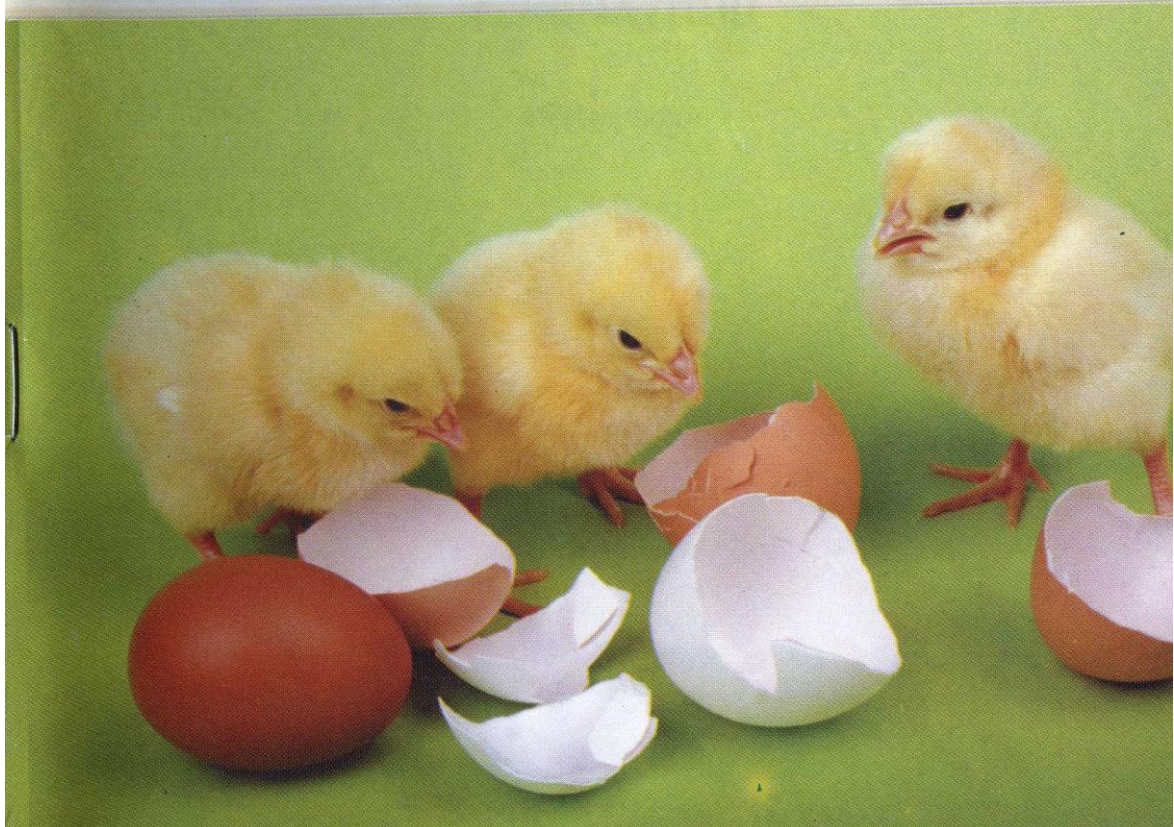


А.А. Сазанов

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ГЕНОМА ПТИЦ**



Ленинградский государственный университет
имени А.С. Пушкина

А. А. Сазанов

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ГЕНОМА ПТИЦ**

Монография

Санкт-Петербург
2010

УДК 575.113:577.21:598.2
ББК 28.64+28.693.35

Рецензенты: **Т. И. Кузьмина**, доктор биологических наук, профессор (Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных Российской академии сельскохозяйственных наук);

Я. М. Галл, доктор биологических наук, профессор (Ленинградский государственный университет имени А.С. Пушкина)

Сазанов А. А. Молекулярная организация генома птиц: моногр. / А. А. Сазанов. – СПб.: ЛГУ им. А.С. Пушкина, 2010. – 108 с.

ISBN 978-5-8290-0957-1

В монографии рассмотрены вопросы молекулярной организации генома птиц как представителей одного из наиболее многочисленных классов позвоночных животных. Сравнительный аспект в изложении данных о структуре и функции геномных последовательностей позволяет осветить наиболее существенные общие черты организации нуклеиновых кислот теплокровных животных.

Предназначена для широкого круга читателей: специалистов, студентов и преподавателей биологии, генетиков и селекционеров.

*Печатается по решению редакционно-издательского совета
Ленинградского государственного университета
имени А. С. Пушкина*

ISBN 978-5-8290-0957-1

© Ленинградский государственный университет (ЛГУ)
имени А. С. Пушкина, 2010

Оглавление

Предисловие	5
Список сокращений	6
<i>Глава 1.</i> Особенности кариотипа птиц	7
<i>Глава 2.</i> Генетические карты	18
<i>Глава 3.</i> Физические карты и интеграция генетических и физических карт	27
<i>Глава 4.</i> Геномные библиотеки	35
<i>Глава 5.</i> Отношения паралогии	48
<i>Глава 6.</i> Отношения ортологии	54
<i>Глава 7.</i> Композиционная гетерогенность ДНК и функциональная специализация геномных фракций	65
<i>Глава 8.</i> Особенности организации нуклеотидных последовательностей по данным геномного секвенирования.....	79
<i>Глава 9.</i> Геномика различных видов птиц	84
<i>Глава 10.</i> Локусы количественных признаков (QTL)	95
10.1. Картирование QTL.....	95
10.2. QTL яичной продуктивности	96
10.3. QTL мясной продуктивности.....	97
10.4. QTL устойчивости к болезням	99
10.5. QTL поведения	101
<i>Глава 11.</i> Функциональная геномика	105
Заключение.....	107

Предисловие

Генетика и молекулярная биология – атрибутивные базисные элементы общебиологического образования. Предметами этих научных дисциплин являются наследственность и изменчивость, функционирование биологических объектов и систем на уровне макромолекул – наиболее общие свойства живых организмов. Концептуальный характер этих дисциплин позволяет считать их точными науками наряду с математикой, физикой и химией. Таким образом, связывая биологию с другими естественнонаучными дисциплинами, генетика и молекулярная биология дают возможность формировать у студентов научное мышление. Освоение логики генетического анализа содействует развитию дисциплины научного мышления. Прикладное значение генетики и молекулярной биологии в медицине, биотехнологии и сельском хозяйстве стремительно возрастает, что настоятельно требует качественного повышения уровня генетического образования в средней школе.

Учебные дисциплины «Генетика с основами селекции» и «Молекулярная биология» в качестве своей неотъемлемой части включают геномику – науку о молекулярной организации генома. Современный период развития наук о жизни часто называют постгеномной эрой. То есть полагается, что весь блок биологических дисциплин основан на релизах полных сиквенсов геномов и геномных базах данных. Наряду с системной биологией, транскриптомикой и протеомикой геномика является – интенсивно развивающаяся область биологии. Это подразумевает необходимость привлечения в учебный процесс данных с передовых рубежей этой науки, обобщений результатов, опубликованных в многочисленных статьях и обзорах, в пределах компактной монографии.

В работе рассмотрены наиболее существенные, на взгляд автора, вопросы молекулярной организации генома птиц как представителей одного из самых многочисленных классов типа Vertebrata. Сравнительный аспект в изложении данных о структуре и функции геномных последовательностей позволяет осветить наиболее существенные общие черты организации нуклеиновых кислот теплокровных животных.

Таким образом, в представленной Вашему вниманию монографии автор постарался дать представление о современной геномике изнутри – от лица ученых-генетиков и молекулярных биологов, что, по мнению автора, будет способствовать более адекватному восприятию материала этих курсов, позволит получить углубленное понимание существа этих предметов.

Автор искренне благодарен Анне Львовне Сазановой, оказавшей бесценную помощь при подготовке рукописи к печати.

Список сокращений

АТ	– пара нуклеотидов аденин-тимин
ГЦ	– пара нуклеотидов гуанин-цитозин
кДНК	– комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
мРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота
пг	– пикограмм
п. н.	– пара нуклеотидов
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
т. п. н.	– тысяча пар нуклеотидов
сМ	– сантиморган
ЯОР	– район ядрышкового организатора
ВАС	– искусственная бактериальная хромосома
EST	– экспрессирующаяся нуклеотидная последовательность
FISH	– флуоресцентная гибридизация ДНК-ДНК <i>in situ</i>
FLpter	– фракционное расстояние от теломера короткого плеча хромосомы (выражается в долях единицы)
GGA	– хромосома курицы
GTP	– гуанозин-трифосфат
HSA	– хромосома человека
ORF	– открытая рамка считывания
OVERGO	– скринирование геномных библиотек путем гибридизации их клонов с 24-членными олигонуклеотидами, представляющими наиболее консервативные части кодирующих или маркерных последовательностей
QTL	– локус количественного признака
RBG	– репликационная R-окраска хромосом
SNP	– сайт мононуклеотидного полиморфизма
YAC	– искусственная хромосома дрожжей

Глава 1. Особенности кариотипа птиц

Среди позвоночных животных класс *Aves* отличается наибольшей консервативностью величины геномов: для изученных в этом отношении видов птиц содержание ДНК на клеточное ядро варьирует от 2,5 до 3,0 пг. Гаплоидный геном птиц в среднем состоит из $1,2 \times 10^9$ пар нуклеотидов, что в 2,75 раза меньше, чем у млекопитающих [1, 2]. Сравнительно низкое содержание ДНК в геномах птиц объясняют «необходимостью полета», а высокий эволюционный консерватизм этого показателя – монофилетическим происхождением класса *Aves* [3]. Высокий консерватизм геномных последовательностей ДНК и структуры кариотипа в пределах класса *Aves* был показан методом zoo-FISH (гетерологической гибридизации ДНК-ДНК *in situ* геномных последовательностей на хромосомах) [2]. Результаты гибридизации хромосомоспецифических ДНК-зондов домашней курицы на хромосомах эму *Dromaius novaehollandiae* свидетельствуют о значительной гомологии всех макрохромосом этих видов, несмотря на то, что они относятся к разным подклассам (*Neognathi* и *Paleognathi*, соответственно) и разошлись в ходе эволюции более 80 миллионов лет назад [2]. При гибридизации 45 макрохромосомных протяженных ДНК-клонов домашней курицы на хромосомах японского перепела было показано точное совпадение порядка расположения маркеров на хромосомах *Gallus gallus* и *Coturnix coturnix* с учетом незначительных хромосомных перестроек, по которым различаются кариотипы этих видов [4]. Ранее было показано, что первые три пары макрохромосом и половая Z-хромосома у четырех видов трех эволюционно неблизких отрядов (*Galliformes* – курообразные, *Columbiformes* – голубеобразные и *Musophagiformes* – бананоеды) имеют очень сходный рисунок G- / R- исчерченности и при этом не проявляют никакой гомологии с хромосомами черепах, змей и амфибий [5]. Ряд исследований с использованием методов дифференциального окрашивания хромосом на большом количестве видов показал уникально высокий для позвоночных животных эволюционный консерватизм кариотипов представителей класса *Aves* [6, 7, 8, 9, 10].

Содержание уникальных последовательностей у изученных в этом отношении видов птиц (80–84 %) по сравнению с млекопитающими (65–70 %) является очень высоким [11, 12]. При этом содержание сателлитной ДНК в геноме домашней курицы не превышает 3 %, в то время как у млекопитающих число последовательностей, характеризующихся высокой повторяемостью в геноме, составляет около 35 % от всего генома [11]. У японского перепела *Coturnix japonica* ГЦ богатая сателлитная ДНК составляет

5 % генома [13]. В 1972 г. Браун и Джонс [14] показали, что сателлитная ДНК локализуется в основном в микрохромосомах и в W-хромосоме домашней курицы и японского перепела. Микрохромосомы у *Gallus domesticus* являются в основном ГЦ-обогащенными, хотя некоторые авторы отмечают, что в некоторых микрохромосомах центромерные районы АТ обогащены [15].

Геном класса *Aves* занимает промежуточное положение между двумя основными типами интерсперсии (типами чередования уникальных и повторяющихся последовательностей) – так называемыми «*Drosophila*» и «*Xenopus*» [12].

Тип интерсперсии «*Xenopus*» характеризуется наличием коротких рассеянных в геноме уникальных последовательностей, фланкируемых повторяющимися последовательностями, вместе с которыми формируют блоки до 2300 п. н. длиной каждый. Этот вариант интерсперсии был найден у ряда растений и животных – как позвоночных, так и беспозвоночных. Тип интерсперсии «*Drosophila*» характеризуется наличием очень протяженных уникальных последовательностей, которые вместе с повторяющейся ДНК формируют блоки длиной до 40 т. п. н. Этот тип характерен для двукрылых и перепончатокрылых насекомых [12].

Промежуточный тип чередования уникальных и повторяющихся последовательностей, найденный у домашней курицы, характеризуется тем, что около 34 % имеющихся в геноме данного вида уникальных последовательностей вместе с фланкирующими их повторами образуют блоки размером до 7 т. п. н.; в то же время в геноме курицы содержится 38 % ничем не перемежающихся уникальных последовательностей, имеющих размер около 22 т. п. н. [12].

Главной отличительной особенностью кариотипов птиц является многочисленность и гетерогенность входящих в их состав хромосом. Ввиду того, что хромосомы в классе *Aves* различаются по размеру, их принято условно делить на две группы: группу макрохромосом, состоящую из шести – восьми пар относительно крупных по размеру (3–8 мкм) хромосом и группу микрохромосом – мелких трудноидентифицируемых хромосом (0,3–3 мкм) [14]. Проведенный Родионовым [16] анализ опубликованных кариотипов более 800 современных видов птиц показал, что практически все они имеют стандартный диплоидный набор хромосом ($2n=76-82$ обнаружено у 65 % видов) и типичную морфологию макрохромосом. Наименьшее среди всех птиц число хромосом ($2n=40$) встречается у авдотки обыкновенной (*Burhinus oedipnemus*), отряд ржанкообразных (*Charadriiformes*), а наибольшее ($2n=132$) – у

представителя отряда ракшеобразных (Coraciiformes) – зимородка обыкновенного (*Alcedo atthis*) [17]. Интересно, что различия по числу хромосом у птиц не всегда связаны с таксономическим положением. Так, у соколообразных (Falconiformes) Старого Света кариотип включает по 20–23 пары хромосом, а у соколов Нового Света – по 50–53 пары [18]. Следует отметить, что практически всегда в таких случаях число и морфология макрохромосом остаются неизменными, варьирует число и структура микрохромосом [19].

У всех изученных видов птиц хромосомный механизм определения пола – ZZ (самцы) и ZW (самки), т. е. в отличие от млекопитающих гомогаметным полом у птиц является мужской [20].

У единственного модельного объекта из числа птиц – домашней курицы *Gallus domesticus* – диплоидный набор состоит из 78 хромосом, 16 из которых макро-, а 62 микрохромосомы [21]. Исследование митотических хромосом домашней курицы при помощи дифференциального окрашивания выявило ряд интересных особенностей. При использовании С-метода дифференциальной окраски по Гимза-Романовскому была обнаружена неоднозначность выявления блоков гетерохроматина в прицентромерных областях макрохромосом (за исключением половой Z-хромосомы). С-положительные районы наиболее интенсивно окрашиваются в прицентромерных областях микрохромосом, а половая W-хромосома является полностью С-положительной [22].

При помощи G-метода дифференциальной окраски на митотических хромосомах курицы были выявлены достаточно четкие G-диски [23]. Полученный рисунок использовали для идентификации хромосомных районов и сигнала после изотопной гибридизации *in situ* [24].

Использование АТ-специфических флуорохромов (акрихин-иприт, Хехст 33258, ДАПИ) не позволило выявить отчетливых блоков гетерохроматина курицы. Полученная неоднородная флуоресценция была недостаточно информативна для анализа Q-исчерченности хромосом. По-видимому, картина Q-окраски хромосом птиц и рептилий является промежуточной между четкой Q-исчерченностью хромосом млекопитающих и монотонной флуоресценцией хромосом амфибий [25, 26].

Небольшие ярко светящиеся блоки гетерохроматина были выявлены после применения ГЦ-специфических антибиотиков хромомидина и оливомидина, причем самые яркие блоки гетерохроматина после этой окраски были обнаружены на половых Z- и W- хромосомах [26].

Хромонемная организация хромосом курицы выявляется при окрашивании нитратом серебра или при обработке гиалуронидазой.

Для хромонемы курицы, в отличие от млекопитающих, характерны следующие особенности: малый диаметр витка хромонемной спирали, меньшее число витков на плечо хромосомы и немонотонность спирали. В микрохромосомах хромонемная спираль не обнаружена. Возможно, у них вообще отсутствует надхромонемная организация [25].

В 1992 г. Понс де Леон с сотрудниками получили четкую картину репликационного R-окрашивания. RBA-окраска выявляется при окрашивании акридином оранжевым после введения 5'-бромдезоксидуридина и его включения на этапах раннего или позднего ДНК-синтеза в S-фазе клеточного цикла. Были получены рисунки ранней и поздней R-исчерченности, причем рисунок ранней R-исчерченности соответствовал рисунку, получаемому при G-окрашивании, а рисунок поздней R-исчерченности был обратным. Кроме макрохромосом, отчетливые R-блоки были обнаружены и в группе микрохромосом 8-12,W [24].

Исследования выявили значительную степень гомологии R-, C- и G- окрашенных хромосом у двух родственных видов – *Gallus domesticus* и *Coturnix coturnix* [27].

C-окрашенные кариотипы перепела *Coturnix coturnix* и курицы *Gallus domesticus* очень схожи между собой, но у перепела гетерохроматиновые блоки в центромерных регионах более четко выражены. Кроме того, у *Coturnix coturnix* короткие плечи аутосомной пары 4 полностью гетерохроматинизированы [27], и терминальные гетерохроматиновые блоки Z-хромосомы более узкие, чем у *Gallus domesticus* [28].

За исключением трех инверсий в хромосомах 1, 2 и 4 у перепела *Coturnix coturnix* G-окрашенные макрохромосомы данного вида демонстрируют высокую степень гомологии с таковыми у курицы [27]. Другие авторы отмечают, что у перепела наличествует еще одна инверсия – в Z-хромосоме [28]. Кроме того, у *Gallus domesticus* хромосомы 16 и 24, а у *Coturnix coturnix* хромосома 18 содержат позитивные R-диски, причем в хромосомах 16 и 18 соответственно в тех же дисках находятся ядрышкообразующие районы, но хромосома 24 у *Gallus domesticus* такового района не содержит [27]. Половая W-хромосома домашней курицы относится к группе микрохромосом GGA 10 – GGA 15, в то время как у японского перепела эта хромосома значительно крупнее и по размеру находится между третьей и четвертой хромосомами [27].

На наш взгляд, следовало бы остановиться более подробно на двух вопросах, связанных с изучением генома птиц: биологическая значимость микрохромосом и детерминация пола. Микрохромосомы встречаются в геномах разных видов птиц, большинства видов

рептилий и некоторых примитивных позвоночных. У птиц они могут рассматриваться как продукт минимизации генетического аппарата (поскольку у класса *Aves* самый маленький геном из наземных позвоночных), редукции повторов в результате процессов «разделения – слияния» согласно предложенной Буртом модели эволюции кариотипов [19]. Считается, что микрохромосомы могут представлять собой минимальные синтенные блоки хромосом. В настоящее время известно по крайней мере четыре древних синтении у птиц, рыб и млекопитающих, дивергировавших не менее 400 миллионов лет тому назад [19].

Долгое время существовали гипотезы, согласно которым функциональная нагрузка макро- и микрохромосом могла быть неравнозначной. Само понятие «микрохромосомы» было введено Оно в 1961 г. Некоторые авторы в 50–60-х годах нашего столетия не считали микрохромосомы истинными хромосомами и даже предлагали для них термин «хромозоиды» [20]. Позднее в работах Шмида и Клемента было показано, что при репликации включение H^3 -тимидина происходит как в макро-, так и в микрохромосомы [29, 30]. С использованием светового и электронного микроскопирования не было обнаружено разительного разрыва между макро- микрохромосомами по структуре и поведению в митозе и мейозе. Показано также, что хромосомы обеих групп одинаково окрашиваются по Фельгену и, следовательно, являются ДНК-содержащими структурами [31]. При изучении синаптонемального комплекса хромосом курицы были идентифицированы центромеры на макро- и микрохромосомах [32]. Этими же авторами была показана возможность вовлечения микрохромосом в реципрокные транслокации $t(Z; \text{микро})$ [33]. Структура мейотических бивалентов макро-микрохромосом типа «ламповых щеток» оказалась одинаковой [34]. Окончательно сомнения в том, что микрохромосомы являются полноценными в функциональном отношении, исчезли, когда на них были локализованы гены биологически важных признаков, такие как гены главного комплекса гистосовместимости (МНС), ядрышкообразующего района (ЯОР), кластера генов beta-подобных глобинов, онкогенов и т. п. [35].

У птиц, как и у других позвоночных, имеются короткие последовательности, характеризующиеся высоким содержанием ГЦ- пар – так называемые CpG-островки – короткие (около 1 т. п. н.) последовательности ДНК, как правило, связанные с промоторами генов [36, 37]. Они могут быть легко отделены от тотальной ДНК по высокому содержанию GC пар (65 %) и низкому уровню метилирования [38].

При помощи гибридизации *in situ* было показано, что CpG-островки концентрируются в основном в микрохромосомах; в макрохромосомах их значительно меньше (почти в шесть раз), что, возможно, связано с более низкой концентрацией генов в этой группе хромосом [37]. Все вышеизложенное дает основания считать макрохромосомы настоящими хромосомами, отличающимися от макрохромосом лишь по размеру и характеру компактизации. На микрохромосомы приходится по разным оценкам 18–30 % всего генома домашней курицы [39, 40], кроме того, они проявляют многие косвенные признаки повышенной концентрации генов, свойственные T-дискам млекопитающих. К таким признакам относятся: репликация в первой половине фазы S клеточного цикла [24], низкий уровень метилирования ГЦ-пар оснований [36], гиперацетилирование гистонов [37]. Существенно различается и частота рекомбинации в макро- и микрохромосомах – один кроссинговер на 30 и 12 миллионов пар оснований, что соответственно в 2 и 5 раз меньше, чем у млекопитающих [41]. Относительная ГЦ-обогащенность, свойственная районам с высокой плотностью генов в хромосомах млекопитающих, совсем не очевидно должна быть характерна для подобных районов хромосом птиц, поскольку гетерохроматин у представителей класса *Aves* является ГЦ-богатым. В исследованиях группы А.В. Родионова показано, что эухроматиновая составляющая микрохромосом представлена преимущественно ГЦ-богатой ДНК R-блоков и, возможно, корреляция композиционного состава и генетической активности районов хромосом свойственна всем теплокровным животным [16]. В настоящее время на основании данных физического картирования около 200 маркеров первого типа (кодирующих последовательностей ДНК) показано, что около двух третей генов находятся на микрохромосомах [40].

Таким образом, исследование особенностей структурно-функциональной организации микрохромосом может оказаться полезным как для выявления минимально необходимых элементов эукариотических хромосом, так и для эволюционной кариологии позвоночных животных.

Вопросы детерминации пола и компенсации дозы генов у птиц, обладающих ZW-хромосомным типом определения пола, остаются не ясными. Одна из наиболее известных гипотез была сформулирована Чандрой в 1994 г. [42], по её мнению, половые хромосомы птиц несут одинаковый набор определяющих пол генов в условиях отсутствия дозовой компенсации Z- и инактивации W-хромосомы (факультативной гетерохроматизации) при нормальном развитии. Считается, что у птиц в отличие от млекопитающих нет прогонадной стадии дифференцировки –

гонадный бугорок непосредственно развивается в направлении тестисов или яичников [43]. Не существуют решающих аргументов в пользу генетического (по типу млекопитающих) или хромосомного (балансового, по типу дрозофилы) механизма определения пола у птиц. Предполагается, что Z и W хромосомы птиц эволюционировали от одной пары аутосом общего предка теплокровных животных, но другой, чем X- и Y-хромосомы млекопитающих [44]. По структурно-функциональным чертам W-хромосома проявляет сходство с Y-хромосомой млекопитающих, для них характерна сравнительная обедненность кодирующими последовательностями и обилие гетерохроматина. Всего на W хромосоме локализовано четыре гена SPINW (спиндлина) [45], PKCIW (протеинкиназы C) [46, 47], CHD1W (белка, связывающего комплекс хромохеликаза-ДНК) и ATP5A1W (АТФ-синтетазы 5A) [44], все они находятся в псевдоаутосомной области W хромосомы и, следовательно, ранее были представлены на предковой аутосоме [44]. Только один ген PKCIW, кодирующий специфическую форму протеин киназы C, существенно отличается от своего Z-хромосомного гомолога PKC1Z и других протеин киназ содержанием уникальных Leu- и Arg богатых областей и отсутствием гистидиновых триад [46, 47]. В отношении вопроса компенсации дозы генов была выполнена работа [48], в которой с помощью FISH была продемонстрирована равная активность пяти Z- хромосомных аллелей генов IREBP (белка, связывающего железо), ALDOB (альдолазы B) и CHRNB3 ($\beta 3$ полипептида холинэргического рецептора). По всей видимости, характерная для млекопитающих компенсация дозы генов на уровне транскрипции у птиц отсутствует, что не исключает того, что она может иметь место на посттранскрипционном или трансляционном уровне. Некоторые доводы относительно возможности существования механизма дозовой компенсации у птиц представлены в работе Тераниши и сотрудников [49]. В ней выявлен участок в Z хромосоме – MNM (мужской гиперметилированный район), содержащий около 200 копий 2, 2 т. п. н. кодирующей последовательности и гиперметилированные CpG участки. При этом транскрипция высокомолекулярной полиА-иРНК наблюдается только с единственной Z хромосомы у самок [50, 51]. Важно отметить, что внутрихромосомная локализация MNM совпадает с цитогенетической позицией DMRT1 (DM-подобный домен, который вовлечен в процессы дифференцировки пола у млекопитающих и у рыб [52]) на Z хромосоме, и можно предположить, что его функция заключается в том, чтобы этому гену, по всей видимости связанному с определением пола, избежать компенсации. Какую-то роль в этом процессе играет W хромосома. По данным Тераниши и

соавторов [49] у интерсексов ZZW наблюдается гипометилирование и транскрипция МНМ, а у самцов ZZZ – гиперметилирование и отсутствие транскрипции. Из генов W хромосомы только РКС1W, существенно отличающийся от своего гомолога на Z-хромосоме РКС1Z, теоретически может как-то взаимодействовать с МНМ областью [53]. Хотелось бы еще раз подчеркнуть, что молекулярно-генетические механизмы определения пола у птиц во многом остаются неясными.

Таким образом, все перечисленные особенности геномов птиц придают результатам исследований по картированию и изучению экспрессии генов особое биологическое значение. Поиск возможного функционального сходства с геномами млекопитающих поможет объяснить общие закономерности контроля биологически важных признаков у теплокровных животных.

Список литературы

1. Guillier-Gencik Z. etc. Generation of whole – chromosome painting probes specific to each chicken macrochromosome / Z. Guillier-Gencik, A. Bernheim and Ph. Coullin // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1999. – V. 87. – P. 282–285.
2. Shetty S. etc. Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution / S. Shetty, D. K. Griffin and G. J. A. Marshall // *Chromosome Research.* – 1999. – V. 7. – P. 289–295.
3. Kadi F. etc. The compositional patterns of the avian genomes and their evolutionary implications / F. Kadi, D. Mouchiroud, G. Sabeur, G. Bernardi // *J. Mol. Evol.* – 1993. – V. 37. – P. 544–551.
4. Shibusawa M. etc. A comparative cytogenetic study of chromosome homology between chicken and Japanese quail / M. Shibusawa, S. Minai, C. Nishida-Umehara etc. // *Cytogenet. Cell Genet.* 2001. – V. 95. – P. 103–109.
5. Stock A.D. etc. Chromosome banding pattern conservatism in birds and nonhomology of chromosome banding patterns between birds, turtles, snakes and amphibians / A. D. Stock, G. A. Mengden // *Chromosoma.* – 1975. – V. 50. – P. 69–77.
6. Takagi N. etc. A phylogenetic study of bird karyotypes / N. Takagi, M. Sasaki // *Chromosoma.* – 1974. – V. 46. – P. 91–120.
7. Stock A.D. etc. Chromosome homology in birds: banding patterns of the chromosomes of the domestic chicken, ring-necked dove, and domestic pigeon / A. D. Stock, F. E. Arrighi, K. Stefos // *Cytogenet Cell Genet.* – 1974. – V. 13. – P. 410–418.
8. Au W. etc. Identification of the sex chromosomes in the bald eagle / W. Au, N. S. Fechheimer, S. Soukup // *Can. J. Genet. Cytol.* 1975. – V. 17. – P. 187–191.
9. de Lucca E.J. Karyotyping of 8 species of birds / E. J. de Lucca // *Rev. Bras. Biol.* – 1974. – V. 34. – P. 387–391.
10. de Boer L.E. etc. Cytotaxonomy of the Ciconiiformes (Aves), with karyotypes of eight species new to cytology / L. E. de Boer, J. M. van Brink // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1982. – V. 34. – P. 19–34.

11. Oloffson B. etc. Organization of nucleotide sequences in the chicken genome / B. Oloffson, G. Bernardi // *Eur. J. Biochem.* – 1983. – V. 130. – P. 241–245.
12. Stevens L. Gene structure and organization in the Domestic Fowl (*Gallus domesticus*) / L. Stevens // *The WPSA Journal.* – 1986. – V. 42. – P. 232–238.
13. Comings D.E. Studies of microchromosomes and a G-C rich DNA satellite in the quail / D. E. Comings, E. Mattoccia // *Chromosoma.* – 1970. – V. 30. – P. 202–214.
14. Shoffner R. N. Chromosomes of Birds / R. N. Shoffner // *The Cell Nucleus.* – 1974. – V. 2. – P. 223–261.
15. Fillon V. etc. Identification of 16 chicken microchromosomes by molecular markers using two – colour fluorescence in situ hybridization (FISH) / V. Fillon, M. Morrison, R. Zoorob etc. // *Chromosome Research.* – 1998. – V. 6. – P. 307–313.
16. Родионов А.В. Цитогенетика domesticированных птиц: физические и генетические карты хромосом и проблема эволюции кариотипа: автореф. дис. д-ра биол. наук / А. В. Родионов. – СПб.: СПбГУ, 2001. – 42 с.
17. Christidis L. Aves. In: *Animal Cytogenetics.* Ed. by John B., Kayano H., Levan A. – 1990. Berlin. Gebrueder Borntraeger. – 356 p.
18. Tegelstrom H. etc. Rate of karyotype evolution and speciation in birds / H. Tegelstrom, T. Ebenhard, H. Rytman // *Hereditas.* – 1983. – V. 98. – P. 235–239.
19. Burt D.W. Origin and evolution of avian microchromosomes / D. W. Burt // *Cytogenet. Genome Res.* – 2002. – V. 96. – P. 97–112.
20. Ohno S. etc. Nuclear organization of microchromosomes *Gallus domesticus* / S. Ohno, C. Christian, C. Stenins // *Exp. Cell Res.* – 1962. V. – 27. – P. 612–614.
21. Bitgood J.J. etc. Linkage relationships and gene mapping / J. J. Bitgood, R. G. Somes // In: *Poultry Breeding and Genetics* (R.D. Crawford ed.). Elsevier: Amsterdam, 1990. – P. 469–495.
22. Wang N. etc. Trypsin G- and C-banding for interchange analysis and sex identification in the chicken / N. Wang, R. N. Shoffner // *Chromosoma.* – 1974. – V. 47. – P. 61–69.
23. Show E.M. etc. Mapping of the growth hormone gene by in situ hybridization to chicken chromosome 1 / E. M. Show, R. N. Shoffner, D. N. Foster etc. // *J. Hered.* – 1991. – V. 82. – P. 505–508.
24. Ponce de Leon F.A. etc. Early and late replicative chromosomal banding patterns of *Gallus domesticus* / Ponce de Leon F.A., Y. Li and Z. Weng // *Journal of Heredity.* – 1992. – V. 83. – P. 36–42.
25. Родионов А. В. Цитохимический анализ молекулярной гетерогенности хромосом курицы: дис. канд. биол. наук / А. В. Родионов. – Л.: ВНИИРГЖ, 1985.
26. Sumner A.T. etc. The distribution of genes on chromosomes: a cytological approach / A. T. Sumner, de la Torre J., L. Stuppia // *J. Mol. Evol.* – 1993. – V. 37. – P. 117–122.
27. Schmid M. etc. Chromosome banding and DNA replication patterns in bird karyotypes / M. Schmid, E. Enderle, D. Schindler etc. // *Cytogenet Cell Genet.* – 1989. – V. 52. – P. 139–146.
28. Stock A.D. etc. The evolutionary implications of chromosome banding pattern homologies in the bird order Galliformes / A. D. Stock, T. D. Bunch // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1982. – V. 34. – P. 134–148.

29. Schmid W. DNA replication patterns of the heterochromosomes in *Gallus domesticus* / W. Schmid // *Cytogenetics*. – 1962. – V. 1. – P. 344–352.
30. Clement W.M.J. DNA replication patterns in the chromosomes of the domestic fowl / W. M. J. Clement // *Cytologia*. (Tokyo). – 1971. – V. 36. – P. 168–172.
31. Bloom S. E. etc. Ammoniacal silver staining of embryonic chicken cells and chromosomes / S. E. Bloom, E. G. Buss // *Poult. Sci.* – 1969. – V. 48. – P. 1114–1116.
32. Kaelbling M. etc. Synaptonemal complexes and the chromosome complement of domestic fowl, *Gallus domesticus* / M. Kaelbling, N. S. Fechheimer // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1983a. – V. 35. – P. 87–92.
33. Kaelbling M. etc. Synaptonemal complex analysis of chromosome rearrangements in domestic fowl, *Gallus domesticus* / M. Kaelbling, N.S. Fechheimer // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1983b. – V. 36. – P. 567–572.
34. Hutchison N. Lampbrush chromosomes of the chicken, *Gallus domesticus* / N. Hutchison // *J. Cell Biol.* – 1987. – V. 105. – P. 1493–1500.
35. Ponce de Leon F.A. etc. Physical map of the chicken / Ponce de Leon F.A., D. W. Burt // In: *Manipulation of the avian genome*. – 1993. – P. 203.
36. McQueen H.A. etc. CpG islands of chicken are concentrated on microchromosomes / H.A. McQueen, J. Fantes, S. H. Cross etc. // *Nat. Genet.* – 1996. – V. 12. – P. 321–324.
37. McQueen H. A. etc. Chicken microchromosomes are hyperacetylated, early replicating, and gene rich / H. A. McQueen, G. Siriaco, A. P. Bird // *Genome Research*. – 1998. – V. 8. – P. 621–628.
38. Cross S.H. etc. CpG islands and genes / S. H. Cross, A. P. Bird // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 1995. – V. 5. – P. 309–314.
39. Schmid M. etc. First report on chicken genes and chromosomes 2000 / M. Schmid, I. Nanda, M. Guttenbach etc. // *Cytogenet. Cell Genet.* – 2000. – V. 90. – P. 169–218.
40. Smith J. etc. Differences in gene density on chicken macrochromosomes and microchromosomes / J. Smith, C. K. Bruley, I. R. Paton etc. // *Animal Genetics*. – 2000. – V. 31. – P. 96–103.
41. Rodionov A.V. Micro versus macro: a review of structure and function of avian micro- and macrochromosomes / A. V. Rodionov // *Genetika*. – 1996. – V. 32. – P. 597–608.
42. Chandra H. S. Proposed role of W chromosome inactivation and the absence of dosage compensation in avian sex determination / H. S. Chandra // *Proc. Roy. Soc. Lond. B*. – 1994. – V. 258. – P. 79–82.
43. Clinton M. Sex determination and gonadal development: a bird's eye view / M. Clinton // *J. Exp. Zool.* – 1998. – V. 281. – P. 457–465.
44. Ellegren H. etc. Multiple and independent cessations of recombination between avian sex chromosomes / H. Ellegren, A. Carmihael // *Genetics*. – 2002. – V. 158. – P. 525–531.
45. Itoh Y. etc. Chicken spindin genes on W and Z chromosomes : transcriptional expression of both genes and dynamic behavior of spindlin in interphase and mitotic cells / Y. Itoh, T. Hori, H. Saitoh etc. // *Chromosome Res.* – 2001. – V. 9. – P. 283–289.

46. O'Neill M. etc. ASW: a gene with conserved avian linkage and female specific expression in chick embryonic gonad / M. O'Neill, M. Binder, C. Smith etc. // *Dev. Genes Evol.* – 2000. – V. 210. – P. 243–249.
47. Hori T. etc. Wpkci, encoding an altered form of PKCI is conserved widely on the avian W chromosome and expressed in early female embryos: implication of its role to female sex determination / T. Hori, S. Asakawa, Y. Itoh etc. // *Mol. Biol. Cell.* – 2000. – V. 11. – P. 3645–3660.
48. Kuroda Y. etc. Absence of Z chromosome inactivation for five genes in male chicken / Y. Kuroda, N. Arai, M. Arita etc. // *Chromosome Res.* – 2001. – V. 9. – P. 457–468.
49. Teranishi M. etc. Transcripts of the MHM region on the chicken Z chromosome accumulate as non-coding RNA in the nucleus of female cells adjacent to the DMRT1 locus / M. Teranishi, Y. Shimada, T. Hori etc. // *Chromosome Research.* – 2001. – V. 9. – P. 147–165.
50. Ellegren H. Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex chromosomes / H. Ellegren // *TREE.* – 2000. – V. 13. – P. 188–192.
51. Smith C. etc. Sex determination in the chicken embryos / C. Smith, A. Sinclair // *J. Exp. Zool.* – 2001. – V. 290. – P. 691–699.
52. Smith C.A. etc. DMRT1 Is Upregulated in the Gonads During Female-to-Male Sex Reversal in ZW Chicken Embryos / C. A. Smith, M. Katz, A. H. Sinclair // *Biol. Reprod.* – 2003. – V. 68. – P. 560–570.
53. Ellegren H. Dosage compensation: do birds do it as well? / H. Ellegren // *Trends in Genetics.* – 2002. – V. 18. – P. 25–28.

Глава 2. Генетические карты

Инструментом анализа генотипической структуры вида и своеобразным путеводителем по геному являются генетические и физические карты хромосом.

Несмотря на то, что представитель класса *Aves* – домашняя курица – стала первым объектом генетики животных [1], ограниченное число молекулярно-цитогенетических работ было проведено на небольшом числе видов птиц. Генетические и физические карты хромосом птиц, являющиеся своего рода путеводителем по геному, остаются сравнительно малонасыщенными и по настоящее время [2]. Наиболее изученным с генетической точки зрения видом птиц является домашняя курица *Gallus gallus*, что определяется как хозяйственным значением этого вида, так и удобством ее использования в качестве модельного лабораторного объекта [3]. Способность к размножению круглый год и сравнительно быстрая смена поколений существенно упрощает эксперименты по гибридологическому анализу. Детальная информация по биологии развития этого вида позволяет обсуждать генетические данные в общебиологическом контексте.

Первая работа по сцеплению гена *BARR* с признаком пола была опубликована Спиллманом в 1908 г. [4], а в 1928 г. было установлено сцепление двух аутосомных маркеров *R* (*rose comb*) и *CP* (*creeper*) [5]. Систематические исследования по картированию хромосом курицы начались на подмосковной станции Аниково под руководством Александра Сергеевича Серебровского в 1919 г. Как первое обобщение данных по сцеплению генов домашней курицы были опубликованы генетические карты, включающие двенадцать маркеров, распределенных по четырем группам сцепления, и четыре маркера, проявляющих независимое наследование [6] (рис. 1). И только через шесть лет появилась аналогичная публикация зарубежных авторов [7] (рис. 2). Следует отметить, что незаслуженно забытые на Западе генетические карты группы А.С. Серебровского оказались более точными. Так, локус *NA* (*naked neck*), отнесен Хаттом к группе сцепления III (*GGA 1*) [7], в то время А.С. Серебровский и С.Г. Петров отмечали независимое с маркерами третьей группы сцепления (хромосома 1) наследование этого гена [6]. В 2000 г. была установлена локализация гена *NA* в *GGA 3* [8]. К сожалению, Хатт не ссылается на карты А.С. Серебровского и С.Г. Петрова и цитирует их данные по сцеплению генов домашней курицы в общем перечне использованной литературы [6].

Последняя по времени публикация классических (основанных на морфологических, биохимических и цитогенетических точках разрыва хромосом при транслокациях – маркерах) генетических карт домашней курицы относится к 1993 г. [9]. Она включает 136 локусов, из которых 49 картированы внутри семи аутосомных групп сцепления и на половой Z-хромосоме (рис. 3). Кроме того, 71 локус на этих картах отнесен к какой-либо хромосоме (включая 18 микрохромосомных локусов), и для 16 локусов показано попарное сцепление [9].

К началу 1990-х гг. из 40 возможных групп сцепления (38 аутосом и две половые хромосомы) было известно лишь 10, причем только для шести из них была определена хромосомная локализация. Не были соотнесены с соответствующими хромосомами группы сцепления I, II, IV и VI, не были известны группы сцепления, соответствующие макрохромосомам 2, 3, 4, 5 [10].

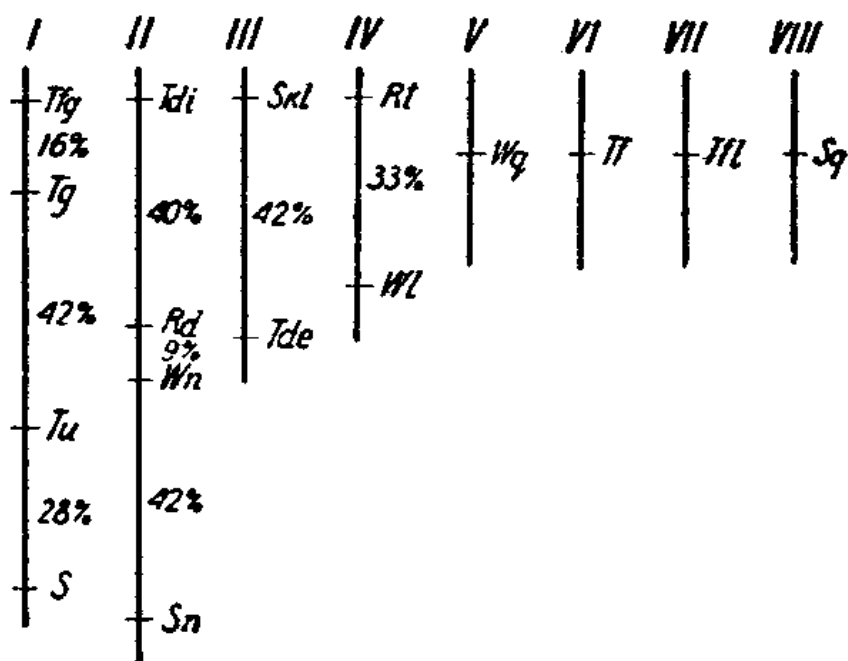


Рис. 1. Первые генетические карты домашней курицы, опубликованные Серебровским и Петровым в 1930 [6]

TENTATIVE CHROMOSOME MAP
FOR THE FOWL

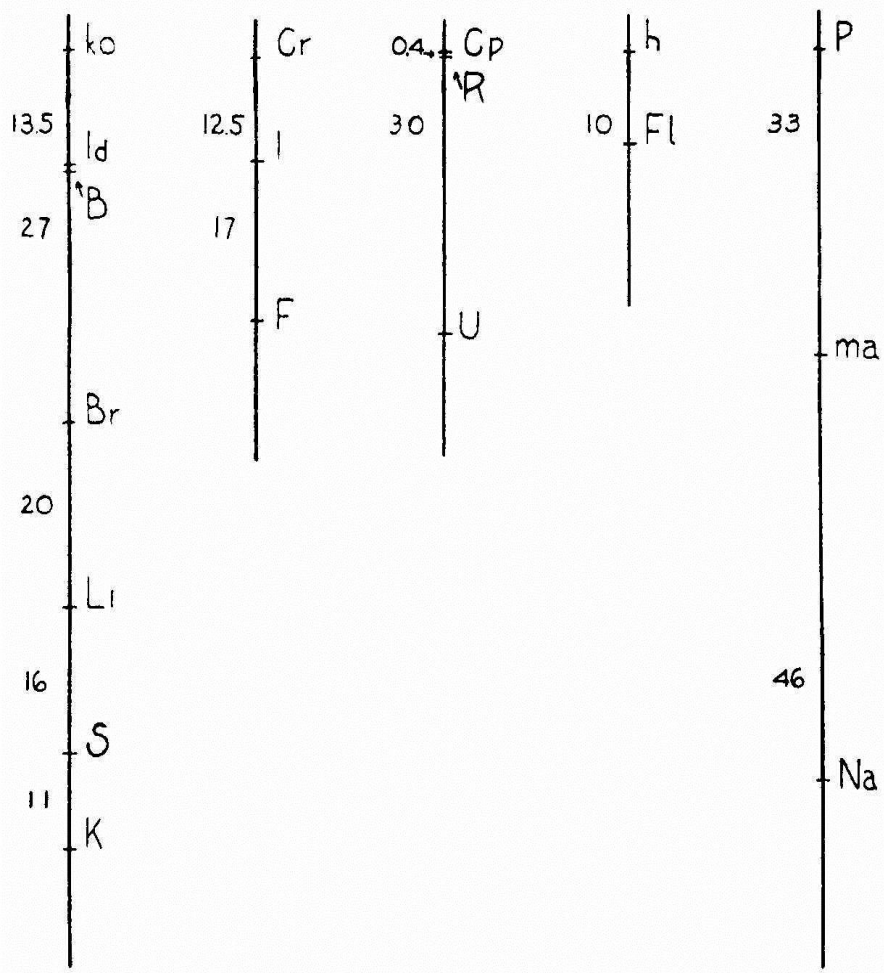


Рис. 2. Вторая по времени опубликования генетическая карта хромосом домашней курицы [7].

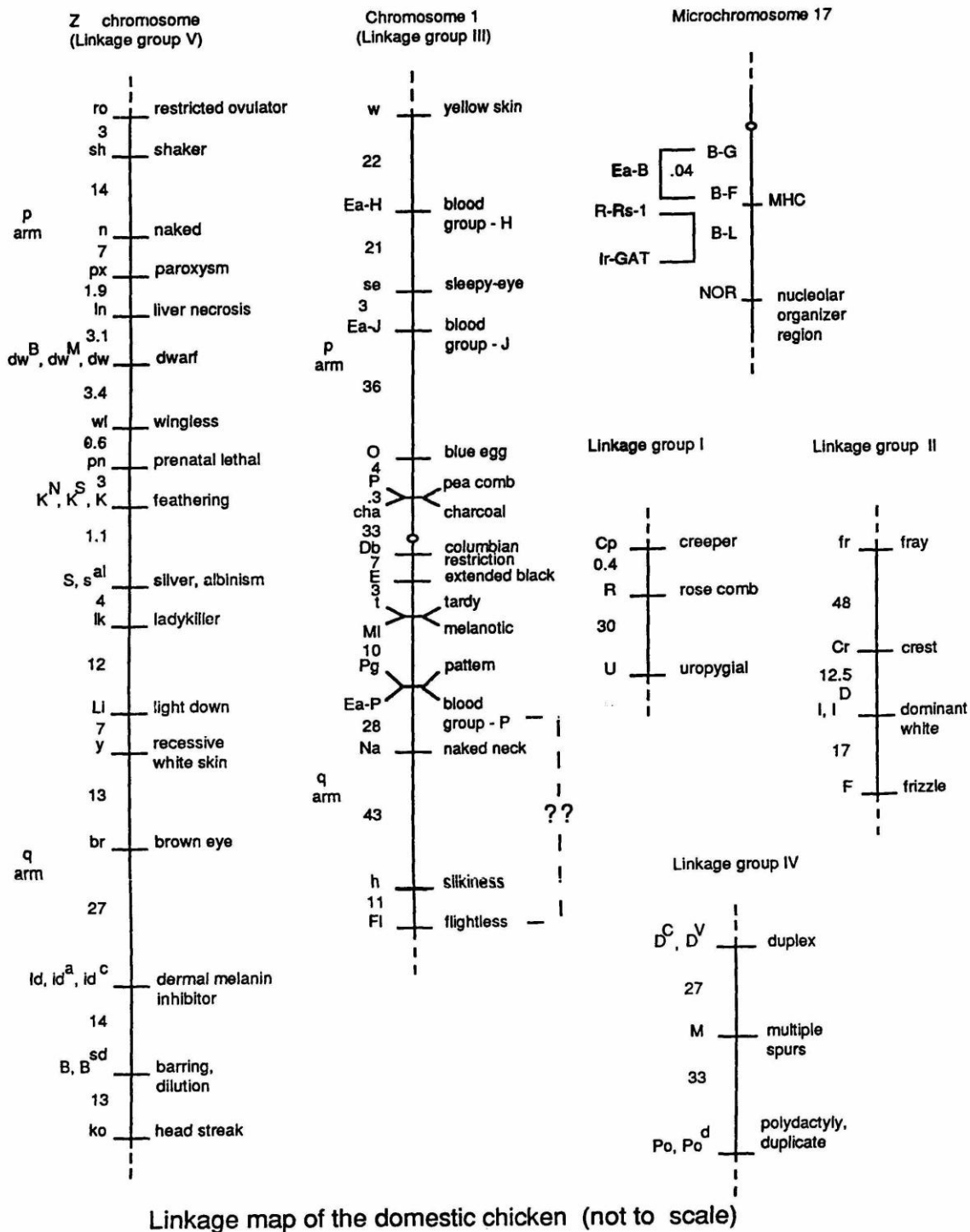


Рис. 3. Последняя по времени публикации классическая генетическая карта домашней курицы [10]

Качественно новый этап развития генетических карт домашней курицы начался с появлением молекулярных маркеров — микросателлитных последовательностей ДНК, полиморфных

рестрикционных фрагментов (ПДРФ), фрагментов амплификационного полиморфизма (RAPD) и сателлита CR1. Применение полиморфных ДНК-маркеров позволило построить три новые генетические карты хромосом курицы, включавшие в общей сложности 50 групп сцепления [11].

В 1992 г. Бамстидом и Палигой была построена генетическая карта курицы, включавшая 18 групп сцепления, названных Комптоновскими по местоположению института здоровья птиц (Compton) в Великобритании, и 22 локуса, не проявлявших сцепления с другими маркерами [12]. Исследователи работали с линиями кур, устойчивых (линия N) и чувствительных (линия 151) к сальмонеллезу. Из ДНК линии N, используя набор семи рестриктаз, были получены фрагменты, клонированные в плазидах *E. Coli*. После этого авторы проводили блот-гибридизацию по Саузерну клонированных последовательностей с тотальной ДНК родительских форм и гибридов F₁, выявляя полиморфные локусы. Было проведено возвратное скрещивание двух самок F₁ с одним и тем же самцом линии 151. Такой небольшой объем выборки должен был исключить влияние индивидуального полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. У потомков возвратного скрещивания (N=56) выявляли сцепление маркеров ПДРФ и определяли рекомбинационное расстояние между ними. На основании данных по сцеплению и рекомбинации маркеров ПДРФ были построены 18 групп сцепления.

Другая генетическая карта, названная Ист-Лансингской по местоположению Мичиганского университета (East Lansing) в США, была построена на основе генетического анализа гибридов частично инбредной линии UCD001 джунглевой курицы и высокоинбредной линии UCD003 домашней курицы породной группы Белый Леггорн с использованием 71 полиморфного ДНК-маркера (включая ПДРФ, RAPD, CR), шести морфологических (окраска оперения) и трех биохимических (группы крови) маркеров. Проанализировано 52 потомка возвратного скрещивания гибридов F₁. Такой подход позволил авторам идентифицировать 22 группы сцепления и установить соответствие двух из них с хромосомами 1 и Z [13].

Третья генетическая карта была построена в университете голландского города Вагенинген (Wageningen) на основе анализа расщепления полиморфных ДНК-маркеров у 456 особей поколения F₂ от скрещивания двух высокоинбредных бройлерных линий, ведущих происхождение от породы Белый Плимутрок [14]. Выявлено 20 групп сцепления. Следует отметить, что число потомков возвратного скрещивания в Ист-Лансингской и Комптоновской реферативных популяциях – 52 и 56 соответственно – позволяет достичь среднего разрешения 5–7 cM, в то время как при 456 гибридах второго поколения в

Вагенингеновской популяции среднее разрешение карты приближается к 1 сМ [15].

Три генетические карты были интегрированы в одну консенсусную с использованием маркеров, «заякоренных» на каждой из них [16]. Данная карта включает в свой состав 1889 локусов. Из них 450 объединены в 50 групп сцепления. 1409 локусов не включены ни в какую-либо группу сцепления. Общая длина карты составляет 3800 сМ, что значительно больше ранее определенного размера генома курицы. Несмотря на то, что физический размер генома курицы в три раза меньше, чем у млекопитающих, генетическая карта этого объекта сравнима по длине с таковой большинства млекопитающих. Карта содержит 350 маркеров, имеющих в своем составе экспрессирующиеся последовательности (ETS), 235 из которых представлены известными генами с известной локализацией. На рис. 4 показана консенсусная генетическая карта хромосомы 1. Однако специфика используемых для построения генетических карт линий и маркеров, несколько затрудняет экстраполяцию данных, полученных в разных исследованиях, на вид *Gallus gallus* в целом [16]. Часто на разных картах не совпадают не только расстояния между маркерами, но даже их порядок [15].

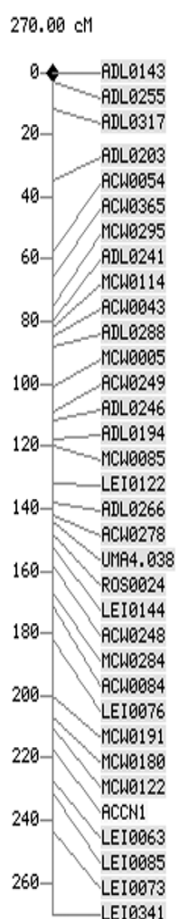


Рис. 4. Консенсусная генетическая карта хромосомы 4 домашней курицы [15]

Кроме перечисленных выше, существуют также Австралийские (36 ДНК-маркеров) [17] и Лейкастерские (22 микросателлитных локуса) [18] карты групп сцепления. В отличие Комптоновской, Ист-Лансингской и Вагенингеновской они не получили широкого распространения, хотя некоторые маркеры этих карт используются для анализа сцепления в трех основных реферативных популяциях [15].

Существуют еще две возможности развития генетических карт, связанные с радиационными гибридами и EST маркерами [3]. Обе они начали реализовываться и применительно к *Gallus domesticus*. Дополнительный материал для генетического картирования дают радиационные гибриды, точнее, WGRH (полногеномные радиационные гибриды, whole-genome radiation hybrids) панели. Разрешение таких панелей выше, чем при рекомбинационном картировании, зависит от дозы, и для создания таких карт не требуется использования полиморфизма. Недавно удалось получить гибридную панель, используя эмбриональные фибробласты курицы, облученные дозой 6000 рад, и мутантные по HPRT клетки китайского хомячка. Было отобрано 90 из 452 клонов со средней частотой сохранения куриных хромосом 21,9 %. Однако для двух наибольших макрохромосом не удалось достигнуть желательного для эффективности применения панели 20-процентного уровня. Из каждого гибрида экстрагируется более чем 3 мг ДНК, что достаточно для 150000 ПЦР реакций. Авторы считают такую панель подходящей для картирования генов и построения ВАС контигов [19].

В недавно опубликованной работе [20] сообщается о накоплении коллекции из 339314 ESTs, полученных из 64 кДНК библиотек, приготовленных из 21 ткани взрослых кур и эмбрионов. Эти последовательности организованы в 85486 контигов, причем 38 % из таковых содержат ортологи для генов у других объектов и около 180000 новых генов курицы. По оценке, выполненной этими исследователями, у *Gallus gallus domesticus* приблизительно 380000 генов. Накопленная коллекция EST будет, безусловно, полезна для анализа генома этого объекта и дальнейшего прогресса его картирования.

Кроме домашней курицы, известны данные по генетическому картированию еще у двух видов птиц – индейки и японского перепела.

Генетические карты индейки *Melagris gallopavo* включают 18 аутосомных (общая длина 540,1 сМ, всего 67 полиморфных ДНК-маркеров) и карту половой Z-хромосомы (один ДНК-маркер, сцепленный с признаком пола) [2].

Для японского перепела *Coturnix coturnix* обнаружено 50 информативных полиморфных ДНК-маркеров, которые могут быть использованы для построения генетических карт [21], и показана неприменимость праймеров микросателлитных локусов домашней курицы [22].

Список литературы

1. Bateson W. etc. Experimental studies in the physiology of heredity / W. Bateson, E. R. Saunders // Reports to the Evolution Committee of the Royal Society I. – 1902. – P. 1–160.
2. www.thearkdb.org.
3. Brown W.R. etc. The chicken as a model for large-scale analysis of vertebrate gene function / W. R. Brown, S. J. Hubbard, C. Tickle etc. // Nat. Rev. Genet. – 2003. – V. 4. – P. 87–98.
4. Spillman W. J. Spurious allelomorphism: results of some recent investigations / W. J. Spillman // American Naturalist. – 1908. – V. 42. – P. 610–615.
5. Serebrovsky A. S. etc. A case of close autosomal linkage in the fowl / A.S. Serebrovsky, S. G. Petrov // J. Heredity. – 1928. – V. 19. – P. 306–315.
6. Serebrovsky A.S. etc. On the composition of the plan of the chromosomes of the domestic hen / A. S. Serebrovsky, S. G. Petrov // Zhurn. Exp. Biol. – 1930. – V. 6. – P. 157–180.
7. Hutt F.B. Genetics of the fowl. VI. A tentative chromosome map / F. B. Hutt // Neue Forschungen in Tierzucht und Abstammungslehre (Duerst Festschriif). – 1936. – P. 105–112.
8. Pitel F. etc. Tixier-Boichard M. Mapping the Naked Neck (NA) and Polydactyly (PO) mutants of the chicken with microsatellite molecular markers / F. Pitel, R. Berg, G. Coquerelle etc. // Genet. Sel. Evol. – 2000. – V. 32. – P. 73–86.
9. Bitgood J. J. etc. Gene map of the chicken (*Gallus gallus*) / J. J. Bitgood, R. G. Somes // In: Genetic Maps, 6th ed. (S. O'Brien ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1993. – P. 4333–4342.
10. Bitgood J.J. etc. Linkage relationships and gene mapping / J. J. Bitgood, R. G. Somes // In: Poultry Breeding and Genetics (R.D. Crawford ed.). Elsevier: Amsterdam. – 1990. – P. 469–495.
11. Rotschild M.F. Genome mapping in livestock: a journey, not a destination / M. F. Rotschild // Rep. Iowa Univ. – 1994. – P. 13.
12. Bumstead N. etc. A preliminary linkage map of the chicken genome / N. Bumstead, J. Palyga // Genomics. – 1992. – V. 13. – P. 690–697.
13. Levin I. etc. An autosomal genetic linkage map of the chicken / I. Levin, L. Santangelo, H. Cheng etc. // J. Hered. – 1994. – V. 85. – P. 79–85.
14. Groenen M.A. etc. A comprehensive microsatellite linkage map of the chicken genome / M. A. Groenen, R. P. Crooijmans, A. Veenendaal etc. // Genomics. – 1998. – V. 49. – P. 265–274.
15. Schmid M. etc. First report on chicken genes and chromosomes 2000 / M. Schmid, I. Nanda, M. Guttenbach. etc. // Cytogenet. Cell Genet. – 2000. – V. 90. – P. 169–218.

16. Groenen M. A. etc. A consensus linkage map of the chicken genome / M. A. Groenen, H. H. Cheng, N. Bumstead etc. // *Genome Res.* – 2000. – V. 10. – P. 137–147.
17. Sheldon B.L. etc. Poultry genome mapping / B.L. Sheldon, M. N. Thorne // In: *Manipulation of avian genome.* – 1993. – P. 12.
18. Tixier-Boichard M. Current state of the art in poultry genome mapping / M. Tixier-Boichard // In: *Manipulation of avian genome.* – 1993. – P. 9.
19. Brown W.R. etc. The chicken as a model for large-scale analysis of vertebrate gene function / W.R. Brown, S.J. Hubbard, C. Tickle etc. // *Nat. Rev. Genet.* – 2003. – V. 4. – P. 87–98.
20. Morisson M. etc. Chick RH: a chicken whole-genome radiation hybrid panel / M. Morisson, A. Lemiere, S. Bosc etc. // *Genet. Sel. Evol.* – 2002. – V. 34. – P. 521–533.
21. Boardman P.E. etc. A comprehensive collection of chicken cDNAs / P.E. Boardman, J. Sanz-Ezquerro, I. M. Overton etc. // *Curr. Biol.* – 2002. – V. 12. – P. 1965–1969.
22. Kayang B.B. etc. Fifty microsatellite markers for Japanese quail / B. B. Kayang, M. Inoue-Murayama, A. Nomura etc. // *J. Hered.* – 2000. – V. 91. – P. 502–505.
23. Inoue-Murayama M. etc. Chicken microsatellite primers are not efficient markers for Japanese quail / M. Inoue-Murayama, B.B. Kayang, K. Kimura etc. // *Anim. Genet.* – 2001. – V. 32. – P. 7–11.

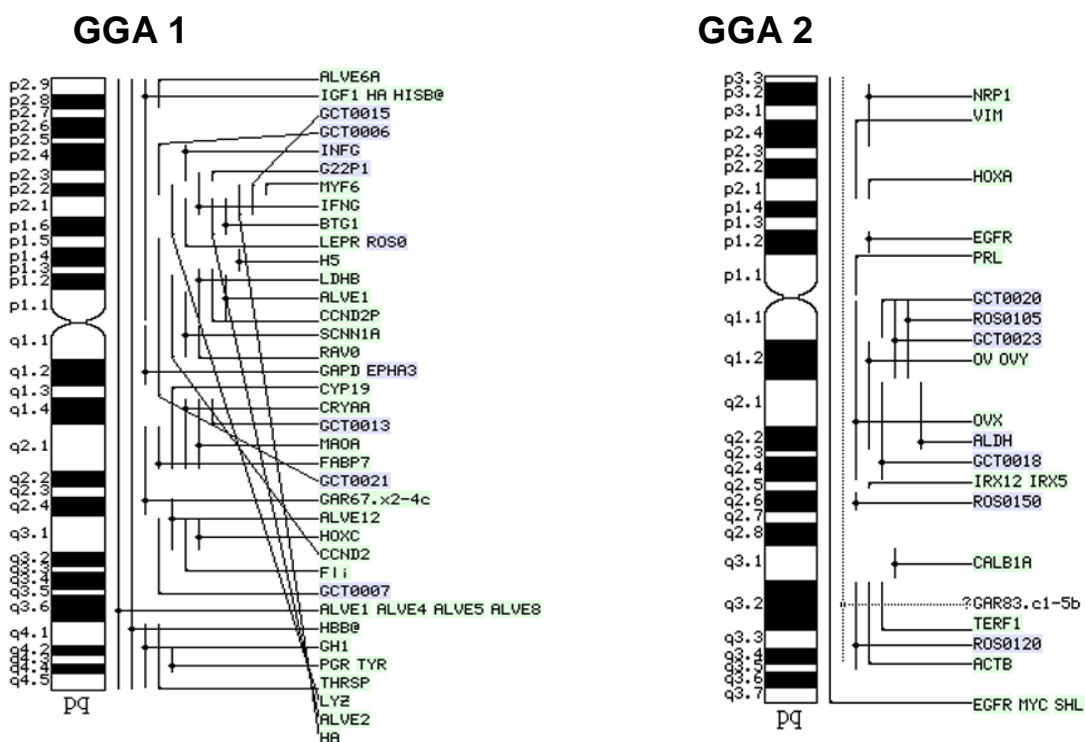
Глава 3. Физические карты и интеграция генетических и физических карт

Систематические исследования по физическому картированию генома домашней курицы начались в 80-е годы прошлого столетия. В 1979 г. Тереба с сотрудниками [1] удалось определить положение на хромосомах пяти эндовирусных локусов и онкогена *c-src*. Позднее теми же авторами был локализован ген ароматазы [2]. Шоу с соавторами был картирован ген β -актина и ген гормона роста [3]. Несколько раньше были картированы протоонкогены *c-erb-A*, *c-erb-B* и *c-myb* [4, 5]. При помощи неизотопного варианта гибридизации *in situ* с использованием пероксидазной системы детекции была локализована последовательность ДНК курицы, гомологичная гену дистрофина человека [6], а также гены главного комплекса гистосовместимости (МНС) [7]. Ген орнитинтранскарбамилазы картирован на половой Z-хромосоме [8]. Гены овальбумина и прогестерона, а также специфичного для эритроцитов гистона H5 локализованы неизотопным методом гибридизации *in situ* с использованием иммунофлуоресценции [9, 10]. Следует отметить, что в ранних исследованиях по физическому картированию хромосом в качестве ДНК-зондов использовали сравнительно короткие нуклеотидные последовательности 1–7 т. п. н., причем часто эти последовательности происходили из банков комплиментарной ДНК, т. е. были получены путем обратной транскрипции информационной РНК и, следовательно, не содержали интронов и фланкирующих областей. Таким образом, при гибридизации было трудно добиться наличия гомологии ДНК-мишени и ДНК-зонда на протяженном участке, что не позволяло получить высокую интенсивность и воспроизводимость гибридизационного сигнала.

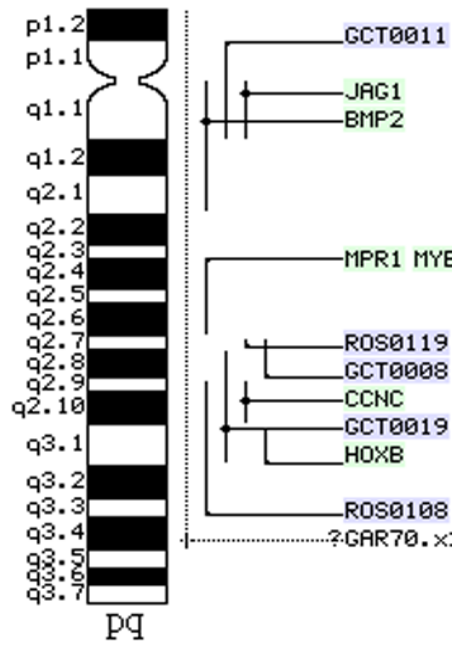
Одновременное использование протяженных космидных ДНК-зондов и техники амплификации с флуоресцентной системой детекции стало наиболее распространенным в настоящее время подходом. С его помощью были картированы гены тирозин гидроксилазы [11], ростового фактора нервных клеток NGF, овотрансферрина, аденилаткиназы [12].

В настоящее время прямое физическое картирование хромосом кур проводится преимущественно методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Известна внутривитрихромосомная локализация около 250 маркеров первого типа (кодирующих генов) (рис. 5). Кроме того, многие физически картированные протяженные клоны ДНК могут содержать кодирующие последовательности [13].

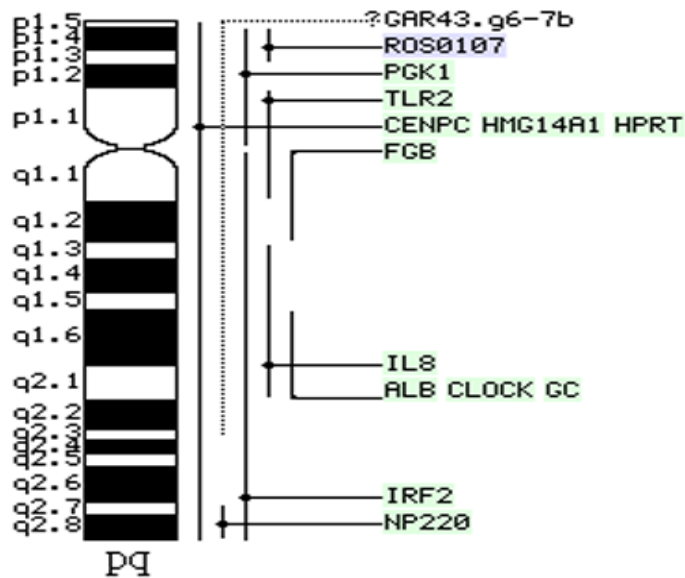
Применяются различные варианты собственно гибридизации *in situ* и системы детекции гибридизационного сигнала. В качестве ДНК-зондов часто используются протяженные (30–200 т. п. н.) клоны из геномных гридированных библиотек, что, на наш взгляд, наиболее перспективно, поскольку позволяет добиться почти стопроцентной эффективности гибридизации [14, 15]. Большие надежды возлагают на использование специальных хромосомоспецифических проб для микрохромосом и пэинтинговых проб для макрохромосом [16, 17, 18], которые могут существенно упростить процедуру идентификации хромосом. Нужно отметить, что использование хромосом типа ламповых щеток параллельно с митотическими зачастую позволяет повысить разрешающую способность метода [19, 20]. Проведено исследование с помощью сканирующей конфокальной микроскопии распределения пэинтинговых хромосомоспецифических проб, которое позволило выявить некоторые закономерности локализации микро- и макрохромосом в интерфазных ядрах [21]. Обращают на себя внимание детальные исследования двух районов W-хромосомы, сочетающие молекулярно-генетические и цитологические подходы, что в перспективе может оказаться одним из эффективных путей анализа всего генома [22].



GGA 3



GGA 4



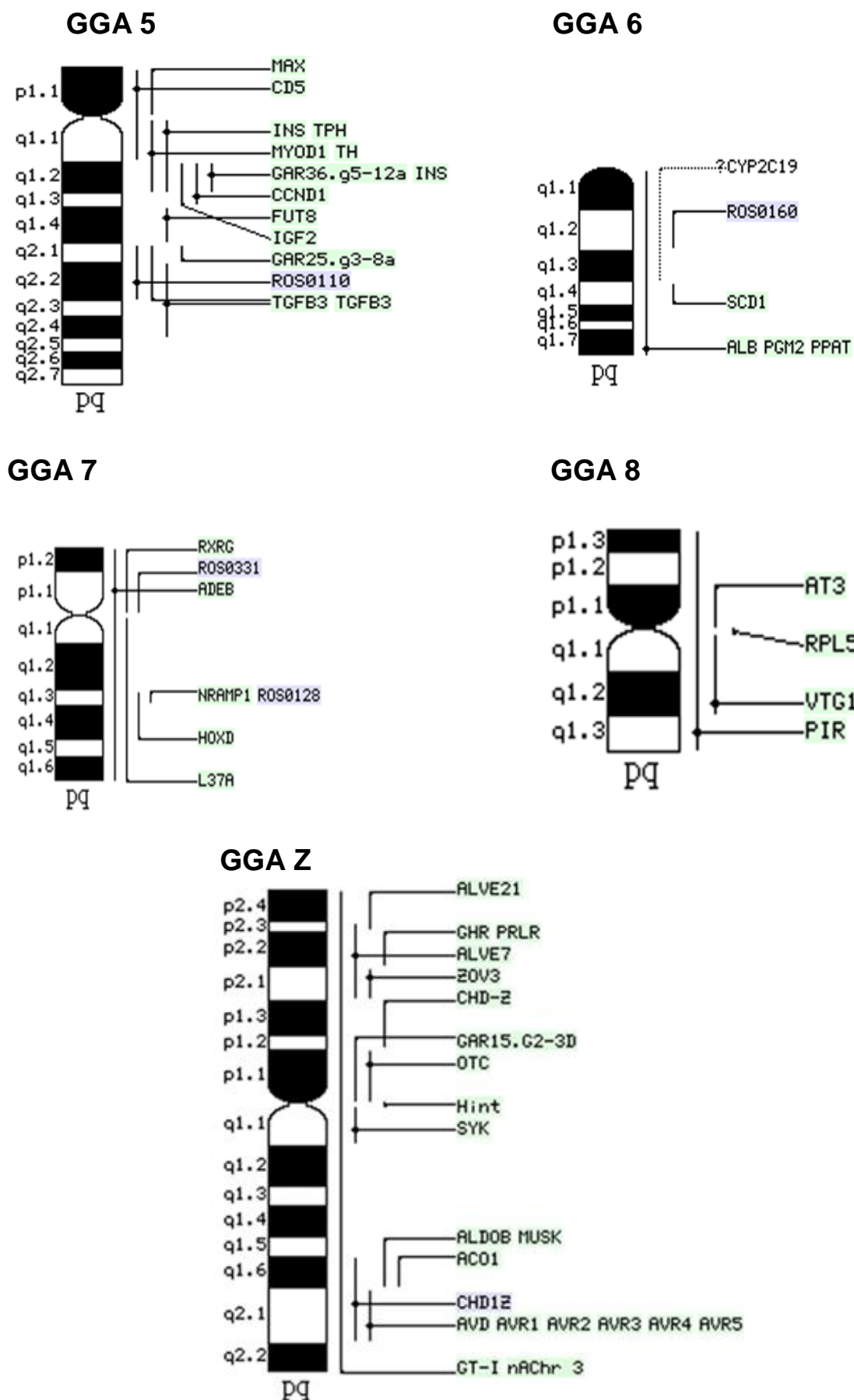


Рис. 5. Физические карты макрохромосом домашней курицы. По материалам Chicken Genome Database [13]

Установление соответствия групп сцепления хромосомам является одним из путей интеграции данных генетического, молекулярного и цитогенетического анализа генома.

Первые исследования данного рода проводили методом цитогенетического анализа хромосомных перестроек. Используя различные транслокации, при которых точки разрыва находятся в разных плечах хромосомы 1, было установлено соответствие III группы сцепления хромосоме 1 и определен порядок расположения маркеров этой хромосомы [23]. Позднее была выявлена связь перичентрической инверсии $inv(1)(p+q)$ с геном доминантной черной окраски E, поздней эмбриональной смертностью и геном гороховидного гребня P, что подтверждает ранее установленное соответствие хромосомы 1 и классической группы сцепления III [24].

С появлением новых генетических карт, основанных на молекулярных маркерах, и протяженных геномных клонов стало возможным проводить интеграцию генетических и физических карт путем картирования на них одного и того же маркера. Случайно выбранные геномные клоны физически картировали на хромосомах методом гибридизации *in situ*, затем методом прямого секвенирования находили в них полиморфные ДНК-маркеры. Генетический анализ расщепления аллелей обнаруженных ДНК-маркеров в вагинингеновской реферативной популяции позволил установить соответствие консенсусной группы сцепления E01C01C11W01 хромосоме 1, E06C02W02 – хромосоме 2, E02C03W03 – хромосоме 3, E05C04W04 – хромосоме 4, E07E34C05W05 – хромосоме 5, E11C10W06 – хромосоме 6, E45C07W07 – хромосоме 7 и E43C12W11 – хромосоме 8 [25].

Особенную сложность долгое время представляла интеграция генетических и физических карт микрохромосом по причине практической невозможности их индивидуальной идентификации в митозе. Первой работой в этом направлении была идентификация хромосомы 16, несущей ядрышковый организатор [26], которая, учитывая специфику этой хромосомы, долгое время оставалась единственной. В рамках европейского проекта «ChickMap» была создана коллекция случайных протяженных ДНК-клонов, которые использовали в качестве ДНК-зондов для гибридизации *in situ* на митотических хромосомах домашней курицы [27, 28]. Затем отобрали те ДНК-клоны, которые были локализованы на микрохромосомах, провели мечение каждого из них биотином и дигоксигенином и использовали их в качестве зондов для попарной колокализации методом двуцветной флуоресцентной гибридизации ДНК-ДНК *in situ* [17]. Таким образом, была создана система молекулярных маркеров для 22 микрохромосом. Для удобства

идентификации каждой из маркированных микрохромосом был присвоен условный номер. Позднее эта система была принята для обозначения микрохромосом в геномной базе данных Chicken Genome Database [13]. Затем локализованные на микрохромосомах протяженные ДНК-клоны были подвергнуты секвенированию с целью выявления полиморфных локусов, которые, в свою очередь, были картированы на генетических картах. Такой подход позволил установить локализацию 16-ти консенсусных групп сцепления на микрохромосомах домашней курицы [29] (табл. 1).

Таблица 1

Локализация 16-ти консенсусных групп сцепления на микрохромосомах домашней курицы [30]

Цитогенетический маркер	Генетический маркер	Группа сцепления	Длина, сМ	Условный номер хромосомы
P1A6	GCT16	E36C06W08	132	9
8G10	MCW132	E29C09W09	120	10
29L10	MCW0097	E30C14W10	88	11
11C21 n°1	MCW332	E16C17W22	90	12
P3-1	GCT907	E48C28W13W27	74	13
P1-8	GCT903	E35C18W14	77	14
P3C6	GCT14	E18C15W15	71	15
MHC	MHC	GGA 16	60	16
8L2	ADL293	E41W17	70	17
FAS	FAS	E31E21C25W12	47	18
ACC	ACC	E52W19	40	19
28L18 n°1	MCW249	E27C36W25W26	13	23
P2-4	GCT905	E49C20W21	58	24
P2-7	GCT906	E60C04W23	67	26
P10G12	GCT22	E59C35W20	75	27
P2-3	GCT902	E53C34W16	75	28

Список литературы

1. Tereba A. etc. Chromosome 1 contains the endogenous RAV-0 retrovirus sequences in chicken cells / A. Tereba, M. M. Lai, K. G. Murti // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1979. – V. 76. – P. 6486–6490.
2. Tereba A. etc. The gene for aromatase (P450 arom) in the chicken is located on the long arm of chromosome 1 / A. Tereba, M. J. McPhaul, J. D. Wilson // *J. Hered.* – 1991. – V. 82. – P. 80–81.
3. Show E.M. etc. Mapping of the growth hormone gene by in situ hybridization to chicken chromosome 1 / E. M. Show, R. N. Shoffner, D. N. Foster etc. // *J. Hered.* – 1991. – V. 82. – P. 505–508.
4. Symonds G. etc. Cellular oncogenes (c-erb-A and c-erb-B) located on different chicken chromosomes can be transduced into the same retroviral genome / G. Symonds, E. Stubblefield, M. Guyaux etc. // *Mol. Cell Biol.* – 1984. – V. 4. – P. 1627–1630.
5. Soret J. etc. Chromosomal reallocation of the chicken c-myb locus and organization of 3'-proximal coding exons / J. Soret, M. Vellard, E. Viegas-Pequignot etc. // *FEBS.* – 1991. – V. 263. – P. 254–260.
6. Dominguez-Steglich M. etc. The dystrophin gene is autosomally located on a microchromosome in chicken / M. Dominguez-Steglich, G. Meng, T. Bettecken etc. // *Genomics.* – 1990. – V. 8. – P. 536–540.
7. Dominguez-Steglich M. etc. Linkage of the chicken MHC to the nucleolus organizer region visualized using non-isotopic in situ hybridization / M. Dominguez-Steglich, C. Auffray, M. Schmid // *J. Hered.* – 1991. – V. 82. – P. 503–505.
8. Dominguez-Steglich M. etc. Sex-linkage of the chicken ornithine transcarbamylase gene / M. Dominguez-Steglich, M. Schmid // *Hereditas.* – 1993. – P. 118. – P. 1–5.
9. Dominguez-Steglich M. etc. In situ mapping of the chicken progesterone receptor gene and the ovalbumin gene / M. Dominguez-Steglich, J. M. Jeltsch, J. M. Garnier etc. // *Genomics.* – 1992a. – V. 13. – P. 1343–1344.
10. Hutchison N.J. etc. Gene mapping in chicken via fluorescent in situ hybridization to mitotic and meiotic chromosomes / N. J. Hutchison, Le Ciel C. // In: *Manipulation of the avian genome.* Paris. Gibbins. – 1991. – P. 205.
11. Dominguez-Steglich M. etc. Assignment of the chicken tyrosine hydroxylase gene to chromosome 6 by FISH / M. Dominguez-Steglich, A. Carrier, C. Auffray etc. // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1992b. – V. 60. – P. 138–139.
12. Dominguez-Steglich M. etc. Mapping the beta NGF gene in situ to a microchromosome in chicken / M. Dominguez-Steglich, P. Lichter, A. Carrier etc. // *Genomics.* – 1992c. – V. 12. – P. 829–832.
13. www.thearkdb.org.
14. Buitkamp J, Ewald D, Schalkwyk L, Weiher M, Masabanda J, Sazanov A, Lehrach H, Fries R. Construction and characterisation of a gridded chicken cosmid library with four-fold genomic coverage // *Anim. Genet.* – 1998. – V. 29. – P. 295–301.
15. Smith J. etc. Differences in gene density on chicken macrochromosomes and microchromosomes / J. Smith, C. K. Bruley, I. R. Paton etc. // *Animal Genetics.* – 2000. – V. 31. – P. 96–103.
16. Zimmer R. etc. Generation of chicken Z chromosome painting probes by microdissection for screening large-insert genomic libraries / R. Zimmer, W. King, A. Verrinder-Gibbins // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1997. – V. 78. – P. 124–130.

17. Fillon V. etc. Identification of 16 chicken microchromosomes by molecular markers using two – colour fluorescence in situ hybridization (FISH) / V. Fillon, M. Morrison, R. Zoorob etc. // *Chromosome Research*. – 1998. – V. 6. – P. 307–313.
18. Guillier-Gencik Z. etc. Generation of whole – chromosome painting probes specific to each chicken macrochromosome / Z. Guillier-Gencik, A. Bernheim, Ph. Coullin // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1999. – V. 87. – P. 282–285.
19. Mizuno S. etc. The ZW lampbrush chromosomes of birds: a unique opportunity to look at the molecular cytogenetics of sex chromosomes / S. Mizuno, H. Macgregor // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1998. – V. 80. – P. 149–157.
20. Rodionov A.V. etc. Crossing over in chicken oogenesis: cytological and chiasma-based genetic maps of chicken lampbrush chromosome 1 / A. V. Rodionov, N. A. Lukina, S. A. Galkina etc. // *J. Hered.* – 2002. – V. 93. – P. 125–129.
21. Habermann F. etc. Arrangement of macro- and microchromosomes in chicken cells / F. Habermann, M. Cremer, J. Walter etc. // *Chromosome Research*. – 2001. – V. 9. – P. 569–584.
22. Itoh Y. etc. Molecular and cytological characterization of Ssp1- family repetitive sequence on the chicken W chromosome / Y. Itoh, S. Mizuno // *Chromosome Research*. – 2002. – V. 10. – P. 499–511.
23. Bitgood J.J. Additional linkage relationships within the Z chromosome of the chicken / J. J. Bitgood // *Poult. Sci.* – 1985. – V. 64. – P. 2234–2238.
24. Smyth J.R. etc. Research note: linkage relationship between the pea comb (P) and the extended black (E) loci in chicken / J. R. Smyth, Ponce de Leon F.F. // *Poltry Sci.* – 1992. – V. 71. – P. 208–210.
25. Groenen M. A. etc. A consensus linkage map of the chicken genome / M.A. Groenen, H. H. Cheng, N. Bumstead etc. // *Genome Res.* – 2000. – V. 10. – P. 137–147.
26. Bloom S. E. etc. Linkage of the major histocompatibility (B) complex and the nucleolar organizer in the chicken. Assignment to a microchromosome / S. E. Bloom, L. D. Bacon // *J. Hered.* – 1985. – V. 76. – P. 146–154.
27. Zoorob R. etc. Two chicken genomic libraries in the PAC and BAC cloning systems: organization and characterization / R. Zoorob, A. Billault, V. Severac etc. // *Anim. Genet.* – 1996. – V. 27. – P. 69.
28. Crooijmans R. P. etc. Two-dimensional screening of the Wageningen chicken BAC library / R. P. Crooijmans, J. Vrebalov, R. J. Dijkhof etc. // *Mamm. Genome.* – 2000. – V. 11. – P. 360–363.
29. Morisson M. etc. Integration of chicken cytogenetic and genetic maps: 18 new polymorphic markers isolated from BAC and PAC clones / M. Morisson, F. Pitel, V. Fillon etc. // *Anim. Genet.* – 1998. – V. 29. – P. 348–355.
30. Schmid M. etc. First report on chicken genes and chromosomes 2000 / M. Schmid, I. Nanda, M. Guttenbach etc. // *Cytogenet. Cell Genet.* – 2000. – V. 90. – P. 169–218.

Глава 4. Геномные библиотеки

Возможность быстрого получения препаративных количеств ДНК протяженных (> 30 т. п. н.) фрагментов генома является необходимым условием большинства экспериментов по молекулярно-генетическому и цитогенетическому анализу геномов. Гридированные геномные библиотеки, т. е. имеющие адресное указание индивидуальных клонов, позволяют получать протяженные фрагменты ДНК, содержащие интересующую исследователей последовательность, и широко используются для анализа генома с использованием различных подходов [1].

Первая генетическая система для масштабного клонирования протяженных фрагментов генома была создана Бурке в 1987 г. [3]. Она была основана на искусственных хромосомах дрожжей (YACs), включающих центромер, теломеры, автономно-реплицирующиеся последовательности, сайт клонирования и гены селективных маркеров. Система позволяла клонировать нуклеотидные последовательности до 1000 т. п. н. Поскольку в начале 90-х годов интенсивно проводилось секвенирование генома человека, такие системы были быстро востребованы и использованы для создания геномных библиотек [3]. Однако существенные недостатки этого рода библиотек – высокий уровень химеризма, нестабильность геномной вставки и трудность приготовления препаративных количеств клонированных последовательностей ДНК – не позволили их использовать в качестве основного инструмента геномного клонирования. Большое количество tandemных повторов генома млекопитающих приводило в дрожжевой системе к сайт-специфической рекомбинации и потере фрагментов вставки, либо к образованию химерных клонов, т. е. клонов, содержащих фрагменты ДНК из разных областей генома-донора [3]. Цитологически химерные клоны выявляются при гибридизации *in situ*, поскольку локализуются в двух и более сайтах [1].

Поскольку прокариотические системы рекомбинации оставляют меньше вероятности нежелательных обменов, кроме того эписомы прокариот отличаются относительной стабильностью и могут существовать в суперскрученной форме, бактерии оказались более привлекательны как организмы-хозяева для геномных клонов. Плазмидные векторы не только проще хромосомных эукариотических векторов (не содержат центромера, теломеров) и, следовательно, конструирование библиотек с ними менее трудоемко, но и позволяют существенно упростить процедуру выделения ДНК основанных на них клонов путем полного разрушения хромосомной.

Первым вектором с использованием клеток кишечной палочки *Escherichia coli* были космиды – плазмиды, содержащие сегмент ДНК фага λ с соединенными липкими концами (cos-сайты) [4]. Важной чертой большинства космидных векторов для клонирования является их способность включать вставки до 45 т. п. н. Если кольцевую космидную ДНК разрезать по какому-то уникальному сайту, смешать с фрагментами ДНК, содержащими липкие концы, и произвести отжиг, то образуются длинные конкатемеры. При смешении этих конкатемеров с белками, осуществляющими упаковку фага λ , они разрезаются по cos-сайтам, и ДНК упаковывается в головку фага. Этот процесс позволяет отобрать вставки большой протяженности, так как для того, чтобы ДНК упаковывалась в головку фага, расстояние между cos-сайтами должно быть 38–52 т. п. н. Такая смесь может содержать фрагменты вовсе без вставки или с несколькими повторяющимися вставками, что отражается на качестве полученной библиотеки и затрудняет ее применение для геномного анализа. Реципиентные клетки приобретают упакованные космиды в результате инфицирования «фальшивыми» фаговыми частицами, причем этот процесс более эффективен, чем трансфекция плазмидной ДНК. Попав в клетку-хозяина, рекомбинантная ДНК амплифицируется и сохраняется в виде плазмиды [4]. Полученные рекомбинантные клоны могут быть гридированы – выращены на платах с точным указанием адреса каждого клона. Получение отпечатков (реплик) на нитроцеллюлозных или других фильтрах для переноса ДНК с последующим разрушением клеточных стенок бактерией и отмыванием белков позволяет проводить скринирование таких библиотек при помощи обычной дот-блот ДНК-ДНК гибридизации [1]. Недостатком космидных геномных библиотек является относительно (по сравнению с искусственными хромосомами дрожжей) небольшая величина вставки (до 45 т. п. н.) и, следовательно, большой объем библиотеки (для геномов млекопитающих около 2×10^5 клонов [5]). Для того чтобы совместить преимущества космидных библиотек (высокая стабильность ДНК-клонов, относительно низкий уровень химеризма, простота конструирования, удобство выделения ДНК) и дрожжевых библиотек (большая длина вставки и компактность всей библиотеки), были разработаны две системы клонирования: на основе искусственных хромосом бактерий (BAC) и искусственных хромосом фага P1 (PAC). Впервые PAC вектор (pCYPAC-1) был использован Иоанноу в 1994 г. [6] для переноса рекомбинантной ДНК в клетки *Escherichia coli* при помощи электропорации. Разделенные при помощи пульс-электрофореза фрагменты

геномной ДНК человека были упакованы в головки частиц бактериофага P1. Заражение такими фаговыми частицами штамма *E. coli*, экспрессирующих рекомбиназу Cre, привело к возникновению эписомных копий генома рекомбинантных фаговых частиц. Полученная геномная библиотека содержала 15 000 клонов со средним размером вставки 130–150 т. п. н. Тридцать четыре клон были гибридизованы на митотических хромосомах методом FISH, при этом не было выявлено ни одного случая химеризма. Продолжительное культивирование бактерий не выявило нестабильности вставки на примере 20 клонов [6].

Искусственные хромосомы бактерий (BACs) основаны на F-факторе (факторе фертильности) – низкокопийной плазмиде, которая существует в бактериальных клетках в суперскрученной кольцевой форме и может включать вставку до 500 т. п. н. Репликация фактора фертильности жестко контролируется клеточными механизмами, что существенно снижает уровень рекомбинации в эписомах этого рода [3]. Кроме того, геномная ДНК вида-донора находится практически все время в суперскрученном состоянии, следовательно, вероятность нежелательных обменов между фрагментами вставки теоретически приближается к нулю [7]. Первая такая библиотека была получена Шизуя в 1992 г. [8] на основе вектора pBAC108L, включающего фактор фертильности и *cosN*-сайт. Размер вставки варьировал от 10 до 300 т. п. н., составляя в среднем 100 т. п. н. Стабильность вставки (по признаку сохранения профиля рестрикционных фрагментов) подтверждена в течение 100 поколений бактериальных клеток. Проверка клонов на химеризм методом гибридизации *in situ* позволила обнаружить только один случай обмена из 28 случайно выбранных трансформантов [8]. Дальнейшие работы с использованием библиотеки, полученной Шизуя и соавторами, также показали низкую частоту транслокаций [3]. Следует отметить в среднем меньшую длину клонированных фрагментов в системах искусственных хромосом бактерий по сравнению с дрожжевыми и основанными на бактериофаге P1. Указанные выше недостатки дрожжевых систем не позволяют им конкурировать с бактериальными. Преимуществом BAC-библиотек перед PAC-библиотеками является относительная простота их конструирования – исключается использование бактериофагов, перенос донорной ДНК проводится при помощи обычной трансформации. Таким образом, оптимальными системами для клонирования протяженных геномных последовательностей более 50 т. п. н. признают искусственные хромосомы бактерий (BACs), а для фрагментов менее 50 т. п. н. (которые имеют преимущества для

использования в некоторых исследованиях геномов) таковыми остаются космиды [3].

Гридированные геномные библиотеки протяженных ДНК-клонов оказались наиболее мощным инструментом картирования и секвенирования генома человека, поскольку позволяли проводить интеграцию данных по составу нуклеиновых кислот (секвенирование) и их местоположению на хромосоме (физическое картирование) [9]. В течение пяти лет (1995–2000) были созданы ресурсные центры для поддержания таких библиотек различных видов животных и растений и обслуживания исследований с их применением. В Европе наиболее крупным ресурсным центром является RZPD (Ресурсный Центр Германии) [10], в Новом Свете – Техасский ВАС-центр, где хранятся библиотеки геномов растений и домашней и джунглевой курицы [11] и Калифорнийский ресурсный центр [12], который специализируется на геноме человека и млекопитающих. Следует отметить, что в отличие от RZPD, два последних центра не требуют обязательного участия пользователей в проектах в государстве их расположения, что существенно упрощает их использование отечественными специалистами. В распоряжение исследователей предоставляются отпечатки (реплики) библиотек на фильтрах для гибридизации ДНК для скринирования. Координаты выявленных положительных ДНК-клонов сообщаются в ресурсный центр, где указанные клоны высевают на агарную среду и доставляют пользователям [11].

Для подавляющего большинства районов человека (кроме центромеров, где клонирование невозможно по причине присутствия высокоповторяющихся последовательностей ДНК) построены контиги (совокупности перекрывающихся ДНК-клонов) с известной последовательностью и, таким образом, знание любой последовательности нуклеотидов позволяют быстро найти содержащий ее протяженный ДНК-клон в базах данных [13]. Для домовой мыши построены контиги для отдельных районов хромосом [13]. Один район хромосомы 13 домашней курицы также представлен в виде контига 204-х искусственных хромосом бактерий, занимающих приблизительно 20 % от длины GGA 13 [14].

Организовать протяженные ДНК-клоны в контиг можно методом геномного фингерпринтинга или флуоресцентной гибридизации *in situ* на растянутых хромосомах (fiber-FISH) [15]. В первом случае возможен одновременный анализ 192-х клонов (стандартный агарозный гель для фингерпринтинга имеет 242 дорожки, из них 52 – для маркеров молекулярных весов), второй метод ограничен возможностями цветовой гаммы флуорохромов и спектром

прохождения оптических фильтров до двадцати – двадцати пяти ДНК-проб одновременно [15].

Кроме геномного картирования, библиотеки протяженных ДНК-клонов являются основным инструментом позиционного клонирования районов хромосом, контролирующими количественные признаки.

Первая геномная библиотека единственного представителя класса птиц, сравнимого по степени изученности генома с млекопитающими – домашней курицы – была построена Тойе и соавторами в 1997 г. [16] на основе искусственных хромосом дрожжей (YACs). Был использован вектор pCGS966 YAC для клонирования геномных фрагментов, подвергнутых частичной рестрикции эндонуклеазой EcoRI и разделенных методом пульс-электрофореза. Первая часть библиотеки включала 16 000 клонов со средним размером вставки 634 т. п. н., что соответствует 8,5 эквивалентам генома домашней курицы. Вторая часть включает 20 000 клонов, из которых около 20 % содержат вставки до 450 т. п. н. Средний размер вставки определен не был. Общее число клонов составило 36 000, что, по оценке авторов, должно обеспечить десятикратное покрытие генома [16]. Поскольку к концу девяностых годов стали известны недостатки дрожжевых систем клонирования на примере генома человека, эта библиотека была практически не используется, несмотря на то, что специально оценку химеризма и стабильности клонов в ней не проводили.

С использованием искусственных хромосом бактерий (BACs) была построена геномная библиотека домашней курицы Циммером в 1998 г. [17] с использованием нового для того времени вектора pVeloBAC11 в два этапа. Вначале был использован стандартный подход [8] для получения 1440 клонов со средним размером вставки 180 т. п. н. Для получения двух оставшихся третей (2976 клонов) было использовано пульс-электрофоретическое разделение донорной ДНК, которое позволило получить средний размер вставки 490 т. п. н., что повлекло за собой необходимость модификации методики для трансформации клеток *E. coli* с использованием штамма DH10B. Таким образом, в библиотеке размер вставки варьировал от 25 до 725 т. п. н., составляя в среднем 390 т. п. н., что является необыкновенно высоким показателем для BAC-библиотек [3]. На основании общего числа клонов и среднего размера вставки оценено покрытие – 0,8 генома домашней курицы представлено в библиотеке, что является явно недостаточным для ее эффективного применения.

В настоящее время наиболее широкое применение получили четыре геномные BAC-библиотеки вида *Gallus gallus*, находящиеся

в Техасском ресурсном центре [11]. Одна из них была построена из частично рестрицированных эндонуклеазой HindIII фрагментов геномной ДНК домашней курицы породы белый леггорн группой исследователей Вагенингеновского университета [18] и успешно использована для построения контигов и секвенирования районов хромосом [14]. Три другие библиотеки были созданы в ходе сотрудничества Техасского ресурсного центра и группы исследователей Государственного университета штата Мичиган (Ист-Лансинг, США) под руководством проф. Дж. Додсона [19]. Скринирование этих библиотек с использованием 30-ти нуклеотидных последовательностей показало их адекватность задачам геномного картирования – было выявлено 59 протяженных геномных клонов, содержащих искомые последовательности, что было подтверждено методом блот-гибридизации по Саузерну или секвенированием [19].

Гридированные геномные библиотеки сыграли большую роль в программе полного секвенирования генома человека как инструмент связи молекулярно-биологических и цитогенетических данных путем построения контигов и их локализации на хромосомах, а также изучения ортологии между геномами млекопитающих [13]. На момент начала наших исследований по данной проблеме (1996) не было известно работ по использованию такого рода библиотек для геномного картирования у представителей класса *Aves*. Не было ясно, могут ли особенности организации нуклеиновых кислот птиц оказывать влияние на стабильность протяженных геномных клонов в бактериальных клетках и на частоту химеризма клонированных фрагментов генома. Оставался также открытым вопрос о том, не существует ли предпочтительности каких-либо последовательностей ДНК при процедурах клонирования и, следовательно, о том, насколько адекватно представлен геном в библиотеках.

Гридированная геномная космидная библиотека RZPD-125 была создана с использованием геномной ДНК домашней курицы породы Род Айленд из коллекции кафедры селекции Мюнхенского технического университета (Фрайзинг-Тальхаузен, ФРГ). Геномную ДНК подвергали частичной рестрикции с использованием эндонуклеазы *Sau3A*, контролируя размер фрагментов методом электрофоретического разделения в агарозном геле. Рестрикцию останавливали при достижении длины около 50 т. п. н. Затем геномные фрагменты были клонированы в векторе *sCos1* (Stratagene) с использованием двух различных бактериальных штаммов в качестве клеток-хозяев – DH5 α MCR (платы 1–51) и DL735 (платы 52–288). Следует отметить, что первая бактериальная система обладает большей устойчивостью к недостаточно точным

действиям робота, осуществляющего пересадку колоний в ресурсных центрах (поскольку робот в отличие от человека не может видеть неровностей растущих колоний и при пересадке руководствуется исключительно их координатами). Преимуществом второй системы является отсутствие инсерционной последовательности TN1000, которая может перемещаться в космиды, разрушая тем самым целостность геномных фрагментов [1]. При анализе 68 клонов было показано, что при пересадке на платы 1–51 (штамм-хозяин DH5 α MCR) сохраняется 98 % колоний, а на платах 52–288 (штамм-хозяин DL735) – 95 %, что является вполне удовлетворительным показателем в обоих случаях [1].

Библиотека включает около 110 000 клонов со средним размером вставки около 40 т. п. н. (точнее $39,7 \pm 3,8$ т. п. н., минимальный размер – 20, максимальный – 48 т. п. н.) [1]. Оценка размеров вставки была проведена путем рестрикционного анализа 68 клонов. При этом геномная вставка сохранилась во всех проанализированных клонах, что является высоким показателем для подобного рода библиотек. В ходе последующей работы более чем со ста клонами был обнаружен только один случай отсутствия вставки. Таким образом стабильность космид в библиотеке можно оценить в 99 %. На основании средней длины вставки и общего числа клонов установлено, что библиотека представляет четырехкратный эквивалент генома. Вероятность обнаружения любой последовательности домашней курицы (P) в библиотеке оценивается выше 0,99 (число клонов = $\ln(1 - P) / \ln(1 - \text{средний размер вставки})$) [20], что хорошо согласуется с нашими данными о наличии хотя бы одного гибридационного сигнала при использовании для ее скрининга 22 ДНК-зондов [1].

Скринирование библиотеки было проведено с использованием 22-х кодирующих последовательностей ДНК в качестве зондов и для каждой из них наблюдался хотя бы один положительный гибридационный сигнал. В среднем число положительных сигналов было шесть, минимум – один (INS), максимум – десять (AVR1-7, ETS1, GDF8). Тридцать один космидный клон из библиотеки RZPD-125 был физически картирован на митотических хромосомах методом флуоресцентной гибридации *in situ*, при этом не было обнаружено ни одного случая химеризма [1]. Следовательно, наличие специфических для птиц ГЦ-богатых повторов не привело к нарушению стабильности геномных последовательностей курицы в клетках *E.coli*.

Схема гридирования позволяет проводить точную идентификацию положительных клонов при наличии двух гибридационных сигналов, соответствующих одному и тому же

клону, что делает необязательной процедуру рескрининга, принятую при других схемах гридирования. Мультикопийность космид позволяет получить высокую плотность ДНК на репликах, что сокращает до двух часов время экспозиции рентгеновских пленок при автордиографии. Использование штаммов DH5 α MCR и DL735 позволяет проводить выделение ДНК при помощи стандартных наборов для выделения плазмидной ДНК (например, Quiagene). Большое число клонов (110 000), с одной стороны, несколько затрудняет применение этой библиотеки, например, увеличивает размер реплик, с другой – может оказаться полезным для скринирования с использованием комбинированных ДНК-зондов, представляющих различные участки генома.

Использование геномной библиотеки RZPD-125 позволило клонирование и хромосомная локализация кластера генов семейства авидинов. Авидин – белок, связывающий биотин с высокой специфичностью (близкой к специфичности связывания при иммунологических взаимодействиях) [21]. Его экспрессия происходит в клетках яйцевода во время созревания яиц и находится под регуляцией прогестерона [22]. Считается, что авидин взаимодействует с различными белками, обеспечивающими защиту развивающегося эмбриона от инфекций [22]. Кроме яйцевода наблюдается следовая экспрессия этого белка в различных тканях самцов и самок после их травматического повреждения, при бактериальной или вирусной инфекции [23]. До начала наших исследований было известно пять гомологов гена авидина (AVR1-5), имеющих 94–100 % идентичности между собой и 91–95 % – с геном авидина [24, 25]. Оказалось, что гомология внутри интронов (в среднем 97 %) оказалась выше, чем в экзонах (90 %) [25]. Первые пять гомологов гена авидина были клонированы в виде перекрывающихся протяженных клонов, что позволило сделать вывод об их кластеризации [24]. Однако до начала наших исследований взаимная ориентация авидиноподобных генов внутри кластера и их хромосомная локализация не были известны, не было ясно также все ли авидиноподобные гены клонированы.

Скринирование гридированной геномной космидной библиотеки RZPD-125 с использованием в качестве зондов кДНК авидина [26], имеющей гомологию нуклеотидной последовательности со всеми представителями семейства авидиновых генов, и олигонуклеотида, специфического только для гена AVD, позволило изолировать пять клонов, представляющих AVD, и девять клонов авидиноподобных последовательностей. Таким образом, при проведении скрининга в

условиях, когда олигонуклеотид MA2 специфически гибридизовался с геном авидина и не мог давать положительный гибридизационный сигнал с другими фрагментами кластера, нам удалось идентифицировать геномные клоны (O07-04 и C21-154) для ранее неизвестных гомологов гена авидина – AVR6 и AVR7. Нами был клонирован фрагмент хромосомы, длину которого исходя из среднего размера клона (около 40 т. п. н.) и четырехкратного покрытия библиотеки можно оценить в 100 т. п. н. Методом флуоресцентной гибридизации ДНК-ДНК *in situ* кластер авидиновых генов был нами локализован на половой Z-хромосоме домашней курицы в прителомерном районе q21 [27].

На основании полученных данных Алрот и соавторы секвенировали район расположения кластера авидиновых генов (27 т. п. н.), выявили и охарактеризовали не известные ранее гены AVR6 и AVR7, установили взаимное расположение и взаимную ориентацию генов AVD, AVR1, AVR2, AVR3, AVR4 и AVR5 [27]. Схема организации кластера авидиновых генов была составлена на основе частичного секвенирования и рестрикционного анализа идентифицированных нами космидных клонов A02-114, P23-156, L09-154, A24-07, O04-05, O07-04, F18-104, K18-233 и C21-154. Клоны L09-154 и P23-156 оказались идентичными, и клоны O04-05 и C21-154 – практически идентичными, за исключением конечной последовательности. Нуклеотидные последовательности генов AVR6 и AVR7 были внесены в геномную базу данных [13] под идентификационными номерами (NCBI accession number) AJ237658 и AJ237659, соответственно.

Клонирование кластера авидина и авидиноподобных генов позволило установить взаимную ориентацию этих генов, которая ранее была определена только для AVD и AVR1-5 условно на основании данных ПЦР на двух частично перекрывающихся клонах [25]. Оказалось, что ген авидина находится на удалении (9 т. п. н.) от остальных элементов кластера, расположенных в непосредственной близости друг от друга (2,5–2,8 т. п. н.). Поскольку построенный нами контиг включает последовательности, выходящие за пределы кластера на 35–40 т. п. н. в двух направлениях, все авидиноподобные гены можно считать клонированными [27].

Из всех генов, входящих в кластер, только ген авидина транскрибируется на высоком уровне [27]. Описаны минорные информационные РНК для генов AVR1, AVR2 и AVR3 [28]. Однако не известно, происходит ли трансляция этих транскриптов. Известно, что прогестерон не оказывает влияния на транскрипцию генов AVR1, AVR2 и AVR3, которая описана только в тканях,

подвергшихся воспалению [28]. Считать авидиноподобные гены псевдогенами нельзя, поскольку их кодирующие последовательности не нарушены и в кластере присутствуют потенциально активные промоторы и сигналы посттрансляционной модификации [27]. На наш взгляд, следует признать рабочей гипотезой недавнее возникновение кластера путем серии дупликаций и последующей дивергенцией и инактивацией части авидиноподобных генов. На это указывает также то обстоятельство, что степень гомологии нуклеотидных последовательностей фрагментов кластера достаточно велика (около 95 %) не только в кодирующих частях, но и за пределами рамки считывания [27]. Наличие делеции величиной 6 п. н. во втором экзоне генов AVR1-7 по сравнению с AVD говорит о том, что все они от одной предковой последовательности, которая в свою очередь является результатом дупликации гена AVD. Самым последним событием эволюции кластера авидиновых генов следует считать появление генов AVR4 и AVR5, поскольку они идентичны в кодирующей части, различаясь несущественно во фланкирующем 5'-районе [27]. Первичная дупликация гена авидина с последующей делецией одной из копий, по всей видимости, привела к появлению кластера. Дальнейшее влияние мутаций могло сглаживаться действием конверсии генов, на что указывает большой консерватизм интронов по сравнению с экзонами [25]. Возможно, что был этап в эволюции кластера, когда нуклеотидные замены в экзонах поддерживались отбором. Инвертированная ориентация гена AVR7 является исключением по отношению к характерной для кластера тандемной ориентации генов. Инверсии меньшего размера характерны для аллельных вариантов генов AVD и AVR2, что указывает на то, что инверсии наряду с дупликациями сыграли роль в эволюции кластера [27].

Известно, что нуклеотидные последовательности, организованные в виде тандемных повторов, имеют тенденцию к изменению своего числа путем неравного кроссинговера или неравных сестринских хроматидных обменов [29]. Теломерная локализация авидиновых генов могла активизировать процессы неравного кроссинговера (или неравных сестринских хроматидных обменов), которые привели к появлению кластера [27]. Поскольку в пределах кластера наблюдается высокий эволюционный консерватизм последовательности ДНК не только в кодирующих участках, но и в межгенных областях, кластер авидиновых генов может являться своего рода «горячей точкой» для неравных обменов. Локализация в Z-хромосоме свидетельствует о наличии

двух копий генов авидинов у самцов (ZZ) и только одной у самок (ZW). Учитывая то, что гены авидинов экспрессируются преимущественно в клетках яйцевода [22], и то, что вопрос о компенсации дозы у птиц остается открытым, наличие двойного количества авидиновых генов у самцов представляется труднообъяснимым фактом.

Другая гридированная геномная библиотека (031-JF256-BI), использованная нами в работе, была сконструирована Дж. Додсоном и соавторами в 2000 г. [11, 19] из геномной ДНК линии UCD 001 джунглевой курицы, имеющей менее 1 % отличия по нуклеотидной последовательности в кодирующей части от домашней курицы [30]. Геномная ДНК для построения библиотеки была выделена из одной птицы, для того чтобы снизить гетерозиготность. В то время это обстоятельство оставляет возможность влияния индивидуальных особенностей этой особи на состав нуклеиновых кислот в библиотеке. Всего библиотека содержит 38 400 ВАС-клонов со средним размером вставки 150 т. п. н. (минимум – 45, максимум – 195 т. п. н. из 314 проанализированных клонов) и представляет эквивалент 5,2 генома. Процент клонов без вставки был оценен в 4,8 %, что намного выше, чем в библиотеке RZPD-125 (около 1 %). По этому показателю библиотека 031-JF256-BI несколько уступает аналогам (033-JF256-H3 – 2,6 %, 032-JF256-RI – 3,4 % [30]). В то же время по сравнению с RZPD-125 преимущество этой библиотеки для геномного картирования заключается как в большей длине вставки и большем покрытии генома, так и в существенном (почти в три раза) меньшем размере самой библиотеки. Нами показана эффективность применения этой библиотеки на примере 10 ВАС-клонов, представляющих восемь различных генов (ALB, ANX5, APOA1, EDNRA, ETS1, MGF, MGP и TYR) [13]. Хотя число клонов достаточно только для оценочной характеристики библиотеки, отсутствие химеризма дает основания сделать вывод о том, что и эта библиотека адекватна задачам геномного картирования.

Таким образом, гридированные геномные библиотеки протяженных ДНК-клонов (космидные и основанные на искусственных хромосомах бактерий), хорошо зарекомендовавшие себя на млекопитающих, с успехом могут быть применены и для анализа генома и, возможно, позиционного клонирования локусов количественных признаков и у представителей класса Aves.

Список литературы

1. Buitkamp J. etc. Construction and characterisation of a gridded chicken cosmid library with four-fold genomic coverage / J. Buitkamp, D. Ewald, L. Schalkwyk etc. // *Anim. Genet.* – 1998. – V. 29. – P. 295–301.
2. Burke D.T. etc. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors / D. T. Burke, G. F. Carle, M. V. Olson // *Science.* – 1987. – V. 236. – P. 806–812.
3. Schalkwyk L.C. etc. Techniques in mammalian genome mapping / L. C. Schalkwyk, F. Francis, H. Lehrach // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 1995. – V. 6. – P. 37–43.
4. Сингер М. Гены и геномы: в 2 т. / М. Сингер, П. Берг // М.: Мир, 1998. – Т. 1. – 373 с.
5. www.ucl.ac.uk.
6. Ioannou P.A. etc. A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments / P. A. Ioannou, C. T. Amemiya, J. Garnes etc. // *Nat. Genet.* – 1994. – V. 6. – P. 84–89.
7. Shizuya H. etc. The development and applications of the bacterial artificial chromosome cloning system / H. Shizuya, H. Kourou-Mehr // *Keio J. Med.* – 2001. – V. 50. – P. 26–30.
8. Shizuya H. etc. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector / H. Shizuya, B. Birren, U. J. Kim etc. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1992. – V. 89. – P. 8794–8797.
9. McPherson J.D. etc. A physical map of the human genome / J. D. McPherson, M. Marra, L. Hillier etc. // *Nature.* – 2001. – V. 409. – P. 934–941.
10. www.rzpd.de.
11. hbz.tamu.edu.
12. www.chori.org.
13. www.ncbi.nlm.nih.gov.
14. Buitenhuis A.J. etc. Improvement of the comparative map of chicken chromosome 13 / A.J. Buitenhuis, R.P. Crooijmans, Bruijnesteijn van Coppenraet E.S. etc. // *Anim. Genet.* – 2002. – V. 33. – P. 249–254.
15. International Human Genome Consortium, 2001.
16. Toye A.A. etc. A yeast artificial chromosome (YAC) library containing 10 haploid chicken genome equivalents / A.A. Toye, L. Schalkwyk, H. Lehrach etc. // *Mamm. Genome.* – 1997. – V. 8. – P. 274–276.
17. Zimmer R. etc. Construction and characterization of a large-fragment chicken bacterial artificial chromosome library / R. Zimmer, A. Gibbins // *Genomics.* – 1997. – V. 42. – P. 217–226.
18. Crooijmans R.P. etc. Two-dimensional screening of the Wageningen chicken BAC library / R.P. Crooijmans, J. Vrebalov, R.J. Dijkhof etc. // *Mamm. Genome.* – 2000. – V. 11. – P. 360–363.
19. Romanov M.N. etc. Alignment of the chicken linkage map with BAC contigs / M.N. Romanov, S. Suchyta, E. Peters etc. // *Final Abstracts Guide of the International Plant, Animal and Microbe Genome X Conference. San Diego. CA.* – 2002. – P. 225.

20. Clarke L. etc. A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome / L. Clarke, J. Carbon // *Cell*. – 1976. – V. 9. – P. 91–99.
21. Wilchek M. etc. Introduction to avidin–biotin technology / M. Wilchek, E.A. Bayer // *Meth. Enzymol.* – 1990. – V. 184. – P. 5–13.
22. Tuohimaa P. etc. Development of progesterone-specific response in the chicken oviduct / P. Tuohimaa, T. Joensuu, J. Isola etc. // *Int. J. Dev. Biol.* – 1989. – V. 33. – P. 125–134.
23. Elo H.A. etc. Induction of antimicrobial biotin-binding egg white protein (avidin) in chick tissues in septic Escherichia coli infection / H.A. Elo, S. Räsänen, P.J. Tuohimaa // *Experientia*. – 1980. 36, 312–313.
24. Keinänen R.A. etc. Molecular cloning and nucleotide sequence of chicken avidin-related genes 1–5 / R.A. Keinänen, M.J. Wallen, P.A. Kristo etc. // *Eur. J. Biochem.* – 1994. – V. 220. – P. 615–621.
25. Wallen M.J. etc. Two chicken repeat one (CR1) elements lacking a silencer-like region upstream of the chicken avidin related genes Avr 4 and Avr 5 / M.J. Wallen, R.A. Keinänen, M.S. Kulomaa // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1996. – V. 1308. – P. 193–196.
26. Gope M.L. etc. Molecular cloning of the chicken avidin cDNA / M.L. Gope, R.A. Keinänen, P.A. Kristo etc. // *Nucleic Acids Research*. 1987. – V. 15. – P. 3595–3606.
27. Ahlroth M.K. etc. Characterization and chromosomal localization of the chicken avidin gene family / M.K. Ahlroth, E.H. Kola, D. Ewald etc. // *Anim. Genet.* – 2000. – V. 31. – P. 367–375.
28. Kunnas T.A. etc. Induction of chicken avidin and related mRNAs after bacterial infection / T.A. Kunnas, M.J. Wallen, M.S. Kulomaa // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1993. – V. 1216. – P. 441–445.
29. Li W.H. *Molecular Evolution* / W.H. Li // Sunderland, MA, USA. Sinauer Associates Inc. – 1997.
30. Lee M.K. etc. Construction and characterization of three BAC libraries for analysis of the chicken genome / M.K. Lee, C.W. Ren, B. Yan etc. // *Anim. Genet.* – 2003. – V. 34. – P. 151–152.

Глава 5. Отношения паралогии

Полагают, что в ходе ранней эволюции часто происходили дубликации генов, что привело к быстрой дивергенции и специализации ферментативных реакций, определивших разнообразие жизненных форм на Земле [1]. Увеличение размеров геномов, возникновение новых ферментативных реакций, формирование цитоскелета, появление комплексных путей метаболизма считают прямыми следствиями геной дубликации [1].

Понятие «гомология» применяют по отношению к двум структурам или последовательностям (нуклеотидным или аминокислотным), которые развились из одной предковой структуры или последовательности [2]. Чтобы классифицировать различные типы гомологии, Фитч [3] предложил использовать термины «ортология» и «паралогия». Ортологическими называются структуры или последовательности двух различных организмов, которые произошли из одной предковой структуры или последовательности, совсем не обязательно сохраняя функции их предшественника. Поскольку проследить эволюцию структур или последовательностей на практике не всегда представляется возможным, обычно эволюционный консерватизм структур или последовательностей служит основанием для того, чтобы считать их ортологическими. Пример ортологии – β -цепи глобина человека и домово́й мыши. Понятие «паралогия» относится к структурам или последовательностям, возникшим в результате дубликации [2]. Обычно понятие «паралогии» применяют к гомологичным структурам или последовательностям в пределах одного генома [4]. Например, β -цепь глобина человека является паралогом α -цепи глобина и миоглобина человека, поскольку они все произошли в результате последовательных дубликаций [2]. Для серий паралогичных районов, которые могут считаться происшедшими от одного предкового района, предложен термин «паралогон» [5]. Копаралогами называются гены, принадлежащие к одному паралогону, независимо от того, являются ли они между собой паралогами или нет. Общий предок районов, входящих в один паралогон, называется «протопаралогон» [5].

Два раунда крупномасштабных дубликаций произошли в ходе ранней эволюции позвоночных животных согласно так называемой гипотезе 2R (другое название – модель «один-к-четырем») [6]. Следовательно, каждый ген должен быть представлен четырьмя гомологичными последовательностями в каждом геноме. Процессы дивергенции и специализации могли существенно изменить структурные и функциональные характеристики гомологов, а

дупликации и делеции – их число. Наличие большого числа паралогичных нуклеотидных последовательностей, представленных двумя или тремя генами, свидетельствует о возможной массовой потере генов после двух раундов дупликации в соответствии с вышеизложенной гипотезой [5]. Локализация в паралогонах и сходство последовательностей двух или нескольких молекул ДНК может служить основанием для поиска их общего предшественника, как это показано на примере генов семейства WNT (гомологов wiggless-type генов дрозофилы) человека [5].

Вопрос о том, насколько физическая кластеризация (локализация в одном хромосомном районе) отражает функциональную кластеризацию нуклеотидных последовательностей и, следовательно, возможна ли коэволюция функционально-специализированных районов хромосом, обсуждается в течение последних пятнадцати-двадцати лет [4, 5]. Активация отдельных районов хромосом в определенных клеточных линиях может быть объяснением природы паралогичных районов. Например, гены ацетилхолинэстеразы и тироглобулина имеют гомологию нуклеотидных последовательностей и расположены вблизи от генов нейротропного фактора Y (HSA 7) и панкреатического полипептида Y (HSA 17) соответственно [4]. Таким образом, два гена из паралогичного района хромосомы 7 экспрессируются в клетках нервной системы, а два гена соответствующего района хромосомы 17 – в клетках иммунной системы. Анализ распределения генов, кодирующих белки, вовлеченные в различные функциональные комплексы, по длине хромосом человека позволил установить соответствие некоторых паралогионов блокам генов, вовлеченных в один каскад реакций [5]. Таким образом, паралогия может быть связана с функциональной специализацией отдельных районов хромосом. С другой стороны, могут присутствовать механизмы, обеспечивающие дифференциальную экспрессию паралогионов в различных клеточных линиях. Данные сравнительного изучения паралогических районов хромосом человека и дрозофилы послужили основанием для гипотезы коэволюции функциональных кластеров [5].

Гены нескольких семейств (плазминогенные активаторы, ангирины, рецепторы ростовых факторов фибробластов, адренергические рецепторы, везикулярные моноамин-транспортеры, липопротеин липазы), представленные в четырех районах хромосом человека – HSA 4p16, HSA 5q33-q35, HSA 8p12-p21, HSA 10q24-q26) – оказались представлены в геномах позвоночных, включая костистых рыб, в виде консервативных паралогионов [6]. В то же время у иглокожих, насекомых и нематод, указанные семейства представлены одним геном [6]. Интересно, что

у видов *Drosophila melanogaster* и *Caenorhabditis elegans* гомологи генов этих семейств сцеплены. Предполагают, что протопаралогон существует со времени происхождения многоклеточных животных [6]. На примере гомеозисных генов семейства HOX и инсулиноподобных белков показано, что, скорее всего, тетраплоидизация имела место на рубеже цефалохордовые – черепные [7].

В настоящее время известно 15 паралогонов человека (серий паралогических районов, имеющих происхождение от одного предкового района) (рис. 6), которые включают более 1700 генов, что составляет более чем 5 % от общего числа генов человека [5]. Большинство генов, входящих в паралогоны, представляют обширные семейства, такие как иммуноглобулины, ольфакторные рецепторы, антигены гистосовместимости и т. д. [5].

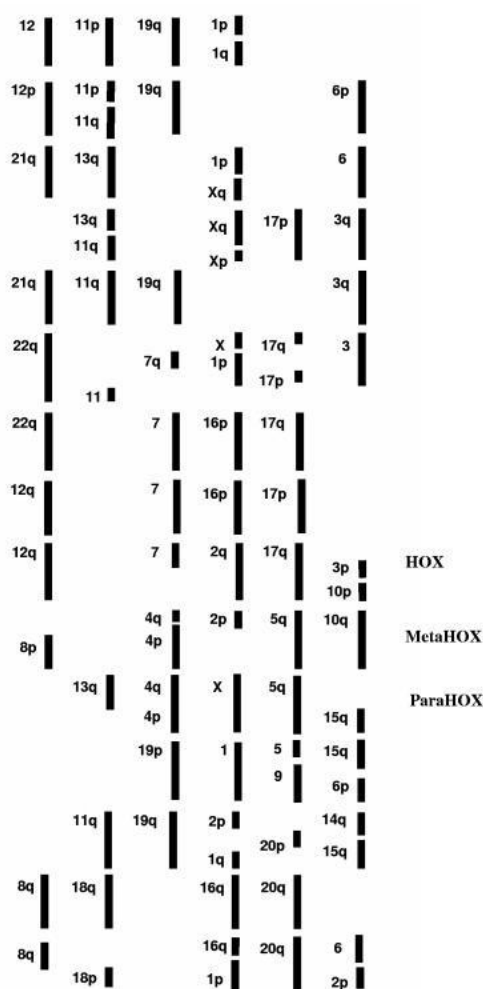


Рис. 6. Обобщенная карта паралогонов человека по [5]

Обращает на себя внимание тот факт, что районы хромосом расположены по четыре – в соответствии с 2R-гипотезой.

На основании паралолии картирование генома может проводиться быстрее – зная локализацию одного представителя семейства генов и паралогию этого хромосомного района другим районам, можно предсказать три наиболее вероятных сайта локализации другого представителя того же генного семейства. Зная локализацию двух или трех генов семейства, можно предсказать, соответственно, два или один возможный район локализации.

Аденозиновые рецепторы являются важными медиаторами передачи множества клеточных сигналов и относятся к надсемейству рецепторов, связывающих G-белки, к классу рецепторов клеточной поверхности, связывающих G-белковые гетеротримеровые комплексы и включающих гептатрансмембранный домен [8]. У птиц показано участие аденозиновых рецепторов в ангиогенезе развивающихся эмбрионов и хориоалантоисной мембраны [9], а также в развитии и регуляции роста симпатических нейронов (Wakade et al., 1995), выявлен высокий уровень экспрессии генов аденозиновых рецепторов в мышечных тканях сердца [10].

В настоящее время изучена геномная структура одного из аденозиновых рецепторов домашней курицы – ADORA2B. Ген занимает участок около 10 т. п. н. и включает два экзона [11]. Промотор этого гена ассоциирован с CpG-островком и не содержит канонического ТАТА-бокса. Выявлены сайты связывания регуляторных факторов ν -Myb и ς -Myb в 5'-фланкирующей области, в интроне обнаружены множественные сайты гиперчувствительности к ДНКазе I, некоторые из которых функционируют в качестве тканеспецифических cis-активных регуляторных элементов (Braas et al., 2003). Общая структура фланкирующей области гена ADORA2B определена как типичная для тканеспецифических генов [11].

На хромосомах человека гены ADORA1, ADORA2B и ADORA3 расположены в районах 1q32.1, 17p12-p11.2 и 1p21-p13 [12] соответственно. Всего у человека известно четыре гена аденозиновых рецепторов – ADORA1 (рецептор аденозина A1), ADORA2A (рецептор аденозина A2A), ADORA2B (рецептор аденозина A2B) and ADORA3 (рецептор аденозина A3), гомология нуклеотидных последовательностей которых позволяет говорить об их происхождении от одного предкового гена [13, 14, 15]. Это хорошо согласуется с предложенной в 1998 г. Постлетвайтом [16] гипотезой тетраплоидизации предкового генома в эволюции генома позвоночных животных [16]. Известно, что гены ADORA1 и ADORA3 расположены в протяженных районах паралолии хромосом человека – 1q21-q42 и 1p36-p13 [4]. Таким образом, принимая во внимание установленный высокий уровень эволюционного

консерватизма районов хромосом человека и домашней курицы [17], семейство генов аденозиновых рецепторов представляет собой удобную модель для изучения отношений паралолии нуклеотидных последовательностей в геноме птиц. Методом ПЦР с использованием деградированных праймеров на геномной ДНК домашней курицы были выявлены три фрагмента длиной 450 п. н., 350 п. н. и 350 п. н. [18]. Секвенирование этих фрагментов и последующее за тем сравнение их нуклеотидных последовательностей с имеющимися в геномных базах данных позволило установить соответствие этих фрагментов генам ADORA1, ADORA2B и ADORA3 на основании гомологии [18]. К этому времени стала доступной последовательность гена ADORA3 домашней курицы (EMBL accession number AF115332), которая оказалась идентичной последовательности, установленной нами для ADORA3 [18]. Последовательности генов ADORA1 и ADORA2B были внесены в геномный банк данных [8] с идентификационными номерами (EMBL accession numbers) V12601 и U28380 соответственно. Полученные при скринировании геномной библиотеки RZPD-125 космидные клоны F11-95 (ADORA1), A19-221 (ADORA2B) и D17-237 (ADORA3) были локализованы нами на микрохромосомах примерно одинакового размера, порядка GGA 15 – GGA 25 [18]. Предстояло выяснить, находятся ли они действительно в разных хромосомных районах, как у человека, или на одной микрохромосоме. Особый интерес представляла колокализация генов ADORA1 и ADORA3, находящихся в классических паралогических районах человека [4]. Методом двуцветной гибридизации ДНК-ДНК *in situ* нами было показано, что ген ADORA2B расположен отдельно от ADORA1 и ADORA3 – на другой микрохромосоме – в то время как последние два гена локализованы на одной и той же микрохромосоме [18].

Выявление этих двух генов аденозиновых рецепторов на одной микрохромосоме курицы дает возможность сделать два предположения: либо тетраплоидизация предкового генома происходила независимо в эволюционных линиях птиц и млекопитающих, либо дивергенция ADORA1 и ADORA3 в двух классах теплокровных проходила различным образом, т. е. эти гены у птиц возникли путем прямой дупликации. Первое предположение, на наш взгляд, является более вероятным, принимая во внимание более высокую степень гомологии нуклеотидных последовательностей генов семейства аденозиновых рецепторов человека и домашней курицы, чем ADORA1 и ADORA3 в пределах вида [18], хотя и не согласуется с распространенной в настоящее время гипотезой тетраплоидизации генома у цефалохордовых в ходе ранней эволюции позвоночных [19].

Список литературы

1. Lascano M. etc. How long did it take for life to evolve to cyanobacteria? / M. Lascano, S. Miller // *J. Mol. Evol.* – 1994. – V. 39. – P. 545–554.
2. Gogarten J.P. etc. Orthologs, paralogs and genome comparisons / J. P. Gogarten, L. Olendzenski // *Curr. Opin. Genet.* – 1999. – V. 9. – P. 630–636.
3. Fitch W.M. Distinguishing homologous from analogous proteins / W.M. Fitch // *Syst. Zool.* – 1970. – V. 19. – P. 99–113.
4. Lundin L.G. Evolution of the vertebrate genome as reflected in paralogous chromosomal regions in man and the house mouse / L.G. Lundin // *Genomics.* – 1993. – V. 16. – P. 1–19.
5. Popovici C. etc. Coparalogy: physical and functional clusterings in the human genome / C. Popovici, M. Leveugle, D. Birnbaum etc. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – V. 288. – P. 362–370.
6. Pebusque M.J. etc. Ancient large-scale genome duplications: phylogenetic and linkage analyses shed light on chordate genome evolution / M.J. Pebusque, F. Coulier, D. Birnbaum etc. // *Mol. Biol. Evol.* – 1998. – V. 15. – P. 1145–1159.
7. Holland P.W.H. etc. Gene duplications and the origins of vertebrate development / P.W.H. Holland, J. Garcia-Fernandez, N.A. Williams etc. // *Development.* – 1994. Suppl. – P. 125–133.
8. www.ncbi.nlm.nih.gov.
9. Dusseau J.W. etc. Stimulation of angiogenesis by adenosine on the chick chorioallantoic membrane / J.W. Dusseau, P.M. Hutchins, D.S. Malbasa // *Circ. Res.* – 1986. – V. 59. – P. 163–170.
10. Durand I.H. etc. Cloning of a chick A3 adenosine receptor: characterization of ligand binding and receptor-effector coupling of chick A1 and A3 adenosine receptors / I.H. Durand, R.D. Green // *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 2001. – V. 363. – P. 81–86.
11. Braas D. etc. Analysis of DNase I-hypersensitive sites in the chromatin of the chicken adenosine receptor 2B gene reveals multiple cell-type-specific cis-regulatory elements / D. Braas, D. Kattmann, J. Miethe etc. // *Gene.* – 2003. – V. 303. – P. 157–164.
12. www.gdb.org.
13. Townsend-Nicholson A. etc. Localisation of the adenosine A receptor subtype gene ADORA1 to chromosome 1q32.1 / A. Townsend-Nicholson, E. Baker, P.R. Schofeld etc. // *Genomics.* – 1995a. – V. 26. – P. 423–425.
14. Townsend-Nicholson A. etc. Localisation of the adenosine A receptor subtype gene ADORA2B to chromosome 17p11.2-p12 by FISH and PCR screening of somatic cell hybrids / A. Townsend-Nicholson, E. Baker, G.R. Sutherland etc. // *Genomics.* – 1995b. – V. 25. – P. 605–607.
15. Atkinson M.R. etc. Cloning, characterization and chromosomal assignment of the human adenosine A receptor (ADORA3) gene / M.R. Atkinson, A. Townsend-Nicholson, J.K. Nicholl etc. // *Neurosci. Res.* – 1997. – V. 29. – P. 73–79.
16. Postlethwait J.H. etc. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map / J.H. Postlethwait, Y.L. Yan, M.A. Gates // *Nature Genet.* – 1998. – V. 18. – P. 345–349.
17. Burt D.W. etc. The dynamics of chromosome evolution in birds and mammals / D.W. Burt, C. Bruley, I.C. Dunn etc. // *Nature.* – 1999. – V. 402. – P. 411–413.
18. Sazanov A. etc. Chromosomal mapping of adenosine receptor genes in chicken suggests clustering of two members of the gene family / A. Sazanov, M.R. Atkinson, J. Buitkamp etc. // *Chromosome Rese.* – 2000. – V. 8. – P. 173–176.
19. Thornton J.W. etc. Gene family evolution and homology: genomics meets phylogenetics / J.W. Thornton, R. DeSalle // *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.* – 2000. – V. 1. – P. 41–73.

Глава 6. Отношения ортологии

Наряду с традиционными морфологическими подходами к изучению эволюционных отношений и механизмов данные сравнительного картирования хромосом позволяют делать выводы о путях эволюции [1]. В этом случае синтенные группы разных организмов можно рассматривать как морфологические структуры, которые могут проявлять отношения гомологии и аналогии между собой. Быстрый прогресс геномного картирования, преимущественно на различных видах млекопитающих, позволил применить указанный подход и выявить неожиданно высокий уровень эволюционного консерватизма хромосомных районов [2]. Среди животных наиболее подробно феномены ортологии изучены в геномах человека и домового мыши. В настоящее время у человека и домового мыши выявлено 202 района ортологии, которые включают более 1800 кодирующих последовательностей [3]. Наиболее детальная информация об эволюционном консерватизме хромосомных районов может быть получена при сравнении полностью секвенированных геномов или хромосом различных видов. В этом случае становится возможным выявление точек разрыва ортологии хромосомных районов с точностью до нуклеотида. Сравнение полной нуклеотидной последовательности хромосомы 16 домового мыши (MMU 16) и генома человека позволило охарактеризовать на молекулярном уровне эволюционный консерватизм MMU 16 и HSA 3, HSA 8, HSA 12, HAS 16, HSA 21, HSA 22 [4]. Хромосома 16 была выбрана для сравнения, поскольку было известно, что есть протяженный участок ее гомологии (около 25 миллионов пар оснований) с хорошо охарактеризованной хромосомой 21 человека. В отношении кодирующих последовательностей ДНК с неизвестной функцией (ESTs) принят критерий ортологичности – более 80 % гомологии нуклеотидной последовательности на протяжении более 100 пар оснований. В данной работе показан эволюционный консерватизм локализации 11 822 кодирующих последовательностей со средним значением идентичности нуклеотидной последовательности 88,1 % и средней длиной ортологичных генов 198 пар оснований. В среднем на каждые восемь тысяч пар нуклеотидов приходился один консервативный маркер. Интересно, что «интерсперсия» консервативных и неконсервативных районов была неравномерна – от 0 до примерно 3,5 миллиона пар оснований. Знание отношений гомологии с геномом человека дало возможность предсказать функцию 731 новой кодирующей последовательности на хромосоме 16 домового мыши [4].

Эволюционный консерватизм состава кодирующих последовательностей в ортологичных районах может быть выявлен при помощи стандартных методов физического картирования. Сравнение между собой крупномасштабных последовательностей различных геномов позволяет установить наличие консерватизма порядка расположения генов по отношению друг к другу на участках, трудно разрешимых для обычных методов [4]. В случае, когда три последовательности в пределах короткого интервала на хромосоме расположены в том же порядке, что и гомологичные им последовательности на хромосоме другого вида, это их отношение определяется как «консерватизм синтении» [4]. Оказалось, что блоки консервативной синтении человека и домового мыши могут включать от нескольких до нескольких сот генов, причем отмечается в среднем больший физический размер синтенных блоков человека. Суммарная длина синтенных блоков на Mmu 16 – 92 миллиона пар оснований, а в ортологичных ей районах хромосом человека – 108 миллионов пар оснований [4].

Помимо, безусловно, большого значения для теоретической биологии феномен ортологии оказался очень полезен для картирования геномов, поскольку, основываясь на консерватизме изучаемых районов, можно экстраполировать данные по картированию генома более изученного в этом отношении вида на менее изученный. Поскольку в настоящее время наиболее изученным видом является человек, выявление ортологии нуклеотидных последовательностей и хромосомных районов любого вида позвоночных животных и человека имеет особое значение. Позиционное клонирование районов хромосом, обладающих наибольшим действием на проявление количественных признаков, может быть существенно проще в случае, если известен эволюционный консерватизм изучаемого района и соответствующего ему на хромосомах человека. Так, на основании ортологии центромерного района хромосомы 14 крупного рогатого скота и района HSA 8q23-tel был осуществлен подбор маркеров первого типа для построения контига протяженных геномных клонов, покрывающего район локализации QTL жирности молока [5]. При секвенировании нуклеотидных последовательностей этого контига был обнаружен ген DGAT1 (ацил-кофермент А – диацилглицерол ацилтрансфераза), который по физиологическому действию мог быть кандидатом для данного QTL. В другом исследовании по позиционному клонированию знание ортологии теломерного района хромосомы 6 крупного рогатого скота (BTA 6) и района HSA 4p16-q21 позволило установить, что мутация гена LIMBIN является причиной хондродиспластической карликовости у крупного рогатого скота [6].

Таким образом, изучение гомологии (ортологии и паралогии) нуклеотидных последовательностей и хромосомных районов является необходимым элементом молекулярно-цитогенетического анализа геномов.

6.1. Хромосома 1

Впервые ортология GGA 1p21-q12 и HSA 12p13-q23 была выявлена Кляйн и соавторами в 1996 г. [7], установившими локализацию гена IGF1 в прицентромерном районе GGA1 методом прямого физического картирования. Ранее методом генетического анализа была определена локализация гена GAPD также в прицентромерном районе хромосомы 1 домашней курицы. Поскольку на хромосомах человека оба гена находятся в районе 12p13-q23, авторами был сделан вывод об эволюционном консерватизме GGA 1p21-q12 и HSA 12p13-q23 (рис. 7) [7]. Третьим по счету маркером этого района эволюционного консерватизма и вторым с известной физической локализацией стал ген CCND2, картированный нами методом FISH в GGA 1p12 - q11 в 1998 г. [8].

Методом рекомбинационного картирования гены ранее было установлено, что гены MGF и MGP домашней курицы находятся на GGA1 в положениях 126 и 143 сМ соответственно [9]. Полученные нами данные о физической локализации этих генов в GGA1p11-q11 позволяют установить соответствие этого района хромосомы 1 сегменту 126–143 сМ группы сцепления 1 [10].

Всего в настоящее время известно 25 генов, проявляющих ортологию нуклеотидных последовательностей хромосомы 12 человека и хромосомы 1 домашней курицы [11]. Для девяти из них известна внутрихромосомная локализация [9]. Данный район включает также важный морфологический маркер – центромер – у обоих видов, положение которого относительно маркеров первого типа (кодирующих последовательностей ДНК) не сохранилось постоянным.

Интересно отметить, что у домового мыши указанный район представлен тремя районами хромосом 6, 10 и 15, что иллюстрирует более высокий уровень гомологии хромосом *Homo sapiens* и *Gallus gallus*. Таким образом, эволюционный консерватизм наблюдается, несмотря на отдаленное таксономическое положение представителей классов птиц и млекопитающих, и даже превосходит консерватизм внутри класса *Mammalia* [11].

Неожиданно высокий эволюционный консерватизм районов хромосом человека и домашней курицы, оказавшийся существенно более высоким, чем у таксономически несравненно более близких видов – человека и домового мыши, открывает возможности прямого экстраполирования данных полного секвенирования генома

человека на большое число хромосомных районов птиц. Это дает основания полагать, что при позиционном клонировании и поиске генов-кандидатов количественных признаков у хозяйственно ценных птиц могут быть использованы детальные карты нуклеотидных последовательностей человека. С другой стороны, обладая большим сходством по композиции хромосомных районов с человеком, чем домовая мышь, домашняя курица (а, возможно, и другие виды птиц) могут быть использованы в качестве лабораторных объектов для моделирования хромосомных заболеваний и других наследственных дефектов человека, особенно связанных с биологией развития, поскольку эта область биологии детально разработана на представителях класса Aves.

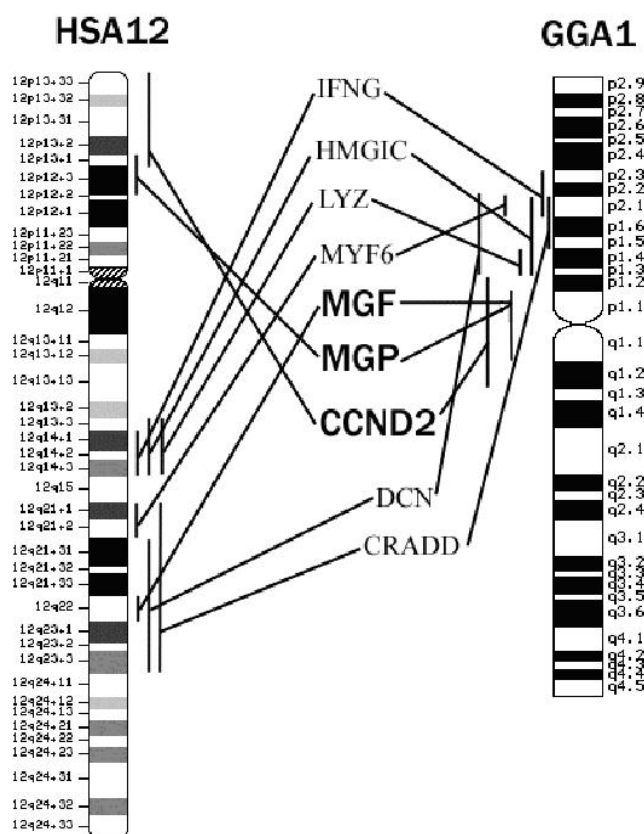


Рис. 7. Эволюционный консерватизм районов GGA 1p21-q12 и HSA 12p13-q23. Жирным шрифтом выделены символы генов, картированных на хромосомах домашней курицы в представленной работе. Указаны только те маркеры первого типа, для которых известна физическая внутривхромосомная локализация на GGA 1 [10]

Таблица 2

Сравнительная локализация генов ADORA1, ADORA2B, ADORA3, APOA1, BBC1, CCNC, CCND1, CCND2, CCND2P, CCNE, EDNRA, ETS1, GDF8, MC1R, ALB, ANX5, MGF, MGP и TYR на хромосомах человека (HSA) и домашней курицы (GGA). Локализация генов на хромосомах человека приведена на основании данных Human Genome Database [12]

Локус	HSA	GGA
ADORA1	1q32.1	15–25
ADORA2B	17p12-p11.2	15–25
ADORA3	1p21-p13	15–25
ALB	4q11-q13	4q11-q12
ANX5	4q26-q28	4q13-q21
APOA1	11q23.3	24*
BBC1	16q24.3	15–20
CCNC	6q21	3q28-q210
CCND1	11q13.3	5q12-q13
CCND2	12p13	1p12-q12
CCND2P	12p13	1p13-p11 + 10–20
CCNE	19q12-q13	10 – 15
EDNRA	4pter - qter	4q11-q12
ETS1	11q23.3	24*
GDF8	2q32.1	7p11
MC1R	16q24.3	15 – 20
MGF	12q22	1p11-q11
MGP	12p13.1-p12.3	1p11-q11
TYR	11q21	1q32-q42

Примечание.

* номер микрохромосомы определен на основании оценки ее относительной длины, выполненной Филлон и соавт. в 1998 г. [13].

В настоящее время известно 10 генов, проявляющих консерватизм локализации на хромосомах 1 и 11, домашней курицы и человека, соответственно [11].

У домашней курицы известен локус С (аутосомный альбинизм), представленный четырьмя аллелями: с⁺ (дикий тип), с (рецессивный белый), с^{re} (красно-глазый белый) и са (аутосомный альбинизм) [14]. Сравнение нуклеотидных последовательностей гена тирозиназы у линий Блэк-Силки (дикий тип по локусу с) и Аутосомный Альбино (гомозигота по аллели са) методом РТ-ПЦР (ПЦР на основе кДНК) позволило выявить три мутации у мутантной линии: две синонимические нуклеотидные замены и делецию величиной 6 пар нуклеотидов (Δ GACTGG) в положении +817 п. н. [14]. Поскольку такая делеция приводит к потере двух аминокислотных остатков – аспартама и триптофана – в одном из функциональных центров белка, авторы предполагают, что эта мутация приводит к инактивации фермента тирозиназы и проявлению фенотипа аутосомный альбино [14].

Внутрихромосомная локализация гена тирозиназы (TYR) впервые была определена в районе GGA 1q42-q44 Сузуки и соавторами в 1999 г. [15] с использованием в качестве зонда кДНК длиной 2 т. п. н.

Поскольку для достоверного установления локализации необходимы независимые друг от друга данные двух и более исследовательских групп, желательно с использованием разных ДНК-зондов, мы провели эксперимент по гибридизации *in situ* двух ВАС-клонов, содержащих этот ген, на митотических хромосомах домашней курицы. Нами установлена локализация гена TYR в районе GGA 1q32-q42, причем один из клонов находится в районе 1q32-q36, а другой – в районе 1q36-q42 [15]. Принимая во внимание длину клонов (около 150 т. п. н.), можно предположить, что они расположены в противоположных друг другу концах района 1q36, что приводит к смещению района статистически достоверной локализации в дистальную и проксимальную область. Полученные нами данные несколько отличаются от данных Сузуки и соавторов [15], при этом общим для трех локализованных клонов является район 1q36. Поскольку нами использованы протяженные геномные ДНК-зонды, которые, как правило, позволяют получить более сильный гибридизационный сигнал, указанный факт, на наш взгляд, можно рассматривать как уточнение локализации.

Получение геномных ВАС-клонов и применение их для прямого физического картирования гена TYR позволило не только уточнить его локализацию в районе GGA 1q32-q42, но и предоставило два протяженных фрагмента генома (суммарной

длиной 300 т. п. н.), которые могут быть использованы для изолирования и характеристики последовательностей ДНК района эволюционного консерватизма GGA 1q23-q44 – HSA 11p15-q22, а также анализа геномной структуры гена тирозиназы курицы.

Хотелось бы отметить, что у домашней мыши район эволюционного консерватизма GGA 1q23-q44 и HSA 11p15-q22 представлен на двух хромосомах: MMU 7 и MMU 9, что подтверждает положение о большем сходстве хромосом человека и курицы, чем человека и мыши [11].

6.2. Хромосома 3

Нами была показана локализация гена CCNC в районе GGA 3q28-q210. У человека этот ген находится в районе HSA 6q21 [12]. На момент опубликования наших данных по локализации CCNC [8] два локуса были физически картированы на хромосоме 3 домашней курицы – MYB (гомолог вирусного онкогена v-myb миелобластоматоза птиц; GGA 3q24-q26; HSA 6q21) [16] и TGFB2 (трансформирующий ростовой фактор бета 2; GGA 3q29-q31; HSA 1q41) [17]. Поскольку ген CCNC был локализован в участке между генами MYB и TGFB2, был сделан вывод о наличии нового района эволюционного консерватизма хромосом человека и домашней курицы и существовании разрыва консервативной синтении в районе локализации гена TGFB2 (GGA 3q29-q31; HSA 1q41) [12].

На хромосомах человека ген CCNC был локализован в районе 6q21 Деметрик и соавторами в 1995 г. [18] методом флуоресцентной гибридизации *in situ*. Локализация была подтверждена Ли и соавторами в 1996 г. [19], установившими также, что при острой лимфобластической лейкемии район HSA 6q21 делетирован, что косвенно свидетельствует об участии гена CCNC в канцерогенезе. Район HSA 6p12-q27 привлекает пристальное внимание генетиков человека, поскольку содержит большое число генов, вовлеченных в канцерогенез, и часто оказывается поверженным хромосомным перестройкам в опухолевых клетках [12]. В настоящее время район ортологии хромосом HSA 6 и GGA 3 включает 13 маркеров первого типа, которые у домашней мыши представлены на хромосомах MMU 4, MMU 9, MMU 10, MMU 17 [11]. Интересно отметить, что один из генов, локализованных на GGA 3 (SULT1A2), проявляет ортологию с MMU 17 и не проявляет таковой с HSA 6 [11]. Это единственный известный случай, когда эволюционный консерватизм хромосомных районов домашней курицы и домашней мыши выше, чем человека и курицы.

6.3. Хромосома 4

Данный район является одним из самых протяженных и наиболее изученным как путем сравнительного картирования молекулярных маркеров первого типа, так и методом микродиссекции и гетерологичного хромосомного пэинтинга [20], районом ортологии хромосом человека и домашней курицы. Кроме того, большинство известных QTL качества яйца локализованы в пределах GGA 4q11-q24 [21, 22], что определяет потенциальную значимость этого района для позиционного клонирования, проведение которого может быть существенно ускорено экстраполированием данных полного секвенирования генома человека на ортологичный район GGA 4. У домашней мыши этот район ортологии соответствует районам хромосом MMU 3, MMU 5, MMU 8 и MMU 13 [11] (рис. 8).

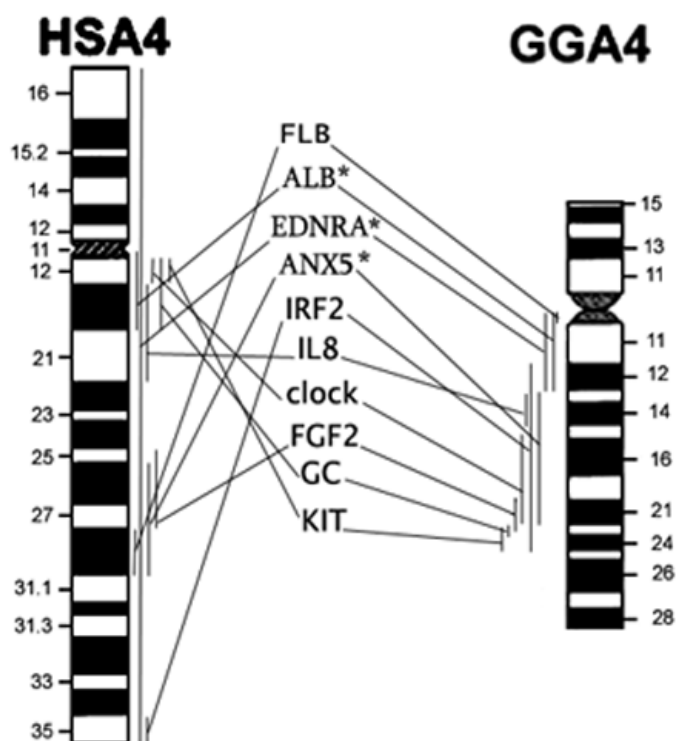


Рис. 8. Эволюционный консерватизм районов GGA 4q11-q24 и HSA 4p16-q28. Звездочками отмечены символы генов, картированных на хромосомах домашней курицы в представленной работе. Указаны только те маркеры первого типа, для которых известна физическая внутрихромосомная локализация на GGA 4 (Chicken Genome Database [10])

Из трех локализованных нами маркеров GGA 4q11-q24, два были впервые физически картированы на хромосомах домашней курицы – ANX5 и EDNRA, а ген ALB, ранее был отнесен Сузуки и соавторами [15] к району GGA 4q16-q21 на основании результатов гибридизации *in situ* с использованием в качестве зонда кДНК длиной всего 1,3 т. п. н. Применение в качестве ДНК-зонда геномной последовательности длиной 150 т. п. н. позволило уточнить локализацию этого гена в GGA 4q11-q12.

Особое значение имеет локализация гена ALB, поскольку в соседнем районе GGA 4q16-q21 находится ген CLOCK, продукт которого контролирует циркадные ритмы [23]. Существуют веские основания считать ген CLOCK наиболее вероятным геном-кандидатом для картированных на хромосоме 4 QTL яйценоскости и массы яйца [22].

В 1986 г. Пальмером и Джонсом [24] четыре гена домашней курицы – фосфоглюкомутаза 2 (PGM-2), сывороточный альбумин (ALB), белок, связывающий витамин D, (GC) и фосфорибозил-пирофосфат-амидотрансфераза (PPAT) – были отнесены к хромосоме 6 на основании анализа их косегрегации в панели гибридных клеток курица – китайский хомячок. Последующие работы по картированию этих генов методами генетического картирования и гибридизации *in situ* показали локализацию двух из них – GC и ALB на хромосоме 4 [10].

6.4. Хромосома 5

Данный район ортологии хромосом человека и домашней курицы включает 11 кодирующих последовательностей и представлен на трех хромосомах домового хомячка: MMU 2, MMU 7 и MMU 19 [11]. На момент опубликования наших данных по локализации гена циклина D1 – CCND1 (GGA 5q12-q13; HSA 11q13.3) этот район ортологии не был известен [8]. В 1998 г. на основании данных по локализации гена тирозин-гидроксилазы (GGA 5q11-q12; HSA 11q15.5) [25] и гена CCND1 нами было показано существование эволюционного консерватизма хромосомы 5 домашней курицы и хромосомы 11 человека [8]. Позднее была установлена локализация генов инсулина (INS, GGA 5q11-q12, HSA 11q15.5) и триптофан гидроксилазы (TPH, GGA 5q11-q12, HSA 11q15.3-q15.8) [26], при этом для локализации гена INS авторы использовали космидный ДНК-клон, полученный при нашем участии [27].

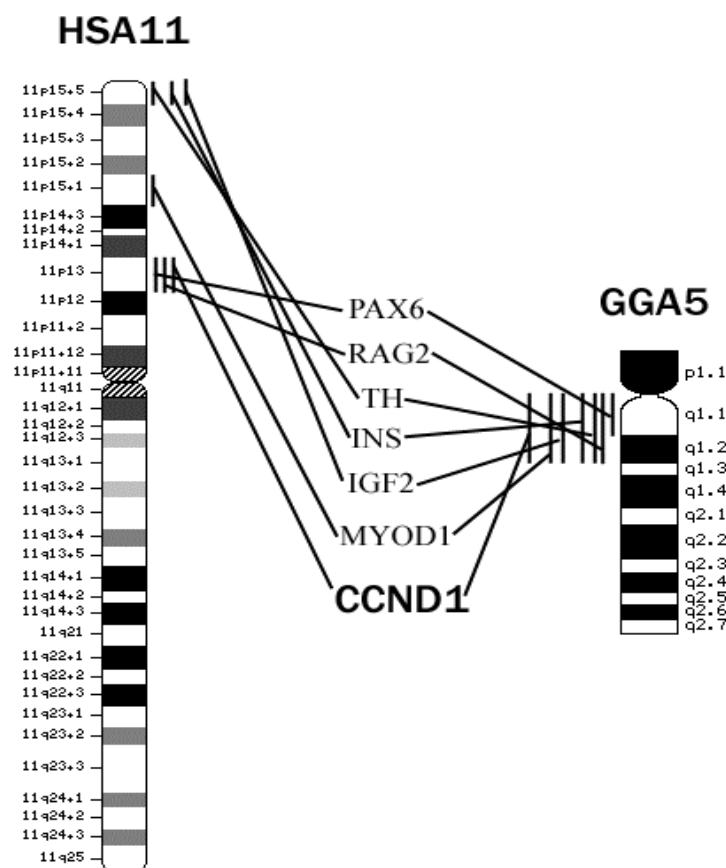


Рис. 9. Эволюционный консерватизм районов GGA 5q11-q12 и HSA 11p13-q24. Жирным шрифтом выделены символы генов, картированных на хромосомах домашней курицы в представленной работе. Указаны только те маркеры первого типа, для которых известна физическая внутрихромосомная локализация на GGA 5 (Chicken Genome Database [10])

Список литературы

1. Lundin L.G. Evolution of the vertebrate genome as reflected in paralogous chromosomal regions in man and the house mouse // *Genomics*. – 1993. – V. 16. – P. 1–19.
2. Lundin L.G. Evolutionary conservation of large chromosomal segments reflected in mammalian gene maps // *Clin. Genet.* – 1979. – V. 16. – P. 72–81.
3. www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/Homology.
4. Mural R.J. etc. A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome // *Science*. – 2002. – V. 296. – P. 1661–1671.
5. Grisart B. etc. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutations in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition // *Genome Research*. – 2002. – V. 12. – P. 222–231.
6. Takeda H. etc. Positional cloning of the gene LIMBIN responsible for bovine chondrodysplastic dwarfism // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2002. – V. 99. – P. 10549–10554.
7. Klein S. etc. Genetic and physical mapping of the chicken IGF1 gene to chromosome 1 and conservation of synteny with other vertebrate genomes // *J. Hered.* – 1996. – V. 87. – P. 10–14.

8. Masabanda J. etc. Mapping of five members of the cyclin gene family on chicken chromosomes by FISH // *Chromosome Res.* – 1998. – V. 6. – P. 231–233.
9. Schmid M. etc. First report on chicken genes and chromosomes 2000 // *Cytogenet. Cell Genet.* – 2000. – V. 90. – P. 169–218.
10. www.thearkdb.org.
11. Burt D.W. Origin and evolution of avian microchromosomes // *Cytogenet. Genome Res.* – 2002. – V. 96. – P. 97–112.
12. www.gdb.org.
13. Fillon V. etc. Identification of 16 chicken microchromosomes by molecular markers using two – colour fluorescence in situ hybridization (FISH) // *Chromosome Research.* – 1998. – V. 6. – P. 307–313.
14. Tobita-Teramoto T. etc. Autosomal albino chicken mutation (*ca/ca*) deletes hexanucleotide (-deltaGACTGG817) at a copper-binding site of the tyrosinase gene // *Poult. Sci.* – 2000. – V. 79. – P. 46–50.
15. Suzuki T. etc. Cytogenetic mapping of 31 functional genes on chicken chromosomes by direct R-banding FISH // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1999. – V. 87. – P. 32–40.
16. Soret J. etc. Chromosomal reallocation of the chicken *c-myc* locus and organization of 3'-proximal coding exons // *FEBS.* – 1991. – V. 263. – P. 254–260.
17. Burt D.W. etc. The chicken transforming growth factor-beta 3 gene: genomic structure, transcriptional analysis, and chromosomal location // *DNA Cell Biol.* – 1995. – V. 14. – P. 111–123.
18. Demetrick D.J. etc. Chromosomal mapping of the genes for the human cell cycle proteins cyclin C (*CCNC*), cyclin E (*CCNE*), p21 (*CDKN1*) and KAP (*CDKN3*) // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1995. – V. 69. – P. 190–192.
19. Li H. etc. Molecular cloning and chromosomal localization of the human cyclin C (*CCNC*) and cyclin E (*CCNE*) genes: deletion of the *CCNC* gene in human tumors // *Genomics.* – 1996. – V. 32. – P. 253–259.
20. Chowdhary B.P. etc. HSA4 and GGA4: remarkable conservation despite 300-Myr divergence // *Genomics.* – 2000. – V. 64. – P. 102–105.
21. Tuiskula-Haavisto M. Mapping of quantitative trait loci affecting quality and production traits in egg layers // *Poultry Sci.* – 2002. – V. 81. – P. 919–927.
22. Wardecka B. etc. Relationship between microsatellite marker alleles on chromosome 1-5 originating from the Rhode Island Red and green-legged Partridge breeds and egg production and quality traits in F₂ mapping population // *J. Appl. Genet.* – 2002. – V. 43. – P. 319–329.
23. Wardecka B. etc. Relationship between microsatellite marker alleles on chromosome 1-5 originating from the Rhode Island Red and green-legged Partridge breeds and egg production and quality traits in F₂ mapping population // *J. Appl. Genet.* – 2002. – V. 43. – P. 319–329.
24. Palmer D.K. etc. Gene mapping in chicken-Chinese hamster somatic cell hybrids. Serum albumin and phosphoglucosyltransferase-2 structural genes on chicken chromosome 6 // *J. Hered.* – 1986. – V. 77. – P. 106–108.
25. Dominguez-Steglich M. etc. Assignment of the chicken tyrosine hydroxylase gene to chromosome 6 by FISH // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1992b. – V. 60. P. – 138–139.
26. Habermann F. etc. Physical mapping of the genes encoding tryptophan hydroxylase and insulin to chicken chromosome 5 // *Animal Genetics.* – 2001. – V. 32. – P. 316–331.
27. Buitkamp J. etc. Construction and characterisation of a gridded chicken cosmid library with four-fold genomic coverage // *Anim. Genet.* – 1998. – V. 29. – P. 295–301.

Глава 7. Композиционная гетерогенность ДНК и функциональная специализация геномных фракций

Неоднородность распределения по геному ГЦ- и АТ-обогащенных районов, другими словами, композиционная гетерогенность ДНК является одной из наиболее важных характеристик молекулярной организации геномов.

Более 30-ти лет назад Бернарди и сотрудники при исследовании генома мыши *Mus musculus* обнаружили, что комплекс ДНК и серебра может быть разделен с помощью равновесного центрифугирования в градиенте плотности Cs_2SO_4 по частоте сайтов на молекуле ДНК, связавших серебро. Это открытие позволило с высокой точностью разделять ДНК на фракции. Дальнейшее изучение этих фракций ДНК привело к открытию четкой композиционной гетерогенности ДНК [1]. Композиционно гомогенные сегменты ДНК, принадлежащие к небольшому числу семейств, различающихся по плавучей плотности, были названы изохорами [2]. Фракционирование ДНК по плавучей плотности при центрифугировании фрагментов ДНК в градиенте Cs_2SO_4 (или сахарозы) было выявлено у большого числа видов животных. Это отражает гетерогенность ДНК по нуклеотидному составу: АТ-богатые последовательности обладают большей плавучей плотностью, чем ГЦ-богатые. Относительные количества ДНК в семействах изохор формируют так называемый композиционный изохорный паттерн генома (также он называется геномным фенотипом), т. е. характерный «рисунок» из изохор, являющийся специфичным для каждого отряда или семейства [1]. У теплокровных и холоднокровных позвоночных изохорные паттерны значительно различаются [2, 3].

У человека были выявлены два «легкие» семейства изохор: L1 ($1,698 \text{ г/см}^3$) и L2 ($1,700 \text{ г/см}^3$), и три «тяжелые»: H1 ($1,704 \text{ г/см}^3$), H2 ($1,708 \text{ г/см}^3$) и H3 ($1,712 \text{ г/см}^3$) [3, 4]. В геноме мыши присутствуют семейства L1, L2, H1 и H2 [4]. У холоднокровных животных представлены только «легкие» изохоры семейств L1 и L2 [5]. Среди нескольких видов птиц из разных таксонов показана в принципе однообразная композиция генома с присутствием тех же фракций, что и у человека, и дополнительного семейства «сверхтяжелых» изохор H4 ($> 1,712 \text{ г/см}^3$) [6]. Кроме того, во фракциях тяжелых и «сверхтяжелых» изохор обнаруживается характерный для птиц и рептилий ГЦ-богатый сателлит [2]. У человека семейства L1 и L2 составляют свыше 62 % всего генома; H1 – 22 %, H2 – 9 %, семейство H3 составляет около 3 % генома [7]. По другим данным,

содержание изохор в геноме человека несколько иное: L1 и L2 составляют 63 % генома; H1 – 24 %, H2 – 7,5 %, H3 – 4,7 % [8, 9].

Наибольшее значение с точки зрения структурно-функциональной организации генома имеет вопрос о связи различных семейств изохор с кодирующими последовательностями ДНК и особенностями их экспрессии. В первых исследованиях этого вопроса было показано, что большинство из 40 взятых в анализ генов человека расположены в ГЦ-богатых семействах [9]. Впоследствии локализация *in silico* более 14000 генов человека привела авторов к тому же выводу [10], позднее подтвержденному на еще больших выборках кодирующих последовательностей [11, 12]. На рис. 10 показана диаграмма распределения плотности генов в каждом из семейств изохор у человека.

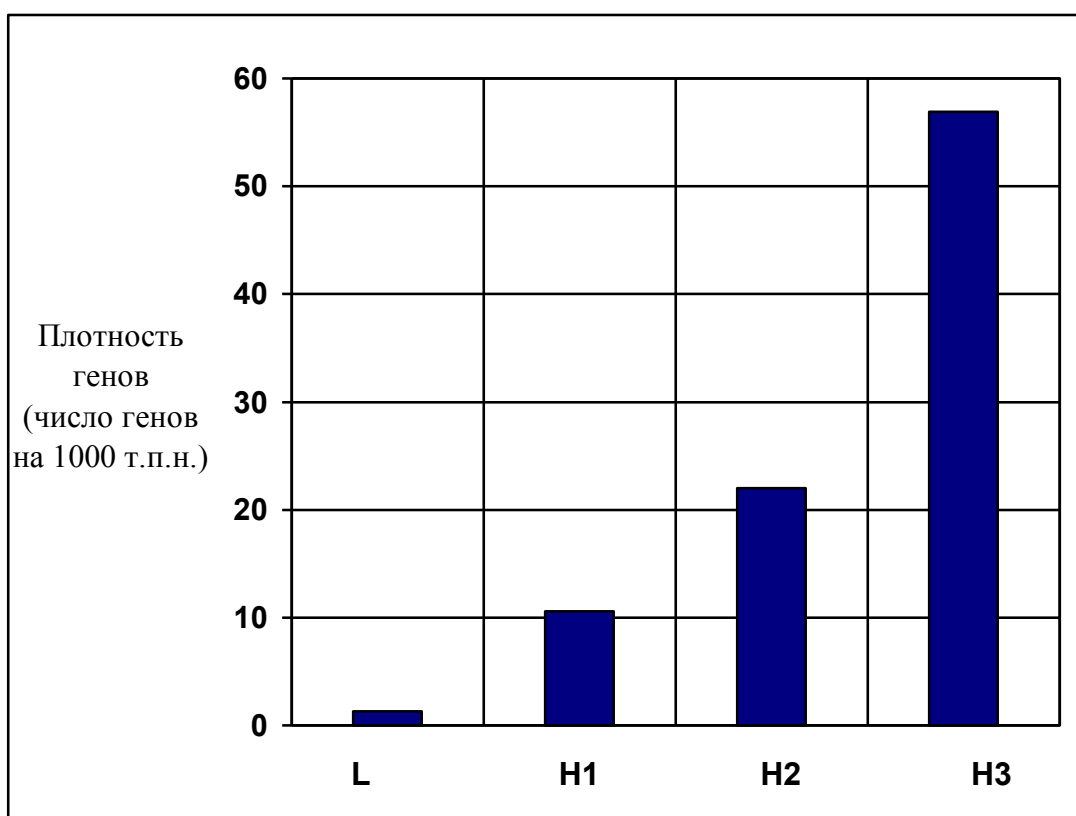


Рис. 7. Плотность генов в различных семействах изохор у человека [11]

Выявление связи паттерна экспрессии генов с ГЦ-уровнем, иными словами, распределение тканеспецифических генов и генов домашнего хозяйства относительно изохор является не менее важным аспектом характеристики функционального значения композиционной гетерогенности геномной ДНК. Суммируя независимые друг от друга данные по структуре хроматина и распределению генов и изохор, Бернарди в 1993 г. писал: «Скорее всего, наибольший уровень транскрипции встречается в семействе

изохор H3, поскольку там концентрация генов, прежде всего генов домашнего хозяйства, является наибольшей» [13]. Гипотеза о высокой транскрипционной активности генов, локализованных в семействе H3, подтверждалась и исследованиями нуклеотидного контекста стартовых AUG-кодонов [8]. Привлечение дополнительного критерия – процентного содержания гуанина или цитозина в третьем положении кодона (ГЦ₃-уровень) – помимо молярного отношения ГЦ и АТ (ГЦ-уровень) и статистический анализ последовательностей ДНК из геномных баз данных человека и *Xenopus laevis* позволили установить, что гены домашнего хозяйства преимущественно локализованы в ГЦ-богатых семействах изохор, не составляют большинства генов в ГЦ-богатых семействах изохор, являются не менее ГЦ₃-обогащенными, чем тканеспецифические гены [14].

Вырожденность генетического кода в значительном числе случаев оставляет возможность варьирования третьего положения кодона. Впервые была описана флуктуация ГЦ₃ в кодирующих последовательностях бактериофагов и бактерий Вада и Суйама в 1985 г. [15]. Однако недостатки математического аппарата не позволили однозначно подтвердить или опровергнуть справедливость этого утверждения на большей выборке кодирующих последовательностей. Большое значение имеют параметры анализа ГЦ-содержания – при использовании метода «скользящих окон (sliding windows)» величина «окна» (т. е. условной единицы из нескольких нуклеотидных пар, которая последовательно сдвигается относительно анализируемой последовательности) может оказать решающее влияние на достоверность корреляции [15]. Теми же авторами была показана негативная корреляция ГЦ₃-уровня и уровня ГЦ₁₊₂ [15]. Принципиально новым подходом явилось выравнивание сравниваемых кодонов по вторичной структуре кодируемого белка. В этом случае фрагменты полной кодирующей последовательности, соответствующие определенным элементам вторичной структуры белка, объединяли в «нуклеотидную структуру» для анализа соотношения синонимических и несинонимических замен нуклеотидов и ГЦ₃-уровня [16]. Позитивная корреляция ГЦ₃-уровня и гидропатии белковых молекул и достоверное возрастание этой связи с повышением ГЦ₃-уровня были показаны как на уровне целых белков, так и во внутрибелковых структурах на примере 62 аминокислотных последовательностей, для которых известна полная кристаллографическая структура и кодирующая последовательность ДНК [14]. Таким образом, показано существование связи композиционного состава кодонов и вторичной структуры, соответствующих им аминокислотных последовательностей.

Несмотря на то, что вариации ГЦ₃-уровня существенно превосходят вариации композиционного состава изохор (30–90 % и 35–60 %, соответственно), корреляция уровня ГЦ внутри кодирующих последовательностей и в окружающих областях на примере 369 генов HSA 21 и HSA 22 оказалась очень строгой – коэффициент корреляции 0,73, уровень значимости $P < 0,0001$) [5]. Возможно, присутствие повторяющихся элементов генома отражается в меньшей вариации ГЦ-уровня по сравнению с ГЦ₃-уровнем [5].

Существуют три гипотезы возникновения композиционной гетерогенности: предпочтительные по нуклеотидному составу мутации, давление естественного отбора и предпочтительная генная конверсия [5]. Первая гипотеза, на наш взгляд, представляется наиболее вероятной, и подробнее она будет изложена ниже. Давление естественного отбора как механизм возникновения гетерогенности геномов проявляется в преимущественном закреплении тяжелых изохор у организмов с высокой температурой тела по причине большей термостабильности ГЦ-пар оснований [1]. Так, для холоднокровных амфибий и рептилий характерно преобладание изохор ГЦ – обедненных семейств, которые распределяются по геному дисперсно, образуя монотонный изохорный паттерн (так называемый палеогеном) [1]. Холоднокровные отличаются от теплокровных не только низким уровнем композиционной гетерогенности, но также невысоким ГЦ-уровнем, составляющим всего 10–15 % от генома, хотя у них, как и у теплокровных, наибольшая концентрация генов наблюдается в ГЦ – богатых участках ДНК [1]. Классический паттерн млекопитающих (теплокровные животные) включает семейства H1, H2 и H3 тяжелых изохор и семейства L1 и L2 легких изохор с ярко выраженной гетерогенностью их распределения по длине хромосом (неогеном) [1]. Для млекопитающих характерно наличие всех фракций изохор, образующих мозаичный изохорный паттерн. Эти изохоры формируют четкие, сложные по составу блоки хроматина, хорошо различимые при дифференциальном окрашивании [1]. На основе представленных фактов можно выявить эволюционную тенденцию к обогащению генома ГЦ-парами и, соответственно, к увеличению доли «тяжелых» изохор в геноме [1]. Однако тенденции к увеличению концентрации генов не наблюдается, так как ГЦ – богатые изохоры содержат, помимо генов, еще и большое количество некодирующих участков генов – интронов и межгенных последовательностей – спейсеров [1]. Представители другого класса теплокровных животных – птицы – обладают в среднем более высокой температурой тела, чем млекопитающие, и кроме

классического паттерна млекопитающих имеют дополнительное семейство «сверхтяжелых» изохор – H4 [2]. В то же время, заметные различия по композиционной гетерогенности у близких видов крокодилов (класс Reptilia) не согласуются с этой гипотезой [5].

Гипотеза предпочтительной по нуклеотидному составу генной конверсии основана на наблюдаемом более высоком уровне гомологичной рекомбинации в ГЦ-обогащенных районах. Смещение нитей ДНК во время формирования гетеродуплекса приводит к неправильному спариванию нуклеотидов и мутациям в гетерозиготных сайтах с преимущественной заменой АТ-пар на ГЦ [5]. Наиболее веским аргументом против этой гипотезы является высокий ГЦ₃-уровень в генах Y-хромосомы человека, где гомологичная рекомбинация отсутствует [5].

Возможным механизмом происхождения композиционной гетерогенности ДНК высших эукариот считают мутационное давление в ГЦ-парах нуклеотидов: дезокси-ГТФ-оксидации в зависимости от времени репликации и симметричного деаминирования дезокси-ЦТФ [17]. Результатом первых являются аллотипические транверсии (замены пурина на пиримидин и пиримидина на пурин), результатом вторых – транзиции (замены пурина на пурин, пиримидина на пиридин). Поскольку ГЦ-богатые последовательности преимущественно реплицируются в первой половине фазы S клеточного цикла и дезокси-ГТФ-оксидация наблюдается в то же время, окисленный дезокси-ГТФ может вставать напротив дезокси-АТФ, что приводит к активации систем репарации, замене А на Ц, и, следовательно, повышению общего ГЦ-уровня [17]. Таким образом, тенденция к повышению уровня ГЦ должна присутствовать преимущественно в ГЦ-обогащенных районах. Обратный процесс – увеличение содержания АТ-пар, по всей видимости, не имеет настолько выраженной композиционной предпочтительности и может происходить следующим образом: деаминирование цитозина во втором положении кодона приводит к замене Ц на Т и фиксации сочетаний Ц₂Т₃ [17]. В случае, если замена является синонимической (т. е. не приводит к изменению кодируемой аминокислоты), отбор не оказывает на нее влияние и она может фиксироваться в ряду поколений.

Вопрос о гомогенности изохор, иными словами о сохранении среднего значения содержания ГЦ по длине изохор, то есть на протяжении более 300 т. п. н.), был предметом статистических исследований с использованием сегментационного анализа и анализа вариант [18, 19]. «Черновая» последовательность генома человека была разделена на «окна» по 300 т. п. н., а те, в свою очередь – на «подокна» по 20 т. п. н., в которых подсчитывали

средние значения содержания ГЦ и отклонения среднего значения [18]. Оказалось, что отклонения среднего значения для более трех четвертей генома человека статистически недостоверны, на основании чего авторы высказали сомнение в гомогенности изохор и, следовательно, в их существовании [18]. Следует отметить, что сама концепция «гомогенности» во многом является относительной – достоверность принятия или отклонения нулевой гипотезы о наличии «гомогенности» зависит не только от строгости критериев, но и от длины анализируемой последовательности [19]. Использование коротких (около 1 т. п. н.) последовательностей не позволяет применить анализ достоверности из-за крайне низких или высоких значений содержания ГЦ по причине влияния случайных событий [19]. Одно из возможных решений этой проблемы – одновременная оценка при помощи log-баллов нулевой гипотезы (гомогенность есть) и альтернативной (гомогенность отсутствует) [19]. Дополнительные возможности дает математический спектральный анализ – декомпозиция отклонения среднего значения на серию вкладов от различных периодических компонентов (т. е. последовательностей различной длины) [19]. С использованием этих методов было показано, что более четко изохоры можно определить как гомогенные относительно целого генома протяженные последовательности, короткие участки которых достоверно различаются по нуклеотидной композиции, причем вклад этих различий может полностью устранить достоверность отличий всего комплекса от остатка генома [19].

У многоклеточных эукариот внутригеномные различия по содержанию ГЦ-пар намного превышают различия между геномами, в то время как у прокариот ситуация в целом обратная [17]. По всей видимости, изохоры отражают уровень организации генома [1]. Повышенное содержание кодирующих последовательностей, более высокий уровень рекомбинации, большое число ГЦ-обогащенных коротких интерспесных повторов (SINE) в тяжелых изохорах, в то время как в легких локализовано значительно меньше генов, ниже уровень рекомбинации и находятся почти исключительно ГЦ-обедненные длинные интерсперсные повторы (LINE), дает основание говорить об изохорах как структурно-функциональных единицах организации генома [5]. Границы между тяжелыми и легкими изохорами на примере детально исследованного в отношении композиционного состава на молекулярном уровне кластера генов гистосовместимости (MHC) человека являются более чем композиционными структурами – временные границы репликации в фазе S клеточного цикла практически точно соответствуют физическим границам локализации изохор [20].

Исследования изохорного паттерна, произведенные на птицах видов *Struthio camelus* (страус африканский), *Rhea americana* (нанду), *Spheniscus demersus* (пингвин очковый), *Cairina moschata* (утка мускусная), *Gallus gallus* (курица домашняя), *Larus argentatus* (чайка серебристая), *Columbia livia* (голубь скальный), *Passer domesticus* (воробей домовый), принадлежащих к восьми различным отрядам (*Struthioniformes* – страусообразные, *Rheiformes* – нандуобразные, *Sphenisciformes* – Пингвинообразные, *Anseriformes* – Гусеобразные, *Galliformes* – Курообразные, *Charadriiformes* – Ржанкообразные, *Columbiformes* – Голубеобразные, *Passeriformes* – Воробьиные, соответственно) и представляющих два подкласса (*Paleognati* – первые два вида и *Neognati* – оставшиеся шесть) показали практически идентичную композицию генома класса *Aves* [6]. Наибольшие различия наблюдаются между представителями подклассов *Paleognati* и *Neognati* и выражаются в варьировании в пределах нескольких процентов содержания некоторых фракций изохор в геноме. Отмечается принципиальное сходство с геномами млекопитающих – наличие классического паттерна – мозаичного неогенома [1]. Также как у млекопитающих изохорный паттерн птиц представлен двумя семействами легких изохор: L1 (1,698 г/см³) и L2 (1,700 г/см³) и тремя семействами тяжелых: H1 (1,704 г/см³), H2 (1,708 г/см³) и H3 (1,712 г/см³), кроме того, у птиц есть дополнительное (по отношению к млекопитающим) семейство «сверхтяжелых» изохор H4 (> 1,712 г/см³) [6]. Содержание последних в геноме птиц довольно значительно – от 9 до 13 %, что отчасти может быть объяснено присутствием ГЦ-обогащенного сателлита птиц, который занимает около 5 % генома [6]. Оставшиеся 4–8 %, по всей видимости, представлены уникальными последовательностями ДНК с крайне высоким ГЦ-уровнем. Это подтверждается данными, полученными при анализе кодирующих последовательностей птиц: так в некоторых генах домашней курицы содержание ГЦ₃ достигает до 100 % [6].

В целом ГЦ-обогащенные тяжелые фракции (H1 + H2 + H3 + H4) представляют 33 % генома домашней курицы [12], что не намного отличается от этого показателя у человека – 37–38 % [1, 7]. На 12-ти видах млекопитающих и трех видах птиц показано, что различия по содержанию почти всех семейств изохор (за исключением H4, которое отсутствует у млекопитающих) между классами сравнимы с межвидовыми значениями этого показателя [2]. Блот-гибридизация изохорных семейств человека с геномными фракциями этих видов также выявляет строгое соответствие изохорных паттернов птиц и млекопитающих [2]. Таким образом, Бернарди сделал вывод о принципиальном сходстве композиционной организации геномов теплокровных животных [1].

Композиционное картирование – это изучение распределения по длине хромосом различных семейств изохор [1]. Особый интерес представляет соотнесение композиционных и цитогенетических карт хромосом, выявление приуроченности фракций изохор к морфологическим (центромер, теломер) и цитохимическим (G/R-блоки) маркерам. Различают «хромосомное» композиционное картирование (методом гибридизации *in situ* различных фракций изохор на хромосомах в присутствии конкурирующей ДНК, которая позволяет почти полностью исключить неспецифическую гибридизацию повторов) и «молекулярное» – путем локализации генов во фракциях изохор методом ПЦР или блот-гибридизации по Саузерну [4].

У млекопитающих было показано неоднородное распределение разных семейств изохор. Самые «тяжелые» изохоры H3 расположены в T-дисках (преимущественно прителомерные R-диски с наиболее ярко выраженными структурно-функциональными характеристиками этой группы), которые характеризуются наибольшей концентрацией генов, особенно генов домашнего хозяйства и онкогенов. Наблюдается общая тенденция приуроченности легких фракций к G-дискам (относительно инертные, поздне-replicating, выявляемые при окрашивании красителем Гимзы), где значительно ниже концентрация генов, чем в R-дисках (обратные G-дискам, ранне-replicating, относительно функционально активные) и расположены преимущественно тканеспецифические гены, а тяжелых изохор к R-дискам [21, 22]. Так, у человека T-диски представлены самым тяжелым семейством изохор H3 и частично семействами H2 и H1, R'-диски (R-диски за исключением из их числа T-дисков) – семейством H1 с минорным участием семейств H2 и H3 и семействами легких изохор L1 и L2, а G-диски – семействами L1 и L2 с минорным компонентом H1 [21]. У домашней мыши мажорным компонентом T-дисков являются изохоры семейства H2, R'-диски представлены преимущественно изохорами семейства H1 с незначительным участием L1 и L2, а G-диски – почти исключительно семействами легких изохор L1 и L2 [22]. В интерфазных ядрах было показано полярное относительно друг друга расположение наиболее легких и наиболее тяжелых фракций изохор, что, по всей видимости, отражает близость наиболее GC-богатых теломерных районов интерфазных хромосом [23]. Тонкое физическое картирование изохор на прометафазных хромосомах человека [22] позволило построить композиционные карты высокого разрешения, совмещенные с картами контигов протяженных геномных клонов [24]. Такие карты представлены в сети Интернет [25], что дает возможность быстро получить композиционную характеристику

любого изучаемого района или фланкирующей области любой последовательности генома человека.

Среди нескольких видов птиц из разных таксонов показана в принципе однообразная композиция генома [2]. В отличие от млекопитающих у птиц есть семейство «сверхтяжелых» изохор H4 ($c=1,712$) [2]. Кроме того, характерный для птиц и рептилий ГЦ-богатый сателлит обнаруживается во фракциях тяжелых изохор [2].

У млекопитающих было показано неоднородное распределение разных семейств изохор. Самые «тяжелые» изохоры H3 расположены в T-дисках, которые характеризуются наибольшей концентрацией генов, особенно генов «домашнего хозяйства» и онкогенов. Наблюдается общая тенденция приуроченности «легких» фракций к G-дискам, где значительно ниже концентрация генов, чем в R-дисках и расположены преимущественно тканеспецифические гены, а «тяжелых» изохор к R-дискам [21, 22].

Кариотипы птиц обладают некоторыми морфологическими особенностями, которые представляют особый интерес с точки зрения композиционного картирования. Около 30 % генома птиц представлено микрохромосомами, которые не только существенно меньше по длине, чем макрохромосомы, но и обладают рядом цитологических и биохимических особенностей. Микрохромосомы являются R-положительными и ГЦ-обогащенными [26]. Методом гибридизации ДНК/ ДНК *in situ* было показано, что CpG-островки сконцентрированы на микрохромосомах, в отличие от макрохромосом, что является косвенным доказательством обогащенности микрохромосом генами [27]. У курицы эта часть генома оказалась относительно обогащенной уже картированными генами [28]. Другой отличительной чертой микрохромосом является меньшая степень метилирования пар оснований ГЦ и более высокий уровень ацетилирования гистонов в сравнении с макрохромосомами, что также характерно для функционально активного хроматина [29]. Таким образом, отмечается структурная, а возможно, и структурно-функциональная компартиментализация геномов птиц. Поскольку композиционное картирование позволяет выявить функциональное назначение участков генома [1], вопрос о функциональной компартиментализации генома птиц может быть прояснен при помощи этого подхода.

Специфическая для теплокровных организация геномов птиц – гетероморфность хромосом, своего рода компартиментализация кариотипа – давно привлекает внимание исследователей. В разное время показаны основные структурно-функциональные черты микро- и макрохромосом. Для первых характерна сравнительная обогащенность генами, раннее время репликации ДНК в ходе клеточного цикла, высокая концентрация CpG островков, низкий

уровень метилирования ГЦ-пар оснований, высокая степень ацетилирования гистонов [28, 29]. С точки зрения композиционного картирования нами показана обогащенность микрохромосом тяжелыми изохорами [30]. Эта закономерность наблюдается у обоих исследованных в данной работе видов птиц – курицы и перепела. Можно заключить, что микрохромосомы напоминают по этому критерию Т-дисковые участки хромосом млекопитающих. В рамках данного исследования можно говорить о микрохромосомах как об особом классе Т-дисков, в которых всегда отсутствуют легкие изохоры семейств L1 и L2 [30]. Указанные особенности микрохромосом делают их сходными с теломерными участками макрохромосом. Полученные нами данные подтверждает предположение о функциональной специализации микрохромосом птиц.

Следует отметить принципиально противоположный характер распределения в геномах обоих исследуемых нами видов птиц самой легкой фракции Fr 1 и самой тяжелой Fr 7 [30]. Сильный гибридизационный сигнал с тяжелыми изохорами наблюдался в гетерохроматиновом районе Z хромосомы курицы [30], что может быть объяснено наличием ГЦ богатых сателлитных последовательностей ДНК в «тяжелых» фракциях изохор [2] или, что менее вероятно, недостаточной степенью супрессии неспецифической гибридизации повторяющихся нуклеотидных последовательностей.

Следует отметить, что характер распределения фракций изохор у курицы и перепела практически одинаков, что, скорее всего, определяется близким таксономическим положением этих видов и близостью их кариотипов [31]. Единственное отмеченное различие – более слабое мечение гетерохроматинового района Z-хромосомы перепела – имеет количественный характер и может быть связано с различием состава сателлитной ДНК в этом районе у этих видов птиц.

Интересно, что рисунок распределения фракций ДНК Fr 3–6 по макрохромосомам курицы и перепела моделирует дифференциальную R-окраску, так как обнаруживает некоторую предпочтительность локализации в R-дисках, давая несовершенный рисунок дифференциального окрашивания [30].

Макрохромосомы исследованных нами двух видов птиц в отношении локализации тяжелых изохор оказались сходными с хромосомами млекопитающих: преимущественно теломерное расположение самых тяжелых изохор и приуроченность к положительным RBG-блокам минорных сайтов локализации более легких.

Несмотря на существенные различия в организации кариотипов млекопитающих и птиц, принципиальный характер распределения

семейств изохор сохраняется в геномах этих двух линий теплокровных животных. Основная особенность организации генома птиц – наличие большого числа микрохромосом (около 30 % генома), имеющих очень много общих черт с наиболее функционально активными Т-дисками млекопитающих, находит свое отражение и в присутствии в них наиболее тяжелых изохор. Это позволяет говорить о наличии не только структурной, но и функциональной компартиментализации геномов птиц.

Таблица 3

Размеры генома некоторых видов птиц

Виды	Число хромосом 2n	Количество ДНК на гаплоидный геном (пг)
Банкивская курица (<i>Gallus gallus</i>)	78	1,25
Японский перепел (<i>Coturnix japonica</i>)	78	1,29–1,41
Обыкновенный перепел (<i>Coturnix coturnix</i>)	78	1,35
Обыкновенная индейка (<i>Meleagris gallopavo</i>)	80	1,31–1,68
Обыкновенная цесарка (<i>Numida meleagris</i>)	78	1,23–1,31
Обыкновенный павлин (<i>Pavo cristatus</i>)	76	-
Обыкновенный (колхидский) фазан (<i>Phasianus colchicus</i>)	82	0,97–1,27
Золотистый фазан (<i>Chrysolophus pictus</i>)	82	1,21
Серебряный фазан (<i>Lophura nycthemera</i>)	80	-
Утка кряква (<i>Anas platyrhynchos</i>)	80	1,24–1,54
Мускусная утка (<i>Cairina moschata</i>)	80	1,00–1,34
Серый гусь (<i>Anser anser</i>)	80	1,08
Сухонос (<i>Anser cygnoides</i>)	80 или 82+	1,08

Лебедь шипун (<i>Cygnus olor</i>)	80	1,48
Африканский страус (<i>Struthio camelus</i>)	80	2,16
Большой нанду (<i>Rhea americana</i>)	80	-
Эму (<i>Dromaius novaehollandiae</i>)	80	1,55–1,63
Казуар (<i>Casuarus spp.</i>) (казуарообразные)	80	-
Киви (<i>Apteryx australis</i>)	80	-
Скалистый голубь (<i>Columba livia</i>)	80	1,14–1,65
Смеющаяся горлица (<i>Streptopelia roseogrisea</i>)	78	-
Канарский вьюрок (каеарейка) (<i>Serinus canaria</i>)	80	1,48–1,62
Зебровая амадина (<i>Taeniopygia guttata</i>)	80	1,25
Ожереловый попугай Крамера (<i>Psittacula krameri</i>)	68	1,37
Волнистый попугайчик (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	58-60	1,02–1,37
Серый журавль (<i>Grus grus</i>)	80	1,54
Белый аист (<i>Ciconia ciconia</i>)	68	1,58
Африканский марабу (<i>Leptoptilos crumeniferus</i>)	72	1,34
Калифорнийский кондор (<i>Gymnogyps californianus</i>)	80 или 82	1,51
Розовый пеликан (<i>Pelecanus onocrotalus</i>)	66	1,26
Сапсан (<i>Falco peregrinus</i>)	50	1,45
Беркут (<i>Aquila chrysaetos</i>)	62	1,48

Список литературы

1. Bernardi G. Isochores and the evolutionary genomics of vertebrates // *Gene*. – 2000. – V. 241. – P. 3–17.
2. Caccio S. etc. Methylation patterns in the isochores of vertebrate genomes // *Gene*. – 1997. – V. 205. – P. 119–124.
3. Bernardi G. Misunderstandings about isochores. Part 1 // *Gene*. – 2001. – V. 276. – P. 3–13.
4. Saccone S. etc. Compositional mapping of mouse chromosomes and identification of the gene-rich regions // *Chromosome Res.* – 1997. – V. 5. – P. 293–300.
5. Eyre-Walker A. etc. The evolution of isochores // *Nat. Rev. Genet.* – 2001. – V. 2. – P. 549–555.
6. Kadi F. etc. The compositional patterns of the avian genomes and their evolutionary implications // *J. Mol. Evol.* – 1993. – V. 37. – P. 544–551.
7. Oloffson B. etc. Organization of nucleotide sequences in the chicken genome // *Eur. J. Biochem.* – 1983. – V. 130. – P. 241–245.
8. Pesole G. Isochore specificity of AUG initiator context of human genes // *FEBS Letters*. – 1999. – V. 464. – P. 60–62.
9. Bernardi G. The organization of the vertebrate genome and the problem of the CpG shortage // *Prog. Clin. Biol. Res.* – 1985. – V. 198. – P. 3–10.
10. D'Onofrio G. etc. The base composition of the genes is correlated with the secondary structures of the encoded proteins // *Gene*. – 2002. – V. 300. – P. 179–187.
11. Zoubak S. etc. The gene distribution of the human genome // *Gene*. – 1996. – V. 174. – P. 95–102.
12. Saccone S. etc. Gene, isochores and bands in human chromosomes 21 and 22 // *Chrom. Res.* – 2001. – V. 9. – P. 533–539.
13. Bernardi G. The vertebrate genome: isochores and evolution // *Mol Biol Evol.* – 1993. – V. 10. – P. 186–204.
14. D'Onofrio G. Expression patterns and gene distribution in the human genome // *Gene*. – 2002. – V. 300. – P. 155–160.
15. Wada A. etc. Third letters in codons counterbalance the (G + C)-content of their first and second letters // *FEBS Lett.* – 1985. – V. 188. – P. 291–294.
16. Chiusano M.L. etc. Correlations of nucleotide substitution rates and base composition of mammalian coding sequences with protein structure // *Gene*. – 1999. – V. 238. – P. 23–31.
17. Sueoka N. Wide intra-genomic G † C heterogeneity in human and chicken is mainly due to strand-symmetric directional mutation pressures: dGTP-oxidation and symmetric cytosine-deamination hypotheses // *Gene*. – 2002. – V. 300. – P. 141–154.
18. Lander E.S. etc. Initial sequencing and analysis of the human genome // *Nature*. – 2001. – V. 409. – P. 860–921.
19. Li W. Are isochore sequences homogeneous? // *Gene*. – 2002. – V. 300. – P. 129–139.
20. Tenzen T. etc. Precise switching of DNA replication timing in the GC content transition area in the human major histocompatibility complex // *Mol. Cell. Biol.* – 1997. – V. 17. – P. 4043–4050.

21. Saccone S. etc. Identification of the gene – richest bands in human chromosomes // *Gene*. – 1996. – V. 174. – P. 85–94.
22. Saccone S. etc. Identification of the gene – richest bands in human prometaphase chromosomes // *Chromosome Res.* – 1999. – V. 7. – P. 379–386.
23. Saccone S. etc. Localization of the gene-richest and the gene-poorest isochores in the interphase nuclei of mammals and birds // *Gene*. – 2002. – V. 300. – P. 169–178.
24. Oliver J.L. etc. Isochore chromosome maps of the human genome // *Gene*. – 2002. – V. 300. – P. 117–127.
25. bioinfo2.ugr.es/isochores.
26. Schmid M. etc. First report on chicken genes and chromosomes 2000 // *Cytogenet. Cell Genet.* – 2000. – V. 90. – P. 169–218.
27. McQueen H.A. etc. CpG islands of chicken are concentrated on microchromosomes // *Nat. Genet.* – 1996. – V. 12. – P. 321–324.
28. Smith J. etc. Parameters of the chicken genome (*Gallus gallus*) // *Anim. Genet.* – 1998. – V. 29. – P. 290–304.
29. McQueen H. A. etc. Chicken microchromosomes are hyperacetylated, early replicating, and gene rich // *Genome Research*. – 1998. – V. 8. – P. 621–628.
30. Сазанов А.А. и др. Сравнительное композиционное картирование хромосом курицы и перепела // *Генетика*. – 2003. – Т. 39. – С. 819–825.
31. Schmid M. etc. Second report on chicken genes and chromosomes // *Cytogenet Genome Res.* – 2005. – V. 109. – P. 415–479.

Глава 8. Особенности организации нуклеотидных последовательностей по данным геномного секвенирования

Класс птиц отличается исключительным консерватизмом размера генома среди позвоночных животных. Диплоидный набор включает от 2,5 до 3 пг ДНК, при этом 1 пг составляет примерно 978 миллионов п.н. [1]. Гаплоидный набор (C value) для различных видов птиц включая домашнюю курицу представлен в таблице 3.

Средний размер гаплоидного генома птиц – 1,45 пг, при этом у нелетающих птиц геном больше – до 2,16 пг у страусов. Геном домашней курицы почти в три раза меньше, чем в среднем у млекопитающих. Отмечена положительная корреляция размера генома птиц с величиной эритроцитов и ядер и отрицательная с общим уровнем метаболизма [1, 2]. Не выявлено корреляций этого признака с продолжительностью жизни или скоростью развития. Сравнительно низкое содержание ДНК на гаплоидный набор хромосом объясняют отбором на снижение общей массы клетки в связи с необходимостью ускорения обмена веществ при полете, а также монофилетическим происхождением птиц [2, 3]. Кариотип птиц характеризуется множественностью и гетерогенностью хромосом. Он включает несколько макрохромосом (3–8 мкм) и многочисленные микрохромосомы [4]. Считается, что модельный для класса птиц кариотип представлен у домашней курицы [5, 6]. В научной литературе долгое время не было единства мнений в отношении того, какие хромосомы считать макро- и какие микрохромосомами, где проходит грань, их разделяющая. Как правило к макро- относили первые 6–10 пар хромосом, включая GGAZ [7]. Международный консорциум по секвенированию генома домашней курицы [8] в 2004 году предложил выделять три группы хромосом в соответствии с их длиной: большие макрохромосомы GGA1–5, хромосомы среднего размера GGA6–10, и 28 микрохромосом GGA11–38. Масабанда [9] и Шмид [7] предложили новый подход к классификации хромосом домашней курицы. В соответствии с этой системой к группе А относят GGA1–10, Z, и W (цитогенетически различимые хромосомы, которые сравнительно легко можно идентифицировать при проточной цитофлуориметрии). Группа В представлена GGA11–16 (крупные микрохромосомы до хромосомы, несущей ЯОР (ядрышкообразующий район) включительно). Группа С состоит из GGA17–32 (микрохромосомы небольшого размера, большинство из которых соотнесено с группами сцепления). Наконец, группа D

включает GGA33–38 (наиболее короткие микрохромосомы, преимущественно не соотнесенные с группами сцепления). Микрохромосомы домашней курицы составляют не менее 23 % генома и несут около половины известных кодирующих последовательностей [4, 10]. Более того, есть доказательства большей генетической активности микрохромосом по сравнению с микрохромосомами [11, 12]. Частота рекомбинации в макро- и микрохромосомах порядка одного кроссинговера на 30 и 12 миллионов п. н. соответственно. Это в два и пять раз чаще, чем у млекопитающих [5]. Детальное изучение особенностей структурно-функциональной организации микрохромосом птиц необходимо для понимания минимально необходимых компонентов хромосомы теплокровных животных [1].

В результате исследований по сравнительной геномике более 80 районов эволюционного консерватизма (ортологии) хромосом человека и домашней курицы выявлено [13, 14]. Такой уровень кластеризации ортологичных нуклеотидных последовательностей, также называемый синтенией («сайты локализации генов двух и более организмов в районах хромосом общего предка»; [15]), оказался даже выше, чем у человека и домового мыши [13].

Для физического картирования хромосом обычно используют флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH). При помощи этого метода была определена внутрихромосомная локализация 250 маркеров I типа (кодирующих последовательностей) [1]. Такого рода данные могут быть использованы для закрепления маркеров малоизученных видов на картах хромосом более изученных видов с целью интраполяции геномных данных на основе ортологии. Существует большое количество вариантов метода FISH. Нам представляется наиболее продуктивным использование в качестве зондов протяженных геномных клонов, например, на основе искусственных хромосом бактерий, что позволяет достичь практически 100-% эффективности гибридизации [10, 16, 17]. Наборы хромосомспецифических клонов и полнохромосомных зондов являются весьма полезным инструментом цитогенетических исследований [18, 19, 20].

Использование хромосом типа ламповых щеток в дополнение к митотическим в ряде случаев позволяет повысить разрешающую способность физического картирования [21, 22]. Применение конфокальной микроскопии позволяет уточнить пространственное расположение микро- и макрохромосом в интерфазе [12]. Другим подходом для повышения плотности генетических карт является микродиссекция с последующим созданием хромосомспецифических библиотек и картированием в них микросателлитов [23]. Удачное

сочетание цитогенетических и молекулярных методов позволило Ито и Мицуно [24] провести физическое картирование GGAW.

В качестве альтернативы традиционным молекулярно-цитогенетическим методам анализа генома домашней курицы можно рассматривать компьютерный анализ геномных баз данных и, в первую очередь, опубликованного в 2004 г. полного сиквенса генома *Gallus gallus* с 6,6-кратным покрытием [8]. Так, было установлено, что по сравнению с млекопитающими геном домашней курицы, а возможно, и всех птиц, характеризуется существенным уменьшением числа интерсперсных повторов, псевдогенов, сегментных дупликаций и размера интронов. Эти показатели отличаются примерно в три раза. При сравнении микро- и макрохромосом выявлена отрицательная корреляция между размером и уровнем рекомбинационной активности, содержанием пар ГЦ, CpG-островков и плотностью генов. В то же время отмечается положительная связь между величиной хромосомы и плотностью повторяющихся последовательностей. Также известно, что гены как в митохондриальных, так и субтеломерных районах макрохромосом имеют более высокий уровень синонимических замен нуклеотидов. В отличие от других позвоночных животных в геноме домашней курицы не было активных инсерций коротких интерсперсных элементов (SINE – short interspersed nucleotide element) за последние 50 миллиардов лет. По крайней мере 70 миллионов лет назад геномной ДНК человека и домашней курицы, имеющих выраженную гомологию являются функционально-активными у обоих видов. Сравнительный анализ некодирующих нуклеотидных последовательностей человека и домашней курицы позволил установить, что в большинстве случаев гомологи находятся достаточно далеко от генов и организованы в виде кластеров, которые, по всей видимости, находились под влиянием отбора на неизвестные биологические функции.

Параллельно с опубликованием первого чернового варианта полного сиквенса генома домашней курицы международный консорциум опубликовал данные о мононуклеотидном полиморфизме (SNP), представленном на первой полногеномной карте геновариаций [8]. Полученная путем сравнения геномных последовательностей бройлеров, несушек и декоративной породы китайская шелковистая карта включает 2,8 миллиона маркеров. По меньшей мере 70 % из них широко представлены в изученных популяциях кур. Сравнение геномных последовательностей домашних пород кур и дикой банкивской куры показало большую

вариабельность по мононуклеотидным сайтам у домашних кур, что находится в противоречии с общепринятыми воззрениями на домашних животных как на более инбредированных, чем их дикие предки и сородичи. Показано, что большинство SNP домашней курицы возникли еще до одомашнивания, и на уровне разрешения 100 т. п. н. заметны следы эволюционной коррекции адаптивно важных полиморфных вариантов.

Хотелось бы отметить, что изучение молекулярной организации генома и полиморфных вариантов ДНК домашней курицы имеют большое значение для сельского хозяйства и медицины, проливают свет на многие аспекты одомашнивания и позволяют моделировать эволюционные процессы на основе сравнительной геномики 9,600 известных в настоящее время видов птиц [25].

Список литературы

1. Romanov M.N. etc. First century of chicken gene study and mapping – a look back and forward // *Worlds Poult Sci J.* – 2004. V/ 60. – P. 19–41.
2. <http://www.genomesize.com/>.
3. Kadi F. etc. The compositional patterns of the avian genomes and their evolutionary implications // *J. Mol. Evol.* – 1993. – V. 37. – P. 544–551.
4. Schmid M. etc. First report on chicken genes and chromosomes 2000 // *Cytogenet. Cell Genet.* – 2000. – V. 90. – P. 169–218.
5. Rodionov A.V. Micro versus macro: a review of structure and function of avian micro- and macrochromosomes // *Genetika.* – 1996. – V. 32. – P. 597–608.
6. Derjusheva S. etc. High chromosome conservation detected by comparative chromosome painting in chicken, pigeon and passerine birds // *Chromosome Res.* – 2004. – V. 12. – P. 715–723.
7. Schmid M. etc. Second report on chicken genes and chromosomes // *Cytogenet Genome Res.* – 2005. – V. 109. – P. 415–479.
8. International Chicken Genome Sequencing Consortium.
9. Masabanda J.S. Molecular cytogenetic definition of the chicken genome: the first complete avian karyotype // *Genetics.* – 2004. – V. 166. – P. 1367–1373.
10. Smith E.J. etc. Expressed sequence tags for the chicken genome from a normalized, ten-day-old white leghorn whole embryo cDNA library. 2. Comparative DNA sequence analysis of guinea fowl, quail, and turkey genomes // *Poult Sci.* – 2001b. – V. 80. – P. 1263–1272.
11. Andreozzi L. etc. Compositional mapping of chicken chromosomes and identification of the gene-richest regions // *Chromosome Res.* – 2001. – V. 9. – P. 521–532.
12. Habermann F. etc. Arrangement of macro- and microchromosomes in chicken cells // *Chromosome Res.* – 2001. – V. 9. – P. 569–584.
13. Burt D.W. etc. The dynamics of chromosome evolution in birds and mammals // *Nature.* – 1999. – V. 402. – P. 411–413.
14. Burt D.W. Origin and evolution of avian microchromosomes // *Cytogenet Genome Res.* – 2002. – V. 96. – P. 97–112.

15. Passarge E. etc. Incorrect use of the term synteny // *Nat Genet.* – 1999. – V. 23. – P. 387.
16. Buitkamp J. etc. Construction and characterisation of a gridded chicken cosmid library with four-fold genomic coverage // *Anim Genet.* – 1998. – V. 29. – P. 295–301.
17. Sazanov A.A. etc. Two chicken genes *APOA1* and *ETS1* are physically assigned to the same microchromosome // *Anim Genet.* – 2002. – V. 33. – P. 321–322.
18. Zimmer R. etc. Generation of chicken Z-chromosome painting probes by microdissection for screening large-insert genomic libraries. *Cytogenet Cell Genet.* – 1997. – V. 78. – P. 124–130.
19. Fillon V. etc. Identification of 16 chicken microchromosomes by molecular markers using two – colour fluorescence in situ hybridization (FISH) // *Chromosome Research.* – 1998. – V. 6. – P. 307–313.
20. Guillier-Gencik Z. etc. Generation of whole – chromosome painting probes specific to each chicken macrochromosome // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1999. – V. 87. – P. 282–285.
21. Mizuno S. etc. The ZW lampbrush chromosomes of birds: a unique opportunity to look at the molecular cytogenetics of sex chromosomes // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1998. – V. 80. – P. 149–157.
22. Rodionov A.V. etc. Crossing over in chicken oogenesis: cytological and chiasma-based genetic maps of chicken lampbrush chromosome 1 // *J. Hered.* – 2002. – V. 93. – P. 125–129.
23. Ambady S. etc. Development and mapping of microsatellite markers derived from chicken chromosome-specific libraries. *Poult Sci.* – 2002. – V. 81. – P. 1644–1646.
24. Itoh Y. etc. Molecular and cytological characterization of Ssp1- family repetitive sequence on the chicken W chromosome // *Chromosome Research.* – 2002. – V. 10. – P. 499–511.
25. Burt D.W., Pourquié O. Chicken genome-science nuggets to come soon // *Science.* – 2003. – V. 300. – P. 1669.

Глава 9. Геномика различных видов птиц

Несмотря на тот факт, что утка, канарейка, волнистый попугайчик и голубь были видами, на которых наряду с кроликом, мышью, крысой и тремя видами рыб было показано наличие сцепления генов с полом и аутосомных групп сцепления, генетическое и цитогенетическое изучение птиц за исключением домашней курицы проводилось эпизодически [1, 2, 3]. Весьма скудные генетические карты Z-хромосом японского перепела и индейки включали три и два морфологических маркера соответственно [4, 5]. Было известно всего пять Z-сцепленных генов обыкновенного фазана, три – у обыкновенной цесарки, три – у павлина, пять – голубя, один – у африканской горлицы, четыре – у домашней утки, два – у мускусной утки, один – лебедя-шипунa и, возможно, пять – у гуся. Кроме того, четыре случая аутосомного сцепления были известны у японского перепела, по два – у индейки и горлицы и по одному – у сизаря и утки. Еще несколько случаев аутосомного и Z-сцепленного наследования описаны у незначительного числа видов птиц. В течение последнего десятилетия молекулярно-генетические методы и классический гибридологический анализ позволили построить генетические карты ранее неизученных видов птиц, и сравнительная геномика этого класса стала реальностью, опираясь преимущественно на данные полного сиквенса генома домашней курицы.

Применяя методологические подходы сравнительной цитогенетики, включая ZOO-FISH, сравнительное картирование геномных ВАС-клонов и сравнительного G-окрашивания, выявлено, что хромосома 2 домашней курицы имеет участки гомологии в хромосомах 3 и 6 индейки и фазана, т. е. представлена двумя отдельными структурами, в то время как 4-я хромосома домашней курицы образована слиянием хромосомы 4 и микрохромосомы, характерной для многих других видов птиц [6–12]. У цесарки хромосома 4 является результатом центрального слияния хромосомы 9 и длинного плеча хромосомы 4 домашней курицы [13]. Хромосома 5 цесарки представляет собой результат слияния хромосом 6 и 7 курицы. Перицентрическая инверсия в хромосоме 7 цесарки является единственным видимым на цитогенетическом уровне хромосоме 8 курицы. С другой стороны, гибридизация хромосомоспецифических пэинтинговых (полученных путем микроизоляции и последующей амплификации отдельных районов хромосом) ДНК-зондов макрохромосом 1–9 и Z домашней курицы с митотическими хромосомами японского перепела и красноногой куропатки не выявила никаких межхромосомных перестроек [7, 13,

14]. Сравнительное картирование методом флуоресцентной гибридизации *in situ* геномных ВАС-клонов, специфических для макрохромосом 1–8 и Z курицы позволило установить наличие строгого эволюционного консерватизма последовательностей курицы, перепела, индейки и утки [8], которые представляют две эволюционно ранних ветви птиц, разошедшихся около 90 млн лет назад. У четырех видов было обнаружено несколько внутрихромосомных перестроек, слияний или расщеплений. Эволюция кариотипов у птиц, по-видимому, происходила несколько медленнее во времени, чем у млекопитающих, для кариотипов которых характерны более радикальные перестройки хромосом. Считается, что кариотип птиц мог эволюционировать посредством множественных слияний/расщеплений или инверсий вместо реципрокных (в первую очередь Робертсоновских) транслокаций, свойственных млекопитающим [8, 15, 16]. Исследования по сравнительной геномике также содействовали картированию генома домашней курицы и межвидовой экстраполяции геномных данных у домашней курицы, индейки, цесарки, японского перепела, утки и голубя [8, 17–20]. Картирование хромосом методом FISH и прямое секвенирование районов генома позволило осуществить привязку нескольких локусов к половым хромосомам и аутосомам индейки, павлина, фазана, перепела, утки, голубя, страуса, эму казуара, волнистого попугайчика, зебровой амадины и некоторых других видов птиц.

Наиболее существенным методологическим компонентом геномики других видов птиц, безусловно, следует считать сравнительное картирование с использованием протяженных геномных клонов. Для значительного числа видов птиц библиотеки протяженных геномных клонов созданы или создаются. Например, в аризонском институте генома была создана ВАС-библиотека зебровой амадины с 16-кратным покрытием [21]. В Американском отделении института исследований в области геномики и энергии была создана библиотека протяженных геномных клонов эму с 13,5-кратным покрытием генома [23]. В окландском ресурсном центре (CHORI) создана ВАС-библиотека калифорнийского кондора (*Gymnogyps californianus*, семейство катартовых или американских грифов, отряд аистообразных) с 13-кратным покрытием [24, 25]. Космидные геномные библиотеки сконструированы для японского перепела, голубя, гуся, эму и для двух видов воробьиных — красноплечего черного трупяла (*Agelaius phoeniceus*) и буроголового коровьего трупяла (*Molothrus ater*) [26–30]. Существует также геномная библиотека на основе фосмидных векторов для домашней утки [31]. Физические карты контигов

протяженных геномных клонов различных видов птиц при их соотнесении с полным сиквенсом генома домашней курицы могли быть основой для сравнительной геномики этого класса. И наоборот, это позволит более глубоко понять структурно-функциональную организацию генома домашней курицы. Томас и соавторы [32] продемонстрировали, что так называемые универсальные OVERGO-пробы или Up-пробы могут быть использованы для идентификации ортологичных BAC-клонов у различных млекопитающих (приматов, кошки, собаки, коровы, свиньи), а затем была показана целесообразность их применения и для поиска ортологии между разными отрядами позвоночных [33]. OVERGO-пробы были сконструированы на основе высококонсервативных последовательностей и затем использованы для исследования несеквенированных геномов. Романов и Додсон в 2006 г. [34] анализировали результаты межвидовой гибридизации с использованием OVERGO-проб, которые были сконструированы на базе геномных последовательностей курицы и EST зебровой амадины. С помощью этих зондов были исследованы BAC-библиотеки зебровой амадины и индейки. Использование перекрывающихся зондов было более эффективно для изучения кодирующих последовательностей, нежели нетранскрируемых областей, интронов или фланкирующих последовательностей. Вообще межвидовая гибридизация между ДНК курицы и индейки была более успешной, чем между более удаленными с точки зрения эволюции видами (курица – зебровая амадина или зебровая амадина – индейка). Подобное умозаключение оказалось верным и в отношении соотнесения контигов протяженных геномных клонов различных видов птиц с полным сиквенсом генома домашней курицы и при построении межвидовых сравнительно-генетических карт. Определенное количество молекулярных маркеров и геномные базы данных созданы для японского перепела [35, 36], утки и гуся [37, 38], фазана [39], павлина [40, 41], голубя [42], страуса [43], эму [44], волнистого попугайчика [45] и ограниченного числа других видов птиц. Эти инструменты должны облегчить построение рекомбинационных генетических карт, что в последнее время удалось воплотить на таком объекте, как утка [46]. Эти карты были построены методом сегрегационного анализа микросателлитных маркеров с использованием инбредной ресурсной популяции пекинской утки, которая состоит из 12 семейств полных сибсов с общим числом особей F₂, равным 224. В результате исследования в 19 группах сцепления были помещены 115 локусов, и 34 маркера остались не локализованы. Общая длина карт аутосомных групп сцепления у утки 1 387,6 сМ, как и у других

видов. Интеграция генетической и цитогенетической карт генома утки бала сделана методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с использованием ВАС-клонов домашней курицы, в результате чего 11 из 19 известных групп сцепления были соотнесены с десятью хромосомами утки [46]. Конструирование геномной библиотеки ВАС-клонов утки [47] проложит путь для более детального исследования генома этого вида птиц. Значительный прорыв в генетическом картировании генома японского перепела был достигнут благодаря созданию карт молекулярно-генетических маркеров, относящихся к группам AFLP и микросателлитов. Первая генетическая карта содержала 258 AFLP-маркеров, организованных в 39 аутосомных группах сцепления, и две группы сцепления, соответствующие половым Z и W хромосомам [48]. Генетическая карта первого поколения групп сцепления микросателлитов этого вида включала 58 маркеров, сведенных в 12 аутосомных групп сцепления, и группу сцепления Z хромосомы [49]. На генетической карте групп сцепления второго поколения было помещено 1 660 AFLP-маркеров (полиморфизм длин амплификационных фрагментов) и одиннадцать микросателлитных маркеров, фенотипы наследственного заболевания недостаточности нейрофиламента и пола были сгруппированы в 44 мультилокусных групп сцепления, W хромосому и 21 группу сцепления, каждая из которых включает по два локуса [50]. К этой карте были добавлены еще шесть микросателлитных локусов, полученных из EST-последовательностей [51], и девять EST-маркеров, полученных из cDNA-AFLP фрагментов [52]. Последующий вклад в развитие генетических карт молекулярных маркеров японского перепела, их обогащения классическими маркерами, такими как окраска оперения и белки крови, был сделан Мива и соавторами [53]. Ими были выявлены 14 аутосомных групп сцепления и построена карта Z-хромосомы. Эти карты содержали 69 микросателлитных маркеров и пять классических маркеров: yellow (Y), black at hatch (Bh), гемоглобин (Hb-1), трансферрин (Tf) и преальбумин-1 (Pa-1). Исследование подтвердило более раннее, сделанное при помощи флуоресцентной гибридизации *in situ* наблюдение, что локус Bh локализован на длинном плече хромосомы 1 (CJA1). Последнее упомянутое исследование было проведено с использованием в качестве зонда фланкирующих последовательностей локуса Bh. Мива и сотрудники картировали пять других микросателлитных маркеров и локуса s, определяющего пятнистую окраску оперения – панда, на хромосоме 4 (CJA4) [53]. В последующем исследовании этими же авторами было подтверждено предположение, что ген эндотелинового рецептора В подтипа 2 (EDNRB2) является

возможным кандидатом для локуса *s* [54]. Две генетических карты перепела на основе микросателлитных и AFLP маркерах были объединены и исправлены сравнением групп сцепления перепела и полного сиквенса генома домашней курицы, а также с помощью межвидовой флуоресцентной *in situ* гибридизации. Кайанг и сотрудники [55] получили 14 аутосомных и Z-хромосомную группы сцепления с 92 локусами и сравнили их с картой AFLP маркеров. Общая длина генетической карты составила 904,3 сМ со средним расстоянием между локусами 9,7 сМ. Путем сравнения генетической карты перепела и сиквенса генома домашней курицы было обнаружено, что порядок расположения маркеров на 9-ти макро- и 14-ти микрохромосомах очень похож у этих двух видов. Во всех 23 хромосомах не было обнаружено ни одной межхромосомной перестройки, что говорит о высокой степени эволюционного консерватизма этих синтенных сегментов [55]. Независимо от вышеуказанных авторов Сасазаки с сотрудниками в том же 2006 г. [56] построили другую объединенную генетическую карту перепела, которая включает 1 995 маркеров: 1 933 AFLP, три локуса, имеющих фенотипическое проявление (*Quv*, *LWC* и пол), и 59 генов/EST, организованных в 66 групп сцепления (включая *W* хромосому). Общая длина этой генетической карты составила 3 199 сМ, а среднее расстояние между маркерами 5 сМ. Положение генов и их порядок у курицы и перепела были схожи, за исключением тех, что локализованы в пределах известной инверсии во 2-й хромосоме перепела (*CJA2*) [57]. С другой стороны, низкая разрешающая способность генетических карт не позволяет выявить три других инверсии, обнаруженных в хромосомах 1 (*CJA1*), 4 (*CJA4*) и 8 (*CJA8*) перепела.

Другой хорошо известный лабораторный объект из класса птиц – зебровая амадина. С точки зрения модельных качеств это своего рода мышь или дрозофила в мире птиц [58]. Зебровая амадина – австралийская певчая птица – хорошо изученный модельный объект с точки зрения ученых, исследующих поведение, в особенности механизмы обучения и контроля пения самцов, формирование зрелой нервной ткани и синтез стероидов в мозге. В отделах мозга, контролирующих пение, имеется выраженный половой диморфизм. Интерес к генетическим механизмам регуляции поведения зебровой амадины позволил исследователям получить финансирование проекта по созданию библиотеки протяженных геномных клонов, двух проектов по изучению EST и созданию биочипа для профилирования экспрессии [58–60]. Сравнительный цитогенетический анализ генома зебровой амадины с помощью хромосомоспецифических ДНК-зондов, полученных при

помощи микродиссекции хромосом домашней курицы, позволил выявить очень небольшое количество хромосомных перестроек, которые произошли с момента расхождения этих двух видов в процессе эволюции, и высокий уровень консервативной синтении генов курицы и их ортологов у зебровой амадины [61]. Были выявлены две наиболее крупные внутривидовые перестройки. Одна из них разделяет хромосому 1 курицы на две макрохромосомы у зебровой амадины. В результате другой перестройки хромосома 4 курицы у зебровой амадины разделена на макро- и микрохромосому. Позже в результате сравнения концевых последовательностей ДНК и результатов прямого секвенирования ВАС-клонов зебровой амадины с сиквенсом домашней курицы было подтверждено наличие высокой степени консервативной синтении между этими двумя видами [60]. ВАС-клоны, соотнесенные Романовым и Додсоном с генами зебровой амадины методом межвидовой гибридизации, доступны для широкой общественности на сайте консорциума по изучению генома домашней курицы [62]. Зебровая амадина будет третьим видом птиц, для которого имеются физическая карта ВАС-контигов и полногеномный сиквенс [63]. Частичная карта групп сцепления построена для другого вида воробьиных птиц – дроздовидной камышевки (*Acrocephalus agundinaceus*) [64]. Построена также сравнительная карта микросателлитных маркеров курицы и воробьиных птиц [65]. Первая генетическая карта воробьиных птиц включала 43 микросателлитных маркера в одиннадцати аутосомных группах сцепления и семь локусов на Z хромосоме [64]. Гипотетическая обобщенная генетическая карта отряда воробьиных была основана на сравнении последовательностей 550 микросателлитов воробья полевого, черного варианта сиквенса домашней курицы и на данных генетической карты дроздовидной камышевки, построенной Хансоном и сотрудниками в 2005 г. [64]. Генетическая карта Z хромосомы, основанная на SNP маркерах, включающая 23 гена, была создана Бакстрёмом и сотрудниками [66], которые использовали в своей работе природную популяцию мухоловки-белошейки (*Ficedula albicollis*) и данные геномного сиквенса домашней курицы. В ходе работы была также продемонстрирована консервативная синтения с нарушениями консерватизма порядка расположения генов на Z хромосоме птиц. Чтобы начать исследования генома калифорнийского кондора, пользуясь новейшими достижениями в геномике домашней курицы, Родсепп и сотрудники [67] сделали попытку общего цитогенетического анализа этого вида, находящегося под угрозой исчезновения. В результате этого исследования было установлено общее число хромосом в

составе кариотипа кондора, равное 80, получена информация о цетромерах, теломерах и ядрышкообразующих районах. Было проведено сравнение макрохромосом кондора и курицы с помощью гибридизации хромосомспецифических пэинтинговых ДНК-зондов для хромосом 1-9, а также Z и W домашней курицы на метафазных хромосомах калифорнийского кондора. Наблюдалось соответствие каждой макрохромосомы курицы одной макрохромосоме кондора за исключением хромосом 4 и Z. Хромосома 4 курицы (GGAZ) была гомологична хромосомам 4 и 9 кондора. Эти результаты позволяют предположить, что хромосомы кондора являются предковыми хромосомами птиц. Гибридизация на хромосомах кондора пэинтингового ДНК-зонда Z хромосомы курицы позволила выявить положительные сигналы как на Z, так и на W хромосоме кондора, что демонстрирует неполную дифференциацию половых хромосом кондора в ходе эволюции в противоположность половым хромосомам всех других птиц [67]. Первая сравнительная физическая карта хромосом курицы и кондора была построена с использованием ВАС-библиотеки кондора и гибридизации OVERGO [68]. Зонды для OVERGO были сконструированы с использованием последовательностей ДНК курицы (164 ДНК-зонда) и калифорнийского кондора (8 ДНК-зондов). В результате скрининга 2,8 × субнабора всей библиотеки было выявлено 236 положительных пар ВАС-ген, в среднем 2,5 позитивных ВАС-клона на один ДНК-зонд. Предварительные сравнительные карты курицы и кондора, основанные на ВАС-клонах, содержат 93 гена. Сравнение отобранных сиквенсов ВАС-клонов кондора с ортологичными последовательностями курицы показало высокий уровень консервативной синтении между геномами этих видов птиц. В ходе этого исследования были получены необходимые инструменты для поиска генов-кандидатов хондродистрофии у кондора (наследственной болезни, наносящей существенный ущерб природной популяции калифорнийских кондоров) и генетической профилактики распространения этого заболевания [68]. В настоящее время активное геномное картирование и проекты по секвенированию геномов осуществляются у многих видов птиц: курицы, индейки, утки, японского перепела, зебровой амадины, бурого киви и калифорнийского кондора [69]. В настоящее время большая часть нуклеотидных и белковых последовательностей, внесенных в банк генов GenBank, принадлежат домашней курице, индейке, зебровой амадине, утке и калифорнийскому кондору.

Список литературы

1. Durham F.M. etc. Note on the inheritance of sex in canaries // Rep Evol Comm R Soc. – 1908. – V. IV. – P. 57–60.
2. Spillman W.J. Spurious allelomorphism: results of some recent investigations // American Naturalist. – 1908. – V. 42. – P. 610–615.
3. Hutt F.B. Genetics of the fowl. VI. A tentative chromosome map // Neue Forschungen in Tierzucht und Abstammungslehre (Duerst Festschrif). – 1936. – P. 105–112.
4. Crawford R.D. (ed) Poultry breeding and genetics. – 1990. Elsevier, Amsterdam.
5. Minvielle F. etc. Microsatellite mapping of QTL affecting growth, feed consumption, egg production, tonic immobility and body temperature of Japanese quail // BMC Genomics. – 2005. – V. 6. – P. 87.
6. Shetty S. etc. Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution // Chromosome Res. – 1999. – V. 7. – P. 289–295.
7. Schmid M. etc. First report on chicken genes and chromosomes 2000 // Cytogenet. Cell Genet. – 2000. – V. 90. – P. 169–218.
8. Schmid M. etc. Second report on chicken genes and chromosomes 2005. Cytogenet Genome Res. – 2005. – V. 109. – P. 415–479.
9. Raudsepp T. etc. Cytogenetic analysis of California condor (*Gymnogyps californianus*) chromosomes: comparison with chicken (*Gallus gallus*) macrochromosomes // Cytogenet Genome Res. – 2002. – V. 98. – P. 54–60.
10. Guttenbach M. etc. Comparative chromosome painting of chicken autosomal paints 1-9 in nine different bird species. Cytogenet Genome Res. – 2003. – V. 103. – P. 173–184.
11. Derjusheva S. etc. High chromosome conservation detected by comparative chromosome painting in chicken, pigeon and passerine birds // Chromosome Res. – 2004. – V. 12. – P. 715–723.
12. Itoh Y. etc. Chromosomal polymorphism and comparative painting analysis in the zebra finch. Chromosome Res. – 2005. – V. 13. – P. 47–56.
13. Shibusawa M. etc. Chromosome rearrangements between chicken and guinea fowl defined by comparative chromosome painting and FISH mapping of DNA clones // Cytogenet Genome Res. – 2002. – V. 98. – P. 225–230.
14. Kasai F. etc. Chromosome homology between chicken (*Gallus gallus domesticus*) and the red-legged partridge (*Alectoris rufa*); evidence of the occurrence of a neocentromere during evolution // Cytogenet Genome Res. – 2003. – V. 102. – P. 326–330.
15. Burt D.W. etc. The dynamics of chromosome evolution in birds and mammals // Nature. – 1999. – V. 402. – P. 411–413.
16. Burt D.W. Origin and evolution of avian microchromosomes // Cytogenet. Genome Res. – 2002. – V. 96. – P. 97–112.
17. Pimentel-Smith G.E. etc. Amplification of sequence tagged sites in five avian species using heterologous oligonucleotides // Genetica. – 2000. – V. 110. – P. 219–226.

18. Smith E.J. etc. Expressed sequence tags for the chicken genome from a normalized 10-day-old White Leghorn whole embryo cDNA library:1. DNA sequence characterization and linkage analysis // *J Hered.* – 2001a. – V. 92. – P. 1–8.
19. Smith E.J. etc. Expressed sequence tags for the chicken genome from a normalized, ten-day-old white leghorn whole embryo cDNA library. 2. Comparative DNA sequence analysis of guinea fowl, quail, and turkey genomes // *Poult Sci.* – 2001b. – V. 80. – P. 1263–1272.
20. Reed K.M. etc. Allelic variation and genetic linkage of avian microsatellites in a new turkey population for genetic mapping // *Cytogenet Genome Res.* – 2003. – V. 102. – P. 331–339.
21. Clayton D.F. Songbird genomics: methods, mechanisms, opportunities, and pitfalls // *Ann N Y Acad Sci.* – 2004. – V. 1016. – P. 45–60.
22. Kellner W.A. etc. Uprobe: a genome-wide universal probe resource for comparative physical mapping in vertebrates // *Genome Res.* – 2005. – V. 15. – P. 166–173.
23. Nefedov M. etc. New chicken, turkey, salmon, bovine, porcine and sheep genomic BAC libraries to complement world wide effort to map farm animals genomes // In: *Proc Plant Anim Genome XI Int Conf.* – 2003. – San Diego. – P. 96. – Abstr. – P. 87.
24. Romanov M.N. etc. Cross-species overgo hybridization and comparative physical mapping within avian genomes // *Anim Genet.* – 2006. – V. 37. – P. 397–399.
25. Kameda K. Goodridge AG Isolation and partial characterization of the gene for goose fatty acid synthase // *J Biol Chem.* – 1991. – V. 266. – P. 419–426.
26. Edwards S.V. Genomics and polymorphism of *Agph-DAB1*, an *Mhc* class II B gene in red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*) // *Mol Biol Evol.* – 1998. – V. 15. – P. 236–250.
27. Longmire J.L. etc. Low abundance of microsatellite repeats in the genome of the brown-headed cowbird (*Molothrus ater*) // *J Hered.* – 1999. – V. 90. – P. 574–578.
28. Shiina T. etc. Gene organization of the quail major histocompatibility complex (MhcCoja) class I gene region // *Immunogenetics.* – 1999. – V. 49. – P. 384–394.
29. Roots E.H. etc. Distribution and characterization of microsatellites in the emu (*Dromaius novaehollandiae*) genome // *J Hered.* – 2002. – V. 93. – P. 100–106.
30. Takahashi R. etc. Nucleotide sequences of pigeon feather keratin genes // *DNA Seq.* – 2003. – V. 14. – P. 205–210.
31. Moon D.A. etc. Construction and characterization of a fosmid library for comparative analysis of the duck genome. *Anim Genet.* – 2004. – V. 35. – P. 417–418.
32. Thomas J.W. etc. Parallel construction of orthologous sequence-ready clone contig maps in multiple species // *Genome Res.* – 2002. – V. 12. – P. 1277–1285.
33. Kellner W.A. etc. Uprobe: a genome-wide universal probe resource for comparative physical mapping in vertebrates // *Genome Res.* – 2005. – V. 15. – P. 166–173.
34. Romanov M.N. etc. Cross-species overgo hybridization and comparative physical mapping within avian genomes // *Anim Genet.* – 2006. – V. 37. – P. 397–399.

35. Pang S.W. etc. Japanese quail microsatellite loci amplified with chicken-specific primers // *Anim Genet.* – 1999. – V. 30. – P. 195–199.
36. Kayang B.B. etc. Microsatellite loci in Japanese quail and cross-species amplification in chicken and guinea fowl // *Genet Sel Evol.* – 2002. – V. 34. – P. 233–253.
37. Maak S. etc. Isolation and characterization of 18 microsatellites in the Peking duck (*Anas platyrhynchos*) and their application in other waterfowl species. *Mol Ecol Notes.* – 2003. – V. 3. – P. 224–227.
38. Huang Y. etc. Characterization of 35 novel microsatellite DNA markers from the duck (*Anas platyrhynchos*) genome and cross-amplification in other birds // *Genet Sel Evol.* – 2005. – V. 37. – P. 455–472.
39. Baratti M. etc. Polymorphic microsatellites developed by cross-species amplifications in common pheasant breeds // *Anim Genet.* – 2001. – V. 32. – P. 222–225.
40. Hanotte O. etc. Hypervariable minisatellite DNA sequences in the Indian peafowl *Pavo cristatus* // *Genomics.* – 1991. – V. 9. – P. 587–597.
41. Hale M.L. etc. Polymorphic microsatellite loci in peafowl (*Pavo cristatus*) // *Mol Ecol Notes.* – 2004. – V. 4. – P. 528–530.
42. Traxler B. etc. Polymorphic DNA microsatellites in the domestic pigeon, *Columba livia* var. *Domestica* // *Mol Ecol.* – 2000. – V. 9. – P. 366–368.
43. Tang B. etc. Isolation and characterization of 70 novel microsatellite markers from ostrich (*Struthio camelus*) genome // *Genome.* – 2003. – V. 46. – P. 833–840.
44. Taylor E.L. etc. Isolation and characterization of microsatellite loci in the emu, *Dromaius novaehollandiae*, and cross-species amplification within Ratitae // *Mol Ecol.* – 1999. – V. 8. – P. 1963–1964.
45. Kamara D. etc. Isolation and characterization of microsatellite markers from the budgerigar, *Melopsittacus undulatus* // *Mol. Ecol. Notes.* – 2007. – V. 7. – P. 507–509.
46. Huang Y. etc. A genetic and cytogenetic map for the duck (*Anas platyrhynchos*) // *Genetics.* – 2006. – V. 173. – P. 287–296.
47. Yuan X. etc. Construction and characterization of a duck bacterial artificial chromosome library // *Anim. Genet.* – 2006. – V. 37. – P. 599–600.
48. Roussot O. etc. AFLP linkage map of the Japanese quail *Coturnix japonica* // *Genet Sel Evol.* – 2003. – V. 35. – P. 559–572.
49. Kayang B.B. etc. A first-generation microsatellite linkage map of the Japanese quail // *Anim Genet.* – 2004. – V. 35. – P. 195–200.
50. Kikuchi S. etc. Construction of a genetic linkage map of Japanese quail (*Coturnix japonica*) based on AFLP and microsatellite markers // *Anim Genet.* – 2005. – V. 36. – P. 227–231.
51. Mannen H. etc. Development and mapping of microsatellite markers derived from cDNA in Japanese quail (*Coturnix japonica*) // *J Poult Sci.* – 2005. – V. 42. – P. 263–271.
52. Sasazaki S. etc. Mapping of EST markers with cDNA-AFLP method in Japanese quail (*Coturnix japonica*) // *Anim Sci J.* – 2006a. – V. 77. – P. 42–46.
53. Miwa M. etc. Mapping of plumage colour and blood protein loci on the microsatellite linkage map of the Japanese quail. *Anim Genet.* – 2005. – V. 36. – P. 396–400.
54. Miwa M. etc. Mapping of panda plumage color locus on the microsatellite linkage map of the Japanese quail // *BMC Genet.* – 2006. – V. 7. – P. 2.

55. Kayang B.B. etc. Integrated maps in quail (*Coturnix japonica*) confirm the high degree of synteny conservation with chicken (*Gallus gallus*) despite 35 million years of divergence // BMC Genomics. – 2006. – V. 7. – P. 101.
56. Sasazaki S. etc. A comparative map of macrochromosomes between chicken and Japanese quail based on orthologous genes // Anim Genet. – 2006b. – V. 37. – P. 316–320.
57. Shibusawa M. etc. A comparative cytogenetic study of chromosome homology between chicken and Japanese quail // Cytogenet. Cell Genet. – 2001. – V. 95. – P. 103–109.
58. <http://www.genome.gov/Pages/Research/Sequencing/BACLibrary/zebraFinch.pdf>.
59. Wade J. etc. A cDNA microarray from the telencephalon of juvenile male and female zebra finches // J Neurosci Methods. – 2004. – V. 138. – P. 199–206.
60. Luo M. etc. Utilization of a zebra finch BAC library to determine the structure of an avian androgen receptor genomic region // Genomics. – 2006. – V. 87. – P. 181–190. Erratum in: Genomics. – 2006. – V. 87. – P. 678–679.
61. Itoh Y. etc. Chromosomal polymorphism and comparative painting analysis in the zebra finch // Chromosome Res. – 2005. – V. 13. – P. 47–56.
62. <http://poultry.mph.msu.edu/resources/Resources.htm#bacdatafinch>
63. http://www.physci.ucla.edu/html/images/Zebra_finch_genome_white_paper.pdf
64. Hansson B. etc. Linkage mapping reveals sex-dimorphic map distances in a passerine bird // Proc Biol Sci. – 2005. – V. 272. – P. 2289–2298.
65. Dawson D.A. etc. A predicted microsatellite map of the passerine genome based on chicken-passerine sequence similarity // Mol Ecol. – 2006. – V. 15. – P. 1299–1320.
66. Backström N. etc. Genetic mapping in a natural population of collared flycatchers (*Ficedula albicollis*): conserved synteny but gene order rearrangements on the avian Z chromosome // Genetics. – 2006. – V. 174. – P. 377–386.
67. Raudsepp T. etc. Cytogenetic analysis of California condor (*Gymnogyps californianus*) chromosomes: comparison with chicken (*Gallus gallus*) macrochromosomes // Cytogenet Genome Res. – 2002. – V. 98. – P. 54–60.
68. Romanov M.N. etc. Construction of a California condor BAC library and first-generation chicken-condor comparative physical map as an endangered species conservation genomics resource // Genomics. – 2006. – V. 88. – P. 711–718.
69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=genomeprj>.

Глава 10. Локусы количественных признаков (QTL)

10.1. Картирование QTL

Идентификация генов, оказывающих влияние на проявление хозяйственно важных признаков, является одной из важнейших задач геномики сельскохозяйственных видов. Большинство таких признаков характеризуется широкой вариабельностью экспрессии генов, находящихся в определенных локусах, называемых QTL (quantitative trait loci – локусы количественных признаков) [1]. Эти локусы полиморфны и ассоциированы с вариациями фенотипических проявлений признаков, таких как яйценоскость, масса тела и т. п. Характеристика районов хромосом, несущих QTL, может быть применена в MAS (marker assisted selection – маркерная селекция) для увеличения эффективности селекции [2]. Наличие карт групп сцепления молекулярных маркеров в сочетании с мощными статистическими методами облегчает генетический анализ комплексных признаков. Домашняя курица является чрезвычайно удобным объектом для решения подобных задач благодаря относительно небольшой продолжительности жизненного цикла и большому числу потомков [3]. Для изучения геномной архитектуры хозяйственно важных признаков применяют два основных подхода: картирование QTL и функциональную геномику.

Изучение QTL у домашней курицы с помощью минисателлитных маркеров и метода фингерпринтинга началось в середине 90-х годов XX в. В одном из таких исследований для идентификации генетических маркеров, сцепленных с QTL, Ламоном и соавторами были использованы кроссы (гибриды) двух генетически различающихся между собой линий кур яичного направления [5]. В результате анализа сцепления индивидуальных полос ДНК и фенотипических проявлений признаков у петухов и их потомков были выявлены QTL, сцепленные со специфическими признаками роста, репродуктивных качеств и QTL качества яйца. На основе генетических карт высокого разрешения у домашней курицы были идентифицированы QTL для многих признаков, включая рост [5-7], эффективность кормления [8], качество тушки [9], устойчивость к болезни Марека (MD; [3, 10-12]), ожирение [13] и качество яйца [14, 15]. Информация по картированию, полученная в ходе исследований QTL, позволила в дальнейшем локализовать 45 микросателлитов на консенсусной карте, включающей 2306 маркеров первого и второго типов [16].

Как известно, большинство хозяйственно ценных признаков домашних животных имеют сложный полигенный тип наследования и контролируются многими генами, расположенными в локусах QTL. Изучение комплексной молекулярной архитектуры QTL представляет интерес с точки зрения общей генетики. Кроме того, данные о нуклеотидных последовательностях из районов QTL могут быть использованы в практическом животноводстве для селекции с помощью молекулярных маркеров.

Для комплексного понимания природы QTL указывают на необходимость рассмотрения следующих аспектов:

- число и состав генов, участвующих в биохимических и физиологических путях проявления фенотипа;
- уровень мутаций в QTL;
- число и состав QTL, определяющих фенотипическую изменчивость признака на внутривидовом, внутривидовом и межвидовом уровнях;
- эпистатические взаимодействия генов, вовлеченных в контроль количественного признака;
- возможный плейотропный эффект аллелей указанных генов, в первую очередь на жизнеспособность;
- молекулярный полиморфизм функционально различных аллелей QTL;
- молекулярные механизмы, определяющие фенотипические различия по количественным признакам;
- частоты аллелей QTL.

Следует отметить, что практически все указанные выше аспекты проблемы требуют детальной информации о нуклеотидных последовательностях геномов изучаемых видов.

10.2. QTL яичной продуктивности

В 2002 г. Туискула-Хаависто с соавторами провели полногеномное сканирование в поисках QTL для яичной продуктивности и качества яйца. Исследователи использовали реферативную популяцию кур, которая представляла собой кросс между двумя линиями яичного направления [14]. Авторы выявили 14 достоверных QTL, оказывающих значительное влияние на данные признаки, и шесть предположительных QTL, локализованных на хромосомах 2, 3, 4, 5, 8, и Z. Наиболее убедительные результаты были получены для GGA4, где выявлены QTL массы тела, массы яйца и эффективности усвоения корма.

Близкое по методологии исследование было проведено Вардецкой и соавторами в 2002 г. [15]. Влияние генотипов

яйценосной линии породы род-айленд и локальной польской породы зеленоногая куропатчая на яйценосность и качество яйца было проанализировано по сцеплению с 23 микросателлитными локусами. Достоверное влияние аллелей микросателлитов на количественные признаки было показано для 16 локусов. Выявленные при картировании QTL маркеры могут быть использованы для соотнесения локусов количественных признаков с контигами геномных клонов или полными сиквенсами геномов. Так, для двух QTL из изложенной выше работы нами были определены протяженные геномные клоны и составлены списки генов-кандидатов [17]. Такой методический подход называется позиционным клонированием.

Генетическое картирование QTL, влияющих на характеристики качества яйца, яйценосность и массу тела, было проведено Сасаки и соавторами в 2004 г. на гибридах второго поколения от скрещивания белых леггорнов и род-айлендов с использованием 123 микросателлитных локусов [18]. Авторы установили локализацию 95 маркеров в 25 аутосомных группах сцепления и 13 – на GGAZ, причем для восьми маркеров группа сцепления была определена впервые. Статистически достоверные QTL выявлены: в GGA4 и GGA27 – для массы тела, в GGA4 – массы и ширины яйца, в GGA11 – красноватой окраски скорлупы. В GGAZ был обнаружен локус, существенно влияющий на возраст снесения первого яйца. В целом 6–19 % фенотипической изменчивости указанных выше признаков может быть объяснена этими QTL.

10.3. QTL мясной продуктивности

Для поиска QTL, оказывающих влияние на рост, были использованы черновые данные полного сиквенса генома и микросателлитные маркеры. Ван Каам и сотрудники, [8] проводили полногеномное сканирование в поисках QTL, влияющих на рост и эффективность кормления кур, и обнаружили четыре статистически достоверные QTL на хромосомах GGA1, GGA2, GGA4 и GGA23. Эта же группа исследователей провела полногеномное сканирование в поисках QTL, оказывающих влияние на качество тушки у курицы [9]. В ходе данного исследования было показано, что на хромосомах GGA1 и GGA2 локализованы два QTL, влияющих на указанные признаки. Эти результаты были подтверждены и уточнены с помощью байесовского анализа [19]. В том же 2002 г. Тацуда и Фуджинака [7] выявили QTL, оказывающий влияние на массу тела, с использованием реферативной популяции, происходящей от скрещивания петухов Сацумадори (медленно растущей легкой

местной японской породы, используемой в качестве мясной птицы) и кур породы белый плимутрок (скороспелого тяжелого бройлера). На хромосоме GGA1 в районе 220 сМ и на хромосоме GGA2 на 60 сМ были картированы два QTL, оказывающих влияние на массу тела на 13–16-й неделе жизни птицы. Ближайшие QTL маркеры – LEI0071 на GGA1 и LMU0013 и MCW0184 на GGA2. Севалем и соавторы [20] исследовали QTL для массы тела на 3-й, 6-й, и 9-й неделях жизни птицы, используя кросс бройлера и яичной породы кур. В результате исследований на хромосоме GGA13 был выявлен QTL, оказывающий влияние на массу тела в течение всех трех исследованных периодов жизни. На геномном уровне были также обнаружены QTL на хромосомах 1, 2, 4, 7 и 8, влияющих на массу тела в течение двух периодов жизни цыплят. В 2004 г. были идентифицированы QTL для качества мяса и продуктивности в коммерческих линиях бройлеров [21]. При помощи 52 микросателлитных локусов, представляющих районы девяти хромосом курицы, путем анализа полусибсов на основе модели множественных QTL исследователи установили связь между этими девятью районами и признаками роста, качеством тушки и потребления корма. QTL, оказывающие влияние на жирность у кур, были исследованы и картированы Икеоби и соавторами в 2002 г. [22] в популяции F2 от скрещивания линий бройлеров и яичных кур. При помощи внутрисемейного регрессионного анализа с использованием 102-х микросателлитных локусов из 27 групп сцепления, были выявлены: QTL для массы абдоминального жира на хромосомах 3, 7, 15, и 28, для нормализованной по общей массе абдоминального жира - на хромосомах 1, 5, 7 и 28; массы кожного и подкожного жир на хромосомах 3, 7 и 13; нормализованной по общей массе кожного жира на хромосомах 3 и 28, а масса кожного жира, нормализованного по массе абдоминального жира на хромосомах 5, 7 и 15. Достоверное позитивное и негативное влияние на изучаемые признаки было показано для аллелей QTL в обеих линиях. Некоторые QTL, оказывающие влияние на процесс депонирования жира у бройлеров, были выявлены Йеннен и сотрудниками в 2004 г. [23]. В своем исследовании авторы использовали две неродственные линии самок бройлеров породы белый плимутрок. Генетический контроль скорости роста и телосложения изучались в реферативной популяции кур, полученной скрещиванием племенного петуха из коммерческой бройлерной линии с курами из двух неродственных высокоинбредных линий [24]. Предполагалось, что хозяйственные признаки, отобранные традиционными методами у бройлеров, контролируются большим числом генов с небольшим

эпистатическими эффектами, в то время как на признаки, связанные с жизнеспособностью, могли оказывать решающее влияние немногие гены. После одновременного картирования эпистатирующих QTL у гибридов второго поколения кластеры QTL, оказывающие похожее влияние на рост, были обнаружены в 2004 г. Карлборгом и соавторами [25]. Авторы использовали одновременное картирование взаимодействующих QTL для изучения признаков роста. Этот подход позволил увеличить число выявленных QTL на 30 %. Генетическая вариация роста подвержена эпистазу в значительной степени, особенно на ранних стадиях развития (до шестинедельного возраста). Поскольку раннее развитие, как было показано, связано с определенным набором взаимодействующих локусов, вовлеченных в данный процесс, эти результаты обеспечили в дальнейшем понимание различия генетической регуляции раннего и позднего развития кур. Такие различия обнаружены и у других видов.

10.4. QTL устойчивости к болезням

Принято считать, что уровень иммунного ответа и устойчивость к болезням можно улучшить с помощью селекции. Поскольку эти количественные признаки имеют низкую или среднюю наследуемость, предполагают, что большего эффекта относительно них можно достичь при помощи маркерной селекции, нежели конвенционными методами [26]. Повышение наследственной устойчивости к болезни Марека представляет собой более привлекательное решение проблемы массовых вспышек этого тяжелого заболевания, чем вакцинация. Генетическое картирование QTL, оказывающее влияние на восприимчивость к опухолям, индуцируемым вирусом болезни Марека, было проведено Валлейо и сотрудниками в 1998 г. [3]. Эти авторы были первыми, кто сообщил о картировании QTL комплекса гистосовместимости (не MHC), вовлеченного в процесс формирования восприимчивости кур к болезни Марека. В четырех районах хромосом было выявлено два достоверных и два предполагаемых QTL устойчивости к болезни Марека. Влияние этих локусов определяет 11–23 % фенотипической изменчивости болезни Марека или 32–68 % генетической изменчивости этого признака. Другие QTL, влияние которых определяет примерно 7,2 % фенотипической изменчивости резистентности к данной болезни, были обнаружены на хромосоме 4 [27]. В своей работе Хи и соавторы использовали модель гетерогенной остаточной вариации, которая, как считается, дает преимущество в скорости расчетов по сравнению со

смешанной моделью. В этих и других исследованиях, в которых использовались те же гибриды, F₂ между двумя экспериментальными линиями [28–30] идентифицированы QTL на хромосомах 1, 2, 4, 7, 8, 12 и 17, оказывающих влияние на устойчивость к болезни Марека. QTL, ассоциированных с этим признаком (определенного как продолжительность жизни после появления первых симптомов), были проверены на кроссе между линиями коммерческих яичных кур [32]. В данном исследовании было проведено генотипирование с использованием 81 микросателлита, отобранного на основе предварительных результатов, полученных с использованием пулов ДНК. В результате было выявлено несколько маркеров, ассоциированных с выживаемостью при болезни Марека. Один из этих маркеров соответствует QTL, идентифицированному на хромосоме 2 вблизи района, установленного Валлейо [3] и Йонаш [32] для QTL устойчивости к болезни Марека, находящегося в области 90 cM GGA2 на консенсусной генетической карте. Очень важная и актуальная проблема для продукции птицеводства, безопасности и потребительской ценности продуктов питания – это контаминация бактериями *Salmonella enteritidis*. Кайзер и соавторы в 2002 г. [32] идентифицировали генетические маркеры антител, вырабатываемых в ответ на вакцину *Salmonella enteritidis* у цыплят-бройлеров и подтвердили сцепление у потомства бройлерных кроссов.

Некоторые QTL, влияющие на иммунный ответ на введение эритроцитов барана, были выявлены Сивек и соавторами в 2003 г. [33] у яичных кур с использованием 170 микросателлитных маркеров на популяции птиц F₂ от скрещивания двух линий, селективированных на высокий и низкий иммунный ответ на введение эритроцитов барана. Для идентификации QTL были использованы модель полусибсов и модель линия-гибрид, основанных на методе регрессионного интервала. В двух независимых популяциях яичных кур в 2003 г. были обнаружены QTL, вовлеченные в первичный ответ на введение гемоцианина фиссуреллы и бактерий *Mycobacterium butyricum* [34]. Предполагалось, что генетическая регуляция иммунного ответа на два разных зависимых от Т-лимфоцитов антигена различна. Жоу и сотрудниками [35] с помощью микросателлитов и анализа нарушения равновесия сцепления у гибридов высокоинбредных самцов двух конгенных по МНС линий кур Fayoumi и высокоинбредных самок леггорна G-B1 были исследованы QTL, оказывающие влияние на иммунный ответ. QTL, влияющие на кинетику антител, были локализованы на хромосомах 3, 5, 6 и Z.

Полногеномное сканирование с использованием 119 микросателлитов позволило Жоу и сотрудникам [35] картировать на хромосоме 1 домашней курицы QTL, связанный с устойчивостью к птичьему коккоидиозу. Ионаш и соавторы [26] исследовали QTL, ассоциированные с иммунным ответом на эритроциты барана, вирус болезни Ньюкасла (NDV) и кишечную палочку. Как было показано в указанной работе, с этими тремя признаками имеют существенную ассоциацию три маркера.

Кроме собственно экономического значения, домашнюю курицу можно рассматривать как модельный объект для изучения болезней человека, например, наследственной предрасположенности к различным формам миопии [36].

10.5. QTL поведения

В 2003 г. Бьютенхьюз с сотрудниками [37] обнаружили несколько QTL, оказывающих влияние на выщипывание перьев (особенность поведения, являющаяся важной проблемой при вольерном содержании) и устойчивость к стрессу кур яичного направления. С помощью 180 микросателлитных локусов исследователи картировали один достоверный QTL, ассоциированный с сильным выщипыванием перьев, на хромосоме 2 и предполагаемые QTL для легкого проявления этого признака на хромосомах 1, 2 и 10 домашней курицы. Полногеномное сканирование с использованием 104 микросателлитов с целью поиска QTL, оказывающих влияние на пищевое поведение и общественную мотивацию, было проведено в 2002 г. Шутцем и сотрудниками [38]. В качестве материала для исследования были использованы потомки F2 от скрещивания птиц породы белый леггорн и дикой банкивской курицы. Были обнаружены достоверные QTL, связанные с предпочтением свободной пищи без общественных стимулов и небольшого количества искусственных добавок на хромосомах 27 и 7 соответственно. Интересно, что локализация этих QTL совпала с известными QTL для темпа роста и массы тела. Исследования QTL у кур очень быстро расширяются, создана специальная база данных по QTL домашней курицы (NAGRP, [39]). С появлением плотно насыщенных молекулярными маркерами генетических карт исследования по поиску QTL становятся возможными и у других видов домашней птицы [40–42].

Список литературы

1. Cheng H.H. etc. Development of a genetic map of the chicken with markers of high utility // *Poult Sci.* – 1995. – V. 74. – P. 1855–1874.
2. Grisart B. etc. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutations in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition // *Genome Research.* – 2002. – V. 12. – P. 222–231.
3. Vallejo R.L. etc. Genetic mapping of quantitative trait loci affecting susceptibility to Marek's disease virus induced tumors in F₂ intercross chickens // *Genetics.* – 1998. – V. 148. – P. 349–360.
4. Lamont S.J. etc. Genetic markers linked to quantitative traits in poultry // *Anim Genet.* – 1996. – V. 27. – P. 1–8.
5. Groenen M.A.M. QTL mapping in chicken using a three generation full sib family structure of an extreme broiler × broiler cross // *Anim Biotechnol.* – 1997. – V. 8. – P. 41–46.
6. van Kaam J.B.C.H.M. etc. Whole genome scan in chickens for quantitative trait loci affecting body weight in chickens using a three generation design // *Livest Prod Sci.* – 1998. – V. 54. – P. 133–150.
7. Tatsuda K. etc. Genetic mapping of QTL affecting body weight in chickens using a F₂ family // *Br Poult Sci.* – 2001. – V. 42. – P. 333–337.
8. van Kaam J.B.C.H.M. etc. Whole genome scan in chickens for quantitative trait loci affecting growth and feed efficiency // *Poult Sci.* – 1999a. – V. 78. – P. 15–23.
9. van Kaam J.B.C.H.M. etc. Whole genome scan in chickens for quantitative trait loci affecting carcass traits // *Poult Sci.* – 1999b. – V. 78. – P. 1091–1099.
10. Xu G. etc. A CT repeat in the promoter of the chicken malic enzyme gene is essential for function at an alternative transcription start site // *Arch Biochem Biophys.* – 1998. – V. 358. – P. 83–91.
11. Yonash N. etc. High resolution mapping and identification of new quantitative trait loci (QTL) affecting susceptibility to Marek's disease // *Anim Genet.* – 1999. – V. 30. – P. 126–135.
12. Lipkin E. etc. Quantitative trait locus mapping in chickens by selective DNA pooling with dinucleotide microsatellite markers by using purified DNA and fresh or frozen red blood cells as applied to marker-assisted selection // *Poult Sci.* – 2002. – V. 81. – P. 283–292.
13. Ikeobi C.O. etc. Quantitative trait loci affecting fatness in the chicken // *Anim Genet.* – 2002. – V. 33. – P. 428–435.
14. Tuiskula-Haavisto M. etc. Mapping of quantitative trait loci affecting quality and production traits in eggs layers // *Poultry Sci.* – 2002. – V. 81. – P. 919–927.
15. Wardecka B. etc. Relationship between microsatellite marker alleles on chromosome 1-5 originating from the Rhode Island Red and green-legged Partridge breeds and egg production and quality traits in F₂ mapping population // *J. Appl. Genet.* – 2002. – V. 43. – P. 319–329.
16. Schmid M. etc. Second report on chicken genes and chromosomes 2005. // *Cytogenet Genome Res.* – 2005. – V. 109. – P. 415–479.
17. Sazanov A.A. etc. Chromosomal localization of fifteen large insert BAC clones containing three microsatellites on chicken chromosome 4 (GGA4) which refine its centromere position // *Anim Genet.* – 2005. – V. 36. – P. 161–163.

18. Sasaki O. etc. Genetic mapping of quantitative trait loci affecting body weight, egg character and egg production in F₂ intercross chickens // *Anim Genet.* – 2004. – V. 35. – P. 188–194.
19. van Kaam J.B.C.H.M. etc. Scaling to account for heterogeneous variances in a Bayesian analysis of broiler quantitative trait loci // *J Anim Sci.* – 2002. – V. 80. – P. 45–56.
20. Sewalem A. etc. Mapping of quantitative trait loci for body weight at three, six, and nine weeks of age in a broiler layer cross // *Poult Sci.* – 2002. – V. 81. – P. 1775–1781.
21. de Koning D-J. etc. Segregation of QTL for production traits in commercial meat-type chickens // *Genet Res.* – 2004. – V. 83. – P. 211–220.
22. Ikeobi C.O. etc. Quantitative trait loci affecting fatness in the chicken // *Anim Genet.* – 2002. – V. 33. – P. 428–435.
23. Jennen D.G.J. etc. Detection and localization of quantitative trait loci affecting fatness in broilers // *Poult Sci.* – 2004. – V. 83. – P. 295–301.
24. Deeb N. etc. Use of a novel outbred by inbred F₁ cross to detect genetic markers for growth // *Anim Genet.* – 2003. – V. 34. – P. 205–212.
25. Carlborg O. etc. Simultaneous mapping of epistatic QTL in chickens reveals clusters of QTL pairs with similar genetic effects on growth. *Genet Res.* – 2004. – V. 83. – P. 197–209.
26. Yonash N. etc. DNA microsatellites linked to quantitative trait loci affecting antibody response and survival rate in meat-type chickens // *Poult Sci.* – 2001. – V. 80. – P. 22–28.
27. Xu G. etc. A CT repeat in the promoter of the chicken malic enzyme gene is essential for function at an alternative transcription start site // *Arch Biochem Biophys.* – 1998. – V. 358. – P. 83–91.
28. Bumstead N. etc. A preliminary linkage map of the chicken genome. *Genomics.* – 1992. – V. 13. – P. 690–697.
29. Yonash N. etc. DNA microsatellites linked to quantitative trait loci affecting antibody response and survival rate in meat-type chickens // *Poult Sci.* – 2001. – V. 80. – P. 22–28.
30. Liu W. etc. Construction and characterization of a novel 13.34-fold chicken bacterial artificial chromosome library // *Anim Biotechnol.* – 2003. – V. 14. – P. 145–153.
31. McElroy J.P. etc. Microsatellite markers associated with resistance to Marek's disease in commercial layer chickens // *Poult. Sci.* – 2005. – V. 84. – P. 1678–1688.
32. Kaiser M.G. etc. Microsatellite markers linked to *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* vaccine response in young F₁ broiler-cross chicks // *Poult Sci.* – 2002. – V. 81. – P. 193–201.
33. Siwek M. etc. Detection of QTL for immune response to sheep red blood cells in laying hens // *Anim Genet.* – 2003a. – V. 34. – P. 422–428.
34. Siwek M. etc. Detection of different quantitative trait loci for antibody responses to keyhole limpet hemocyanin and *Mycobacterium butyricum* in two unrelated populations of laying hens // *Poult Sci.* – 2003b. – V. 82. – P. 1845–1852.
35. Zhou H. etc. Genetic markers associated with antibody response kinetics in adult chickens // *Poult Sci.* – 2003. – V. 82. – P. 699–708.

36. Dodgson J.B. etc. Use of chicken models for the analysis of human disease. In: Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, Moir DT, Morton CC, Seidman CE, Seidman JG, Smith DR (eds) Current protocols in human genetics. John Wiley and Sons, Inc, Hoboken, Unit 15.5, pp 15.5.1-15.5.11/
37. Buitenhuis A.J. etc. Identification of quantitative trait loci for receiving pecks in young and adult laying hens // *Poult Sci.* – 2003. – V. 82. – P. 1661–1667.
38. Schütz K. QTL analysis of a red junglefowl × White Leghorn intercross reveals trade-off in resource allocation between behavior and production traits // *Behav Genet.* – 2002. – V. 32. – P. 423–433.
39. <http://www.animalgenome.org/QTLdb/chicken.html>.
40. Minvielle F. etc. Microsatellite mapping of QTL affecting growth, feed consumption, egg production, tonic immobility and body temperature of Japanese quail // *BMC Genomics.* – 2005. – V. 6. – P. 87.
41. Beaumont C. etc. A genome scan with AFLPTM markers to detect fearfulness-related QTLs in Japanese quail // *Animal Genetics.* – 2005. – V. 36. – P. 401–407.
42. Huang Y. etc. A genetic and cytogenetic map for the duck (*Anas platyrhynchos*) // *Genetics.* – 2006. – V. 173. – P. 287–296.

Глава 11. Функциональная геномика

Домашняя курица за последнее столетие стала довольно привлекательным модельным организмом для исследований в области фундаментальной биологии и медицины. Широко известны такие примеры значения этого объекта, как открытие В-клеток и опухолевых вирусов [1, 2]. Эмбрион птицы – идеальная система для исследования развития позвоночных животных (например, зачатков конечностей) из-за доступности и простоты манипуляций с инкубированными яйцами [3]. Функциональная геномика – новая многообещающая область исследований для этого биологического вида. Благодаря новым ресурсам и методическим подходам, включающим полные сиквенсы геномов, базы данных по EST, ДНК-биочипы, электропорацию куриных эмбрионов, использование иРНК для экспрессии нокаутированных генов и технологии трансгенеза, эта область развивается стремительно [3, 5, 6]. ДНК-биочипы стали мощным инструментом для выявления функциональных генов у некоторых организмов, включая человека, грызунов, дрозофилу, домашнюю курицу и т. д. В 2000 г. был создан международный консорциум по систематическому профилированию экспрессии генов домашней курицы [7]. Целью проекта было создание геномных ресурсов (EST и ДНК-биочипы), исследования экспрессии генов курицы в тканях-мишенях и поиск новых функциональных генов. Усилия по реализации другого проекта по функциональной геномике привели к получению коллекции 339 314 EST из 64 библиотек кДНК, полученных из 21 ткани взрослых особей и эмбрионов кур [8]. Эти последовательности ДНК были организованы в 85 486 контигов, что соответствует 89 % рассчитанного общего числа генов курицы. Из них около 180 000 EST представляли собой оригинальные для этого вида кодирующие последовательности, тогда как 38% их были ортологичны последовательностям других видов. Позднее было проведено объединение этих двух коллекций EST [2]. В настоящее время в базе данных NCBI имеется более 600 000 EST. Компания Affymetrix, Inc. создала первый коммерческий доступный ДНК-биочип домашней курицы GeneChip Chicken Genome Array [9]. Этот чип содержит 25-членные олигонуклеотидные зонды для идентификации 32 773 транскриптов, соответствующих более чем 28 000 генов домашней курицы, а также набор из 689 зондов для 684 транскриптов 17 вирусов птиц. Другие полногеномные чипы включают: (1) производства Operon Biotechnologies, Inc. 70-членный биочип с 21 120 зондами; (2) Chicken Consortium cDNA биочип с 11 136 зондами, произведенный лабораторией GRL (Tucson, AZ, USA) и (3) произведенный NimbleGen Systems, Inc. Chicken биочип на основе хроматин-

иммунопреципитации, который представляет каждые 100 п. н. из уникальных районов. Новый биочип, состоящий из 44 000 олигонуклеотидных элементов, был также сделан Agilent Corp. Группа сотрудников Рослинского института (Эдинбург, Великобритания), университета Делавера (Ньюарк, Делавер), GSF института молекулярной и радиационной биологии (Нюрнберг, Германия) создали общедоступный чип, содержащий около 13 000 EST курицы [11]. Кроме того, известны четыре чипа, созданные в университете Делавера (UD_Liver_3.2K, UD 7.4K Metabolic/Somatic Systems, Chicken Neuroendocrine System 5K и DEL- MAR 14K Integrated Systems), три чипа, созданных ARK- Genomics (чип, содержащий 1153 клон кДНК куриных эмбрионов, чип для изучения иммунного ответа, включающий 5000 кДНК-клонов, и нейроэндокринный чип, состоящий из 4 800 клонов) [12].

Такие ДНК-биочипы используются для анализа профилей экспрессии генов в связи с иммунным ответом на инфекционные заболевания [12], признаками роста, метаболизма липидов и депонирования жира [7, 12], функциями желез внутренней секреции, формированием скорлупы яиц [12], эмбриональным развитием [12] в экспериментальных и коммерческих линиях и породах.

Список литературы

1. Brown W.R. etc. The chicken as a model for large-scale analysis of vertebrate gene function // *Nat Rev Genet.* – 2003. – V. 4. – P. 87–98.
2. Romanov M.N. etc. First century of chicken gene study and mapping – a look back and forward // *Worlds Poult Sci J.* – 2004. – V. 60. – P. 19-41.
3. Stern C.D. The chick embryo—Past, present and future as a model system in developmental biology. *Mech. Dev.* 2004. V. 121. P: 1011–1013.
4. Stern C.D. The chick: a great model system becomes even greater. *Dev. Cell.* – 2005. – V. 8. – P. 9–17.
5. Brown W.R. etc. The chicken as a model for large-scale analysis of vertebrate gene function // *Nat Rev Genet.* – 2003. – V. 4. – P. 87–98.
6. Burt D.W. etc. Chicken genome—science nuggets to come soon. *Science.* – 2003. – V. 300. – P. 1669.
7. Cogburn L.A. etc. Systems-wide chicken DNA microarrays, gene expression profiling, and discovery of functional genes // *Poult Sci.* – 2003. – V. 82. – P. 939–951.
8. Boardman P.E. etc. A comprehensive collection of chicken cDNAs // *Curr Biol.* – 2002. – V. 12. – P. 1965–1969.
9. <http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/chicken.affx>.
10. Burnside J. etc. Development of a cDNA array for chicken gene expression analysis // *BMC Genomics.* – 2005. – V. 6. – P. 13.
11. <http://poultry.mph.msu.edu/about/Poultry%20Coord%20report%20for%2006.pdf>.
12. Romanov M.N. etc. *Genome Mapping and Genomics in Animals.* V. 3. Ed. by N.E. Cockett and C. Kole. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg. – 2009. – P. 75–141.

Заключение

Интеграция молекулярного и цитогенетического уровней исследования хромосом позволяет приблизиться к комплексному пониманию структурно-функциональной организации генома. Сравнительный подход к исследованию геномов открывает качественно новые возможности вскрытия как принципиальных закономерностей функционирования ядра эукариотической клетки, так и эволюционных взаимоотношений элементов геномов представителей различных таксономических групп.

Гридированные библиотеки протяженных геномных клонов представляют собой мощный инструмент анализа генома. Их использование дает возможность привести в соответствие друг с другом данные по молекулярной организации нуклеиновых кислот и цитогенетические данные по структуре хромосом. Существующие геномные библиотеки птиц являются адекватными задачам молекулярно-цитогенетического анализа генома класса *Aves* и могут быть с успехом использованы для получения и характеристики протяженных участков генома. Это обстоятельство позволит им найти свое применение не только в области картирования хромосом, но и для позиционного клонирования и поиска генов-кандидатов количественных признаков.

Геном птиц, являясь уникальным по своей структуре для теплокровных животных и отличаясь высоким консерватизмом внутри класса *Aves*, представляет собой многообещающую модель, которая при сравнении с детально изученными геномами млекопитающих позволит рассмотреть принципы комплексной структурно-функциональной организации клеточного ядра позвоночных животных.

Неожиданно высокий эволюционный консерватизм районов хромосом человека и домашней курицы, оказавшийся существенно более высоким, чем у таксономически несравненно более близких видов – человека и домовый мыши, открывает возможности прямого экстраполирования данных полного секвенирования генома человека на большое число хромосомных районов птиц. Это дает основание полагать, что при позиционном клонировании и поиске генов-кандидатов количественных признаков у хозяйственно ценных птиц могут быть использованы детальные карты нуклеотидных последовательностей человека. В особой степени это относится к хромосоме 4 домашней курицы, где существует протяженный и насыщенный маркерами район ортологии и где локализованы наиболее важные QTL яйценоскости и качества яйца.

Феномен паралогии нуклеотидных последовательностей, детально исследованный в последнее время в геномах млекопитающих, оказался свойственным также и классу Aves. Данные о распределении в геноме домашней курицы представителей семейства генов аденозиновых рецепторов дают основания говорить о возможности различных путей эволюции хромосом млекопитающих и птиц.

В настоящее время вопрос о наличии механизмов компенсации дозы генов в половых хромосомах птиц остается открытым. Пока не получено убедительных подтверждений ни для одной из гипотез – наличия и отсутствия подобного механизма. Показанная нами локализация кластера авидиновых генов, которые функционируют почти исключительно у самок (ZW), в половой Z-хромосоме определяет наличие двух копий этих генов у самцов (ZZ). Указанный парадокс не может быть объяснен на основании известных данных и, возможно, свидетельствует о существовании посттранскрипционных механизмов компенсации дозы генов, отличных от таковых у млекопитающих.

Наряду с характерными для млекопитающих феноменами ортологии и паралогии геному птиц свойственна структурно-функциональная компартиментализация, которая выражается в специализации микрохромосом как наиболее активных в генетическом отношении элементов генома.

Научное издание

Алексей Александрович Сазанов

Молекулярная организация генома птиц

Монография

Редактор *В. Л. Фурштатова*
Технический редактор *Н. П. Никитина*
Оригинал-макет *Н. П. Никитиной*

Подписано в печать 23.07.2010. Формат 60x84 1/16.
Бумага офсетная. Гарнитура Arial. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 6,75. Тираж 500 экз. Заказ № 531

Ленинградский государственный университет имени А.С. Пушкина
196605, Санкт-Петербург, г. Пушкин, Петербургское шоссе, 10

РТП ЛГУ 197136, Санкт-Петербург, Чкаловский пр., 25а