

••• ГЕНЕТИКА ••• GENETICS •••

УДК: 575.852:577.152.311:595.7

Філогенія ортологів генів β -естераз за межами роду *Drosophila* С.Л.Пастернак¹, А.М.Венгер², О.О.Колесник³, В.О.Малиновський²

¹Одеський національний університет імені І.І.Мечникова (Одеса, Україна)

²Міжнародний гуманітарний університет (Одеса, Україна)

³Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннезнавства та сортовивчення
(Одеса, Україна)
venger87@ukr.net

Гени β -естераз дрозофіл мають життєво важливі функції та присутні у всіх представників роду. Найбільш досліджений представник цих генів – *Est-6 Drosophila melanogaster* – грає важливу роль у репродукції. Але на даний час практично нічого не відомо про наявність та кількість цих генів у інших видів комах та їх молекулярну еволюцію. За допомогою пошукового інструменту BLAST знайдені нуклеотидні послідовності ортологів генів *Est-6 D. melanogaster* у 10 видів комах, що належать до 5 рядів. Показано, що послідовності β -естераз дрозофіл входять у один кластер з ортологічними послідовностями комарів *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* та *Culex quinquefasciatus* (ряд Diptera). Сестринський йому кластер утворюють ортологічні послідовності представників інших рядів інфракласу Neoptera. У представників таксонів Crustacea (*Daphnia pulex*), Myriapoda (*Strigamia maritima*) та Chelicerata (*Tetranychus urticae*) ортологи *Est-6* не знайдені. За допомогою інструменту TimeTree обґрунтований ймовірний часовий проміжок виникнення генів, ортологічних генам β -естераз представників роду *Drosophila*. Обговорюється гіпотеза про виникнення предкових β -естеразам дрозофіл генів на ранніх етапах становлення класу Insecta.

Ключові слова: філогенія, гомологи, ортологи, кластер, *Est-6*, β -естерази, дрозофіли.

Phylogeny of orthologs of β -esterase genes outside of *Drosophila* genus S.Pasternak, A.Venger, O.Kolesnyk, V.Malynovsky

β -esterase genes of *Drosophila* have important functions and are present in all members of the genus. The most studied member of these genes is *Est-6* gene of *D. melanogaster*. There are no data yet about presence and numbers of these genes in another insects and their molecular evolution is unknown. With the help of search tool BLAST there have been found orthologous sequences of the *Est-6* gene of *D. melanogaster* in 10 species of insects belonging to 5 orders. It has been shown that the sequences of β -esterases of *Drosophila* belong to the same cluster with orthologous sequences of *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (order Diptera). Its sister cluster consists of orthologous sequences of other orders of infraclass Neoptera. There have been not detected orthologs of the *Est-6* gene in the representatives of the taxon Crustacea (*Daphnia pulex*), Myriapoda (*Strigamia maritima*) and Chelicerata (*Tetranychus urticae*). With the help of the TimeTree instrument there has been substantiated the probable time period of possible origin of genes which are orthologous to β -esterase genes of *Drosophila*. The hypothesis of the origin of genes which were the ancestral to β -esterases of *Drosophila* on the early stages of development of the class Insecta is discussed.

Key words: phylogeny, homologs, orthologs, cluster, *Est-6*, β -esterases, *Drosophila*.

Філогенія ортологів генів β -естераз за межами роду *Drosophila* С.Л.Пастернак, А.М.Венгер, О.О.Колесник, В.О.Малиновський

Гени β -естераз дрозофіл мають життєво важливі функції та присутні у всіх представників роду. Найбільш досліджений представник цих генів – *Est-6 D. melanogaster* – грає важливу роль у репродукції. Але на даний час практично нічого не відомо про наявність та кількість цих генів у інших видів комах та їх молекулярну еволюцію. При помощи поискового инструмента BLAST найдены последовательности ортологов гена *Est-6 D. melanogaster* у 10 видов насекомых, относящихся к 5 отрядам. Показано, что последовательности β -естераз дрозофіл входят в один кластер с ортологічними послідовностями комарів *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* и *Culex quinquefasciatus* (отряд Diptera). Сестринский ему кластер образуют ортологічные

последовательности представителей других отрядов инфракласса Neoptera. У представителей таксонов Crustacea (*Daphnia pulex*), Myriapoda (*Strigamia maritima*) и Chelicerata (*Tetranychus urticae*) ортологи *Est-6* не найдены. При помощи инструмента TimeTree обоснована вероятная временная дистанция возникновения генов, ортологичных генам β -эстеразам дрозофил. Обсуждается гипотеза о возникновении предковых β -эстеразам дрозофил генов на ранних этапах становления класса Insecta.

Ключевые слова: филогения, гомологи, ортологи, кластер, *Est-6*, β -эстеразы, дрозофилы.

Вступ

Ген *Est-6* *Drosophila melanogaster* та інші гени β -естераз дрозофіл є модельними об'єктами для вивчення молекулярної еволюції еукаріотичних ензим-кодуєчих генів (Robin et al., 2009). Їх філогенії й популяційній генетиці присвячено багато праць (Balakirev, Ayala, 2003; Balakirev et al., 1999; Brady, Richmond, 1990; Robin et al., 2009; Veuille, King, 1995). Однак присутня лише фрагментарна інформація щодо філогенії ортологів β -естераз дрозофіл за межами роду. До теперішнього часу було відомо лише те, що гени *AGAP005370*, *AGAP005371*, *AGAP005372*, *AGAP005373* *Anopheles gambiae* та *AAEL012509* (Carboxylesterase-6) *Aedes aegypti*, гомологічні генам β -естераз дрозофіл, входять до зовнішньої, по відношенню до останніх, кладі. Відомо також, що найближчим паралогом генів β -естераз *D. melanogaster* (*Est-6* й *Est-P*) є ген *Jhedup* (Claudianos et al., 2006; Robin et al., 2009). Виходячи з вищенаведеного, була поставлена мета знайти ортологи гену *Est-6* у видів, які не належать до роду *Drosophila*, й провести їх філогенетичний аналіз. У задачі дослідження також входило виявити, на якому етапі еволюції класу Insecta виникли гени, ортологічні генам β -естераз дрозофіл. Оскільки акт видоутворення часто супроводжується дуплікацією генів, то під поняттям «ортологи *Est-6*» маються на увазі всі гени будь-якого виду, що мають загального з *Est-6* предка (Fitch, 1970). Між собою ці гени є паралогами.

Методика

Пошук послідовностей ортологів гену *Est-6* *D. melanogaster* проводили за допомогою пошукового інструменту BLASTP проти бази KEGG Genes (<http://www.genome.jp/kegg/genes.html>). При цьому покроково вибирались геноми наступних видів комах: *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* (ряд Diptera), *Apis mellifera*, *Nasonia vitripenni* (ряд Hymenoptera), *Tribolium castaneum* (ряд Coleoptera), *Acyrtosiphon pisum* (ряд Hemiptera) й *Pediculus humanus* (ряд Phthiraptera). В якості запиту (query) була використана амінокислотна послідовність *Est-6* *D. melanogaster*. Ортолог *Est-6* у *Bombyx mori* (ряд Lepidoptera) був отриманий з бази даних OrthoDB (<http://cegg.unige.ch/orthodb6>) (Waterhouse et al., 2013). Крім того, за допомогою інструменту DELTA-BLAST (Boratyn et al., 2012) був виконаний пошук споріднених *Est-6* генів у представників таксонів Crustacea (*Daphnia pulex*), Myriapoda (*Strigamia maritima*) й Chelicerata (*Tetranychus urticae*) у базі даних UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Послідовності *Est-6*, *Est-P*, *Jhedup*, *Jhe* *D. melanogaster* (підрид Sophophora) й *EstS* *D. virilis* (підрид Drosophila) отримані з бази даних FlyBase (<http://flybase.org/>) (Marygold et al., 2013). Послідовності, що мали у результаті пошуку рахунок >250 (рахунок *Jhedup* складає 244) зберігали у форматі FASTA (Pearson, Lipman, 1988) й вирівнювали за допомогою програми MEGA6 (Tamura et al., 2011). На основі вирівнювання за допомогою тієї ж програми було побудовано філогенетичне дерево методом «приєднання сусідів» (Saitou, Nei, 1987). Статистичну оцінку дерева проводили методом бутстреп-аналізу при кількості реплікації рівній 1000 (Zharkikh, Li, 1995). Еволюційні події були датовані за допомогою інструменту TimeTree (www.timetree.org/). Систематика комах дана відповідно до бази даних Tree of Life (<http://tolweb.org/tree/>). Номенклатура генів дана відповідно до KEGG Genes.

Результати та обговорення

Як видно з рис. 1, послідовності β -естераз дрозофіл входять у одну кладу з ортологічними послідовностями інших двокрилих – комарів *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* й *Culex quinquefasciatus*. У *A. gambiae* в геномі знаходиться 4 гени β -естераз, кожен з котрих містить 2 екзони, як й у генів β -естераз дрозофіл (Robin et al., 2009), тоді як у *A. aegypti* й *C. quinquefasciatus* присутні по одному гену β -естераз, перший з яких містить 2 екзони, а другий – 4. Це говорить про те, що, ймовірно, гени досліджених видів двокрилих є близькими ортологами β -естераз дрозофіл й, вірогідно, їх генопродукти виконують схожі функції.

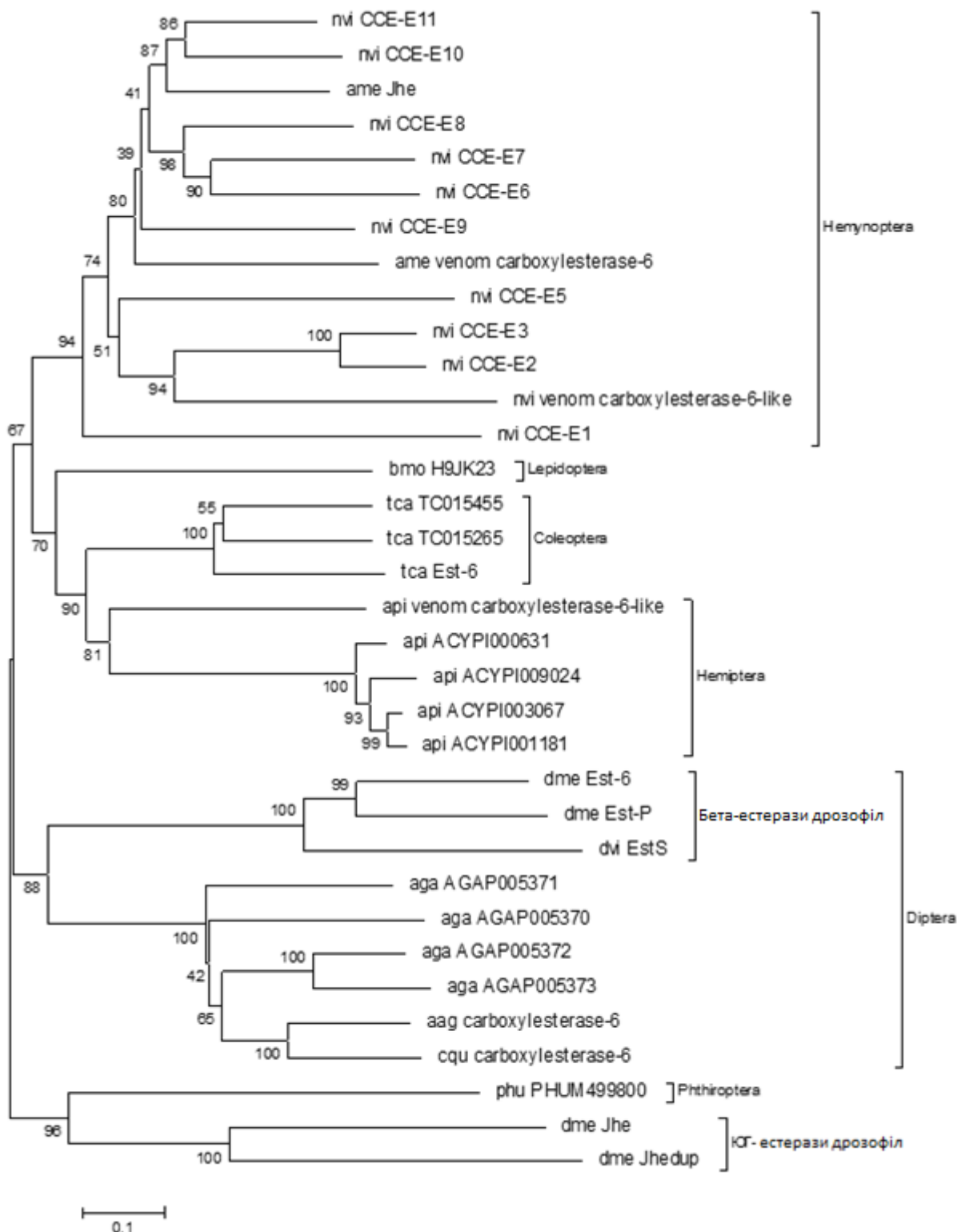


Рис. 1. Філогенетичне дерево гомологів гену β -естераз дрозофіл. Дерево побудовано методом «приєднання сусідів». Цифри на вузлах – показники бутстреп-аналізу

Сестринську кладу утворюють послідовності генів представників інших рядів комах: *Apis mellifera*, *Nasonia vitripennis* (ряд Hemiptera), *Tribolium castaneum* (ряд Coleoptera), *Acyrtosiphon*

pisum (ряд Hemiptera) й *Bombyx mori* (ряд Lepidoptera). В кладі 2 підклади: першу утворюють послідовності Hemiptera, другу – послідовності Hemiptera, Coleoptera й Lepidoptera.

У *N. vitripenni* є 10 гомологів β -естераз, тоді як у *A. mellifera* їх 2, до того ж один з них, *Jhe*, кодує естеразу ювенільного гормону (Mackert et al., 2008). Ймовірно, цей ген набув своєї функції незалежно від *Jhe* дрозофіл, адже він не входить з ними до однієї класи. Таким чином, він є гомологом генів β -естераз дрозофіл й аналогом генів естераз ювенільного гормону (Fitch et al., 1970). У представника Lepidoptera – *Bombyx mori* знайдений тільки один ген, споріднений генам β -естераз дрозофіл – *H9JK23*, у *Tribolium castaneum* (ряд Coleoptera) й *Acyrthosiphon pisum* (ряд Hemiptera) – відповідно 3 й 5 гомологів генів β -естераз. Гени цих двох видів складають класу, сестринську по відношенню до гену *B. mori*. Топологія дерева не відповідає загальноприйнятій системі комах, адже Hemiptera належить до надряду Paraneoptera, а Coleoptera, Lepidoptera, Hemiptera і Diptera – до Endopterygota. Найближчий до *Est-6* ген *Pediculus humanus* (ряд Phthiroptera, надряд Paraneoptera) – *PHUM499800* – входить до зовнішньої по відношенню до всіх знайдених ортологів *Est-6* класи. Він знаходиться у одній класі з паралогами *Est-6* – *Jhedup* й *Jhe* та, вірогідно, є їх ортологом. Це говорить про те, що, ймовірно, у Phthiroptera відсутні ортологічні β -естеразам дрозофіл гени. Вірогідно, Phthiroptera їх втратили, адже в геномі *Acyrthosiphon pisum* (ряд Hemiptera, надряд Paraneoptera) вони присутні.

Таким чином, можна зробити висновок про те, що лінія β -естераз намітилася ще до розділення надрядів Paraneoptera і Endopterygota (355–372 млн р. т.). Можливо, це сталося до становлення інфракласу Neoptera або навіть до становлення підкласу Pterygota. Для більш точного датування потрібні сиквенс геномів представників Odonata, Ephemeroptera та інших, зовнішніх по відношенню до Neoptera, груп. У представників таксонів Crustacea (*Daphnia pulex*), Myriapoda (*Strigamia maritima*) й Chelicerata (*Tetranychus urticae*) гени, гомологічні генам β -естераз дрозофіл, не знайдені. Отже, вони виникли вже після формування класу Insecta (не раніше 443 млн р. т.).

Висновки

На побудованому в даній роботі філогенетичному дереві гени β -естераз дрозофіл та інших представників Diptera складають окрему класу, сестринську по відношенню до споріднених генам представників інших рядів комах. Ортологи *Est-6* є і у представника надряду Paraneoptera, і у представників Endopterygota. Це говорить про те, що вони, ймовірно, виникли до дивергенції цих двох надрядів. Однак вони відсутні у представників Crustacea, Myriapoda та Chelicerata, що свідчить про їх виникнення після формування класу Insecta. Таким чином, ймовірний часовий проміжок виникнення генів, ортологічних *Est-6*, – від 355 до 433 млн р.т.

Список літератури

- Balakirev E.S., Ayala F.J. Molecular population genetics of the β -esterase gene cluster of *Drosophila melanogaster* // Journal of Genetics. – 2003. – Vol.82, no 3. – P. 115–131.
- Balakirev E.S., Balakirev E.I., Rodriguez-Trelles F. et al. Molecular evolution of two linked genes, *Est-6* and *Sod*, in *Drosophila melanogaster* // Genetics. – 1999. – Vol.153. – P. 1357–1369.
- Boratyn G.M., Schäffer A.A., Agarwala R. et al. Domain enhanced lookup time accelerated BLAST // Biol. Direct. – 2012. – Vol.7. – P.12.
- Brady J.P., Richmond R.C. Molecular analysis of evolutionary changes in the expression of *Drosophila* esterases (esterase 5/esterase 6/gene regulation) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1990. – Vol.87. – P. 8217–8222.
- Claudianos C., Ranson H., Johnson R.M. et al. A deficit of detoxification enzymes: Pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee // Insect Mol. Biol. – 2006 – Vol.15. – P. 615–636.
- Fitch W. Distinguishing homologous from analogous proteins // Syst. Zool. – 1970. – Vol.19, no 2. – P. 99–113.
- Mackert A., do Nascimento A.M., Bitondi M.M. et al. Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L. – expression analysis and functional assays // Comparative Biochemistry and Physiology – Part B: Biochemistry and Molecular Biology. – 2008. – Vol.150, no 1. – P. 33–44.
- Marygold S.J., Leyland P.C., Seal R.L. et al. FlyBase: improvements to the bibliography // Nucleic Acids Res. – 2013. – Vol.41. – P. 751–757.

- Pearson W.R., Lipman D.J. Improved tools for biological sequence comparison // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1988. – Vol.85, no 8. – P. 2444–2448.
- Robin C., Bardsley L.M., Coppin C. et al. Birth and death of genes and functions in the beta-esterase cluster of *Drosophila* // J. Mol. Evol. – 2009. – Vol.69, no 1. – P. 10–21.
- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. – 1987. – Vol.4, no 4. – P. 406–425.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Molecular Biology and Evolution. – 2011. – Vol.28. – P. 2731–2739.
- Veuille L., King L.M. Molecular basis of polymorphism at the esterase-5B locus in *Drosophila pseudoobscura* // Genetics. – 1995. – Vol.141. – P. 255–262.
- Waterhouse R.M., Tegenfeldt F., Li J. et al. OrthoDB: a hierarchical catalog of animal, fungal and bacterial orthologs // Nucleic Acids Res. – 2013. – Vol.41. – P. 358–365.
- Zharkikh A., Li W.H. Estimation of confidence in phylogeny: the complete-and-partial bootstrap technique // Mol. Phylogenet. Evol. – 1995. – Vol.4, no 1. – P. 44–63.
- <http://cegg.unige.ch/orthodb6> – Computational Evolutionary Genomics Group
- <http://flybase.org> – A Database of *Drosophila* Genes & Genomes
- <http://tolweb.org/tree> – Tree of Life Web Project
- <http://www.genome.jp/kegg/genes.html> – GenomeNet
- <http://www.uniprot.org/> – Universal Protein Resource
- www.timetree.org/ – Time tree of life

Представлено: В.В.Немерцалов / Presented by: V.V.Nemertsalov

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 14.02.2017