

© Л. Н. Нефедова, Д. О. Коростин,
М. В. Потапова, Н. И. Романова,
А. И. Ким

Московский государственный
университет имени
М. В. Ломоносова, биологический
факультет, кафедра генетики

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕГУЛЯТОРНОГО ГЕНА *DIP1* У РАЗНЫХ ВИДОВ *DROSOPHILA*

✿ Ген *DIP1* является регуляторным геном *D. melanogaster*, функция которого не известна. В результате альтернативного сплайсинга образуется не менее 6 вариантов мРНК (*DIP1*-с/*Klett*-с, *DIP1*-b/*Klett*-d, *DIP1*-d, *DIP1*-a, *Klett*-a и *Klett*-b). Проанализированы структура и экспрессия гомологов гена *DIP1* у видов подгруппы *melanogaster*: *D. melanogaster*, *D. sechellia*, *D. mauritiana*, *D. simulans*, *D. erecta* и *D. yakuba*. У *D. sechellia*, *D. simulans* и *D. mauritiana*, в отличие от *D. melanogaster*, *D. erecta* и *D. yakuba*, обнаружены изменения, влияющие на экспрессию гомологов гена *DIP1*. У них не выявлено форм, гомологичных *Klett*-a и *Klett*-b *D. melanogaster*, что обусловлено отсутствием альтернативного сплайсинга первого экзона.

✿ **Ключевые слова:** дрозофила; ген *DIP1*; гомологи гена *DIP1*; экспрессия гена *DIP1*.

ВВЕДЕНИЕ

Транспозиции мобильного элемента *gypsy* у *Drosophila melanogaster* контролируются геном *flamenco*. Мутанты по гену *flamenco* характеризуются генетической нестабильностью, обусловленной высокой частотой транспозиций этого элемента (Ким и др., 1989). Ген *flamenco* локализован в районе 20A1-3 X-хромосомы (Prud'homme et al., 1995). С целью более точного картирования данного гена была получена линия мух P[yellow], несущая инсерцию молекулярной конструкции на основе Р-элемента и проявляющая мутантный фенотип *flamenco* (Robert et al., 2001). Методом «прогулки по хромосоме» картировать и клонировать ген *flamenco* не удалось. Установлено, что инсерция в линии P[yellow] находится на расстоянии 1,5 т. п. н. от начала кодирующей последовательности гена *DIP1* (Robert et al., 2001). Было сделано предположение, что ген *DIP1* или сам является геном *flamenco*, или принимает участие в контроле транспозиции *gypsy* вместе с геном *flamenco* (Нефедова и др., 2007).

Функция гена *DIP1* практически не изучена. Показано, что белковый продукт гена *DIP1* содержит два домена, связывающих двунитевую РНК (днРНК), а также сигнал ядерной локализации, и накапливается в ядрах неделящихся клеток многих тканей (DeSousa et al., 2003). Известно, что белки, связывающие днРНК, вовлечены в различные клеточные процессы. Одни белки (DICER, NFAR, ADAR, TRBP) локализованы в ядре и участвуют в РНК-интерференции, сплайсинге, экспорте РНК из ядра. Другие (PKR, PACT) расположены в цитоплазме и задействованы в регуляции трансляции, передаче стрессовых сигналов и защите клеток от вирусной инфекции (Saunders, Barber, 2003).

Показано, что ген *DIP1* экспрессируется на всех стадиях развития мух. Уровень его экспрессии снижается в процессе деления клеток в разных тканях в течение эмбрионального и постэмбрионального развития (Saunders, Barber, 2003; Bondos et al., 2004).

С использованием дрожжевой двугибридной системы было продемонстрировано, что продукт гена *DIP1* может взаимодействовать с несколькими белками. Так, он взаимодействует с белком Disco, принимающим участие в контроле развития нервной системы, циркадных ритмов и светочувствительности у *D. melanogaster* (Lee et al., 1999).

Продукт гена *DIP1* взаимодействует с белком Ubx Ib, относящимся к Нох-семейству (Bondos et al., 2004). Нох-белки являются транскрипционными факторами. Функции большинства белков, взаимодействующих с Нох-белками, до сих пор не изучены. Белок Ubx Ib отвечает за развитие 4-го и 5-го сегментов груди, а также влияет на развитие ЦНС, периферической нервной системы, конечностей, средней кишки.

Продукт гена *DIP1* может взаимодействовать с рибосомным белком L27a (De Felice et al., 2004). L27a гомологичен белку S6 млекопитающих, вовлеченному в регуляцию клеточного деления.

Поступила в редакцию 17.09.2009
Принята к публикации 10.11.2009

Наконец, продукт гена *DIP1* взаимодействует с белком Su(var)3-9, который является основной метилтрансферазой, специфичной для гетерохроматина, у *D. melanogaster* (Krauss et al., 2001).

Изложенные выше свойства позволяют предположить, что продукт гена *DIP1* является многофункциональным регуляторным белком, который принимает участие в формировании сложных белковых комплексов, контролирующих экспрессию важных генов *Drosophila*. Не исключено, что он может быть задействован и в процессе регуляции транспозиции мобильного элемента *gypsy*.

Одним из способов исследования функции гена является его инактивация. Однако *DIP1* является регуляторным, и, по-видимому, жизненно важным геном. Таким образом, полное выключение этого гена является трудно выполнимой задачей (DeSousa et al., 2003). По этой причине мы решили исследовать функцию гена *DIP1* посредством сравнительного анализа его структуры и экспрессии у других видов *Drosophila*, находящихся в разной степени филогенетического родства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии дрозофилы и условия культивирования. В работе использовали виды *D. melanogaster*, *D. sechellia*, *D. mauritiana*, *D. simulans*, *D. erecta* и *D. yakuba* из коллекции кафедры генетики МГУ. Все виды дрозофилы культивировали в стандартных для *D. melanogaster* условиях: при температуре 25 °C на стандартной питательной агаризованной среде. Пересев культур осуществляли через 10–14 дней. Для выделения геномной ДНК брали по 30–50 особей каждого вида. Выделение ДНК из мух осуществляли, как описано ранее (Нефедова и др., 2007).

Выделение тотальной РНК и обратная транскрипция. Выделение тотальной РНК проводили с помощью набора для выделения тотальной РНК «Promega» согласно протоколу фирмы-производителя. Перед постановкой обратной транскрипции пробы (по 5 мкг тотальной РНК) обрабатывали ДНКазой-I («Fermentas») для деградации ДНК. Целостность РНК проверяли электрофоретически по присутствию в геле полос целой рРНК, концентрацию определяли спектрофотометрически.

Амплификацию ДНК- и кДНК-фрагментов гена *DIP1* проводили методом ПЦР с использованием праймеров («Евроген») d1 (5'-GAAACAACAAGCCATTTGTCT-3'), d2 (5'-GTTTCCGTTGGCCAGCGAG-3'), r (5'-GTCCACCATGATTCACAGAT-3') в амплификаторе Amply4 («Biokom») в течение 30 циклов по схеме: денатурация 95 °C 30 сек, отжиг праймеров 55 °C 1 мин, синтез 72 °C 2 мин. Для контроля обратной транскрипции проводили ПЦР с праймерами к гену *gr49* (5'-CGATCTCGCCGAGTAAAC-3' и 5'-ACCATCCGCCAGCATACA-3').

Клонирование и секвенирование фрагмента гомолога гена *DIP1 D. mauritiana*. Клонирование ПЦР-фрагмента осуществляли в векторе pGEM T-easy («Promega») по протоколу фирмы-производителя. Клонированные фрагменты ДНК были секвенированы Д. В. Мухой и А. Л. Королевым (Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН) по методу Сэнгера с использованием ДНК-секвенатора ABI PRISM 310 и набора реактивов Big Dye Termination KIT V.3.0 («PE Applied Biosystems», Foster City CA), согласно рекомендациям фирмы изготовителя.

Компьютерный анализ. Для анализа последовательностей использовали следующие программы: для поиска нуклеотидных последовательностей базу данных последовательностей генома *D. melanogaster* FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>), BLAST для поиска гомологии в нуклеотидной последовательности генов против последовательности белка (<http://flybase.org/blast/>), ClustalW для множественного выравнивания последовательностей (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ген *DIP1 D. melanogaster* кодирует не менее шести продуктов

Ген *DIP1 D. melanogaster* состоит из пяти экзонов. По данным базы FlyBase он кодирует несколько продуктов, образующихся в результате альтернативного сплайсинга пре-мРНК (DeSousa et al., 2003). Последовательность гена содержит сигнал ядерной локализации, который в результате альтернативного сплайсинга может вырезаться. Таким образом, продукты гена функционируют главным в основном в ядре, но есть также форма, которая локализуется в цитоплазме (Bondos et al., 2004). Показано, что продукты гена *DIP1* могут транслироваться с разных стартовых кодонов (DeSousa et al., 2003; Krauss et al., 2001).

В базе данных FlyBase приведены противоречивые сведения о кодирующих последовательностях (CDS) гена *DIP1* и их названиях (рис. 1). Фигурируют два названия одного и того же гена: *DIP1* и *Klett*. Кроме того, одни и те же CDS называются по-разному, или одинаково называются разные CDS. Известны три варианта кодирующих последовательностей с ATG1: *DIP1*-с, она же *Klett*-с (AF175711), *DIP1*-b, она же *Klett*-d, (AF182154) и *DIP1*-d (AY217028). Следующие CDS читаются с ATG2, локализованного в альтернативном первом экзоне: *Klett*-a (AJ250866) и *Klett*-b (AJ250867). С ATG3 читается форма *DIP1*-a (AF175713).

Мы провели анализ альтернативного сплайсинга гена *DIP1* у *D. melanogaster* с использованием метода ОТ-ПЦР с парами праймеров d1-г и d2-г. В результа-

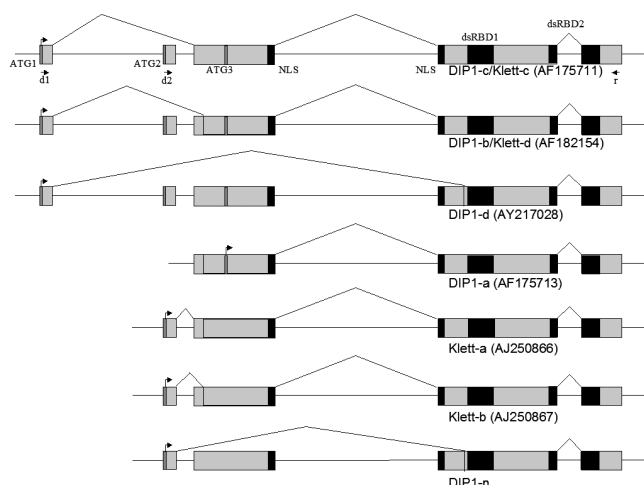


Рис. 1. Кодирующие последовательности гена *DIP1* *D. melanogaster*.

Обозначения: ATG — предполагаемые сайты инициации трансляции, NLS — состоящий из двух частей сигнал ядерной локализации, dsRBD — два домена, связывающих двунитевую РНК. Показана локализация праймеров d1, d2 и г.

те мы подтвердили наличие форм DIP1-с (1109 п.н.), DIP1-б (1063 п.н.), DIP1-д (713 п.н.), Klett-а (1113 п.н.) и Klett-б (1068 п.н.) (рис. 1). Нам не удалось выявить кодирующую последовательность, обозначенную DIP1-п на рисунке 1, которая имела бы альтернативный первый экзон и альтернативный второй (как у DIP1-д). В результате ОТ-ПЦР с праймерами d2 и г мы получили несколько фрагментов, сходных по размеру с формой DIP1-д. Однако эти фрагменты оказались неспецифичными для *DIP1*, что было подтверждено результатами секвенирования. По-видимому, эта форма специфически образуется только с участием первого экзона. Таким образом, ген *DIP1* кодирует не менее 6 продуктов, 5 из которых имеют ядерную локализацию, и 1 продукт (DIP1-д) функционирует в цитоплазме.

Структурная организация гомологов гена *DIP1* в геномах *D. sechellia*, *D. mauritiana*, *D. simulans*, *D. erecta* и *D. yakuba*

В настоящее время в базе данных FlyBase представлены секвенированные последовательности геномов двенадцати разных видов рода *Drosophila*. Проведя поиск гена *DIP1* в геномах с помощью программы BLAST, мы обнаружили, что гомологи гена *DIP1* присутствуют во всех исследованных геномах. Наиболее близкими по структуре к гену *DIP1* *D. melanogaster* оказались, как и следовало ожидать, гомологи, обнаруженные у представителей подгруппы *melanogaster* (рис. 2).

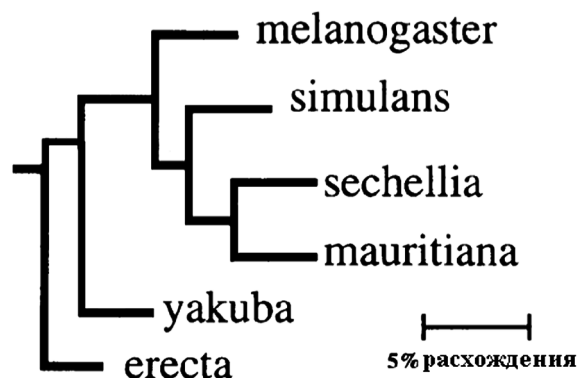


Рис. 2. Филогения исследованных видов *Drosophila* (по Jeffs et al., 1994).

Ген *DIP1* *D. melanogaster* во втором интроне содержит инсерцию мобильного генетического элемента НВ, которая занимает практически весь второй интрон гена (Нефедова и др., 2007). НВ представлен в геноме *D. melanogaster* десятками копий, и практически все они дефектны (Нефедова, Ким, 2007).

Известно, что мобильный элемент, находясь даже в интроне гена, может влиять на его экспрессию (Feschotte, 2008). Мы провели ПЦР-анализ хромосомной ДНК видов подгруппы *melanogaster* *D. sechellia*, *D. mauritiana*, *D. simulans*, *D. erecta* и *D. yakuba* на наличие в гомологах гена *DIP1* копии НВ. Копии НВ присутствуют во всех геномах видов подгруппы (данные не приведены), но ни в одной из нуклеотидных последовательностей гомологов гена *DIP1* НВ нет. Это означает, что этот мобильный элемент ранее перемещался по геному и попал в ген *DIP1* уже после отделения *D. melanogaster* от общего эволюционного древа подгруппы *melanogaster*.

Размеры амплифицированных фрагментов ДНК гомологов гена *DIP1* исследуемых видов *Drosophila* соответствуют ожидаемым по базе данных FlyBase. По этой причине мы решили не секвенировать фрагменты ДНК гомологов *DIP1* видов *D. sechellia*, *D. simulans*, *D. erecta* и *D. yakuba*. Однако геном *D. mauritiana* в настоящее время не секвенирован, поэтому амплифицированные фрагменты были клонированы и секвенированы.

Анализ секвенированных последовательностей показал, что гомолог *DIP1* *D. mauritiana*, также как и гомологи этого гена у *D. yakuba*, *D. sechellia*, *D. simulans* и *D. erecta*, действительно не содержит следов НВ. Последовательности, гомологичные гену *DIP1*, обрабатывали с помощью компьютерной программы SoftBerry, которая позволяет выявлять экзоны и интроны. Программа предсказывает наиболее вероятные экзоны: для *DIP1* они соответствуют форме DIP1-с (рис. 3).

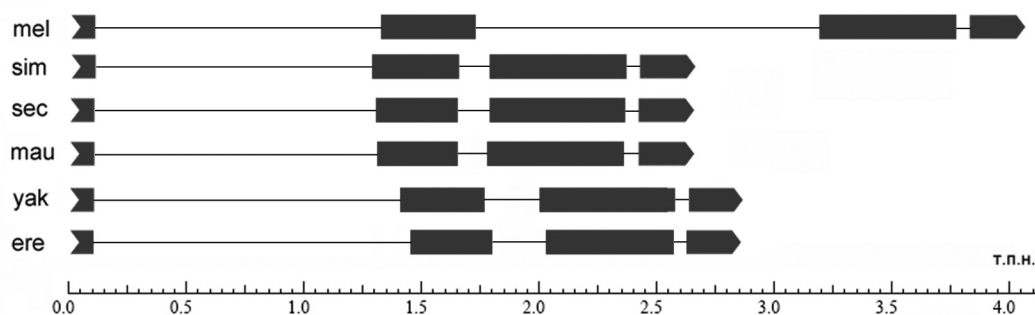


Рис. 3. Схема строения гена *DIP1* и его гомологов у разных видов *Drosophila*.

Обозначения: выделенные области соответствуют экзонам формы *DIP1-c*; mel — *D. melanogaster*, sim — *D. simulans*, sec — *D. sechellia*, mau — *D. mauritiana*, yak — *D. yakuba*, ere — *D. erecta*.

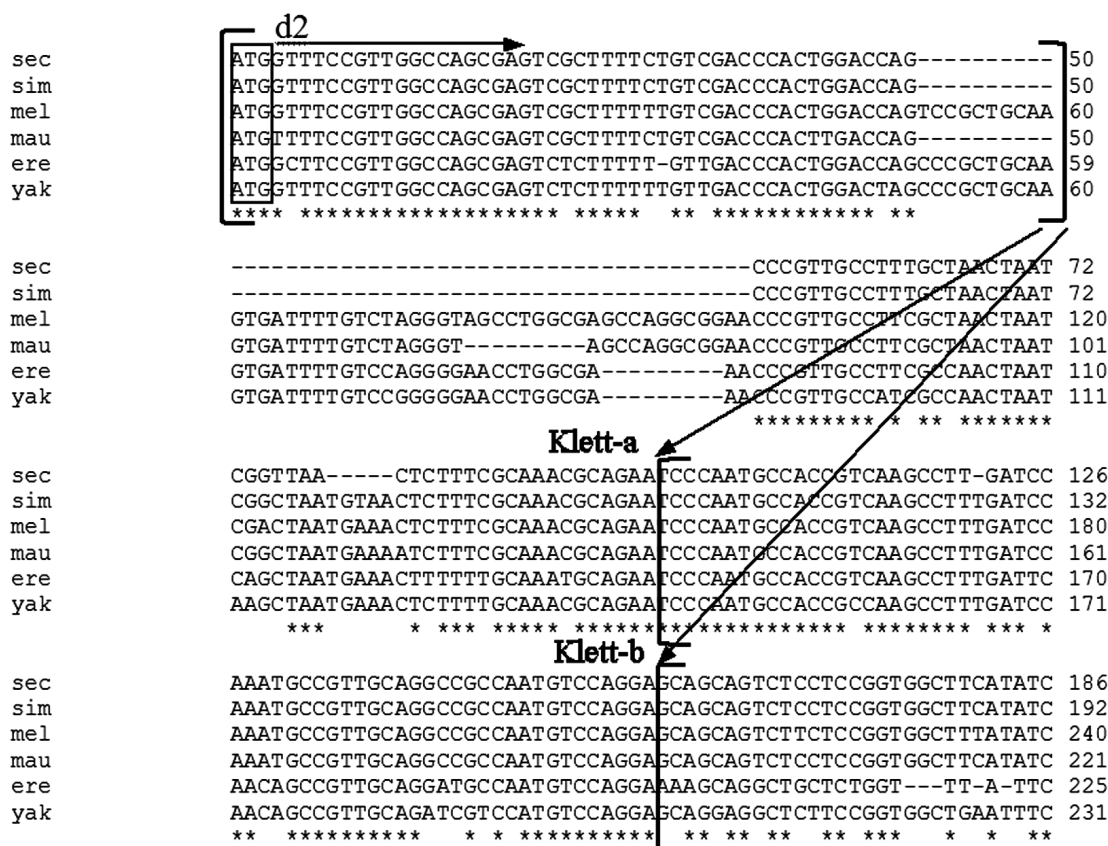


Рис. 4. Множественное выравнивание участков предполагаемой локализации стартового кодона ATG2 у разных видов дрозофилы. mel — *D. melanogaster*, sim — *D. simulans*, sec — *D. sechellia*, mau — *D. mauritiana*, yak — *D. yakuba*, ere — *D. erecta*. Показана локализация праймера d2. Стрелками обозначены варианты сплайсинга альтернативного первого экзона (Klett-a и Klett-b). Звездочками под выравниванием последовательностей обозначены идентичные нуклеотиды.

В области, гомологичной альтернативному первому экзону, у гомологов гена *DIP1* обнаружены изменения. У *D. sechellia*, *D. simulans* и *D. mauritiana* районы, комплементарные альтернативному экзону форм Klett-a и Klett-b несут делеции (рис. 4). У *D. erecta* и

D. yakuba организация района совпадает с таковой у *D. melanogaster*.

Обнаруженные изменения могут влиять на экспрессию гомологов гена *DIP1*. Так, можно предполагать, что у *D. sechellia*, *D. mauritiana* и *D. simulans* будут от-

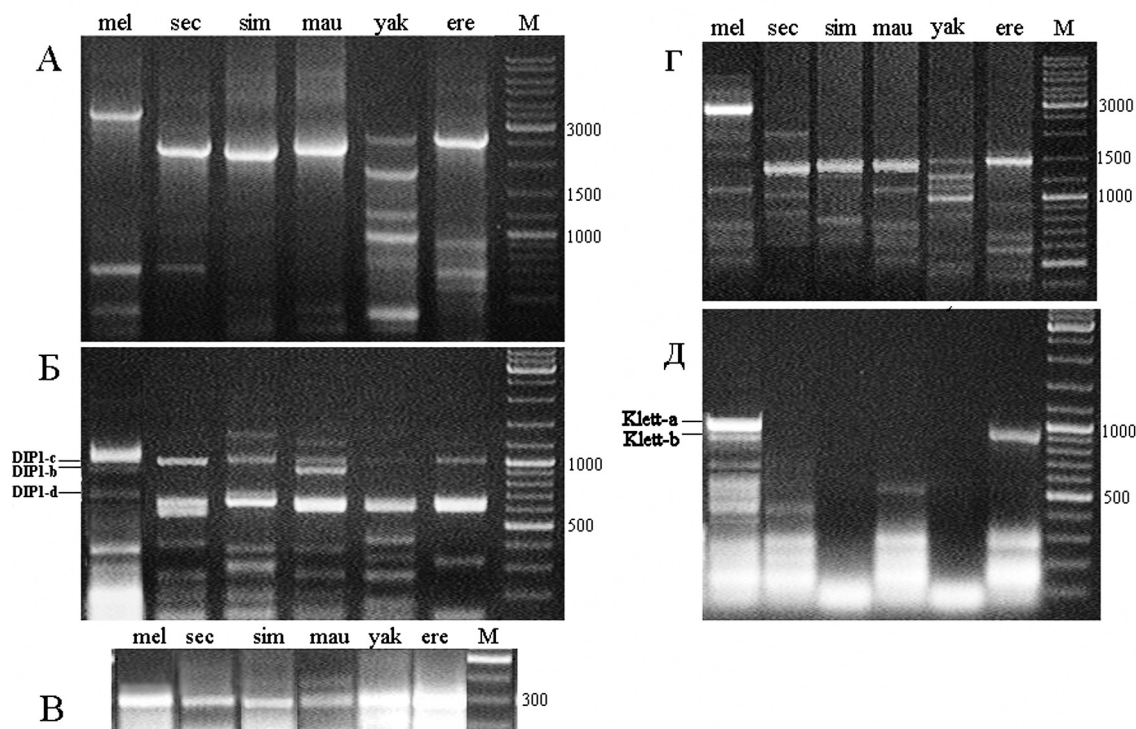


Рис. 5. Электрофореграмма амплифицированных фрагментов ДНК и кДНК гена *DIP1* видов *D. melanogaster* (mel), *D. sechellia* (sec), *D. mauritiana* (mau), *D. simulans* (sim), *D. erecta* (ere) и *D. yakuba* (yak). (А) ДНК, амплифицированная с праймерами d1 и г, (Б) кДНК, амплифицированная с праймерами d1 и г, (В) кДНК, амплифицированная с праймерами к гену gr49, (Г) ДНК, амплифицированная с праймерами d2 и г, (Д) кДНК, амплифицированная с праймерами d2 и г. В качестве маркера размера фрагментов ДНК (дорожка М) использован GeneRuler DNA Ladder Mix ("Fermentas"). Размеры фрагментов маркера указаны с правой стороны рисунка.

существовать продукты, гомологичные Klett-a и Klett-b *D. melanogaster*.

Экспрессия гомологов гена *DIP1* у *D. sechellia*, *D. mauritiana*, *D. simulans*, *D. erecta* и *D. yakuba*

Анализ экспрессии методом ОТ-ПЦР проводили на стадии имаго (рис. 5). Подобранные нами для амплификации фрагментов гена *DIP1* праймеры (d1, d2 и г) локализованы в районах, практически полностью идентичных у исследуемых видов *Drosophila*. кДНК, гомологичные *DIP1*-с/Klett-с, обнаружены в геномах всех исследованных видов. Размер амплифицированных продуктов совпал с теоретически ожидаемым. кДНК, гомологичную *DIP1*-b, мы обнаружили в явном виде только у *D. mauritiana*. Не исключено, что у других видов она также образуется, но мы не можем ее детектировать методом стандартной ОТ-ПЦР. кДНК, гомологичную *DIP1*-d, которая у *D. melanogaster* синтезируется в малых количествах, выявить не представляется возможным из-за наличия большого количества неспецифических продуктов.

Анализ экспрессии форм, образующихся с альтернативного первого экзона, однозначно свидетельствует об

экспрессии форм Klett-a/Klett-b у *D. erecta*. У *D. simulans*, *D. mauritiana* и *D. sechellia* экспрессии с альтернативного первого экзона действительно нет, как и ожидалось по данным биоинформатического анализа. О наличии продукта экспрессии у *D. yakuba* невозможно говорить однозначно, поскольку контрольная амплификация с хромосомой дает дополнительные неспецифические продукты.

Таким образом, альтернативные формы транскриптов гена *DIP1* (Klett-a/Klett-b) отсутствуют у более молодых, чем *D. melanogaster*, видов дрозофилы, и есть у более древних. По-видимому, эти альтернативные формы, не являясь основными у *D. melanogaster*, не поддерживались в процессе эволюции отбором, что привело к их утрате более молодыми видами.

Примечательно, что в большинстве случаев альтернативный сплайсинг затрагивает только первый и второй экзоны. При этом функциональный участок — домен, связывающий днРНК, — остается неизменным. Вероятно, разнообразие кодирующих форм гена *DIP1* у *D. melanogaster* носит приспособительный характер: при наличии альтернативного первого экзона активность гена сохраняется даже в том случае, когда «основной» первый экзон инактивирован.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ №№08-04-00693 и 08-04-97050.

Литература

1. Ким А. И., Беляева Е. С., Ларкина З. Г., Асланян М. М., 1989. Генетическая нестабильность и транспозиции мобильного элемента *GYPSY* (МДГ4) в мутаторной линии *Drosophila melanogaster* // Генетика. Т. 25. № 10. С. 1747–1756.
2. Неведова Л. Н., Романова Н. И., Ким А. И., 2007. Особенности структурной организации гена *DIP1* в линиях *Drosophila melanogaster*, мутантных по гену *flamenco* // Генетика. №. 1. Т. 43. С. 71–78. (Nefedova L. N., Romanova N. I., Kim A. I. Structural organization characteristics of the *DIP1* gene in *Drosophila melanogaster* strains mutant for the *flamenco* gene // Russian journal Genetika. 2007. Vol. 43. N 1. P. 56–63.)
3. Bondos S. E., Catanese D. J. Jr., Tan X. X. et al., 2004. Hox transcription factor ultrabithorax Ib physically and genetically interacts with disconnected interacting protein 1, a double-stranded RNA-binding protein // J. Biol. Chem. Vol. 279. N 25. P. 26433–26444.
4. De Felice B., Wilson R. R., Mondola P. et al., 2003. Characterization of *DIP1*, a novel nuclear protein in *Drosophila melanogaster* // Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 307. N 2. P. 224–228.
5. DeSousa D., Mukhopadhyay M., Pelka P. et al., 2003. A novel double-stranded RNA-binding protein, disco interacting protein 1 (*DIP1*), contributes to cell fate decisions during *Drosophila* development // J. Biol. Chem. Vol. 278. N 39. P. 38040–38050.
6. Feschotte C., 2008. Transposable elements and the evolution of regulatory networks // Nat. Rev. Genet. Vol. 9. N 5. P. 397–405.
7. Jeffs P. S., Holmes E. C., Ashburner M., 1994. The molecular evolution of the alcohol dehydrogenase and alcohol dehydrogenase-related genes in the *Drosophila melanogaster* species group // Mol. Biol. Evol. Vol. 11. N 2. P. 287–304.
8. Krauss V., O'Grady M., Hoffmann J. et al., 2001. KLETT, a drosophila chromatin protein with dsRNA

binding motifs interacts with the heterochromatin-associated SU(VAR)3-9 protein // 17th Europ. Dros. Res. Conf. Book of abstracts. Scotland. P. 8.

9. Lee K. J., Mukhopadhyay M., Pelka P. et al., 1999. Disconnected: a locus required for neuronal pathway formation in the visual system of *Drosophila* // Dev. Biol. Vol. 214. P. 385–398.
10. Prud'homme N., Gans M., Terzian C. et al., 1995. Flamenco, a gene controlling the gypsy retrovirus of *Drosophila melanogaster* // Genetics. Vol. 139. P. 697–711.
11. Robert V., Prud'homme N., Kim A. et al., 2001. Characterization of the flamenco region of the *Drosophila melanogaster* genome // Genetics. Vol. 158. P. 701–713.
12. Saunders L. R., Barber G. N., 2003. The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions // FASEB J. Vol. 17. N 9. P. 961–983.

MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF THE *DIP1* REGULATOR GENE IN VARIOUS SPECIES OF *DROSOPHILA*

L. N. Nefedova, D. O. Korostin, M. V. Potapova,
N. I. Romanova, A. I. Kim

✿ **SUMMARY:** The *DIP1* is a regulator gene of *D. melanogaster* with an unknown function. As a result of mRNA alternative splicing, at least 6 coding sequences are formed (*DIP1-c/Klett-c*, *DIP1-b/Klett-d*, *DIP1-d*, *DIP1-a*, *Klett-a*, and *Klett-b*). Structure and expression of *DIP1* homologues in various species of the melanogaster subgroup, such as *D. melanogaster*, *D. sechellia*, *D. mauritiana*, *D. simulans*, *D. erecta*, and *D. yakuba*, have been analyzed. In *D. sechellia*, *D. simulans*, and *D. mauritiana* we found alterations, which affected expression of the *DIP1* homologues in contrast to *D. melanogaster*, *D. erecta*, and *D. yakuba*. These alterations have to do with splicing of the first alternative exon. It has been demonstrated that *DIP1* homologues of *D. sechellia*, *D. simulans* and *D. mauritiana* do not code for *Klett-a* and *Klett-b* forms.

✿ **KEY WORDS:** *Drosophila*; the *DIP1* gene; *DIP1* homologues; expression of the *DIP1* gene.

✿ Информация об авторах

Неведова Лидия Николаевна — доцент.
E-mail: lidia_nefedova@mail.ru

Коростин Дмитрий Олегович — студент.

Потапова Мария Валерьевна — м. н. с.
E-mail: maria_potapova@mail.ru

Романова Наталия Ивановна — доцент.

Ким Александр Иннокентьевич — профессор.
E-mail: aikim57@mail.ru.

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра генетики. 119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М. В. Ломоносова, д. 1, корп. 12.

Nefedova Lidiya Nikolaevna — associate professor.
E-mail: lidia_nefedova@mail.ru

Korostin Dmitriy Olegovich — student.

Potapova Mariya Valerevna — scientist.
E-mail: maria_potapova@mail.ru.

Romanova Nataliya Ivanovna — associate professor.

Kim Alexandr Innokentevich — professor
E-mail: aikim57@mail.ru.

M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Genetics. 119991, GSP-2, Moscow, Leninskie Gori, M. V. Lomonosov Moscow State University, 1, bld. 12