

На правах рукописи



**Бойкова
ТАТЬЯНА ВАЛЕРЬЕВНА**

**СТРУКТУРА ДНК, ЭЛИМИНИРУЕМОЙ
В ХОДЕ ДИМИНИУЦИИ ХРОМАТИНА
У *CYCLOPS KOLENSIS* (CRUSTACEA: COPEPODA)**

ГЕНЕТИКА 03.00.15

**АВТОРЕФЕРАТ
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК**

Новосибирск 2006

Работа выполнена в лаборатории молекулярной цитогенетики
Института цитологии и генетики СО РАН, г.Новосибирск

Научный руководитель: чл.-кор. РАН, доктор биологических наук,
профессор Жимулёв Игорь Федорович
Институт цитологии и генетики СО РАН,
г. Новосибирск

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Высоцкая Людмила Васильевна
Новосибирский Государственный
Университет, г. Новосибирск

доктор биологических наук,
Вершинин Александр Васильевич
Институт цитологии и генетики СО РАН,
г. Новосибирск

Ведущее учреждение: Институт биологии гена РАН, г. Москва

Защита состоится “17” мая 2006 г. на утреннем заседании
диссертационного совета по защите диссертаций на соискание
ученой степени доктора наук (Д-003.011.01) в Институте цитологии
и генетики СО РАН в конференц-зале Института по адресу. 630090,
г.Новосибирск-90, проспект академика Лаврентьева, 10. e-mail:
disssov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
цитологии
и генетики СО РАН.

Автореферат разослан “7” апреля 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук



А.Д.Груздев

2006 А
7715

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Результаты недавних проектов по секвенированию геномов различных видов животных и растений, а также генома человека, подтвердили тот факт, что большую часть генома эукариот составляют некодирующие последовательности ДНК. Однако данное открытие не только не разрешило загадку парадокса размера генома эукариот, так называемый С-парадокс, но поставило перед учеными новые вопросы о функциональной необходимости и роли данной ДНК.

В настоящее время в качестве попытки разрешения этой загадки было предложено одновременно два направления: первое – это сравнение ортологических последовательностей ДНК хорошо изученных и довольно близких видов, второе, развиваемое в настоящей работе, – изучение фрагментов ДНК, элиминируемых в процессе диминуции хроматина (ДХ). Данное явление, хотя и было открыто около 120 лет тому назад, до сих пор слабо изучено методами молекулярной генетики у многоклеточных животных. ДХ является запрограммированным в онтогенезе процессом, в ходе которого происходит необратимая потеря части генетического материала из генома соматических клеток. В связи с этим, ДХ может быть рассмотрена как биологическое явление, при котором клеточный механизм как бы освобождает геномы соматических клеток от избытка ДНК.

В качестве объекта для изучения ДХ и, в частности, структуры элиминируемой ДНК (эДНК) нами был выбран вид *Cyclops kolensis* из московской популяции. Представители семейства Cyclopoidae являются удобными, хотя и довольно трудными объектами. Главной особенностью, определившей перспективность Cyclopoidae, является элиминация огромной доли генома в клетках зародышевого пути (у *C. kolensis* – до 94%) при сохранении исходного числа хромосом (Гришанин и др., 1996). Кроме того, упаковка эДНК в специфические гранулы позволяет экстрагировать образцы данной ДНК для изучения ее молекулярной структуры.

Немецкая исследовательница Сигрид Берман подробно изучила методами цитогенетики различные виды рода *Cyclops* еще во второй половине прошлого столетия. Она показала, что количество элиминируемой ДНК, а также ее расположение в ядрах делящихся клеток видоспецифичны (Beermann, 1977). Однако в литературе встречается достаточно много противоречий в характеристиках процесса ДХ даже у циклопов, отнесенных к одному и тому же виду. Это может быть связано с ошибкой в идентификации видов по морфологическим признакам, которая, в частности, у представителей копепод представляет, как правило, серьезные трудности. Поэтому изучение картины процесса диминуции у *C. kolensis* из байкальской популяции является не только интересным и важным, но и позволяет провести сравнительный анализ двух географически изолированных популяций: московской и байкальской. Это позволило бы ответить и на вопрос, может ли ДХ быть использована в качестве одного из признаков для идентификации видов.

В 1998 г. А.П. Акифьевым было выдвинуто предположение о том, что избыточная ДНК создает уникальный молекулярный портрет генома вида и, таким образом, служит фактором генетической изоляции, препятствуя синапсису гомеологичных хромосом в первом поколении межвидовых гибридов (если таковые могут возникать) (Акифьев и др., 1998). Сравнение геномов *C. kolensis* из московской и байкальской популяций (в первую очередь, размеров тотального и постдиминуционного генома, временной картины протекания процесса диминуции; гомологии последовательностей эДНК) может дать информацию, свидетельствующую в пользу данной гипотезы, либо ее опровергающую.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы было изучение молекулярной структуры последовательностей ДНК, элиминируемых в процессе диминуции у *Cyclops kolensis* (Crustacea: Copepoda), и их сравнительный анализ у представителей двух географически изолированных популяций (московской и байкальской).

В связи с этим были поставлены следующие конкретные задачи:

1. Изучить структуру последовательностей ДНК, элиминируемых в процессе диминуции у *C. kolensis* из московской популяции:
 - а) с помощью метода микродиссекции собрать материал гранул, содержащих эДНК;
 - б) клонировать и определить первичную структуру ДНК, экстрагированной из диминуционных гранул; провести компьютерный анализ структуры последовательностей эДНК.
2. Провести сравнительный анализ структуры последовательностей ДНК постдиминуционного генома *C. kolensis* из московской популяции и эДНК:
 - а) создать клонотеку постдиминуционной ДНК генома *C. kolensis* из московской популяции;
 - б) изучить структуру полученных последовательностей ДНК;
3. Оценить консерватизм структуры генома *C. kolensis* из двух географически изолированных популяций: московской и байкальской:
 - а) исследовать картину ДХ у *C. kolensis* из байкальской популяции, определить стадию деления, во время которой проходит ДХ, продолжительность интерфазы, предшествующей процессу диминуции;
 - б) определить, насколько последовательности эДНК, полученные из диминуционных гранул у *C. kolensis* из московской популяции, являются консервативными: показать с помощью ПЦР анализа присутствие (или отсутствие) данных последовательностей в додиминуционном геноме *C. kolensis* из байкальской популяции и сравнить их нуклеотидный состав.
4. Выявить, удаляются ли полностью во время ДХ последовательности ДНК, полученные из диминуционных гранул.

Научная новизна

Впервые получены последовательности ДНК, элиминируемые из хромосом презумптивных соматических клеток *Cyclops kolensis* (Crustacea: Copepoda) в процессе диминуции хроматина. Проведен компьютерный анализ и выявлены

закономерности в организации данных последовательностей нуклеотидов, свидетельствующие о высокой степени упорядоченности в организации ДНК, ограниченной клетками зародышевого пути.

Впервые проведено сравнительное изучение последовательностей эДНК геномов двух географически изолированных популяций *C. kolensis*: московской и байкальской, обнаружена высокая консервативность данных последовательностей.

Показано, что ДХ может использоваться в качестве одного из важных признаков при определении видов рода *Cyclops* (*Cyclopoidae*), что снимает ряд противоречий между литературными данными относительно корректности идентификации видов

Практическая ценность

Впервые с помощью микродиссекции получена библиотека фрагментов эДНК *Cyclops kolensis*. Определена первичная структура ДНК, экстрагированной из диминуционных гранул, и проведен компьютерный анализ структуры данной ДНК. Последовательности эДНК являются АТ-богатыми и насыщены повторами. Показана мозаичная структура многих повторов и высокая степень гомологии внутри отдельных семейств повторов.

Впервые изучена картина ДХ у *C. kolensis* из байкальской популяции. ДХ происходит во время 4-го деления дробления с сохранением числа хромосом (2n=22), длительность преддиминуционной интерфазы составляет 9-10 часов, как и у *C. kolensis* из московской популяции.

Показано, что, во-первых, 20 из 21 проанализированного фрагмента, полученного из диминуционных гранул *C. kolensis* из московской популяции, присутствуют в геноме *C. kolensis* из байкальской популяции, во-вторых, данные последовательности эДНК не полностью элиминируются во время ДХ и присутствуют в постдиминуционном геноме циклопов из обеих популяций. Изучаемые фрагменты эДНК являются консервативными (90-99% гомологии).

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на международных конференциях в докладах и стеновых сообщениях: на III Международной конференции «Проблема вида и видообразования» (Томск, 2005), 9th International Conference on Copepoda (Hammamet, Tunisia, 2005), 7th International Conference on *Drosophila* Heterochromatin (Gubbio, Italy, 2005), 4-ой Верещагинской Байкальской конференции (Иркутск, 2005).

Публикации

По теме диссертации опубликовано или находится в печати 8 работ.

Объем работы

Диссертация состоит из Введения, Обзора литературы, разделов Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Выводы и списка цитируемой литературы, в который входит 163 ссылки. Работа изложена на 117 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц и 17 рисунков.

Вклад автора

Основные результаты получены автором самостоятельно. Микродиссекция гранул эДНК была проведена совместно с д.б.н. Рубцовым Н.Б. (ИЦиГ, СО РАН) и к.б.н. Гришаниным А.К. (ИОГен, РАН). Работа по секвенированию последовательностей эДНК была проведена автором в лаборатории проф. М. Эшбернера (Университет Кэмбриджа, Англия).

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность член-корр. РАН Жимулову И.Ф. и профессору Акифьеву А.П. за помощь в работе и обсуждении результатов; д.б.н. Рубцову Н.Б. за проведение микродиссекции; проф. М. Эшбернеру за предоставленную возможность провести секвенирование клонов на базе его лаборатории. Особая благодарность директору Лимнологического института СО РАН (г. Иркутск) академику РАН Грачеву М.А. и сотрудникам данного института к.б.н. Мельник Н.Г. и Наумовой Е.Ю. за предоставленную возможность работать и помочь в сборе материала, за взаимное сотрудничество и обучение идентификации некоторых видов рода Cyclops, а также сотрудникам института Общей генетики РАН (г. Москва) к.б.н. Гришанину А.К. и Кетовой Т.А. Автор благодарен всем без исключения сотрудникам лаборатории молекулярной цитогенетики (в особенности к.б.н. Белякину С.Н. и аспирантке Зоткевич Е.А.) за их постоянную помощь.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вид Cyclops kolensis Lilleborg 1901. Самок с яйцевыми мешками, в которых находятся зародыши, собирали в период с 2001 г. по 2005 г. в Марьинском пруду на Воробьевых горах в Москве и в период 2004 – 2005 г.г. в прибрежной части (на глубине 7-10 метров) озера Байкал вблизи стационара Лимнологического института (г. Иркутск) в Больших Котах. Определение проводили по Монченко (Монченко, 1974) (табл. 1).

Анализ нуклеиновых кислот. Все эксперименты, связанные с очисткой и анализом нуклеиновых кислот выполняли методами, изложенными в руководстве Sambrook *et al.*, 1989, с некоторыми модификациями.

Микродиссекцию гранул и создание библиотеки эДНК выполняли по методу, описанному в статьях (Telenius *et al.*, 1992; Rubtzov *et al.*, 1996) с небольшими модификациями (рис. 1).

Флуоресцентную гибридизацию in situ (FISH) и детекцию сигнала (авидин-FITS/биотинилированный антиавидин/авидин-FITS) проводили по стандартным методикам (Lichter *et al.*, 1988; Karamysheva *et al.*, 2001).

Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей ДНК. Для оценки гомологии нуклеотидных последовательностей фрагментов эДНК применяли тест на множественное сравнение (AliBee-MultipleAlignment: http://www.genabee.msu.su/services/malign_reduced.html).

Для поиска мотивов использовали программу MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/website/meme.html>).

Для анализа последовательностей нуклеотидов в ДНК использовали компьютерные программы: DNASIS (Hitachi Software Engineering Co. LTD, 1984, 1989); DNA Strider V 1.2 (CEA); MAR-Finder (Singh *et al.*, 1997) на сервере <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/MarFinder/>; BLAST v.2.0 (Altschul *et al.*, 1997) на сервере <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>.

Все нуклеотидные последовательности полученных фрагментов элиминированной ДНК *Cyclops kolensis* московской популяции зарегистрированы в базе компьютерных данных (GenBank Accession Numbers: AY533039-AY533099).

Таблица 1. Источники получения последовательностей ДНК и сокращенные названия клонов

название клона	полное название клона	дополнительная информация	источник получения последовательностей ДНК
CkD	<i>Cyclops kolensis</i> Drops	последовательности ДНК элиминируемой ДНК	диминуционные гранулы/капли, цитологические препараты ядер во время 5-го деления дробления
gICkM	germ line <i>Cyclops kolensis</i> Moscow	последовательности ДНК из генома до диминуции	яйцевые мешки на стадии 4-8 клеток, <i>C. kolensis</i> из московской популяции
gICkB	germ line <i>Cyclops kolensis</i> Baikal	последовательности ДНК из генома до диминуции	яйцевые мешки на стадии 4-8 клеток, <i>C. kolensis</i> из байкальской популяции
sCkM	somatic <i>Cyclops kolensis</i> Moscow	последовательности ДНК из генома после диминуции	лапки <i>C. kolensis</i> из московской популяции
sCkM	somatic <i>Cyclops kolensis</i> Baikal	последовательности ДНК из генома после диминуции	лапки <i>C. kolensis</i> из байкальской популяции

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение диминуционной ДНК *C. kolensis*

Постдиминуционные гранулы собирали с сухих цитологических препаратов с помощью микроманипулятора. Получение диминуционной ДНК циклопа проводили методом микродиссекции с последующей амплификацией с помощью DOP-PCR. В результате нами были получены фрагменты ДНК длиной 100-1000 п.н. Часть этого материала была помечена биотином и использована в качестве зонда при гибридизации *in situ*, оставшийся продукт был клонирован в плазмидный вектор pGEM-T Easy (Promega). С помощью гибридизации диминуционной ДНК с додиминуционными хромосомами циклопа было показано, что последовательности эДНК присутствуют в большей или меньшей доле во всех хромосомах. Сигналы гибридизации указывают на то, что ДНК, подлежащая удалению, располагается в различных районах хромосом: около теломер, в прицентромерных участках, либо в других районах хромосом, не связанных ни с теломерами, ни с центромерами (рис. 2).

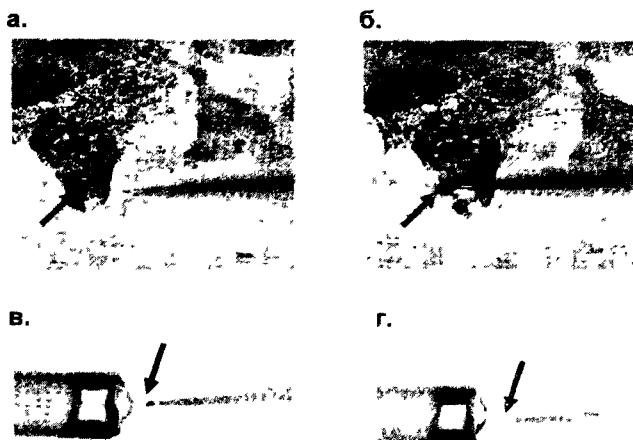


Рисунок 1. Сбор материала гранул с эДНК.

а. Цитологический препарат ядер во время пятого деления дробления (стрелкой указана гранула); б. удаление гранулы стеклянной иглой при помощи микроманипулятора; в. перенос материала гранулы в пипетку Пастера; г. контрольная фотография микроиглы после переноса материала (стрелкой показано отсутствие материала гранулы на кончике иглы).

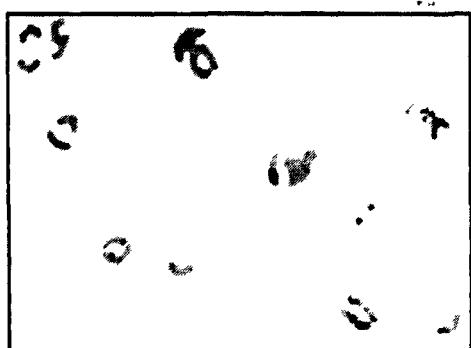


Рисунок 2. Флуоресцентная гибридизация *in situ* материала постдиминуциональных гранул, меченного биотином, с додиминуциональными хромосомами циклопа. Участки, окрашенные черным – места гибридизации элиминированной ДНК с хромосомами.

Общая характеристика последовательностей эДНК

В результате клонирования было получено и секвенировано 90 клонов, длина которых варьировала от 129 до 650 п.н. (средняя длина составила 351 п.н., их общая длина – 31564 п.н.). Данные клоны были названы CkD (*Cyclops kolensis* Drop). При анализе суммарного нуклеотидного состава обращает на себя внимание преобладание АТ-пар (61.1%) по сравнению с GC-парами (соответственно 38.9%). Последовательность нуклеотидов каждого фрагмента была переведена в аминокислотную последовательность во всех шести рамках считывания. Сравнение их с соответствующими банками данных (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>) существенной гомологии не выявило. При сравнении последовательностей нуклеотидов всех 90 фрагментов между собой мы обнаружили, что в полученной клонотеке присутствуют:

- 19 уникальных фрагментов;
- 30 фрагментов, высокогомологичных по нуклеотидному составу (77-96%), но не идентичных на 100%. Мы разделили их на 7 семейств повторов;
- 41 клон входил в состав 8 групп фрагментов ДНК, которые состояли из точных копий:

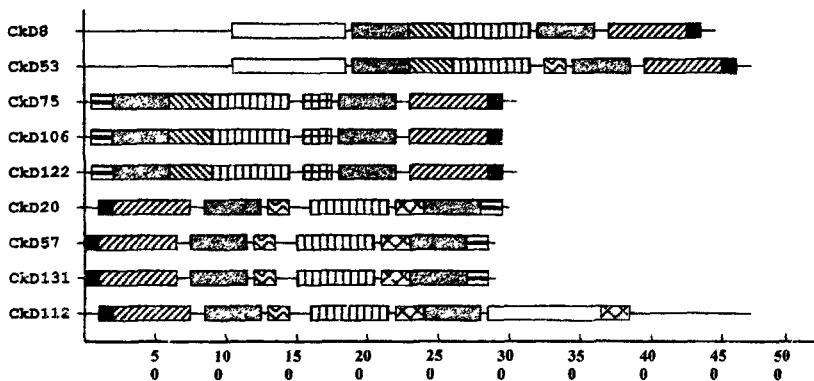
В дальнейшем, анализ последовательностей эДНК мы вели в двух направлениях:

1. Отдельный анализ фрагментов внутри каждого из 7 семейств повторов.
2. Для получения более реального представления о молекулярной сложности эДНК была составлена выборка (S1), в которую вошли все «уникальные» фрагменты и по одному представителю из каждого семейства повторов и фрагментов, имеющих свои точные копии. С одной стороны, это исключает риск того, что программа поиска будет выдавать, прежде всего, мотивы, характерные для семейств повторов, с другой стороны, поскольку один из представителей будет участвовать в поиске с другими фрагментами, то можно ожидать, что мы получим более короткие гомологичные мотивы, присущие всем или, по крайней мере, большинству последовательностей эДНК.

Анализ последовательностей внутри семейств повторов

В полученной нами клонотеке выделено 7 семейств повторов. С помощью компьютерной программы по поиску повторяющихся мотивов (<http://meme.sdsc.edu/meme/website/meme.html>) мы анализировали последовательности данных фрагментов внутри каждого отдельно взятого семейства. В качестве примера рассмотрим первое семейство, включающее в свой состав 9 клонов (рис. 3). Было выявлено 10 мотивов (№1-10) длиной от 11 до 79 п.н. Из них 4 мотива входят в состав последовательностей всех 9 клонов – это мотивы №1 (56 п.н.), №2 (56 п.н.), №3 (41 п.н.), №5 (11 п.н.). Расположение мотивов внутри фрагментов может быть одинаковым, например, мотив №1 во всех клонах находится между мотивами №5 и №3, либо может различаться, например, мотив №2 в клонах CkD 8, 75, 106 и 122

находится между №4 и №9, в клонах CkD 20, 57, 131 и 112 – между мотивами №6 и №7, а в CkD 53 – между №4 и №6.



- [1] - - 56 п.н. - TAGGGAGAGAGTTCTCAAGTTACTCTCCATACACCTAGTTCACTGTAAAT
- [2] - - 56 п.н. - GAGGTCGCAGCATCGGTACACTTCCCTTAATTCAATACTTCCATTCACTCTGTC
- [3] - - 41 п.н. - CTGATGGTTTGAGAGATCCAACAGAACATCCTCCGGCG
- [4] - - 29 п.н. - TTGACACTGGAAGAACATACTAATTGAA
- [5] - - 11 п.н. - GGATCCTACAC
- [6] - - 15 п.н. - CATAAACCGAGGTTRAC
- [7] - - 21 п.н. - TAGTCGGTCTTACCACTCTCA
- [8] - - 79 п.н. - GGCATCTTGTATAGGTCCATCAGSCTTCTTATGACTCCTCAGCCTGGCTATGATA
TGTGGCTTATAGGGGGCTTTC
- [9] - - 20 п.н. - TTICAGAETCAACCTGGTTAT
- [10] - - 15 п.н. - CCCAGAAGGCCCT

Рисунок 3. Мотивы внутри нуклеотидных последовательностей семейства повторов №1 эДНК *C. kolensis*.

Мотивы обозначены прямоугольниками с разной штриховкой. На оси ординат указаны названия клонов эДНК, по оси абсцисс отложено расстояние в п.н.

Таким образом, было показано, что до диминуции хроматина в геноме *C. kolensis* из московской популяции присутствуют высокогомологичные последовательности ДНК, которые в свою очередь состоят из мотивов. Данные мотивы могут быть расположены в одинаковом порядке, однако спейсера между такими мотивами отличаются по длине и нуклеотидному составу.

Анализ выборки S1

В выборку S1 вошли «уникальные» фрагменты и по одному представителю из каждого семейства повторов и фрагментов, имеющих свои точные копии. В результате число клонов, оставленных для дальнейшего анализа, сократилось до 34. Их общая длина составила 10810 п.н., средняя длина – 318 п.н.

При дальнейшем анализе 34 клона выборки S1 тестировали на присутствие внутри каждого отдельно взятого фрагмента гомологичных последовательностей, т.е. повторов. Учитывали повторы длиной от 7 п.н. Обнаружено, что изучаемые 34 фрагмента эДНК *C. kolensis* насыщены довольно короткими прямыми и обратными повторами, длиной от 7 до 40 п.н. Было выявлено, что в составе каждого фрагмента, за исключением пяти клонов (CkD 19, 24, 31, 71, 103), присутствуют от 1 до 6 различных семейств повторов ([d1]–[d71] – нумерация повторов внутри «*dentro*» последовательности отдельно взятого клона; знаком отмечена их ориентация – прямая (+) или обратная (–); цифры между повторами обозначают длину сплайсера в п.н.). Например:

CkD 8: 14-[+d9]-36-[+d9]-93-[+d9]-[+d9]-4-[+d11]-16-[+d10]
132-[-d10]-19-[-d11]-87

[d9] – 11 п.н. – GGCTTATTCCGG

[d10] – 8 п.н. – CTACAAAC

[d11] – 7 п.н. – CAGGCCG

CkD62: 4-[+d49]-12-[+d49]-15-[+d49]-1-[+d48]-2-[+d48]-5-
[d48] – 40 п.н. – CAAGTTTCAGGAGACAGAAATGTCCCACCAAAGTGACAGCA
[d49] – 21 п.н. – GAAAATGTCCCCATGACCAAC

Следующим шагом нашей работы был поиск «общих» мотивов, т.е. мотивов, которые присутствуют во всех или большинстве последовательностях фрагментов эДНК. Во внимание принимались мотивы длиной не менее 15 п.н. Выявлено 10 мотивов (g1-g10 – нумерация «общих» «*generale*» мотивов) длиной от 15 до 31 п.н., которые присутствуют в составе 28 из 34 фрагментов (рис. 4). Особый интерес представляют мотивы g2, присутствующий в 22 копиях в 12 фрагментах; g3 – 17 копий в 13 фрагментах; g8 – 15 копий в 13 фрагментах; g5 и g9 – по 8 копий в 7 фрагментах.

В качестве примера разберем структуру одного клона, принадлежащего семейству повторов №1: CkD8 (рис. 5). Обобщенные результаты анализа показывают, что во фрагменте CkD8 имеются протяженные повторы, сплайсер между повторами 8 и 3 одновременно является повторяющимся мотивом g10, который присущ большинству клонов из выборки S1 и повтором d9, который был обнаружен внутри клона. Сплайсер между повторами 2 и 9 является частью мотива g1, а между 9 и 3 – частью повторяющегося мотива g7.

Таким образом, главным заключением из проведенной части работы являются два факта:

- мозаичная структура многих повторов в додиминуционном геноме;
- высокая степень гомологии внутри отдельных семейств повторов.

CkD18: 173-[-g1]-32-[+g3]-2
CkD30: 33-[+g9]-109-[-g8]-27-[+g8]-23-[-g1]-91
CkD62: 37-[+g4]-15-[+g4]-8-[+g1]-11-[+g1]-14-[+g1]-11-[+g1]-24
CkD55: 99-[-g4]-98-[+g3]-40-[+g5]-146-[-g8]-62
CkD126: 137-[-g3]-8-[+g4]-17-[+g4]-1
CkD3: 25-[+g4]-104-[-g8]-115
CkD44: 143-[+g2]-24-[+g2]-72-[+g2]-52-[+g6]-42-[-g4]-66
CkD116: 31-[+g2]-39-[+g7]-60-[+g7]-15-[+g3]-23
CkD8: 24-[-g2]-7-[+g10]-94-[+g10]-7-[-g7]-57-[-g1]-18-[+g7]-103
CkD93: 12-[+g2]-53-[+g3]-22-[+g10]-117-[+g2]-75-[+g2]-8
CkD7: 66-[-g3]-56-[-g3]-8-[-g10]-20
CkD108: 128-[-g10]-76
CkD31: 85-[-g2]-52
CkD43: 40-[+g3]-82-[-g5]-61-[+g5]-65-[+g8]-160-[+g8]-57-[+g2]-34
CkD97: 90-[-g9]-17-[+g9]-27-[+g8]-90-[-g6]-4-[-g6]-24
CkD133: 68-[-g2]-41-[-g9]-24-[-g2]-8-[-g2]-52-[-g2]-104
CkD134: 2-[-g2]-72-[-g5]-64-[+g8]-11-[-g2]-20
CkD11: 91-[+g3]-83-[+g5]-31-[-g2]-72
CkD42: 24-[-g3]-13-[+g9]-102-[+g3]-77-[-g8]-4-[+g6]-44-[-g5]-75
CkD2: 110-[+g3]-133-[-g2]-5-[+g5]-11-[+g3]-116-[-g2]-32
CkD92: 102-[+g8]-130-[+g3]
CkD47: 100-[+g3]-58-[+g3]-42
CkD29: 32-[-g2]-27-[-g2]-139-[-g8]-55-[+g9]-43
CkD99: 167-[+g5]-33-[-g8]-5
CkD25: 172-[-g2]-51
CkD19: [-g3]-57-[-g9]-71-[-g8]-58
CkD101: 72-[+g9]-76-[+g8]-81-[-g7]-3
CkD24: 66-[+g8]-48

[g1] - 31 п.н. CTGGAGACAGAAATGCCCCACCAAAGTGACAG
 [g2] - 30 п.н. TTGGCCCTCATGTTTTCTGCTTCCCTTTC
 [g3] - 16 п.н. TGGATGATGTGCTTGG
 [g4] - 21 п.н. GAAAATGTCCCCCTGTCCAAAC
 [g5] - 15 п.н. TTTGGAGGCCAAGGC
 [g6] - 20 п.н. TCCTGTGTAGAGATCTGTGG
 [g7] - 31 п.н. ATGGTAATTGTTGGTTGTAGAAAATCAACA
 [g8] - 15 п.н. GAAACTAATTTTGCA
 [g9] - 16 п.н. GTTTTTATTCAAAAGG
 [g10] - 21 п.н. GCTTCCCTGGCTTCCAGGTG

Рисунок 4. Повторяющиеся мотивы, присущие большинству последовательностей изучаемой клонотеки S1 эДНК *C. kolensis*.
 Цифры и буквы внутри квадратных скобок – номера повторов, знаком отмечена их ориентация – прямая (+) или обратная (-). Цифры между блоками обозначают длину спейсера в п.н.

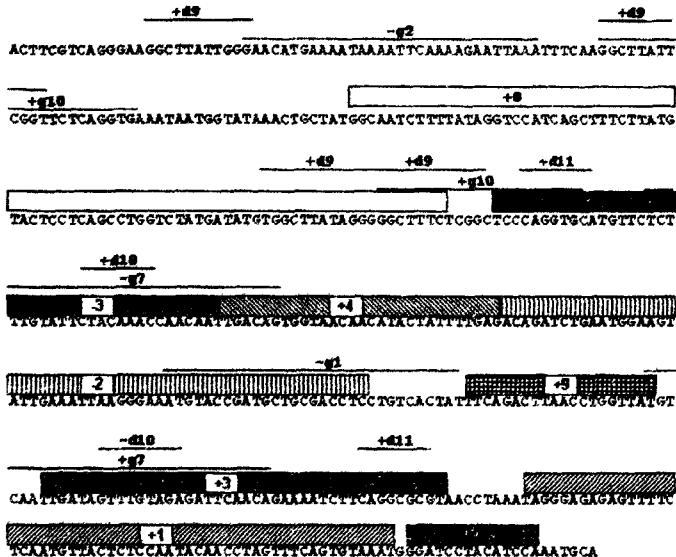


Рисунок 5. Повторяющиеся мотивы в составе фрагмента СкД 8.

Цифрами и буквами обозначены:

1, 2, 3, 5, 8, 9 – мотивы внутри последовательностей семейства повторов №1 (рис. 3);
g1, g2, g7, g10 – мотивы, присущие большинству клонов из выборки S1 (рис. 4);

d9, d10, d11 – повторы внутри исследуемого фрагмента CkD8.

Знаком отмечена их ориентация – прямая (+) или обратная (-)

Общая характеристика и компьютерный анализ последовательностей постдиминуционной ДНК *C. kolensis* из московской популяции

Геномную ДНК соматических клеток выделяли из лапок циклопов, проводили недорестрикцию по сайтам *Sau3A* с последующим клонированием в плазмиду *pBluescript* по сайтам *BamHI*. В результате клонирования было получено и отсеквенировано 48 клонов (названия клонов *sCkM* – somatic *Cyclops kolensis* Moscow). Общая длина последовательностей составила 40387 п.н. (средняя длина – 841 п.н.). При сравнении последовательностей нуклеотидов между собой было показано, что каждый из фрагментов присутствует в данной клонотеке в одном экземпляре. Среднее значение содержания АТ-пар составляет 62.7%. Последовательность нуклеотидов каждого клона была переведена в аминокислотную последовательность во всех шести рамках считывания. После сравнение их с соответствующими банками данных мы выявили, что 11 фрагментов имеют некоторую

гомологию с известными аминокислотными последовательностями, данные клоны были исключены из дальнейшего анализа.

В результате осталось 37 фрагментов, составившие выборку S2 (общая длина – 30013 п.н., средняя длина – 811 п.н.) Как и в случае анализа последовательностей эДНК, фрагменты постдиминуционной ДНК исследовали сначала на предмет наличия повторов внутри каждого отдельно взятого клона и затем проводили поиск общих мотивов, присущих большинству фрагментов. Было показано, что все фрагменты содержат 1-5 семейств прямых и обратных повторов длиной от 7 до 48 п.н. Число повторов составляет в среднем 5 копий на фрагмент, а также было выявлено 15 мотивов длиной от 10 до 138 п.н., присущих большинству фрагментов. Поскольку анализируемые последовательности ДНК соматических клеток почти в 3 раза длиннее, то вполне ожидаемо было получить более протяженные повторы и более высокую копийность. В связи с этим для сравнения нуклеотидных последовательностей двух клонотек на предмет наличия коротких повторов был проведен расчет средних значений на общую длину секвенированных фрагментов и показано, что повторы составляют примерно 27% от общей длины ДНК для элиминируемой ДНК и 21% для постдиминуционной ДНК; соответственно средняя длина повтора для эДНК – 13,2 п.н., для ДНК генома соматических клеток – 15,7 п.н.

Таким образом, сравнительный анализ показал, что структура организации эДНК и некодирующих последовательностей постдиминуционной ДНК в общих чертах сходна, что позволяет нам говорить о том, что изучение ДНК, удаляемой в процессе диминуции, может внести вклад в понимание структуры и роли избыточной ДНК, а сам процесс диминуции служит удобной моделью для исследования этой проблемы. Кроме того, при анализе эДНК мы имеем дело с материалом, о котором точно знаем, что данные последовательности являются «избыточными» для соматических клеток, но не для клеток зародышевого пути.

Сравнительный анализ ДХ у *C. kolensis* из московской и байкальской популяций

Цитологическое исследование зародышей *C. kolensis* из байкальской популяции во время ранних делений дробления показало, что процесс ДХ происходит во время 4-го деления также с последующим уменьшением размеров хромосом, но с сохранением их числа ($2n=22$). Длительность преддиминуционной интерфазы была измерена более чем у 1000 эмбрионов и составила 9-10 часов (табл. 2). Гранулы элиминируемого хроматина в анафазе диминуционного деления в основном располагаются на полюсах веретена деления и лишь небольшая их часть находится в области экватора. Таким образом, основные признаки, характеризующие процесс ДХ у байкальской популяции *C. kolensis* полностью совпадают с таковыми у московской популяции.

Таблица 2. Сопоставление характеристик диминуции хроматина у *Cyclops kolensis* из московской (М) и байкальской (Б) популяций

Характеристика	М	Б
Число хромосом (2n)	22*	22
Длительность интерфаз первых пяти делений дробления:		
• перед 2-м;	70-90 мин*	70-80 мин
• перед 3-м;	70-90 мин*	70-80 мин
• перед 4-м (диминуционным делением);	8-9 час*	9-10 час
• перед 5-м;	50-60 мин*	50-60 мин
• перед 6-м.	50-60 мин*	50-60 мин
Содержание ядерной ДНК (M±m) в клетках:		
• до диминуции;	2,30±0,03**	2,30±0,04**
• после диминуции.	0,15±0,002**	0,085±0,002**
Доля элиминируемой ДНК (%)	93,5%**	96,3%**

Примечание: * – данные из: Гришанин, Акифьев, 1993; Гришанин и др., 1996

** – данные из: Гришанин и др., 2006

Консерватизм структуры генома *C. kolensis* из двух географически изолированных популяций: московской и байкальской

Для проведения ПЦР реакции в качестве матрицы мы использовали геномные ДНК до и после диминуции из особей двух изучаемых нами популяций и праймеры на 21 из 34 (выборка S1) исследованных ранее фрагментов эДНК *C. kolensis* из московской популяции (рис. 6). На остальные 13 последовательностей эДНК праймеры не были подобраны по двум причинам:

1. короткая длина самого исходного фрагмента;
2. содержание на концах протяженных АТ-трактов или повгоров, которые «залипают» сами на себя.

Результаты экспериментов показали что, во-первых, все фрагменты, за исключением СкД 22, присутствуют в геноме *C. kolensis* из байкальской популяции, во-вторых, данные последовательности эДНК не полностью элиминируются во время диминуции хроматина и присутствуют в постдиминуционном геноме циклопов из обеих популяций.

Для достижения большей точности в анализе, мы провели по 3-4 ПЦР реакции в разное время, клонировали продукты ПЦР в плазмиду и взяли на сиквенс по 3-4 клона из каждой реакции. В результате выравнивания 9-12 последовательностей ДНК на каждую матрицу были получены консенсусные последовательности, которые были использованы в дальнейшем сравнительном анализе (рис. 7). Степень гомологии для 20 из 21 фрагмента (СкД 22 отсутствует в геноме циклопов из байкальской популяции) эДНК в геноме представителей двух изучаемых популяций представлены в таблице 3. Полученные результаты показывают, что данные последовательности эДНК являются консервативными.

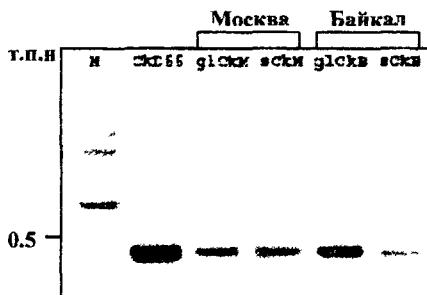


Рисунок 6. Электрофорез ПЦР-продуктов. гlCkM и гlCkB – додиминуционная геномная ДНК, sCkM и sCkB – постдиминуционная геномная ДНК *C. korensis* из московской (CkM) и байкальской (CkB) популяций. Для положительного контроля в качестве матрицы мы брали ДНК клона CkD55. М – маркер молекулярного веса.

CkD55 GGAGGGAGGTGAGGTTGAGGATTGACCAAGGTGTTGGAAGTGTTCAGACAGGGATAGTGT
gICkM GGAGGGAGGTGAGGTTGAGGATTGACCAAGGTGTTGGAATGTTCTTGTAGACAGGGATAGTGT
gICkB GGAGGGAGGTGAGGTTGAGGATTGACCAAGGTGTTGGAAGTGTTCAGACAGGGATAGTGT

CkD55 TTAGTTCACTAGGACACGAGTACACTAGGATGTATGAACAGGGATCAAATTCCACATAGGGGTCA
gICkM TGAGTTCACTAGGACACGAGTACACTAGGATGTATGAACAGGGATCAAATTCCACATAGGGGTCA
gICkB TGAGTTCACTAGGACATGAGTACACTAGAATGTAAGAACAGGGATCAAATTCCACATAGGGGTCA

CkD55 TCTTAACACATATGTTCTTCTTGAAAGGATAAAGTTTCTGTTATGGATCCAA
gICkM TGTTAACACATATGTTCTTCTTGAAAGGATAAAGCTTCCAAAATTTCCTCTGTTATGGATCCAA
gICkB TGTTAACACATATGTTCTTCTTGAAAGGATAAAGCTTCTAAAATTTCCTCTGTTATGGATCCAA

CkD55 GCTGGCTGTTAACAGTTGGTAATTTCGTGTGAAGGCCAAAGTCGTCAATTCTGACCTTGGTCCAA
gICkM GCTGGCTGTTAACATTGGTAATTTCGTGTGAAGGCCAAAGTCGTCAATTCTGACCTTGGTCCAA
gICkB GCTGGTTGTTAACATTGGCAATTTCGTGTGAAGGCCAAAGTCGTCAATTCTGACCTTGGTCCAA

CkD55 TTGATTGGCTGCCAGCCTTTGATGAGAGTTCTTGCCCAGATTTTGTTTCTTGCACACT
gICkM TTGATTGGCTGCCAGCCTTTGATGAGGTTTGTTGCCAGAGTTTGTTTCTTGCACACT
gICkB TTGATTGGCTGCCAGCCTTTGATGAGGTTTGTTGCCAGAGTTTGTTTCTTGCACACT

CkD55 TTCTTGTAGAGATGCCCATGTTGGCATTCACTTCAGATGCCCTCTTACTCCTTTGCTTT
gICkM TTCTTGTAGAGATGCCCATGTTGGCATTCACTTCAGATGCCCTCTTACTCCTTTGCTTT
gICkB TTCTTGCAGAGATGCCCATGTTGGCATTCACTTCAGATGCCCTCTTACTCCTTTGCTTT

CkD55 TGAAATCGAGTTTGAGAGCATCCAAACCCGC
gICkM TGAAATCGAGTTTGAGAGCATCCAAACCCGC
gICkB TGAAATCGAGTTTGAGAGCATCCAAACCCGC

Рисунок 7. Сравнительный анализ консенсусов последовательностей ДНК, присутствующих в додиминуционном геноме *C. korensis* из московской (gICkM) и байкальской (gICkB) популяций, с фрагментом эДНК CkD55. Жирным шрифтом с подчеркиванием выделены отличающиеся нуклеотиды.

Таблица 3. Гомология между последовательностями нуклеотидов для фрагментов эДНК в додиминуционных геномах *C. kolensis* из московской и байкальской популяций

Номер фрагмента	Степень гомологии (в%)	Номер фрагмента	Степень гомологии (в%)
CkD 2	96.4	CkD 43	94.9
CkD 3	91.6	CkD 44	98.7
CkD 7	90.3	CkD 55	97.3
CkD 8	97.5	CkD 62	94.7
CkD 11	96.8	CkD 71	92.7
CkD 18	93.4	CkD 92	95.4
CkD 25	98.1	CkD 93	98.1
CkD 29	96.8	CkD 108	98.3
CkD 30	97.6	CkD 116	96.2
CkD 42	92.7	CkD134	95.9

Это означает, что несмотря на огромное число поколений, прошедших между разделением *C. kolensis* на московскую и байкальскую популяции (не менее 25 млн.), данные последовательности успешно противостояли факторам естественного мутационного процесса. В 1998 г. А.П. Акифьевым было выдвинуто предположение о том, что «избыточная» для соматических клеток ДНК создает уникальный молекулярный портрет генома вида и, таким образом, служит фактором генетической изоляции. Сравнение московской и байкальской популяций *C. kolensis*, свидетельствует в пользу данной гипотезы.

Выводы

1. Впервые получены и охарактеризованы последовательности ДНК, элиминируемые (эДНК) в процессе диминуции хроматина из хромосом презумптивных соматических клеток *Cyclops kolensis* московской популяции. Выявлены следующие закономерности:
 - последовательности эДНК являются АТ-богатыми;
 - среди фрагментов обнаружены семейства повторов;
 - каждый фрагмент содержит в своем составе от 1 до 6 семейств коротких повторов с высокой гомологией внутри семейств;
 - между фрагментами найдены гомологичные мотивы, присущие большинству фрагментов;
 - с помощью гибридизации *in situ* показано, что вырезаемые последовательности локализованы в самых различных районах хромосом.
2. Впервые изучена картина диминуции хроматина у *C. kolensis* из байкальской популяции. Показано, что ДХ происходит во время 4-го деления дробления с сохранением числа хромосом (2n=22), длительность преддиминуционной интерфазы составляет 9-10 часов. Сопоставление характеристик ДХ у *C. kolensis* из московской и байкальской популяций

подтверждает предположение о том, что ДХ может быть использована в качестве одного из важных признаков при идентификации видов рода *Cyclops*.

3. Показано, что 20 из 21 проанализированного фрагмента эДНК, полученного из диминуционных гранул *C. kolensis* из московской популяции, присутствуют также и в додиминуционном геноме *C. kolensis* из байкальской популяции. Данные последовательности эДНК являются консервативными (90-99% гомологии).
4. Выявлено, что последовательности эДНК не полностью удаляются во время ДХ и присутствуют в постдиминуционном геноме циклопов из обеих популяций. Структура эДНК и некодирующих последовательностей постдиминуционной ДНК в общих чертах сходна.

Публикации

1. Degtyarev S., Boykova T., Grishanin A., Belyakin S., Rubtsov N., Karamysheva T., Makarevich G., Akifyev A., and Zhimulev I. The molecular structure of the DNA fragments eliminated during chromatin diminution in *Cyclops kolensis*// Genome Research. 2004. V. 14. N. 11. P. 2287-2294.
2. Акифьев А.П., Бойкова Т.В., Гришанин А.К., Зоткевич Е.А., Жимулев И.Ф. Диминуция хроматина у циклопов как модель эволюционного преобразования геномов// Эволюционная биология. Томск. 2005. Т. 3. С. 133-144.
3. Boykova T., Grishanin A., Shekhovtsov S., Melnik N., Naumova E., Akifyev A., Zhimulev I. Chromatin diminution in *Cyclops kolensis*// A 9th International Conference on Copepoda. 2005. P. 206.
4. Boykova T., Zotkevich E., Grishanin A., Melnik N., Naumova E., Akifyev A., Zhimulev I. On the chromatin diminution in Cyclops// A 7th International Conference on Drosophila Heterochromatin. 2005. P. 84.
5. Зоткевич Е.А., Бойкова Т.В., Гришанин А.К., Акифьев А.П., Жимулев И.Ф. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей элиминируемой ДНК *Cyclops kolensis* и геномной ДНК *Cyclops insignis*// Вестник Томского государственного университета. 2005. №4. С.47.
6. Гришанин А.К., Зоткевич Е.А., Бойкова Т.В., Наумова Е.Ю., Мельник Н.Г., Акифьев А.П., Жимулев И.Ф. Диминуция хроматина как фактор генетической изоляции видов рода *Cyclops*// Материалы 4-ой Верещагинской Байкальской конференции. 2005. С. 60.
7. Гришанин А.К., Шеховцов С.В., Бойкова Т.В., Акифьев А.П., Жимулев И.Ф. Проблема диминуции хроматина на рубеже XX и XXI веков// Цитология. 2006. №5 (в печати).
8. А.К. Гришанин, Т.В. Бойкова, Т.Л. Маршак, Н.Г. Мельник, Е.Ю. Наумова, М.В. Загоскин, А.П. Акифьев, И.Ф. Жимулев Консерватизм структуры генома в двух популяциях *Cyclops kolensis* (Copepoda, Crustacea), обитающих в прудах г. Москва и о. Байкал// ДАН. 2006. Т. 408. №5 (в печати).

Подписано к печати 22.03.2006
Формат бумаги 60 x 90. Печ. л. 1. Уч. изд. л. 0,7
Тираж 100 экз. Заказ 44

Ротапринт Института цитологии и генетики СО РАН
630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10.

2006A
7715

7-7715