

На правах рукописи

Сормачева Ирина Дмитриевна

**ЭВОЛЮЦИЯ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ
ЭЛЕМЕНТОВ В ГЕНОМАХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ОТРЯДА
LEPIDOPTERA**

03.01.09 – математическая биология, биоинформатика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2014

Работа выполнена в лаборатории молекулярно - генетических систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
Блинов Александр Геннадьевич

Официальные оппоненты: **Бажан Сергей Иванович**
доктор биологических наук, доцент,
заведующий теоретическим отделом,
Федеральное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр вирусологии и
биотехнологии "Вектор" Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ
«Вектор»), р.п. Кольцово, Новосибирская
область.

Гусев Владимир Дмитриевич
кандидат технических наук, старший научный
сотрудник, старший научный сотрудник
лаборатории анализа данных, Федеральное
государственное бюджетное учреждение науки
Институт математики им. С.Л. Соболева
Сибирского отделения Российской академии
наук (ИМ СО РАН), г. Новосибирск.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН), г. Москва.

Защита диссертации состоится «___» _____ 201_ г. на утреннем заседании диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (Д 003.011.01) в ИЦиГ СО РАН в конференц-зале Института по адресу:

пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090

тел/факс: (383) 363-49-06 (1321); e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

факс: (383) 333-12-78

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте института www.bionet.nsc.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 201_ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Мобильные генетические элементы (МГЭ) – последовательности ДНК, способные менять свою локализацию в геноме. МГЭ описаны практически для всех эукариотических организмов и могут составлять значительную фракцию их геномов.

МГЭ являются ключевыми факторами нестабильности геномов эукариот и участвуют в изменении структуры и размера геномов, нарушении функций генов и появлении новых функций. Активные исследования МГЭ показали, что с ними связано развитие системы поддержания продолжительности жизни клеток, формирование процесса V(D)J-рекомбинации, возникновение некоторых заболеваний человека, процесс старения, и многие другие свойства организмов-хозяев (Feschotte, Pritham, 2007; St. Laurent *et al.*, 2010; Rostant *et al.*, 2012; Kaer, Speek, 2013).

Благодаря способности к горизонтальному переносу, МГЭ могут участвовать в передаче генетической информации между репродуктивно изолированными и эволюционно удаленными видами. Особый интерес у исследователей горизонтального переноса вызывают МГЭ порядка non-LTR ретротранспозонов (класс I ретротранспозоны) и TIR ДНК транспозонов (класс II ДНК транспозоны). Горизонтальный перенос характерен для TIR ДНК транспозонов, на данные элементы приходится около 40% от всех случаев горизонтального переноса МГЭ, выявленных между геномами эукариот. Горизонтальный перенос non-LTR ретротранспозонов напротив чрезвычайно редкое явление, и наследование данной группы элементов происходит вертикально от родителей к потомкам. Изучение данных групп элементов позволит получить новые данные о разнообразии, особенностях распространения МГЭ и механизме горизонтального переноса.

Несмотря на актуальность проблемы изучения МГЭ, в картине происхождения, разнообразия и распространения МГЭ остается ряд нерешенных вопросов. Изучение данных вопросов осложняется тем, что в литературе накоплены данные о МГЭ, представленных в геномах модельных объектов, таких как *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana* и *Homo sapiens*. Исследования особенностей МГЭ на новых «немодельных» объектах позволит получить дополнительную информацию об эволюции геномов хозяев и МГЭ в целом.

Отряд Lepidoptera (Чешуекрылые) - самый крупный отряд насекомых (Insecta), включающий в себя 47 суперсемейств, 124 семейства, 332 подсемейства и более 157000 видов (Kristensen, 2003; van Nieukerken *et al.*, 2011). Представители данного отряда являются значимыми компонентами природных экосистем, оказывают влияние на деятельность человека и являются удобными

объектами для научных исследований. Большинство представителей отряда имеют сложный жизненный цикл, что может представлять особый интерес в связи с изучением механизма горизонтального переноса МГЭ. Исследования МГЭ из геномов представителей отряда *Lepidoptera* позволят получить информацию о распространении, разнообразии и эволюции МГЭ элементов в геномах насекомых и эволюции геномов хозяев.

В рамках данной работы было проведено исследование распространения, разнообразия и эволюции *CR1* non-LTR ретротранспозонов и *mariner*-like TIR ДНК транспозонов в геномах представителей отряда *Lepidoptera* с помощью биоинформатических и экспериментальных методик. Применение экспериментальных подходов позволило получить последовательности МГЭ представителей отряда, для которых к настоящему моменту не секвенированы полногеномные последовательности. Биоинформатический анализ позволил осуществить поиск МГЭ в секвенированном геноме *Bombyx mori* и проанализировать последовательности, полученные в результате биоинформатического и экспериментального поиска.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлось изучение распространения, разнообразия и эволюции *CR1* non-LTR ретротранспозонов и *mariner*-like TIR ДНК транспозонов в геномах представителей отряда *Lepidoptera*.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследование разнообразия *CR1* non-LTR ретротранспозонов в геноме тутового шелкопряда *Bombyx mori* и геномах других представителей отряда *Lepidoptera* (Insecta).
2. Анализ эволюции *CR1* non-LTR ретротранспозонов в геномах представителей отряда *Lepidoptera*.
3. Исследование разнообразия *mariner*-like TIR ДНК транспозонов в геноме тутового шелкопряда *Bombyx mori* и геномах других представителей отряда *Lepidoptera* и класса Insecta.
4. Анализ эволюции *mariner*-like TIR ДНК транспозонов в геномах представителей отряда *Lepidoptera*.
5. Выявление фактов возможного горизонтального переноса *mariner*-like TIR ДНК транспозонов и *CR1* non-LTR ретротранспозонов в геномах представителей отряда *Lepidoptera*.
6. Поиск и анализ химерных конструкций, содержащих *mariner*-like TIR ДНК транспозоны и *CR1* non-LTR ретротранспозоны, в геномах представителей отряда *Lepidoptera*.

Научная новизна. Впервые было проведено исследование распространения, разнообразия и эволюции *mariner*-like TIR ДНК транспозонов в геномах представителей отряда *Lepidoptera*. Был выявлен новый *mariner*-like

ДНК транспозон *BmmarY* в геноме *Bombyx mori*. Подтвержден горизонтальный перенос *CR1B* non-LTR ретротранспозонов между бабочками семейства Lycaenidae и молями семейства Bombycidae. Продемонстрирован случай горизонтального переноса *mariner*-like ДНК транспозонов и выявлены химерные конструкции, содержащие *mariner*-like ДНК транспозоны со встройкой *CR1B* элементов.

Теоретическая и практическая значимость. В результате проведенного исследования был обнаружен уникальный случай горизонтального переноса *mariner*-like ДНК транспозонов между представителями семейств Lycaenidae и Bombycidae. Был подтвержден горизонтальный перенос *CR1B* non-LTR ретротранспозонов между представителями семейств Lycaenidae и Bombycidae. Были обнаружены свидетельства совместного горизонтально переноса *CR1B* и *mariner*-like элементов и участия *mariner*-like элементов в горизонтальном переносе *CR1B*.

Результаты, полученные в рамках настоящего исследования, вносят вклад в понимание распространения, разнообразия и эволюции *CR1B* non-LTR ретротранспозонов и *mariner*-like ДНК транспозонов в геномах представителей отряда Lepidoptera. Полученные данные могут быть внедрены в образовательный процесс и использованы при разработке векторных конструкций для трансгеноза, основанных на МГЭ насекомых.

Положение, выносимое на защиту. Распространение *Bmmar1*-like, *BmmarY*-like ДНК транспозонов и *CR1B* non-LTR ретротранспозонов в геномах представителей семейств Lycaenidae и Bombycidae произошло в результате горизонтального переноса между представителями данных семейств.

Апробация результатов. Материалы диссертации докладывались на Международной Московской конференции по компьютерной молекулярной биологии (Москва, Россия, 2011), на 6-ом Международном симпозиуме по Молекулярной Биологии Насекомых (Амстердам, Нидерланды, 2011), на 8-ой конференции Международной конференции по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (BGRS\SB'12, Новосибирск, 2012).

Личный вклад автора. Основные результаты работы получены автором самостоятельно. Экспериментальный поиск *CR1* non-LTR ретротранспозонов проводился совместно с к.б.н. Новиковой О.С. и Смышляевым Г.А. Биоинформатический анализ генома *Bombyx mori* осуществлялся в сотрудничестве с Новиковым А.С.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 работ, из которых 2 работы в рецензируемых отечественных журналах и 1 работа в рецензируемом зарубежном журнале.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждений,

выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений. Работа изложена на 137 страницах, содержит 30 рисунков и 3 таблицы. Библиографический указатель литературы включает 200 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологический материал 60 видов из 15 семейств и 8 суперсемейств отряда *Lepidoptera* был предоставлен доктором Ч. Миттером (Мэрилендский университет, США), к.б.н. О. Костериным (Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия), к.б.н. В. Дубатовым (Институт систематики и экологии животных СО РАН, Россия) и доктором Евой Сливинской (Ягеллонский университет, Польша). Для экспериментального поиска и получения последовательностей *CR1* non-LTR ретротранспозонов, *mariner*-like ДНК транспозонов (*MLE*) и химерных элементов *CR1B/MLE* использовались методики ПЦР амплификации, электрофореза, клонирования и секвенирования. Результаты ПЦР амплификации *CR1* non-LTR ретротранспозонов и *MLE* ДНК транспозонов подтверждались методом дот-блот гибридизации. Для подтверждения результатов ПЦР амплификации *CR1B/MLE* элементов были созданы мини библиотеки клонов и проведен скрининг методом «colony lift assay» согласно Sambrook *et al.* (1989). Биоинформатический анализ последовательностей проводили с помощью программ: BLAST (Altschul *et al.*, 1990), ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), Vector NTI v.11.0 (Lu, Moriyama, 2004), UniPRO UGENE v. 1.12.3 (Okonechnikov *et al.*, 2012), MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010).

РЕЗУЛЬТАТЫ

CR1* non-LTR ретротранспозоны в геномах представителей отряда *Lepidoptera

Предпосылкой к проведению настоящей работы является уникальный случай горизонтального переноса (ГП) элементов *CR1B* группы *CR1* non-LTR ретротранспозонов, выявленный при изучении разнообразия данных элементов в геномах бабочек рода *Maculinea* семейства *Lycaenidae*, и молей видов *Bombyx mori* и *Oberthueria caeca* семейства *Bombycidae* (*Lepidoptera*) (Novikova *et al.*, 2007).

В настоящей работе было проведено исследование распространения и разнообразия *CR1* non-LTR ретротранспозонов в геномах 60 видов отряда *Lepidoptera*. В результате экспериментального поиска *CR1* non-LTR ретротранспозонов методом ПЦР амплификации было показано присутствие *CR1* элементов в геномах 55 из 60 исследованных видов. Анализ последовательностей обратной транскриптазы, полученных в результате ПЦР

амплификации, клонирования и секвенирования, показал, что 156 последовательности из 37 видов относятся к *CR1* non-LTR ретротранспозонам, а 162 последовательности относятся к *T1Q*, *Jockey* и *R1* non-LTR ретротранспозонам.

Результат филогенетического анализа последовательностей обратной транскриптазы *CR1*, *T1Q*, *Jockey* и *R1* non-LTR ретротранспозонов, полученных в настоящей работе и доступных в базе данных GenBank, представлен на рис. 1.

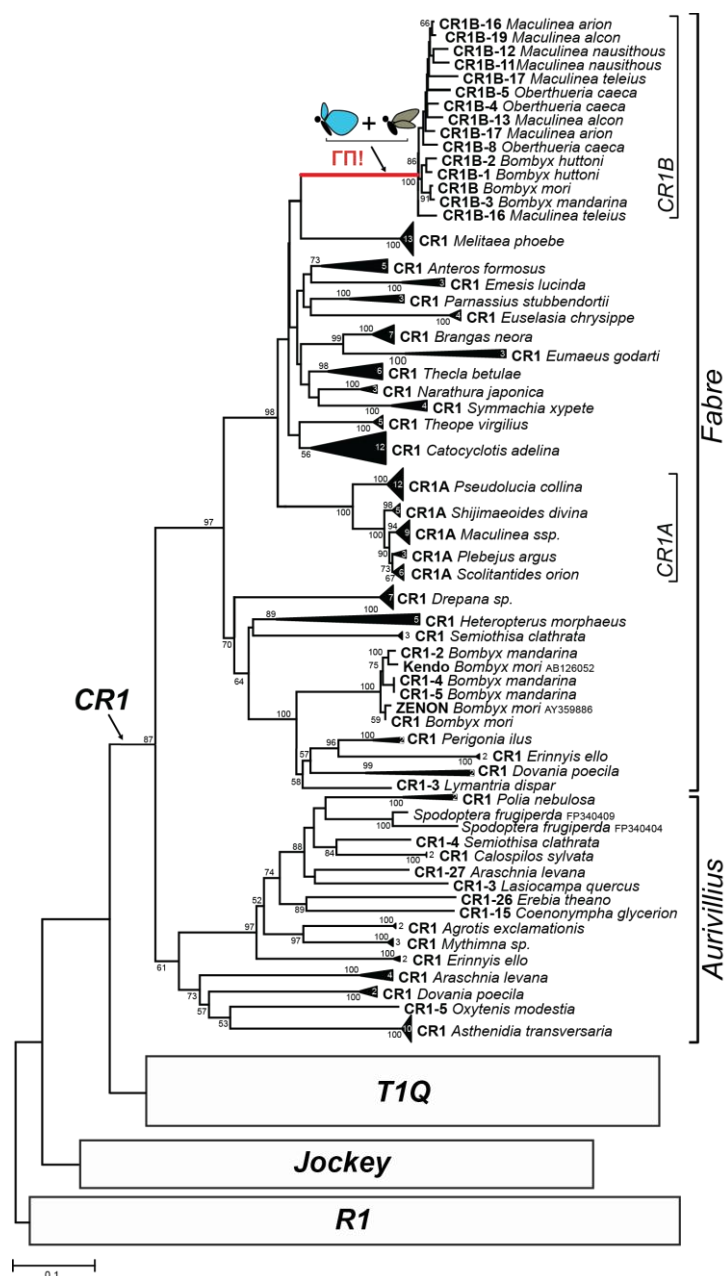


Рис. 1. Бескорневое филогенетическое древо, реконструированное на основе последовательности обратной транскриптазы методом объединения ближайших соседей (NJ) в программе MEGA 5.0. Для оценки достоверности был использован бутстреп-тест (1000 репликаций). Значения коэффициентов поддержки бутстреп-теста менее 50% не показаны. Кластеры *T1Q*, *Jockey* и *R1* представлены схематично. Бабочка голубого цвета обозначает бабочек голубянок семейства Lycaenidae, бабочка коричневого цвета – молей семейства Bombycidae.

Non-LTR ретротранспозоны, представленные в геномах насекомых отряда Lepidoptera, формируют пять крупных кластеров: *T1Q*, *Jockey*, *R1*, *Aurivillius* и *Fabre*. *CR1* non-LTR ретротранспозоны кластера *Fabre* широко представлены в геномах изученных видов отряда Lepidoptera. Данные элементы выявлены в

геномах 20 изученных видов из 11 семейств отряда, в том числе в геномах настоящих бабочек (семейств Lycaenidae, Riodinidae, Nymphalidae и Papilionidae) и молей (семейства Bombycidae). *CR1* non-LTR ретротранспозоны кластера *Aurivillius* характеризуются ограниченным распространением в геномах Lepidoptera (Рис. 1).

Филогения, реконструированная на основе последовательностей элементов *T1Q*, *Jockey*, *R1* и *CR1*, в основном согласуется с филогенией видов хозяев (Рис. 1). Эволюция данных элементов в геномах изученных видов происходила путем вертикального наследования. Исключение составляют элементы кластера *Fabre*. Так, в подгруппе *CR1B* присутствуют элементы исключительно из геномов двух семейств Lycaenidae (род *Maculinea*) и Bombycidae (рода *Bombyx* и *Oberthuria*), которые кластеризуются в одну ветвь. Различие между последовательностями обратной транскриптазы *CR1B* элементов из геномов представителей Lycaenidae и Bombycidae составляет от 3.6% до 4.8%. Неравномерное распределение *CR1B* элементов, высокое сходство последовательностей из геномов эволюционно удаленных видов и несоответствие филогении данных элементов и филогении видов хозяев являются свидетельствами ГП *CR1B* между бабочками Lycaenidae и молями Bombycidae.

Для подтверждения неравномерности распространения *CR1B* элементов в геномах Lepidoptera была проведена дот-блот гибридизация проб, специфичных к элементу *CR1B*, с геномной ДНК 25 видов отряда Lepidoptera (Рис. 2).

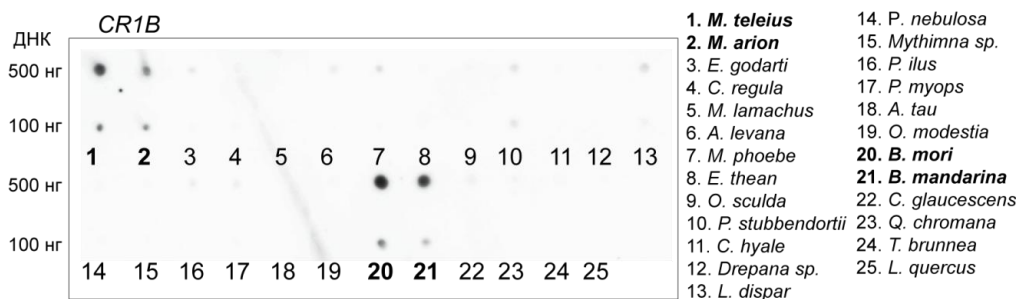


Рис. 2. Результат дот-блот гибридизации образцов ДНК 25 видов бабочек и молей с пробами специфичными к элементу *CR1B*. Список использованных видов приведен справа, номера соответствуют номерам в таблице 3.1. В качестве зонда был использован P^{32} -меченный фрагмент последовательности обратной транскриптазы *CR1B* элемента из *M. teleius*.

Результаты дот-блот гибридизации подтвердили результаты ПЦР амплификации и ограниченное распространение *CR1B* элементов в геномах изученных видов отряда Lepidoptera.

Для подтверждения ГП *CR1B* элементов между геномами бабочек Lycaenidae и молями Bombycidae был проведен «divergence-versus-age» анализ последовательностей обратной транскриптазы non-LTR ретротранспозонов, полученных в данной работе (Рис. 3).

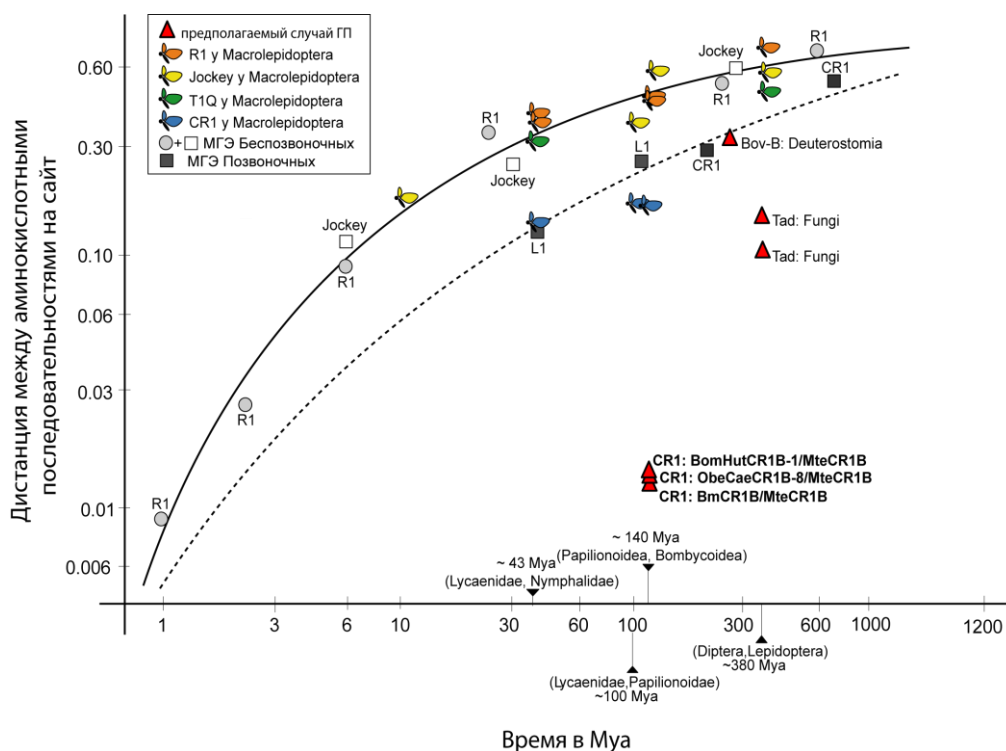


Рис. 3. Результаты «divergence-versus-age» анализа non-LTR ретротранспозонов из геномов Lepidoptera. По оси Y отложены значения различий между аминокислотными последовательностями обратной транскриптазы из различных групп организмов, подсчитанные в программе MEGA. По оси X отложено время дивергенции организмов-хозяев в Mya (Mya - million years ago - миллионы лет назад) (Gaunt, Miles, 2002; Douzery *et al.*, 2004; Nazari *et al.*, 2007). Штрихпунктирная и сплошная линии представляют собой кривые скорости эволюции последовательностей МГЭ позвоночных и артропод, соответственно (согласно Malik *et al.*, 1999).

Согласно результатам «divergence-versus-age» анализа элементы группы *CR1B* характеризуются низкой скоростью эволюции аминокислотных последовательностей обратной транскриптазы по сравнению с элементами *R1*, *Jockey* и *T1Q*, и контролем (Malik *et al.*, 1999) (Рис. 3). Снижение скорости эволюции подтверждает ГП *CR1B* элементов между геномами бабочек *Lycaenidae* и молей *Bombycidae*.

ГП non-LTR ретротранспозонов является редким событием, механизм которого не установлен. Одним из возможных механизмов является перенос данных элементов в составе химерных конструкций, в случае которых последовательности non-LTR ретротранспозонов встроены в ДНК транспозоны. В настоящей работе было сделано предположение о том, что *mariner*-like TIR ДНК транспозоны (*MLE*) принимают участие в горизонтальном переносе *CR1B* non-LTR ретротранспозонов между представителями отряда Lepidoptera.

Для подтверждения данного факта был проведен биоинформатический поиск химерных конструкций типа *CR1B/MLE* в геноме *B. mori*. В результате поиска было обнаружено два локуса, содержащих элементы *Bmmar*-like (*MLE*) и *BmCR1B* (Рис. 4).

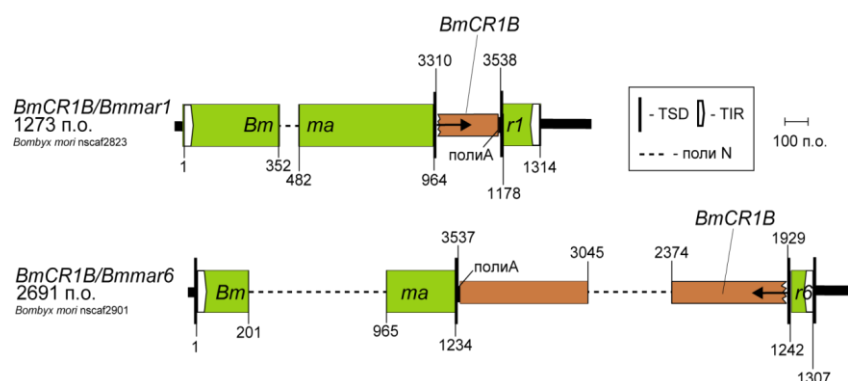


Рис. 4. Структура химерных последовательностей *BmCR1B/MLE* из генома *B. mori*. Цифры внизу рисунка соответствуют позициям нуклеотидной последовательности *MLE*; цифры над рисунком соответствуют позициям нуклеотидной последовательности *BmCR1B*, стрелки указывают направление ориентации последовательности. Аббревиатура: п.о.- пары оснований, TIR - terminal inverted repeat (концевые инвертированные повторы), TSD - target site duplication (дупликация сайта – мишени).

Химерные конструкции представляют собой полноразмерный *Bmmar*-like *MLE* элемент, содержащий встройку нарушенного *CR1B* элемента, и могут являться результатом ГП данных элементов.

Mariner-like TIR ДНК транспозоны в геномах представителей отряда Lepidoptera

Для проверки гипотезы участия *MLE* TIR ДНК транспозонов в ГП *CR1B* элементов был проведен анализ распространения и разнообразия *MLE* ДНК элементов в геномах представителей класса Insecta и отряда Lepidoptera. Биоинформатический поиск и анализ последовательностей *MLE* из геномов Insecta, представленных в базе данных GenBank, показал присутствие элементов 13 подсемейств семейства *mariner* и по одному подсемейству семейств *mori* и *ludens* (*MLE*). Разнообразие *MLE* элементов в геномах Lepidoptera ограничивается шестью подсемействами *mariner* (*DTTMarCRI*, *cecropia*, *mauritiana*, *mellifera*, *vertumana*, *irritans*) и семейством *mori*. Биоинформатический анализ генома *B. mori* позволил выявить 6 *MLE* (*Bmmar1-6*), описанных ранее, и один новый элемент *BmmarY*.

Экспериментальный поиск *MLE* элементов в геномах 60 видов отряда Lepidoptera, проведенный с помощью ПЦР с праймерами, специфичными к центральной части гена транспозазы, выявил присутствие данных элементов в геномах 36 видов. Результат филогенетического анализа последовательностей транспозазы *MLEs*, полученных в рамках данной работы с помощью теоретических и экспериментальных методов, представлен на рис. 5. *MLEs* из геномов представителей отряда Lepidoptera, полученные в результате экспериментального поиска, распределяются между пятью кластерами *MLE* элементов: *cecropia*, *mellifera*, *mauritiana*, *mori* и *vertumana* (Рис. 5).

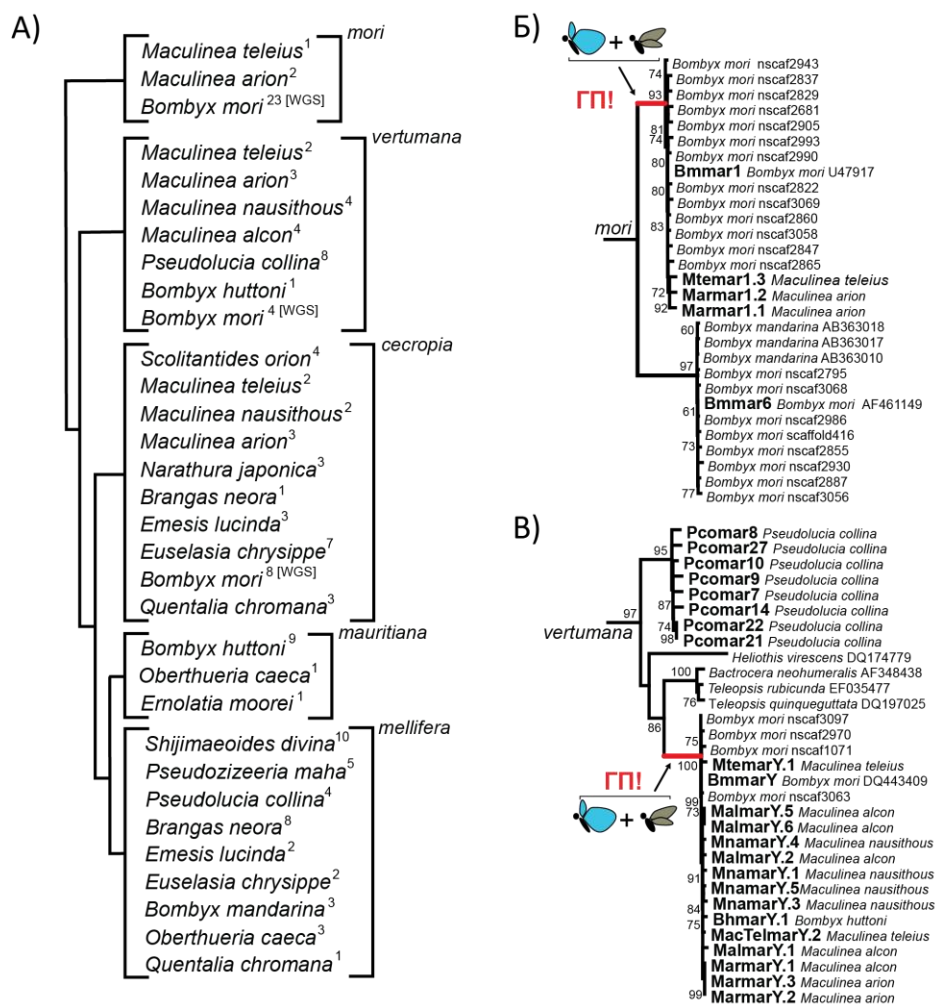


Рис. 5. Схематичное представление филогенетического дерева, реконструированного на основе последовательностей транспозазы *mariner*-like элементов (*MLEs*). А) Иллюстрирует все подсемейства *MLEs* выявленные в геномах изученных видов отряда *Lepidoptera*. Число последовательностей, использованных в анализе, указано после названия вида. Б) и В) Детальные представления ветвей *mori* и *vertumana*. Бабочка голубого цвета обозначает бабочек голубянок семейства *Lycaenidae*, бабочка коричневого цвета – молей семейства *Bombycidae*. Аббревиатура: ГП – горизонтальный перенос; WGS - whole genome sequencing (полногеномное секвенирование).

Наиболее многочисленными являются кластеры *mauritiana*, *cecropia* и *mellifera*. Элементы данных кластеров распространены равномерно в геномах изученных видов. *MLE* элементы, по-видимому, эволюционировали в геномах представителей отряда *Lepidoptera* путем вертикального наследования. Исключение составляют элементы кластеров *vertumana* и *mori*. Элементы кластеров *mori* (*Bmmar1*-like) и *vertumana* (*BmmarY*-like) представлены исключительно в геномах представителей родов *Maculinea* и *Bombyx*, и характеризуются высоким сходством последовательностей внутри кластеров при межвидовых и внутривидовых сравнениях (Рис. 5). Перечисленные факты

свидетельствуют о возможном горизонтальном переносе данных элементов между геномами представителей *Lycaenidae* и *Bombycidae*.

Сравнения последовательностей коротких фрагментов гена транспозазы недостаточно для достоверного разрешения эволюционных взаимоотношений *MLE* элементов из геномов *Bombyx* и *Maculinea*. Для подтверждения горизонтального переноса *Bmmar*-like было проанализировано разнообразие и распространение полноразмерных последовательностей элементов *vertumana* (*BmmarY*-like), *mori* (*Bmmar1*-like и *Bmmar6*-like) и *secropia* (*Bmmar3*-like) в геномах представителей родов *Maculinea*, *Bombyx* и некоторых других групп отряда *Lepidoptera* (28 видов), с помощью ПЦР амплификации.

В результате ПЦР амплификации было показано, что полноразмерные копии элементов *Bmmar3*-like распространены равномерно среди изученных видов. Распространение элементов *Bmmar1*-like, *Bmmar6*-like и *BmmarY*-like среди представителей *Lepidoptera* ограничено родами *Bombyx* (*Bombycidae*) и *Maculinea* (*Lycaenidae*). Уровень сходства последовательностей *BmmarY*-like элементов из геномов *Bombyx* и *Maculinea* является высоким (96.6%) и соответствует уровню сходства последовательностей внутри данных родов. Аналогичные результаты получены для *Bmmar1*-like элементов: сходство последовательностей из геномов *Bombyx* и *Maculinea* составляет 92.3%. В случае *Bmmar3*-like элементов сходство последовательностей из геномов *Bombyx* и *Maculinea* составляет 84.1%, а внутри родов уровень сходства составляет 90.1% и 93.9%, соответственно.

Результаты ПЦР амплификации, демонстрирующие неравномерное распространение *Bmmar1*-like и *BmmarY*-like элементов в геномах изученных видов, были подтверждены с помощью дот-блот гибридизации (Рис. 6).

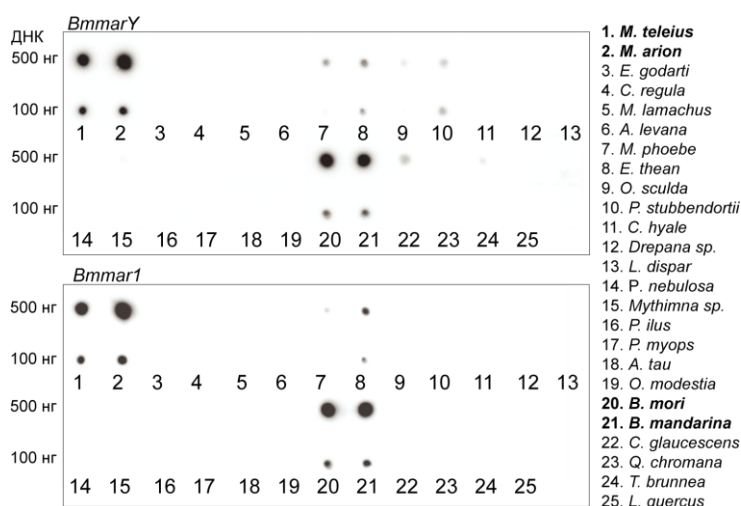


Рис. 6. Результат дот-блот гибридизации образцов ДНК 25 видов бабочек и молей с пробами специфичными к элементам *Bmmar1*-like и *BmmarY*-like. Список использованных видов приведен справа, номера соответствуют номерам в таблице 3.1. В качестве зонда был использован P^{32} -меченный фрагмент последовательности обратной транскриптазы *CR1B* элемента из *M. teleius*.

Филогенетический анализ полноразмерных *Bmmar*-like элементов и других полноразмерных *MLE*, представленных в базе данных GenBank, выявил

Для последовательностей данных элементов невозможно провести выделение отдельных ветвей, соответствующих различным родам и видам. Таким образом, *Bmmar1*-like и *BmmarY*-like не образуют ветвей на филогенетическом дереве, согласующихся с их видовой принадлежностью. Элементы *Bmmar3*-like в кластере *secropia*, напротив, образуют ветви согласно видовой принадлежности (Рис. 7).

Высокое сходство последовательностей *Bmmar1*-like и *BmmarY*-like элементов из геномов эволюционно удаленных видов (семейств *Lycaenidae* и *Bombycidae*), их неравномерное распространение в геномах изученных видов *Lepidoptera* и несоответствие филогении основанной на данных элементах и филогении видов хозяев являются признаками ГП *Bmmar1*-like и *BmmarY*-like элементов.

Для подтверждения ГП *Bmmar1*-like и *BmmarY*-like элементов между бабочками *Lycaenidae* и молями *Bombycidae* было проведено сравнение числа синонимичных замен на синонимичный сайт (dS) для данных элементов. В случае если МГЭ попал в геном в результате вертикального наследования, dS в последовательностях МГЭ должна соответствовать dS ядерных генов геномов хозяев. Если МГЭ был перенесен в геном горизонтально, то значение dS его последовательности МГЭ должно быть значительно ниже, чем dS генов хозяина.

Для сравнительного анализа dS были использованы три группы последовательностей: последовательности ядерных генов (*wg*, *EF1a* и *H3*), наследование которых происходило вертикально; последовательности *BmmarY*-like и *Bmmar1*-like элементов из геномов *B. mori* и *Maculinea* (*M. teleius*, *M. nausithous*, *M. arion* и *M. alcon*), для которых предполагается горизонтальный перенос и последовательности *Bmmar3*-like элементов из геномов *Bombyx mori* и *Maculinea* (*M. teleius*, *M. nausithous*, *M. arion* и *M. alcon*), эволюция которых, по-видимому, происходила вертикально.

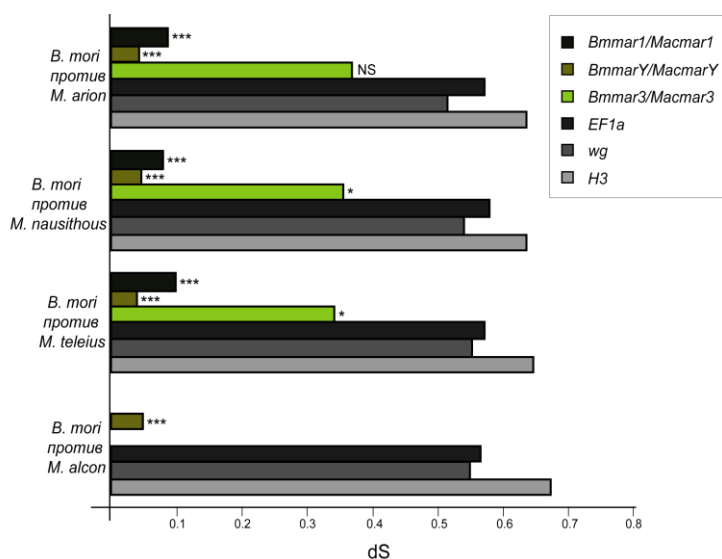


Рис. 8. Значения dS для *mariner* – like элементов *Bmmar1*, *BmmarY* и *Bmmar3*, и ядерных генов фактора элонгации альфа (*EF1a*), wingless (*wg*) и гистона *H3* (*H3*) в попарных сравнениях между *B. mori* и видами *M. arion*, *M. nausithous*, *M. teleius*, и *M. alcon*. Результаты точного теста Фишера: *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; NS – не достоверно (non-significant).

dS в случае *BmmarY*-like и *Bmmar1*-like элементов для всех исследованных пар была достоверно ниже значений dS ядерных генов. Полученные результаты подтверждают гипотезу о горизонтальном переносе *BmmarY*-like и *Bmmar1*-like элементов между геномами бабочек семейства *Lycaenidae* и молей семейства *Bombycidae*.

Совместный горизонтальный перенос *CR1B* non-LTR ретротранспозонов и *mariner*-like ДНК транспозонов

Процессы ГП *CR1B* non-LTR ретротранспозонов и *BmmarY*-like и *Bmmar1*-like *MLE* ДНК транспозонов могли произойти независимо. Однако ГП элементов из двух различных групп МГЭ между определенными группами организмов и наличие химерных конструкций *CR1B/MLE* в геноме *B. mori* свидетельствуют о совместном переносе данных элементов. В случае если *MLE* элементы принимали участие в ГП *CR1B* non-LTR ретротранспозонов между представителями отряда *Lepidoptera*, химерные конструкции аналогичные конструкциям, выявленным в геноме *B. mori*, должны присутствовать в геномах *Maculinea*.

Экспериментальный поиск химерных конструкций, содержащих последовательности *Bmmar*-like и *CR1B* элементов, в геномах представителей отряда *Lepidoptera* (*M. teleius*, *M. arion*, *B. mori* и *B. mandarina*.) проводился с помощью методик ПЦР амплификации и «colony lift assay». В результате поиска были выявлены фрагменты, содержащие последовательности как *MLE*, так и *CR1B* элементов. Две химерные последовательности *CR1B/MLE* были обнаружены в геноме *M. teleius* (*MacCR1B/MtemarY*-1 и *MacCR1B/MtemarY*-2) и одна в геноме *M. arion* (*MacCR1B/MarmarY*) (Рис. 9).

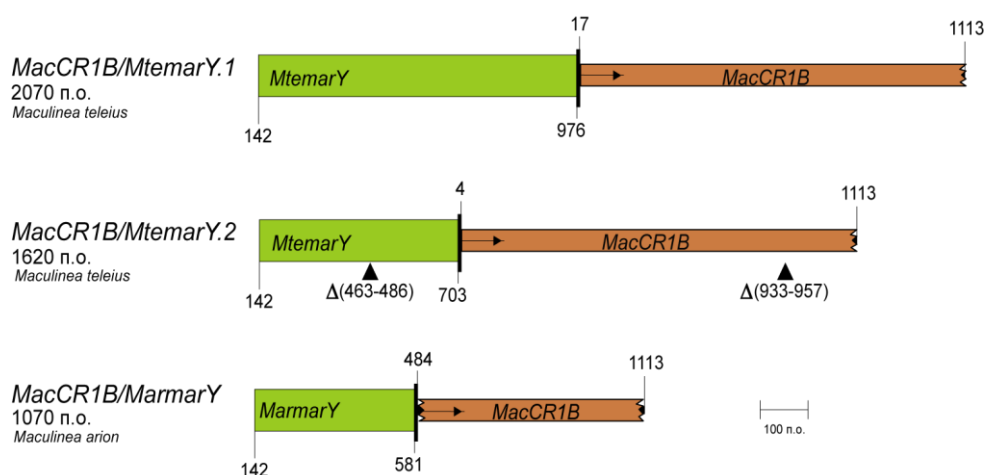


Рис. 9. Структурная организация химерных элементов *CR1B/MLE* из геномов представителей рода *Maculinea*. Цифры внизу рисунка соответствуют позициям консенсусной последовательности *MLEs*; цифры над рисунком соответствуют позициям консенсусной последовательности *MacCR1B*. Черные треугольники обозначают делетированные участки, стрелки указывают направление ориентации последовательности.

Сравнительный анализ полученных последовательностей показал, что они значительно отличаются между собой и отличаются от химерных последовательностей, выявленных ранее в геноме *B. mori*. Анализ транслированных последовательностей полученных с помощью программы ORF Finder выявил один элемент *MacCR1B/MtemarY-1* (JQ580972) в случае которого встройка *CR1B* элемента не нарушила рамку считывания ДНК транспозона. Данная структура, возможно, представляют собой химерную конструкцию, участвовавшую в горизонтальном переносе.

Таким образом, в результате работы был подтвержден факт горизонтального переноса *CR1B* non-LTR ретротранспозонов, *Bmmar1*-like и *BmmarY*-like ДНК транспозонов между геномами представителей эволюционно удаленных групп отряда Lepidoptera (Рис. 10).

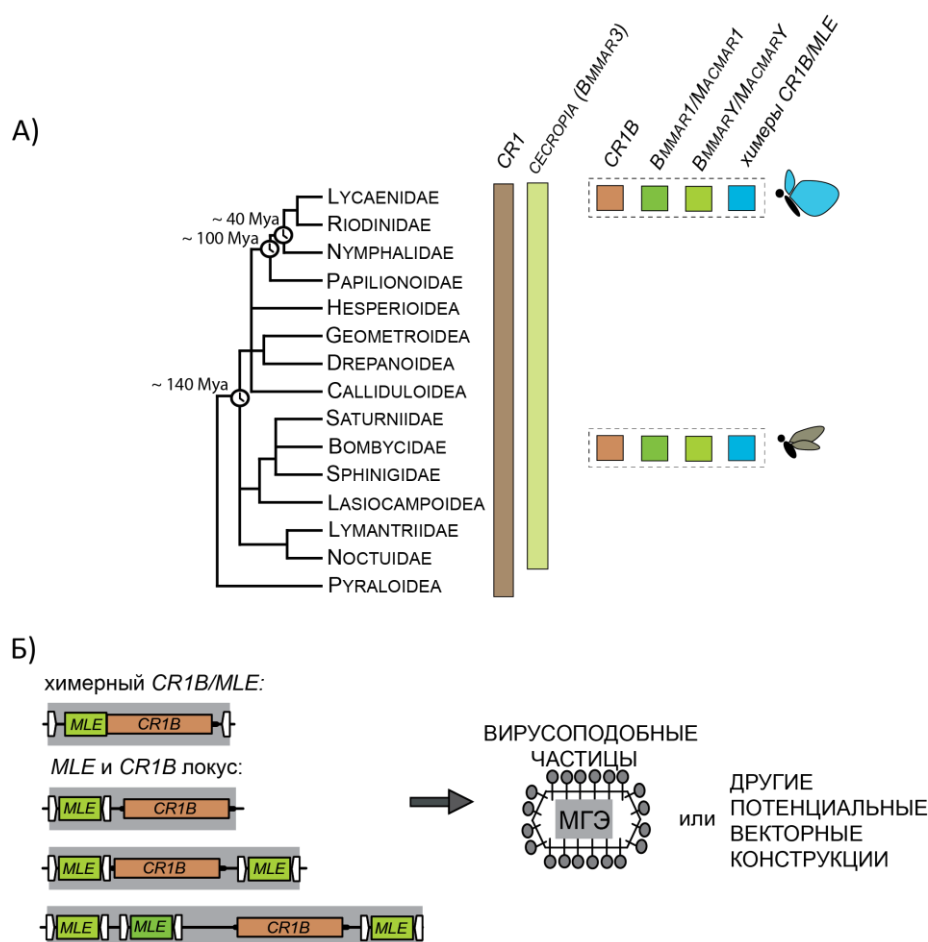


Рис. 10. (А) Распространение *CR1* non-LTR ретротранспозонов, *MLE* ДНК транспозонов и химерных элементов *CR1B/MLE* в геномах представителей отряда Lepidoptera. Филогения видов отряда представлена согласно Tree of Life Web Project (<http://tolweb.org/>). (Б) Предполагаемая структура конструкций, участвовавших в горизонтальном переносе и механизм горизонтального переноса. Аббревиатура: МГЭ – мобильные генетические элементы, *MLEs* - *mariner* – like elements (*mariner*-like подобные элементы). Бабочка голубого цвета обозначает бабочек голубянок семейства Lycaenidae, бабочка коричневого цвета – молей семейства Bombycidae.

В геномах *B. mori* и геномах видов рода *Maculinea* обнаружены химерные конструкции, содержащие последовательности *CR1B* элементов, встроенные в последовательность *MLE* элементов. Вышеперечисленные результаты свидетельствуют о возможном участии ДНК транспозонов в ГП поп-LTR ретротранспозонов. *MLE* элементы обладают высокой способностью к ГП. *MLE* могут перенести поп-LTR ретротранспозон из одного сайта в другой, если поп-LTR ретротранспозон встроен в последовательность *MLE* (химерный конструкт). *MLE* могут перенести участок ДНК между двумя *MLE* элементами (Рис. 10). Полученные данные, тем не менее, не позволяют полностью исключить возможность того, что ГП *CR1B* поп-LTR ретротранспозонов между геномами представителей *Bombycidae* и *Lycaenidae* произошел независимо от перемещения *MLE* элементов.

Механизм ГП *CR1B* поп-LTR ретротранспозонов и *MLE* ДНК транспозонов неизвестен. Для успешного горизонтального переноса ДНК транспозонов и поп-LTR ретротранспозонов требуется наличие вектора и возможности взаимодействия генома донора с геномом реципиентом (Wallau *et al.*, 2012). В роли переносчика мог выступать любой общий агент бабочек и молей: бактерия, внутриклеточный паразит, симбионт, вирус и т.д. Подобным вектором может являться микроспориций *Nosema bombycis*, для которого показаны случаи горизонтального переноса ДНК транспозонов *hAT* и *MITE* между геномом *Nosema bombycis* и геномом *B. mori* (Zhang *et al.*, 2013a; Zhang *et al.*, 2013b). Потенциальным местом взаимодействия генома донора с геномом реципиентом может являться гнездо муравьев рода *Myrmica*. Одна из стадий жизненного цикла (стадия гусеницы) бабочек *Maculinea* протекает в муравьином гнезде, а моли семейства *Bombycidae* могут попасть в муравейник в качестве объекта питания. Таким образом, муравейник представителей рода *Myrmica* является идеальным местом для прямого контакта бабочек *Maculinea* и молей семейства *Bombycidae* и перекрестного заражения паразитами, являющимися потенциальными векторами ГП.

Заключение

В ходе работы был проведен анализ распространения и разнообразия мобильных генетических элементов групп *CR1* поп-LTR ретротранспозонов и *mariner*-like TIR ДНК транспозонов в геномах представителей отряда *Lepidoptera*. Выявлен горизонтальный перенос *CR1B* поп-LTR ретротранспозонов и *BmmarY*-like и *Bmmar1*-like *MLE* ДНК транспозонов между геномами представителей семейств *Lycaenidae* и *Bombycidae*. В геномах *Bombyx mori*, *Maculinea teleius* и *Maculinea arion* были выявлены химерные конструкты *CR1B/MLE*.

ВЫВОДЫ

1. Проведен поиск non-LTR ретротранспозонов в геномах 60 видов отряда Lepidoptera и установлены их филогенетические взаимоотношения. Показано присутствие четырех филогенетических групп non-LTR ретротранспозонов (*CR1*, *T1Q*, *Jockey* и *R1*) в геномах представителей отряда Lepidoptera. Элементы группы *CR1* представлены двумя кластерами *Aurivillius* и *Fabre*.
2. Подтвержден факт горизонтального переноса *CR1B* non-LTR ретротранспозонов между геномами представителей семейств Lycaenidae (род *Maculinea*) и Bombycidae (рода *Bombyx* и *Oberthueria*).
3. В геномах видов отряда Lepidoptera выявлено шесть подсемейств семейства *mariner* (*DTTMarCRI*, *cecropia*, *mauritiana*, *mellifera*, *vertumana*, *irritans*) и семейство *mori mariner-like* ДНК транспозонов. Установлены их филогенетические взаимоотношения.
4. В геноме *Bombyx mori* обнаружен новый элемент *BmmarY*, принадлежащий к подсемейству *vertumana mariner-like* ДНК транспозонов.
5. Установлен факт горизонтального переноса *BmmarY-like* и *Bmmar1-like* ДНК транспозонов между геномами представителей семейств Lycaenidae (род *Maculinea*) и Bombycidae (род *Bombyx*).
6. В геномах *Bombyx mori*, *Maculinea teleius* и *Maculinea arion* были выявлены химерные *mariner-like* ДНК транспозоны, содержащие встройки *CR1B* non-LTR ретротранспозонов. Данные конструкции могут являться результатом совместного горизонтального переноса *CR1B* non-LTR ретротранспозонов и *mariner-like* ДНК транспозонов, что свидетельствуют об участии *mariner-like* элементов в горизонтальном переносе *CR1B* элементов между видами отряда Lepidoptera.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Сормачева И.Д.**, Новиков А.С., Блинов А.Г. Распространение и филогенетические взаимоотношения *Tc1-Mariner* ДНК транспозонов в отряде *Lepidoptera* // Евразийский энтомологический журнал. 2010. Т. 9. № 3. С. 430-432.
2. **Sormacheva I.**, Novikov A., Blinov A. Vertical evolution and horizontal transmission of *Tc1/mariner* superfamily DNA transposons in Lepidopteran species // Proceedings of international Moscow conference on computational molecular biology - MCCMB'11. 2011. Moscow. Russia. P. 349-350.
3. **Sormacheva I.**, Novikov A., Blinov A. The evolution and diversity of *Tc1/mariner* superfamily DNA transposons in the genomes of Lepidoptera species // Proceedings of the Sixth International Symposium on Molecular Insect Science. 2011. Amsterdam, The Netherlands. P. 123.

4. **Сормачева И.Д.**, Блинов А.Г. LTR-ретротранспозоны растений. Вавиловский журнал Генетики и Селекции. 2011. Т. 15. №2. С. 351-381.
5. **Sormacheva I.**, Blinov A. The recurrent horizontal transfers of different transposable elements between Lepidoptera species // Proceedings of the eighth international conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology — BGRS\SB-2012. 2012. Novosibirsk, Russia. V. 1 P. 302.
6. **Sormacheva I.**, Smyshlyaev G., Mayorov V., Blinov A., Novikov A., Novikova O. Vertical Evolution and Horizontal Transfer of CR1 Non-LTR Retrotransposons and Tc1/mariner DNA Transposons in Lepidoptera Species // Mol. Biol. Evol. 2012. V. 29. P. 3685-3702.