

Бойкова Татьяна Валерьевна

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

Межлабораторный семинар

Научный руководитель:
член-корр. РАН, д.б.н.,
проф. Жимулев И.Ф.

1. Нет прямой зависимости между сложностью организации вида животных и количеством генетического материала, которым он обладает (Mirsky, Ris, 1951).

2. Различие размеров геномов близких видов, часто не обладающих по отношению друг к другу какими-либо адаптивными преимуществами (Moriyama et al., 1998) .

- сравнение ортологичных последовательностей ДНК хорошо изученных и довольно близких видов;

- изучение фрагментов ДНК, элиминируемых в процессе диминуции хроматина.

**Диминуция хроматина –
запрограммированный
в онтогенезе процесс,
в ходе которого происходит
необратимая потеря
части генетического материала
из генома соматических клеток.**

Cyclops kolensis (Crustacea: Copepoda)



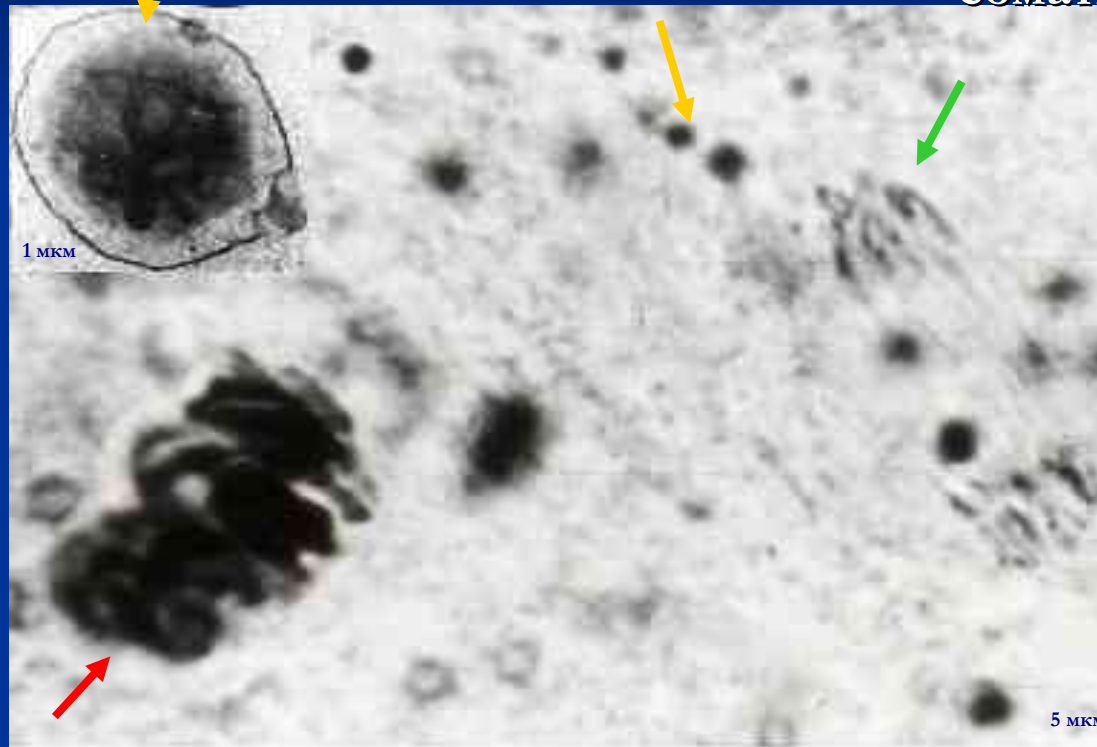
- доля элиминированной ДНК составляет 94%;
- сохраняется исходное число хромосом;
- эДНК упаковывается в специфические гранулы.

Хромосомы и гранулы с эДНК у *S. kolensis* (из: Акифьев, Гришанин, 1993).

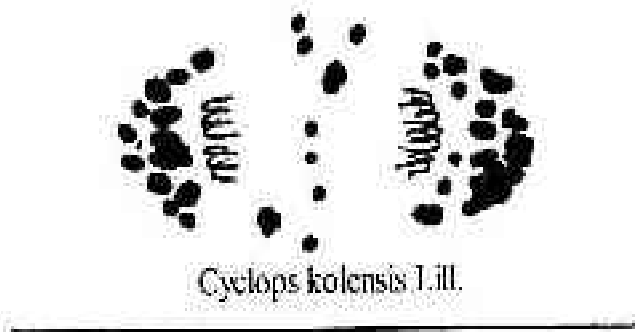
гранула с эДНК

гранула с эДНК

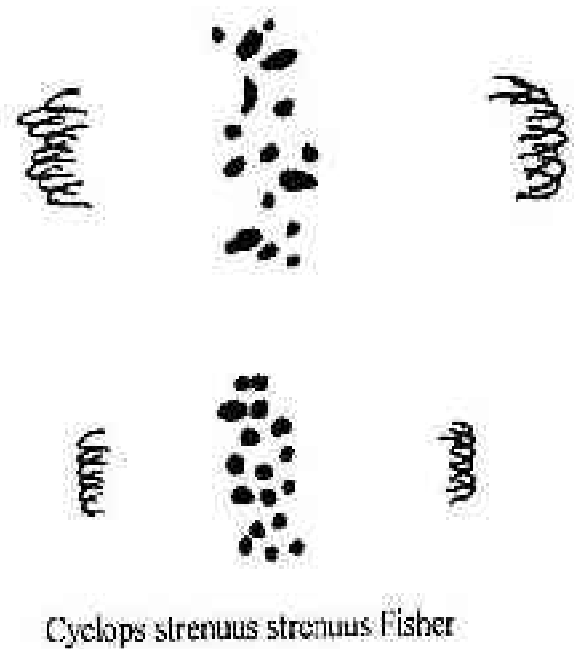
хромосомы
соматических клеток



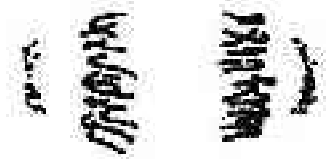
хромосомы в клетке
зародышевого пути



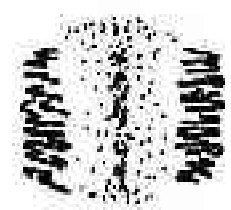
Cyclops kolensis Lill.



Cyclops strenuus strenuus Fisher



Cyclops strenuus strenuus Fisher (According S. Baermann)



Cyclops kolensis Lill. (According U. Einsle)

Figure 1. Localization of eliminated chromatin in presomatic cells of *Cyclops kolensis* Lill. And *Cyclops strenuus strenuus* (according to Ghirshman & Akif'ev, 1993).

Figure 2. Localization of eliminated chromatin in presomatic cells of *Cyclops strenuus strenuus* Fisher (according to Baermann, 1977) and *Cyclops kolensis* Lill. (according to Einsle, 1996b).

Вид	Размер генома; до/после ДХ 1С (пг)	Гаплоидный набор хромосом	Деление, во время которого происходит ДХ	Ссылка
<i>C.strenuus</i>	2.2/0.9	11	5	Beermann, 1977
	0.72/0.18	12	5	Grishanin <i>et al.</i> , 1994
<i>C.insignis</i>	н.д.	н.д.	5	Einsle, 1993
	2.1	11	отсутствует	Grishanin <i>et al.</i> , 2004

Примечание: н.д. — нет данных.

Цель работы:

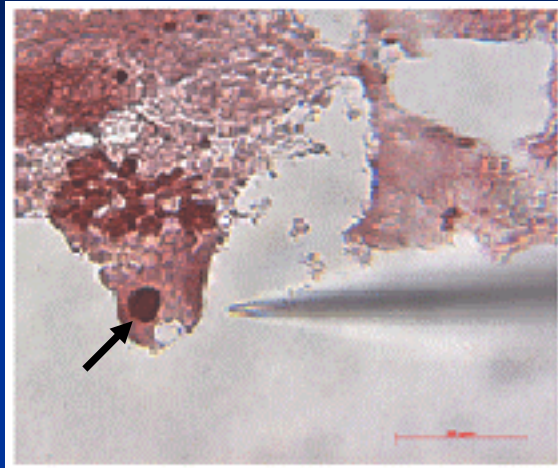
изучение молекулярной структуры последовательностей ДНК, элиминируемых в процессе диминуции у *Cyclops kolensis* (Crustacea: Copepoda), и их сравнительный анализ у представителей двух географически изолированных популяций (московской и байкальской).

Задачи работы:

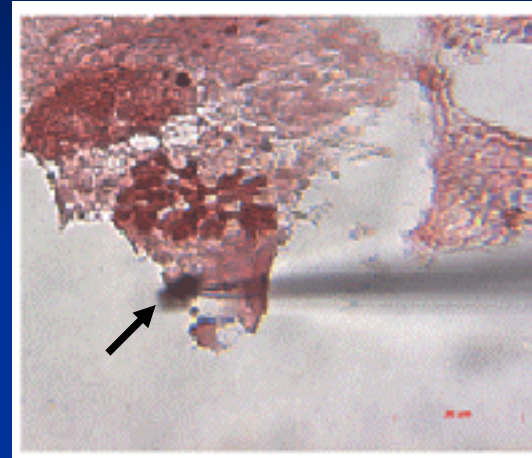
1. Изучить структуру последовательностей ДНК, элиминируемых в процессе диминуции у *S. kolensis* из московской популяции.
2. Провести сравнительный анализ структуры некодирующих последовательностей ДНК генома соматических клеток *S. kolensis* и эДНК.
3. Оценить консерватизм структуры генома *S. kolensis* из двух географически изолированных популяций: московской и байкальской.
4. Выявить, удаляются ли полностью из генома презумптивных соматических клеток последовательности ДНК, полученные из диминуционных гранул.

Сбор материала гранул с эДНК.

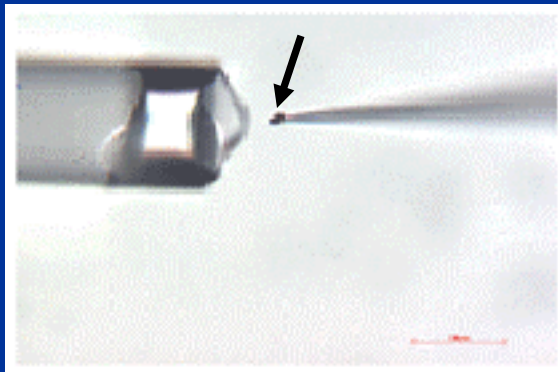
а.



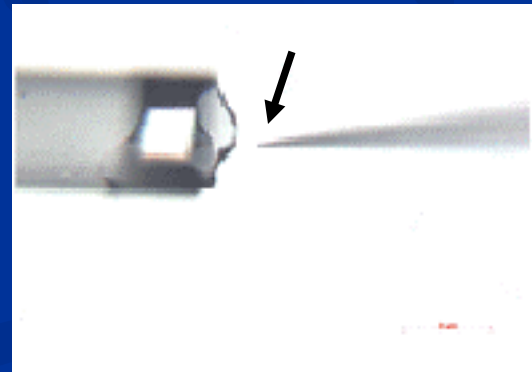
б.



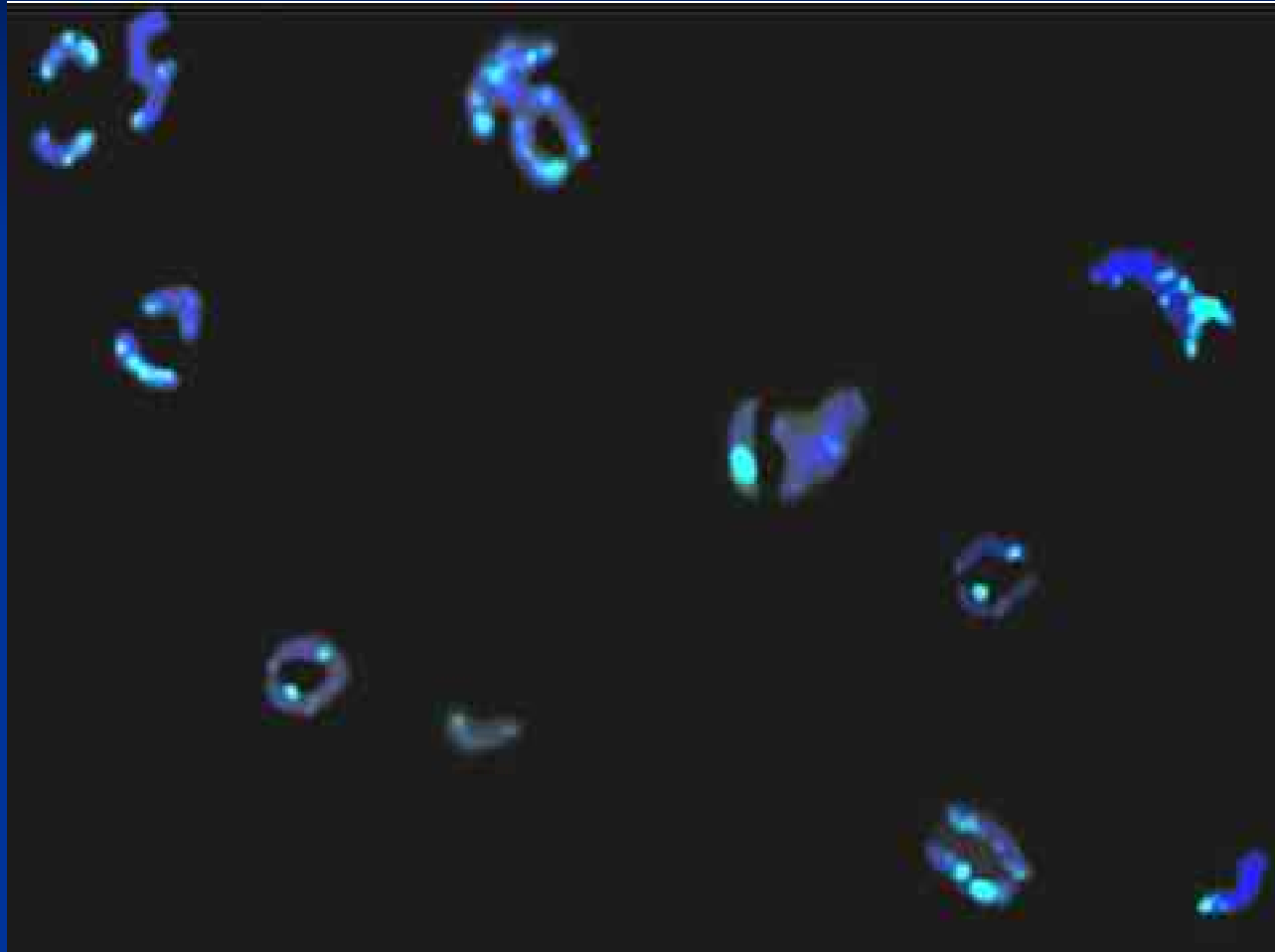
в.



г.



Флуоресцентная гибридизация *in situ* материала постдиминуционных гранул, меченного биотином с додиминуционными хромосомами *S. kolensis*.



Общая характеристика последовательностей эДНК.

Кол-во клонов	Минимальная длина фрагмента, п.н.	Максимальная длина фрагмента, п.н.	Общая длина, п.н.	АТ-пары, %
90	129	650	31564	61,1

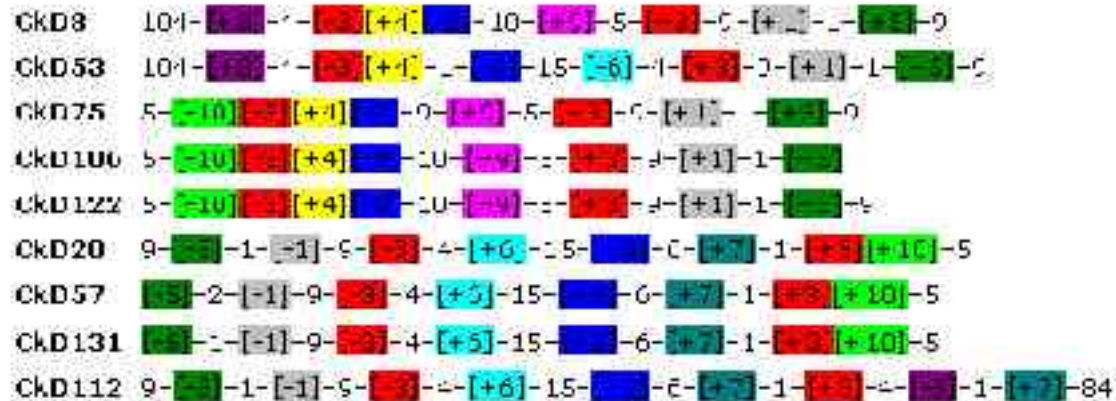
Последовательность нуклеотидов каждого фрагмента была переведена в аминокислотную последовательность во всех шести рамках считывания (сравнение их с соответствующими банками данных существенной гомологии не показало).

-19 уникальных фрагментов;

-30 фрагментов, высокомонологичных по нуклеотидному составу (77-96%), были разделены на 7 групп повторяющихся последовательностей;

-41 клон входил в состав 8 групп фрагментов ДНК, которые состояли из точных копий.

Повторяющиеся мотивы внутри семейства повторов №1 эДНК *S. kolensis*.



[-1] - 56 л. н. - TAGGAGAGAGAGTTTCTCAAGGCTACTCTCCCAATACAAACCTACTCTC
AATGTAAAGT

[5] - 56 л. н. - GAGGTCCAGCAGCATCGATACACTTCACCTAACTCCAAATACCTCCACTC
AGATCTCTTC

[9] - 41 л. н. - CTGATGGTCTGTAGAGATCCAAACAGAACATCCCTCCGGGGG

[4] - 29 л. н. - TTGACAGTGTATAGAAACAATACTATTCTTA

[5] - 11 л. н. - CCAATCCAGAC

[6] - 1 л. н. - CATAACCAAGTCAAC

[7] - 21 л. н. - TAGGTGTATCTTAAATCTTCTCA

[9] - 79 л. н. - GGCATCTGTATATAGGTCATCCAGCTTTCTCAAGTCTCTTCAGCCT
GGGCTATGATATGCTTCTTATAGGAGCCTTC

[9] - 20 л. н. - TTCAGACTCAACCTGGTAT

[10] - 1 л. н. - CCAAGAAAAGCCTCT

Показаны следующие закономерности в организации нуклеотидных последовательностей эДНК:

- каждый фрагмент содержит в своем составе от 1 до 6 семейств коротких повторов (от 7 до 40 п.н.);

N клина ClD	диаграмма повторов	нуклеотидная последовательность повторов
2	15- [d3] -19- [d3] -17- [d3] -20- [-d3] -18- [+d3] -2- [+d3] -47- [+d3] -17- [d3] -10- [d3] - 42- [+d3] -9- [+d3] -1- [-d3] -38- [+d3] -41	[d3] - GCAT&CATAG&CGATGTGTCCGCCGC [-d3] - GGCTGGAGAGG [d3] - CTC&T&C&GAT
43	4- [d18] -23- [d18] -88- [+d18] -88- [+d18] -7- [+d18] -50- [+d18] -45- [+d18] -52- [+d18] -82	[d18] - TG&&ATG&ATG&CAA&ATG&ATG [d18] - CCTTTTTCAGCA&TCCC
47	37- [-d21] -7- [-d21] -5- [+d21] -7- [+d21] -64- [+d21] -37	[d21] - CTC&T&CTT>G&ATG

- обнаружены
повторяющиеся
мотивы, присущие
большинству
последовательностей
эДНК.

GkD18: 1*3-[-g1]-32-[-g2]-2
GkD30: 33-[+g9]-109-[-g8]-27-[+g6]-23-[-g1]-91
GkD62: 07-[+g1]-18-[+g4]-8-[-g1]-11-[+g1]-14-[+g1]-11-[-g1]-24
GkD55: 99-[+g4]-98-[-g2]-40-[+g5]-146-[-g6]-62
GkD125: 127-[-g3]-8-[+g4]-7-[+g4]-1
GkD5: 23-[+g4]-104-[-g8]-115
GkD44: 143-[+g2]-24-[-g2]-72-[+g2]-52-[+g6]-42-[-g4]-66
GkD115: 31-[+g2]-39-[-g2]-60-[-g2]-15-[-g3]-23
GkD8: 24-[-g2]-7-[+g10]-94-[+g10]-7-[-g2]-57-[-g1]-18-[-g2]-102
GkD93: 12-[-g2]-33-[-g2]-22-[+g10]-117-[+g2]-73-[+g2]-8
GkD7: 66-[-g2]-56-[-g2]-8-[-g10]-20
GkD103: 128-[-g10]-75
GkD51: 83-[-g2]-32
GkD43: 40-[-g2]-82-[-g5]-61-[+g5]-55-[+g8]-160-[+g8]-57-[+g2]-34
GkD97: 90-[-g9]-17-[+g9]-27-[+g8]-20-[-g6]-4-[-g6]-24
GkD133: 68-[-g2]-41-[-g9]-24-[-g2]-3-[-g2]-52-[-g2]-104
GkD134: 2-[-g2]-72-[-g4]-64-[+g6]-11-[-g2]-20
GkD11: 91-[-g2]-82-[+g5]-91-[-g2]-72
GkD42: 24-[-g2]-13-[+g9]-102-[-g2]-77-[-g8]-4-[+g5]-44-[-g5]-75
GkD2: 110-[+g9]-133-[-g2]-5-[+g5]-11-[-g9]-116-[-g8]-32
GkD92: 102-[+g8]-123-[-g2]
GkD47: 100-[+g9]-58-[-g2]-42
GkD29: 32-[-g2]-27-[-g2]-135-[-g6]-53-[+g9]-42
GkD99: 127-[+g5]-90-[-g8]-5
GkD25: 1*2-[-g2]-51
GkD19: [-g2]-57-[-g9]-71-[-g8]-58
GkD101: 70-[+g9]-76-[+g8]-91-[-g2]-3
GkD24: 66-[+g6]-48

Повторяющиеся мотивы в составе фрагмента SkD 8.



- мозаичная структура многих повторов в геноме клеток зародышевого пути;
- высокая степень гомологии внутри отдельных семейств повторов.

Общая характеристика последовательностей постдиминуюционной ДНК.

Кол-во клонов	Минимальная длина	Максимальная длина	Общая длина,	АТ-пары, %
48	фрагмента, п.н. 150	фрагмента, п.н. 1345	п.н. 4038	62,7

7

- все фрагменты уникальные;
- 11 фрагментов обладают гомологией с известными аминокислотными последовательностями.

1. 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.

2. Кроме того, при анализе эДНК мы имеем дело с чистым материалом, данные последовательности являются «избыточными» для соматических клеток.

Сопоставление характеристик диминуции хроматина у *S. kolensis* из московской и байкальской популяций.

Характеристика	Московская популяция	Байкальская популяция
Число хромосом (2n)	22*	22
Длительность интерфаз первых пяти делений дробления: <ul style="list-style-type: none"> ● перед 2-м; ● перед 3-м; ● перед 4-м (диминуционным делением); ● перед 5-м; ● перед 6-м. 	70-90 мин* 70-90 мин* 8-9 час* 50-60 мин* 50-60 мин*	70-80 мин 70-80 мин 9-10 час 50-60 мин 50-60 мин
Содержание ядерной ДНК ($M \pm m$) в клетках: <ul style="list-style-type: none"> ● до диминуции; ● после диминуции. 	2,30±0,03 0,15±0,002	2,30±0,04 0,085±0,002
Доля элиминируемой ДНК (%)	93,5%	96,3%

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

**Электрофорез фрагментов ДНК,
полученных в результате ПЦР реакции
для двух клонов эДНК: СkD55 (А) и СkD22
(Б).**



Присутствие (+) / отсутствие (-) фрагментов эДНК
 в геномах до- и после диминуции *S. kolensis* из
 московской и байкальской популяций.

№ фрагмента	sCkM	glCkV	sCkV	№ фрагмента	sCkM	glCkV	sCkV
2	+	+	+	43	+	+	+
3	+	+	+	44	+	+	+
7	+	+	+	47	+	+	+
8	+	+	+	55	+	+	+
11	+	+	+	62	+	+	+
18	+	+	+	71	+	+	+
22	+	-	-	92	+	+	+
25	+	+	+	93	+	+	+
29	+	+	+	108	+	+	+
30	+	+	+	116	+	+	+
42	+	+	+	134	+	+	+

Сравнительный анализ консенсусов нуклеотидных последовательностей для фрагмента СkD55.

```
СkD55  GGAAGCAAGTTGAGGTTGAGGATTGACCAAGAGGTGTTGAGAGCGTTCCTTCTGAGAGCCAGGATAGTGTTTAGTTGAGTAGGACACGAGTAC
g1СkM  GGAAGCAAGTTGAGGTTGAGGATTGACCAAGAGGTGTTGAGAGCGTTCCTTCTGAGAGCCAGGAGTGTGTTTGAGTTGAGTAGGACACGAGTAC
g1СkB  GGAAGCAAGTTGAGGTTGAGGATTGACCAAGAGGTGTTGAGAGCGTTCCTTCTGAGAGCGAGGAGGATAGTGTTTGAGTTGAGTAGGACACGAGTAC

СkD55  AСТАGGATTGATGAAACAGGGATTCAAAATTTCCATAGGGGATAGGGGATGATGATTTTCTTCTGAAAGGATAGGTTTTCAAAAT
g1СkM  AСТАGGATTGATGAAACAGGGATTCAAAATTTCCATAGGGGATAGGGGATGATGATTTTCTTCTGAAAGGATAGGTTTTCAAAAT
g1СkB  AСТАGGATTGATGAAACAGGGATTCAAAATTTCCATAGGGGATAGGGGATGATGATTTTCTTCTGAAAGGATAGGTTTTCAAAAT

СkD55  TTTCCTTCTCTTATGGAATCAAGGCTGGCTGTTTAAACAGTTCGTAATTTGTTTGGGAAGGCTCAGAGTCCGTAATTTGTTGTTAGTTTCGCAATT
g1СkM  TTTCCTTCTCTTATGGAATCAAGGCTGGCTGTTTAAACATTTGTAATTTGTTTGGGAAGGCTCAGAGTCCGTAATTTGTTGTTAGTTTCGCAATT
g1СkB  TTTCCTTCTCTTATGGAATCAAGGCTGGCTGTTTAAACATTTGTAATTTGTTTGGGAAGGCTCAGAGTCCGTAATTTGTTGTTAGTTTCGCAATT

СkD55  CGATTTCCTTCGCCAATTCCTTCCGATACATGCTGCTTCCAGACATTTTCCTTCCTTTCGCCACATTCCTTCAGACATTCCTTCACCTCTTC
g1СkM  CGATTTCCTTCGCCAATTCCTTCCGATACATGCTGCTTCCAGACATTTTCCTTCCTTTCGCCACATTCCTTCAGACATTCCTTCACCTCTTC
g1СkB  CGATTTCCTTCGCCAATTCCTTCCGATACATGCTGCTTCCAGACATTTTCCTTCCTTTCGCCACATTCCTTCAGACATTCCTTCACCTCTTC

СkD55  GCATTCAAGTTGAGGATTGAGGATTGACCAAGAGGTGTTGAGAGCGTTCCTTCTGAGAGCCAGGATAGTGTTTAGTTGAGTAGGACACGAGTAC
g1СkM  GCATTCAAGTTGAGGATTGAGGATTGACCAAGAGGTGTTGAGAGCGTTCCTTCTGAGAGCCAGGATAGTGTTTAGTTGAGTAGGACACGAGTAC
g1СkB  GCATTCAAGTTGAGGATTGAGGATTGACCAAGAGGTGTTGAGAGCGTTCCTTCTGAGAGCCAGGATAGTGTTTAGTTGAGTAGGACACGAGTAC
```

Примечание: СkD55 – фрагмент эДНК;
g1СkM – московская популяция;
g1СkB – байкальская популяция.

Гомология между последовательностями нуклеотидов для фрагментов эДНК в додимируционных геномах *S. kolensis* из московской и байкальской популяций.

Номер фрагмента	Процент гомологии	Номер фрагмента	Процент гомологии	Номер фрагмента	Процент гомологии
CkD 2	97.0	CkD 29	96.8	CkD 71	92.7
CkD 3	91.6	CkD 30	97.6	CkD 92	95.4
CkD 7	90.3	CkD 42	99.5	CkD 93	98.1
CkD 8	97.5	CkD 43	94.9	CkD 108	98.3
CkD 11	95.7	CkD 44	98.7	CkD 116	96.2
CkD 18	93.4	CkD 55	97.3	CkD134	95.9
CkD 25	98.1	CkD 62	94.7		

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.

Апробация работы:

- III Международная конференция «Проблема вида и видообразования» (Томск, 2005);
- 9th International Conference on Copepoda (Hammamet, Tunisia, 2005);
- 7th International Conference on Drosophila Heterochromatin (Gubbio, Italy, 2005);
- 4-ая Верещагинская Байкальская конференция (Иркутск, 2005).

Публикации по теме диссертации:

1. Degtyarev S., **Бойкова Т.**, 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. **Бойкова Т.**, 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. **Бойкова Т.**, 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., Жимулёв И.Ф. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей элиминируемой ДНК *Cyclops kolensis* и геномной ДНК *Cyclops insignis* // Вестник Томского государственного университета. 2005.
6. Гришанин А.К., Зоткевич Е.А., **Бойкова Т.В.**, Наумова Е.Ю., Мельник Н.Г., Акифьев А.П., Жимулёв И.Ф. Диминуция хроматина как фактор генетической изоляции видов рода *Cyclops* // Материалы 4-ой Верецагинской 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. (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. (в печати).

Автор выражает глубокую признательность:

руководителю:

член-корр. РАН Жимулеву И.Ф. (ИЦиГ СО РАН)



д.б.н. Рубцову Н.Б.
к.б.н. Карамышевой Т.В.
к.б.н. Белякину С.Н.
аспирантке Зоткевич Е.А.

д.б.н. Акифьеву А.П.
к.б.н. Гришанину А.К.
Кетовой Т.А.



академику РАН Грачеву М.А.
к.б.н. Мельник Н.Г.
н.с. Наумовой Е.Ю.

проф. М. Эшбернеру (Университет Кэмбриджа, Англия);
Межинститутскому центру секвенирования ДНК