

Локалізація 10 генів на X хромосомах п'яти видів полєвок роду *Microtus* (*Arvicolinae*, *Rodentia*)

О. В. Аноприєнко^{1, 2}, А. И. Шевченко², Н. А. Мазурок²,
Н. Б. Рубцова², С. И. Закиян²

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Ул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

² Інститут цитології і генетики СО РАН
Пр. Академіка Лаврентьєва, 10, Новосибірськ, 630090, РФ

E-mail: o.v.anoprienko@imbg.org.ua

Определена локалізація 10 нових генів на X хромосомах п'яти видів сьрих полєвок роду *Microtus*. Особенностью выбранных генів является их свойство избегать инактивации на инактивируемой X хромосоме человека и, частично, мыши. На основе сравнительного анализа локалізації генів на X хромосомах четырех видов полєвок группы *arvalis* (обыкновенные полєвки) выявлены четыре новые и уточнены границы двух определенных ранее инверсий. Обнаружено семь кластеров консервативной синтени в X хромосомах обыкновенных полєвок. В результате сравнения порядка генів у полєвок группы *arvalis* и представителя внешней группы *agrestis* показано, что X хромосома *M. arvalis* и *M. kirgisorum* являются наиболее близкими к предковой X хромосоме обыкновенных полєвок.

Ключевые слова: X хромосома, хромосомные перестройки, инактивация X хромосомы, картирование, флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH).

Введение. В плане разнообразия структурной организации половых хромосом отряд грызунов является уникальной группой, представляющей широкий спектр кариотипических вариантов. В отношении X хромосомы выдвинуто предположение о том, что изменение статуса экспрессии генів на неактивной X хромосоме может быть вызвано эволюционными изменениями ее структурной организации (инверсиями, добавлениями блоков гетерохроматина, изменениями положения центромеры) [1]. X хромосома мыши, которая может оказаться самой перестроенной среди X хромосом плацентарных, имеет значительно меньше избегающих инактивации генів, чем у человека. Однако остается неясным, насколько изменение порядка генів или различие в морфологии X хромосом человека и мыши ответст-

венны за отличия в статусе инактивации генів у этих видов.

Перспективным подходом для изучения комплекса вопросов, связанных с эволюцией хромосом, механизмами хромосомных перестроек, эволюцией механизмов регуляции экспрессии генів и регуляторных элементов, является исследование групп близкородственных видов. Сьрые полєвки роду *Microtus* относятся к быстроэволюционирующим группам. Пять близкородственных видов полєвок роду *Microtus* — *M. rossiaemeridionalis*, *M. arvalis*, *M. kirgisorum*, *M. transcaspicus* и *M. agrestis* — имеют отличные по размеру и морфологии X хромосомы [2] и были выбраны нами для изучения эволюционных преобразований их X хромосом с помощью сравнительного картирования методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

На предыдущих этапах для исследований у

полевок мы выбрали гены, характеризующиеся свойством избегать инактивации на инактивируемой X-хромосоме человека и, частично, мыши. Клоны, содержащие соответствующие генные последовательности полевок, получены в результате скрининга фаговой геномной библиотеки *M. rossiaemeridionalis* мышинными или человеческими кДНК зондами [3]. Дальнейшее частичное секвенирование подтвердило высокую гомологию последовательностей для генов *Eif4c*, *Zfx*, *rab9*, *Crsp2*, *Utx1*, *Sb1.8*, *Nap113*, *Sybl1*, *Spry3*, *In1Hst2* полевок, мыши и человека. Эти клоны были отобраны для FISH на метафазных хромосомах пяти видов полевок. В комплексе с картированными ранее «классическими» инактивируемыми генами *Hprt*, *G6pd*, *Gla*, *Pgk* и геном, ответственным за распространение сигнала инактивации *Xist* [4], новые гены являются маркерами функциональных кластеров генов X хромосомы. Исследование реорганизации этих кластеров у близкородственных видов полевок явилось целью данной работы.

Материалы и методы. Животные. В работе использованы пять видов полевок рода *Microtus*: четыре вида полевок группы *arvalis* — *M. arvalis*, *M. kirgisorum*, *M. rossiaemeridionalis* и *M. transcaspicus* и один вид из группы *agrestis* — *M. agrestis*. Животных отловливали в разных регионах бывшего СССР и содержали в виварии Института цитологии и генетики СО РАН.

Приготовление препаратов метафазных хромосом. Цитогенетические препараты метафазных хромосом готовили из клеточных линий и первичных культур фибробластов легкого. Клетки получали методом трипсинизации от одно- или двухмесячных животных и поддерживали в среде Хамса F12 с 10 % FCS в атмосфере 5 % углекислого газа. За 3 ч до приготовления препаратов к клеткам добавляли бромистый этидий (до концентрации 1,5 мг/мл), а за 40 мин — колхицин (до конечной концентрации 0,1 мг/мл). Метафазные хромосомы фиксировали в смеси метанол:уксусная кислота в объемном соотношении 3:1. Препараты хранили при температуре 4 °С в течение нескольких месяцев. Перед использованием препараты высушивали в вакууме при комнатной температуре в течение 4 дней.

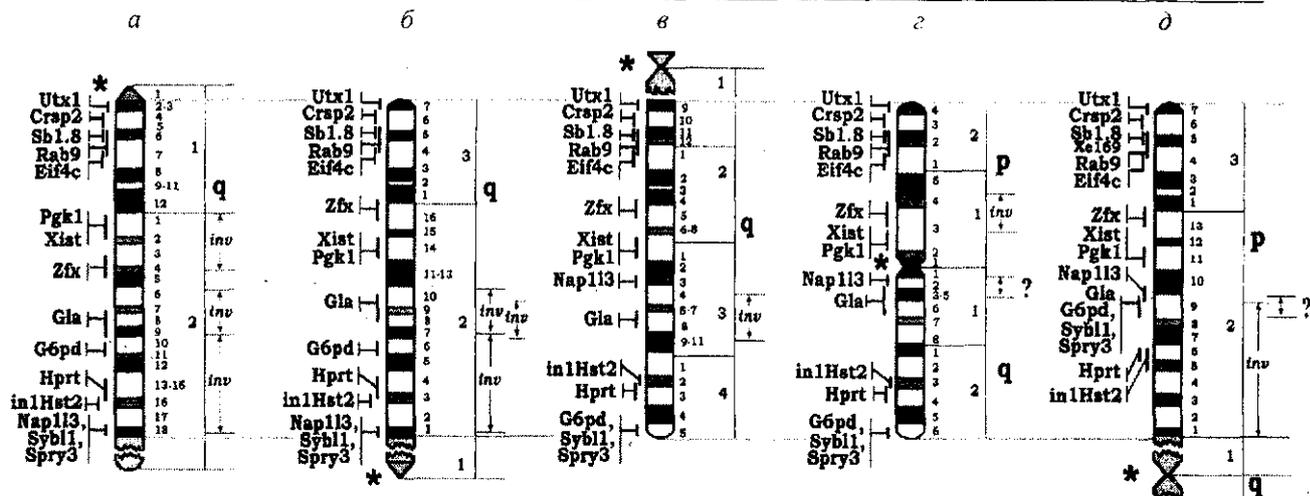
Флуоресцентная гибридизация *in situ*. ДНК клонов метили ник-трансляцией с биотин-16-dUTP или дигоксигенин-11-dUTP («Roche», Швейцария). От невключенных нуклеотидов зонды очищали на колонке с сефадексом G-50 (средним), уравнове-

шенным буфером TE с 0,1 % SDS. Размер меченых фрагментов ДНК и активность зонда детектировали с помощью конъюгата стрептавидин—щелочная фосфатаза.

FISH выполняли на основе метода [5]. Зонды гибридизовали с препаратами хромосом в течение 16 ч на водяной бане при температуре 37 °С в смеси следующего состава: 50 %-й формамид; 2 × SSC, 1 %-й твин-20; 1 %-й декстран сульфат, 200 нг меченого зонда. Препараты после гибридизации последовательно отмывали при температуре 44 °С в 50 %-м формамиде и 2 × SSC, при 40 °С в 2 × SSC и 60 °С в 0,1 × SSC. Для детекции зонда использовали конъюгат авидин — флуоресцеин и антитела к дигоксигенину, меченые родамином. Препараты анализировали с помощью интерференционного фильтра на флуоресцентном микроскопе NIKON ×100. G-подобный бэндинг получали компьютерной обработкой изображений DAPI-окрашенных хромосом.

Результаты и обсуждение. FISH фаговых клонов на метафазных хромосомах полевок рода *Microtus*. В результате проведенной *in situ* гибридизации на X хромосомах полевок *M. rossiaemeridionalis*, *M. transcaspicus*, *M. kirgisorum*, *M. arvalis*, и *M. agrestis* установлена локализация фаговых клонов для девяти генов: *Eif4c*, *Zfx*, *Utx1*, *Sb1.8*, *Crsp2*, *Nap113*, *Rab9*, *Sybl1*, *Spry3* и молекулярного маркера *In1Hst2*. В качестве зонда при скрининге геномной библиотеки для гена *Xel69* использовали мышиную кДНК размером 2,3 тыс. п. н. Такой размер позволяет использовать клон кДНК в качестве самостоятельного зонда для FISH. Удовлетворительный сигнал FISH получен на X хромосоме *M. agrestis*.

Результаты FISH изображены на идиограммах X хромосом полевок (рисунок). Районы X хромосом, содержащие пять генов (*Utx11*, *Crsp2*, *Sb1.8*, *Rab9* и *Eif4c*), у всех видов полевок группы *arvalis* и полевок *M. agrestis* сохраняют идентичный порядок генов на фоне очень схожего GTG-бэндинга, расположение же остальных 10 маркеров в различной степени отличается у всех видов. Это позволяет сделать предположение о локализации гена *Xel69* в X хромосомах полевок группы *arvalis*. Локализация гена *Xel69* установлена в районе Xp3.5 X хромосомы *M. agrestis*, где также картирован ген *Sb1.8*. Поскольку эти два гена у человека и мыши расположены в небольшом кластере размером около 370 тыс. н. и у всех пяти видов полевок район локализации *Sb1.8* выглядит неперестроен-



Цитогенетические карты эухроматиновых районов X хромосом пяти исследованных видов полевок: *M. rossiaemeridionalis* (а), *M. transcaspicus* (б), *M. kirgisorum* (в), *M. arvalis* (г) и *M. agrestis* (д). Слева обозначены районы локализации генов и справа — предполагаемые инверсии, разделяющие X хромосомы *M. arvalis* и остальных видов; * — центромера, inv — инверсии.

ным, вероятность совместной локализации генов *Xel69* и *Sbl.8* и в X хромосомах полевок группы *arvalis* достаточно высока. Анализ порядка расположения генов на X хромосомах полевок подтверждает выводы, основанные на большом количестве современных данных о том, что транспозиция центромер может проходить независимо от других внутрихромосомных перестроек [6]. У всех четырех видов полевок группы *arvalis* при различном положении центромер сохранены идентичные кластеры генов (*Utx1-Eif4c* и *Syb1-Spry3*), фланкирующие эухроматиновые районы X хромосомы.

Реорганизация X хромосом пяти видов полевок рода *Microtus*. При анализе возможных путей реорганизации X хромосомы полевок сделан выбор в пользу инверсионных перестроек, так как при делециях и последующих инсерциях хромосомных фрагментов необходимо большее число актов разрывов — воссоединений. Наряду с локализацией генных маркеров во внимание принимали изменение GTG-рисунка X хромосом.

В целом шесть различных инверсий, отличающих между собой X хромосомы видов полевок группы *arvalis*, выявлены в результате анализа локализации 15 генных маркеров. Семь кластеров консервативной синтении могут быть выделены в X хромосоме в пределах группы обыкновенных полевок: это кластеры генов *Utx1-Eif4c*, *Zfx*, *Xist-Pgk*, *Nap113*, *Gla*, *In1hst2-G6pd*, *Syb1-Spry3*, что (с учетом относительно небольшого эволюционного возраста группы — 0,5–0,6 млн лет) предполагает довольно высокую скорость реорганизации и закрепления перестроек на X хромосоме у представи-

телей ее видов. Анализ реорганизации X хромосом полевок группы *arvalis* с использованием в качестве аутгруппы хромосомы *M. agrestis* позволяет сделать вывод о том, что X хромосомы *M. kirgisorum* и *M. arvalis* могут быть в равной степени близки к предковой форме X хромосомы группы *arvalis*. От X хромосомы *M. agrestis* хромосомы *M. arvalis* и *M. kirgisorum* отделяют две или три независимые инверсии, минимум четыре инверсии отделяют от хромосомы *M. agrestis* X хромосомы *M. transcaspicus* и *M. rossiaemeridionalis*. Две из этих инверсий у *M. transcaspicus* и *M. rossiaemeridionalis* являются общими (рисунок). Следовательно, анализ реорганизации X хромосомы в группе *arvalis* подтверждает выводы, сделанные на основе других цитогенетических данных, об объединении *M. transcaspicus* и *M. rossiaemeridionalis* в общую эволюционную линию.

Участок локализации генов *Nap113* и *Gla* вовлечен в независимые инверсии, по-видимому, у всех исследованных видов. Возможно, за это ответственны «горячие точки» перестроек, локализованные, в частности, в кластерах повторенных последовательностей [3].

Анализ реорганизации X хромосом пяти исследованных видов полевок, а также ряда других видов мышевидных грызунов [7] выявил довольно распространенные у них перестройки в районе гена *Xist*. Мы полагаем, что такие преобразования либо не критичны для системы X инактивации, либо нарушения каким-то образом компенсируются у разных видов. Реорганизация X хромосом грызунов также может отражать более гомогенный профиль

інактивации их X хромосом (по типу мыши). С другой стороны, перестройки в районе гена *Xist* и в целом по X хромосоме могут быть причиной возникновения у особей специфических отличий, которые, в свою очередь, способствуют обособлению нового вида.

Работа поддержана грантом РФФИ 02-04-49321.

O. V. Anopriyenko, A. I. Shevchenko, N. A. Mazurok,
N. V. Rubtsova, S. M. Zakian

Localization of 10 genes in X chromosomes of five vole species of the genus *Microtus* (*Arvicolinae*, *Rodentia*)

Summary

The localization of ten new genes in X chromosomes of five vole species of the genus *Microtus* is presented. A particular feature of the genes chosen is their property to escape inactivation in the inactive X chromosome of human and, partially, of mice. On the basis of comparative analysis of gene locations in four vole species of the *arvalis* group (common vole), four new inversions were revealed and the borders of two inversions determined earlier were defined more precisely. Seven clusters of conservative synteny were delineated in the X chromosomes of common voles. A comparison between gene locations in voles of the *arvalis* group and a representative of the *agrestis* outgroup showed, that X chromosomes of *M. arvalis* and *M. kirgisorum* are the closest to the ancestral X chromosome of the *arvalis* group.

Key words: X chromosome, chromosome rearrangements, X inactivation, gene mapping, FISH.

O. B. Анопрієнко, А. І. Шевченко, Н. О. Мазурок,
Н. В. Рубцова, С. М. Закіян

Локалізація 10 генів на X хромосомах п'яти видів полівок роду *Microtus* (*Arvicolinae*, *Rodentia*)

Резюме

Визначено локалізацію 10 нових генів на X хромосомах п'яти видів сірих полівок роду *Microtus*. Особливістю вибраних генів є їхня властивість уникати інактивзації на інактивованій X

хромосомі людини і, частково, миші. На основі порівняльного аналізу локалізації генів на X хромосомах чотирьох видів полівок групи *arvalis* (звичайні полівки) виявлено чотири нові та уточнено межі двох відомих раніше інверсій. Знайдено сім кластерів консервативної синтенії в X хромосомах звичайних полівок. У результаті порівняння порядку генів у полівок групи *arvalis* і представника зовнішньої групи *agrestis* показано, що X хромосоми *M. arvalis* і *M. kirgisorum* є найближчими до предкової X хромосоми звичайних полівок.

Ключові слова: X хромосома, хромосомні перебудови, інактивация X хромосоми, картування, флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Distèche C. M., Filippova G. N., Tsuchiya K. D. Escape from X inactivation // *Cytogenet. Genome Res.*—2002.—99.—4.—P. 36—43.
2. Mazurok N. A., Rubtsova N. V., Isaenko A. A., Pavlova M. E., Slobodyanyuk S. Y., Nesterova T. B., Zakian S. M. Comparative chromosome and mitochondrial DNA analyses and phylogenetic relationships within common voles (*Microtus*, *Arvicolidae*) // *Chromosome Res.*—2001.—9.—P. 107—120.
3. Rubtsov N. B., Rubtsova N. V., Anopriyenko O. V., Karaymyshva T. V., Shevchenko A. I., Mazurok N. A., Nesterova T. B., Zakian S. M. Reorganization of the X chromosome in voles of the genus *Microtus* // *Cytogenet. Genome Res.*—2002.—99.—P. 323—329.
4. Nesterova T. B., Duthie S. M., Mazurok N. A., Isaenko A. A., Rubtsova N. V., Zakian S. M., Brockdorff N. Comparative mapping of X chromosomes in vole species of the genus *Microtus* // *Chromosome Res.*—1998.—6.—P. 41—48.
5. Pinkel D., Straume T., Gray J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—83.—P. 2934—2938.
6. Ventura M., Archidiacono N., Rocchi M. Centromere emergence in evolution // *Genome Res.*—2001.—11.—P. 595—599.
7. Kuroiwa A., Tsuchiya K., Watanabe T., Hishigaki H., Takahashi E., Namikawa T., Matsuda Y. Conservation of the rat X chromosome gene order in rodent species // *Chromosome Res.*—2001.—9.—P. 61—67.

УДК 575.852:575.116.4:576.316
Надійшла до редакції 20.12.04