УДК 575.13:595.773.4

ПОЛНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА *D. LITTORALIS* (DIPTERA: DROSOPHILIDAE): СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ В ГРУППЕ ДРОЗОФИЛ *VIRILIS*

С.Ю. Сорокина[1], **Б.В. Андрианов**[2], **В.Г. Митрофанов**[1]

([1]Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, г. Москва;
[2]Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН, г. Москва;
e-mail: svetlana_ibr@mail.ru)

Представлен анализ полной последовательности митохондриального (мт) генома *D. littoralis*. Приведены его основные характеристики, размер, нуклеотидный состав, последовательность генов, а также степень давления стабилизирующего отбора на разные участки генома. Обсуждены особенности структуры белок-кодирующих генов и генов тРНК. Приведена структура некодирующих районов: контрольного района и межгенных спейсеров мтДНК группы *virilis*. Найдены фрагменты мт-генов *atp6* и *cox3* в ядерном геноме *D. virilis*. Эволюционная история митохондриальных и ядерных последовательностей этих генов указывает на то, что процесс образования мт-псевдогенов идет в настоящее время и связан с активностью ретротранспозонов.

Ключевые слова: *митохондриальный геном, нуклеотидная последовательность, межгенный спейсер, псевдоген, ретротранспозон Tv1, Drosophila littoralis.*

D. littoralis является одним из одиннадцати видов-двойников группы *virilis*. Данная группа на протяжении многих лет служит объектом исследований в области микроэволюции и видообразования [1]. Вид *D. littoralis* широко распространен на территории Евразии, где образует генетически гетерогенные природные популяции, структура которых хорошо изучена на основании инверсионного [2] и аллозимного [3] полиморфизмов, а также полиморфизма мтДНК [4].

Результаты и обсуждение

Мт-геном *D. littoralis* представляет собой кольцевую молекулу размером 16,017 п.о. с суммарным содержанием A + T — 76,2%. Порядок генов такой же, как и у других видов дрозофил [5]. МтДНК содержит 37 генов (13 генов белков внутренней мембраны, 2 гена рРНК и 22 гена тРНК) и один протяженный некодирующий участок (контрольный район). Гены расположены на обеих нитях и не содержат интронов. Межгенные последовательности составляют всего 1,6% мт-генома *D. littoralis*.

Сравнение мт-геномов *D. littoralis* и *D. virilis* (GenBank: BK006340) позволило оценить давление отбора для индивидуальных генов. Мы рассчитали соотношение синонимичных (Ks) и несинониминых (Kn) замен для каждого гена (рис. 1). Значения Kn/Ks для всех 13 белок-кодирующих генов меньше единицы, что указывает на давление стабилизирующего отбора. Наиболее изменчивыми оказались гены *nad6, nad3, nad4L,* наименее изменчивым — *cox1.*

Все белок-кодирующие гены, кроме *cox1*, имеют канонические старт-кодоны ATR (метионин) или ATY(изолейцин). Открытая рамка считывания гена *cox1* начинается с неканонического кодона TCG. Было показано, что у других видов дрозофил рамка трансляции также начинается с неканонического кодона (T/C)CG [6]. Шесть генов, *nad2, cox1, atp8, atp6, cox3* и *nad3,* имеют канонические кодоны терминации трансляции TAA или TAG. У остальных семи генов кодоны терминации неполные: T или TA. Гены с неполными стоп-кодонами

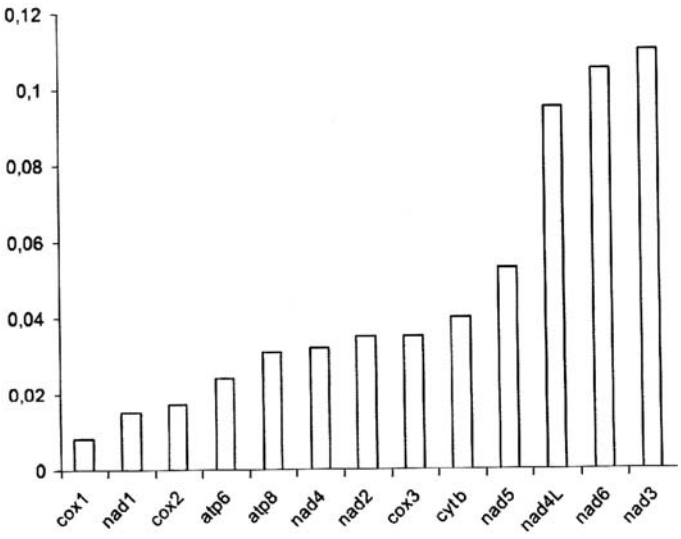

Рис. 1. Соотношение несинонимичных и синонимичных замен (Kn/Ks) для 13 белок-кодирующих генов при сравнении мт-геномов *D. littoralis* и *D. virilis*

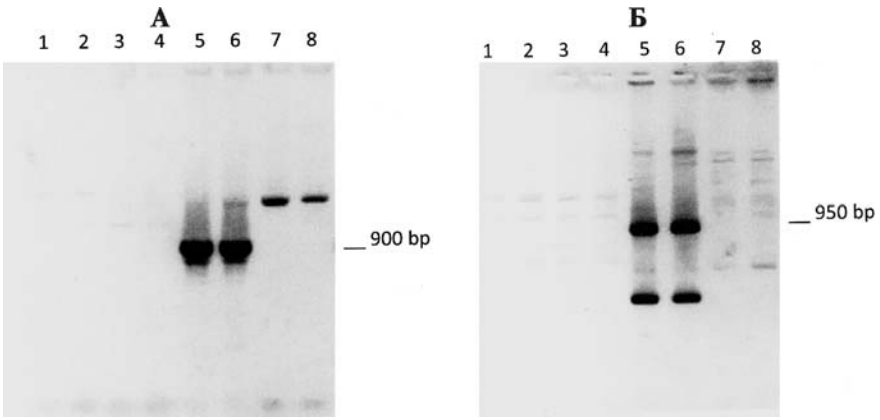

Рис. 2. ПЦР-идентификация мт псевдогена, ассоциированного с ретротранспозоном *Tv1*. А — *atp6/Tv1,* размер ожидаемого фрагмента — 900 п.о.; Б — *cox3/Tv1,* размер ожидаемого фрагмента — 950 п.о. 1, 2 — ♂ *D. littoralis*; 3, 4 — ♀ *D. littoralis*; 5, 6 —♂ *D. virilis*; 7, 8 — ♀ *D. virilis*

у *D. littoralis*, как правило, непосредственно граничат с генами тРНК. Полный стоп-кодон, напротив, найден в генах, которые граничат с некодирующим спейсером.

По первичной последовательности, вторичной структуре и антикодонам все 22 мт-гена тРНК *D. littoralis* соответствуют генам тРНК других дрозофил [6]. Все тРНК имеют типичную структуру клеверного листа за исключением тРНК$^{Ser(AGN)}$. Эта тРНК имеет простую DHU-петлю без стебля. Необычная структура не влияет на функцию молекулы, так как кодон AGN, узнаваемый данной тРНК, широко используется в митохондриальном геноме *D. littoralis.*

Контрольный район (КР) — единственный протяженный некодирующий район мт-генома дрозофилы. Данный район насыщен A/T нуклеотидами (A+T-район) и содержит точки начала репликации и промоторы для обеих нитей мт-генома. КР локализован между геном 12S рРНК и геном тPHK^{Ile} *D. littoralis* и имеет длину 1023 п.о. В составе КР выявляется две поли-Т последовательности: одна вблизи гена тPHK^{Ile}, другая на противоположной нити в центральной части КР. Экспериментально показано, что эти поли-Т блоки расположены непосредственно в точках начала репликации обеих нитей мт-генома у четырех видов дрозофил (*D. yakuba, D. obscura, D. albomicans* и *D. virilis*) [7]. В центральной части КР между поли-Т блоками идентифицирована высоко консервативная последовательность длиной 275 п.о., известная как HCSE [7].

При сравнении HCSE *D. littoralis* и *D. virilis* величина *p*-дистанции равна 0,05 ± 0,01, что в 3 раза меньше, чем величина *p*-дистанции, рассчитанная для всего КР в целом. В области КР, примыкающей к гену 12SpPHK, выявлена последовательность из четырех G-нуклеотидов (G-остров), которая может являться частью сигнальной последовательности для терминации синтеза минорной нити мтДНК [7].

На долю межгенных спейсеров приходится всего 20% некодирующей мтДНК *D. littoralis* (250 п.о.). Самый протяженный спейсер в мтДНК *D. littoralis* обнаружен между генами *atp6* и *cox3* и имеет длину 45 п.о. Наличие данного спейсера является характерной особенностью мтДНК дрозофил группы *virilis.* Мы определили нуклеотидную последовательность этого спейсера и прилежащих фрагментов *atp6* и *cox3* у 9 видов дрозофил группы *virilis.* Размер спейсера в группе *virilis* зависит от числа повторов (TA)n и ко-

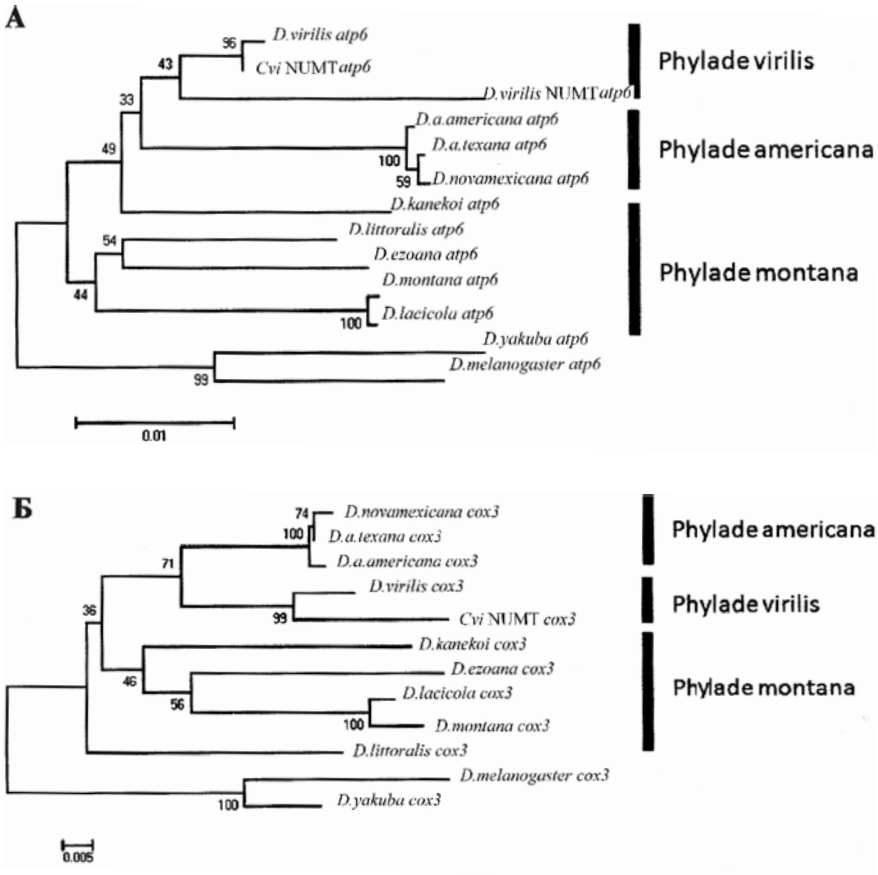

Рис. 3. Эволюционные взаимоотношения в группе *virilis*, основанные на последовательностях мт-генов. Дендрограмма построена методом минимальной эволюции в MEGA4.1.; А — фрагмент мт-гена *atp6* длиной 261 п.о., соответствующий позициям 4478—4738 мт-генома *D. virilis* (GeneBank:BK006340) и мт-псевдоген (NUMT) *atp6;* Б — фрагмент мт-гена *cox3* длиной 301 п.о., соответствующий позициям 4791—5091 мт-генома *D. virilis* (GeneBank:BK006340) и мт-псевдоген (NUMT) *cox3*; *Cvi* — пересеваемая клеточная линия 79f7Dv3g *D. virilis*

леблется между 29 п.о. (*D. kanekoi*) и 75 п.о. (*D. laticola*). Экспансия (TA)n, характерная для дрозофил группы *virilis*, позволяет рассматривать межгенный спейсер *atp6/cox3* как горячую точку изменчивости мт-геномов дрозофил этой группы.

Ранее нами было показано, что 8-нуклеотидная последовательность 5'-ATATATAT-3' фланкирует хромосомные копии специфичного для группы *virilis* ретротранспозона *Tv1* [8]. Следовательно, район повторов (TA)n между генами *atp6* и *cox3* может служить сайтом интеграции *Tv1*. Мы предположили, что если возможны транспозиции *Tv1* между ядерным и мт геномами, то есть вероятность обнаружить фрагменты мтДНК, прилегающие к сайту интеграции *Tv1*, в ядерном геноме. Для проверки этой гипотезы мы разработали две пары праймеров для ожидаемой последовательности мт-фрагмента, содержащего гены *atp6/cox3* с инсерциями *Tv1*. Положительные результаты получены только на ДНК самцов *D. virilis* (рис. 2). Клонирование полученных ПЦР-фрагментов в *pJemT* (Promega) и секвенирование отдельных клонов подтвердило их химерную (*Tv1*-мтДНК) природу. Полученные фрагменты мт-генов не имеют рамки считывания. Этот результат позволяет картировать мт-псевдоген *atp6/cox3* на Y-хромосоме *D. virilis*.

Мы провели филогенетический анализ фрагментов генов *atp6* (261 п.о.) и *cox3* (301 п.о.) у дрозофил группы *virilis*, включая последовательности мт-псевдогенов (рис. 3). Дендрограммы, построенные с помощью модели минимальной эволюции, хорошо согласуются с известной филогенией дрозофил группы *virilis* [1]. Последовательности псевдогенов *D. virilis* кластеризуются с предковыми мт-последовательностями *D. virilis*, что указывает на их недавнее происхождение.

* * *

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 08-04-00958-а) и государственной программой "Генофонды и генетическое разнообразие".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Throckmorton L.H.* The *virilis* species group // The genetics and biology of Drosophila / Eds. M. Ashburner, H.L.Carson, J.N. Thompson. London: Academic Press, 1982. 3b. P. 227—296.

2. *Митрофанов В.Г., Полуэктова Е.В.* Инверсионный полиморфизм в природной популяции *Drosophila imeretensis* Sokolov (*D. littoralis* Meig.) // Генетика. 1982. Т. 18. № 11. С. 1849—1855.

3. *Гончаренко Г.Г., Митрофанов В.Г., Корочкин Л.И.* Изучение генотипической структуры *Drosophila imeretensis* Sokolov (*D. littoralis* Meigen) в географически разделенных популяциях Краснодарского края и Белоруссии // Докл. АН СССР. 1984. Т. 279. № 1. С. 216—219.

4. *Андрианов Б.В., Сорокина С.Ю., Мюге Н.С., Резник Н.Л., Митрофанов В.Г.* Популяционная динамика митохондриального полиморфизма в природной популяции *Drosophila littoralis* // Генетика. 2008. Т. 44. № 2. С. 195—201.

5. *Clary D.O., Wolstenholme D.R.* The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide sequence, gene organization, and genetic code // J. Mol. Evol. 1985. Vol. 22. N 3. P. 252—271.

6. *Montooth K., Abt D., Hofmann J., Rand D.* Comparative genomics of *Drosophila* mtDNA: Novel features of conservation and change across functional domains and lineages // J. Mol Evol. 2009. Vol. 69. N 1. P. 94—114.

7. *Saito S., Tamura K., Aotsuka T.* Replication origin of mitochondrial DNA in insects // Genetics. 2005. Vol. 171. N 4. P. 1695—1705.

8. *Andrianov B.V., Zakharyev V.M., Reznik N.L., Gorelova T.V., Evgen'ev M.B. Gypsy* group retrotransposon *Tv1* from *Drosophila virilis* // Gene. 1999. Vol. 239. N 1. P. 193—199.

Поступила в редакцию
25.04.10

COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME SEQUENCE OF *D. LITTORALIS* (DIPTERA: DROSOPHILIDAE): COMPARATIVE ANALYSIS OF THE MITOCHONDRIAL GENOMES IN DROSOPHILA VIRILIS SPECIES GROUP

S.Yu. Sorokina, B.V. Andrianov, V.G. Mitrofanov

An analysis of the complete sequence of *D. littoralis* mitochondrial genome (mt-genome) is presented. The basic characters of the mt-genome, such as size, nucleotide composition, genes order, as well as a degree of purifying selection pressure on different parts of the mt-genome are reported. The features of protein-coding genes and tRNA genes are discussed. The structure of mtDNA control region and intergenic spacers in the virilis group are presented. The fragments of mitochondrial genes atp6 and cox3 were found in the nuclear genome of *D. virilis*. The evolution history of mitochondrial and nuclear genes data indicates that mitochondrial gene transfer to the nucleus is a recent event and connected to the activity of retrotransposons.

Key words: *mitochondrial genome, nucleotide sequence intergenic spacer, Tv1 retrotransposone, Drosophila littoralis.*

Сведения об авторах

Сорокина Светлана Юрьевна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаборатории генетики Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел. 7(499)135-87-81; e-mail: svetlana_ibr@mail.ru

Андрианов Борис Витальевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории сравнительной генетики животных Института общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН. Тел. 7(499)135-11-30; e-mail: andrianovb@mail.ru

Митрофанов Владимир Григорьевич — докт. биол. наук, проф., зав. лабораторией генетики Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Тел. 7(499)135-87-81.