

На правах рукописи  
УДК 575.113:576.316:599.363:636.4

**РГБ ОД**

**13 ДЕК 2000**

Ларкин Денис Михайлович



**ЛОКАЛИЗАЦИЯ У СВИНЬИ И БУРОЗУБКИ ОБЫКНОВЕННОЙ  
ГЕНОВ СИСТЕМНОЙ ГРУППЫ ХРОМОСОМЫ 17 ЧЕЛОВЕКА**

Генетика - 03.00.15

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск  
2000

Работа выполнена в Институте цитологии и генетики СО РАН,  
лаборатория генетических основ онтогенеза  
г. Новосибирск

Научный руководитель: кандидат биологических наук,  
Н.С. Жданова  
Институт цитологии и генетики  
СО РАН, г. Новосибирск

Официальные оппоненты: доктор биологических наук  
Т.И. Аксенович  
Институт цитологии и генетики  
СО РАН, г. Новосибирск  
кандидат биологических наук  
С.П. Князев  
Новосибирский аграрный  
университет,  
г. Новосибирск

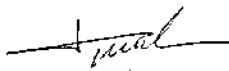
Ведущее учреждение: Институт общей генетики РАН,  
г. Москва

Защита диссертации состоится "5" декабря 2000 года  
на утреннем заседании специализированного совета по защите  
диссертаций на соискание ученой степени доктора наук (Д-002.11.01)  
при Институте цитологии и генетики СО РАН в конференц-зале  
Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект акад.  
Лаврентьева, 10. тел./факс: 33-12-78; e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

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

Автореферат разослан "6" октября 2000 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук



Груздев А.Д.

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Картирование геномов является одной из важнейших задач современной генетики. Картирование хромосом млекопитающих преследует две основные цели: 1) Создание подробных карт геномов человека и сельскохозяйственных видов позволит проводить молекулярный анализ локусов, имеющих медицинское значение, и изучать наследование локусов, вносящих главный вклад в формирование хозяйственно ценных признаков (ETL) у сельскохозяйственных животных. 2) Сравнение карт разных видов позволит выявлять закономерности эволюции и организации геномов млекопитающих.

Сравнение геномных карт млекопитающих указывает на то, что в кариотипах разных видов представлены схожие протяженные блоки одних и тех же сцепленных генов. Для выявления этих консервативных блоков используется флуоресцентная *in situ* гибридизация хромосомоспецифичных зондов на хромосомы других, даже отдаленных видов (Zoo-FISH). В большинстве случаев выявляются районы межвидовой гомеологии не меньше одной G полосы. Однако использование этого метода не позволяет выявлять мелкие районы и определять порядок генов в пределах консервативных районов. Границы консервативных районов и порядок генов в них может быть установлен с помощью генетического и радиационного картирования. Картирование с помощью радиационно-индуцированных гибридов позволяет установить порядок генов, основываясь на статистическом анализе данных по присутствию/отсутствию картируемых маркеров в клонах панели. Желательно, чтобы используемые маркеры были предварительно нанесены на цитогенетическую или генетическую карты вида.

Одной из наиболее консервативных ассоциаций генов у млекопитающих является группа сцепления хромосомы 17 человека. Согласно данным Zoo-FISH эта хромосома сохранилась у 15 исследованных видов, распавшись лишь у некоторых представителей отряда хищных и приматов (Glas et al., 1998). Данные геномного картирования в целом подтверждают результаты Zoo-FISH, однако свидетельствуют о том, что у разных видов отдельные гены могут выпадать из этой группы, либо в нее могут включаться гены или блоки генов из других синтенных групп (Werner et al., 1997; Muller et al., 1997; Larkin et al., 2000). Только детальное геномное картирование может показать, какие именно изменения претерпевал в ходе эволюции геном млекопитающих в рамках каждого вида. Построение геномных карт представителей отрядов, рано дивергировавших от общего ствола млекопитающих, приблизит нас к пониманию природы происхождения крупных блоков синтенных генов в геномах далеких видов и возможности реконструкции предкового кариотипа млекопитающих.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы являлось выяснение судьбы крупного консервативного блока генов у двух отдаленных видов млекопитающих.

Одной из главных задач исследования было картирование у свиньи (*Sus scrofa Dom.*) и бурозубки обыкновенной (*Sorex araneus*) генов, локализованных у человека в хромосоме 17.

Для достижения цели были поставлены следующие конкретные задачи:

1. Осуществить субхромосомную локализацию четырех консервативных генов у свиньи с помощью Саузерн-блот гибридизации. Провести отбор по литературным источникам и сконструировать новые ПЦР праймеры для картирования генов у свиньи и бурозубки обыкновенной.
2. Осуществить с помощью ПЦР анализа у свиньи субхромосомную локализацию генов, распределенных по всей длине хромосомы 17 человека.
3. Нанести 9 генов свиньи на радиационную карту с помощью панели радиационных гибридов и установить их порядок.
4. Провести сравнение порядка генов в хромосомах 12 свиньи, 17 человека, 19 коровы и в гомеологичных хромосомах других видов для выявления изменения и сохранения порядка генов в ходе эволюции.
5. Картировать у бурозубки обыкновенной 8 генов, охватывающих всю длину хромосомы 17 человека.

Научная новизна и практическая значимость.

1. Впервые с использованием набора гибридов соматических клеток свинья-норка и свинья-китайский хомячок установлена хромосомная и субхромосомная локализация 17 генов свиньи: NF1, PRKCA, RARA, ERBB2, HLR1, THRA1, ENO3, CRYB1, P4HB, MYL4, LIS1, GAS, BRCA1, MCP1, TOP2A, STAT5B и H3F3B.
2. Впервые на радиационную карту нанесены 9 генов свиньи H3F3B, HLR1, MYL4, TOP2A, STAT5B, THRA1, MPO, MCP1, NF1 и установлен их относительный порядок с использованием радиационной панели гибридов соматических клеток.
3. На основе сравнения порядков генов в хромосоме 12 свиньи и хромосоме 17 человека впервые выявлен район, перестройка в котором определила изменение порядка генов в гомеологичных хромосомах. Выявлено изменение относительного положения центромеры в этих двух хромосомах.
4. Впервые проведена хромосомная локализация 8 генов у бурозубки обыкновенной: генов NF1, MYL4, THRA1, MTMR4, GLUT4, ACADVL, MPO на хромосому *hn*, а гена MYH2 на хромосому *ik*. Впервые применена ПЦР с гетерологичными праймерами для картирования генома этого вида.

5. Впервые определен район возможного разрыва у бурозубки синтенной группы генов хромосомы 17 человека.

6. Создана геномная база данных, содержащая информацию о локализации генетических маркеров у бурозубки обыкновенной. База доступна в сети Интернет по адресу <http://shrewbase.da.ru>.

Насыщение геномной карты свиньи сыграет важную роль при выявлении генов-кандидатов, отвечающих за формирование экономически важных признаков. Установление точного порядка генов необходимо для проведения позиционного клонирования и характеристики выявляемых экономически важных локусов. Насыщение геномной карты бурозубки имеет большое значение для развития частной генетики вида, предсказания локализаций гомеологичных генов у других видов и реконструкции предкового кариотипа млекопитающих.

Полученные в ходе данной работы данные используются при чтении лекций по курсу «Цитогенетика» (НГУ).

Апробация работы и публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в отечественной и зарубежной печати. Результаты работы были представлены на 5 международных конференциях. Создан веб сайт «Shrew genome database» (<http://shrewbase.da.ru>). Часть материалов по картированию генома бурозубки была внесена в сводку по сравнительному картированию, опубликованную О'Браеном в журнале *Science* (O'Brien et al., 1999).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 3-х глав, заключения, выводов, приложений и списка литературы. Работа изложена на 132 страницах, иллюстрирована 13 рисунками и содержит 9 таблиц. Список цитированной литературы включает 210 работ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Линии клеток, использованные для хромосомной локализации генов свиньи.** а). Для определения субхромосомной локализации генов свиньи была использована серия клонов гибридов соматических клеток, полученных от слияния фибробластов американской норки линии MVTK<sup>c</sup>, дефицитной по активности тимидинкиназы (ТК), и лейкоцитов свиньи (Zhdanova et al., 1996; Zhdanova et al., 1995; Рубцов и др., 1998), а также гибридный клон 8990, любезно предоставленный доктором Пр. Томсеном (Королевский ветеринарный и сельскохозяйственный университет, Дания). Клон 8990 получен от слияния линии ВК 14-150 китайского хомячка, дефицитной по активности ТК1, с лимфоцитами свиньи (Thomsen and Zhdanova, 1995). б). В работе были использованы субклоны гибридных линий SV1, SV11, SV27, устойчивые к 5-бромдезоксигуанидину. В аббревиатуре этих клонов присутствует буква "В". (табл.1)

**Линии клеток, использованные для радиационного картирования генов свиньи.** ImpRH<sub>7000R</sub> панель состоит из 118 клонов, полученных от слияния

облученных клеток лимфоцитов или фибробластов свиньи с клетками китайского хомячка линии Wg3c1 (Yerle et al., 1998). В качестве контроля использовалась ДНК, выделенная из линии китайского хомячка Wg3c1 и фибробластов свиньи.

**Таблица 1.** Список гибридных клеточных клонов свинья-американская норка и свинья-китайский хомячок.

<b>Клон свинья-американская норка</b>	<b>Хромосомы свиньи</b>
SV1-19	8,9,12
SV1-B12	8,9
SV11-B3	8
SV11-B5	8,14
SV19	Все
SV23	Все
SV27-B1	2
SV35	12
SV36	5cen-q2; 6q21-q23; 13q21; 13q22; 7q25-qter; 4p12-p13; 16q12-q14; 12pter-p15; Xp11-Xq11
SV38-B4	5
<b>Клон свинья-китайский хомячок</b>	<b>Хромосомы свиньи</b>
8990	12p
8990-B4	-

**Линии клеток, использованные для локализации генов бурозубки.** Использовалась панель из 14 клонов бурозубка-китайский хомячок (аббревиатура «SAS», «SAB») и 5 клонов бурозубка-мышь (клоны, маркированные «С») (табл. 2.). Гибридные клоны получены при слиянии клеток селезенки или костного мозга бурозубки с клетками перевиваемой линии мышей LMTK<sup>-</sup>, дефицитной по активности ТК (клоны серии С1, С2) или клетками перевиваемой линии Ag17 китайского хомячка, дефицитной по активности гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (серии SAS и SAB) (Pack et al., 1995). В работе так же использовались: 1) перевиваемая линия клеток мыши LMTK<sup>-</sup>, 2) перевиваемая линия клеток китайского хомячка Ag17, 3) гибридные клоны бурозубка-мышь K2-1 и K2-1BS, не включенные в панель.

**ДНК зонды.** Для локализации генов NF1, PRKCA, RARA, ERBB2 свиньи были использованы клонированные фрагменты гомеологичных генов человека.

**Работа с нуклеиновыми кислотами.** Все молекулярные работы, связанные с выделением ДНК, трансформацией клеток *E.Coli*, амплификацией и секвенсом ДНК проводили по стандартным методикам (Маниатис, 1986).

**Конструирование видоспецифических и консенсусных ПЦР праймеров.** Для конструирования видоспецифических и консенсусных праймеров, были использованы последовательности ДНК генов свиньи, человека, мыши и других видов, доступные через GeneBank (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/>). В случае создания видоспецифических праймеров свиньи, последовательности генов свиньи анализировались с помощью программы Primer Premier 5.0.

Таблица 2. Частота встречаемости хромосом и хромосомных плеч бурозубки в клетках гибридных клонов панели

	de	bc	af	l	k	g	o	jl	h	n	m	p	q	r	tu
SAS3	1.03												0.07	0.07	0.73
SAS7	1.00										0.93		0.57	1.16	
SAS8	1.00		1.40	1.00	1.00								0.98	0.96	1.00
SAS11	1.00														1.00
SAS13	1.03		1.00	0.50	0.50								1.06	1.08	1.20
SAS23	0.83		0.96	0.30	0.30								0.46	0.90	0.93
SAS26	1.00	0.40	1.20	0.60	0.60			1.00			1.08			1.06	0.77
SAS28	1.00		1.13	0.73	0.73	0.98	0.96	1.00			1.06	1.06	0.60	0.80	0.90
SAS31	1.00		1.00					0.93			0.70	0.70			0.80
SAS32	0.96	0.83	1.06	0.67	0.67	1.18	1.16	1.40			0.80	0.80	0.73	0.73	0.53
SAS35	1.00		1.20	0.40	0.40			0.83	0.47	0.47			0.73	0.73	1.00
SAS37	1.00	0.37	0.90						0.50	0.50					0.77
SAS41	1.00		1.03	0.96	0.96	0.20	0.20	1.06					0.10	0.10	0.27
SAB6	1.00	1.03											0.93	0.93	
C1-4			0.50	0.80	0.80			0.60	1.33	1.33	0.13	0.13	0.36	0.40	0.20
C2-1									1.00	1.00					
C2-2				0.40	0.40				1.20	1.20					
C2-3		0.70		0.93	0.93			0.73	1.03	1.03	1.10	0.60		0.93	1.00
C2-9				1.70	1.03	0.53	1.16		0.83	0.17			0.13	0.56	

\* - производился учет в клетках клона одного или двух гомологов, поэтому показатель может быть больше 1.

**Анализ IMpRH панели ПЦР анализ** всей радиационной панели проводился дважды. Клоны, дававшие противоречивый результат анализировались третий раз. Результаты обрабатывались с помощью веб интегрированной программы (<http://imprh.toulouse.inra.fr/>) на совместное сохранение в клонах с референтными маркерами, которые были нанесены на радиационную карту ранее (Hawken et al., 1999).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

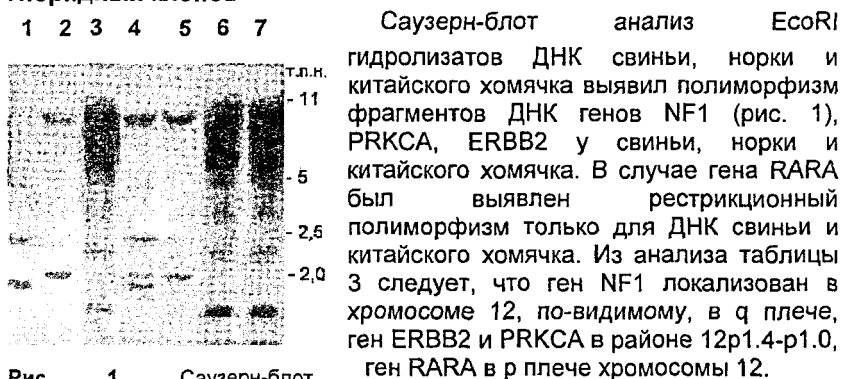
**Картирование генов из синтенной группы хромосомы 17 человека на хромосомы свиньи**

Гомеология хромосомы 17 человека и хромосомы 12 свиньи позволяет использовать для хромосомного и субхромосомного

картирования у свиньи генов из этой синтенной группы ограниченный набор клеточных гибридов, в который входят моно- и малохромосомные клоны свинья-американская норка (табл. 1), содержащие хромосому 12 и ее фрагменты (Zhdanova et al., 1996).

Картирование проводили с помощью Саузерн-блот гибридизации зондов кДНК человека и ПЦР анализа с 53 парами геноспецифических праймеров разного типа. В результате четыре гена - NF1, PRKCA, RARA и ERBB2, - были локализованы с помощью Саузерн-блот анализа гибридных клонов (табл. 3). Гены HLR1, THRA1, ENO3, CRYB1, P4HB, MYL4, LIS1, GAS, BRCA1, MCP1, TOP2A, STAT5B и H3F3B были картированы с помощью ПЦР анализа гибридных клонов.

### Хромосомная и субхромосомная локализация генов NF1, PRKCA, RARA и ERBB2 с помощью Саузерн-блот анализа гибридных клонов



**Рис. 1.** Саузерн-блот гибридизация EcoRI-гидролизатов ДНК, выделенной из клеток печени свиньи (1), норки (2), китайского хомячка (3), клонов: SV35 (4), SV36 (5), 8990 (6), 8990B4 (7), с клонированным фрагментом кДНК гена NF1. Клон 4 – положительный, а клоны обозначены 5, 6, 7 – отрицательные по фракциям свиньи

### Хромосомная и субхромосомная локализация генов HLR1, THRA1, ENO3, CRYB1, P4HB, MYL4, LIS1, GAS, BRCA1, MCP1, TOP2A, STAT5B и H3F3B с помощью ПЦР анализа гибридных клонов свинья-норка и свинья китайский хомячок

Для локализации генов из этой группы был использован набор ПЦР праймеров. Для генов THRA1, TOP2A, GAS, MCP1 - гомологичные праймеры (праймеры для генов THRA1, TOP2A, GAS разработаны нами, а праймеры для гена MCP1 – TOAST праймеры (Jiang et al., 1998)); для гена HLR1 – CATS праймеры (Lyons et al., 1997); для генов CRYB1, P4HB, MYL4, LIS1 – праймеры, гомологичные для генома коровы (Yang and Womack, 1998; Yang and



Womack, 1997; Yang and Womack, 1995); для генов STAT5B, H3F3B – праймеры гомологичные для кошки (Murphy et al., 2000); для генов ENO3 и BRCA1 – консенсусные праймеры, разработанные нами в ходе данной работы.

**Таблица 3.** Результаты анализа гибридных клонов свинья-норка и свинья-китайский хомячок на наличие 17 генов свиньи

Название гена свиньи	Гибридные клоны											
	SV1-19	SV1-B12	SV1-B3	SV11-B5	SV19	SV23	SV27-B1	SV35	SV36	SV38-B4	8990	8990-B4
P4HB	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-
PRKCA	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
ERBB2	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
HLR1	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
THRA1	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
MYL4	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
GAS	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
BRCA1	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
TOP2A	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
NF1	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
MCP1	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
CRYB1	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
ENO3	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
LIS1	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
RARA	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	+	-
H3F3B	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	+	-
STAT5B	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	+	-

«+» - положительный клон, «-» - отрицательный клон, «?» - клоны свинья-норка, которые не удалось проанализировать по причине отсутствия межвидового полиморфизма по данному маркеру.

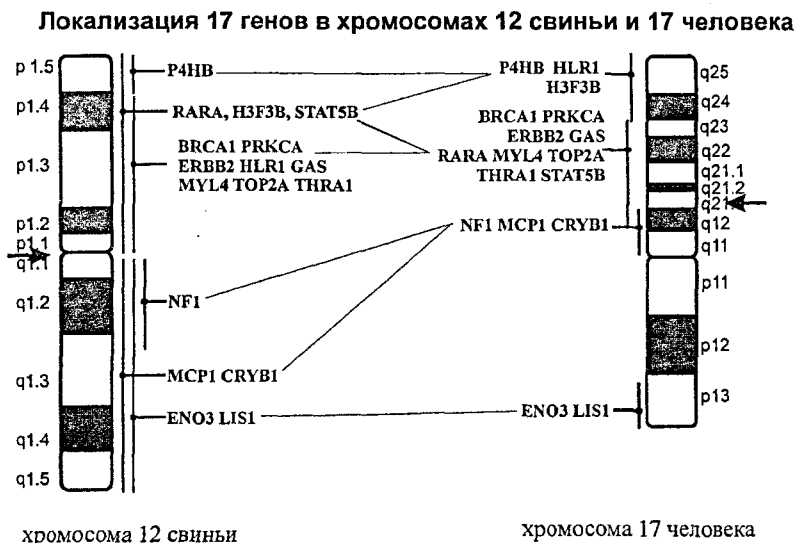
Для генов THRA1, ENO3, P4HB, LIS1, MCP1, TOP2A (рис. 2.) были подобраны условия ПЦР и разделения фракций норки, свиньи и китайского хомячка, что позволило по подвижности фракций идентифицировать положительные и отрицательные клоны. В случае генов HLR1, CRYB1, MYL4, BRCA1, GAS нам не удалось подобрать условия, которые бы позволили четко различить фракции родительских видов. Для разделения ПЦР продуктов использовали полиморфизм по длинам рестрикционных фрагментов (RFLP). В случае генов BRCA1, HLR1, GAS полиморфизм удалось выявить



**Рис. 2.** Результат ПЦР анализа ДНК свиньи (1), норки (2), китайского хомячка (3) и клонов SV35 (4), SV36 (5), SV27B1 (6), 8990 (7), 8990B4 (8) с праймерами, специфичными для гена TOP2A свиньи. Клоны 4 и 7 положительные, а клоны 5, 6 и 8 отрицательные по фракции свиньи.

с использованием HaeIII эндонуклеазы рестрикции, для гена MYL4 была использована MspI рестриктаза, а гена CRYB1 – рестриктаза HhaI. В случае генов STAT5B и H3F3B не удалось подобрать условия разделения ПЦР продуктов свиньи и норки, но ПЦР продукты свиньи и китайского хомячка разделялись без дополнительной обработки. В обоих случаях клон, содержащий р плечо хромосомы 12, является положительным. Результаты анализа гибридных клонов свинья-норка и свинья китайский хомячок по этим генам свиньи представлены в таблице 3. В результате проделанной работы, ген P4HB был картирован в район pter-p1.4, гены HLR1, THRA1, MYL4, GAS, BRCA1, TOP2A в район 12p1.5-p1.0, гены H3F3B и STAT5B в р плечо хромосомы 12, а ENO3, LIS1, MCP1, CRYB1 в q плечо хромосомы 12 (рис 3.)

MYL4, GAS, BRCA1, TOP2A в район 12p1.5-p1.0, гены H3F3B и STAT5B в р плечо хромосомы 12, а ENO3, LIS1, MCP1, CRYB1 в q плечо хромосомы 12 (рис 3.)



**Рис. 3.** Результаты сравнения локализаций 17 генов в хромосомах 12 свиньи и 17 человека. Стрелками указано относительное изменение положения центромеры.

Сравнение карты хромосомы 12 свиньи с картой хромосомы 17 человека (GDB: <http://www.gdb.org>) показывает, что гены, локализованные в р плече хромосомы 12 свиньи, локализованы в q плече хромосомы 17 человека. Там же локализованы 3 гена из q плеча хромосомы 12 (рис. 3). Локализация гена NF1 в 12 q свиньи подтверждается локализацией его в 12q1.0-q1.3 методом микродиссекции районов хромосомы с последующим ПЦР ДНК районов с праймерами специфичными к NF1 (личное сообщение Кузнецова С.Б., Рубцова Н.Б. и Ждановой Н.С.). Можно предположить, что по сравнению с хромосомой 17 человека в гомеологичной хромосоме свиньи имеется либо хромосомная перестройка, ведущая к изменению соотношений длин плеч и порядка генов в прицентромерных районах, либо порядок генов в этой хромосоме такой же, как в хромосоме 17 человека, но произошло изменение положения центромеры, в результате чего как минимум 3 гена оказались перемещенными из одного плеча в другое. Чтобы прояснить ситуацию, мы решили установить порядок ряда картированных генов с помощью радиационной панели гибридов соматических клеток.

#### **Картирование генов H3F3B, HLR1, MYL4, TOP2A, STAT5B, THRA1, MPO, MCP1, NF1 с использованием IMpRH панели**

Для картирования с помощью радиационной панели были отобраны маркеры, для которых нами были выявлены четкие различия по подвижности ПЦР фракций свиньи и китайского хомячка. Кроме того, мы попытались картировать ген MPO, ранее локализованный у свиньи с точностью до хромосомы (GI:6644339). Этот ген интересен тем, что у человека он локализуется в том же районе хромосомы 17, что и ген LPO, для которого было показано изменение положения в хромосоме 12 относительно положения в гомеологичной хромосоме человека (Pinton et al., 2000). Частота сохранения проанализированных маркеров колебалась от 18% (NF1, HLR1) до 29% (MCP1). Обработка на IMpRH веб сервере (<http://imprh.toulouse.inra.fr/>) данных по сохранению в клонах панели 9 генов, основанная на двухточечном статистическом анализе, показала, что все картируемые гены сцеплены с референтными маркерами нескольких групп сцепления хромосомы 12, которые были получены при радиационном картировании генома свиньи с помощью этой панели (рис.4) (Hawken et al., 1999).

Использование многоточечного анализа, основанного на методе минимизации обязательных хромосомных разрывов, позволило установить порядок каждого в отдельности картируемого гена относительно референтных маркеров. Первые 3 лучшие порядка для маркеров приведены в таблице 4. На основании полученных данных можно заключить, что наиболее вероятный порядок всех

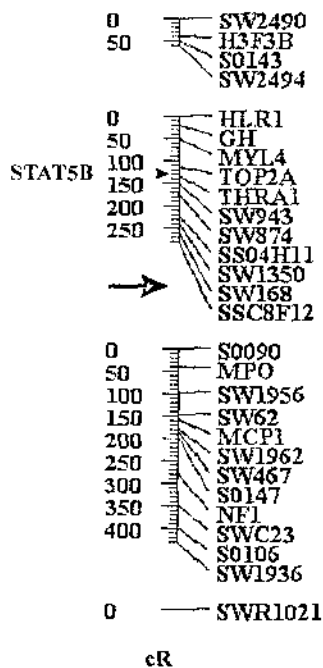
**Таблица. 4.** Лучшие порядки картируемых относительно референтных маркеров хромосомы 12, установленные с использованием метода минимизации обязательных хромосомных разрывов.

Маркер	Порядок №	Количество дополнительных дифференциальных разрывов	Порядок маркеров
H3F3B	1	-	SW2490 H3F3B S0143 SW2494 GH SW943
	2	2	SW2490 S0143 SW2494 H3F3B GH SW943
	3	4	SW2490 S0143 H3F3B SW2494 GH SW943
HLR1	1	-	SW2490 S0143 SW2494 HLR1 GH SW943
	2	4	SW2490 S0143 SW2494 GH HLR1 SW943
	3	12	SW2490 S0143 SW2494 GH HLR1 SW943
MYL4*	1	-	SW2490 S0143 SW2494 GH MYL4 SW957
	2	-	SW2490 S0143 SW2494 MYL4 GH SW943
TOP2A	1	-	SW2490 S0143 SW2494 GH TOP2A SW943
	2	12	SW2490 S0143 SW2494 GH SW943 TOP2A SW874
	3	12	SW2490 S0143 SW2494 GH SW943 SW874 SW1350 SS04H11 SW168 SW37 SWR390 SSC8F12 TOP2A S0090 SW1956 SW62...
STAT5B*	1	-	SW2490 S0143 SW2494 GH STAT5B SW943 SW874 SW1350 SS04H11 SW168
THRA1	1	-	SW2490 S0143 SW2494 GH THRA1 SW943
	2	4	SW2490 S0143 SW2494 GH SW943 THRA1 SW874 SW1350 SS04H11 SW168 SW37
	3	14	SW2490 S0143 SW2494 GH SW943 SW874 SW1350 SS04H11 SW168 SW37 SWR390 SSC8F12 THRA1 S0090 SW1956 SW62
MPO*	1	-	SSC8F12 S0090 MPO SW1956 SW62
	2	2	SSC8F12 MPO S0090 SW1956 SW62
MCP1	1	-	SSC8F12 S0090 SW1956 SW62 MCP1 SW1962 SW467 S0147 SWC23 S0106
	2	4	SSC8F12 S0090 SW1956 MCP1 SW62 SW1962 SW467 S0147 SWC23 S0106
	3	14	SC8F12 S0090 SW1956 SW62 SW1962 MCP1 SW467 S0147 SWC23 S0106 SW1936
NF1	1	-	S0147 NF1 SWC23 S0106 SW1936 SWR1021
	2	4	S0147 SWC23 S0106 SW1936 NF1 SWR1021
	3	6	S0147 SWC23 S0106 NF1 SW1936 SWR1021

\*Для большинства генов приведено 3 лучших порядка. Если приведено 1 или 2 порядка, это означает, что следующий за приведенным порядком относился к группам сцепления не 12-ой хромосомы. Они не приведены, поскольку локализация всех генов на хромосоме 12 считается установленной.

картированных нами генов и референтных маркеров следующий: pter-...-SW2490-H3F3B-S0143-SW2494; HLR1-(MYL4)-GH-(MYL4, TOP2A, THRA1, STAT5B)-SW943-SW874-SS04H11-SW1350--SW168-SW37-SWR390-SSC8F12; S0090-MPO-SW1956-SW62-SW1962-MCP1-SW467-S0147-NF1-SWC23-S0106-SW1936; SWR1021-...-qter. При

установлении этого порядка мы использовали лучший порядок для каждого гена в отдельности. В случае гена MYL4 первые 2 порядка не отличались по количеству дифференциальных разрывов. Лучшие порядки для генов TOP2A, THRA1, STAT5B и один из двух первых порядков для гена MYL4 указывали на вероятную локализацию этих маркеров между одними и теми же референтными маркерами. Для выяснения относительного порядка генов в группе ...-GH-(TOP2A, THRA1, MYL4)-SW943... была проведена одновременная обработка наших данных и векторов для референтных маркеров с помощью статистического метода «максимального правдоподобия». Эта обработка проводилась др. Денисом Миланом, лаборатория клеточной генетики, Тулуза, Франция. Наиболее вероятным оказался следующий порядок: GH-MYL4-TOP2A-THRA1-SW943-.... Порядок MYL4-GH-TOP2A-THRA1-SW943-... всего в 8 раз менее вероятен, чем первый. Мы не имеем обработки результатов локализации гена STAT5B методом «максимального правдоподобия», однако использование «квази-филогенетического» метода (Barendse et al., 2000)



свидетельствует о порядке ...-MYL4-TOP2A-STAT5B-THRA1-SW143 -... как о наиболее вероятном. Принимая во внимание лучшие порядки, мы заключаем, что общий порядок маркеров на радиационной карте хромосомы 12 следующий: pter-...-SW2490-H3F3B-S0143-SW2494; HLR1-GH-MYL4-TOP2A-STAT5B THRA1-SW943-SW874-SS04H11-SW1350-SW168-SC8F12 S0090-MPO-SW1956-SW62-MCP1-SW1962-SW467-S0147-NF1-SWC23-S0106-SW1936; SWR1021-...-qter. (рис. 4). В результате проделанной работы нам не только удалось нанести на радиационную карту хромосомы 12 свиньи 9 генов, что увеличивает число генных маркеров на радиационной карте этой хромосомы с 1 до 10, но и объединить две из 4 групп сцепления, на которые была разбита опубликованная радиационная карта хромосомы 12 (Hawken et al., 1999).

Рис. 4. Радиационная карта хромосомы 12 свиньи. Гены H3F3B, HLR1, MYL4, TOP2A, STAT5B, THRA1, MPO, MCP1, NF1 картированы нами. Большая стрелка указывает на вероятное положение центromеры, полученное при анализе цитогенетических локализаций этих генов (рис. 3).

## **Сравнение порядка генов в хромосоме 12 с порядком гомеологических генов у других видов млекопитающих**

Проведем сравнение полученного генного порядка с порядком гомеологических генов на радиационной карте хромосомы 17 человека (UniGene: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>). Позиция гена STAT5B у человека точно не установлена, поэтому этот маркер мы не рассматриваем. Относительный порядок остальных картированных у свиньи генов, у человека следующий: H3F3B-HLR1-GH-MPO-MYL4-TOP2A-THRA1-MCP1-NF1. Из сравнения этих порядков следует, что они преимущественно совпадают. Однако у свиньи ген MPO локализуется между генами THRA1 и MCP1-NF1, а у человека между GH и MYL4-TOP2A-THRA-MCP1-NF1. У мыши, коровы и собаки определен следующий порядок генов: GH-THRA1-MPO-NF1 (Werner et al., 1999; Yang and Womack, 1998; Yang and Womack, 1995). На основании этих данных можно предположить, что порядок GH-THRA1-MPO-NF1 может быть предковым для этих видов, а в ходе хромосомной эволюции приматов (или только человека), произошла хромосомная перестройка, изменившая положение этого маркера.

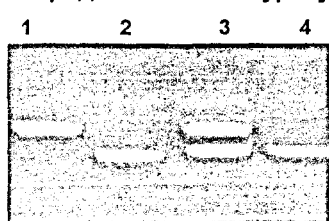
Сравним порядок генов в гомеологических хромосомах у двух представителей отр. Парнокопытных: хромосомы 19 коровы и хромосомы 12 свиньи. У коровы представлен следующий порядок: H3F3B-GH-MYL4-THRA1-MPO-NF1-MCP1 (Yang and Womack, 1998; Yang and Womack, 1995). Можно заметить, что порядок генов NF1-MCP1 у коровы инвертирован по сравнению с таковым у свиньи и человека. Если учесть порядок всех генов, нанесенных на радиационную карту хромосомы 19 коровы, то видно, что у этого вида имеется как минимум 3 точки разрыва, определивших изменение порядка генов в этой хромосоме относительно хромосомы 17 человека (Yang and Womack, 1998). При сравнении с нашими данными можно заключить, что инверсия порядка генов, по крайней мере, в одном районе хромосомы 19 коровы, включающем гены NF1 и MCP1, характерна не для всех представителей отр. Парнокопытных.

Полученные данные показывают, что изменение морфологии гомеологических хромосом у разных видов не всегда сопровождается изменением порядка генов, в прицентромерных районах. Как мы уже указывали, в хромосоме 12 свиньи изменено положение центромеры относительно ее положения в хромосоме 17 человека, в результате чего произошло изменение соотношения длин хромосомных плеч (рис. 3). При этом порядок ближайших к центромере генов (THRA1, MCP1, NF1) у свиньи и человека совпадает. Таким образом, положение центромеры изменилось без изменения порядка окружающих генов. Подобное явление описано для эволюции хромосомы 9 у нескольких видов приматов (Montefalcone et al., 1999). Не исключая возможности возникновения нескольких хромосомных перестроек, изменяющих

положение центромеры при сохранении порядка генов, авторы указывают на возможность возникновения новых центромер у каждого вида.

Принимая во внимание данные, полученные недавно при гибридизации регионспецифичных хромосомных ДНК библиотек норки с метафазными хромосомами человека и свиньи (Rubtsov et al, 2000), можно заключить, что хромосомы 12 свиньи и 17 человека отличаются как минимум 2 перестройки и измененное положение центромеры.

**Локализация генов THRA1, NF1, MPO, GLUT4, MYL4 на хромосому *hn* с использованием набора монохромосомных гибридных клонов бурозубка-мышь**



Результаты Zoo-FISH анализа показали

гомеологию хромосомы 17 человека с единственным районом в геноме бурозубки – частью плеча *h* (Dixkens et al., 1998). Это давало право надеяться, что использование ограниченного набора монохромосомных гибридов окажется эффективным для картирования у бурозубки группы генов хромосом 17 человека. Для локализации этих генов были использованы независимые клоны бурозубка-мышь C2-1, C2-3, C2-9 из панели (таб. 2), а так же непанельный клон K2-1, содержащий единственную хромосому бурозубки – *hn*, и его бэк-селектант, не содержащий эту

Рис. 5. ПЦР анализ ДНК бурозубки (1), мыши (2), клона C2-1 (3), и клона K2-1BS (4) с праймерами, специфичными для гена MPO. Клон 3 – положительный, а клон 4 – отрицательный по фракции бурозубки

хромосому. Результаты анализа гибридных клонов бурозубка-мышь на наличие перечисленных выше маркеров представлены в таблице 5.

**Таблица 5.** Результаты анализа гибридных клонов бурозубка-мышь на наличие 5 генов бурозубки.

Гибридные клоны	Название гена				
	THRA1	NF1	MPO	GLUT4	MYL4
C2-1*	+	+	+	+	+
C2-3	+	+	+	+	+
C2-9	+	+	+	+	+
K2-1	+	+	+	+	+
K2-1BS	-	-	-	-	-

\*Выделены клоны, содержащие единственную хромосому бурозубки – хромосому *hn*.

ПЦР продукты генов THRA1, NF1, MPO (рис. 5.), GLUT4, MYL4 различались по подвижности у бурозубки и мыши. Частичное

секвенирование ПЦР продукта гена MPO и THRA1 показало значительную (96% и 89% соответственно) гомологию с кДНК гомеологичных генов человека и овцы. Результаты анализа монохромосомных клонов бурозубка-мышь позволили сделать заключение о локализации этих генов в хромосоме *hn*.

### Локализация гена MYH2

Таблица 6. Сегрегация хромосом и маркеров бурозубки в гибридных клонах

Хромосома	ACADVL		MTMR4		MYH2	
	+	-	+	-	+	-
de +	2	12	2	12	7	7
-	5	0	5	0	4	1
bc +	2	3	2	3	3	2
-	5	9	5	9	8	6
af +	3	8	3	8	8	3
-	4	4	4	4	3	5
ik +	5	7	5	7	11	1
-	2	5	2	5	0	7
go +	1	3	1	3	4	0
-	6	9	6	9	7	8
jl +	3	5	3	5	7	1
-	4	7	4	7	4	7
hn +	7	0	7	0	5	2
-	0	12	0	12	6	6
m +	2	5	2	5	5	2
-	5	7	5	7	6	6
p +	2	3	2	3	4	1
-	5	9	5	9	7	7
q +	3	9	3	9	8	4
-	4	3	4	3	3	4
r +	4	10	4	10	10	4
-	3	2	3	2	1	4
tu +	4	10	4	10	9	5
-	3	2	3	2	2	3

Нам не удалось локализовать ген MYH2 на хромосому *hn*, используя ограниченный набор гибридных клонов, поэтому для локализации этого гена у бурозубки была использована полная панель гибридов соматических клеток бурозубка-мышь и бурозубка-китайский хомячок. Результаты анализа клонов представлены в таблице 6. Наиболее вероятной хромосомой для локализации гена MYH2 оказалась хромосома *ik*, при одном дискордантном клоне (SAS23) (табл. 2.) Дискордантность в данном случае может объясняться наличием не идентифицированной делеции в хромосоме *ik* клона.

### Локализация генов MTMR4 и ACADVL на хромосому *hn*

При локализации генов MTMR4 и ACADVL мы также использовали полную панель и дополнительные клоны. Результаты анализа панельных клонов по этим генам бурозубки представлены в таблице 6. Оказалось, что клоны, содержащие хромосому бурозубки *hn*, содержат и фракции ПЦР продуктов бурозубки для генов ACADVL и MTMR4, а клоны, не содержащие эту хромосому, были во всех случаях отрицательными. Таким образом, можно сделать заключение о локализации этих генов в хромосоме *hn*.



## Сравнительный анализ у бурозубки группы генов хромосомы 17 человека

Пять из картированных нами у бурозубки генов были из q плеча хромосомы 17 человека, а три – из p плеча. Учитывая ранее картированные на эту хромосому гены из синтенной группы хромосомы 17 человека (Pack et al., 1995; Malchenko et al., 1996), видно, что большая часть из них локализована в хромосоме *hn*, подтверждая данные zoo-FISH (Dixkens et al., 1998). Исключение составил ген MYH2, который был локализован нами на хромосому *ik*. У человека этот ген локализуется в терминальном районе p плеча: 17p13.1. Возможно, в ходе эволюции у бурозубки гены из этого района были перенесены в синтенную группу хромосомы *ik*. Чтобы уточнить район разрыва, мы картировали у бурозубки гены GLUT4 и ACADVL, локализованные у человека в районе 17p13. Оба этих гена были картированы на хромосому *hn*. Можно предположить, что точка хромосомного разрыва соответствует району хромосомы человека 17p13.1 между генами (GLUT4, ACADVL) и MYH2. Таким образом, у бурозубки, по-видимому, из синтенной ассоциации выпадает район 17pter-17p13.1, т.е. район размером меньше G полосы. Согласно данным zoo-FISH, *h* плечо хромосомы *hn* состоит из двух сегментов, один из которых гомеологичен хромосоме 17, а второй - хромосоме 11 человека. При этом зонд хромосомы 11 человека гибридизовался еще и с терминальным районом *k* плеча хромосомы *ik*. На основании полученных данных можно предположить, что в ходе эволюции кариотипов произошел реципрокный обмен хромосомных материалов, в результате чего в хромосоме *ik* бурозубки хромосомный материал, соответствующий району 17pter-p13.1 человека, оказался сцепленным с материалом хромосомы 11.

### Создание веб сайта "Shrew genome database"

В результате проделанной работы настоящая геномная карта бурозубки стала содержать 46 генов. Количество картированных генов из синтенной ассоциации хромосомы 17 человека возросло с 2 до 10. В обновленном виде карта бурозубки доступна на сервере "Shrew genome database" по адресу: <http://shrewbase.da.ru>. Этот сервер содержит всю имеющуюся информацию по картированию генома бурозубки: детали экспериментов, условия разделения биохимических маркеров, картированных у бурозубки ранее, последовательности использованных праймеров, данные по zoo-FISH анализу генома бурозубки (Dixkens et al., 1998), а также данные по локализации гомеологичных генов у человека и ссылки на базу данных OMIM.

## ВЫВОДЫ

1. Используя набор гибридов соматических клеток свинья-норка и свинья-китайский хомячок, проведена хромосомная и субхромосомная локализация 17 генов свиньи. Установлено, что гены *P4NB* и *PRKCA* локализируются в 12pter-p1.4; гены *RARA*, *ERBB2*, *HLR1*, *THRA1*, *MYL4*, *GAS*, *BRCA1*, *TOP2A* в 12p1.5-p1.0; гены *H3F3B* и *STAT5B* в р плече хромосомы 12, а *NF1*, *ENO3*, *LIS1*, *MCP1*, *CRYB1* были картированы в q плечо хромосомы 12.
2. Используя IMpRH панель, установлен порядок для 9-и генов *H3F3B*, *HLR1*, *MYL4*, *TOP2A*, *STAT5B*, *THRA1*, *MPO*, *MCP1*, *NF1* на радиационной карте хромосомы 12 свиньи.
3. На основе сопоставления данных по цитогенетическому и радиационному картированию хромосомы 12 свиньи и хромосомы 17 человека было выявлено изменение относительного положения центромеры и положения гена *MPO* в этих двух хромосомах. Сопоставление данных по картированию гомеологичных хромосом у свиньи, коровы, собаки, кошки, мыши и человека позволило выявить изменение порядка генов в хромосоме 17 человека относительно предкового для этих видов млекопитающих порядка генов.
4. Картировано 8 генов на цитогенетическую карту бурозубки обыкновенной. Гены *NF1*, *MYL4*, *THRA1*, *MTMR4*, *GLUT4*, *ACADVL*, *MPO* локализованы в хромосому *hn*. Ген *MYH2* локализован в хромосому *ik*. Создана геномная база данных, содержащая информацию обо всех генах картированных у бурозубки. База является публично доступной по средствам сети Интернет.
5. При сопоставлении данных по картированию генов *MYL4*, *THRA1*, *MTMR4*, *GLUT4*, *ACADVL*, *MPO*, *MYH2* у человека и бурозубки впервые выявлен район, выпадающий у бурозубки из синтенной ассоциации, локализованной в хромосоме 17 человека. Высказано предположение о реципрокном обмене хромосомного материала в ходе эволюции *Sorex araneus*.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Zhdanova N.S., Kuznetsov S.B., Plyusnina (Ivanova) E.V., Rybtsov N.B., Larkin D.M., Serdyukova N.A., Graphodatsky A.S. Regional localization of three genes on porcine chromosome 12. // 10th North American Colloquium on Gene Mapping and Cytogenetics in Human and Domestic Species Abstract Booklet. 1997. P.35.
2. Larkin D.M., Kuznetsov S.B., Kaftanovskaya E.M., Ivanova E.V., Zhdanova N.S. Mapping of several HSA17 genes in pigs, cattle, and sheep. // Plant and Animal Genome VI abstracts guide. 1998. P.109.
3. Кузнецов С.Б., Ларкин Д.М., Кафтановская Е.М., Иванова Е.В., Астахова Н.М., Черякуене О.В., Жданова Н.С. Хромосомная

локализация и анализ синтении некоторых генов у свиньи, коровы и овцы (отряд Artiodactyla) // Генетика. 1998. Т.34. С.1200-1204.

4. Larkin D.M., Serov O.L., Zhdanova N.S. Mapping of 5 genes from human chromosome 17 in chromosome *hn* of common shrew (*Sorex araneus*). // In Proceedings of the ISACC Fifth International Meeting. Bialowieza, Poland. 1999. P. 22.

5. Larkin D.M., Serov O.L., Borodin P.M., Zhdanova N.S., Searle J.B., Comparative mapping in mammals: the shrew genome map. // Acta Theriologica. 2000. V. 45. P. 131-141

6. Larkin D.M., Serov O.L., Zhdanova N.S. Mapping of 5 HSA17 genes to chromosome *hn* of common shrew (*Sorex araneus*). // Acta Theriologica. 2000. V. 45. P. 143-146.

7. Larkin, D., Serov O., Fokina, V., Zhdanova N. Mapping of HSA17 genes in the common shrew (*Sorex araneus*) // 27<sup>th</sup> International conference on animal genetics conference abstract book. Minneapolis. 2000. P.52.

8. Zhdanova, N.S., Larkin, D.M., Kuznetsov, S.B., Rubtsov, N.B. and Astakhova, N.M. The order of genes on porcine chromosome 12. // 27<sup>th</sup> international conference on animal genetics conference abstract book. Minneapolis. 2000. P.52.

9. Ларкин Д.М., Кузнецов С. Б., Астахова Н. М., Жданова Н. С. Использование ПЦР маркеров для картирования хромосомы 12 свиньи // Генетика (в печати)

Подписано к печати 28.09. 2000 г.

Формат бумаги 60 x 90 1/16. Печ. л. 1. Уч. изд. л. 0,7

Тираж 100 экз. Заказ 122.

---

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