

На правах рукописи

ДЕМЕНТЬЕВА ПОЛИНА ВЛАДИМИРОВНА

ВЫЯВЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КОДИРУЮЩИХ  
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ  
НА В-ХРОМОСОМАХ СИБИРСКОЙ КОСУЛИ

03.01.07 – молекулярная генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск - 2013

Работа выполнена в лаборатории сравнительной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской Академии наук, г. Новосибирск.

Научный руководитель: Трифонов Владимир Александрович - кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской Академии наук, г. Новосибирск, зав. лабораторией

Официальные оппоненты: Беляева Елена Сергеевна - доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской Академии наук, г. Новосибирск, главный научный сотрудник

Высоцкая Людмила Васильевна - доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», зам. зав. кафедры

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург

Защита состоится: \_\_\_\_\_ 2013 г. на заседании диссертационного совета Д 003.074.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8/2.

Тел: +7- 952-916-7858. e-mail: kokoza@mcb.nsc.ru. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН. Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2013г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Е. Б. Кокоза

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность работы

В-хромосомы или добавочные, сверхчисленные, хромосомы обнаружены у животных, растений, грибов и характеризуются необязательностью для жизнедеятельности организма (Camacho et al., 2000). Основная часть исследований по молекулярной организации В-хромосом показала, что добавочные элементы богаты повторенной некодирующей ДНК: LINE и SINE, теломерными и центромерными повторами, рибосомной ДНК, гистоновыми генами и не несут экспрессирующихся уникальных генов. Имеющиеся данные наводили на мысль о функциональной инертности В-хромосом. Однако с применением молекулярных методов в последнее время был обнаружен целый ряд уникальных аутосомных генов, расположенных на В-хромосомах, у различных организмов (Han et al., 2001; Lamatsch et al., 2011; Yoshida et al., 2011; Martis et al., 2012). В частности, на В-хромосомах хищных был обнаружен протоонкоген *C kit*, что позволило сделать предположение о присутствии генов в добавочных элементах и других видов млекопитающих, в частности, сибирской косули *Capreolus pygargus* ( $2n=70+0-12B$ ) (Graphodatsky et al., 2005; Yudkin et al., 2007; Duke Becker et al., 2011).

Вопрос о транскрипционной активности генов, расположенных на В-хромосомах млекопитающих, долго оставался спорным и открытым. Была показана экспрессия рибосомных генов, лежащих на добавочных элементах, у растений (Leach et al., 2005) и животных (Rubtsov et al., 2004; Ruiz-Estevez et al., 2012). Однако, обнаружение в данном исследовании транскрипта *FPGT-TNNI3K*, экспрессирующегося с дублированных генов на В-хромосомах в культуре фибробластов сибирской косули – является первым примером транскрипционной активности уникальных генов, расположенных на добавочных элементах кариотипа млекопитающих. Варьирование копииности функционально значимых генов в зависимости от числа В-хромосом может оказаться критическим для жизнедеятельности вида. Таким образом, проведенное в данной работе подробное картирование В-хромосом сибирской косули выявило важные функциональные последовательности, локализованные на добавочных элементах, и показало их экспрессию, что способствует пересмотру представления о В-хромосомах и необходимости учитывать их возможную роль в жизнедеятельности организма и в эволюции геномов.

**Целью** представленной работы было детальное картирование В-хромосом сибирской косули и выявление транскрипционной активности дублированных генов, расположенных на В-хромосомах. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Стандартизация кариотипа косули и выявление гомологичных районов хромосом косули, верблюда и коровы с помощью хромосомного пэйнтинга.
2. Разработка метода идентификации генов на добавочных хромосомах.

3. Картирование последовательностей ДНК, локализованных на В-хромосомах косули, с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации ВАС клонов коровы и ПЦР.
4. Определение копийности аутомомных участков, присутствующих на добавочных элементах у сибирской косули с разным числом В-хромосом, с помощью ПЦР в реальном времени.
5. Выявление возможных различий первичной структуры гомологичных фрагментов ДНК аутомом и В-хромосом с помощью секвенирования.
6. Оценка эволюционной консервативности генов, локализованных на В-хромосомах, путем сравнения экзонов этих генов у косули, лося, марала, мазама и других видов позвоночных.
7. Доказательство транскрипционной активности дублированных копий генов, расположенных на В-хромосомах, путем выявления аналогичных нуклеотидных замен в ДНК В-хромосом и в клонх кДНК.

### **Научная новизна работы и практическая значимость**

Впервые проведена стандартизация кариотипа косули относительно кариотипов коровы и верблюда. Обнаружено восемь перестроек, разделяющих кариотипы коровы и косули, из них шесть слияний хромосом в линии косули, одно слияние хромосом в линии коровы и одна инверсия на хромосоме 11 сибирской косули.

Предложен оригинальный метод идентификации последовательностей, расположенных на В-хромосомах. Впервые показано, что В-хромосомы сибирской косули содержат аутомомные копии генов *TNNI3K*, *FPGT* и *LRR1Q3* вместе с прилегающими к ним последовательностями. Участок, гомологичный хромосоме 3 коровы (74.6 – 76.4 м.п.н.), на добавочных хромосомах составляет около 2 м.п.н. Установлено, что копии генов *TNNI3K*, *FPGT* и *LRR1Q3*, локализованные на В-хромосомах, очень консервативны. Однако в двух случаях удалось выявить несинонимичные В-хромосом-специфичные замены. Поскольку замены, обнаруженные на добавочных хромосомах, совпали с заменами, обнаруженными в клонх кДНК, был сделан вывод о транскрипционной активности этих генов. Показано, что гены *TNNI3K*, *FPGT* характеризуются высокой консервативностью в ряду млекопитающих.

Использование разработанных нами молекулярных подходов по картированию В-хромосом сибирской косули в дальнейшем может облегчить задачу исследования молекулярной организации добавочных хромосом у других видов позвоночных.

### **Положения, выносимые на защиту**

Сибирская косуля обладает высококонсервативным кариотипом, близким предковому кариотипу оленых. Добавочные хромосомы косули содержат крупный дублированный фрагмент хромосомы 1, включающий уникальные

гены *TNNI3K*, *FPGT* и *LRRIQ3*. Кодрующие гены, локализованные на В-хромосомах сибирской косули, транскрибируются.

### **Апробация работы**

Результаты исследования были доложены на следующих конференциях:

1. Симпозиум, посвященный 130-летию со дня рождения Левитского Г.А. "Хромосомы и эволюция" (Санкт-Петербург, 26-27 ноября 2008 г);
2. Международная конференция "Хромосома 2009" (Новосибирск, 31 августа-6 сентября 2009 г);
3. II международная научно-практическая конференция "Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика" (Новосибирск, 14-17 ноября 2011 г);
4. 19-я международная хромосомная конференция (Болонья, Италия, 2-6 сентября 2013г).

### **Личный вклад соискателя**

Автором выполнена вся экспериментальная работа, включающая локализацию ВАС клонов с помощью FISH и скрининг В-хромосомных библиотек с помощью ПЦР. Автором также проведена оценка копийности участков, представленных на добавочных хромосомах, с помощью ПЦР в реальном времени и секвенирование копий генов, лежащих на В-хромосомах и аутосомах сибирской косули, европейской косули, лося, марала и мазама. Стандартизация кариотипа косули с помощью хромосомного пэйнтинга была проведена совместно с к.б.н. А. И. Кулемзиной (ИМКБ СО РАН, Новосибирск). Обработка, анализ, интерпретация данных и подготовка публикаций были выполнены при участии автора.

### **Объем и структура диссертации**

Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 216 ссылок. Диссертация изложена на 148 страницах машинописного текста, содержит 12 таблиц, 18 рисунков и 4 приложения.

### **Публикации**

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в виде трех статей в рецензируемых научных изданиях, а также доложены на четырех отечественных и международных конференциях.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Суспензии хромосом коровы и сибирской косули без В-хромосом, сибирской косули с 4 и 8 В-хромосомами, а также образцы ДНК европейской косули, лося, марала, сибирской косули без В-хромосом, сибирской косули с 4 и

8 В-хромосомами, коровы и мазама были приготовлены в лаборатории цитогенетики животных ИМКБ СО РАН.

**Библиотека В-хромосом** сибирской косули была получена с помощью хромосомного сортирования П. О'Брайен (Центр сравнительной геномики, Кембриджский университет, Великобритания) и В. А. Трифоновым (ИМКБ СО РАН, Новосибирск) из культуры фибробластов сибирской косули, отловленной в Новосибирской области (8 В-хромосом). Амплификацию фрагментов ДНК сортированных В-хромосом осуществляли с помощью метода DOP-ПЦР.

**В-хромосом-специфичная библиотека кДНК** была получена В. А. Трифоновым (ИМКБ СО РАН, Новосибирск) на основе метода SHAC ("Selection of Hybrids by Affinity Capture" – отбор гибридов афинной сорбцией) (Chen-Liu et al., 1995). Из культуры клеток фибробластов сибирской косули с 8 В-хромосомами была выделена тотальная РНК и получена кДНК библиотека с помощью BD SMART PCR cDNA Synthesis Kit (BD Biosciences) по протоколу производителя. Затем полученная кДНК библиотека была амплифицирована со специфичным праймером (BD Biosciences), и гибридизована *in vitro* с В-хромосом-специфичной биотинилированной библиотекой, которая была помечена с помощью метода DOP-ПЦР. Захват полученных гибридов производили магнитными микрочастицами с иммобилизованным авидином. Фрагменты кДНК амплифицировали с помощью ПЦР со специфичным праймером (BD Biosciences). Продукты ПЦР клонировали с использованием TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, UK) и секвенировали по стандартному протоколу. Полученные последовательности были выровнены относительно генома коровы UCSC genome browser on Cow Oct. 2011 (Baylor Btau\_4.6.1/bosTau7).

**Клоны ВАС библиотеки** коровы CHORI-240 были предоставлены д-ром Д.М. Ларкиным (Аберистуитский университет, Великобритания).

*Препараты метафазных хромосом* исследованных видов и GTG-окраска были получены по стандартному протоколу (Графодатский, Раджабли, 1988).

*Библиотеку ДНК ВАС клонов* получали в реакции DOP-PCR (Backx et al., 2008).

*Мечение ДНК ВАС клонов* для FISH проводили с использованием аналогов нуклеотидов: биотина-11-дУТФ или дигоксигенина-11-дУТФ и DOP4-праймера (5'-GGAAACAGCCCGACTCGAG-3').

*Флуоресцентную in situ гибридизацию* выполняли по ранее предложенному протоколу (Yang et al., 1999).

*Скрининг библиотек сортированных добавочных хромосом* проводили с помощью ПЦР. Подбор праймеров осуществлялся по геному коровы UCSC

genome browser on Cow Oct. 2011 (Baylor Btau\_4.6.1/bosTau7). Температуру отжига праймеров подбирали с помощью программы “OLIGO”.

*ПЦР в реальном времени* проводилась на приборе C1000 Thermocycler фирмы “BioRad” с использованием красителя SYBR Green I. Анализ данных осуществлялся с помощью метода калибровочных прямых.

*Секвенирование* ПЦР-продуктов осуществлялось с использованием ABI Big Dye системы на приборе ABI3130x1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc., CA) по стандартному протоколу.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

### **Стандартизация кариотипа косули, выявление гомологичных районов аутосом косули, коровы и верблюда**

Поскольку косуля не относилась к числу видов, вовлеченных в исследования по картированию генома, то генетический состав и гомология хромосом косули с хромосомами хорошо картированных видов не были известны, а кариотип был охарактеризован только классическими цитогенетическими методами. Поэтому необходимым этапом работы было проведение стандартизации кариотипа косули относительно кариотипа коровы.

Использование сравнительного хромосомного пэйнтинга с пробами верблюда позволило выявить гомологичные районы на хромосомах косули и восстановить сценарий кариотипической эволюции этого вида. Мы выявили восемь хромосомных перестроек, разделяющих кариотипы коровы и косули. Из них – шесть слияний в линии сибирской косули, одно слияние в линии коровы и инверсию на хромосоме 11 косули (Рис.1).

Кроме того, мы установили, что кариотип косули является очень консервативным и почти не отличается от предкового кариотипа оленых.

### **Разработка метода идентификации генов на В-хромосомах**

Метод идентификации генов на В-хромосомах строился на получении В-хромосом-специфичной библиотеки кДНК. Наиболее важным шагом метода была гибридизация библиотеки кДНК косули с В-хромосом-специфичной биотинилированной библиотекой, что дало возможность отобрать только те клоны кДНК, которые оказались гомологичны последовательностям с В-хромосом. Специфичность и той и другой библиотек была подтверждена методом FISH. Из В-хромосом-специфичной библиотеки кДНК были отсекуены 45 клонов. Среди них встретились транскрипты уникальных генов, в частности, гомологичные ген-содержащему району хромосомы 3 коровы. Последовательности данных клонов депонированы в GenBank под следующими номерами: JN871269-JN871285.

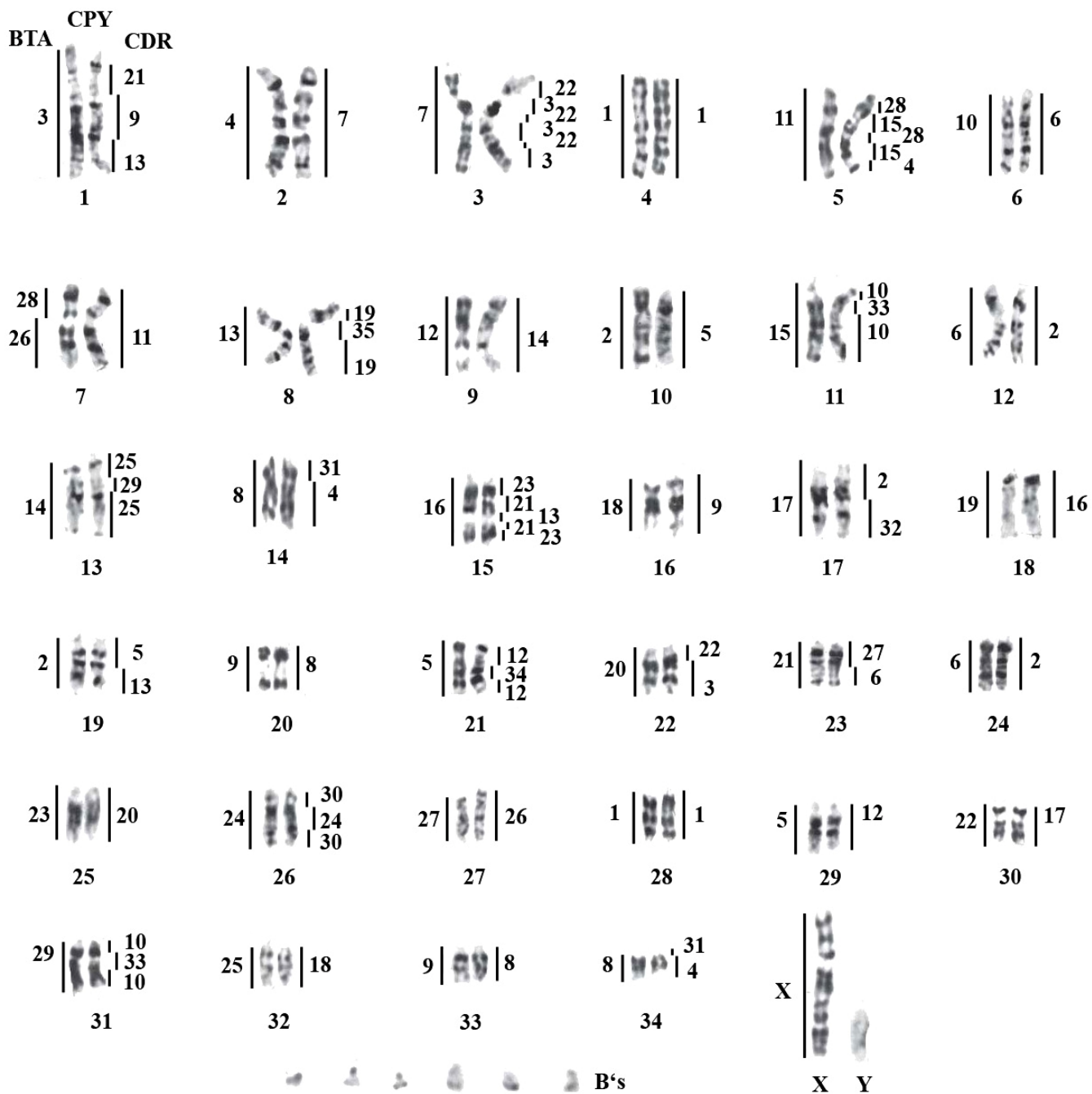


Рисунок 1. Сравнительная карта гомологичных районов косули (CPY), верблюда (CDR) и коровы (BTA), основанная на данных хромосомного пэйнтинга. «B's» – В-хромосомы.

**Картирование участков ДНК, лежащих на В-хромосомах сибирской косули**  
 Нами была получена В-хромосом-специфичная библиотека кДНК, клоны из которой оказались гомологичны уникальным аутосомным генам *FPGT*, *TNNI3K*, *LRR1Q3*, расположенным на хромосоме 3 коровы и, соответственно, на хромосоме 1 сибирской косули. Поэтому дальнейшей задачей нашего исследования стало картирование копий этих генов и участков, прилегающих к ним на В-хромосомах сибирской косули.



*Картирование участков ДНК, лежащих на В-хромосомах косули с помощью ВАС клонов коровы*

К району хромосомы 3 коровы, содержащему участки гомологии В-хромосом-специфичных кДНК, были подобраны ВАС клоны из библиотеки CHORI-240. При локализации ВАС клонов (CH240-10H15, CH240-444I8, CH240-493P4, CH240-515C3, CH240-454D22, CH240-351I13) можно было видеть сигналы на хромосоме 1 и В-хромосомах косули, а также на хромосоме 3 коровы. При локализации ВАС клонов CH240-131I21 и CH240-385G2 сигналы на добавочных хромосомах отсутствовали. По распределению ВАС клонов, давших сигнал на добавочных хромосомах, удалось установить примерное местоположение участка, присутствующего на добавочных элементах, относительно хромосомы 3 коровы, а также примерный размер этого участка, который был уточнен с помощью ПЦР-картирования (Рис.2).

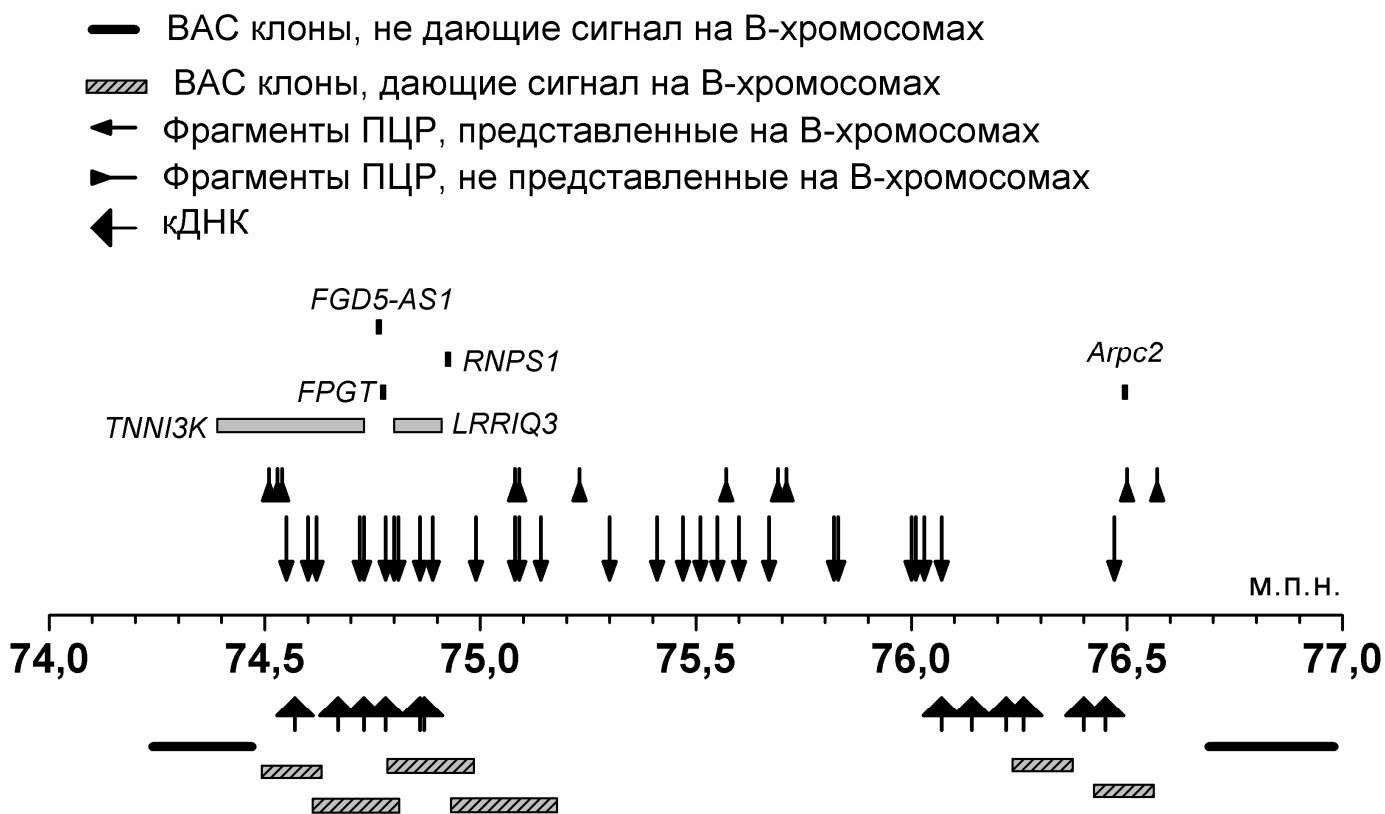


Рисунок 2. Схема района хромосомы 3 коровы с координатами и нанесенными маркерами, картированными на В-хромосомах сибирской косули. “*TNNI3K*”, “*LRR1Q3*”, “*FPGT*”, “*FGD5-AS1*”, “*RNPS1*”, “*Arpc2*” – названия генов, располагающихся на хромосоме 3 коровы (по данным UCSC genome browser on Cow Oct. 2011 (Baylor Btau\_4.6.1/bosTau7)).

*Картирование участков ДНК, лежащих на В-хромосомах косули, с помощью ПЦР на библиотеке сортированных добавочных хромосом*

Для уточнения границ дуплицированного участка на добавочных элементах подбирали 40 пар праймеров по геномной последовательности коровы UCSC genome browser on Cow Oct. 2011 (Baylor Btau\_4.6.1/bosTau7). ПЦР проводили с использованием DOP-библиотеки сортированных добавочных хромосом в качестве матрицы. ДНК коровы и ДНК косули с В-хромосомами использовали как контроли. В результате с использованием каждой пары праймеров на всех контрольных матрицах был получен ПЦР-продукт ожидаемого размера. Принимая во внимание полученные данные, а также данные о распределении кДНК и локализации ВАС клонов, мы установили, что участок, расположенный на В-хромосомах, составляет примерно 2 м.п.н. и несет важные функциональные гены: *TNNI3K*, *FPGT* и *LRR1Q3* (Рис.2).

### Оценка копийности генов, присутствующих на добавочных хромосомах сибирской косули

ПЦР в реальном времени проводился для трех разных образцов ДНК сибирской косули с различным числом В-хромосом по трем генам *TNNI3K*, *FPGT*, *LRR1Q3*. В качестве внутреннего стандарта был использован консервативный участок однокопийного гена *PTGFR*. В результате проведенных экспериментов было показано, что копийность генов *FPGT*, *TNNI3K* и *LRR1Q3* коррелирует с числом В-хромосом, хотя их зависимость не всегда является прямой (Рис.3).

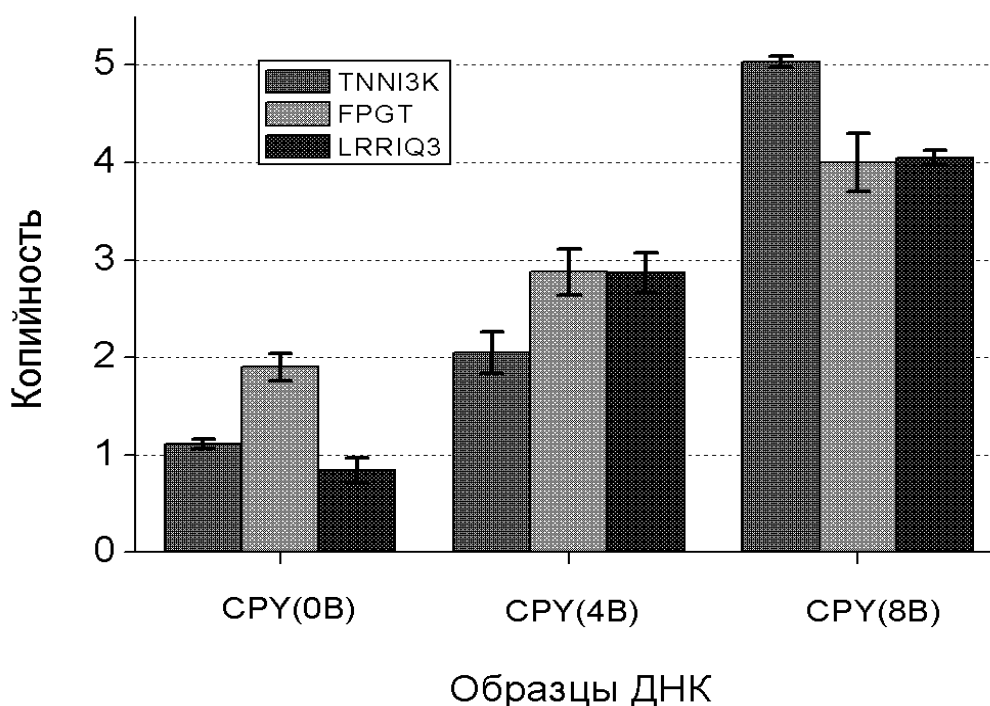


Рисунок 3. Степень копийности генов *TNNI3K*, *FPGT* и *LRR1Q3* относительно однокопийного аутосомного гена *PTGFR*, у сибирской косули (SPY) без В-хромосом (0B), у сибирской косули с 4 В-хромосомами (4B) и 8 В-хромосомами (8B).

## Сравнение первичной структуры гомологичных фрагментов ДНК аутосом и В-хромосом

Мы определили последовательности аутосомных и В-хромосомных копий второго и четвертого экзонов гена *LRRIQ3* длиной 222 п.н. и 153 п.н., соответственно. Последовательности второго экзона гена *LRRIQ3* представлены в геномном банке под номерами: JN871294 и JN871295. Также мы определили аутосомные и В-хромосомные последовательности трех экзонов гена *FPGT* общей длиной 345 п.н. (примечание 1, 2, 3 текста диссертации) и промоторной области гена *TNNI3K* длиной 234 п.н. (JN871289-JN871293). В результате секвенирования мы обнаружили две В-хромосом-специфические замены: во втором экзоне гена *LRRIQ3* (валин 141 на изолейцин141) и во втором экзоне гена *FPGT* (лизин 83 на аргинин 83) (таблица 1).

Таблица 1. Аминокислотные замены, специфичные для В-хромосом.

Источник ДНК / Позиция	кДНК	В	СРУ (0В)	СРУ (8В)	CEL	AAL	MGO	ВТА
141 позиция гена <i>LRRIQ3</i>	<b>I</b>	<b>I</b>	V					V
83 позиция гена <i>FPGT</i>	<b>R</b>	<b>R</b>	K	<b>R</b>	K	K	K	K

“кДНК” – В-хромосом-специфичная кодирующая ДНК. “ВТА” – *Bos taurus*, “СРУ (0В)” – *Capreolus pygargus*, сибирская косуля без В-хромосом, “СРУ (8В)” – *Capreolus pygargus*, сибирская косуля с 8 В-хромосомами, “CEL” – *Cervus elaphus*, “MGO” – *Mazama gouazoubira*, “AAL” – *Alces alces*, “В” – В-хромосомы.

Как видно из таблицы 1, аргинин в 83 позиции гена *FPGT* встречается при секвенировании кДНК, DOP-библиотеки В-хромосом и тотальной ДНК сибирской косули с 8 В-хромосомами. В последнем случае, очевидно, что при секвенировании получается последовательность В-хромосом, поскольку вклад аутосомной компоненты данного района в тотальную ДНК сибирской косули с 8 В-хромосомами ничтожно мал. При секвенировании ДНК сибирской косули без В-хромосом получали последовательность аутосомной ДНК сибирской косули, где в данной позиции был лизин.

Таким образом, данный пример ярко демонстрирует, что обнаруженные нами замены действительно являются В-хромосом-специфичными.

## Оценка эволюционной консервативности генов, локализованных на В-хромосомах

В связи с обнаружением копий генов *FPGT* и *TNNI3K* на добавочных хромосомах оказалось интересным оценить их консервативность в эволюции путем сравнения последовательностей экзонов у косули, лося, марала, мазама и других видов позвоночных. Мы получили последовательность гена *FPGT* у разных видов оленых длиной 1788 п.н. (JN871286-JN871288), а также последовательность промоторной области и первого экзона гена *TNNI3K* (JN871289-JN871293; примечание 4 текста диссертации) общей длиной 345 п.н.

В начале первого экзона гена *FPGT*, в качестве кодона, выполняющего функцию инициации трансляции, выявлен кодон GUG на В-хромосомах у сибирской косули с 4 и 8 В-хромосомами вместо классического стартового кодона AUG, также характерного для сибирской косули без В-хромосом, лося, марала и мазама. Как видно из таблицы 2, валин встречается при секвенировании DOP-библиотеки В-хромосом и тотальной ДНК сибирской косули с 4 и 8 В-хромосомами, тогда как в аутомсомной ДНК, представленной сибирской косулей без В-хромосом встречается метионин. Видно, что валин связан с наличием В-хромосом в геноме и это подтверждает тот факт, что кодон GUG встречается именно на В-хромосомах. В третьем экзоне гена *FPGT*, были обнаружены две аминокислотные замены, характерные для семейства оленых по положению 89 и 104 (таблица 2). В копии четвертого экзона гена *FPGT* было найдено восемь замен в положениях 165, 175, 177, 248, 279, 393, 468 и 589 а.к., специфичных для сибирской и европейской косули (таблица 3).

Таблица 2. Значимые аминокислотные замены, обнаруженные на В-хромосомах и у оленых в трех экзонах гена *FPGT* относительно ряда млекопитающих.

Источник ДНК \ Позиция	кДНК	В	СРУ (0)	СРУ (4, 8)	CEL	AAL	MGO	ВТА	VPA	ECA	HSA	LAF	RNO	CPO	DVI	OAN
1		V	M	V	M	M	M	M	M	M	M	M		M	M	M
89	A	A	A	A	A	A	A	S	S	S	S	S	S	S	S	A
104	E	E	E	E	E	E	E	K	E	K	K	K	E	K	M	K

“кДНК” – В-хромосом-специфичная кодирующая ДНК. “ВТА” – *Bos taurus*, “СРУ (0В)” – *Capreolus pygargus*, сибирская косуля без В-хромосом, “СРУ (4, 8В)” – *Capreolus pygargus*, сибирская косуля с 4 и 8 В-хромосомами, “CEL” – *Cervus elaphus*, “MGO” – *Mazama gouazoubira*, “AAL” – *Alces alces*, “VPA” – *Vicugna pacos*, “ECA” – *Equus ferus caballus*, “HSA” – *Homo sapiens*, “RNO” – *Rattus norvegicus*, “CPO” – *Cavia porcellus*, “LAF” – *Loxodonta africana*, “OAN” – *Ornithorhynchus anatinus*, “DVI” – *Didelphis virginiana*.

Таблица 3. Значимые аминокислотные замены, обнаруженные у оленых в экзоне гена *FPGT* относительно млекопитающих.

Вид / Позиция	CPY (8B)	ССА	CEL	ВТА	VPA	ECA	HSA
165	<b>S</b>	<b>S</b>	T	T	T	T	T
175	<b>T</b>	<b>T</b>	I	I	T	V	I
177	<b>D</b>	<b>D</b>	E	E	E	E	E
248	<b>L</b>	<b>L</b>	F	F	F	F	F
279	<b>S</b>	<b>S</b>	K	K	K	K	K
393	<b>S</b>	<b>S</b>	P	P	P	P	P
468	<b>A</b>	<b>A</b>	T	T	T	T	T
589	<b>M</b>	<b>M</b>	L	L	L	L	L

“ВТА” – *Bos taurus*, “CPY (8B)” – *Capreolus pygargus*, сибирская косуля с 8 В-хромосомами, “ССА” – *Capreolus capreolus*, “CEL” – *Cervus elaphus*, “VPA” – *Vicugna pacos*, “ECA” – *Equus ferus caballus*, “HSA” – *Homo sapiens*.

#### **Обнаружение транскрипционной активности копии гена *FPGT*, расположенного на В-хромосомах**

Поскольку замена во втором экзоне гена *FPGT* (лизин83 на аргинин83) была обнаружена как на В-хромосомах так и в В-хромосом-специфичной кДНК, стало ясно, что копия гена *FPGT* с В-хромосомом транскрибируется. Мы исключили возможность наличия данной мутации в аутомсомной копии гена сибирской косули с помощью генотипирования отдельных хромосом 1 и добавочных хромосом, полученных с помощью микродиссекции. Для исключения возможной гетерогенности добавочных хромосом по данной мутации мы отсековировали десять разных клонов, полученных из библиотеки добавочных хромосом. Таким образом, мы показали, что обнаруженный транскрипт имеет В-хромосомное происхождение.

Другая В-хромосом-специфичная замена (G->A) была обнаружена во втором экзоне гена *LRR1Q3*. Для того, чтобы проверить гипотезу о транскрипционной активности копии этого гена, расположенного на добавочных хромосомах, мы получили последовательность исследуемого нами участка с В-хромосом-специфичной кДНК и тотальной кДНК, выделенной из культуры клеток фибробластов сибирской косули с 8 В-хромосомами. В кДНК и тотальной кДНК в искомой позиции был обнаружен аденин, как и на В-хромосомах. Этот факт говорит в пользу транскрипционной активности гена *LRR1Q3*, расположенного на В-хромосомах. Однако не исключена возможность

того, что данная мутация присутствует в аутосомной копии данного гена. Поэтому необходимы дальнейшие исследования этого района.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Картирование В-хромосом сибирской косули показало, что на добавочных элементах присутствует крупный аутосомный сегмент, содержащий ряд уникальных генов. Эти данные согласуются с результатами, полученными на других видах позвоночных: у лисиц и енотовидных собак, у амазонской моллинезии *Poecilia formosa* (Cyprinodontiforme, Poecillidae) и у эндемичного вида цихлид озера Виктория. Кроме аутосомных копий генов или их фрагментов, на добавочных элементах присутствуют протяженные области, прилегающие к этим генам. Участки, картированные нами на В-хромосомах, имеют значительное сходство с гомологичными участками ДНК аутосом косули. В связи с этим можно заключить, что В-хромосомы представляют собой сегментные дубликации генома. Дублицированные гены на В-хромосомах могут накапливать мутации (как было нами обнаружено в случае фрагмента второго экзона гена *LRRIQ3* и второго экзона гена *FPGT*), что теоретически может приводить к возникновению новых функций этих генов, кроме того, возможно смещение доменов ранее не связанных генов и образование новых комбинаций геномных сегментов. Таким образом, добавочные элементы служат дополнительным источником новых вариантов кодирующих последовательностей и являются “горячими точками” эволюции. Эти данные становятся особенно важными в свете возможности транскрипции новых вариантов генов с В-хромосом. Известно, что сегментные дубликации обладают рядом общих закономерностей. В большинстве случаев сегментные генные дубликации располагаются тандемно. Со временем, дублицированные копии перемещаются в другие районы хромосом. Кроме того, большинство генов дублицируются полностью или частично, представляя собой часть больших дублицированных сегментов. Особенно интересным является то, что гены с частично дублицированным кодирующим районом могут быть функциональными. В нашем случае при оценке копийности одного из экзонов гена *FPGT* у европейской косули без В-хромосом мы обнаружили дубликацию этого экзона. Таким образом, можно предположить, тандемное расположение дублицированных сегментов у европейской косули с последующей интеграцией одного из сегментов в добавочные хромосомы, часто образующиеся при видообразовании, которое в большинстве случаев происходит по районам, содержащим сегментные дубликации.

Гены *TNNI3K*, *FPGT* и *LRRIQ3*, локализованные на добавочных хромосомах, играют важную функциональную роль в жизнедеятельности организма. Известно, что продукт гена *FPGT* участвует в утилизации фукозы - моносахарида, формирующего существенную часть сложных углеводов, гликолипидов и гликопротеинов (Pastuszak et al., 1998). Ген *TNNI3K* участвует в регулировании клеточного роста, пролиферации и дифференциации кардиомиоцитов (Hannigan et al., 1996). В связи с этим, особенно интересным оказалось обнаружение экспрессии копии гена *FPGT*, локализованного на В-

хромосомах и появились весомые доказательства в пользу транскрипционной активности гена *LRRIQ3*. Кроме того, в результате альтернативного сплайсинга генов *FPGT* и *TNNI3K*, могут возникать различные варианты транскриптов, оказывающих то или иное важное влияние на функционирование организма. Однако в первом экзоне гена *FPGT*, в первой аминокислотной позиции на В-хромосомах была выявлена замена метионин<sup>1</sup> на валин<sup>1</sup> относительно рассмотренного ряда позвоночных. Тогда как у европейской косули в этой позиции присутствовал полиморфизм, что может говорить о наличие псевдогена. Триплет GTG, кодирующий валин, в стартовой позиции дублированного гена *FPGT*, расположенного на В-хромосомах, может говорить о низкой степени экспрессии этого гена с добавочных хромосом или об образовании усеченной формы белка (Reddy et al., 1985; Revay et al., 2012).

Секвенирование и сравнение копий генов, представленных на В-хромосомах и аутосомах представителей семейства оленых, показало, что копии генов, локализованные на добавочных хромосомах сибирской косули, имеют высокую степень гомологии с аутосомными копиями лося, марала, мазама и европейской косули. Эти данные говорят о недавнем происхождении добавочных хромосом от хромосомы 1 сибирской косули.

Использованные нами подходы для картирования В-хромосом – локализация ВАС клонов, ПЦР-картирование, ПЦР в реальном времени по отдельности не дают исчерпывающего ответа на вопрос о локализации аутосомных генов на добавочных элементах. Однако применение комплекса сразу нескольких подходов, включающих анализ геномной ДНК и отдельных компонентов генома (В-хромосом и аутосом), а также секвенирование транскриптов, позволяет с уверенностью ответить на вопросы о размере и свойствах дублированных сегментов.

## ВЫВОДЫ

1. Кариотип сибирской косули является очень консервативным и представляет собой сохранившийся предковый кариотип семейства оленых. Кариотипы коровы и сибирской косули разделяются восемью перестройками, из них шесть слияниями хромосом в линии косули, одним слиянием в линии коровы и одной инверсией на хромосоме 11 сибирской косули.
2. В-хромосомы сибирской косули содержат копии аутосомных генов *TNNI3K*, *FPGT* и *LRRIQ3* с прилегающими к ним межгенными областями. Общий размер района, гомологичного участку (74.6 – 76.4 м.п.н.) хромосомы 3 коровы на добавочных элементах составляет около 2 м.п.н.
3. Копийность участков генов *TNNI3K*, *FPGT* и *LRRIQ3* коррелирует с числом В-хромосом.
4. Сравнение генов *TNNI3K*, *FPGT* у оленых относительно ряда млекопитающих показало, что данные гены консервативны
5. Показана экспрессия копии гена *FPGT-TNNI3K*, расположенного на добавочных хромосомах.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Dementyeva P.V.**, Trifonov V.A., Kulemzina A.I., Graphodatsky A.S. Reconstruction of the putative Cervidae ancestral karyotype by chromosome painting of Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*) with dromedary probes // Cytogenet Genome Res. – 2010. – V. 128. – P. 228-235.
2. Трифонов В.А., **Дементьева П.В.**, Беклемишева В.Р., Юдкин Д.В., Воробьева Н.В., Графодатский А.С. Добавочные хромосомы, сегментные дубликации и эволюция // Генетика. – 2010. – № 46. – С. 1234-1236.
3. Trifonov V.A., **Dementyeva P.V.**, Larkin D.M., O'Brien P.C.M., Perelman P.L., Yang F., Ferguson-Smith M.A., Graphodatsky A.S. Transcription of protein-coding genes on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*) // BMC Biology. – 2013. – 11: 90.
4. **Dementyeva P.**, Makunin A., Graphodatsky A., Trifonov V. Genes on B chromosomes of vertebrates // Genetics and Molecular Biology. (in press)
5. Трифонов В.А., **Найденко П.В. (Дементьева П.В.)**, Юдкин Д.В., Воробьева Н.В., Нестеренко А.И., Беклемишева В.Р., Рубцова Н.В., Ларкин Д.В., Фергюсон-Смит М.А., Графодатский А.С. Молекулярная организация В-хромосом сибирской косули // Симпозиум, посвященный 130-летию со дня рождения Левитского Г.А. "Хромосомы и эволюция". 26-27 ноября, 2008. Санкт-Петербург. С.91.
6. Трифонов В.А., **Найденко П.В. (Дементьева П.В.)**, Юдкин Д.В., Воробьева Н.В., Нестеренко А.И., Беклемишева В.Р., Рубцова Н.В., Ларкин Д.В., Фергюсон-Смит М.А., Графодатский А.С. Добавочные хромосомы, сегментные дубликации и эволюция // Сборник трудов Международной конференции "Хромосома 2009". 31 августа-6 сентября, 2009. Новосибирск. С.35.
7. **Дементьева П.В.** Молекулярная организация В-хромосом сибирской косули // Тезисы II Международной научно-практической конференции "Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика". 14-17 ноября, 2011. Новосибирск. С. 33.
8. Trifonov V.A., **Dementyeva P.V.**, Makunin A.I., Larkin D.M., O'Brien P.C.M., Perelman P.L., Yang F., Ferguson-Smith M.A., Graphodatsky A.S. Amplification of genes on mammalian B-chromosomes // The 19<sup>th</sup> international chromosome conference Bologna (Italy). September 2-6, 2013. Bologna, Italy. P.167.