

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА БАЙКАЛЬСКИХ ГУБОК

Определены нуклеотидные последовательности двух высоковариабельных межгенных районов митохондриального генома двадцати губок семейства *Lubomirskiidae*. В результате анализа последовательностей найдена открытая рамка считывания, кодирующая три предполагаемых белка, а также множество инвертированных повторов, образующих вторичные структуры. Сравнительный анализ этих вторичных структур выявил наличие гомологичных шпилек у байкальских губок, принадлежащих к разным родам. В результате исследования показано, что увеличение размеров межгенных последовательностей митохондриального генома байкальских губок происходит не только за счет появления прямых и инвертированных повторов, но также и открытых рамок считывания. Эти особенности организации митохондриального генома являются отличительными признаками байкальских эндемичных губок от космополитных.

Ключевые слова: губки; *Lubomirskiidae*; митохондриальный геном; открытая рамка считывания.

Губки (Porifera) являются древнейшими многоклеточными животными, дивергировавшими от своего общего предка около 580 млн лет назад [1]. Губки стоят у основания древа многоклеточных и представляют собой интересный объект для исследования процессов эволюции животных. До сих пор не изучены механизмы, направления и скорость эволюции губок. Остается незавершенной и систематика пресноводных губок, в частности байкальских.

В оз. Байкал спонгиозауна представлена семействами *Lubomirskiidae* (Rezvoj) и *Spongillidae* (Gray). Семейство *Lubomirskiidae* является эндемичным и включает в себя 4 рода, представленные 14 видами [2]. Точный возраст байкальской эндемичной спонгиозауны до сих пор не установлен. По палеонтологическим данным семейство *Lubomirskiidae* существовало в оз. Байкал уже около 3 млн лет назад [3]. Губки этого семейства являются близкородственными и представляют собой интересный объект для исследования современных процессов видообразования.

Ранее было показано, что сравнительный анализ традиционно используемых ядерных генов 18S рРНК, ITS1 и ITS2 районов рРНК, равно как и митохондриального гена COX1, не позволяет достоверно определить филогенетические отношения внутри байкальского эндемичного семейства [4, 5]. В связи с этим назрела необходимость сравнения полных митохондриальных геномов.

В последнее время изучению митохондриальных геномов губок уделяется большое внимание. Определены нуклеотидные последовательности 23 полных митохондриальных геномов губок класса *Demospongiae* (Sollas) [6–10], в том числе байкальской губки *Lubomirskia baicalensis* (Pallas) [11] и *Ephydatia muelleri* (Lieberkuhn), вероятного предка *Lubomirskiidae* [6]. Было показано, что митохондриальные геномы этих двух видов губок имеют не только идентичный набор генов, но и их расположение. Однако размеры геномов значительно отличаются (более чем на 4000 пн) за счет увеличения межгенных районов у *Lubomirskia baicalensis* [11].

Особый интерес вызывают именно межгенные районы митохондриальных геномов губок, учитывая то, что до сих пор нет данных о механизмах регуляции репликации и транскрипции мтДНК у этого типа животных. Как известно, у разных групп животных в некодирующих регионах расположены регуляторные последовательности, отвечающие за начало репликации митохондриального генома: в так называемой D-петле

у позвоночных и в A+T-богатой области у беспозвоночных. Последовательности вокруг сайта начала репликации, которые могут формировать петли, являются довольно консервативными и непосредственно участвуют в инициации репликации [12, 13]. Даже для мтДНК человека и быка эти вторичные структуры являются высококонсервативными и имеют характерное строение: A+T-богатые петли и G+C-богатые стебли [13].

Из беспозвоночных в настоящее время наиболее изученными являются митохондриальные геномы насекомых. Например, у дрозофилы, как и у многих других беспозвоночных, сайт начала репликации для минорной цепи находится в средней части большого некодирующего региона в A+T-богатой области [14], причем образующиеся в этой области вторичные структуры значительно отличаются между высокими таксонами (семействами, порядками) [15]. У близкородственных видов животных, напротив, может наблюдаться высокое сходство последовательностей контрольного региона [16].

У более низкоорганизованных многоклеточных животных, таких как кишечнополостные, предполагаемые контрольные регионы показаны в разных межгенных областях митохондриального генома. Эти районы содержат консервативные блоки последовательностей, а также множественные прямые и инвертированные повторы, способные к образованию стабильных шпилек [17, 18]. Для губок недавно были представлены данные о предположительном контрольном регионе, расположенном в самом протяженном межгенном промежутке, обладающем признаками контрольного района высших многоклеточных [19].

Как известно, скорость эволюции митохондриальной ДНК животных в 10 раз выше скорости эволюции ядерного генома [20]. В результате исследований митохондриальных геномов губок показано, что в отличие от других животных, большинство видов *Demospongiae* имеют низкую скорость эволюции нуклеотидной последовательности генов мтДНК, в том числе и отряд *Haplosclerida* (Topsent), к которому относятся семейства *Lubomirskiidae* и *Spongillidae* [21]. Однако имеются высоковариабельные некодирующие последовательности, сосредоточенные между генами, протяженность которых, по данным Д.В. Лаврова, составляет от 2 до 24% от общего размера генома [6]. Интересно, что у кишечнополостных, так же как и у губок, скорость эволюции митохондриальных генов ниже, чем у других групп животных [22, 23]. При филогенетическом ис-

следовании книдарий было показано, что использование индивидуальных белок-кодирующих митохондриальных генов позволяет достоверно разделить лишь семейства, а комплексное использование всех генов NAD позволяет определить филогенетические взаимоотношения только до уровня родов. Использование некодирующих регионов для этих целей также является проблематичным из-за их короткой длины и небольшого количества филогенетически-информативных сайтов, несмотря на высокую изменчивость данных районов. Однако некодирующие регионы были успешно использованы в качестве диагностических маркеров при определении границ видов [24] и популяционном анализе книдарий [17].

Целью настоящей работы является выявление структурных особенностей митохондриального генома, отличающих байкальских эндемичных губок от космополитных, и поиск предполагаемых регуляторных элементов в межгенных областях губок семейства Lubomirskiidae.

Образцы губок были собраны в южной и центральной котловинах оз. Байкал во время экспедиционных работ в 2007 и 2008 гг. с глубин 5–25 м с помощью водолазов.

Выделение суммарной ДНК образцов байкальских губок проводили путем лизиса ткани в SDS-буфере в присутствии протеиназы К по методу [25].

Для амплификации межгенных фрагментов митохондриального генома были использованы праймеры на консервативные участки последовательностей генов транспортных РНК: тРНК-Met и тРНК-Tyr: (trnY-trnM_L) 5'-GATGGCAGAGCGGTAATGC-3', (trnM-trnY_R) 5'-GTAGGTTTCGAGTCCTGCCT-3'. Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе фирмы DNA Engin DYAD™ (MJ Research) с параметрами: первичная денатурация 95°C – 2 мин, затем 30–35 циклов в режиме – 96°C – 2 с, 60°C – 30 с, 72°C – 1 мин 30 с с последующей выдержкой при 72°C в течение 10 мин.

Амплифицированные фрагменты ДНК анализировали методом горизонтального электрофореза в 0,8%-ном агарозном геле. Выделение продукта из геля проводили методом замораживания-оттаивания. Определение нуклеотидных последовательностей проводили на секвенаторе CEQ™ 8800 (Beckman Coulter).

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей межгенных районов осуществляли с использованием программ MAFFT v. 6.240 [26] и BioEdit. Построение вторичных структур межгенных районов осуществляли с помощью сервера Mfold (version 3.2) при температуре +4°C [27]. Поиск открытых рамок считывания проводили с использованием программы Unipro UGENE, предсказание локализации трансмембранного домена в предполагаемом белке осуществляли с помощью сервера SignalP 3.0.

В результате исследования были определены нуклеотидные последовательности фрагмента митохондриального генома, включающего два высоковариабельных участка между генами тРНК-Тур и тРНК-Met, разделенные геном тРНК-Ile. Все 20 проанализированных образцов губок относятся к байкальскому семейству Lubomirskiidae, к представителям 3 родов (номера в GenBank GU980930-GU980944, GU057852-GU057856). Длина амплифицированных последовательностей варьировала от 475 до 908 пн, что связано с присутствием множественных делеций / вставок.

В районе между генами тРНК-Тур и тРНК-Ile у всех исследуемых байкальских губок мы обнаружили открытую рамку считывания, которая начинается с кодона AUG в позиции 28 в консервативном блоке у всех байкальских губок. У космополитной губки *E. muelleri* эта открытая рамка считывания не обнаружена, что позволяет считать ее одним из отличительных признаков губок семейства Lubomirskiidae. В результате сравнительного анализа аминокислотных последовательностей предполагаемого белка было выявлено, что найденная открытая рамка считывания может кодировать 3 типа белков (рис. 1).

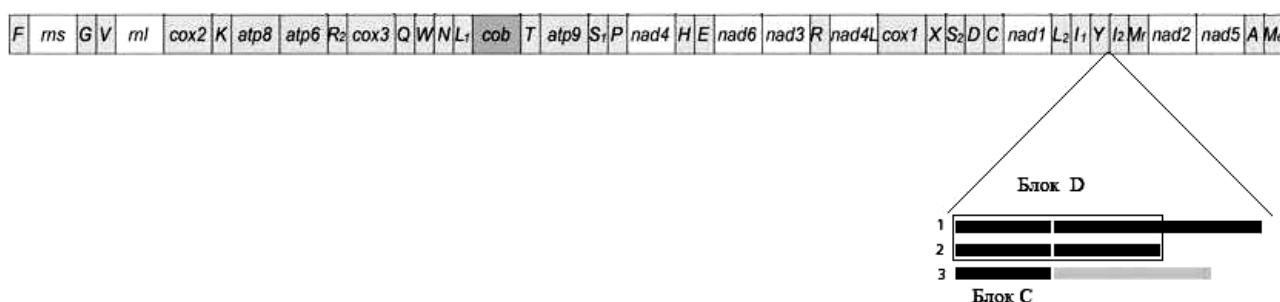


Рис. 1. Расположение открытой рамки считывания на схеме митохондриального генома *L. baicalensis* (Lavrov, 2009): 1, 2, 3 – типы предполагаемых белков; блок C – консервативный район в 21 аминокислоту, блок D – трансмембранный домен

Все транслируемые последовательности на N-конце имеют высококонсервативную область в 21 аминокислоту (блок C), которая входит в состав района, определенного как трансмембранный домен (блок D) с сайтом расщепления между аминокислотами 37 и 38. Исходя из трех типов предполагаемого белка, мы условно поделили все исследуемые губки на 3 группы, не связанные с родовой принадлежностью. В первую группу входят 6 экземпляров губок, у которых длина предполагаемого белка дости-

гает 72–74 аминокислоты за исключением одной последовательности в 60 аминокислот, при этом все нуклеотидные делеции в пределах этого района кратны трем. Вторую группу составляют 8 экземпляров губок, у которых транслируемая последовательность оканчивается в позиции 38, именно в месте предсказанного сайта расщепления. В третью группу входят оставшиеся 6 губок, у которых после консервативного блока кодируется другой белок, общая длина которого варьирует от 44 до 50 ами-

нокислот, при этом стоп-кодоном служит либо UAG, либо, редко, UAA.

Наличие консервативного региона, входящего в состав предполагаемого трансмембранного домена, а также тот факт, что все нуклеотидные делеции в пределах предполагаемой транслируемой последовательности кратны трем, дает нам возможность предположить, что этот белок действительно может существовать.

Кроме открытых рамок считывания в межгенных районах митохондриальных геномов байкальских губок также присутствуют множество прямых и инвертированных повторов.

При моделировании вторичных структур в исследуемых межгенных районах у всех байкальских губок показаны множественные инвертированные повторы, которые могут образовывать шпильки. Так, в пределах найденной открытой рамки считывания у большинства байкальских губок находятся три гомологичные шпильки (рис. 2–4), причем последняя шпилька находится либо непосредственно перед стоп-кодоном, либо включает его в себя (рис. 4). Эта шпилька была недавно описана в митохондриальном геноме *L. baicalensis* как H1s [11]. Первая шпилька является строго консервативной (рис. 2).

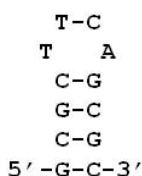


Рис. 2. Первая шпилька, консервативная среди *L. baicalensis*, *B. intermedia profundalis* и *S. papyracea*

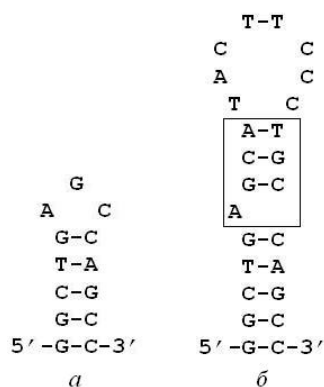


Рис. 3. Вторая шпилька: а – у *B. intermedia profundalis* и *S. papyracea*, б – у *L. baicalensis*

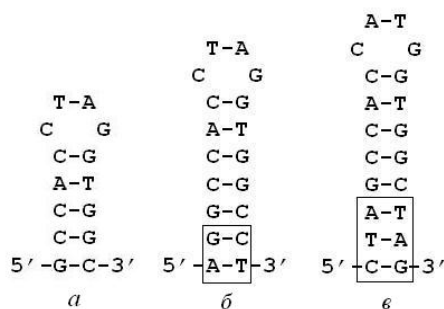


Рис. 4. Третья шпилька: а – у *S. papyracea*; б – у *B. intermedia profundalis*; в – у *L. baicalensis*

Четвертая шпилька располагается вне открытой рамки считывания около гена тРНК-Ile (рис. 5), описанная ранее как H3 [11]. У *L. baicalensis* и *S. papyracea* (Dybowski) имеется пятая гомологичная А+Т-богатая шпилька, которая находится либо перед шпилькой № 4 (H3), либо после нее (рис. 6). При сравнении этих вторичных элементов заметна тенденция удлинения самих шпилек у *L. baicalensis* в результате вставок комплементарных пар нуклеотидов (такие вставки на рисунках выделены рамкой). Следует отметить, что среди гомологичных шпилек у разных губок петли могут сильно варьировать.

У всех байкальских губок в районе между генами тРНК-Туг и тРНК-Ile присутствует 5 консервативных блоков последовательностей, сходство по которым между всеми исследуемыми образцами губок варьирует от 68,4 до 100%, за исключением последовательности *S. papyracea*, сходство с которой в этих блоках изменяется от 47 до 100%.

Для более подробного анализа распределения шпилек был выбран район между генами тРНК-Туг и тРНК-Ile представителей 3 родов губок: *L. baicalensis*, *Baikalospongia intermedia profundalis* (Rezvoj) и *S. papyracea*.

В результате моделирования вторичных структур у *L. baicalensis* обнаружено 12 шпилек, у *B. intermedia profundalis* – 9 шпилек, и меньшее количество шпилек присутствует у *S. papyracea* – 8.

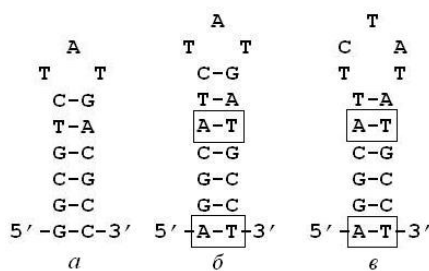


Рис. 5. Четвертая шпилька: а – у *S. papyracea*; б – у *B. intermedia profundalis*; в – у *L. baicalensis*

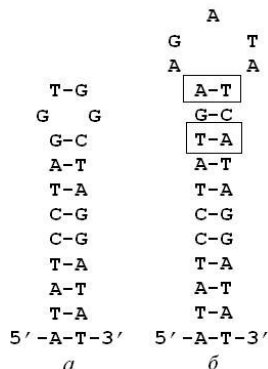


Рис. 6. Пятая шпилька: а – у *S. papyracea*; б – у *L. baicalensis*

В результате сравнительного анализа вторичных структур выбранных последовательностей были обнаружены 4 гомологичные шпилеки у всех трех видов губок и одна шпилька, которая имеется только у *L. baicalensis* и *S. papyracea*, о которых говорилось ранее.

В результате проведенных нами исследований показано, что увеличение размеров межгенных последовательностей митохондриального генома байкальских губок происходит не только за счет появления прямых

и инвертированных повторов, но также и открытых рамок считывания. Подробное изучение некодирующих регионов митохондриальных геномов губок позволит углубиться в понимание процессов регуляции репликации и транскрипции. В дальнейшем мы планируем установить пригодность выбранных межгенных районов в качестве молекулярно-генетических маркеров для идентификации близкородственных видов губок семейства Lubomirskiidae.

ЛИТЕРАТУРА

1. Li C.W., Chen J.Y., Hua T.E. Precambrian sponges with cellular structures // Science. 1998. Vol. 279. P. 879–882.
2. Ефремова С.М. Губки (Porifera) // Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна. Т. 1: Озеро Байкал. Кн. 1. Новосибирск: Наука, 2001. С. 179–192.
3. Weinberg E. The sponge fauna of Lake Baikal in the Late Pliocene // Russian Geology and Geophysics. 2001. Vol. 1(2). P. 130–137.
4. Itskovich V., Belikov S., Efremova S., Masuda Y. et al. Monophyletic origin of freshwater sponges in ancient lakes based on partial structures of COXI gene // Hydrobiologia. Springer Netherlands. 2006. Vol. 568(1). P. 155–159.
5. Itskovich V., Gontcharov A., Masuda Y., Nohno T. et al. Molecular phylogeny of freshwater sponges (Porifera) based on ITS1 and ITS2 sequences of ribosomal DNA // Mol. Evol. 2008. Vol. 67(6). P. 608–620.
6. Wang X., Lavrov D.V. Seventeen new complete mtDNA sequences reveal extensive mitochondrial genome evolution within the Demospongiae // PLoS ONE. 2008. Vol. 3(7). P. 1–11.
7. Lavrov D.V., Forget L., Kelly M., Lang B.F. Mitochondrial Genomes of Two Demosponges Provide Insights into An Early Stage of Animal Evolution // Mol. Biol. Evol. 2005. Vol. 22(5). P. 1231–1239.
8. Lavrov D.V., Lang B.F. Transfer RNA gene recruitment in mitochondrial DNA // Trends Genet. 2005. Vol. 21. P. 129–133.
9. Erpenbeck D., Voigt O., Adamski M. et al. Mitochondrial diversity of early-branching Metazoa is revealed by the complete mt genome of a haplosclerid demosponge // Mol. Biol. Evol. 2007. Vol. 24. P. 19–22.
10. Wang X., Lavrov D.V. Mitochondrial genome of the homoscleromorph Oscarella armela (Porifera, Demospongiae) reveals unexpected complexity in the common ancestor of sponges and other animals // Mol. Biol. Evol. 2007. Vol. 24. P. 363–373.
11. Lavrov D.V. Rapid proliferation of repetitive palindromic elements in mtDNA of the endemic Baikalian sponge Lubomirskia baicalensis // Mol. Biol. Evol. 2010. Vol. 27(4). P. 757–760.
12. Hixson J.E., Wong T.W., Clayton D.A. Both the conserved stem-loop and divergent 59-flanking sequences are required for initiation at the human mitochondrial origin of light-strand DNA replication // J. Biol. Chem. 1986. Vol. 261. P. 2384–2390.
13. Clayton D.A. Nuclear Gene Products that Function in Mitochondrial DNA Replication // Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1987. Vol. 317. P. 473–82.
14. Goddard J.M., Wolstenholme D.R. Origin and direction of replication in mitochondrial DNA molecules from Drosophila melanogaster // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. Vol. 75. P. 3886–3890.

15. Zhang De-Xing, Szymura Jacek M., Hewitt Godfrey M. Evolution and Structural Conservation of the Control Region of Insect Mitochondrial DNA // Mol. Evol. 1995. Vol. 40. P. 382–391.
16. Boore J.L. Animal mitochondrial genomes // Nucleic Acids Research. 1999. Vol. 27, № 8. P. 1767–1780.
17. Chen C., Dai C.-F., Plathong S. et al. The complete mitochondrial genomes of needle corals, *Seriatopora* spp. (Scleractinia: Pocilloporidae): An idiosyncratic *atp8*, duplicated *trnW* gene, and hypervariable regions used to determine species phylogenies and recently diverged populations // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2008. Vol. 46. P. 19–33.
18. Miller D.J. The mitochondrial genome of *Acropora tenuis* (Cnidaria: Scleractinia) contains a large group I intron and a candidate control region // J. Mol. Evol. 2002. Vol. 55(1). P. 1–13.
19. Erpenbeck D., Voigt O., Adamski M. et al. Mitochondrial diversity of early branching Metazoa is revealed by the complete mt genome of a haplo-sclerid demosponge // Mol. Biol. Evol. 2007. Vol. 24(1). P. 19–22.
20. Brown W.M., George M.J., Wilson A.C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA // Proc Natl Acad Sci USA. 1979. Vol. 76. P. 1967–1971.
21. Lavrov D.V., Wanga X., Kelly M. Reconstructing ordinal relationships in the Demospongiae using mitochondrial genomic data // Mol. Phylogenet. Evol. 2008. Vol. 49. P. 111–124.
22. Romano S.L., Palumbi S.R. Evolution of scleractinian corals inferred from molecular systematics // Science. 1996. Vol. 271. P. 640–642.
23. van Oppen M.J.H., Willis B.L., Miller D.J. Atypically low rate of cytochrome b evolution in the scleractinian coral genus *Acropora* // Proc. R. Soc. Lond. B. 1999. Vol. 266. P. 179–183.
24. McFadden C.S., Tullis I.D., Hutchinson M.B. et al. Variation in Coding (NADH Dehydrogenase Subunits 2, 3, and 6) and Noncoding Intergenic Spacer Regions of the Mitochondrial Genome in Octocorallia (Cnidaria: Anthozoa) // Mar. Biotechnol. 2004. Vol. 6. P. 516–526.
25. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
26. Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform // Nucleic Acids Res. 2002. Vol. 30. P. 3059–3066.
27. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // Nucleic Acids Res. 2003. Vol. 31(13). P. 3406–3415.

Статья представлена научной редакцией «Биология» 15 июня 2010 г.