

ФЕНОТИПИЧЕСКИ НЕСТАБИЛЬНЫЕ МУТАЦИИ – МАРКЕРЫ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК С УЧАСТИЕМ ДНК-ТРАНСПОЗОНОВ

© 2021 г. Л. П. Захаренко*

Федеральный исследовательский центр, Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: zakharlp@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 01.02.2021 г.

После доработки 20.02.2021 г.

Принята к публикации 09.03.2021 г.

В обзоре анализировали правомочность использования нестабильных аллелей генов *Drosophila melanogaster* для оценки скорости перемещения мобильных генетических элементов по частоте смены фенотипа. На нескольких примерах показано, что нестабильность аллелей со встроенными в них транспозонами обусловлена в большей степени рекомбинациями между ними, чем истинным перемещением транспозонов с участием транспозазы.

Ключевые слова: нестабильные мутации, мобильные генетические элементы, рекомбинация, дрозофила.

DOI: 10.31857/S0016675821110151

Средняя скорость перемещения мобильных генетических элементов (МГЭ) в геноме *Drosophila melanogaster* незначительна и составляет 2.6×10^{-4} – 5.0×10^{-4} для инсерций и 4.0×10^{-6} для эксцизий на копию за поколение [1, 2]. По другим данным, в отсутствие селекции скорость инсерций МГЭ намного ниже, но также превышает скорость эксцизий и составляет 2.1×10^{-9} и 1.4×10^{-10} на сайт за поколение соответственно [3]. Оценка скорости перемещения МГЭ из-за редкости событий связана с анализом большого количества данных. По этой причине данные полногеномного секвенирования все шире используются для оценки скорости перемещения МГЭ. Однако скорость перемещения МГЭ, измеренная с помощью цитологических методов [4, 5], может не совпадать по порядку величины с результатами полногеномного секвенирования [6] в силу существования “подводных камней”, приводящих к артефактам в интерпретации и связанных со сложностью анализа повторенных последовательностей [7–9], к которым относятся МГЭ. Оценка скорости перемещения МГЭ с помощью полногеномного секвенирования по некоторым данным может быть сильно завышена [10].

Очевидно, что мобильные элементы могут менять свое положение или число в геноме как за счет активности соответствующих транспозаз, так и за счет рекомбинаций между собой или между другими повторами. Мобильные генетические элементы обнаруживают в ряде случаев на

концах перестроек, то есть они дают свой вклад в перестройки генома дрозофил разных видов на популяционном и на эволюционном уровне [11–13].

Некоторые авторы оценивают скорость перемещения МГЭ косвенно по смене фенотипа нестабильных мутаций, вызванных встройками МГЭ. При этом нестабильные мутации ревертируют к дикому типу или дают производные с другими морфологическими проявлениями. Подразумевается, что нестабильность таких генов обусловлена выщеплением МГЭ с участием транспозазы [14, 15]. Возникают вопросы, правомочно ли использовать смену фенотипа нестабильных аллелей для оценки истинной скорости перемещения МГЭ, обусловленной активностью транспозаз, и как перестройки влияют на нестабильность инсерционных аллелей?

Нестабильность аллелей по окраске зерен у кукурузы связана с хромосомными перестройками

Исследуя нестабильность аллелей по окраске зерен у кукурузы, Б. Макклинток обнаружила, что в некоторых линиях разрывы хромосом проходили рядом с локусом, который она назвала *Dissociation (Ds)*. *Ds* мог перемещаться по геному в случайные места. Мобильность *Ds* зависит от присутствия другого локуса, названного *Activator (Ac)* [16, 17]. Более поздние молекулярно-генетические исследования показали, что *Ds* – это укороченный вариант *Ac*-последовательности, явля-

ющей автономным мобильным элементом. *Ac* относится к семейству hAT транспозонов и кодирует всего один ген – транспозазу [18]. *Ac/Ds* элементы перемещаются, как все транспозоны hAT-семейства, посредством cut-and-paste механизма [19]. Полноразмерная копия *Ac* встречается редко и присутствует в геноме в небольшом количестве. В то же время вариантов *Ds* множество, однако к перемещению способны лишь те из них, что сохранили концевые последовательности [20].

Уровень нестабильности в разных аллелях кукурузы, обнаруженный Б. Макклинток, был различным. Часть мутантных аллелей была стабильна, другие аллели могли иметь нормальный фенотип, но были нестабильными и в следующих поколениях обнаруживали мутантные аллели с разной степенью экспрессии признака. Кроме этого, оказалось, что не все нестабильные аллели требовали присутствия активатора *Ac*, среди них были и автономные аллели, нестабильность которых была связана с перестройками, а не с активностью *Ac*. Позже выяснилось, что для образования перестроек необходимы две последовательности, расположенные относительно недалеко друг от друга. *Ac* более чем в 60% и в меньшей степени *Ds* (более 44%) обнаруживают недалеко от другой последовательности этого семейства – на расстоянии от нескольких нуклеотидов до 10 сантиморганид [21]. В зависимости от локализации и ориентации двух МГЭ после рекомбинации их друг с другом могли образоваться делеции, дупликации или рекомбинации, видимые при наличии морфологических маркеров даже на световом уровне на цитологических препаратах. В этом случае наличие концевых повторов необязательно, и рекомбинировать могут МГЭ в разных сочетаниях: *Ac/Ds*, *Ac/Ac* или *Ds/Ds* [21]. Перестройки, которые Б. Макклинток наблюдала на цитологическом уровне, были результатом альтернативной рекомбинации, которая проходила между соседними МГЭ на стадии сестринских хроматид [22, 23]. Перемещения МГЭ сами по себе перестроек не вызывали. Б. Макклинток удалось найти такие линии кукурузы, которые содержали удачную комбинацию вариантов *Ds* и *Ac*, и благодаря этому сделать свое выдающееся открытие без молекулярного анализа, наблюдая за перестройками хромосом на цитологическом уровне и за окраской зерен. Итак, в основе нестабильности аллелей кукурузы лежит не столько перемещение МГЭ, сколько рекомбинация между ними.

Ac/Ds-система кукурузы не уникальна, она работает в более чем 30 видах растений. Перестройки индуцируются сестринскими хроматидными обменами, гомологичной рекомбинацией и транспозицией МГЭ [24–27]. На базе МГЭ кукурузы созданы вектора, которые используются на других видах для манипуляции с хромосомами,

чтобы индуцировать относительно большие хромосомные делеции [27, 28].

Мода на мутацию по гену yellow в Умани – результат распространения инверсии между двумя hobo-элементами, а вспышка мутабельности – результат рекомбинации между ними

Сходная ситуация была описана при анализе причины “моды на мутацию” и вспышки мутабельности по гену *yellow* в популяции *D. melanogaster* в Умани в 1980-е гг. В течение десятилетия в этой популяции мутанты по гену *yellow* встречались с повышенной (до 3%) частотой [29]. Часть аллелей была стабильна, другая часть проявляла нестабильность и давала каскад производных с разной частотой и с разным морфологическим проявлением. Анализ показал, что “мода на мутацию” была вызвана распространением в популяции инверсии регуляторной зоны гена *yellow* между двумя *hobo*-элементами [30–33], которые относятся к hAT-семейству транспозонов, как и *Ac/Ds*-транспозоны кукурузы [34].

В гомозиготном состоянии инверсия в регуляторной зоне гена *yellow* была относительно стабильна. Однако при скрещивании таких мутантных самцов с самками лабораторной линии со сцепленными X-хромосомами, инверсия реинвертировала за счет рекомбинации между разнонаправленными *hobo*, окаймляющими инверсию. Тогда появлялись мухи с нормальным фенотипом, но в регуляторной зоне гена *yellow* оставалась встройка *hobo*-элемента, которая тем не менее не препятствовала нормальной работе гена. Такие псевдонормальные мутации были в свою очередь нестабильны и могли давать мутантные производные с разной степенью нестабильности. Видимая глазом фенотипическая нестабильность аллелей была лишь вершиной айсберга, поскольку инверсия не только реинвертировала, но и в ряде случаев мультиплицировалась с вовлечением в процесс части гена *yellow*. Разный уровень нестабильности был обусловлен разницей в относительном расположении рекомбинирующих МГЭ друг относительно друга и их ориентацией. Если рекомбинация шла между однонаправленными МГЭ и регуляторная зона гена *yellow* выпадала, то мутация была фенотипически стабильной, но на молекулярном уровне процессы могли продолжаться за счет рекомбинаций между мультиплицированными последовательностями гена *yellow* [31–33].

Рекомбинации между *hobo*-элементами у самцов в нестабильных линиях из Умани шли на премейотической стадии между сестринскими хроматидами, поскольку в фенотипически нормальных линиях, но с *hobo*-элементом в регуляторной зоне гена *yellow*, в некоторых семьях все потомки были мутантами по цвету тела. Доля мутантных

потомков в семье в такой линии зависела от стадии сперматогенеза, на которой проходила рекомбинация. Полногеномный сиквенс гибридных геномов подтверждает данные о том, что большая часть рекомбинаций идет на премейотической стадии [35]. В некоторых случаях получали каскад производных, где норма чередовалась с мутантным фенотипом, то есть рекомбинации в гене *yellow* приводили к чередованию в ряду поколений инверсий и реинверсий регуляторной зоны между соседними *hobo* [31–33]. Для сравнения: большая часть пертурбаций *P*-элемента также имеет премейотическое происхождение (32%), в то время как в мейозе наблюдается приблизительно 4% событий, связанных с *P*-элементом [36].

Нестабильность в гене singed связана с перестройками с участием транспозонов

Другой пример спонтанно возникшей нестабильности описан для гена *singed*⁴⁹ *D. melanogaster*. В этом случае за нестабильность гена *sn* также были ответственны перестройки с вовлечением *hobo*-транспозона [37]. Кроме полноразмерной копии в производных нестабильного гена были обнаружены дефектные копии *hobo*. Инверсия между 7D и 2D с *hobo*-элементами на концах была обнаружена в одном из членов каскада производных (*sn*⁸) как результат рекомбинации между разнонаправленными *hobo*. Хромосомные перестройки между транспозонами, связанные с делециями или инверсиями, часто обнаруживали и в других системах [12].

Описана также нестабильность в гене *singed* *D. melanogaster* с участием *P*-элемента. В нестабильных *sn* обнаруживают два *P*-элемента, расположенных голова к голове или тандемно в разной ориентации и в разной локализации [11, 38, 39]. Считается, что выпадение одного из них приводит к смене фенотипа. Однако выпадение *P*-элемента может быть как результатом выщепления за счет активности транспозазы, так и результатом рекомбинации между одинаково ориентированными МГЭ. Так, для одного из производных нестабильного *sn* описана инверсия между 17C и 7D1-2 с *P*-элементами на концах, сопровождающаяся сменой фенотипа [11]. Инверсии с *P*-элементами на концах способны реинвертировать с большой точностью с восстановлением исходного фенотипа [40].

В работах по гибриднему дисгенезу у *D. melanogaster* при оценке активности *P*-элемента используют нестабильные аллели *singed* [4, 5]. Поскольку ген *singed* расположен в X-хромосоме, самцов таких линий скрещивают с лабораторными самками со сцепленными X-хромосомами. Скорость перемещения *P*-элемента косвенно оценивают по доле потомков с изменившимся по срав-

нению с родительским фенотипом. Однако даже если *P*-элемент переместился с участием транспозазы, а не за счет рекомбинаций, но событие произошло на ранних стадиях сперматогенеза, и соответствующий клон клеток размножился, то частота смены фенотипа будет завышена и не будет отражать истинную частоту перемещения МГЭ.

Таким образом, смена фенотипа в нестабильных аллелях и у кукурузы и у дрозофилы связана не столько с перемещением МГЭ с участием транспозазы, сколько с рекомбинацией между соседними МГЭ или другими повторами. В свете вышесказанного, истинную скорость перемещения МГЭ, обусловленную активностью транспозазы, а не рекомбинацией, нельзя однозначно оценивать по смене фенотипа нестабильных аллелей, особенно если нестабильность сопровождается каскадом производных. Экстраполировать частоту смены фенотипа нестабильного аллеля на активность МГЭ неправомерно, так как последовательность МГЭ в данной ситуации выступает как повтор, участвующий в рекомбинации, а не как источник транскрипционной активности, приводящий к перемещению МГЭ.

Работа поддержана бюджетным проектом 0259-2021-0016.

Автор благодарит И.К. Захарова за ценные замечания.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nuzhdin S.V., Pasyukova E.G., Mackay T.F. Accumulation of transposable elements in laboratory lines of *Drosophila melanogaster* // *Genetica*. 1997. V. 100. Is. 1–3. P. 167–175.
2. Maside X., Assimacopoulos S., Charlesworth B. Rates of movement of transposable elements on the second chromosome of *Drosophila melanogaster* // *Genet. Res.* 2000. V. 75. Is. 3. P. 275–284. <https://doi.org/10.1017/s0016672399004474>
3. Adrion J.R., Song M.J., Schrider D.R. et al. Genome-wide estimates of transposable element insertion and deletion rates in *Drosophila melanogaster* // *Genome Biol. Evol.* 2017. V. 9. Is. 5. P. 1329–1340. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx050>
4. Eggleston W.B., Johnson-Schlitz D.M., Engels W.R. P-M hybrid dysgenesis does not mobilize other transposable element families in *D. melanogaster* // *Nature*. 1988. V. 331. Is. 6154. P. 368–370. <https://doi.org/10.1038/331368a0>
5. Eggleston W.B., Rim N.R., Lim J.K. Molecular characterization of *hobo*-mediated inversions in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 1996. V. 144. Is. 2. P. 647–656.

6. *Khurana J.S., Wang J., Xu J. et al.* Adaptation to P element transposon invasion in *Drosophila melanogaster* // Cell. 2011. V. 147. Is. 7. P. 1551–1563. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.042>
7. *Novak P., Neumann P., Macas J.* Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data // BMC Bioinform. 2010. V. 11. P. 378. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-378>
8. *Goubert C., Modolo L., Vieira C. et al.* De novo assembly and annotation of the Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) repeatome with dnaPipeTE from raw genomic reads and comparative analysis with the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*) // Genome Biol. Evol. 2015. V. 7. P. 1192–1205. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv050>
9. *Mohamed M., Dang N.T., Ogyama Y. et al.* A transposon story: From TE content to TE dynamic invasion of *Drosophila* genomes using the single-molecule sequencing technology from Oxford nanopore // Cells. 2020. V. 9. Is. 8. E1776. <https://doi.org/10.3390/cells9081776>
10. *Treiber C.D., Waddell S.* Resolving the prevalence of somatic transposition in *Drosophila* // Elife. 2017. V. 6. e28297. <https://doi.org/10.7554/eLife.28297>
11. *Roiha H., Rubin G.M., O'Hare K.* P element insertions and rearrangements at the singed locus of *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1988. V. 119. P. 73–83.
12. *Lim J.K., Simmons M.J.* Gross chromosome rearrangements mediated by transposable elements in *Drosophila melanogaster* // Bioessays. 1994. V. 16. Is. 4. P. 269–275. <https://doi.org/10.1002/bies.950160410>
13. *Dolgin E.S., Charlesworth B.* The effects of recombination rate on the distribution and abundance of transposable elements // Genetics. 2008. V. 178. № 4. P. 2169–2177. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.082743>
14. *Paterson J., Simmons M.J., O'Hare K.* Transcription of the *singed-weak* mutation of *Drosophila melanogaster*: Elimination of P-element sequences by RNA splicing and repression of *singed* transcription in a P genetic background // Mol. Genet. Genomics. 2007. V. 278. P. 53–64. <https://doi.org/10.1007/s00438-007-0227-z123>
15. *Ota R., Kobayashi S.* Myc plays an important role in *Drosophila* P-M hybrid dysgenesis to eliminate germline cells with genetic damage // Commun. Biol. 2020. V. 3. P. 185. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0923-3>
16. *McClintock B.* The origin and behavior of mutable loci in maize // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1950. V. 36. Is. 6. P. 344–355. <https://doi.org/10.1073/pnas.36.6.344>
17. *McClintock B.* Chromosome organization and genic expression // Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol. 1951. V. 16. P. 13–47.
18. *Kunze R., Weil C.F.* The hAT and CACTA superfamilies of plant transposons // Mobile DNA II / Eds Craig N.L., Craigie R., Gellert M. et al. Washington: ASM Press, 2002. P. 565–610.
19. *McBlane J.F., van Gent D.C., Ramsden D.A. et al.* Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps // Cell. 1995. V. 83. P. 387–395. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90116-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90116-7)
20. *Coupland G., Plum C., Chatterjee S. et al.* Sequences near the termini are required for transposition of the maize transposon *Ac* in transgenic tobacco plants // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 9385–9388. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.23.9385>
21. *Vollbrecht E., Duvick J., Schares J.P. et al.* Genome-wide distribution of transposed dissociation elements in maize plant cell // The Plant Cell. 2010. V. 22. Is. 6. P. 1667–1685. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.073452>
22. *Weil C.F., Wessler S.R.* Molecular evidence that chromosome breakage by *Ds* elements is caused by aberrant transposition // Plant Cell. 2010. V. 22. Is. 6. P. 1667–1685. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.073452>
23. *Fujimoto S., Matsunaga S., Murata M.* Mapping of T-DNA and *Ac/Ds* by TAIL-PCR to analyze chromosomal rearrangements // Methods Mol. Biol. 2016. V. 1469. P. 207–216. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-4931-1_17
24. *Bai L., Brutnell T.P.* The activator/dissociation transposable elements comprise a two-component gene regulatory switch that controls endogenous gene expression in maize // Genetics. 2011. V. 187. Is. 3. P. 749–759. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.124149>
25. *Xuan Y.H., Peterson T., Han C.D.* Generation and analysis of transposon *Ac/Ds*-induced chromosomal rearrangements in rice plants // Methods Mol. Biol. 2016. V. 1469. P. 49–61. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-4931-1_4
26. *Lazarow K., Doll M.L., Kunze R.* Molecular biology of maize *Ac/Ds* elements: An overview // Methods Mol. Biol. 2013. V. 1057. P. 59–82. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-568-2_5
27. *Mielich K., Shtifman-Segal E., Golz J.C. et al.* Maize transposable elements *Ac/Ds* as insertion mutagenesis tools in *Candida albicans* // G3 (Bethesda). 2018. V. 8. Is. 4. P. 1139–1145. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300388>
28. *Puchta H., Fauser F.* Gene targeting in plants: 25 years later // Int. J. Dev. Biol. 2013. V. 57. Is. 6–8. P. 629–637. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130194hp>
29. *Захаров И.К., Иванников А.В., Скибицкий Е.С. и др.* Генетические свойства аллелей генов X-хромосомы, выделенных из природной популяции *Drosophila melanogaster* в период вспышки мутаций // Докл. Акад. наук. 1995. Т. 341. № 1. С. 126–129.
30. *Грачева Е.М., Захаров И.К., Волошина М.А. и др.* Взрыв мутабельности по гену *yellow* в природной популяции *Drosophila melanogaster* связан с инсерцией *hobo*-транспозона // Генетика. 1998. Т. 34. № 4. С. 462–468.
31. *Захаренко Л.П., Захаров И.К., Романова О.А. и др.* Мода на мутацию в природной популяции *Drosophila melanogaster* Умани вызвана распростране-

- нием *hobo* индуцированной инверсии в регуляторной зоне гена *yellow* // Генетика. 2000. Т. 36. № 6. С. 740–748.
32. Захаренко Л.П., Захаров И.К., Волошина М.А. и др. Причина сохранения высокой нестабильности по гену *yellow* в линиях *Drosophila melanogaster*, выделенных в период “моды на мутацию” в популяции Умани // Генетика. 2004. Т. 40. № 3. С. 316–321.
 33. Захаренко Л.П., Коваленко Л.В., Захаров И.К., Май С. Персистентная локус-специфическая генетическая нестабильность *yellow2-717* и *NotchUc-1* у *Drosophila melanogaster* связана с мультипликацией *hobo* // Цитология. 2007. Т. 1. № 6. С. 497–502.
 34. Arensburger P., Hice R.H., Zhou L. et al. Phylogenetic and functional characterization of the *hAT* transposon superfamily genetics // Genetics. 2011. V. 188. Is. 1. P. 45–57.
<https://doi.org/10.1534/genetics.111.126813>
 35. Hemmer L.W., Dias G.B., Smith B. et al. Hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis* results in clusters of mitotic recombination and loss-of-heterozygosity but leaves meiotic recombination unaltered // Mob. DNA. 2020. V. 11. P. 10.
<https://doi.org/10.1186/s13100-020-0205-0>
 36. Daniels S.B., Chovnick A. P element transposition in *Drosophila melanogaster*: An analysis of sister-chromatid pairs and the formation of intragenic secondary insertions during meiosis // Genetics. 1993. V. 133. Is. 3. P. 623–636.
 37. O'Hare K., Tam J.L., Lim J.K. et al. Rearrangements at a *hobo* element inserted into the first intron of the *singed* gene in the unstable *sn*⁴⁹ system of *Drosophila melanogaster* // Mol. Gen. Genet. 1998. V. 257. Is. 4. P. 452–460.
<https://doi.org/10.1007/s004380050669>
 38. Nitasaka E., Yamazaki T. Excision of one of two defective P elements as the cause of alternate mutational events (*sn*⁺ and *sn*^e) of the *singed* bristle allele *sn*^w in *Drosophila melanogaster* // Japn. J. Genet. 1988. V. 63. Is. 4. P. 303–312.
<https://doi.org/10.1266/jjg.63.303>
 39. Ortori C.A., Chambers D., Brookfield J.F. The molecular basis of instability of the *singed* (very weak) mutation in *Drosophila melanogaster* // Genet Res. 1994. V. 63. Is. 1. P. 19–26.
<https://doi.org/10.1017/s0016672300032043>
 40. Engels W.R., Preston C.R. Formation of chromosome rearrangements by P factors in *Drosophila* // Genetics. 1984. V. 107. Is. 4. P. 657–678.

Phenotypically Unstable Mutations as Markers of Chromosomal Rearrangements Involving DNA Transposons

L. P. Zakharenko*

*The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, 630090 Russia*

*e-mail: zakharlp@bionet.nsc.ru

The suitability of using unstable alleles of *Drosophila melanogaster* to estimate the rate of movement of transposable elements (TEs) by the frequency of phenotype change was investigated. Several examples show that the instability of alleles with TE introduced in them is due more to recombinations between TEs than to the true movement of TEs by transposase.

Keywords: unstable alleles, transposable elements, recombination, *Drosophila*.