

ГЕНЫ ГОРМОНА РОСТА У РЫБ: ДОКАЗАТЕЛЬСТВА  
ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ ПАРАЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ  
У ГОЛЬЦА *Salvelinus levanidovi*

© 2015 г. Д. Н. Каменская<sup>1</sup>, М. В. Панькова<sup>2</sup>, Д. М. Атопкин<sup>2, 3</sup>, В. А. Брыков<sup>1, 2\*</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук,  
Владивосток, 690041

<sup>2</sup>Дальневосточный федеральный университет, Школа естественных наук, Владивосток, 690012

<sup>3</sup>Биологический институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток 690022

Поступила в редакцию 26.01.2015 г.

Принята к печати 19.02.2015 г.

Геном большинства позвоночных содержит одну копию гена гормона роста, в то время как у лососевых в результате одного из этапов дупликации многие гены оказались множественными, в том числе и ген гормона роста. В геноме лососевых ген гормона роста представлен двумя несвязанными паралогичными генами, *gh1* и *gh2*. С целью выяснения возможной функциональности генов *gh1* и *gh2* гольца *Salvelinus levanidovi* и выявления различий между ними в настоящей работе проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей этих генов и прилежащих к ним участков. Оба гена содержат по шесть экзонов (I–VI) и пять инtronов (A, B, C, D, E), но имеют разную длину. Показано, что экзоны у двух паралогичных генов имеют одинаковый размер, а различия в общей длине обусловлены разной длиной инtronов. Кодирующие последовательности обоих генов содержат открытую рамку считываания для белка из 210 аминокислотных остатков. В промоторной области выявлены регуляторные элементы – ТАТА-бокс, А/Т- богатые участки, содержащие сайты связывания с гипофиз-специфичным фактором транскрипции Pit-1, а также участки, ответственные за взаимодействие с другими активаторами и инициаторами транскрипции, в частности, с рецепторами гормонов. Полученные данные свидетельствуют о функциональности обоих генов.

**Ключевые слова:** гены гормона роста, структура, *Salvelinus levanidovi*, регуляторные участки, сайты связывания с факторами транскрипции.

FISH GROWTH HORMONE GENES: FUNCTIONALITY EVIDENCE OF PARALOGOUS GENES IN LEVANIDOV CHARR *Salvelinus levanidovi*, by D. N. Kamenskaya<sup>1</sup>, M. V. Pankova<sup>2</sup>, D. M. Atopkin<sup>2, 3</sup>, V. A. Brykov<sup>1, 2</sup>, \* (<sup>1</sup>Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far Eastern Division, Russian Academy of Science, Vladivostok, 690041 Russia; \*e-mail: vlbrykov@mail.ru; <sup>2</sup>Far Eastern Federal University, School of Natural Sciences, Vladivostok, 690012 Russia; <sup>3</sup>Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Division, Russian Academy of Science, Vladivostok, 690022, Russia). In the genome of most vertebrates growth hormone gene is presented in a single copy, while in salmonids after one of the duplication events many genes were multiplied, including growth hormone gene. In salmonids growth hormone gene exists as two unrelated functional paralogous genes, *gh1* and *gh2*. In the present work, comparative analysis of growth hormone genes *gh1* and *gh2*, and adjacent sequences in Levanidov's charr *Salvelinus levanidovi* was performed for determining their functionality and potential differences. The genes structure is the same, both contain six exons (I–VI) and five introns (A, B, C, D, E) but differ in length. The exons comparison showed that the size of each exon in two paralogous genes is identical, and the total length of genes differs due to varying lengths of introns. The coding sequence of both genes contain an open reading frame for 210 amino acids. Regulatory elements were identified in the promoter region of both genes – TATA box, A/T-rich regions containing binding sites, pituitary-specific transcriptional activator Pit-1, regions responsible for interaction with other transcriptional activators and initiators, in particular – hormone receptors. The obtained data indicate that both genes are functional.

**Keywords:** growth hormone genes, *Salvelinus levanidovi*, regulatory regions, transcription factors binding sites.

DOI: 10.7868/S0026898415050092

Принятые сокращения: *gh1* и *gh2* – гены гормона роста 1 и 2 соответственно, Pit-1 – гипофиз-специфичный фактор транскрипции, CRE – элемент ответа на cAMP, GRE – элемент ответа на глюкокортикоиды, RAR/RXR – рецептор ретиноевой кислоты, ERE – элемент ответа на эстрогены.

\* Эл. почта: vlbrykov@mail.ru

Дупликации генов играют важную роль в эволюции. Как правило, дуплицированные или амплифицированные копии генов находятся под меньшим давлением отбора, накапливают изменения с более высокой частотой и со временем могут приобретать новые функции.

Ген гормона роста в геноме млекопитающих и птиц обычно представлен одной копией, хотя возможны и исключения [1–3]. Структура генов гормона роста у рыб типична для позвоночных и включает шесть экзонов и пять инtronов [4–8], реже встречаются гены с пятью экзонами и четырьмя инtronами [9–11]. У многих видов рыб ген гормона роста представлен двумя несвязанными функциональными паралогичными генами, *gh1* и *gh2* [12–14].

Лососевые представляют собой уникальную группу рыб, которая сформировалась в результате события автотетраплоидизации и последующей дивергенции. Таким образом, лососевые являются естественными и относительно недавними полиплоидами [15]. Как следствие, многие гены у представителей этой таксономической группы оказались множественными, в том числе и представленный двумя копиями ген гормона роста [5, 16–20]. Нами проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов *gh1* и *gh2* и прилежащих к ним участков у гольца *Salvelinus levanidovi* для выяснения их возможной функциональности и различий между ними.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали одну особь одного из видов гольцов северо-западной части Тихого Океана – гольца Леванидова (*S. levanidovi*), полученную из коллекции лаборатории генетики ИБМ ДВО РАН.

**Амплификацию ДНК** проводили в 25 мкл реакционной смеси, включающей 20–50 нг суммарной ДНК, 2.5 мкл 10-кратного буфера для Таq-полимеразы (60 мМ Трис-НCl pH 8.5, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 25 мМ KCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0.1% Тритон X-100), 2.5 мкл смеси четырех dNTP (2.5 мМ каждого), по 2.0 мкл каждого праймера (2.5 мКМ), 1.5 ед. Таq-полимеразы (“СибЭнзим”, Россия) и денионизованную воду. Кодирующую область генов гормона роста амплифицировали с использованием пяти пар специфических праймеров, разработанных в лаборатории (табл. 1). ПЦР с праймерами GH1-1/GH1R1 и GH1F4/GH1-2 проводили по схеме: начальная денатурация (94°C, 5 мин), 35 циклов (94°C, 30 с; 51°C, 1 мин; 72°C, 1 мин) и достройка цепей (72°C, 5 мин). ПЦР с праймерами GH1F2/GH1R2, GH1F3/GH1R3, GHtf1/GHtr1 проводили в других условиях: 94°C, 5 мин; 35 циклов (94°C, 1 мин; 55°C, 1 мин; 72°C, 1 мин), 72°C, 5 мин. Каждая пара праймеров обеспечивала амплификацию двух фрагментов ДНК, соответствующих генам *gh1* и *gh2*. Фрагменты двух генов, полученные с праймерами GH1-1/GH1R1, имели сходный размер. Промоторные области генов *gh1* и *gh2* амплифицировали с использованием пары

**Таблица 1.** Нуклеотидные последовательности праймеров для амплификации генов *gh1* и *gh2*

№	Область гена	Праймеры	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'
1	Кодирующая область	GH1-1 GH1R1	TCATCCTTGGCAATTAAGAGTA CAGCCAGGTTACTTACTGAAC
2		GH1F2 GH1R2	GACTTCTGTAACCTCCGACTC GTTCCTGACTATGAGGCTGT
3		GH1F3 GH1R3	GTCTGATTGAATCCTGGGAG GGAAACCCGTTGCACTTAAT
4		GH1F4 GH1-2	CAACCATGTCTGTCACTAAC GTTCTGGTAGTAGTTCCCGTAG
5		GHtf1 GHtr1	AAGCAAATATTGATATGCACAC CCTAATCTGTATATGGGAAACC
6	Промотор	GHpf2 GHpr	TGATGATAACAAGACCCGTGTC TGGTACACTGACTCCCCACT
7		GH2pf1 GH2pr1	TGTCATCTACAGTACCCACAGCG TGGCACTAAATTACTTGTTCACTC
8	Терминатор	GH1tf2 GH1tr22	GTTCATTGATCAAGACTGTTCC GTAGAGGTCTGTGAATTTAGG
9		GH2tf GH2tr	CAAGACTGGTCTCGAGAAAGTC TCCAAGGGACACAATAGGAATGTT

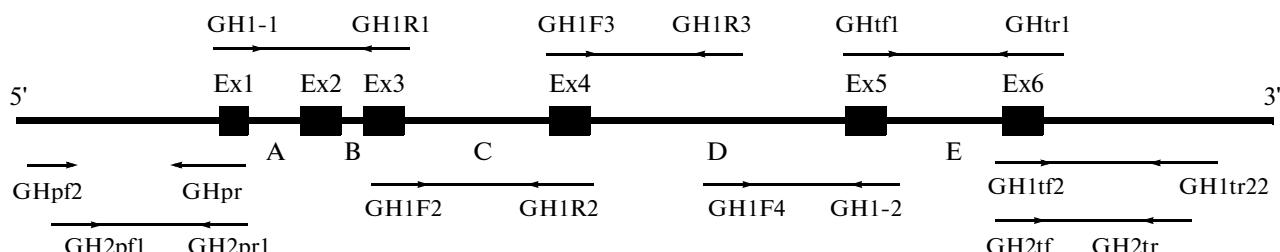


Рис. 1. Стратегия амплификации и секвенирования генов *gh1* и *gh2* *S. levanidovi*.

праймеров, GHpf2/GHpr и GH2pf1/GH2pr1 соответственно (табл. 1). ПЦР проводили по следующей схеме: начальная денатурация (94°C, 5 мин), 35 циклов (94°C, 1 мин; 55°C, 1 мин; 72°C, 1 мин) и достройка цепей (72°C, 5 мин). Область терминатора амплифицировали с использованием праймеров GH1tf2/GH1tr22 и GH2tf/GH2tr для генов *gh1* и *gh2*, соответственно, при следующих условиях: 94°C, 5 мин; 35 циклов (94°C, 1 мин; 60°C, 1 мин; 72°C, 1 мин), 72°C, 5 мин. Продукты амплификации разделяли в 1.2%-ном агарозном геле, вырезали и использовали для клонирования и секвенирования.

**Молекулярное клонирование.** Схема клонирования и секвенирования генов *gh* приведена на рис. 1. Фрагменты ДНК лигировали с помощью набора для клонирования CloneJET™ PCR Cloning Kit ("Fermentas") согласно инструкции изготовителя. Компетентные клетки *Escherichia coli*, предварительно охлажденные при 4°C (30 мин), трансформировали рекомбинантной ДНК методом теплового шока (42°C, 1 мин). Трансформанты инкубировали в течение 1 ч при 37°C в 1 мл жидкой среды Лурия–Бертани (среда LB) и высевали на твердую LB-среду, содержащую 50 мг/мл ампциллина.

Искомые рекомбинантные молекулы ДНК отбирали по результатам определения размера фрагментов, встроенных в векторную молекулу. Для этого проводили ПЦР-анализ клеточных колоний с праймерами, комплементарными нуклеотидной последовательности вектора. Продукты ПЦР разделяли в 1.2%-ном агарозном геле и осаждали этанолом. Концентрацию очищенной вставки определяли методом электрофореза в агарозном геле.

**Секвенирование.** Нуклеотидные последовательности фрагментов генов *gh1* и *gh2* (рис. 1)

определяли с помощью набора реактивов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1 ("Applied Biosystems", США) по методике производителя. Использовали праймеры, входящие в состав CloneJET™ PCR Cloning Kit. Реакцию проводили в следующих условиях: начальная денатурация (96°C, 1 мин), 26 циклов (96°C, 10 с; 55°C, 10 с; 60°C, 4 мин). Последовательности нуклеотидов определяли на автоматическом секвенаторе ABI 3130 xl ("Applied Biosystems") на Кафедре клеточной биологии и генетики ДВФУ. Сборку нуклеотидных последовательностей осуществляли в пакете программ SeqScape V.2.6 ("Applied Biosystems"). Анализ нуклеотидных последовательностей и множественное выравнивание проводили с помощью пакета программ MEGA-5.0 [21].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Анализ кодирующей области паралогичных генов

Определены полные нуклеотидные последовательности двух генов гормона роста – *gh1* и *gh2* – голода *S. levanidovi* (KF772974.1, KF772978.1), включающие структурную часть (экзоны и интроны), а также 3'- и 5'-прилежащие области. Длина транскрибуемых последовательностей генов *gh1* и *gh2* составила 3672 и 3299 п.н. соответственно. Оба гена состоят из шести экзонов (I–VI) и пяти инtronов (A, B, C, D, E). Показано, что размер каждого экзона в двух паралогичных генах одинаков и составляет 74, 140, 117, 156, 147 и 63 п.н. соответственно. Различия в общей длине генов определяются длиной инtronов (табл. 2). Различия в длине инtronов возрастают в направлении от 5'- к 3'-концу генов.

Кодирующая область генов *gh1* и *gh2* соответствует белку-предшественнику из 210 аминокис-

Таблица 2. Длина инtronов генов *gh1* и *gh2* *Salvelinus levanidovi*

Ген	Инtron, п.н.				
	A	B	C	D	E
<i>gh1</i>	455	136	721	1043	620
<i>gh2</i>	463	123	623	1168	225

лотных остатков. Открытая рамка считывания гена *gh1* начинается кодоном ATG и заканчивается стоп-кодоном TAG. Открытая рамка считывания гена *gh2* также начинается кодоном ATG, но заканчивается стоп-кодоном TAA. Аминокислотный состав двух гормонов роста *S. levanidovi*, выведенный по нуклеотидной последовательности, практически не отличается и включает 27 кислых, 32–33 основных, 77 неполярных, 111 полярных остатков.

В обоих генах выявлена лидерная транскрибируемая, но нетранслируемая последовательность длиной 64 п.н. У генов *gh1* и *gh2* *S. levanidovi* она отличается тремя нуклеотидными заменами. Транслируемая последовательность первого экзона (10 п.н.) включает первые три кодона и первый нуклеотид четвертого кодона сигнального пептида, она идентична в обоих генах. Второй экзон включает последние два нуклеотида четвертого кодона и остальные нуклеотиды, кодирующие 18 аминокислотных остатков сигнального пептида, а также аминокислоты 1—28 зрелого белка. Экзоны III, IV, V, VI кодируют аминокислотные остатки 29—67, 68—119, 120—168, 169—188 соответственно. Нуклеотидная последовательность экзона II отличается шестью нуклеотидными заменами, две из которых приводят к изменению аминокислотной последовательности (одна в сигнальном пептиде и одна в зрелом белке). В экзонах III–VI двух генов выявлены шесть, пять, семь и четыре нуклеотидные замены соответственно. Нуклеотидные замены в экзонах III и IV приводят к трем аминокислотным заменам. Аминокислотные последовательности, кодируемые экзоном V генов *gh1* и *gh2*, отличаются одной заменой. Нуклеотидные замены в шестом экзоне не изменяют аминокислотную последовательность.

Всего при сравнении кодирующих последовательностей генов *gh1* и *gh2* *S. levanidovi* выявлено 30 замен нуклеотидов (9 трансверсий, 21 транзиция), из которых три находятся в лидерной области (две трансверсии, одна транзиция).

Сигнальные пептиды отличаются одним аминокислотным остатком, а зрелые белки – восьмью. Лишь три мутации приводят к аминокислотным заменам в зрелом пептиде с изменением общего заряда: гистидин в положении 61 меняется на глутамин, треонин в положении 119 – на лизин, и глутамин в положении 135 – на гистидин (табл. 3).

При анализе кодирующих последовательностей генов *gh1* и *gh2* выявлены различия в частоте кодонов. Ряд триплетов, используемых в одном гене, не используется в другом. Так триплеты CTA, ACG, GCG, CGT и GGA, кодирующие лейцин, треонин, аланин, аргинин и глицин, соответственно, присутствуют в гене *gh1*, но не в *gh2*. Триплеты TCG, GCA, GGT, кодирующие серин, аланин и глицин, наоборот, присутствуют в гене *gh2*, но не в *gh1*.

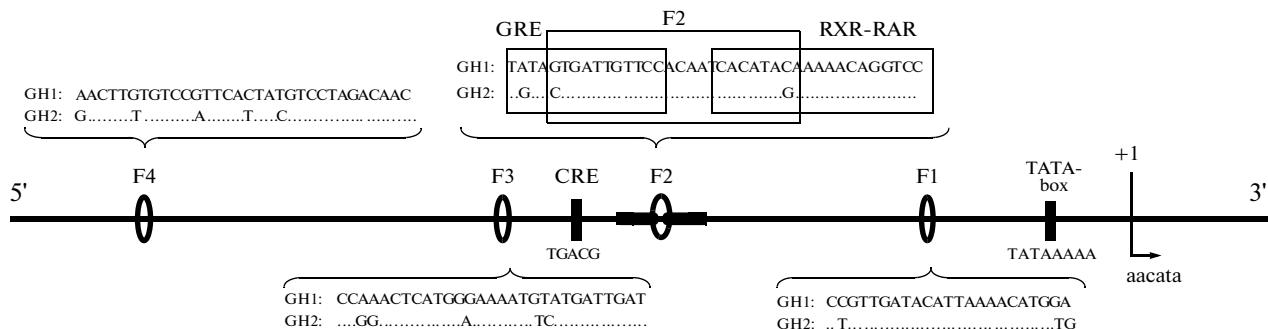
#### *Анализ регуляторных областей генов gh1 и gh2*

Нами определены нуклеотидные последовательности 5'- и 3'-концевых участков паралогичных генов *gh1* и *gh2* *S. levanidovi* и проведено их сравнение. Длина 5'-концевого участка генов *gh1* и *gh2* составила 1197 и 1172 п.н., соответственно, но в настоящей работе мы сравниваем только фрагмент из 300 п.н., непосредственно прилежащих к гену. Длина проанализированной 3'-концевой последовательности у обоих генов равна 590 п.н.

В результате анализа полученных нами данных и их сравнения с опубликованными структурами промоторов генов гормона роста других видов лососевых рыб найдены предположительно функци-

**Таблица 3.** Аминокислотные замены в продуктах генов *gh1* и *gh2* *S. levanidovi* (положение замен в зрелом белке указано без учета сигнального пептида)

Гормон роста	Экзон	Положение замены, аминокислотные остатки	<i>gh1</i>		<i>gh2</i>	
			триплет	аминокислота	триплет	аминокислота
Сигнальный пептид	2	8	TTG	Leu	ATG	Met
Зрелый белок	2	20	ATG	Met	CTG	Leu
	3	30	GTT	Val	GGC	Gly
	3	34	CCT	Pro	TCT	Ser
	3	61	CAC	His	CAG	Gln
	4	90	ACC	Thr	GCC	Ala
	4	96	ATA	Ile	ATG	Met
	4	119	ACG	Thr	AAG	Lys
	5	135	CAG	Gln	CAT	His



**Рис. 2.** Схема расположения сайтов связывания (F1–F4) с гипофиз-специфичным фактором транскрипции Pit-1; элементов ответа на cAMP (CRE) и глюкокортикоиды (GRE); рецептора ретиноевой кислоты (RAR/RXR); и эстрогенчувствительного элемента (ERE) в промоторе генов гормона роста *Salvelinus levanidovi*.

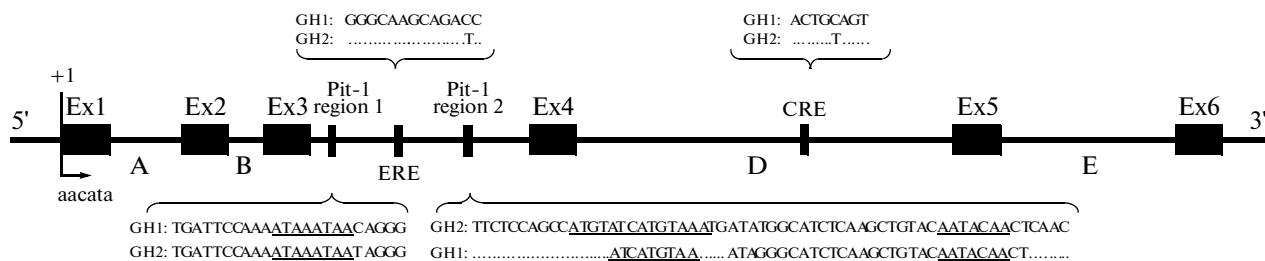
ционально значимые области. В обоих генах-паралогах выявлен ТАТА-бокс, характерный для большинства эукариотических генов, и расположенный в положении –22 п.н. от точки инициации транскрипции. Эта последовательность консервативна в обоих генах. В обоих генах на всем рассмотренном прилежащем участке не обнаружен другой часто встречающийся в эукариотических генах элемент – CAAT-бокс.

В промоторной области найдены и другие регуляторные элементы, выявленные ранее при изучении промотора гена гормона роста радужной форели *Oncorhynchus mykiss* [22, 23]. К ним относятся А/Т-богатые участки, содержащие сайты связывания гипофиз-специфичного фактора транскрипции Pit-1 [24], а также участки, ответственные за взаимодействие с другими активаторами и инициаторами транскрипции, в частности с гормонами. За взаимодействие промотора с фактором транскрипции Pit-1 отвечают четыре сайта связывания: F1–F4. Известно, что для экспрессии гена гормона роста достаточно только сайта F1 в промоторной области, но для большей эффективности транскрипции необходимы и другие F-сайты, расположенные дальше от точки инициации транскрипции [22, 23].

Последовательность сайта F1 в промоторе генов *gh1* и *gh2* *S. levanidovi*, расположенного в положении –39/–61, достаточно консервативна и отличается лишь тремя нуклеотидными заменами (рис. 2). Изменения локализованы во фланкирующих областях сайта и не затрагивают его коровую часть. Сайты связывания F2, расположенные в положениях –118/–140 и –117/–139 п.н. в генах *gh1* и *gh2*, соответственно, отличаются двумя нуклеотидными заменами (рис. 2). Третий сайт (F3) находится в положении –155/–183 в гене *gh1* и –153/–181 п.н. в *gh2*, а четвертый (F4) – в –264/–295 п.н. гена *gh1*. В свою очередь, в гене *gh2* границы F4 сайта смешены на 2 п.н. – –266/–297 п.н. Сайты F3 и F4 в генах *gh1* и *gh2* содержат больше нуклеотидных замен, чем F1 и F2 (рис. 2).

Помимо ТАТА-бокса и Pit-1-сайтов в промоторах генов гормона роста лососевых найдены так называемые элементы ответа – участки, вовлеченные в регуляцию транскрипции в присутствии тех или иных факторов. В промоторе гена гормона роста радужной форели *O. mykiss* обнаружены элементы ответа на cAMP (CRE) и глюкокортикоиды (GRE) [22, 23]. CRE содержит либо асимметричный TGACG-мотив, либо симметричный (палиндромный) TGACGTCA-мотив [25]. Консенсусная последовательность GRE представляет собой несовершенный инвертированный повтор GGTACAnnnTGTTCT. При этом правая часть повтора – гексануклеотид TGTTCT – гораздо более консервативна, чем левая [26]. Рецептор глюкокортикоидов связывается с GRE в виде гомодимера. При этом с каждым из гексануклеотидов инвертированного повтора взаимодействует одна молекула рецептора [27]. Эти элементы ответа также представлены в промоторе генов гормона роста у *S. levanidovi* (рис. 2). Последовательность асимметричного CRE-элемента (TGACG) в генах *gh1* и *gh2* идентична и располагается между сайтами F2 и F3 на расстоянии –148/–152 и –147/–151 п.н. от точки инициации транскрипции соответственно. Элемент GRE находится в участке –130/–144 в гене *gh1* и –129/–143 в *gh2*.

У чавычи (*Oncorhynchus tshawytscha*) и атлантического лосося (*Salmo salar*) выявлен сайт связывания с рецептором ретиноевой кислоты (RAR/RXR) [28]. Рецептор ретиноевой кислоты, гомодимер (RXR/RXR) или гетеродимер (RAR/RXR), связывается с элементами ответа на ретиноиды (RARE и RXRE), которые состоят обычно из двух прямых повторов (AGGTCA), разделенных пятью или двумя нуклеотидами [29]. Этот сайт представлен также в промоторе обоих генов гормона роста гольца – в положениях –105/–124 и –106/–125 п.н. у *gh1* и *gh2* соответственно. Сайт связывания RAR/RXR и GRE-элемент частично перекрываются с обеих сторон с F2-сайтом (рис. 2).



**Рис. 3.** Схема расположения AT-богатых участков, содержащих сайты связывания с гипофиз-специфичным фактором транскрипции Pit-1, CRE- и ERE-элементов в интронах генов гормона роста *Salvelinus levanidovi*.

Интересно, что некоторые элементы ответа обнаружаются не только в регуляторной области, но и внутри гена, в частности в интронах. Так, в четвертом интроне генов *gh1* и *gh2* *S. levanidovi* – в положении +2471/+2478 и +2471/+2478 п.н., соответственно, выявлен элемент CRE, представленный также в интроне D генов гормона роста атлантического лосося и чавычи [28]. В отличие от CRE в промоторе, “интронный” CRE является палиндромом (ACTGCAGT) (рис. 3).

Консенсусные сайты связывания Pit-1 (A/T<sub>3</sub>NCAT), выявленные в составе двух AT-богатых областей интрона C гена *gh2* *O. mykiss* [23], найдены также в гене *gh2* *S. levanidovi* в положении +954/+976 и +1436/+1495 п.н. (рис. 3). Первая из этих двух областей присутствует и в гене *gh1* *S. levanidovi* (+1040/+1062 п.н.) и отличается от аналогичной области гена *gh2* одной нуклеотидной заменой. Второй AT-богатый участок гена *gh1* значительно отличается от соответствующего участка в *gh2* и обнаруживает консервативность только в центральной своей части (рис. 3).

В интроне C генов гормона роста лососевых рыб обнаружен еще один сайт – элемент ERE [30]. ERE – это инвертированный палиндромный повтор GGTCAnnnTGACCC, связываясь с которым рецепторы эстрогенов активируют транскрипцию [31]. В генах *gh1* и *gh2* *S. levanidovi* ERE различаются одной нуклеотидной заменой (рис. 3).

В генах *gh1* и *gh2* *S. levanidovi* 3'-область содержит полиг(A)-последовательность (AATAAA) в положениях +4137 и +3794 соответственно. Других потенциальных *цис*-регуляторных последовательностей в нем не обнаружено.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сравнение последовательностей генов-паралогов гормона роста гольца свидетельствует об их функциональности. Этот вывод основан на следующих фактах. Экзонные последовательности содержат открытую рамку считывания длиной 630 п.н. Предсказанная аминокислотная последовательность, кодируемая этими генами, отличается высокой консервативностью, включая по-

ложение остатков Cys. Последовательности обоих генов сходны с последовательностями генов гормона роста *S. salar* и *O. tshawytscha*, у которых оба гена функциональны. Возможно, что выявленные аминокислотные замены могут влиять на функцию двух форм гормона, но это предположение нуждается в проверке.

В пользу функциональности обоих генов свидетельствуют также результаты сравнения промоторного участка. Оба гена содержат идентичный TATA-бокс и мотивы, потенциально способные модулировать экспрессию: сайт связывания Pit-1 (включающий четыре участка, F1–F4), элементы CRE, GRE и RARE/RXRE. Все эти сайты в обоих генах находятся практически в одинаковых положениях и отличаются в паралогах небольшим числом нуклеотидных замен. Число различий в Pit-1-сайте генов *gh1* и *gh2* увеличивается от F1 к F4. Это может указывать на различия в силе промоторов и возможную тканевую специфичность экспрессии генов. Сайты GRE и RAR/RXR частично перекрываются с участком F2 Pit-1-сайта. Можно предположить, что связывание лигандов с этими сайтами может по-разному влиять на уровень экспрессии генов.

В интроне C обоих генов содержится элемент ERE, нуклеотидная последовательность которого отличается в паралогичных генах лишь одним нуклеотидом. В интроне D также выявлен мотив CRE. Не известно, могут ли CRE в промоторном участке и внутри гена функционировать кооперативно. В генах *gh1* и *gh2* они располагаются на расстоянии 2616 и 2617 п.н. друг от друга, что примерно в 10 раз короче, чем в промоторах ДНК. Возможно, что в структуре хроматина эти сайты могут быть сближены.

В интроне C обнаружены участки, обладающие гомологией с Pit-1-сайтом, при этом в *gh2*, но не в *gh1* участки гомологии относительно протяженные.

Возможно, это свидетельствует не о функциональной значимости этих участков, а, скорее, об эволюционном происхождении интрона из части промоторной области.

Работа частично финансировалась РНФ (грантом № 14-50-00034).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hirt H., Kimelman J., Birnbaum M.J., Chen E.Y., Seeburg P.H., Eberhardt N.L., Barta A. 1987. The human growth hormone locus: structure, evolution and allelic variation. *DNA*. **6**, 59–70.
- Yuri T., Kimball R.T., Braun E.L., Braun M.J. 2008. Duplication of accelerated evolution and growth hormone gene in passerine birds. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 352–361.
- Arai N., Iigo M. 2010. Duplicated growth hormone genes in a passerine bird, the jungle crow (*Corvus macrorhynchos*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **397**, 553–558.
- Ber R., Daniel V. 1992. Structure and sequence of the growth hormone-encoding gene from *Tilapia nilotica*. *Gene*. **113**, 245–250.
- Devlin R.H. 1993. Sequence of sockeye salmon type 1 and 2 growth hormone genes and the relationship of rainbow trout with Atlantic and Pacific salmon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**, 1738–1748.
- Tanaka M., Toma Y., Ohkubo T., Sudo S., Nakashima K. 1995. Sequence of the flounder (*Paralichthys olivaceus*) growth hormone-encoding gene and its promoter region. *Gene*. **165**, 321–322.
- Venkatesh B., Brenner S. 1997. Genomic structure and sequence of the pufferfish (*Fugu rubripes*) growth hormone-encoding gene: a comparative analysis of teleost growth hormone genes. *Gene*. **187**, 211–215.
- Chen Y., Wang Y., He S., Zhu Z. 2004. Cloning and sequencing of the growth hormone gene of large yellow croaker and its phylogenetic significance. *Biochem. Genet.* **42**, 365–375.
- Rajesh R., Majumdar K.C. 2007. A comparative account of the structure of the growth hormone encoding gene and genetic interrelationship in six species of the genus *Labeo*. *Fish Physiol. Biochem.* **33**, 311–333.
- Panicz R., Sadowski J., Drozd R. 2012. Genetic and structural characterization of the growth hormone gene and protein from tench, *Tinca tinca*. *Fish Physiol. Biochem.* **38**, 1645–1653.
- Sekar M., Singh S.D., Gupta S. 2014. Cloning and characterization of *Pangasianodon hypophthalmus* growth hormone gene and its heterologous expression. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **173**, 1446–1468.
- Ber R., Daniel V. 1993. Sequence analysis suggests a recent duplication of growth hormone encoding gene in *Tilapia nilotica*. *Gene*. **125**, 143–150.
- Law M.S., Cheng K.W., Fung T.Z., Chan Y.H., Yu K.L., Chan K.M. 1996. Isolation and characterization of two distinct growth hormone cDNAs from the goldfish, *Carassius auratus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **330**, 19–23.
- Bart H.L., Reneau P.C., Doosey M.H., Bell C.B. 2010. Evolutionary divergence of duplicate copies of the growth hormone gene in suckers (Actinopterygii: Catostomidae). *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 1090–1102.
- Allendorf F.W., Thorgaard G.H. 1984. Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes. In: *Evolutionary Biology of Fishes*. Eds Turner B.J., N.Y.: Plenum Press, 1–53.
- Kawauchi H., Moriyama S., Yasuda A., Yamaguchi K., Shirahata K., Kubota J., Hirano T. 1986. Isolation and characterization of chum salmon growth hormone. *Arch. Biochem. Biophys.* **244**, 542–552.
- Rentier-Delrue F., Swennen D., Mercier L., Lion M., Benrubi O., Martial J.A. 1989. Molecular cloning and characterization of two forms of trout growth hormone cDNA: expression and secretion of tGH-II by *Escherichia coli*. *DNA*. **8**, 109–117.
- Male R., Nerland A.N., Lorens J.B., Telle W., Lossius I., Totland G.K. 1992. The complete nucleotide sequence of the Atlantic salmon growth hormone I gene. *Biochim. Biophys. Acta*. **1130**, 345–348.
- Du S.J., Devlin R.H., Hew C.L. 1993. Genomic structure of growth hormone genes in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): presence of two functional genes, GH-I and GH-II, and a male-specific pseudogene, GH-Ψ. *DNA Cell Biol.* **12**, 739–751.
- Forbes S.H., Knudsen K.L., North T.W., Allendorf F.W. 1994. One of two growth hormone genes in coho salmon is sex-linked. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 1628–1631.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731–2739.
- Argenton F., Bernardini S., Puttini S., Colombo L., Bortolussi M. 1996. A TGACG motif mediates growth-hormone-factor-1/pituitary-transcriptional-activator-1-dependent cAMP regulation of the rainbow trout growth-hormone promoter. *Eur. J. Biochem.* **238**, 591–598.
- Bernardini S., Argenton F., Vianello S., Colombo L., Bortolussi M. 1999. Regulatory regions in the promoter and third intron of the growth hormone gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Gen. Comp. Endocrinol.* **116**, 261–271.
- Rhodes S.J., Rosenfeld M.G. 1996. Molecular involvement of the Pit-1 gene in anterior pituitary cell commitment. *J. Animal Sci.* **74**, 94–106.
- Montminy M.R., Gonzalez G.A., Yamamoto K.K. 1990. Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends Neurosci.* **13**, 184–188.
- Beato M., Chalepakis G., Schauer M., Slater E.P. 1989. DNA regulatory elements for steroid hormones. *J. Steroid Biochem.* **32**, 737–748.
- Truss M., Beato M. 1993. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocrine Rev.* **14**, 459–478.
- Von Schalburg K.R., Yazawa R., de Boer J., Lubieniecki K.P., Goh B., Straub C.A., Beetz-Sargent M.R., Robb A., Davidson W.S., Devlin R.H., Koop B.F. 2008. Isolation, characterization and comparison of Atlantic and Chinook salmon growth hormone 1 and 2. *BMC Genomics*. **9**, 522.
- Blomhoff R., Blomhoff H.K. 2006. Overview of retinoid metabolism and function. *J. Neurobiol.* **66**, 606–630.
- Phillips R.B., Matsuoka M.P., Konkol N.R., McKay S. 2004. Molecular systematics and evolution of the growth hormone introns in the Salmoninae. *Env. Biol. Fishes*. **69**, 433–440.
- Klein-Hitpass L., Ryffel G.U., Heitlinger E., Cato A.C.B. 1988. A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucl. Acids Res.* **16**, 647–663.