

УДК 577.29, УДК 575.85

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СИСТЕМЫ ГЕНОВ *hsp70* У ДВУХ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА STRATIOMYIDAE (DIPTERA)

И.А. Юшенова¹, О.Г. Зацепина¹, А.А. Пржиборо², М.Б. Евгеньев¹, Д.Г. Гарбуз¹

¹Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва;

²Зоологический институт РАН, г. Санкт-Петербург;

e-mail: irinayushenova@mail.ru, dgarbuz@yandex.ru)

Структура кластера генов *hsp70* изучалась у двух видов двукрылых семейства Stratiomyidae (*Stratiomys singularior* и *Oxycera pardalina*), личинки которых обитают в прибрежно-водных биотопах, контрастных по температурному режиму и по составу и концентрации солей. Было показано, что кластер генов *hsp70* *S. singularior* состоит из пяти копий и имеет компактную организацию (интервалы между генами не превышают 5 т.п.н.). Кластер генов *hsp70* *O. pardalina* состоит из четырех копий, расположенных на значительно больших расстояниях друг от друга, чем у *S. singularior*, и включает также ген *hsp68*. Обнаружена высокая вариабельность структуры кластера генов *hsp70* *S. singularior*.

Ключевые слова: *Stratiomyidae*, кластер генов *hsp70*.

Важную роль в адаптации организмов к изменениям условий окружающей среды обитания играет семейство белков теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (БТШ70) [1–3]. Эти белки (молекулярные шапероны) выполняют в клетке функцию предотвращения денатурации и агрегации белков в стрессовых условиях [4, 5]. У большинства изученных организмов гены, кодирующие БТШ70 (*hsp70*), организованы в виде кластера [6]. Изучение структуры кластера генов *hsp70* у родственных видов, живущих в контрастных условиях среды обитания, необходимо для выявления возможных путей эволюции этой высококонсервативной защитной системы организма в ходе адаптации. Данное исследование было выполнено на личинках мух различных видов семейства Stratiomyidae. Stratiomyidae — широко распространенное семейство подотряда Brachycera (Diptera), насчитывающее в настоящее время около 2800 видов [7]. Семейство Stratiomyidae является малоизученным, но интересным в плане адаптации к различным температурным режимам. Для работы были выбраны популяции двух видов, личинки которых развиваются в биотопах, контрастных по температурному и химическому режиму. Это популяция эвритопного вида *Stratiomys singularior* (Harris), личинки которого развиваются по берегам высокоминерализованных озер Крыма (температура биотопа колеблется от 0° до 35° в течение сезона, общая минерализация 30–300 г/л), и *Oxycera pardalina* (Meigen) из родниковых выходов в Ленинградской обл. с температурой (4–10°). Изучаемые виды принадлежат к трибам, дивергировавшим друг от друга предположительно 60 млн лет назад [8]. Было интересно сравнить структуру и число генов *hsp70* у этих контрастных видов с целью

выявить изменения в их структуре, возможно, несущие адаптивный характер.

Материалы и методы

Получение геномных библиотек. Из личинок мух *S. singularior* и *O. pardalina* выделяли геномную ДНК [9]. Клонотеки были получены путем частичного гидролиза геномной ДНК рестриктазой *Sau3A* и последующего лигирования полученных фрагментов с плечами вектора λ DASH (Stratagene). Амплификацию и скрининг полученных библиотек проводили по методам, описанным Маниатисом [10]. Для гибридизации использовали зонд к гену *hsp70* (кДНК *hsp70* *S. singularior*). Для выделения ДНК из индивидуальных клонов использовали стандартную методику [10].

Субклонирование и секвенирование фрагментов ДНК. В качестве вектора использовалась фагемида pBluescript SK⁺. ДНК рекомбинантных фагов расщепляли соответствующими рестриктазами и разделяли в агарозном геле, после чего выделяли из агарозы нужные фрагменты, используя набор фирмы “Quiagen”. Лигирование фрагментов и вектора проводили согласно инструкции производителя лигазы (Fermentas). Трансформацию химически компетентных клеток проводили по методике [10]. Плазмидную ДНК выделяли при помощи набора реактивов “FlexiPrep” (Amersham). Полученные плазмиды секвенировали с использованием геноспецифических праймеров.

Результаты и обсуждение

Гены *hsp70* *S. singularior* организованы в виде кластера, состоящего из пяти копий, две из кото-

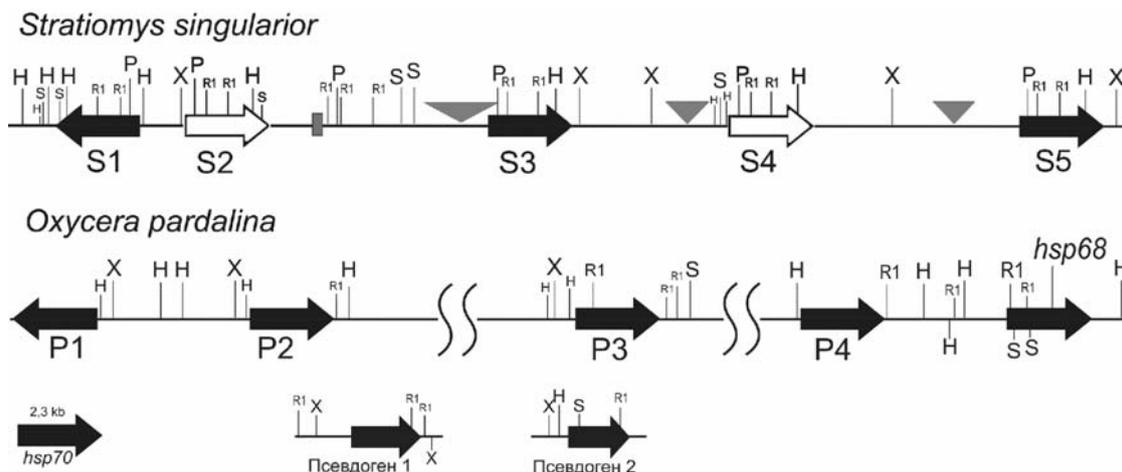


Рис. 1. Структуры кластера генов *hsp70* *S. singularior* и *O. pardalina*. Прямоугольником отмечен фрагмент мобильного элемента *Mariner*, треугольниками — области делеций. Ферменты рестрикции: H — *HindIII*, P — *PstI*, R1 — *EcoRI*, S — *SalI*, X — *XbaI*. Гены, делеции которых отмечаются в популяции *S. singularior* (S2 и S4), показаны белыми стрелками

рых расположены в виде инвертированного повтора, а остальные в тандемной ориентации к гену S2. Весь кластер занимает ~29 т.п.н. (рис. 1). Структура кластера была построена в результате анализа десяти перекрывающихся фагов. Нами обнаружены значительные перестройки кластера генов *hsp70* *S. singularior*, а именно высокий индивидуальный полиморфизм в виде протяженных делеций как генов, так и межгенных участков. В межгенном интервале между генами S2 и S3 обнаружен фрагмент мобильного элемента *Mariner*, возможно, участвовавший в эволюции кластера. Также наблюдается полиморфизм между кодирующими последовательностями разных копий. На нуклеотидном уровне различия варьируют от 0,6 до 1,5%, а на аминокислотном — от 0,3 до 0,9%. Такие значительные различия между копиями генов *hsp70* в отряде *Diptera* обнаружены впервые. Так, между семью копиями генов *hsp70* в области ORF у *Drosophila virilis* нет ни одной аминокислотной замены [11]. Показано [12], что идентичность копий генов у *Drosophila* поддерживается за счет механизма конверсии. По-видимому, у семейства *Stratiomyidae* этот механизм не действует. Возможно, в условиях значительных колебаний температуры и концентрации солей происходят частые перестройки структуры кластера генов *hsp70*; впоследствии адаптивно выгодные изменения закрепляются действием естественного отбора.

У *O. pardalina* обнаружены четыре гена *hsp70*. Из них два также организованы в виде инвертированного повтора, но расстояние между ними больше, чем у *S. singularior* и составляет 4,5 т.п.н., а остальные две копии находятся на значительном расстоянии друг от друга (> 9 т.п.н.). У *O. pardalina* обнаружены также два псевдогена и один ген, сходный с остальными на 73% и, вероятно, являющийся *hsp68*, расположенный на расстоянии 4 т.п.н. от

гена P4 (рис. 1). Данный факт представляет большой интерес, так как у всех описанных видов *Diptera* гены *hsp70* и *hsp68* расположены в разных участках генома.

Увеличение расстояния между копиями генов *hsp70* ранее было выявлено нами у северного вида *Drosophila* группы *virilis* — *D. lummei* — по сравнению с южным, более термоустойчивым видом *D. virilis* [12]. Кроме того, одна из копий *hsp70* *D. lummei* является псевдогеном. Мы полагаем, что компактное строение кластера способствует координированной индукции генов в условиях стресса. Действительно, уровень индукции БТШ70 при тепловом шоке у *D. virilis* выше, чем у *D. lummei* [12]. Ранее нами было показано [13], что уровень экспрессии БТШ70 у *S. singularior*, также имеющего более ком-

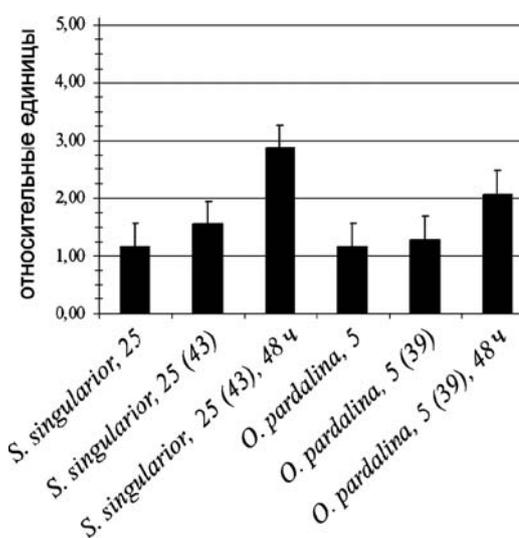


Рис. 2. Результаты вестерн-блоттинга белков из *S. singularior* и *O. pardalina* с антителами 7FВ, узнающими БТШ70. До скобок указана температура содержания личинок, в скобках температура теплового шока в течение 30 мин, после скобок — время восстановительного периода

пактную структуру кластера генов *hsp70*, выше, чем у *O. pardalina* (рис. 2). Таким образом, наши данные позволяют сделать вывод об организации генов *hsp70* в виде компактного кластера у видов, адаптированных к резким перепадам температур и другим агрессивным воздействиям внешней среды. У видов, обитающих в стабильных условиях, происходит увеличение расстояний между генами. Часть генов *hsp70* при этом теряют функциональность и превращаются в псевдогены.

Число HSE-последовательностей (участков связывания транскрипционного фактора теплового шока) варьирует у разных генов *S. singularior*. ТАТА-боксы у *S. singularior* имеют структуру ТАТАТАТА, тогда как у *O. pardalina* — ТАТАААТА. Уровень сходства между генами *hsp70* *S. singularior* и *O. pardalina* составляет 80% на нуклеотидном уровне и 93% на уровне аминокислотной последовательности кодируемых белков БТШ70.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lindquist S. The heat-shock response // Ann. Rev. Biochem. 1986. Vol. 55. P. 1151–1191.
2. Lindquist S., Craig E.A. A heat shock proteins // Ann. Rev. Genet. 1988. Vol. 22. P. 631–667.
3. Feder M.E., Hofmann G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response, evolutionary and ecological physiology // Ann. Rev. Physiol. 1999. Vol. 61. P. 243–282.
4. Fink A.L. Chaperone-mediated protein folding // Physiol. Rev. 1999. Vol. 79. P. 425–449.
5. Hartl F.U., Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein // Science. 2002. Vol. 295. P. 1852–1858.
6. Bettencourt B.R., Feder M.E. *Hsp70* duplication in the *Drosophila melanogaster* species group: how and when did two become five? // Mol. Biol. Evol. 2001. Vol. 18. N 7. P. 1272–1282.
7. Wiegmann B.M., Yeates D.K., Thorne J.L., Kishino H. Time flies, a new molecular time scale for Brachyceran fly evolution without a clock // Systematic Biology. Vol. 2003. P. 745–756.
8. Brammer C.A., von Dohlen C.D. Evolutionary history of Stratiomyidae (Insecta: Diptera): the molecular phylogeny

Выводы

Проведенный сравнительный анализ генов *hsp70* у двух видов Diptera позволил вскрыть характерные отличия в структурной организации этой важнейшей “стресс-системы” и выявить различные направления эволюции этой системы у видов, резко отличающихся по условиям обитания. Сравнение полученных данных с аналогичными результатами для различных видов *Drosophila* позволяет предположить, что время дивергенции между *S. singularior* и *O. pardalina* равно примерно 55–60 млн лет, что соответствует литературным данным. Таким образом, гены *hsp70* в ряде случаев можно использовать для установления филогенетических отношений.

* * *

Работа выполнена при поддержке гранта МКБ для М. Евгеньева и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 09-04-00660а).

of a diverse family of flies // Mol. Phylogenet. Evol. 2007. Vol. 3. P. 660–673.

9. Molecular cloning: a lab. Manual / Sambrook and Russel. Cold Spring Harbor press, 2001. Chapter 6.4.

10. Методы генетической инженерии // Молекулярное клонирование / Под ред. Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. М.: Мир, 1984. С. 480.

11. Evgenyev M.B., Zatssepina O.G., Garbuz D.G., Lerman D.N., Velikodvorskaia V.V., Zelentsova E.S., Feder M.E. Evolution and arrangement of the *hsp70* gene cluster in two closely related species of the *virilis* group of *Drosophila* // Chromosoma. 2004. Vol. 113. P. 223–32.

12. Ish-Horowicz D., Leigh Brown A.J. Evolution of the 87A and 87C heat-shock loci in *Drosophila* // Nature. 1981. Vol. 290. P. 677–682.

13. Garbuz D.G., Zatssepina O.G., Przhiboro A.A., Yushenova I., Guzhova I.V., Evgen'ev M.B. Larvae of related Diptera species from thermally contrasting habitats exhibit continuous up-regulation of heat shock proteins and high thermo-tolerance // Mol. Ecol. 2008. Vol. 17. P. 4763–4777.

Поступила в редакцию
09.04.10

A COMPARATIVE ANALYSIS OF THE *hsp70* GENES SYSTEM IN TWO SPECIES OF THE FAMILY STRATIOMYIDAE (DIPTERA)

I.A. Yushenova, O.G. Zatssepina, A.A. Przhiboro, M.B. Evgen'ev, D.G. Garbuz

Two species investigated (*Stratiomys singularior* and *Oxycera pardalina*) belong to the family Stratiomyidae. Their larvae inhabit contrasting thermal (semi)aquatic environments. The goal was to compare the *hsp70* genes clusters cloned from the genomes of these species. It has been demonstrated that in *S. singularior* five *hsp70* copies form a highly polymorphic gene cluster which occupies ~ 29 kb. In *O. pardalina* we have shown the presence of four *hsp70* copies and *hsp68* gene in the common cluster, and two *hsp70* pseudogenes. The distance between tandem orientated *O. pardalina*

hsp70 genes is more than 9 kb. We suggest that conservative *hsp70* genes may be used with some limitations to assess time of divergence of distantly related species.

Key words: *Stratiomyidae*, *hsp70* genes clusters.

Сведения об авторах

Юшенова Ирина Александровна — аспирантка, мл. науч. сотр. лаборатории молекулярных механизмов биологической адаптации Института молекулярной биологии РАН. Тел. (499)135-97-74; e-mail: irinayushenova@mail.ru

Зацепина Ольга Георгиевна — докт. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории молекулярных механизмов биологической адаптации ИМБ РАН. E-mail: olzacepina@yandex.ru

Пржиборо Андрей Александрович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории пресноводной и экспериментальной гидробиологии Зоологического института РАН. E-mail: diptegan@mail.ru

Евгеньев Михаил Борисович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр., зав. лаборатории молекулярных механизмов биологической адаптации Института молекулярной биологии РАН. E-mail: misha572001@yahho.ru

Гарбуз Давид Григорьевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории молекулярных механизмов биологической адаптации Института молекулярной биологии РАН. E-mail: dgarbuz@yandex.ru