

УДК 577.21

## ТРАНСПОЗОНЫ МОРСКОГО ЕЖА *STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS* A. AGASSIZ, 1863: *IN SILICO* VERSUS *IN VITRO*

© 2019 г. Е. Е. Лебедев<sup>1</sup>, Д. И. Остромышенский<sup>1,2</sup>, А. И. Соловьева<sup>2</sup>, А. С. Туренко<sup>4</sup>,  
А. Л. Дроздов<sup>1,5, \*\*</sup>, О. И. Подгорная<sup>1,2,3</sup>, Л. С. Адонин<sup>1,2, \*</sup>

<sup>1</sup>Дальневосточный федеральный университет, Владивосток 690950, Россия

<sup>2</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург 194064, Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург 199034, Россия

<sup>4</sup>Лаборатория “Центр геномной биоинформатики им. Ф.Г. Добржанского”  
Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург 199178, Россия

<sup>5</sup>Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,  
Владивосток 690041, Россия

\*e-mail: leo.adonin@gmail.com

\*\*e-mail: anatoliyld@mail.ru

Поступила в редакцию 20.06.2018 г.

После доработки 22.04.2019 г.

Принята к публикации 30.05.2019 г.

Данные о прочитанном геноме пурпурного морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* были использованы для выявления транспозонов (TE, transposable elements) и проверки наличия некоторых из них в геноме серого морского ежа *S. intermedius*. Для дизайна праймеров и выявления соответствующих TE в транскриптом *S. intermedius* использованы известные TE *S. purpuratus*, содержащиеся в базе данных повторов RepBase. Обладающие наибольшим покрытием последовательности TE из транскриптома серого морского ежа собраны на основании сравнения с аннотированными TE генома пурпурного морского ежа. За рамками анализа остались TE, представленные недостаточным количеством ридов (случайных фрагментов) в транскриптом. Сделан вывод, что подход продуктивен: с помощью рассчитанных праймеров из 100 собранных TE серого морского ежа удалось доказать наличие 92 TE в геномной ДНК *S. intermedius*. Рассчитанные с помощью методов биоинформатики последовательности TE присутствуют в геноме серого морского ежа и могут быть применены в дальнейшей работе.

**Ключевые слова:** повторяющаяся ДНК, транспозоны, транскриптом, серый морской еж *Strongylocentrotus intermedius*, пурпурный морской еж *Strongylocentrotus purpuratus*

**DOI:** 10.1134/S0134347519060056

Иглокожие — это эволюционно близкие к хордовым вторичноротые животные. Относительно ранняя эволюционная обособленность, доступность и свободное развитие в морской воде позволили использовать иглокожих, в частности морских ежей, в качестве модельных объектов, чтобы получить ответы на многие ключевые вопросы биологии развития, эволюционной биологии, биохимии, а также клеточной и молекулярной биологии (Kondo, Akasaka, 2012). Благодаря обилию, большому размеру и легкости содержания в лабораторных условиях, морские ежи семейства Strongylocentrotidae стали объектом многих ранних работ по биологии развития (Gustafson, Wolpert, 1963; Monroy, Moggio, 1964; Neyfakh, 1971). Для морских ежей и других иглокожих описаны процессы регенерации (Przibram, 1901). На модели оплодотворения яиц морского ежа впер-

вые показан процесс слияния ядер гамет (Hertwig, 1876; Maderspacher, 2008). Биохимические механизмы клеточного цикла, включая циклиновую регуляцию, впервые описаны также на примере морского ежа (Evans et al., 1983). Подробно изучены морфология (Jensen, 1974; Strathmann, 1979, 1987; Buznikov, Podmarev, 1990; Gagnon, Gilkinson, 1994; Biermann, Marks, 2000; Kitamura et al., 2002), генетика (Roberts et al., 1985; Vawter, Brown, 1986; Palumbi, Wilson, 1990; Palumbi, Kessing, 1991; Biermann, 1998; Debenham et al., 2000) и экология (Agatsuma, 1998; Konar, 2001) представителей семейства Strongylocentrotidae. Ввиду высокой продолжительности жизни некоторых видов морских ежей (Brey, 1991; Davidson et al., 2002; Ebert, 2008; Ebert et al., 2008) эти организмы стали моделью для изучения процессов старения.

В 2006 г. опубликован геном пурпурного морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* (см.: Sodergren et al., 2006). Это один из немногих хорошо аннотированных геномов иглокожих. Аннотирование генома морского ежа позволило структурировать информацию о регуляторных генных сетях (РГС), определяющих эмбриональное развитие (Oliveri et al., 2008; Peter, Davidson, 2009, 2017). Концепция РГС и подтверждающие ее данные, получены на модели этого вида морского ежа еще в догеномную эру. Гены, включенные в РГС, кодируют факторы транскрипции, компоненты путей передачи сигнала и структурные гены в качестве маркеров дифференцированных состояний. Из названия концепции следует, что основная роль в процессах работы генных каскадов отводится генам экзонам. Проект “Геном человека” и последовавшее за ним быстрое чтение большого количества геномов сделали очевидным, что основную массу генома составляют массивы повторяющейся ДНК. Экзоны (кодирующие фрагменты ДНК) занимают не более 2(3)% генома (Кери, 2016). Из транспозонов (ТЕ) разных классов состоит не менее 50% от большей части хорошо собранных геномов. Не менее 80% генома транскрибируется в разных тканях и на разных стадиях развития (Karaganov, St. Laurent, 2012; Кери, 2016). Транскрипты ТЕ являются основным компонентом длинных некодирующих РНК (lncRNA – long non coding RNA); lncRNA способна регулировать ансамбли генов за счет изменения конформации хроматина (Li et al., 2016; Подгорная и др., 2018). Это более высокий уровень регуляции по сравнению с генными каскадами, постулируемыми РГС.

Показано, что ретротранспозоны (наиболее многочисленный у млекопитающих класс ТЕ) экспрессируются на ранних стадиях развития мыши, причем спектр экспрессии разных классов меняется на доимплантационных стадиях развития, а после имплантации транскрипция большинства (но не всех) ретропозонов репрессируется. Для перепрограммирования геномов млекопитающих после оплодотворения требуется крупномасштабная транскрипция ТЕ. Данная транскрипция регулируется по принципу обратной связи – через lncRNA (Fadloun et al., 2013). И если для ретротранспозонов получены первые сведения об их активности во время эмбриогенеза, то роль ДНК-транспозонов в развитии пока неизвестна. Некодирующая ДНК остается наименее исследованной частью геномов эукариот, особенно у беспозвоночных. Однако именно беспозвоночные, у которых хорошо изучен эмбриогенез и которые характеризуются обилием ДНК транспозонов, являются перспективной моделью для изучения новой регуляторной системы lncRNA. В данной работе мы воспользовались прочитанным геномом пурпурного морского ежа

*S. purpuratus* для выявления ТЕ и проверки наличия некоторых из них в геноме серого морского ежа *S. intermedius*. Настоящее исследование представляет собой подготовительный этап перед использованием подобранных и проверенных праймеров для изучения транскрипции соответствующих ТЕ в развитии серого морского ежа. Расхождение видов морских ежей произошло около 10 млн лет назад (Lee, 2000, 2003). Известны высокая эволюционная вариабельность ТЕ и длительное время, прошедшее со времени видообразования, что ведет к появлению видоспецифичных ТЕ (Подгорная, 2016).

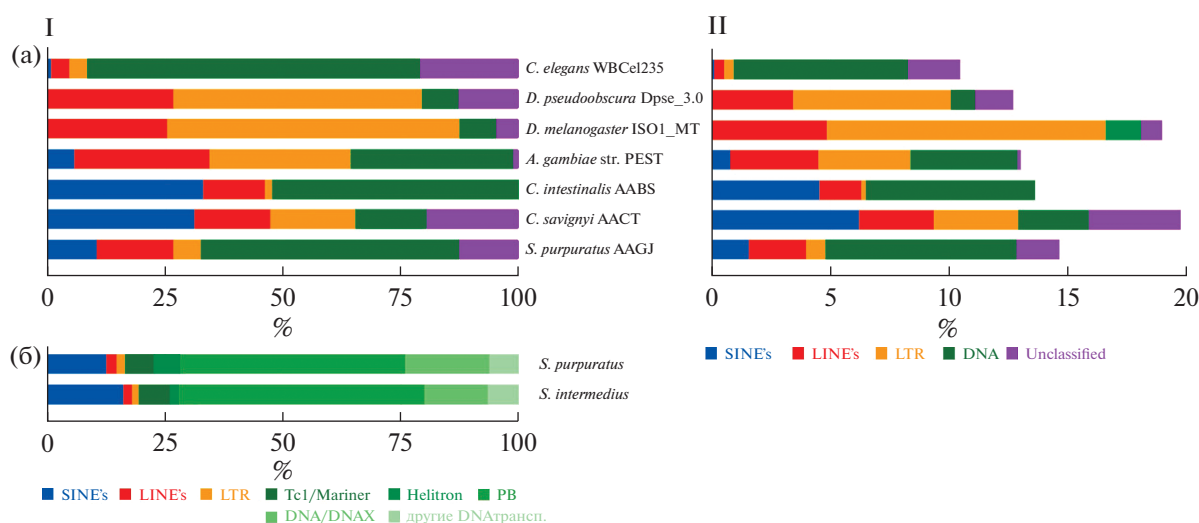
Для дизайна праймеров и выявления соответствующих ТЕ в транскриптоме *S. intermedius* мы использовали известные ТЕ *S. purpuratus*, сведения о которых содержатся в базе данных повторов RepBase. Для сравнения транскрипции выявленных ТЕ анализировали транскриптомы целоцитов серого и пурпурного морских ежей.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Анализ повторов генома *Strongylocentrotus purpuratus*.** Геном пурпурного морского ежа *S. purpuratus* содержит 284 последовательности ТЕ, которые аннотированы в базе данных RepBase (<http://www.girinst.org/repbase/update/search.php?query=purpuratus&querytype=Taxonomy>). Геномы *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *D. pseudoobscura*, *Anopheles gambiae*, *Ciona intestinalis*, *C. savignyi* и *S. purpuratus* получены из публичной базы данных ([www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly)); их анализировали на распределение повторов с помощью программы Repeat Masker (<http://www.repeatmasker.org>) с параметрами по умолчанию. Для поиска использовали базу данных повторов, характерных для эукариот.

**Определение последовательностей повторов серого морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*.** Чтобы нивелировать возможные видовые различия в последовательностях ТЕ у видов морских ежей, разделившихся миллионы лет назад, сравнивали ТЕ генома пурпурного морского ежа и транскриптома серого морского ежа. С помощью геномного ассемблера SPADES (с параметрами по умолчанию) из ридов транскриптома серого морского ежа, картированных на соответствующий мобильный элемент пурпурного морского ежа, собрали последовательности первых (по представленности) 100 мобильных элементов ([http://www.cytspb.rssi.ru/lab\\_podgornaya/table1\\_02-2018.xlsx](http://www.cytspb.rssi.ru/lab_podgornaya/table1_02-2018.xlsx)).

Риды секвенирования транскриптомов целоцитов *S. intermedius* и *S. purpuratus* находятся в открытом доступе в базе данных Sequence Read Archive (<http://trace.ddbj.nig.ac.jp>, accession ID SRP034740 и SRS353141 соответственно). Секве-



**Рис. 1.** ТЕ в геноме пурпурного морского ежа по сравнению с геномами беспозвоночных (а) и в транскриптах цело­моцитов пурпурного и серого морских ежей (б). а – распределение ТЕ в геномах *Drosophila melanogaster*, *D. pseudoobscura*, *Anopheles gambiae*, *Ciona intestinalis*, *C. savignyi*, *Caenorhabditis elegans* и *Strongylocentrotus purpuratus*. Классы ТЕ выделены цветом: класс nonLTR–SINE – голубой, LINE – красный; LTR ТЕ – желтый; ДНК транспозоны – зеленый; не­аннотированные повторы – сиреневый. I – относительное распределение последовательностей ТЕ в геномах (сумму всех ТЕ, маскированных Repeat Masker, принимали за 100%), II – процент содержания ТЕ в геномах беспозвоночных. б – относительное покрытие транскриптомов цело­моцитов *Strongylocentrotus purpuratus* и *S. intermedius* представителями разных классов ТЕ (учитывали количество ридов отдельного ТЕ × длину рида/длину последовательности этого же ТЕ). Количество классов ТЕ выражено в процентах от всех ТЕ транскриптома. Выделение цветом, как на (а); отдельные типы ДНК транспозонов обозначены градациями зеленого (шкала – под панелью б). Неаннотированные повторы не учитывали.

нирование в оригинальном эксперименте проводили с обогащением фракции polyA-транскриптов. Исходные риды обрабатывали в программе Trimmomatic (Bolger et al., 2014). Риды отфильтровывали по качеству чтения (удалили риды со средним качеством чтения <20 и риды, содержавшие технические последовательности Illumina). Очищенные риды картировали на последовательности мобильных элементов *S. purpuratus* (RepBase). Картирование проводили с помощью программы Bowtie2 с параметром local-sensitive. Для каждого ТЕ подсчитывали процент отношения картировавшихся ридов к общему числу ридов, картировавшихся на ТЕ (рис. 1).

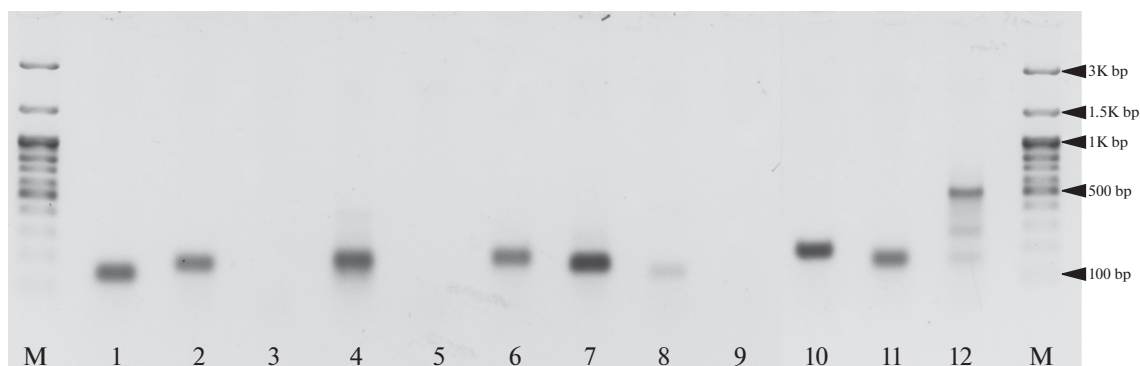
**Дизайн праймеров.** На основе собранных последовательностей ТЕ разработаны специфичные праймеры (приложение 1, [http://www.cytspsb.rssi.ru/lab\\_podgornaya/table1\\_02-2018.xlsx](http://www.cytspsb.rssi.ru/lab_podgornaya/table1_02-2018.xlsx)). Расчет проводили с помощью программы Primer-BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)) с учетом рабочей температуры отжига праймеров в диапазоне 59–61°C и с длиной фланкируемого участка последовательности, не превышающей 300 п.н.

**Выделение геномной ДНК морского ежа *S. intermedius*.** Выделение проводили методом фенол-хлороформной экстракции (Sambrook et al., 1989). Концентрацию и чистоту выделенной ДНК оценивали по оптической плотности полученного раствора на Nanodrop ND-2000. Концентрация

образцов варьировала от 250 до 390 мкг/мл (A260/280 составляла 1.8–2). Полученные образцы ДНК *S. intermedius* разводили до концентрации 1 мкг/мкл и использовали в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции (ПЦР).

**ПЦР-анализ.** Амплификацию целевых фрагментов проводили в термоциклере Eppendorf Mastercycler Personal 5332 (Eppendorf, Германия). Состав реакционной смеси объемом 25 мкл для каждой реакции: 1-кратный Taq-Red Buffer (Evrogen, Россия), 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 пМ каждого праймера, 0.2 мМ dNTP и 0.25 ед. Taq-полимеразы (Evrogen, Россия), 1 мкг матрицы ДНК. Использовали следующие параметры реакции: первичная денатурация при температуре 95°C 3 мин, затем при 94°C 20 с, при 59°C 20 с и при 72°C 60 с; количество циклов реакции 30. Контролями служили ПЦР в идентичных условиях, где в качестве матрицы были использованы: а) геномная ДНК лосося, б) геномная ДНК человека (линия HeLa), в) матрица заменена на равный объем ddH<sub>2</sub>O.

Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, в ТАЕ (трис-ацетатном) буфере. Гель окрашивали бромистым этидием. Изображения для печати обрабатывали в Adobe Photoshop.



**Рис. 2.** ПЦР-анализ геномной ДНК с рассчитанными праймерами к ТЕ серого морского ежа. 1 – PB-N5; 2 – PB-N7; 3 – DNA-1-2; 4 – DNA-1-1; 5 – *Sola2-3N1*; 6 – *Tc1-N1*; 7 – DNAX-12; 8 – *Mariner-2N*; 9 – *SINE2-3*; 10 – RTE-12; 11 – *Gypsy10-LTR*; 12 – DNAX-8. М – маркер молекулярных масс [100bp + 1.5Kb + 3Kb (Evrogen)]. 3, 5, 9 – праймеры непригодны; 10 – элемент претерпел видоспецифичные изменения; 1, 2, 4, 6, 7, 8, 11, 12 – положительный результат.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

На основе анализа 284 последовательностей ТЕ пурпурного морского ежа, представленных в базе данных повторов RepBase, была построена диаграмма их распределения по основным классам: non-LTR, LTR-ТЕ и ДНК-транспозоны (рис. 1а). До 12.5% последовательностей остались неидентифицированными, что неудивительно при известной недостаточной степени аннотации геномов (Politz et al., 2013; Кери, 2016).

В транскриптом для каждого мобильного элемента считали покрытие ридами (процент ридов), которое отражает представленность этого элемента. Транскриптомы целооцитов обоих видов морских ежей оказались сходными по распределению основных классов ТЕ: как и в геноме, доминирующими оказались ДНК-транспозоны. Non-LTR ТЕ составляли не более 20% ТЕ-транскриптома. Максимально были представлены ДНК-транспозоны piggyBac (PB), Helitron, Tc/Mariner (рис. 1б). SINE элементы доминировали среди non-LTR ТЕ. Представленность LTR ретропазонов в транскриптом была меньше, чем в геноме, и варьировала от 1 до 2% (рис. 1б).

Последовательности ТЕ, полученные на основании методов биоинформатики, проверили на наличие в геномной ДНК серого морского ежа. Для этого с помощью программы Primer-BLAST подобрали по паре праймеров, которые фланкировали участок не более 300 п.н. каждого мобильного элемента. Такое ограничение необходимо для удобства электрофоретического разделения и для следующего этапа работы – синтеза меченого зонда для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). При ПЦР-анализе в 92 вариантах (из 100 опробованных) мы получили продукт расчетной длины, в остальных случаях либо продукт отсутствовал, либо наблюдали неспецифическую реакцию (шмер, лестница) (рис. 2, линия 10). Во всех 92 экспериментах рассчитанные праймеры не да-

вали продукта в контрольных ПЦР, где геномная ДНК серого морского ежа была заменена на ДНК человека или лосося.

ПЦР-анализ наличия ТЕ в геномной ДНК серого морского ежа проводили в стандартизованных условиях без изменения количества циклов (см. раздел “Материал и методика”). Как следствие, интенсивность зоны при электрофоретическом разделении продуктов амплификации до некоторой степени отражало относительное содержание количества элементов в геноме (рис. 2). Вероятно, содержание элемента DNAX-12 (рис. 2, линия 7) было больше, чем элемента *Mariner-2N* (рис. 2, линия 8), в то время как количество элементов *Gypsy10-LTR* и DNAX-8 не различалось (рис. 2, линии 11 и 12). Полный список найденных *in silico* ТЕ в транскриптом серого морского ежа и рассчитанных к ним праймеров приведен в приложении 1 ([http://www.cytspb.rssi.ru/lab\\_podgornaya/table1\\_02-2018.xlsx](http://www.cytspb.rssi.ru/lab_podgornaya/table1_02-2018.xlsx)).

Использованный подход продуктивен: из 100 собранных ТЕ серого морского ежа с помощью рассчитанных праймеров удалось доказать наличие 92 ТЕ в геномной ДНК *S. intermedius*. Рассчитанные с помощью методов биоинформатики последовательности ТЕ присутствуют в геноме серого морского ежа и могут быть использованы в дальнейшем.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Повторяющаяся некодирующая ДНК остается наименее исследованной частью геномов эукариот. Активность ТЕ может быть вредоносной для геномов хозяев и способна вызывать различные заболевания, однако именно ТЕ являются одним из важнейших источников генетических изменений, которые формируют разнообразие геномов (Tollis, Boissinot, 2012). В последнее время появляются работы, свидетельствующие о важности

TE для функционирования клетки: роль TE в структуре генома (Pardue et al., 2005), в его размере (Gregory, 2005), в перестройках (Bennetzen, 2005), а также в эволюционном вкладе в геном (Medstrand et al., 2005).

Транспозоны, известные также как “прыгающие гены”, – широко распространенный класс повторяющихся последовательностей, которые до недавнего времени рассматривали в основном как “эгоистичные” внутригеномные паразитные последовательности (Doolittle, Sapienza, 1980; Orgel et al., 1980). Но TE занимают существенную часть эукариотических геномов: не менее 50% в собранной части человеческого генома и мыши, но не более 15–20% среди относительно хорошо аннотированных геномов беспозвоночных (рис. 1а, II). Увеличение количества TE в направлении эволюционно более продвинутых таксонов может говорить об их важности для прогрессивной эволюции. Так, показано, что млекопитающие смогли обрести эволюционное преимущество благодаря активности эндогенных ретровирусов (ERV, класс LTR). В процессе вынашивания плода участвует более 1000 генов, которые прежде выполняли иные функции в разных частях организма. Эти гены обрели чувствительность к женскому гормону прогестерону, которая, в свою очередь, возникла благодаря ERV (Подгорная и др., 2018). Вероятно, ERV внедрил свою ДНК в сперматозоид или яйцеклетку (Mager, Stoye, 2015). В настоящее время ERV рассматриваются как части системы регуляции геномов – как транскрипты и компоненты lncRNA.

В последние годы обнаружено, что транскрипты TE являются основным компонентом lncRNA. На ранних стадиях развития почти весь геном у немногих изученных эукариот транскрибируется (Mattick, Makunin, 2006; Kapranov et al., 2007). В результате образуется РНК, большая часть которой не имеет выражения в белке (Carninci et al., 2005; Cheng et al., 2005). lncRNA являются компонентами новой регуляторной системы, отличной от сравнительно хорошо изученной системы РГС (Amaral et al., 2008; Kapranov, St. Laurent, 2012; Кери, 2016). Идентификация и аннотация TE становятся актуальными, но считаются одними из самых сложных задач в области вычислительной геномики (Lerat, 2010; Koch et al., 2014). В настоящей работе применен набор известных программ и алгоритмов для выявления и систематизации TE серого морского ежа, для которого отсутствует аннотированный геном. Для *S. intermedius* мы не могли использовать ни одну из известных программ для поиска TE элементов. Поэтому был использован подход, который опирается на анализ последовательностей секвенированного транскриптома и генома близкого вида.

Подтвердилось предположение о высоком содержании у морских ежей ДНК-транспозонов, занимающих около половины всех TE. Содержание non-LTR TE класса SINE оказалось существенно ниже, чем в геномах позвоночных (Chalopin et al., 2015). В геноме пурпурного морского ежа представлены ДНК-транспозоны (~55% относительно всех TE), non-LTR TE, неаннотированные TE и LTR-TE (рис. 1а). Данный состав сильно отличается от усредненного генома млекопитающих, где количество TE представлено по убыванию: non-LTR (не менее ~50% SINE и LINE), LTR (ERV ~10%), ДНК транспозоны (~1%) (Lander et al., 2001; Waterston et al., 2002). Показано, что среди TE, составляющих транскриптомы целомоцитов у обоих видов морских ежей, мажорными по покрытию являются представители в основном двух классов: ДНК-транспозоны (piggyBac, Helitron, Tc/mariner) и non-LTR-ретропозоны (SINE). Последовательности TE из транскриптома серого морского ежа, наиболее многочисленные (мажорные) в соответствии со значениями покрытия, собраны на основании сравнения с аннотированными TE генома пурпурного морского ежа. Многие TE остались за рамками нашего анализа, так как были представлены недостаточным количеством ридов в транскриптом. Успешно собранные последовательности TE позволили оценить степень сходства по сравнению с генами у видов с эволюционным расстоянием в 10 млн лет. Сравнение показало, что сходство TE не превышает 87%, в то время как сходство нуклеотидных последовательностей генов (Hsp70, Актин и GAPDH) достигает 97%.

Таким образом, результаты настоящего исследования подтверждают оправданность использованного подхода. Экспериментальная работа с праймерами, сконструированными на основе TE пурпурного морского ежа для идентификации TE серого морского ежа, привела бы к неверным результатам. Например, отсутствие ПЦР-продукта может быть расценено как артефакт, основанный на несходстве последовательностей. Проверенные и давшие положительный результат 92 последовательности TE серого морского ежа из 100 собранных, безусловно, пригодны для дальнейшей работы. Восемь пар праймеров, которые не дали ампликона расчетной массы или же дали набор продуктов (шмер), рассчитаны для последовательностей с небольшим количеством ридов в транскриптом, что повлекло ошибки сборки. Мы надеемся исправить эти ошибки после сборки прочитанного генома серого морского ежа.

Пространственные и временные изменения транскрипционной активности генома сопровождаются изменением архитектуры ядра, которая, в свою очередь, играет роль в регуляции экспрессии генов. Упорядоченная, но динамическая организация хроматина особенно необходима в

раннем эмбриогенезе в процессе морфогенеза. Важной задачей остается определение роли конкретных ТЕ в регуляции конформации хроматина, что невозможно без их детальной классификации и аннотации.

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ**

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

**ФИНАНСИРОВАНИЕ**

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (17-04-02161\_a) и РНФ (19-74-20102; 19-74-10044).

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

*Кери Н.* Мусорная ДНК. Путешествие в темную материю генома. М.: Лаборатория знаний. 2016. 336 с.

*Подгорная О.И.* Внеклеточная ДНК поможет пролить свет на нерешенные проблемы теории эволюции // *Цитология*. 2016. Т. 58. № 5. С. 385–388.

*Подгорная О.И., Остромышенский Д.И., Енукашвили Н.И.* Кому он нужен, этот мусор, или темная материя генома // *Биохимия*. 2018. Т. 83. № 4. С. 610–628.

*Agatsuma Y.* Aquaculture of the sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) transplanted from coralline flats in Hokkaido // *J. Shellfish Res.* 1998. V. 17. P. 1541–1547.

*Amaral P.P., Dinger M.E., Mercer T.R., Mattick J.S.* The eukaryotic genome as an RNA machine // *Science*. 2008. V. 319. P. 1787–1789.

*Bennetzen J.L.* Transposable elements, gene creation and genome rearrangement in flowering plants // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2005. V. 15. P. 621–627.

*Biermann C.H.* The molecular evolution of sperm bindin in six species of sea urchins (Echinoidea: Strongylocentrotidae) // *Mol. Biol. Evol.* 1998. V. 15. P. 1761–1771.

*Biermann C.H., Marks J.A.* Geographic divergence of gamete recognition systems in two species in the sea urchin genus *Strongylocentrotus* // *Zygote*. 2000. V. 8. Suppl. 1. P. S86–S87.

*Bolger A.M., Lohse M., Usadel B.* Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. V. 30. P. 2114–2120.

*Brey T.* Population dynamics of *Sterechinus antarcticus* (Echinodermata: Echinoidea) on the Weddell Sea shelf and slope, Antarctica // *Antarct. Sci.* 1991. V. 3. № 3. P. 251–256.

*Buznikov G.A., Podmarev V.I.* The sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis*, *S. nudus*, and *S. intermedius* // *Animal species for developmental studies*. V. 1. Inverte-

brates / Eds T.A. Dettlaff, S.G. Vassetzky. New York: Consultants Bureau. 1990. P. 253–285.

*Carninci P., Kasukawa T., Katayama S. et al.* The transcriptional landscape of the mammalian genome // *Science*. 2005. V. 309. P. 1559–1563.

*Chalopin D., Naville M., Plard F. et al.* Comparative analysis of transposable elements highlights mobilome diversity and evolution in vertebrates // *Genome Biol. Evol.* 2015. V. 7. P. 567–580.

*Cheng J., Kapranov P., Drenkow J. et al.* Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution // *Science*. 2005. V. 308. P. 1149–1154.

*Davidson E.H., Rast J.P., Oliveri P. et al.* A genomic regulatory network for development // *Science*. 2002. V. 295. P. 1669–1678.

*Debenham P., Brzezinski M.A., Foltz K.R.* Evaluation of sequence variation and selection in the bindin locus of the red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus* // *Mol. Evol.* 2000. V. 51. P. 481–490.

*Doolittle W.F., Sapienza C.* Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution // *Nature*. 1980. V. 284. P. 601–603.

*Ebert T.A.* Longevity and lack of senescence in the red sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus* // *Exp. Gerontol.* 2008. V. 43. P. 734–738.

*Ebert T.A., Russell M.P., Gamba G., Bodnar A.* Growth, survival, and longevity estimates for the rock-boring sea urchin *Echinometra lucunter lucunter* (Echinodermata, Echinoidea) in Bermuda // *Bull. Mar. Sci.* 2008. V. 82. P. 381–403.

*Evans T., Rosenthal E.T., Youngblom J. et al.* Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division // *Cell*. 1983. V. 33. P. 389–396.

*Fadloun A., Eid A., Torres-Padilla M.E.* Mechanisms and dynamics of heterochromatin formation during mammalian development: closed paths and open questions // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2013. V. 104. P. 1–45.

*Gagnon J.M., Gilkinson K.D.* Discrimination and distribution of the sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis* (O.F. Müller) and *S. pallidus* (G.O. Sars) in the Northwest Atlantic // *Sarsia*. 1994. V. 79. P. 1–11.

*Gregory T.R.* Synergy between sequence and size in large-scale genomics // *Nat. Rev. Genet.* 2005. V. 6. P. 699–708.

*Gustafson T., Wolpert L.* The cellular basis of morphogenesis and sea urchin development // *Int. Rev. Cytol.* 1963. V. 15. P. 139–214.

*Hertwig O.* Beiträge zur Kenntnis der Bildung, Befruchtung und Teilung des tierischen Eies // *Morphol. Jahrb.* 1876. V. 1. P. 347–434.

*Jensen M.* The Strongylocentrotidae (Echinoidea), a morphologic and systematic study // *Sarsia*. 1974. V. 57. P. 113–148.

*Kapranov P., Cheng J., Dike S. et al.* RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription // *Science*. 2007. V. 316. P. 1484–1488.

- Kapranov P., St. Laurent G.* Genomic “dark matter”: implications for understanding human disease mechanisms, diagnostics, and cures // *Front. Genet.* 2012. V. 3. e95.
- Kitamura K., Nishimura Y., Kubotera N. et al.* Transient activation of the micro1 homeobox gene family in the sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*) micromere // *Dev. Genes Evol.* 2002. V. 212. P. 1–10.
- Koch P., Platzer M., Downie B.R.* RepARK – *de novo* creation of repeat libraries from whole-genome NGS reads // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. e80.
- Konar B.* Seasonal changes in subarctic sea urchin populations from different habitats // *Polar Biol.* 2001. V. 24. P. 754–763.
- Kondo M., Akasaka K.* Current status of echinoderm genome analysis – what do we know? // *Curr. Genomics.* 2012. V. 13. P. 134–143.
- Lander E.S., Linton L.M., Birren B. et al.* International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome // *Nature.* 2001. V. 409. № 6822. P. 860–921.
- Lee Y.-H.* Evolution of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* based on DNA sequences of a mitochondrial gene, cytochrome c oxidase subunit I // *Sea. J. Korean Soc. Oceanogr.* 2000. V. 5. P. 157–168.
- Lee Y.-H.* Molecular phylogenies and divergence times of sea urchin species of Strongylocentrotidae, Echinoida // *Mol. Biol. Evol.* 2003. V. 20. № 8. P. 1211–1221.
- Lerat E.* Identifying repeats and transposable elements in sequenced genomes: how to find your way through the dense forest of programs // *Heredity.* 2010. V. 104. P. 520–533.
- Li R., Zhu H., Luo Y.* Understanding the functions of long non-coding RNAs through their higher-order structures // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. e702. <https://doi.org/10.3390/ijms17050702>
- Maderspacher F.* Theodor Boveri and the natural experiment // *Curr. Biol.* 2008. V. 18. P. R279–R286.
- Mager D.L., Stoye J.P.* Mammalian endogenous retroviruses // *Microbiol. Spectrum.* 2015. V. 3. № 1. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0009-2014>
- Mattick J.S., Makunin I.V.* Non-coding RNA // *Hum. Mol. Genet.* 2006. V. 15. P. R17–R29.
- Medstrand P., van de Lagemaat L.N., Dunn C. et al.* Impact of transposable elements on the evolution of mammalian gene regulation // *Cytogenet. Genome Res.* 2005. V. 110. P. 342–352.
- Monroy A., Maggio R.* Biochemical studies on the early development of the sea urchin // *Adv. Morphog.* 1964. V. 4. P. 95–145.
- Neyfakh A.A.* Steps of realization of genetic information in early development // *Curr. Top. Dev. Biol.* 1971. V. 6. P. 45–77.
- Oliveri P., Tu Q., Davidson E.H.* Global regulatory logic for specification of an embryonic cell lineage // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. V. 105. P. 5955–5962.
- Orgel L.E., Crick F.H., Sapienza C.* Selfish DNA // *Nature.* 1980. V. 288. P. 645–646.
- Pardue M.L., Rashkova S., Casacuberta E. et al.* Two retrotransposons maintain telomeres in *Drosophila* // *Chromosome Res.* 2005. V. 13. P. 443–453.
- Palumbi S.R., Kessing B.D.* Population biology of the trans-Arctic exchange: mtDNA sequence similarity between Pacific and Atlantic sea urchins // *Evolution.* 1991. V. 45. P. 1790–1805.
- Palumbi S.R., Wilson A.C.* Mitochondrial DNA diversity in the sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus* and *S. droebachiensis* // *Evolution.* 1990. V. 44. P. 403–415.
- Peter I.S., Davidson E.H.* Modularity and design principles in the sea urchin embryo gene regulatory network // *FEBS. Lett.* 2009. V. 583. P. 3948–3958.
- Peter I.S., Davidson E.H.* Assessing regulatory information in developmental gene regulatory networks // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2017. V. 114. P. 5862–5869.
- Politz J.C.R., Scalzo D., Groudine M.* Something silent this way forms: the functional organization of the repressive nuclear compartment // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2013. V. 29. P. 241–270.
- Przibram H.* Experimentelle Studien über Regeneration // *Wilhelm Roux's Arch. Entwickl. Mech. Org.* 1901. V. 11. P. 321–345.
- Roberts J.W., Johnson S.A., Kier P. et al.* Evolutionary conservation of DNA sequences expressed in sea-urchin eggs and early embryos // *J. Mol. Evol.* 1985. V. 22. P. 99–107.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* Molecular cloning: A laboratory manual: 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- Sodergren E., Weinstock G.M., Davidson E.H. et al.* Sea Urchin Genome Sequencing Consortium. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* // *Science.* 2006. V. 314. № 5801. P. 941–952.
- Strathmann M.F.* Reproduction and development of marine invertebrates of the Northern Pacific coast. Seattle: Univ. of Washington Press. 1987. xii + 670 p.
- Strathmann R.R.* Echinoid larvae from the northeast Pacific (with a key and comment on an unusual type of planktotrophic development) // *Can. J. Zool.* 1979. V. 57. P. 610–616.
- Tollis M., Boissinot S.* The evolutionary dynamics of transposable elements in eukaryote genomes // *Genome Dyn.* 2012. V. 7. P. 68–91.
- Vawter L., Brown W.M.* Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock // *Science.* 1986. V. 234. P. 194–196.
- Waterston R.H., Lindblad-Toh K., Birney E. et al.* Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome // *Nature.* 2002. V. 420. № 6915. P. 520–562.

## Transposons of the Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius* A. Agassiz, 1863: In Silico Versus In Vitro

E. E. Lebedev<sup>a</sup>, D. I. Ostromyshenskii<sup>a, b</sup>, A. I. Solovyeva<sup>b</sup>, A. S. Turenko<sup>d</sup>, A. L. Drozdov<sup>a, e</sup>,  
O. I. Podgornaya<sup>a, b, c</sup>, and L. S. Adonin<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>Far Eastern Federal University, Vladivostok 690950, Russia

<sup>b</sup>Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences,  
St. Petersburg 194064, Russia

<sup>c</sup>Saint Petersburg State University,  
St. Petersburg 199034, Russia

<sup>d</sup>Theodosius Dobzhansky Center for Genome Bioinformatics, Saint Petersburg State University,  
St. Petersburg 199178, Russia

<sup>e</sup>National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,  
Vladivostok 690041, Russia

The sequenced genome data of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* were used to identify transposons (TEs, transposable elements) and test for the presence of some of them in the genome of the sea urchin *S. intermedius*. The known TEs of *S. purpuratus* from the RepBase repeats database were used to calculate the primers and identify the corresponding TEs in the *S. intermedius* transcriptome. High-coverage TE sequences from the *S. intermedius* transcriptome were assembled based on comparison with the annotated TEs of the *S. purpuratus* genome. TEs with an insufficient number of reads in the transcriptome were beyond the analysis. The approach applied in the present study was successful: out of the 100 assembled TEs of *S. intermedius*, 92 corresponding TEs in the *S. intermedius* genome were identified using the calculated primer pairs. The TE sequences calculated by in silico methods are present in the *S. intermedius* genome and can be useful in further research.

**Keywords:** repetitive DNA, transposable elements, transcriptome, sea urchins, *Strongylocentrotus intermedius*, *Strongylocentrotus purpuratus*