

KOVALCHUK M.V.¹, GYLKO T.P.^{1,2}

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03143, Kiev, Zabolotnogo str., 150, e-mail: kovmv@ukr.net

² State Institute "Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS Ukraine"
Ukraine, 04114, Kiev, Vyshgorodska, 67

MICROSATELLITE INSTABILITY IN ICR MOUSE STRAIN, PREDISPOSED MALIGNANT SWELLINGS

Aims. Microsatellite instability (MSI) is a form of genomic instability frequently detected in many types of tumors. However, the involvement of MSI in cancer development in the population ICR mouse strain has not been investigated. The aim of this work was to determine the reveal of loss of heterozygosity (LOH) and microsatellite instability (MSI) and to evaluate the possibility of using LOH and MSI as molecular markers for the detection of genomic alterations. **Methods.** Genomic DNA obtained from peripheral blood lymphocytes from each animals was subjected to PCR using specific primers. The PCR products were separated by 10% non-denaturing PAGE and analyzed for the presence of LOH and MSI. **Results.** The presence of these microsatellite alterations was related both to the carcercous phenotype and to the mouse strain. **Conclusion.** This study has demonstrated that microsatellite alterations occur in a part of ICR population but our data need further validation with a larger number of microsatellite loci and enhanced method for MSI identification.

Key words: microsatellite instability, loss of heterozygosity, tumorigenesis.

КОЗЕРЕЦЬКА Д.І., СЕРГА С.В., ДЕМИДОВА А.С., ШКЛЯР С.Є., КОЗЕРЕЦЬКА І.А.

ННЦ «Інститут біології», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна,
01601, м. Київ, вул. Володимирська 64, e-mail: iryna.kozeretska@gmail.com

НОВО ТРАНСПОЗОН В ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER* УКРАЇНИ

Мобільні генетичні елементи (МГЕ) є поширеними в природних популяціях *Drosophila melanogaster* [1]. Сьогодні існує думка, що автономні генетичні елементи слід вважати драйверами еволюції геномів [2]. Виходячи з цього вкрай важливим є дослідження динаміки поширення МГЕ в природних популяціях плодових мух як у просторі, так і у часі. Відомо, що частина МГЕ, такі як *P* та *hobo* транспозони, є активними в даний період дослідження в природних популяціях дрозофіл [3, 4], тому вони становлять особливий інтерес, як МГЕ, які почали інвазію геномів представників природних популяцій [5, 6] в період початку дослідження популяційних процесів в природних популяціях *D. melanogaster* [7] і, таким чином, можуть обумовлювати, частково, чи повністю, процеси, які в них спостерігаються.

hobo транспозон був вперше клонований та охарактеризований McGinnis et al. [8]. Подальший аналіз даного елемента виявив варіанти у послідовностях нуклеотидів кодуючої частини гена транспозази, що веде до варіантів у білковій послідовності [9]. Аналіз даного елемента на геномному рівні у *D. melanogaster* показав, що

hobo елемент може зустрічатися у трьох формах: повнорозмірні автономні елементи (відповідають канонічному HFL1), делетовані (дефектні) копії та залишки реліктових *hobo* елементів (так звані *hobo*-related sequences), інвазія яких відбулася раніше [10]. Всі вказані форми відрізняються довжиною та нуклеотидною послідовністю – дефектні копії мають менші розміри за рахунок делецій у кодуючій частині, а залишки реліктових *hobo* демонструють наявність численних делецій та низького рівня ідентичності послідовності нуклеотидів до канонічного елемента. Наявність трьох форм елемента свідчить про декілька хвиль інвазії транспозону у геноми *D. melanogaster*, одна з яких відбулася нещодавно та можливо продовжується у даний час [10]. Проте особливості та напрям цього процесу у природі залишаються дослідженими недостатньо.

Для двох природних популяцій дрозофіл України (Gurzuf, 1961; Uman, 1970; Uman, 1983) було продемонстровано наявність *hobo* елемента [5]. Більш пізні дані щодо поширення та активності даного мобільного елемента на території України відсутні, що не дозволяє зробити ви-

сновки ні про часову, ні про просторову динаміку даного мобільного елемента у природних популяціях дрозофіл нашої країни. В цій роботі ми дослідили наявність фрагмента кодуєчої частини *hobo* транспозону у імаго природних попу-

Матеріали і методи

Вибірki з природних популяцій *D. melanogaster* України були зібрані у 11 локалітетах з метою характеристики широтного зрізу країни, а саме у містах Києві, Умані, Одесі, Лубнах, Пирятині, Дрогобичі, Ялті (Магарач), Варві та у Чорнобильській зоні (три точки – місто Чорнобиль, селище Поліське та біля водойми-охолоджувача ЧАЕС).

Виділення ДНК проводили з 20-25 дорослих особин кожної вибірки з використанням набору ДНК-сорб («АмпліСенс», Росія) відповідно до протоколу виробника. Наявність *hobo* елемента визначали методом ПЛР. Праймери було спеціально підбрано для дослідження таким чином, щоб ампліфікувати варіабельний S-регіон, який включає мікросателітний повтор TPE (TPE1-5'ACC CGC AGC ACA TCT TCA GG, TPE2-5'TTC AGC TGC TGC GCT ACT GG). Особливістю цього регіону є те, що він відсутній у близьких до *hobo* елементів Th1, Th2 та Oh. Очікуваний фрагмент мав довжину 412 п.н. ПЛР проводили за схемою: 3 хвилини при темпера-

турі *D. melanogaster* України та визначили його нуклеотидну послідовність, що дозволяє зробити висновок про його недавнє походження у досліджуваних популяціях.

турі 94°C, 30 циклів, що складаються з 30 с при 94°C, 45 с при 56°C, 20 с при 72°C, та 7 хвилин при 72°C. Реакція проводилась у суміші об'ємом 20 мкл (3 мкл геномної ДНК, 2 мкл 10 x ПЛР буфера (100 mM Tris-HCl (pH 8.8 на 25°C), 500 mM KCl), 2 мкл 25 mM MgCl₂, 2 мкл 2 mM dNTP («Fermentas»), 2 мкл 20 mM праймерів, 1 мкл Taq-полімерази ((5 од/мкл, «Fermentas»), 8 мкл дистильованої води). Отримані фрагменти з вибірок Одеси, Чорнобиля та біля водойми-охолоджувача ЧАЕС були відсеквеновані. Секвенс було виконано в Університеті Південної Кароліни, США. Для секвенування використовувався автоматичний секвенатор Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer.

Для ідентифікації отриманих експериментально послідовностей був використаний інструмент BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Порівняння отриманих послідовностей проводились за допомогою програм ClustalW та Vector NTI 11.0 (Invitrogen, США).

Результати та обговорення

Проведено діагностику наявності *hobo* елемента за допомогою ПЛР з праймерами, специфічними до ділянки довжиною 412 п.н., яка є

універсальною для всіх відомих копій даного транспозона.

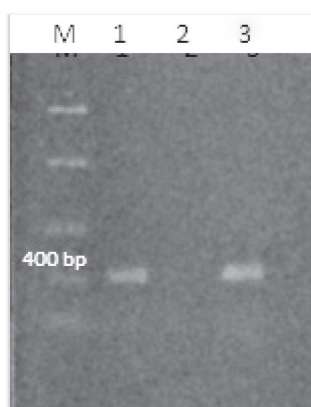


Рис. 1. Детекція *hobo* елемента у представників природних популяцій України. М – маркер молекулярної ваги, 1 – смт. Мотовилівка (всі досліджені популяції характеризувались наявністю фрагмента, як у представників популяції смт. Мотовилівка), 2 – негативний контроль ПЛР, 3 – позитивний контроль (лінія *Canton S*)

Отриманий результат свідчить, що фрагменти очікуваної довжини присутні у представників всіх досліджуваних популяціях *D. melanogaster* України (рис. 1). Для підтвердження ідентичності отриманих ампліконів саме *hobo* елемента, було проведено їх секвенування. Отримані послідовності вирівнювали проти канонічної анотованої послідовності повнорозмірного *hobo* елемента *D. melanogaster* з Генбанку (GeneBank accession: M69216). Послідовності всіх досліджуваних популяцій виявились ідентичними між собою, а також ідентичними відповідній ділянці канонічної анотованої послідовності. Отриманий результат дозволяє стверджувати, що у популяціях України присутня не реліктова форма транспозону, що свідчить про недавнє походження *hobo* елемента у представників досліджуваних популяцій, який представлений або повнорозмірними елементами, або

делетованими копіями (проте у таких елементах повинна бути делетована 5' частина, оскільки S-регіон знаходиться ближче до 3' кінця). Відсик-веновані нами послідовності фрагментів з популяцій міст Одеса, Чорнобиль та поблизу водойми-охолоджувача ЧАЕС, внесено до Генбанку за наступними ідентифікаційними номерами HQ829355, HQ829356, HQ829357.

Для порівняння отриманих нами послідовностей з послідовностями *hobo* елемента у інших популяціях *D. melanogaster* світу, було застосовано пошук у базі GeneBank Національного центру біотехнологічної інформації США (National Center for Biotechnology Information, NCBI) за алгоритмом BLAST. Результати пошуку виявили лише дві послідовності з ідентичністю більше 95%, а саме повнорозмірні *hobo* елементи *HFL1* та *hobo108*. Результати вирівнювання представлені на рис. 2.

HQ829355	AGGTGTTTTGCATTTACAAATTCAGTCCCAATTTATACACATTAAGCTTAGAATCTA	60
HFL1	AGGTGTTTTGCATTTACAAATTCAGTCCCAATTTATACACATTAAGCTTAGAATCTA	60
hobo108	AGGTGTTTTGCATTTACAAATTCAGTCCCAATTTATACACATTAAGCTTAGAATCTA	60

HQ829355	CAGAAACTCCAAGAACTCCAGAAACTCCAGAAACTCCAG-----	99
HFL1	CAGAAACTCCAAGAACTCCAGAAACTCCAGAAACTCCAG-----	99
hobo108	CAGAAACTCCAAGAACTCCAGAAACTCCAGAAACTCCAGAAACTCCAGAAA	120

HQ829355	-----AAAGTCTAGAAAGTCCAA	117
HFL1	-----AAAGTCTAGAAAGTCCAA	117
hobo108	CTCCAGAAACTCCAGAAACTCCAGAAACTCCAGAAACTCCAGAAAGTCTAGAAAGTCCAA	180

HQ829355	ACTTATTTCCAAAAAACAACAATATCTTCTGAAAACGAATTCTTCTTCCCAAAGT	177
HFL1	ACTTATTTCCAAAAAACAACAATATCTTCTGAAAACGAATTCTTCTTCCCAAAGT	177
hobo108	ACTTATTTCCAAAAAACAACAATATCTTCTGAAAACGAATTCTTCTTCCCAAAGC	240

HQ829355	TAGTAACTGAGTCTAATTCCAACCTCAATGAATCTCCATTAGATGAAATGGAACGATATA	237
HFL1	TAGTAACTGAGTCTAATTCCAACCTCAATGAATCTCCATTAGATGAAATGGAACGATATA	237
hobo108	CAGTAACTGAGTCTAATTCCAACCTCAATGAATCTCCATTAGATGAAATGGAACGATATA	300

HQ829355	TTAGACAAAGAGTTCCATTGTCTCAAAATTTTGAAGTAATGAGTGTTGGAAAAATAACG	297
HFL1	TTAGACAAAGAGTTCCATTGTCTCAAAATTTTGAAGTAATGAGTGTTGGAAAAATAACG	297
hobo108	TTAGACAAAGAGTTCCATTGTCTCAAAATTTTGAAGTAATGAGTGTTGGAAAAATAACG	360

HQ829355	CAAACCTTATACCCTCAGTTGTCAAAGTT	325
HFL1	CAAACCTTATACCCTCAGTTGTCAAAGTT	325
hobo108	CAAACCTTATACCCTCAGTTGTCAAAGTT	388

Рис. 2. Вирівнювання послідовностей *hobo* елемента з популяцій *D. melanogaster* України (HQ829355) з відомими послідовностями з Генбанку *HFL1* – канонічна послідовність *hobo* елемента (M69216) та *hobo108* (X04705.1) – послідовність з лінії Daek (Daekwanryeong)

Хотілося б відзначити, що ми не виявили жодного фрагменту послідовності з інших популяцій світу, тому на сьогоднішній день неможливо зробити висновки щодо географічного поліморфізму або градієнту за нуклеотидною послідовністю даного елемента, окрім поліморфізму кількості TPE повторів [5].

Як демонструє рис. 2, наявні в Генбанку послідовності не ідентичні, крім того, вони походять з різних регіонів світу (*HFL1* з Північної Америки, *hobo108* з Кореї). Вказані відрізняються числом мікросателітних TPE повторів, за якими було показано поліморфізм у природних популяціях *D. melanogaster* світу [5], а також заміною двох нуклеотидів TT→CC у позиціях 177-178. Заміна вказаних нуклеотидів призводить до заміни амінокислот у послідовності білка транспозази P → L у позиції 576 (UniProtKB

accession: P12258). Оцінити вплив даної заміни на функцію транспозази *hobo* важко через відсутність інформації з приводу вторинної та третинної структури даного білка. Відсеквеновані нами фрагменти ідентичні саме фрагменту канонічної послідовності послідовності *HFL1*, який походить з лінії дикого типу *Oregon R*, зібраної в Північній Америці[8].

Таким чином проведене дослідження свідчить, що фрагменти *hobo* елемента наявні сьогодні у всіх вивчених популяціях *D. melanogaster* України. Результати вирівнювання показують ідентичність послідовностей *hobo* елемента з популяцій України з канонічною послідовністю, що вказує на інвазивне походження даного елемента у геномах представників досліджуваних популяцій.

Автори висловлюють щирю подяку проф Т. Мюссе (Університет Південної Кароліни, Південна Кароліна, США) за допомогу у секвенуванні, та Г. Міліневському, І. Чижевському, Р. Якимчуку, а також співробітникам Інституту винограду та вина “Магарач” та Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова за допомогу у зборі матеріалу.

Література

1. González J., Macpherson J.M., Petrov D.A., A recent adaptive transposable element insertion near highly conserved developmental loci in *Drosophila melanogaster* // Mol. Biol. Evol. – 2009. – DOI:10.1093/molbev/msp107
2. Kazazian H.H.Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution // Science. – 2004. – Vol. 303. – P. 1626-1632.
3. Vieira C., Bi'émont C. Transposable element dynamics in two sibling species: *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* // Genetica. – 2004. – Vol. 120. – P. 115–123.
4. Depra M., da Silva Valente V.L., Margis R., Loreto E. The *hobo* transposon and *hobo*-related elements are expressed as developmental genes in *Drosophila* // Gene. – 2009. – Vol. 448. – P. 57-63.
5. Bonnivard E., Bazin C., Denis B., Higuët D. A scenario for the *hobo* transposable elements invasion, deduced from the structure of natural population of *Drosophila melanogaster* using tandem TPE repeats // Genet. Res. Camb. – 2000. – Vol. 75. – P. 13-23.
6. Itoh M., Takeuchi N., Yamaguchi M., Yamamoto M., Boussy I.A. Prevalence of full-size *P* and *KP* elements in North American populations of *Drosophila melanogaster* // Genetica. – 2007. – Vol. 131. – P. 21–28.
7. Berg R.L. A genetical analysis of wild populations of *Drosophila melanogaster* // D I S. – 1941. – Vol. 15.
8. McGinnis W., Shermoen A.W., Beckendorf S.K. A transposable element inserted just 5' to a *Drosophila* glue protein gene alters gene expression and chromatin structure // Cell. – 1983. – Vol. 34. – P. 75-84.
9. Calvi B.R., Hong T.J., Findley S.D., Gelbart W.M. Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants: *hobo*, *Activator*, and *Tam3* // Cell. – 1991. – Vol. 66. – P. 465-471.
10. Boussy I.A., Itoh M. Wandering of *hobo*: a transposon in *Drosophila melanogaster* and its close relatives // Genetica. – 2004. – Vol. 120. – P. 125-136.

KOZERETSKA D.I., SERGA S.V., DEMYDOVA A.S., SHKLIAR S.E., KOZERETSKA I.A.

*ESC “Institute of Biology”, National Taras Shevchenko University of Kyiv
Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str, 64, e-mail: iryna.kozeretska@gmail.com*

HOB0 TRANSPOSON IN THE NATURAL POPULATIONS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* IN UKRAINE

Aims. The goal of our study was to investigate population dynamics of the *hobo* transposon in the wild population of *Drosophila melanogaster* in Ukraine. **Methods.** Samples from the wild populations were collected across 11 different locations. Presence of the *hobo* element was determined using PCR with following sequencing. ClustalW and VectorNTI 11.0 software was used for sequence comparison. **Results.** We have

found fragments of *hobo* transposon in all studied populations of *D. melanogaster*. Alignment test provides the evidence of identity of the studied element with the canonical sequence, that suggests the invasive pattern of this transposon in sampled populations' genomes.

Key words: *Drosophila melanogaster*, *hobo* transposon, natural populations.

**КОЗЕРЕЦЬКА І.А., СЕРГА С.В., ПРОЦЕНКО О.В., ЖУК О.В., АЛЕКСАНДРОВ А.В.,
ДЕМИДОВ С.В.**

*ННЦ "Інститут біології", Київський національний університет імені Тараса Шевченка Україна,
01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64, e-mail: iryna.kozeretska@gmail.com*

ЯВИЩЕ «МУТАЦІЙНОГО СПАЛАХУ» У ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER* УКРАЇНИ

Дослідження темпів спонтанного мутаційного процесу є важливим для розуміння еволюційних подій у популяціях різних видів. Дослідження природних популяцій *D. melanogaster* на території колишнього Радянського Союзу показало, що мутаційний процес у цих популяціях характеризувався хвилеподібним зростанням частоти мутацій у різні періоди [1]. У результаті цих досліджень були описані характерні для природних популяцій "моди на мутації" [2, 3, 4].

Дослідження природних популяцій *D. melanogaster* України протягом 2005-2010

років продемонстрували, що всі популяції, які були залучені до аналізу, не характеризуються подіями типу «мутаційного спалаху» [5, 6], хоча кожній з них притаманні певні спадкові зміни.

Різке зростання частоти мутацій у досліджуваних природних популяціях встановлено у 2011 та 2012 роках. Спадкова зміна, частота якої перевищувала спонтанні рівні [7, 8] стосується порушення розвитку другої повздовжньої жилки крила. Ген, який відповідає за розвиток вказаного мутантного фенотипу, локалізується у 4-й хромосомі.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугували особини із природних популяцій *D. melanogaster* різних регіонів України (міст Києва, Одеси, Умані, Варви, Ялти (Магарач), Дрогобича, Пирятин, Харкова, селищ Поліське і Мотовилівка та Чорнобильської зони відчуження) та Швейцарії (м. Лозанна). Збір мух у більшості вказаних локалітетів проводили в серпні, вересні 2011 та 2012 років, у м. Київ та Одеса у 2012 році збір імаго вели протягом сезону (червень – жовтень). У зоні відчуження Чорнобильської АЕС були зібрані представники трьох популяцій із територій з різним рівнем радіаційного забру-

днення (0,4 мР/год (м. Чорнобиль), 2,5-5 мР/год (водойма – охолоджувач ЧАЕС), 2,5-5 мР/год (Поліське).

Увесь природний матеріал було проаналізовано під бінокулярним стереоскопом МБС-10 на наявність видимих фенотипових змін. Виявлених особин із фенотиповими відхиленнями вилучали та досліджували на здатність передавати встановлені фенотипові зміни нащадкам.

Мух утримували на стандартному середовищі при кімнатній температурі [9].

Статистичну обробку результатів проводили за стандартними методиками [10].

Результати та обговорення

У ході досліджень було проаналізовано 14015 імаго із 13-ти популяцій *D. melanogaster* із різних регіонів України та одного локалітету у Швейцарії. Серед проаналізованих особин ідентифіковано імаго з порушенням другої повздовжньої жилки крила. Частота таких особин коливалась в різних популяціях в межах 0,1-2,3% (табл. 1). Кожна з досліджених популяцій характеризувалась наявністю ідентифікованої ознаки

хоча б в одному з років досліджень. Так, в 6-ти природних популяціях вказана спадкова зміна ідентифікована в обох роках досліджень. Чотири популяції характеризувались наявністю мутантних за даною ознакою особин тільки в одному році досліджень. Популяції м. Харкова, Лубен та Лозани були залучені у моніторинг лише у 2012 році, і дві українські популяції продемонстрували наявність мутантних особин.