

УДК 575.113.2:597.442

**МНОЖЕСТВЕННОСТЬ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА ЯДЕРНОЙ 18S рРНК ОСЕТРОВ
АМУРА: ГЕНЫ И ПСЕВДОГЕНЫ?**© 2008 г. Г. Н. Челомина, К. В. Рожкован, К. В. Киселев, С. А. Иванов,
член-корреспондент РАН В. П. Булгаков

Поступило 18.12.2007 г.

Кодирующие регионы рДНК широко используются в качестве молекулярных маркеров для филогенетических исследований эукариот на разных таксономических уровнях, поскольку большинство их мутаций в результате согласованной эволюции быстро фиксируются внутри популяции или вида в процессе дифференциации, в то время как межвидовые различия накапливаются [1, 2]. Изменчивость рДНК внутри вида обычно ограничивается некодирующими областями, такими как внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1 и ITS2) или межгенный спейсер (IGS) [3–5]. В результате интенсивного исследования маркеров рДНК обнаружено, что у небольшого числа организмов регистрируется 2–3 варианта ядерного гена 18S рРНК [6–8]. Поэтому открытие множественных аллелей этого гена у североамериканских осетровых рыб (род *Acipenser*) [9, 10] оказалось достаточно неожиданным. В настоящее время не существует четкого объяснения данного феномена, а также его отсутствия у ближайших филогенетических родственников осетров, таких как веслоносы (род *Polyodon*). Среди возможных причин чаще всего приводят полиплоидию [9, 10]; бесспорным остается лишь тот факт, что механизмы согласованной эволюции в геномах осетровых рыб не смогли реализоваться в полной мере. Альтернативным источником внутригеномного полиморфизма рДНК может быть присутствие псевдогенных последовательностей [11, 12]. Недавно возможность присутствия псевдогенов 18S рРНК обсуждалась для североамериканских видов рода *Acipenser* [9, 10]. Наши исследования позволили не только обнаружить в геномах осетровых рыб Амура множественные варианты 18S рДНК, но получить доказательства, что они (при минимальных межвидовых отличиях в характере распределения нуклеотидного разнообразия) имеют разные эволюционные ограничения, предполагающие высокую вероятность

присутствия среди изученных копий как генных, так и псевдогенных последовательностей. Полученные данные способствуют более глубокому пониманию механизмов поддержания нуклеотидного полиморфизма и, что особенно важно, эволюционной судьбы дублированных генов.

Цель нашей работы состояла в исследовании разнообразия рДНК у двух видов осетровых рыб Амура, амурского осетра *Acipenser schrenckii* (Brandt, 1869) и калуги *Huso dauricus* (Georgi, 1775), что необходимо для прояснения механизмов, генерирующих это разнообразие, и оценки широты распространения феномена множественных аллелей гена 18S рРНК, включая предполагаемые псевдогены, у разных представителей животного мира и прежде всего полиплоидных видов рыб.

Для этого 486 п.н. участки 18S рДНК амурского осетра и калуги амплифицировали с помощью универсальных праймеров (прямой: 5'-TCA AGA ACG AAA GTC GGA GG, обратный: 5'-GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA) с использованием смеси ферментов Taq/Pfu; PCR-продукты лигировали в вектор pTZ57R/T и клонировали согласно протоколу производителя (Fermentas). Продукты отдельных клонов секвенировали (в двух повторностях) с помощью циклической реакции на автоматическом лазерном секвенаторе ABI PRISM 310 (на базе БПИ ДВО РАН). Полученные результаты объединяли с имеющимися данными из GenBank по другим видам осетров (*A. fulvescens*, *A. brevirostrum*, *A. ruthenus* и *A. sturio*), а также их близких и более далеких филогенетических родственников и обрабатывали с помощью пакетов статистических программ (DnaSP, Arlequin).

Всего для амурского осетра *A. schrenckii* и калуги *H. dauricus* изучено 60 клонов с 486 п.н. вставкой 18S рДНК. Максимальное количество клонов и гаплотипов (аллельных вариантов рДНК) от одной особи составило 30 и 12 соответственно, что указывает на неэффективность механизмов согласованной эволюции и потенциальную возможность присутствия в геномах дальневосточных видов осетров псевдогенных последовательностей рДНК малой субъединицы рибосом.

Биолого-почвенный институт
Дальневосточного отделения
Российской Академии наук, Владивосток

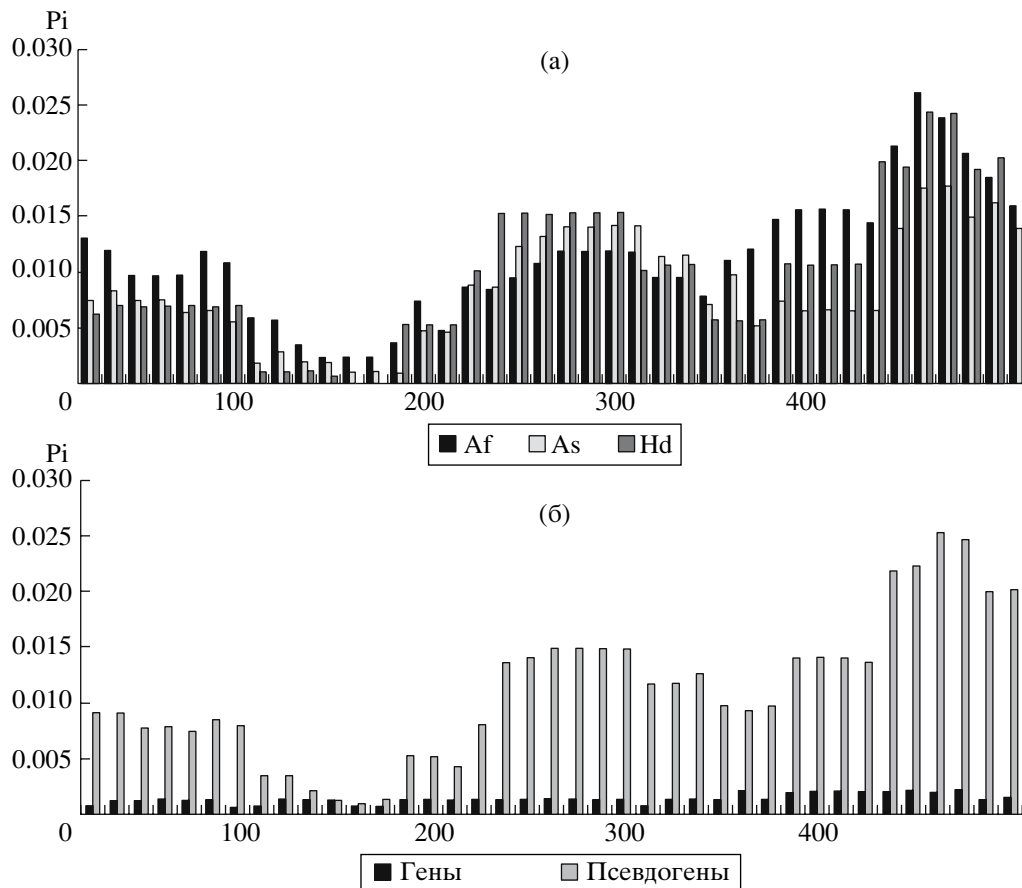


Рис. 1. Распределение нуклеотидного разнообразия (P_i) в последовательностях 18S рДНК у разных видов осетров (а) и у генов по сравнению с псевдогенами (б). Здесь и на рис. 2 Af – *A. fulvescens* (данные Genbank), As – *A. schrenckii*, Hd – *H. dauricus*; n – нуклеотидная позиция.

Наши данные продемонстрировали высокое генетическое разнообразие последовательностей 18S рДНК осетров Амура, сопоставимое с таковым родственного вида *A. fulvescens* Северной Америки. Примечательно, что характер распределения нуклеотидного разнообразия вдоль исследованного фрагмента рДНК у осетров Амура такой же, как у североамериканского озерного осетра (рис. 1), включая консервативную область между 100 и 200 нуклеотидными позициями исследуемого фрагмента (960–1444 п.н. позиции полноразмерного гена 18S рРНК). Уровень изменчивости аллельных вариантов гена 18S рРНК, оцененный с помощью индекса генетических дистанций, у анализируемых видов практически не отличался и варьировал в широком диапазоне: 0.2–3.7% у *A. schrenckii* и 0.2–3.5% у *H. dauricus*. Хотя верхний предел генетических дистанций достаточно высок, он ниже межвидовых различий *Acipenseriformes* (примерно 5%) и почти такой, как у *A. fulvescens* (~4%) [9]. Тест AMOVA показал, что основная часть (70–90%) генетического разнообразия последовательностей рДНК распределена внутри видов.

Филогенетический анализ, выполненный для шести видов осетровых рыб с помощью различных методов (объединения ближайших соседей NJ, максимальной парсимонии MP, максимального правдоподобия ML и минимального спенингового древа MST), распределил все последовательности рДНК в два кластера, состав которых в различных построениях отличался незначительно. Первый кластер включал последовательности с высоким уровнем гомологии, куда входили функциональные последовательности гена 18S рДНК *A. fulvescens* (GenBank). Второй, гетерогенный, состоял из более дивергированных последовательностей, в том числе предположительных псевдогенов *A. fulvescens* (GenBank). Соответственно, эти группы последовательностей мы условно назвали “генами” и “псевдогенами” (рис. 2). По разным критериям полиморфизм рДНК псевдогенов в 3–10 раз выше, чем у генов. Распределение нуклеотидного разнообразия у генов и псевдогенов вдоль исследуемого фрагмента разительно отличается, причем изменчивость генов, как и следовало ожидать, минимальна на всем отрезке. Примечательно, что псевдогены сохранили консервативный участок в области 100–200 нуклеотидов (см. рис. 1).

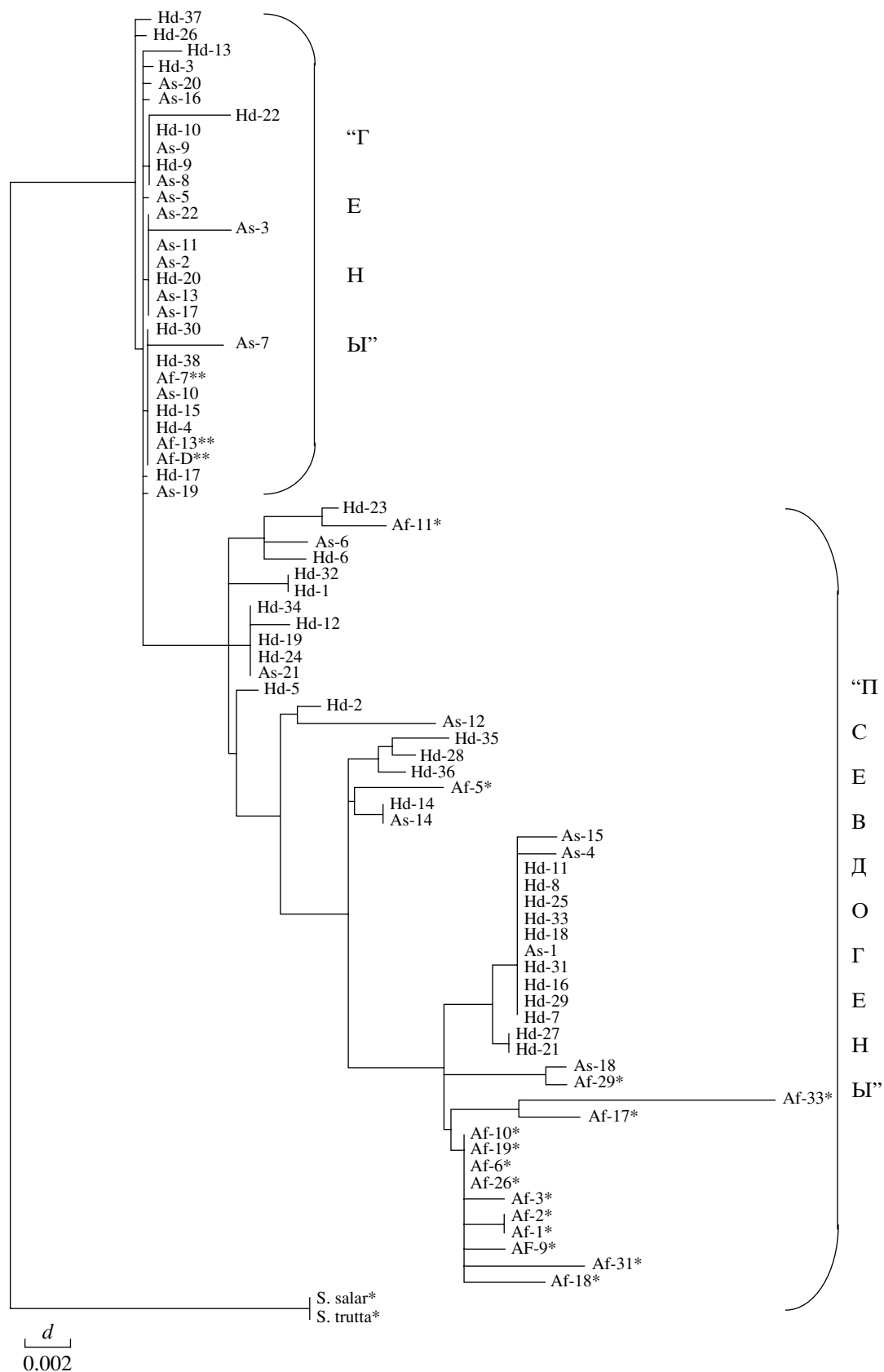


Рис. 2. Филогенетическое NJ древо последовательностей 18S рДНК осетровых рыб. Цифрами пронумерованы клоны; * – данные Genbank.

Дифференциация кластеров по гаплотипическому разнообразию невысока ($G_{st} = 0.122$), но по данным нуклеотидного разнообразия существенна ($F_{st} = 0.629$), причем эти значения заметно выше оценок, полученных при сравнении видов ($G_{st} = 0.0224-0.0492$; $F_{st} = 0.0476-0.2962$). Тест AMOVA показывает, что гены и псевдогены разделяют между собой значительно меньше генетического разнообразия (не более 50%), чем виды.

Предполагаемые функциональные различия между последовательностями рДНК первого и второго кластеров оценивали с помощью ряда тестов. Теоретически потеря функциональных ограничений для псевдогенов определяет более высокие скорости их эволюции. Действительно, тест относительных скоростей, основанный на генетических дистанциях двухпараметрической модели Кимуры, показал, что для последовательностей кластера псевдогенов они значительно выше ($L_b = 0.01264$), чем для генов ($L_a = 0.00348$): $L_a - L_b = -0.009159$ ($SE = 0.003899$), $Z = 2.3262$.

В результате ослабления селективных ограничений псевдогены часто характеризуются повышенной скоростью мутаций, относящихся к метилированным сайтам [13]. Нами также зарегистрировано большее число замен $G \rightarrow A$ и $C \rightarrow T$ у последовательностей кластера “псевдогенов” (24) по сравнению с “генами” (6), а соотношение числа этого типа мутаций к числу остальных замен составило 1 : 1 и 1 : 2.5 соответственно.

$Z_n S$ -тест Келли [14], базирующийся на неравновесии по сцеплению между сегрегирующими сайтами, для информативных вариабельных сайтов выявил более существенное отклонение от нейтральности для последовательностей кластера генов ($Z_n S = 0.182$) по сравнению с псевдогенами ($Z_n S = 0.082$), что соответствует представлениям о разном селективном давлении на кодирующие и нефункциональные последовательности ДНК.

Таким образом, в геномах осетровых рыб Амура обнаруживается значительная индивидуальная изменчивость 486 п.н. последовательностей 18S рДНК, что указывает на наличие огромного резерва разнообразия этих видов на молекулярном уровне. Аллельные варианты имеют, по всей видимости, разную функциональную значимость; возможно, некоторые из них являются псевдогенами, что окончательно может прояснить анализ полноразмерной последовательности 18S рДНК. Теоретически, псевдогенизация – наиболее вероятная судьба большинства генных экстра-ко-

пий; более 90% вновь образованных копий гена деградируют до псевдогенов [12]. Полагают, что наиболее общая судьба комплекса дублированных генов должна быть в субфункционализации, которая определяется как часть функции/функций, первоначально выполняемой одиночным предковым геном между его дубликциями. Субфункционализация может быть обеспечена мутационными процессами дубликации–дегенерации–комплементации, которые либо сохраняют дубликаты как они есть, либо освобождают гены от селективных ограничений для дальнейшей эволюционной шлифовки субфункций [12]. Улучшение свойств функциональной последовательности такого гена, как 18S рРНК, является очень важным для адаптации вида в постоянно изменяющейся среде обитания. Возможно, отчасти по этой причине осетровые смогли сохраниться в течение многих миллионов лет, намного пережив фауну динозавров.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Президиума ДВО РАН (проект “Амур-7” в составе гранта “Амурская экспедиция”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hillis D.M., Dixon M.T. // *Quart. Rev. Biol.* 1991. V. 66. P. 411–453.
2. Hillis D.M., Davis S.R. // *Syst. Zool.* 1988. V. 37. P. 63–66.
3. Harris D.J., Crandall K.A. // *Mol. Biol. and Evolut.* 2000. V. 17. P. 284–291.
4. Reed K.M., Hackett J.D., Phillips R.B. // *Gene*. 2000. V. 249. P. 115–125.
5. Parkin E.J., Butlin R.K. // *Mol. Biol. and Evolut.* 2004. V. 21. P. 1595–1601.
6. Dame J.B., Sullivan M., McCutchan T.F. // *Nucl. Acid. Res.* 1984. V. 12. P. 5943–5952.
7. Carranza S., Giribet G., Ribera C. et al. // *Mol. Biol. and Evolut.* 1996. V. 13. P. 824–832.
8. Muir G., Fleming C.C., Schlotterer C. // *Mol. Biol. and Evolut.* 2001. V. 18. P. 112–119.
9. Krieger J., Fuerst P.A. // *J. Appl. Ichthyol.* 2002. V. 18. P. 290–297.
10. Krieger J., Fuerst P.A. // *J. Appl. Ichthyol.* 2004. V. 20. P. 433–439.
11. Ruggiero M.V., Procaccini G. // *J. Mol. Evolut.* 2004. V. 58. P. 115–121.
12. Rodin S.N., Riggs A.D. // *J. Mol. Evolut.* 2003. V. 56. P. 718–729.
13. Gojobori T., Wen-Hsiung Li, Graur D. // *J. Mol. Evolut.* 1982. V. 18. P. 360–369.
14. Kelly J.K. // *Genetics*. 1997. V. 146. P. 1197–1206.