

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.212.3

СИЛИКАТЕИНЫ ПРЕСНОВОДНЫХ ГУБОК: СРАВНЕНИЕ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ И ЭКЗОН-ИНТРОННЫХ СТРУКТУР ГЕНОВ

© 2011 г. О. В. Калужная^{1*}, А. Г. Красько², В. А. Гребенюк², В. Б. Ицкович¹,
Н. А. Семитуркина¹, И. С. Соловаров¹, W. E. G. Mueller², С. И. Беликов¹

¹Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, 664033

²Institut für Physiologische Chemie, Johann Gutenberg Universität, Mainz, D-55099, Germany

Поступила в редакцию 09.07.2010 г.

Принята к печати 13.12.2010 г.

Кремнистые спикулы губок содержат силикатеины – белки, участвующие в осаждении биогенного кремнезема и определяющие морфологические особенности спикул. Исследована экзон-интронная организация генов четырех изоформ силикатеина- α ($-\alpha 1$, $-\alpha 2$, $-\alpha 3$ и $-\alpha 4$) эндемичной байкальской губки *Lubomirskia baicalensis*. Определены 17 последовательностей фрагментов генов различных изоформ силикатеинов восьми видов пресноводных губок, включающих как космополитных представителей (*Spongilla lacustris*, *Ephydatia muelleri*, *E. fluviatilis*), так и эндемиков Байкала (*L. baicalensis*, *L. incrustans*, *Baikalospongia intermedia*, *B. fungiformis*, *Sw. papyracea*). Показано, что космополитные и эндемичные губки отличаются между собой по структуре генов, а именно – имеют интроны разной длины. Из байкальских видов наибольшей вариабельностью длин интронов отличается ген силикатеина- $\alpha 1$, а наиболее консервативным в этом отношении является ген силикатеина- $\alpha 4$. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей различных изоформ силикатеинов показал, что имеются четыре кластера внутри клады пресноводных губок. Филогенетический анализ экзон-интронных последовательностей генов дает возможность разделять близкородственные виды губок внутри кластеров.

Ключевые слова: пресноводные губки, силикатеин, экзон-интронная структура гена, филогенетический анализ.

FRESHWATER SPONGE SILICATEINS: COMPARISON OF SEQUENCES AND EXON-INTRON STRUCTURE OF GENES, by O. V. Kaluzhnaya^{1*}, A. G. Krasko², V. A. Grebenjuk², V. B. Itskovich¹, N. A. Semiturkina¹, I. S. Solovarov¹, W. E. G. Mueller², S. I. Belikov¹ (¹Limnological Institute, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia, *e-mail: x-sun77@rambler.ru; ²Institut für Physiologische Chemie, Johann Gutenberg Universität, Mainz, D-55099, Germany). Siliceous sponge spicules contain silicateins – proteins taking part in biogenic silica precipitation and determination of the spicule morphological features. The exon-intron structure of four silicatein- α isoforms: $-\alpha 1$, $-\alpha 2$, $-\alpha 3$ and $-\alpha 4$ from endemic baikalian sponge *Lubomirskia baicalensis* was studied. For eight sponge species, including both cosmopolitan (*Spongilla lacustris*, *Ephydatia muelleri*, *E. fluviatilis*) and Baikal endemic (*L. baicalensis*, *L. incrustans*, *Baikalospongia intermedia*, *B. fungiformis*, *Sw. papyracea*) species, seventeen gene fragment sequences of different silicatein isoforms were determined. It was shown that cosmopolitan and endemic Baikalian sponges differ from each other by gene structure (have different length of introns). Among Baikalian sponges silicatein- $\alpha 1$ has the most variable intron length, and silicatein- $\alpha 4$ is the most conservative. Phylogenetic analysis of amino-acid silicatein sequences allow identify different silicatein isoforms, which authentically differ form four clusters on phylogenetic tree. Phylogenetic analysis of exon-intron sequences gives the possibility to separate different sponge species in the clusters.

Keywords: freshwater sponges, silicatein, exon-intron structure of gene, amino-acid sequences, phylogenetic analysis.

Силикатеины – белки спикул кремнистых губок. Впервые аминокислотная последовательность силикатеина из морской губки *Tethya aurantia* была определена в 1998 г. [1]. Этот белок входит в состав аксиального филамента спикул и ускоряет полимеризацию кремниевых алоксидов [1, 2]. Вскоре ген аналогичного белка был обнаружен в спикулах мор-

ской губки *Suberites domuncula* [3], затем исследовали гены силикатеинов в геномах морских губок *Petrosia ficiformis* [4, 5], *Hymeniacidon perlevis* [6] и *Geodia cydonium* [7], *Craeteromorpha meyeri* [8], *Latrunculia oparinae* и *Acanthodendrilla* sp. [9]. В настоящее время известны последовательности мРНК двух групп силикатеинов (α и β) морских губок. Анализируя последовательности этих белков, обнаружили их сход-

* Эл. почта: x-sun77@rambler.ru

ство с известным семейством папаин-подобных цистеиновых протеаз (эндонуклеаз) – катепсинов L [1]. В опытах *in vitro* силикатеины гидролизуют эфиры кремниевой кислоты, что приводит к отложению аморфного кремнезема [2, 3, 10, 11] и формированию филаментных структур [12, 13]. Кроме того, эти белки определяют морфологические черты спикул, которые являются важным признаком видовой идентификации губок [14].

Работы по изучению силикатеинов пресноводных губок проводятся с 2005 г. Найдены четыре изоформы силикатеина- α у космополитной губки *E. fluviatilis* и эндемичной байкальской губки *L. bicalensis*. Последовательностей, гомологичных гену силикатеина- β , в геноме пресноводных губок не обнаружено [11, 15, 16]. Установлено, что экспрессия генов каждой из изоформ силикатеина *E. fluviatilis* происходит на различных этапах формирования спикул [14]. По-видимому, в процессах образования основного филамента и отложения дополнительных слоев кремнезема на поверхность спикулы участвуют разные изоформы силикатеина [14].

Объект нашего исследования – пресноводные губки космополитного семейства Spongillidae и эндемичного байкальского семейства Lubomirskiidae. Последнее включает 13 видов губок [17], дивергенция которых от общего предка произошла относительно недавно [18]. Распознавание этих видов по морфологии часто затруднено, а классические молекулярные маркеры (гены COXI, 18S рРНК, участки внутренних транскрибируемых спейсеров – ITS) информативны лишь на уровне рода и семейства [18]. Поскольку изменения, возникающие в процессе видообразования и эволюции, затрагивают также белоккодирующие гены, в том числе гены, участвующие в образовании скелета, перспективно проведение сравнительного анализа последовательностей этих генов и их экзон-интронных структур у различных видов губок. Изучение интронов генов особенно интересно в связи с тем, что скорость накопления мутаций в этих участках довольно высока [19]. Кроме того, не исключено, что такие характеристики интронов, как вариабельность длины, положение в гене, отношение к длине экзона и иные могут быть связаны и со свойствами генов (экспрессией, транскрипцией, сплайсингом, временем жизни мРНК и т.д.), и с эволюцией организмов в целом [19, 20].

Поэтому мы предприняли изучение экзон-интронных структур генов и соответствующих аминокислотных последовательностей силикатеинов разных видов пресноводных губок с целью поиска видоспецифичных особенностей, которые могут быть применимы для молекулярной идентификации близкородственных видов губок.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сбор материала. Образцы байкальских губок собраны в ходе экспедиций 2005–2006 гг. в районе пос. Большие Коты (юго-западное побережье оз. Байкал), вблизи о. Ольхон (западное побережье) на глубине 5–15 м, а также в 2008 г. у мыса Толстый (Южный Байкал) с глубины 307 м (в ходе экспедиции “МИРы на Байкале”). Виды пресноводных губок, исследуемые в данной работе, перечислены в таблице. Экземпляры, которые использовали для выделения РНК, замораживали в жидком азоте. Образцы, из которых затем выделяли ДНК, помещали в 70%-ный раствор этанола и хранили при 4°C.

Выделение ДНК, РНК и амплификация. Для определения последовательностей нуклеотидов суммарную ДНК из образцов губок выделяли по методике, прилагающейся к набору “QIAGEN RNA/DNA”. Качество ДНК определяли при помощи электрофореза в 0.6%-ном геле агарозы. Суммарную РНК выделяли из свежих образцов губок или из образцов, хранившихся в жидком азоте, используя набор “Trizol Reagent” (“Sigma”) по протоколу фирмы. Синтез кДНК осуществляли с помощью набора реактивов “Реверта” (“АмплиСенс”) согласно прилагающейся инструкции. Продукты амплификации для определения полноразмерных экзон-интронных последовательностей генов получали с использованием праймеров, сконструированных на основе соответствующих известных последовательностей кДНК гена силикатеина- α 1, как было описано ранее [16]. Фрагменты генов силикатеина- α различных видов губок амплифицировали с использованием праймеров Sil_F1 и Sil_R1, структуры которых определяли, исходя из наиболее консервативных участков генов силикатеинов *L. bicalensis* с учетом положения интронов (в скобках указано положение на последовательности кДНК силикатеина- α 1):

Sil_F1 – GGTCAGTGTGGCGCTAGCTATGC
(385–407),

Sil_R1 – CTGTTCTTAACAAGCCAGTAAT
(860–881).

С этими же праймерами амплифицировали фрагменты кДНК силикатеинов. Полимеразную цепную реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси на амплификаторе MiniCycler (“MJ Research”) в следующем режиме: предварительный прогрев смеси, активация полимеразы 5 мин при 94°C; 35 циклов, включающих денатурацию ДНК (45 с при 94°C); отжиг праймеров (60 с при 56°C) и элонгацию (90 с при 72°C); финальная элонгация (10 мин при 72°C). Индивидуальные ПЦР-фрагменты анализировали путем электрофореза в 0.8%-ном геле агарозы, после чего экстрагировали, используя набор “PCR clean-up Gel extraction NucleoSpin Extract II” (“Macherey-Nagel”) по методике производителя.

Виды губок, исследованных в данной работе

Вид/Место сбора (для видов, исследованных в данной работе)	Изоформа силикатеина	Номер в банке данных (GenBank)
<i>Последовательности (фрагменты генов или кДНК), полученные в данной работе</i>		
<i>Lubomirskia incrustans</i> /оз. Байкал, Средняя котловина, восточное побережье	silicatein- α 1 (фрагмент гена)	FJ812082
	silicatein- α 4 (фрагмент гена)	FJ812081
<i>L. baicalensis</i> /оз. Байкал, Южная котловина, юго-западное побережье	silicatein- α 2 (полный ген)	GU222667
	silicatein- α 3 (полный ген)	GU222668
	silicatein- α 4 (полный ген)	GU222669
<i>Baikalospongia intermedia</i> /оз. Байкал, Средняя котловина, восточное побережье	silicatein- α 1 (фрагмент гена)	FJ812083
	silicatein- α 4 (фрагмент гена)	FJ812084
<i>Baikalospongia fungiformis</i> / оз. Байкал, юго-западное побережье	silicatein- α 1 (фрагмент гена)	GU289403
	silicatein- α 2 (фрагмент гена)	HQ668149
	silicatein- α 3 (фрагмент гена)	HQ668150
	silicatein- α 4 (фрагмент гена)	GU289404
<i>Swartschewskia papyracea</i> /оз. Байкал, Южная котловина, юго-западное побережье	silicatein- α 4 (фрагмент гена)	FJ812085
<i>Ephydatia muelleri</i> /р. Голоустная (юго-западное побережье оз. Байкал)	silicatein- α 2 (фрагмент кДНК)	GU289408
	silicatein- α 3 (фрагмент кДНК)	GU289407
	silicatein- α 4 (фрагмент гена)	FJ812080
<i>Ephydatia fluviatilis</i> /оз. Чагытай (республика Тува)	silicatein- α 3 (фрагмент кДНК)	GU289405
	silicatein- α 4 (фрагмент гена)	FJ812077
<i>Spongilla lacustris</i> /р. Духовая (восточное побережье оз. Байкал)	silicatein- α 1 (фрагмент кДНК)	GU289406
	silicatein- α 3 (фрагмент гена)	FJ812078
	silicatein- α 4 (фрагмент гена)	FJ812079
<i>Последовательности (кДНК), извлеченные из банка данных (GenBank)</i>		
<i>Lubomirskia baicalensis</i>	silicatein- α 1	AJ872183
	silicatein- α 2	AJ968945
	silicatein- α 3	AJ968946
	silicatein- α 4	AJ968947
<i>Ephydatia fluviatilis</i>	silicatein-M2 (α 1)	AB370206
	silicatein-M1 (α 2)	AB219573
	silicatein-M4 (α 3)	AB370208
	silicatein-M3 (α 4)	AB370207
<i>Suberites domuncula</i>	silicatein- α	AJ272013
<i>Petrosia ficiformis</i>	silicatein- α	AY158071
<i>Hymeniacidon perlevis</i>	silicatein- α	DQ364228
<i>Geodia cydonium</i>	silicatein- α	AM500875
<i>Tethya aurantia</i>	silicatein- α	AF032117
<i>Halichondria ocadai</i>	silicatein- α	AB071667
<i>Aulosaccus</i> sp.	silicatein- α	GQ387054

Клонирование, анализ клонов и секвенирование ПЦР-продуктов. Очищенные фрагменты клонировали в векторе pCRII-ТОРО (“Invitrogen”), а также в векторе pTZ57A/T (“Fermentas”) по методикам фирм-производителей. *E. coli* трансформировали с использованием химически компетентных клеток TOP10 (“Invitrogen”). Из каждой библиотеки анализировали по 15–25 клонов. Плазмидную ДНК выделяли по методике, описанной в инструкции к набору “High Pure Plasmid Isolation Kit” (“Roche”). Наличие вставки фрагмента в плазмиде определяли, обрабатывая раствор плазмидной ДНК рестриктазой EcoRI в объеме 15 мкл, содержащим 5 мкл раствора плазмиды, 3 мкл буфера Tango (10-кратный), 0.5 мкл рестриктазы (5 ед.) и 6.5 мкл воды. Рестриктионную смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч и анализировали путем электрофореза в 1%-ном геле агарозы. Секвенирование клонированных фрагментов производили на автоматических секвенаторах Li-COR 4200 (“Amersham”) и CEQ 8800 (“Backman Coulter Inc.”). Последовательности депонированы в базе данных EMBL. Номера доступа этих последовательностей указаны в таблице.

Филогенетический анализ. При первичном анализе использовали программу BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). В анализе использовали также последовательности силикатеинов, опубликованные в GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>). Последовательности выравнивали при помощи модуля ClustalW программного пакета BioEdit 7.0 [21] с обязательной корректировкой вручную. Сравнивали аминокислотные последовательности, полученные в результате виртуальной трансляции участков генов без учета интронов, а также нуклеотидные последовательности фрагментов генов, включающих экзоны и интроны. В первом случае анализировали 32 последовательности силикатеинов, 25 из которых принадлежат пресноводным губкам (17 определены нами), а семь последовательностей – морским. В качестве внешней группы взята последовательность катепсина L морской губки *S. domuncula*. Длина выровненных последовательностей составила 150 а.о. В филогенетическом анализе фрагментов генов сравнивали 17 последовательностей восьми видов пресноводных губок, в качестве внешней группы взята последовательность гена силикатеина- α морской губки *S. domuncula*. Из-за существенной разницы в общих длинах последовательностей, вследствие разной длины интронов, выравнивание проводили, варьируя величины штрафов за открытие (gap opening penalties) и продление пропусков (gap extension penalties) с целью повышения гомологии последовательностей (вследствие получения консенсуса с наибольшим количеством консервативных нуклеотидных остатков) [22]. Выявляемые таким образом пробелы удаляли вручную. Длина экзон-интронных последовательностей после выравнивания и приведения к одной длине составила 1004 п.н. Фи-

логенетические деревья строили по методу объединения ближайших соседей (NJ, neighbor-joining method) [23], максимального правдоподобия (ML, maximum likelihood) [24], а также Байесовскому методу (BI, Bayesian Inference) [25]. Использовали пакеты филогенетических программ Mega 4 [26], Phyml [27] и MrBayes v3.1.2. [25]. При построении ML- и BI-деревьев для аминокислотных последовательностей с помощью программы ModelGenerator [28] была выбрана модель аминокислотных замен WAG, для нуклеотидных последовательностей – модель GTR. При BI-анализе создавали 2 млн генераций цепей Маркова, отбирая пробы через каждые 100 генераций, т.е. 20000 проб. Первые 3000 проб исключали из анализа как “burn in”. Устойчивость (статистическую поддержку клад) филогенетических деревьев в NJ и ML анализах оценивали методом бутстрепа на основе 1000 реплик, а также определяя апостериорные вероятности (Posterior Probabilities) в BI-анализе. В обоих случаях в качестве основного принимали дерево, полученное методом NJ. Деревья ML и BI в большинстве деталей имели идентичную топологию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ экзон-интронных структур генов силикатеинов L. baicalensis

Мозаичная экзон-интронная структура является характерной особенностью генов эукариотических организмов. В генах силикатеина- α пресноводной губки *L. baicalensis* мы обнаружили шесть интронов и семь экзонов. Для сравнения, в геноме человека среднее число интронов в гене составляет 7.7, а у хоанофлагеллят, ближайших родственников многоклеточных организмов, – 6.6 [29]. Длины сравниваемых нуклеотидных последовательностей составили 1988 п.н. (силикатеин- α 1); 1668 п.н. (силикатеин- α 2); 1657 п.н. (силикатеин- α 3); 1540 п.н. (силикатеин- α 4) (рис. 1). В трех генах ($-\alpha$ 1, $-\alpha$ 2 и $-\alpha$ 4) локализация интронов и размер экзонов оказались постоянными. У силикатеина- α 3 первый экзон на 18 п.н. длиннее, а второй – на 6 п.н. короче, чем у других генов. Первый интрон при этом “смещен” на 6 н. в сторону второго экзона. В результате общий размер кДНК силикатеина- α 3 составляет 993 п.н., тогда как размер кДНК трех других изоформ силикатеинов ($-\alpha$ 1, $-\alpha$ 2, $-\alpha$ 4) составляет 981 п.н. (рис. 1). Изменения в структуре гена силикатеина- α 3 затрагивают 5'-участок последовательности (первый и второй экзоны), который кодирует переменный N-концевой домен белка, соответствующий сигнальному пептиду и препептиду [14, 16]. Изменения на этом участке, вероятно, могут быть связаны с регуляцией внутриклеточного транспорта белка, его активностью или уровнем экспрессии. Ранее Мори (Morigi) и соавт. [14] показали, что у пресноводной губки *E. fluviatilis* данная изоформа синтезируется на начальном этапе спиккулогенеза, т.е. силикатеин-

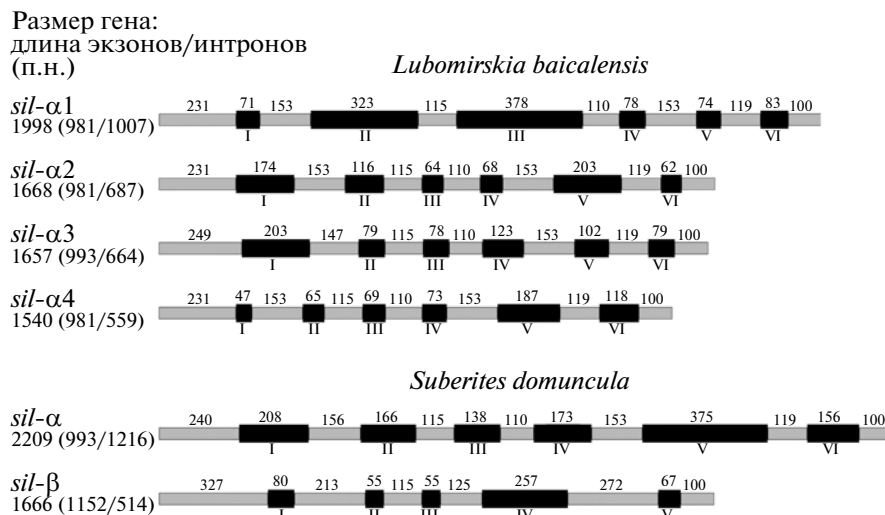


Рис. 1. Полноразмерные экзон-интронные структуры генов силикатеинов. Приведена суммарная длина, в скобках указаны размеры экзонов и интронов. Экзоны обозначены серыми блоками, интроны – черными, их длина обозначена сверху. Порядок расположения интронов в гене указан снизу римскими цифрами.

$\alpha 3$ необходим при закладке основного филемента спикул; синтез других изоформ продолжается и на более поздних этапах формирования спикул.

Суммарные длины интронов исследуемых генов составляют 1007 п.н. ($-\alpha 1$), 687 п.н. ($-\alpha 2$), 664 п.н. ($-\alpha 3$) и 559 п.н. ($-\alpha 4$). Таким образом, общие размеры генов у силикатеинов- $\alpha 1$, $-\alpha 2$ и $-\alpha 4$ зависят исключительно от размера интронов. Соотношение общих длин интронов и экзонов в разных генах изменяется от 0.57 до 1.03. Длины отдельных экзонов в гене варьируют от 100 до 249 п.н.; длины интронов изменяются как в пределах одного гена, так и у различных генов от 47 до 378 п.н. У всех генов интроны фланкированы консервативными парами нуклеотидов: на 5'-конце находится пара GT, на 3'-конце – AG. До настоящего времени были известны экзон-интронные структуры только генов силикатеина- α и $-\beta$ морской губки *S. domuncula* [7]. Мы сравнили эти гены с генами силикатеина- $\alpha 1$, $-\alpha 2$, $-\alpha 3$ и $-\alpha 4$. Длины их последовательностей лежат в пределах от 1540 п.н. до 2209 п.н. (рис. 1). В гене силикатеина- β отсутствует один из интронов, характерный для генов силикатеина- α : этот интрон соответствует пятому интрону силикатеинов- α (сумма длин пятого и шестого экзонов силикатеинов- α соответствует размеру пятого экзона силикатеина- β). Известно, что изменения в структурах генов (миграция места встраивания интрона, изменение числа интронов) являются очень редкими эволюционными событиями [30]. Вероятно, они связаны с приобретением или потерей свойств соответствующих белков и имеют приспособительное значение.

Анализ фрагментов генов силикатеинов пресноводных губок

Исследовали экзон-интронные структуры фрагментов генов у семи видов пресноводных губок, в число которых входят как космополитные виды, так и байкальские эндемики (см. раздел “Экспериментальная часть”). Эти последовательности фрагментов генов содержат третий–шестой экзоны и интроны три–пять. У байкальской губки *B. fungiformis* определили последовательности фрагментов генов всех четырех изоформ силикатеинов. Ранее гомологичные изоформы обнаружены как у эндемичного (*L. baicalensis*) [11, 16], так и у космополитного (*E. fluviatilis*) видов губок [14, 15]. По-видимому, наличие четырех изоформ силикатеинов, отвечающих за образование основных спикул губок (мегасклер), – характерная особенность пресноводных губок.

У других исследуемых видов губок нам удалось обнаружить разное число генов. При этом фрагмент гена силикатеина- $\alpha 4$ имеется у всех видов. У трех видов (*B. intermedia*, *L. incrustans*, *B. fungiformis*) найден ген силикатеина- $\alpha 1$. У двух видов (*S. lacustris*, *B. fungiformis*) – ген силикатеина- $\alpha 3$. В общей сложности были секвенированы 13 фрагментов генов, длины которых составляют от 715 до 1269 п.н. (рис. 2). Этот результат мы объясняем тем, что для поиска генов использовали “универсальные” вырожденные праймеры, что не позволяет выявить полный набор генов в каждом виде. Очевидно, для обнаружения всех генов необходимо использовать индивидуальные праймеры, специфичные уникальным участкам последовательностей каждой изоформы.

В структурах исследуемых участков генов размеры интронов различны, а их локализация в гене по-

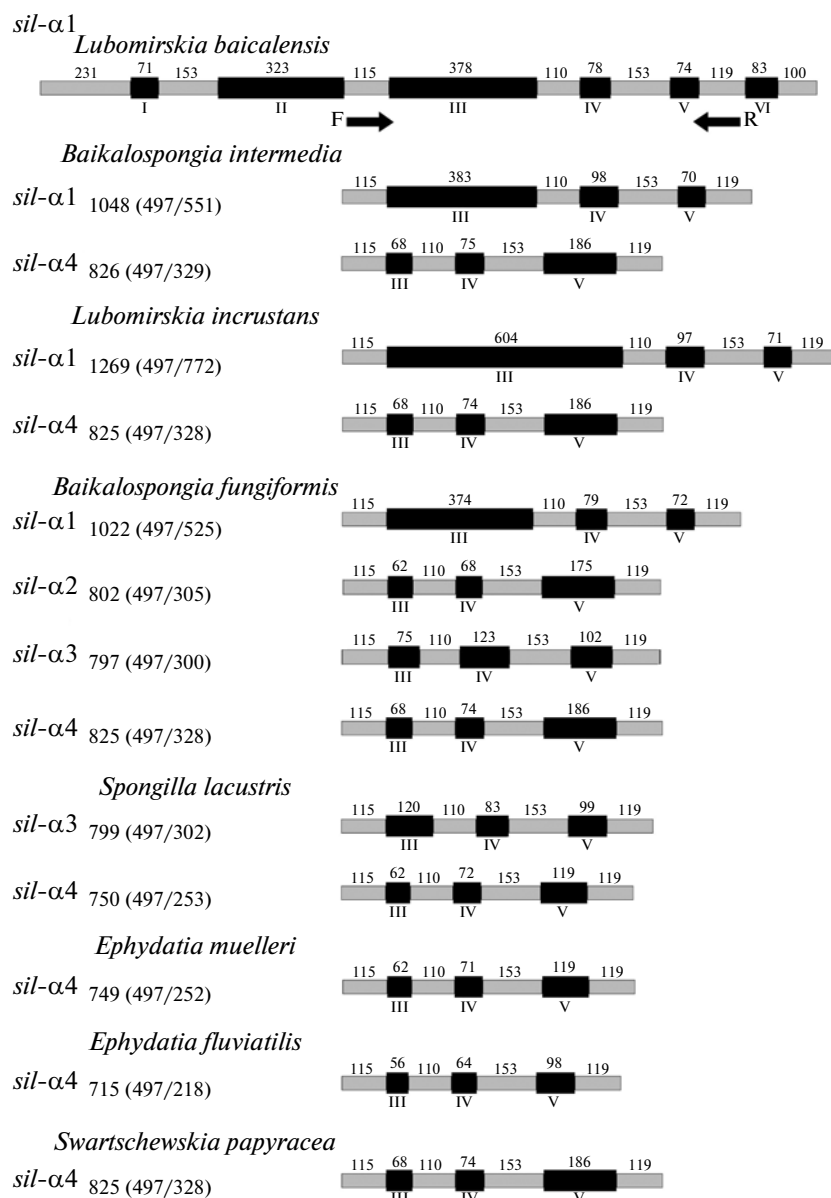


Рис. 2. Экзон-интронные структуры фрагментов генов силикатеинов. Обозначения экзонов и интронов такие же, как на рис. 1. Стрелки указывают позиции праймеров.

стоянна; длины экзонов также остаются одинаковыми (рис. 2). При этом, у байкальских губок интроны длиннее чем у космополитных видов. Суммарная длина интронов байкальских видов составляет 328–772 п.н., а интронов космополитных губок – 218–302 п.н. (рис. 2). Этот факт может свидетельствовать о более высокой скорости эволюции, характерной для байкальской спонгиозауны [31]. При помощи программы BLAST выявились последовательности, высокоомологичные генам четырех известных изоформ силикатеинов. Ген силикатеина-α4 байкальских видов имеет очень сходную структуру, длины интронов в нем в большин-

стве случаев остаются постоянными. Имеются некоторые различия в размерах интронов гена силикатеина-α4 между космополитными и эндемичными видами, а также между разными космополитными видами (*S. lacustris*, *E. fluviatilis*, *E. muelleri*). Длины интронов гена силикатеина-α3 различны у эндемичного (*B. fungiformis*) и космополитного (*S. lacustris*) видов. Длины интронов гена силикатеина-α1 у байкальских губок отличаются наибольшей вариабельностью (рис. 2). Характерная особенность этого гена – необычно длинный третий интрон, размер которого варьирует у разных видов губок от 374 до 604 п.н. Данный ген у космополит-

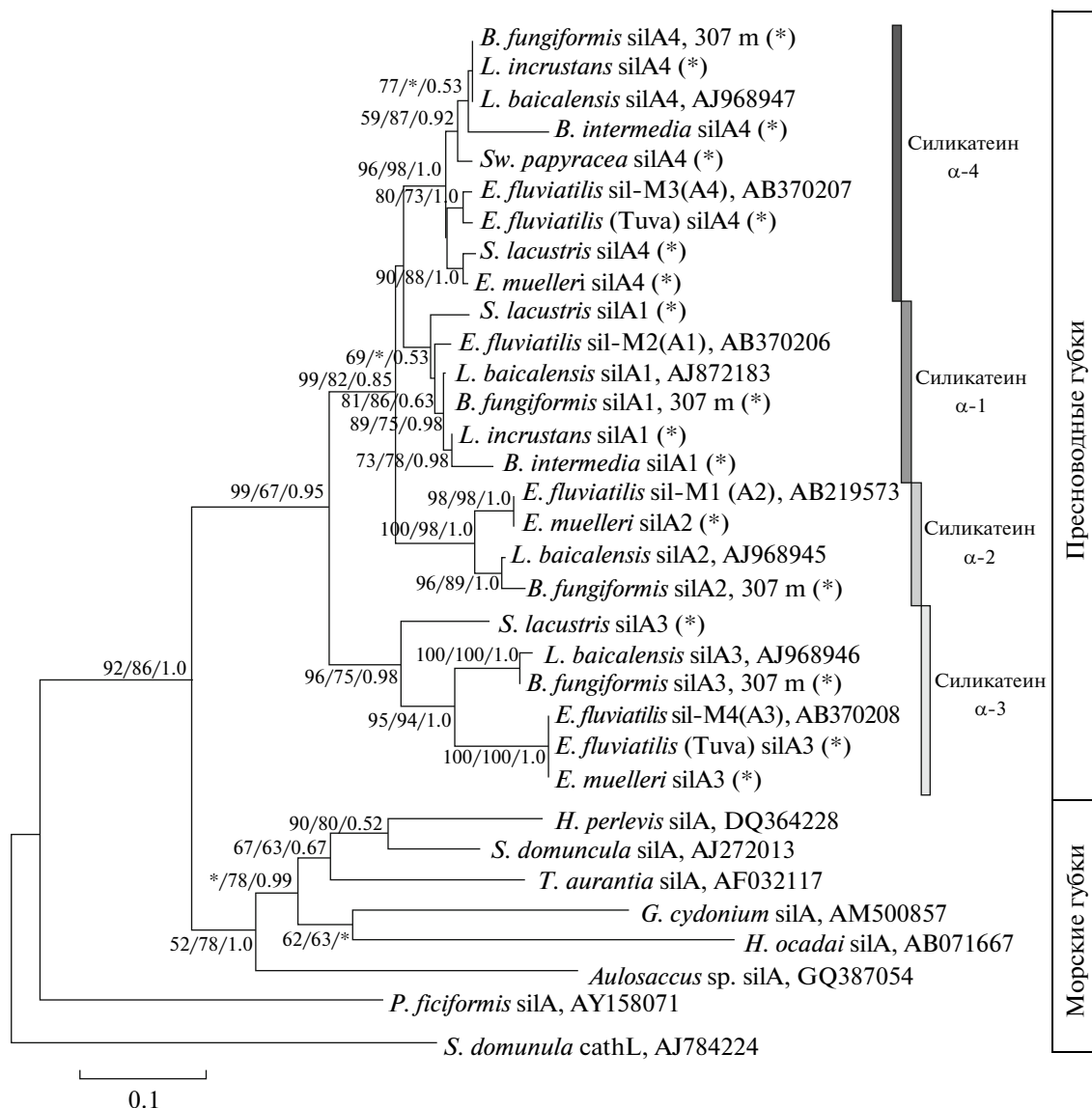


Рис. 3. Филогенетическое древо, построенное методом объединения ближайших соседей (NJ) на основе сравнения фрагментов аминокислотных последовательностей силикатеинов губок (150 а.о.). Числа в узлах дерева — величины бутстреп-поддержек на деревьях, построенных методами NJ, ML и апостериорных вероятностей в В1-анализе (слева направо). В качестве внешней группы взята последовательность катепсина *L. S. domuncula*. Опубликованные ранее последовательности приводятся с номерами доступа. Масштаб эволюционных расстояний соответствует 10 заменам на каждые 100 а.о.

ных губок нами не выявлен. Мы полагаем, что ген силикатеина- $\alpha 1$ может служить маркером видовой идентификации байкальских губок.

Филогенетический анализ проводили, сравнивая определенные нами и опубликованные в GenBank последовательности генов силикатеинов- α . Кроме экзон-интронных фрагментов генов, у четырех видов губок определены последовательности фрагментов кДНК силикатеина- $\alpha 1$ (у *S. lacustris*), силикатеина- $\alpha 2$ (у *E. muelleri*) и силикатеина- $\alpha 3$ (у *E. fluviatilis*, *E. muelleri*). При компьютерной трансляции экзонов получены аминокислотные последовательности длиной 150 а.о., которые использовали

для филогенетического анализа. На филогенетическом древе обнаруживается достоверное расхождение пресноводных и морских губок (рис. 3). Силикатеины пресноводных губок формируют устойчивую кладу, внутри которой группы гомологичных последовательностей образуют четыре кластера, соответствующие различным изоформам силикатеинов. В каждый кластер входят последовательности *L. baicalensis* и *B. fungiformis* (силикатеин- $\alpha 1$, - $\alpha 2$, - $\alpha 3$ и - $\alpha 4$), гомологичные им последовательности *E. fluviatilis* (силикатеин- $M 2$, - $M 1$, - $M 4$ и - $M 3$), а также по одной последовательности различных видов пресноводных губок. Разделение кластеров поддерживается высокими зна-

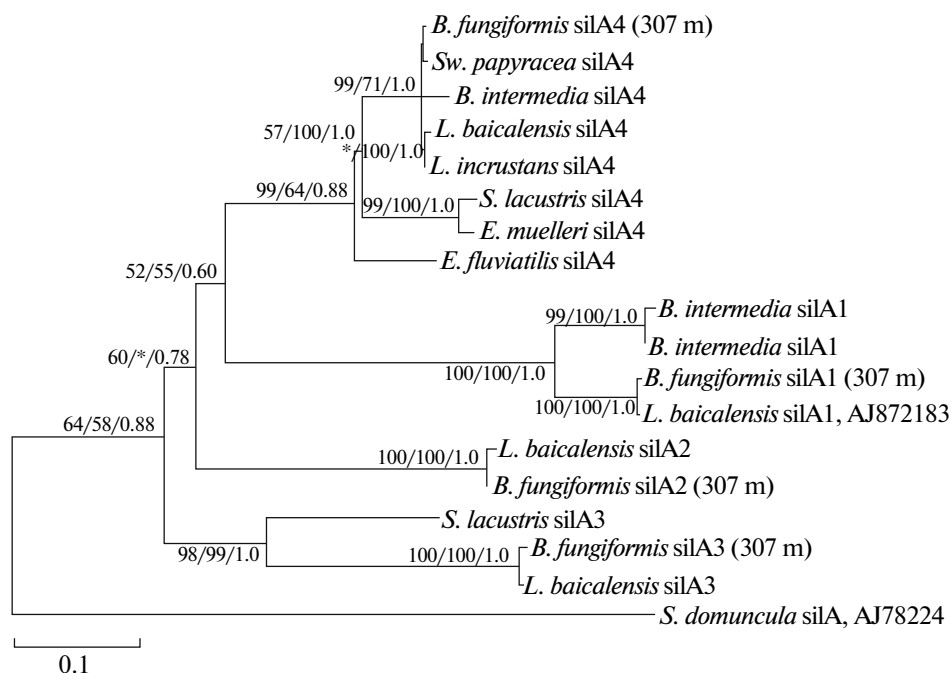


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное методом объединения ближайших соседей (NJ) на основе сравнения экзон-интронных фрагментов генов силикатеинов пресноводных губок (1181 п.н.). Масштаб эволюционных расстояний соответствует 10 заменам на каждые 100 н. Обозначения как на рис. 3.

чениями бутстрепа, определенными с помощью трех различных программ (рис. 3).

Результаты филогенетического анализа аминокислотных последовательностей силикатеинов дополняют ранее опубликованные нами данные [16] и свидетельствуют о том, что в процессе эволюции силикатеинов пресноводных губок вначале произошла дупликация генов, а затем образовались новые виды, т. е. предок современных пресноводных губок уже обладал, по меньшей мере, четырьмя генами силикатеина- α . Кластер sil- α 3 (объединяющий последовательности силикатеинов- α 3 шести видов губок) внутри клады пресноводных губок образует обособленную ветвь и располагается ближе к общему предку силикатеинов пресноводных губок. Несмотря на то, что дивергенция между четырьмя кластерами на дереве хорошо выражена, внутри кластеров имеются неразрешенные позиции. Так, вследствие высокой гомологии выбранного участка последовательности, не разделяются виды *B. fungiformis*, *L. incrustans* и *L. baicalensis* в кластере силикатеина- α 4, а также виды *E. fluviatilis* и *E. muelleri* — в кластерах силикатеинов- α 2 и - α 3 (рис. 3). Таким образом, анализ данного участка аминокислотной последовательности для филогенетического анализа не всегда позволяет различить виды пресноводных губок, однако можно четко определить принадлежность анализируемой последовательности к той или иной изоформе силикатеина- α .

Интроны ядерных генов широко используются для филогенетических исследований близкород-

ственных видов, поскольку скорость накопления мутаций в некодирующих участках более высока [32]. Мы провели филогенетический анализ экзон-интронных последовательностей силикатеинов пресноводных губок (рис. 4). Сравнивали последовательности, обнаруженные в данной работе, и последовательность гена силикатеина- α 1, определенные нами ранее [16]. При этом подходе удастся разделить не только разные изоформы силикатеина, но и виды пресноводных губок внутри кластеров. Наиболее полно представлены на дереве гены силикатеина- α 4, однако, из-за высокой консервативности его последовательностей у байкальских видов губок, разделение видов не всегда поддерживается достоверно высокими величинами бутстрепами.

Последовательности интронов генов силикатеина- α 1, - α 2 и - α 3 более вариабельны, и поэтому все виды байкальских губок в данных кластерах разделяются с большой достоверностью. Космополитные губки, как и при анализе аминокислотных последовательностей, во всех случаях достоверно отделяются от эндемичных байкальских видов. Эти результаты создают предпосылки для дальнейших исследований генов силикатеинов как пригодных молекулярных маркеров видовой принадлежности близкородственных байкальских губок. Далее необходимо провести анализ последовательностей генов или их фрагментов у всех представителей эндемичного байкальского семейства (насчитывающего 13 видов), а также определить уровень межвидовой

и внутривидовой вариабельности этих последовательностей.

Таким образом, нами впервые определены полные последовательности генов четырех изоформ силикатеина- α пресноводной губки *L. baicalensis*. Определены частичные последовательности генов восьми видов. Охарактеризованы особенности экзон-интронной организации генов силикатеинов и показано, что космополитные и эндемичные губки различаются длиной интронов соответствующих изоформ. Филогенетический анализ экзон-интронных последовательностей генов позволяет не только разделять кластеры генов различных изоформ силикатеинов, но и находить соответствие с системой видов пресноводных губок. Можно предположить, что гены силикатенов перспективны для их дальнейшего исследования и использования в качестве маркеров молекулярной идентификации близкородственных видов губок и их эволюции.

Работа получила финансовую поддержку молодого Лаврентьевского гранта (№6) Сибирского отделения РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shimizu K., Cha J., Stucky G.D., Morse D.E. 1998. Silicatein alpha: cathepsin L-like protein in sponge biosilica. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 6234–6238.
- Cha J.N., Shimizu K., Zhou Y., Christiansen S.C., Chmelka B.F., Stucky G.D., Morse D.E. 1999. Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicoes *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 361–365.
- Krasko A., Batel R., Schroeder H.C., Mueller I.M., Mueller W.E.G. 2000. Expression of silicatein and collagen genes in the marine sponge *Suberites domuncula* is controlled by silicate and myotrophin. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4878–4887.
- Pozzolini M., Sturla L., Cerrano C., Bavestrello G., Camardella L., Parodi A.M., Raheli F., Benatti U., Mueller W.E.G., Giovine M. 2004. Molecular cloning of silicatein gene from marine sponge *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae) and development of primorphs as a model for biosilicification studies. *Mar. Biotechnol. (N.Y.)*. **6**, 594–603.
- Armirotti A., Damonte G., Pozzolini M., Mussino F., Cerrano C., Salis A., Benatti U., Giovine M. 2009. Primary structure and post translation modification of silicatein beta from the marine sponge *Petrosia ficiformis* (Poiret, 1789). *J. Proteome Res.* (<http://pubs.acs.org>), 1–29.
- Cao X., Fu W., Yu X., Zhang W. 2007. Dynamics of spicule production in the marine sponge *Hymeniacidon perlevis* during *in vitro* cell culture and seasonal development in the field. *Cell Tissue Res.* **329**, 595–608.
- Mueller W.E.G., Boreiko A., Wang X., Belikov S.I., Wiens M., Grebenjuk V.A., Schlobetamacher U., Schroeder H.C. 2007. Silicateins, the major biosilica forming enzymes present in demosponges: Protein analysis and phylogenetic relationship. *Gene*. **395**, 62–71.
- Mueller W.E.G., Wang X., Kropf K., Boreiko A., Schlossmacher U., Brandt D., Schroeder H.C., Wiens M. 2008. Silicatein expression in the hexactinellid *Crateromorpha meyeri*: the lead marker gene restricted to siliceous sponges. *Cell Tissue Res.* **333**, 339–351.
- Kozhemyako V.B., Veremeichik G.N., Shkryl Y.N., Kovalchuk S.N., Krasokhin V.B., Rasskazov V.A., Zhuravlev Y.N., Bulgakov V.P., Kulchin Y.N. 2009. Silicatein genes in spicule-forming and nonspicule-forming pacific Demosponges. *Marine Biotechnology*. (Доступ online: <http://www.springerlink.com/content/g6253r384j8g6lu9/fulltext.pdf>), 1–7.
- Weaver J.C., Morse D.E. 2003. Molecular biology of Demosponge axial filaments and their roles in biosilicification. *Microscopy Res. Techn.* **62**, 356–367.
- Kaluzhnaya O.V., Belikov S.I., Schroeder H.C., Rothenberger M., Zapf S., Kaandorp J.P., Borejko A., Mueller I.M., Mueller W.E.G. 2005. Dynamics of skeleton formation in the Lake Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis*. Part II. Molecular biological studies. *Naturwissenschaften*. **92**, 128–133.
- Murr M.M., Morse D.E. 2005. Fractal intermediates in the self-assembly of silicatein filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 11657–11662.
- Mueller W.E.G., Schlobetamacher U., Wang X., Boreiko A., Brandt D., Wolf S.E., Tremel W., Schroeder H.C. 2008. Poly(silicate)-metabolizing silicatein in siliceous spicules and silicasomes of demosponges comprises dual enzymatic activities (silica polymerase and silica esterase). *FEBS J.* **275**, 362–370.
- Mohri K., Nakatsukasa M., Masuda Y., Agata K., Funayama N. 2008. Toward understanding the morphogenesis of siliceous spicules in freshwater sponge: Differential mRNA Expression of spicule-type-specific silicatein genes in *Ephydatia fluviatilis*. *Develop. Dynamics*. **273**, 3024–3039.
- Funayama N., Nakatsukasa M., Kuraku S., Takechi K., Dohi M., Iwabe N., Miyata T. and Agata K. 2005. Isolation of Ef silicatein and Ef lectin as molecular markers for sclerocytes and cells involved in innate immunity in the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis*. *Zool. Sci.* **22**, 1113–1122.
- Калюжная О.В., Беликова А.С., Подольская Е.П., Красько А.Г., Мюллер В.Е.Г., Беликов С.И. 2007. Идентификация силикатеинов пресноводной губки *Lubomirskia baicalensis*. *Молекуляр. биология*. **41**, 616–623.
- Ефремова С.М. 2001. Губки (Porifera). В: Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна. 1. Книга 1. Новосибирск: Наука, 179–192.
- Itskovich V.B., Gontcharov A., Masuda Y., Nohno T., Belikov S.I., Efremova S.M., Meixner M., Janussen D. 2008. Ribosomal ITS sequences allow resolution of freshwater sponge phylogeny with alignments guided by secondary structure prediction. *J. Mol. Evol.* **67**, 608–620.
- Ludwig M.Z. 2002. Functional evolution of noncoding DNA. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 634–639.
- Атамбаева Ш.А., Хайленко В.А., Ивашенко А.Т. 2008. Изменения длины интронов и экзонов в ге-

- нах арабидопсиса, риса, нематоды и человека. *Молекуляр. биология.* **42**, 352–362.
21. Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**, 95–98.
 22. Phillips A., Janies D., Wheeler W.C. 2000. Multiple sequence alignment in phylogenetic analysis. *Mol. Phyl. Evol.* **16**, 317–330.
 23. Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
 24. Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**, 368–376.
 25. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* **19**, 1572–1574.
 26. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596–1599.
 27. Guindon S., Delsuc F., Dufayard J.F., Gascuel O. 2009. Estimating maximum likelihood phylogenies with PhyML. *Meth. Mol. Biol.* **537**, 113–137.
 28. Keane T.M., Creevey C.J., Pentony M.M., Naughton T.J., McInerney J.O. 2006. Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol. Biol.* **6**, 29.
 29. King N., Westbrook J., Young S., et al. 2008. The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature.* **451**, 783–788.
 30. Irimia M., Roy S.W. 2008. Spliceosomal introns as tools for genomic and evolutionary analysis. *Nucleic Acids Res.* **36**, 1703–1712.
 31. Efremova S.M., Itskovich V.B., Parfenova V.V., Drucker V.V., Müller W.E., Schröder H.C. 2002. Lake Baikal: a unique place to study evolution of sponges and their stress response in an environment nearly unimpaired by anthropogenic perturbation. *Cell. Mol. Biol.* **48**, 359–371.
 32. Prychitko T., Moore W. 2003. Alignment and phylogenetic analysis of b-fibrinogen intron 7 sequences among avian orders reveal conserved regions within the intron. *Mol. Biol. Evol.* **20**, 762–771.