На правах рукописи

Проскурякова Анастасия Андреевна

«ХРОМОСОМНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ В ОТРЯДЕ КИТОПАРНОКОПЫТНЫЕ (CETARTIODACTYLA, MAMMALIA)»

03.01.07 – молекулярная генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск 2019

Работа выполнена в лаборатории цитогенетики животных Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Научный руководитель: Графодатский Александр Сергеевич, доктор биологических наук, профессор генетики, заведующий лабораторией цитогенетики животных Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Оппоненты: Литвинов Юрий Нарциссович, доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук

Лухтанов Владимир Александрович, доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологического института Российской Академии Наук

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, г. Москва

Защита состоится: 11 декабря 2019 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д 003.074.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН (630090, Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 8/2, тел. (383)-373-02-49, e-mail: ovant@mcb.nsc.ru. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН https://www.mcb.nsc.ru/diss_council/autoref

Автореферат разослан «____» _____2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук О.В. Антоненко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В современную эру секвенирования актуальность приобрели геномные исследования, направленные на прочтение полногеномных последовательностей ДНК всех видов. Множество проектов нацелено на секвенирование геномов различных эукариот, включая 66 тысяч видов позвоночных, и сборок их геномов до хромосомного уровня.

В то же время одна проблема была и пока остается нерешенной на уровне молекулярной генетики и биоинформатики: данные подходы существенно ограничены в оценке количества и распределения повторенных последовательностей и в установлении положения центромер. Определение числа хромосом и их морфологии является важной информацией для всех видов, в особенности для тех, геномы которых подверглись полиплоидизации. Возможно, именно по этим причинам при изобилии данных секвенирования, собранными до уровня хромосом остаются геномы лишь нескольких десятков видов позвоночных. Последнее обстоятельство подчеркивает крайнюю важность детальных цитогенетических исследований для изучения организации, структуры и функционирования геномов позвоночных.

Цитогенетические исследования позволяют взглянуть на геном в целом: выявить число хромосом и описать их морфологию, показать присутствие или отсутствие добавочных хромосом, выявить локализацию повторенных последовательностей и половые хромосомы. При помощи метода флуоресцентной *in situ* гибридизации (Fluorescence *in situ* Hybridization, FISH) можно определять районы гомологии хромосом в геномах различных видов на основании сходства их последовательностей ДНК. Детальный анализ межхромосомных и внутрихромосомных перестроек, а также изменений в положении центромер обеспечивает основу для дальнейших геномных исследований – каркас для сборки геномов до хромосомного уровня. Карты районов гомологии позволяют точнее понять эволюцию кариотипов и филогенетические связи между видами животных, что в свою очередь необходимо для реконструкции и правки предковых кариотипов. Последнее очень важно, поскольку до сих пор остается неразрешенным вопрос о роли

хромосомных перестроек в эволюции геномов, их значимости и вкладе в фенотип.

Целью настоящей работы является изучение на хромосомном уровне геномов представителей отряда китопарнокопытные (Cetartiodactyla) и описание меж- и внутрихромосомных перестроек, произошедших в ходе эволюции. Основной задачей исследования является детальное сравнение геномов различных видов и таксонов более высокого ранга с использованием хромосомоспецифичных библиотек и BAC-клонов. Для этого были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести молекулярно-цитогенетический анализ хромосомных наборов и установить районы гомологии хромосом серого кита и овцебыка с хромосомами человека и одногорбого верблюда;
2. Провести сравнительный анализ порядка распределения BAC-клонов коровы на X-хромосомах представителей Cetartiodactyla для проверки гипотезы о консервативности X-хромосомы;
3. Охарактеризовать распределение повторенных последовательностей в кариотипах представителей отряда Cetartiodactyla;
4. Выявить внутрихромосомные перестройки и картировать точки эволюционных разрывов хромосом путем локализации BAC-клонов коровы на метафазных хромосомах жирафа и яванского оленька.

Научная новизна. В настоящем исследовании впервые получены хромосомные карты серого кита и овцебыка с использованием библиотек сортированных хромосом человека и одногорбого верблюда. Такие карты являются очень подробными, потому что содержат информацию о внутрихромосомных перестройках. С использованием BAC-проб коровы получены подробные карты хромосом жирафа, яванского оленька и X-хромосом представителей большинства ключевых семейств Cetartiodactyla. Подробное сравнение хромосом позволило предложить новую интерпретацию эволюции кариотипов Ruminantia: установить ориентацию консервативных сегментов, четкое положение центромер и порядок сегментов на хромосомах, что является надежной базой для дальнейших геномных исследований.

Положения, выносимые на защиту. Кариотипы серого кита (*Eschrichtius robustus*) и овцебыка (*Ovibos moschatus*) близки к предковым кариотипам Cetartiodactyla и Pecora, соответственно. Хромосомные наборы Cetacea обладают высокой степенью консерватизма, на что указывает идентичность карт районов гомологии хромосом двух ветвей китообразных (усатых и зубатых китов).

Х-хромосомы представителей базальных ветвей Cetartiodactyla (Suidae, Camelidae, Cetacea, Hippopotamidae), как и большинства млекопитающих из Boreoeutheria, в целом, консервативны и сохраняют предковое состояние синтенных блоков и положения центромеры.

В подотряде Ruminantia наблюдается высокая перестроенность Х-хромосом, вызванная инверсиями, изменениями положения центромеры и аутосомными транслокациями. Скорость фиксации перестроек в Х-хромосомах в ходе эволюции у Ruminantia сравнима со скоростью эволюции аутосом среди большинства отрядов млекопитающих.

Преобладающим типом перестроек при формировании предкового кариотипа Ruminantia являлись внутрихромосомные, а при формировании предкового кариотипа Pecora – межхромосомные. Образование предковых кариотипов Cetartiodactyla и Bovidae сопровождалось фиксацией внутрихромосомных перестроек.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы. Выявлены особенности строения и эволюции аутосом и половых хромосом представителей отряда Cetartidactyla. Построены подробные цитогенетические карты районов гомологии хромосом, что является основой для проведения дальнейших геномных исследований.

Описание процессов эволюции половых хромосом и кариотипов в целом позволяет понять, каким образом изменялись геномы на протяжении миллионов лет эволюции млекопитающих.

Описание процессов эволюции хромосом жвачных помогут понять механизмы возникновения признаков, важных для сельского хозяйства.

Степень достоверности и апробация результатов. Научные положения и выводы являются обоснованными. Полученные

результаты являются достоверными, что обеспеченно согласованностью с результатами, представленными в процитированной литературе. Материалы диссертационной работы были представлены на трех международных конференциях: «22-м Международном коллоквиуме по цитогенетике и геномике животных», Тулуза, Франция, 2016 г.; «23-м Международном коллоквиуме по цитогенетике и геномике животных», Санкт-Петербург, Россия; «Хромосома-2018», Новосибирск, Россия, 2018 г.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, содержащего 263 ссылки, и 4 приложений. Диссертация изложена на 144 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц и 20 рисунков.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 статей в зарубежных рецензируемых журналах, все из списка ВАК, и имеется 4 публикации в виде тезисов конференций.

Вклад автора. Автором выполнено культивирование первичных линий фибробластов, и получение суспензий хромосом для большей части изученных видов, вовлеченных в исследование, эксперименты по гибридизации *in situ*, идентификация хромосом при помощи GTG-бэндинга и анализ результатов. Работа с BAC-клонами и подготовка меченых зондов проводилась совместно с к.б.н. А. И. Кулемзиной. Биоинформатический анализ геномов был проведен исследовательской группой под руководством к.б.н. Д. М. Ларкина (Великобритания).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы включает пять разделов и заключение. Подробно описана информация о кариотипах млекопитающих, их эволюции и механизмах, лежащих в ее основе. Большая часть обзора литературы посвящена отряду Cetartiodactyla – общим сведениям, его положению на филогенетическом древе, положению семейств внутри отряда (Рисунок 1), особенностям эволюции кариотипов и, в частности, половых хромосом.

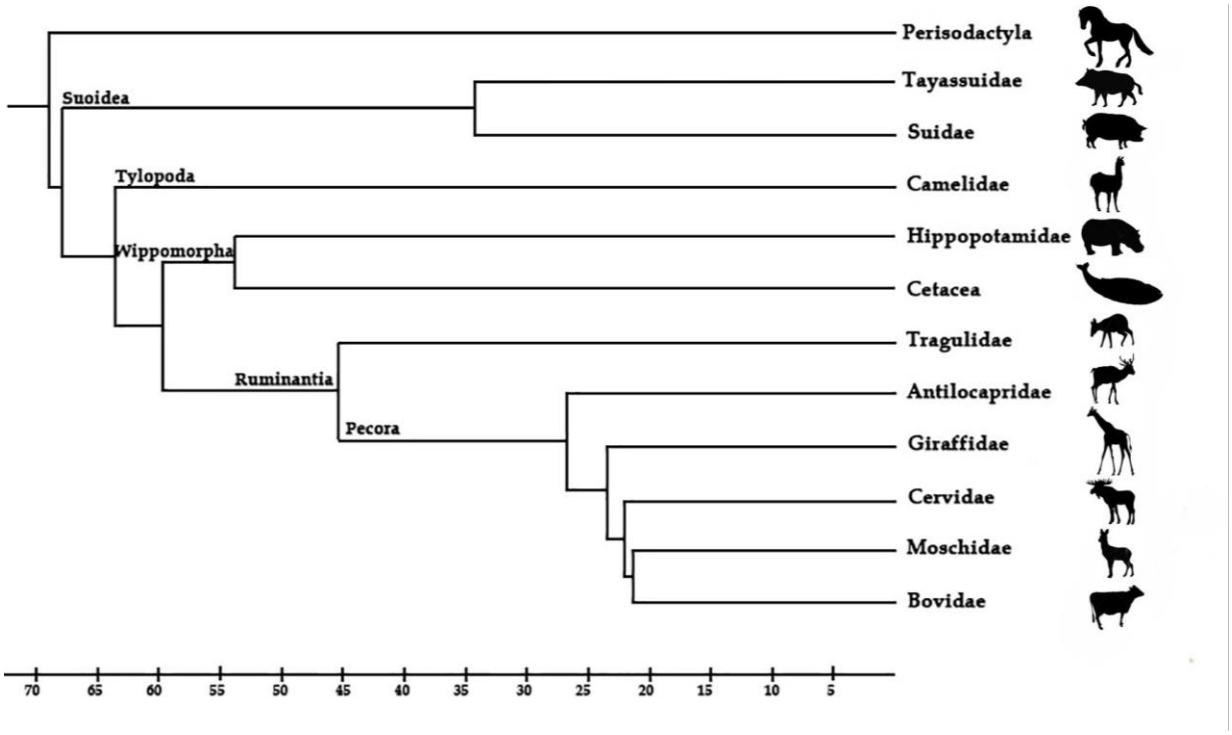

Рисунок 1. Филогенетическое древо Cetartiodactyla с Perissodactyla в качестве внешней группы [Zurano et al., 2019].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры клеток, использованные в исследовании. В работе были использованы фиксированные суспензии метафазных хромосом животных. Источником первичных культур фибробластов является коллекция культур клеток общебиологического назначения на базе отдела эволюции и разнообразия геномов ИМКБ СО РАН (№0310-2016-0002).

Виды животных, вовлеченных в исследование. В данном исследовании были использованы культуры клеток и суспензии метафазных хромосом видов из следующих семейств: Suidae (свиньи) – домашней свиньи (*Sus strofa*); Cetacea (китообразные) – серого кита (*Eschrihtius robustus*), обыкновенной гринды (*Globicephala melas*); Camelidae (верблюдовые) – альпаки (*Lama pacos*); Hippopotamidae (бегемотовые) – бегемота (*Hippopotamus amphibius*); Tragulidae (оленьковые) – яванского оленька (*Tragulus javanicus*); Antilocapridae (вилороговые) – вилорога (*Antilocapra americana*); Giraffidae (жирафовые) – жирафа (*Giraffa camelopardalis*); Moschidae (кабарговые) – сибирской кабарги (*Moschus moschiferus*); Cervidae (оленевые) – лося (*Alces alces*), лани (*Dama dama*), сибирской косули (*Capreolus pygargus*); Bovidae (полорогие) – домашней овцы (*Ovis aries*), домашней козы (*Capra hircus*), овцебыка (*Ovibos moschatus*), черной

антилопы (*Hippotragus niger*), обыкновенного дикдика (*Madoqua kirkii*), бизона (*Bison bison*), коровы (*Bos taurus*), гаура (*Bos gaurus*), нильгау (*Boselaphus tragocamelus*), саолы (*Pseudoryx nghetinhensis*).

Дифференциальные окраски хромосом. GTG-бэндинг проводили по методике Сибрайт [Seabright, 1971], модифицированной Графодатским и Раджабли (1988), выявление гетерохроматина проводили по методике Лемской Н.А. [Lemskaya et al., 2018].

ДНК-библиотеки сортированных хромосом человека и одногорбого верблюда предоставлены группой ветеринарной цитогенетики Кембриджского университета (Великобритания).

Клоны BAC библиотеки коровы CHORI-240 были предоставлены А. В. Кукековой (США).

Флуоресцентная *in situ* гибридизация. Эксперименты проводили на дифференциально окрашенных метафазных хромосомах по методу, описанному ранее [Yang et al., 1999; F. Yang, A. S. Graphodatsky, 2017], с некоторыми модификациями.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Хромосомный пэйнтинг представителей отряда Cetartiodactyla

Сравнительный хромосомный пэйнтинг с использованием хромосомоспецифичных библиотек человека и одногорбого верблюда выполнен для двух представителей отряда: серого кита (*Eschrichtius robustus*) и овцебыка (*Ovibos moschatus*). На рисунке 2 представлены результаты экспериментов. Также кариотипы исследованы на предмет локализации теломерных повторов и ядрышкообразующих районов и проведено окрашивание на гетерохроматин.

Кариотип серого кита. Cetacea содержат две филогенетические ветви: усатые (Mysticeti) и зубатые (Odontoceti) киты. Ранее кариотипы китообразных были подробно изучены методами классической цитогенетики и выдвинута гипотеза о высоком консерватизме их кариотипов [Arnason, 1974]. Позже с помощью локализации хромосомоспецифичных библиотек, были изучены кариотипы трех представителей ветви зубатых китов [Bielec et al., 1998, Kulemzina et al., 2009, Nie et al., 2012]. Серый

кит является представителем усатых китов, ранее не изученных хромосомным пэйнтингом. Полученная карта районов гомологии хромосом серого кита была идентична сравнительной карте обыкновенной гринды [Kulemzina et al., 2009]. Кариотипы китообразных близки к предполагаемому предковому кариотипу китопарнокопытных. Нами впервые проанализирован хромосомный набор представителя усатых китов. Полученные результаты подтверждают гипотезу о консервативности кариотипов Cetacea и других водных млекопитающих [Murphy, Stanyon, O'Brien, 2001] на уровне физических карт хромосом, построенных по результатам сравнительного хромосомного пэйнтинга.

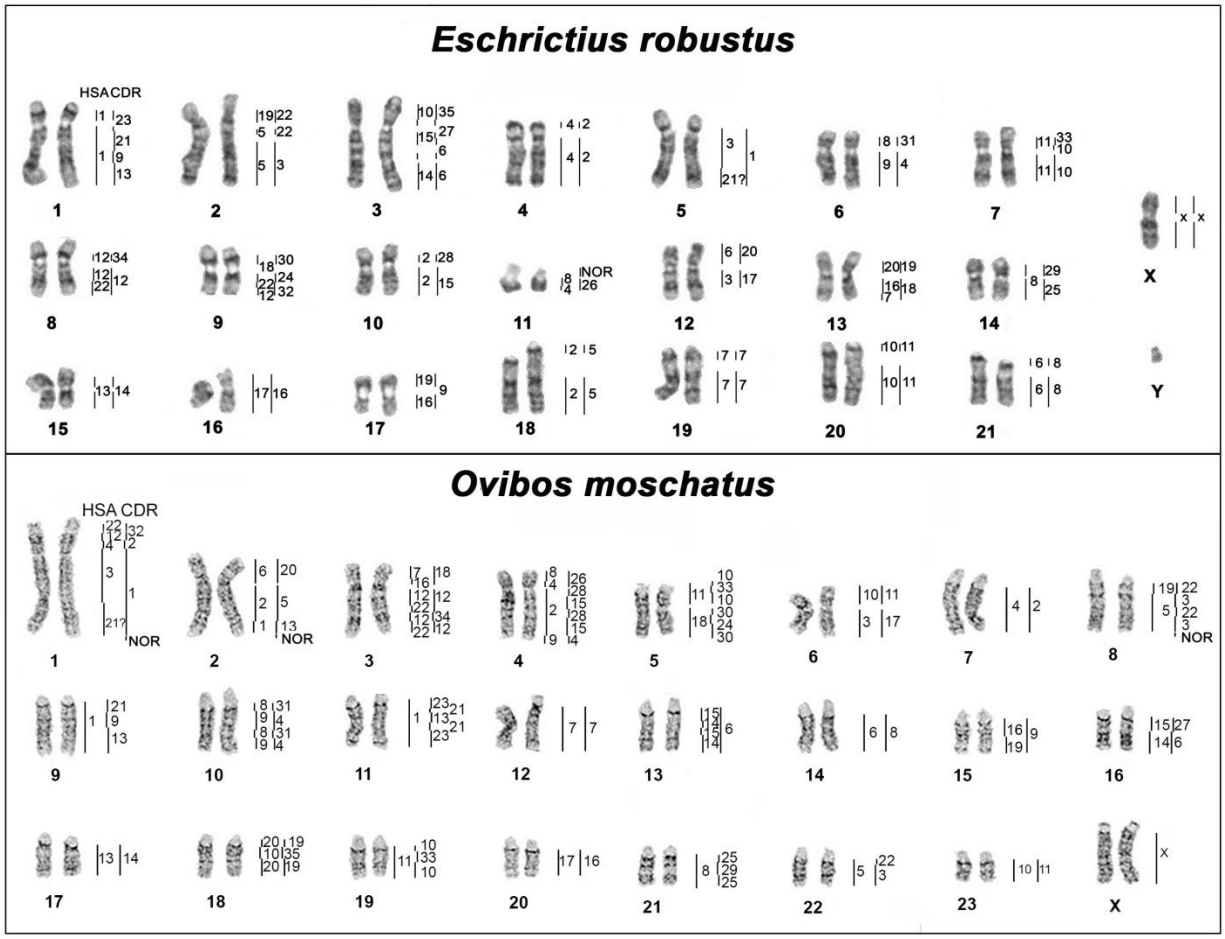

Рисунок 2. Карта районов гомологии хромосом серого кита (*Eschrichtius robustus*) и овцебыка (*Ovibos moschatus*) с хромосомами человека (HSA) и одногорбого верблюда (CDR). NOR –локализация ядрышкового организатора. Промежутки на карте соответствуют гетерохроматиновым блокам.

Кариотип овцебыка. Кариотип овцебыка является довольно типичным для представителей семейства Bovidae: он состоит из небольших акроцентрических хромосом, часть которых слилась с

образованием крупных субметацентрических хромосом. Анализ сравнительных хромосомных карт показал, что кариотип овцебыка близок предковому кариотипу Pecora [Kulemzina et al., 2014], тогда как у остальных представителей Bovidae наблюдаются специфичные инверсии. Субметацентрические аутосомы овцебыка образованы за счет слияния предковых элементов.

2. Выявление точек эволюционных разрывов хромосом у Ruminantia

Локализация библиотек BAC-клонов на хромосомах яванского оленька (*Tragulus javanicus*) и жирафа (*Giraffa camelopardalis*). Роль хромосомных перестроек в эволюции является фундаментальным вопросом биологии. Геномные исследования позволили выявить гомологичные синтенные блоки (Homologous synteny blocks, HSB), участки, остающиеся неизменными в течение эволюции, и точки эволюционных разрывов хромосом (evolutionary breakpoint regions, EBR) – участки, фланкирующие HSB. Для исследования и выявления границ HSB и анализа EBR у Ruminantia с целью реконструкции предковых кариотипов в линии Cetartiodactyla, ведущей к Bovidae, было отобрано 202 BAC-клона коровы из библиотеки CHRI-240. Для экспериментов по локализации BAC-клонов были выбраны несколько представителей Ruminantia: яванский оленек, жираф и корова. Яванский оленек является представителем базальной линии Ruminantia – Tragulina. Анализ хромосом и расширение данных по сравнительной геномике этого вида позволили определить перестройки, характерные для всей линии Ruminantia, и отделить их от перестроек, произошедших у Tragulina и Pecora. В линии Pecora BAC-клоны были локализованы на хромосомах жирафа и коровы. Данные по локализации BAC-клонов помогли установить ориентацию консервативных сегментов в геномах изученных видов и детализировать хромосомные карты, полученные ранее [Kulemzina et al., 2009; Kulemzina et al., 2011; Cernohorska et al., 2013]. Результаты представлены на рисунке 3.

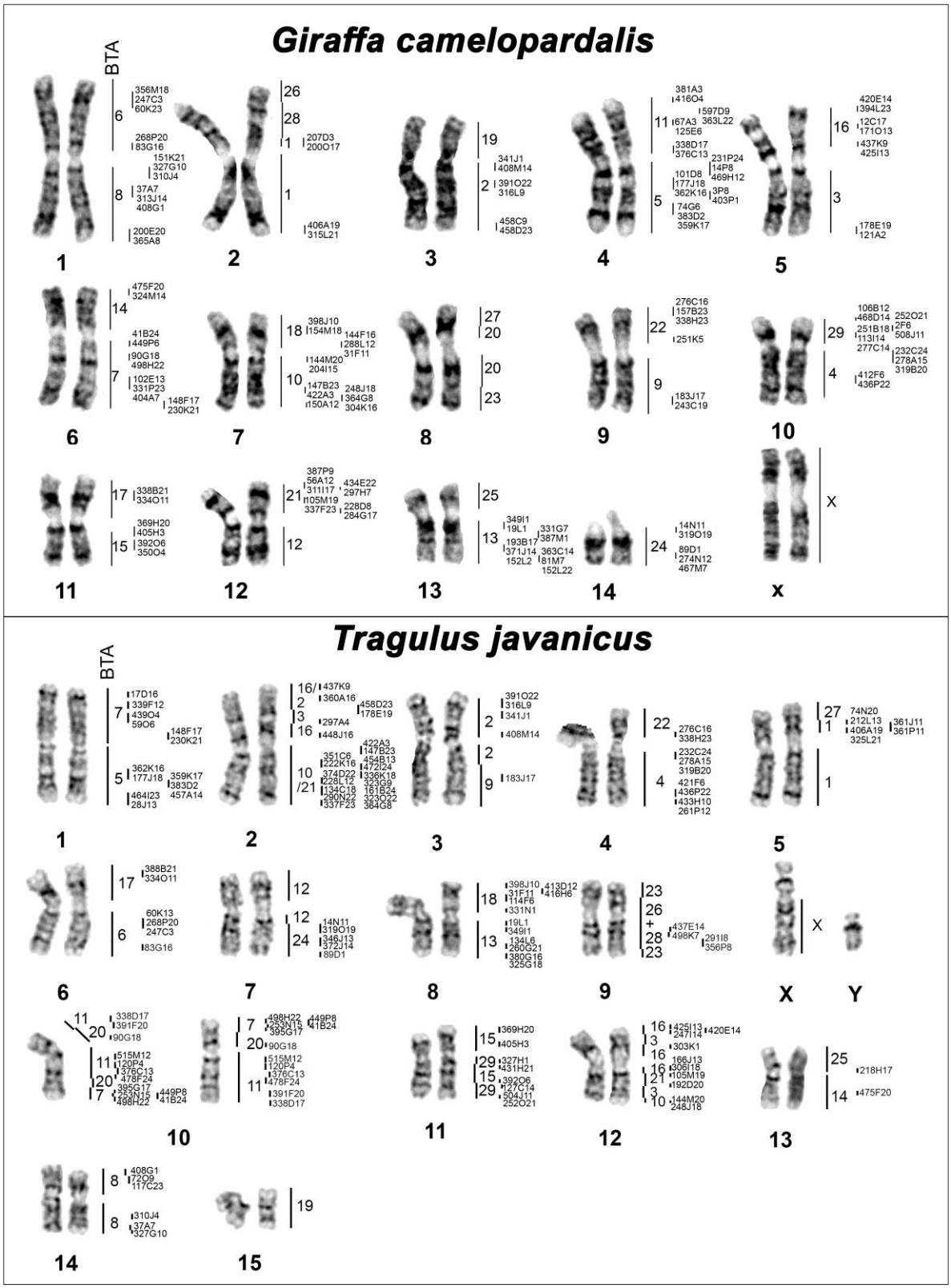

Рисунок 3. Карты районов гомологии хромосом жирафа (*Giraffa camelopardalus*) (вверху), яванского оленька (*Tragulus javanicus*) (внизу) и коровы (BTA, *Bos taurus*). Справа указаны места локализации BAC-клонов коровы из библиотеки CHORI-240.

Реконструкция предковых кариотипов Cetartiodactyla, Ruminantia, Pecora и Bovidae. Ранее были опубликованы данные

о структуре предковых кариотипов (ПК) Bovidae [Slate et al., 2002], Pecora [Kulemzina et al., 2014], Ruminantia [Kulemzina et al., 2011] и Cetartiodatyla [Kulemzina et al., 2009], полученные на основании сравнительного хромосомного пэйнтинга. Из-за особенностей подхода, состоявшего в локализации хромосомоспецифичных проб, информация о предковых кариотипах не содержала информации о точках разрывов хромосом и ориентации консервативных сегментов. Совокупность карт локализации BAC-клонов в комплексе с данными, полученными с помощью биоинформатического алгоритма DESCHRAMBLER [Kim et al., 2017], и анализа геномов 19 видов млекопитающих позволила провести более точные реконструкции предковых кариотипов китопарнокопытных (Рисунок 4).

Таким образом, были выявлены HSB и проведена реконструкция предковых фрагментов хромосом. Полученные данные, в среднем, хорошо согласуются с литературными, однако, были выявлены и расхождения, которые позволили внести уточнения в структуры предковых кариотипов отдельных таксонов. Было показано, что ПК Ruminantia после отделения от других Cetartiodactyla подвергся преимущественно внутрихромосомным, а ПК Pecora - межхромосомным перестройкам. Согласно литературным данным произошли только четыре крупные межхромосомные перестройки, сформировавшие ПК Ruminantia из ПК Cetartiodactyla [Kulemzina et al., 2014], тогда как 15 межхромосомных престроек (12 разрывов и три транслокации) сформировали ПК Pecora. Нами впервые показано, что ПК Ruminantia и Pecora образовались в результате 14 и 11 инверсий, соответственно.

Ранее предполагалось, что в эволюции кариотипов млекопитающих количество внутрихромосомных перестроек остается недоучтенным [Ferguson-Smith, Trifonov, 2007]. В значительной мере это подтверждается результатами нашего исследования. На это указывает высокий уровень накопления и фиксации внутрихромосомных перестроек в линии, ведущей к предку Ruminantia, и небольшим преобладанием количества выявленных внутрихромосомных перестроек над межхромосомными в линии, ведущей к предку Pecora.

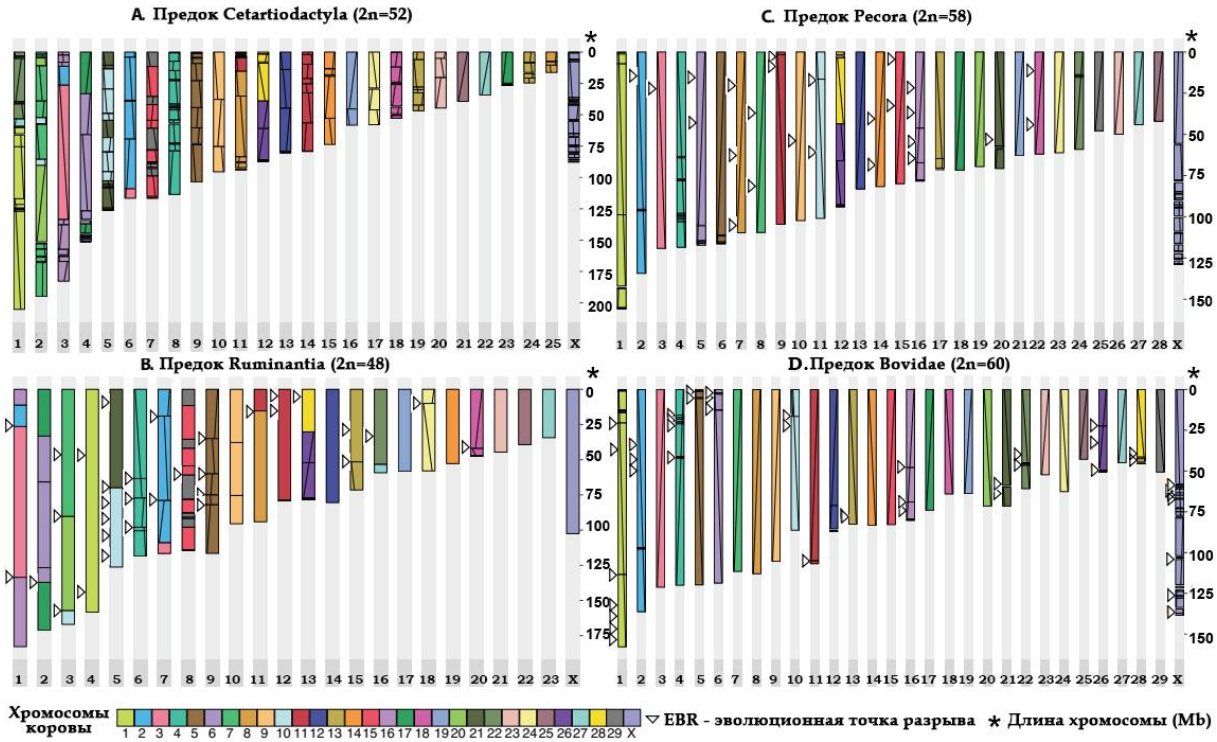

Рисунок 4. Идиограммы предковых кариотипов Cetartiodactyla (A), Ruminantia (B), Pecora (C), Bovidae (D) с гомологиями хромосом коровы. Вертикальные линии внутри каждой хромосомы разграничивают гомологичные синтенные блоки, тогда как диагональные линии указывают их ориентацию по сравнению с геномом коровы. Стрелками указаны области различных типов точек эволюционных разрывов (EBR). Mb – миллионы пар нуклеотидов.

3. Эволюция X-хромосомы в отряде Cetartiodactyla

Для изучения изменения морфологии X-хромосомы Cetartiodactyla были отобраны 23 специфичных BAC-клона коровы из библиотеки CHORI-240. Пробы были локализованы методом FISH на метафазных хромосомах представителей отряда из основных семейств: домашняя свинья (Suidae, Suoidea), альпака (Camelidae), серый кит и обыкновенная гринда (Cetacea), гиппопотам (Hippopotamidae), яванский оленек (Tragulidae), сибирская кабарга (Moschidae), жираф (Giraffidae), вилорог (Antilocapridae). Для изучения эволюции X-хромосомы внутри крупных семейств были отобраны по несколько представителей из каждого: лось, сибирская косуля, лань, олень Давида (Cervidae) и корова, бизон, гаур, саола, нильгаи, черная антилопа, антилопа дикдик, коза, овцебык (Bovidae). Локализация BAC-клонов выявила 3 основных синтенных блока X-хромосомы (СБХ) – СБХ1 (13 BAC- клонов), СБХ2 (7 BAC-клонов), СБХ3 (6 BAC-клонов), и установить порядок сегментов внутри них (Таблица 1).

Путем сравнительного анализа порядка BAC-клонов на Х-хромосомах 23 представителей отряда были выявлены три основных особенности, характерные для эволюции Х-хромосом Cetartiodactyla:

1. Консервативность. У пяти представителей базальных ветвей отряда (серый кит, обыкновенная гринда, гиппопотам, альпака и свинья) сохранилась морфология и внутренняя структура Х-хромосомы: порядок BAC-клонов и положение центромеры в СБХ1 были идентичны.

Таблица 1. Порядок BAC-клонов коровы из библиотеки CHORI-240 на Х-хромосомах представителей отряда Cetartiodatyla. Цвета ячеек соответствуют синтенным блокам: СБХ1 (розовый), СБХ2 (голубой), СБХ3 (желтый)

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	66H2	66H2	108D16	386M8	93K24	514O22	514O22	66H2	66H2
2	155A13	155A13	54D24	103E10	122N13	287O21	287O21	155A13	155A13
3	90L14	90L14	93K24	229I15	195J23	128C9	128C9	90L14	90L14
4	373L23	373L23	122N13	106A3	316D2	106A3	106A3	373L23	373L23
5	62M10	62M10	195J23	128C9	386M8	229I15	229I15	62M10	62M10
6	122P17	122P17	316D2	287O21	103E10	103E10	103E10	122P17	122P17
7	252G15	252G15	514O22	514O22	229I15	386M8	386M8	252G15	252G15
8	375C5	375C5	287O21	316D2	106A3	108D16	108D16	375C5	375C5
9	130I15	130I15	128C9	195J23	229I15	54D24	54D24	130I15	130I15
10	118P13	118P13	106A3	122N13	287O21	93K24	93K24 108D16	118P13	118P13
11	25P8	25P8	229I15	93K24	514O22	122N13	122N13	25P8	25P8
12	14O10	14O10	103E10	54D24	54D24	195J23	195J23	14O10	14O10
13	214A3	214A3	386M8	108D16	108D16	316D2	316D2	214A3	214A3
14	108D16	316D2	214A2	214A3	214A3	214A3	214A3	386M8	386M8
15	54D24	195J23	14O9	14O10	14O10	14O10	14O10	103E10	103E10
16	93K24	122N13	25P7	25P8	25P8	25P8	25P8	128C9	229I15
17	122N13	93K24	118P12	118P13	118P13	118P13	118P13	106A3	106A3
18	195J23	54D24	130I14	130I15	130I15	130I15	130I15	229I15	128C9
19	316D2	514O22	375C4	375C5	375C5	375C5	375C5	287O21	287O21
20	514O22	287O21	252G14	252G15	252G15	252G15	252G15	514O22	514O22
21	287O21	128C9	122P16	122P17	122P17	122P17	122P17	316D2	316D2
22	128C9?	106A3	62M9	62M10	62M10	62M10	62M10	195J23	195J23
23	106A3	229I15	373L22	373L23	373L23	373L23	373L23	122N13	122N13
24	229I15	108D16	90L13	90L14	90L14	90L14	90L14	93K24	93K24
25	103E10	103E10	155A12	155A13	155A13	155A13	155A13	54D24	54D24
26	386M8	386M8	66H1	66H2	66H2	66H2	66H2	108D16	108D16

Соответствие столбцов: 1 – свинья, альпака, серый кит, обыкновенная гринда, гиппопотам; 2 - яванский оленек; 3 – вилорог; 4 – жираф, сибирская косуля, лось; 5 – лань; 6 - олень Давида, корова, бизон, гаур, нильгау; 7 – саола; 8 – овцебык, коза, овца; 9 - черная антилопа, антилопа дикдик.

2. Центромерный сдвиг. В эволюции Х-хромосомы наблюдалось изменения положения центромеры при сохранении порядка BAC-клонов. Это событие происходило при

формировании предковых X-хромосом Ruminantia, Antilopinae и Cervinae. По-видимому, центромерные сдвиги были одним из определяющих факторов эволюции X-хромосомы Cetartiodactyla.

3. Инверсии. Анализ порядка BAC-клонов позволил выявить три основных типа инверсий, имевших место в эволюции X-хромосом представителей отряда: (А) инверсия синтенного блока; (Б) инверсия внутри синтенного блока; (В) инверсия с разрывом синтенного блока.

Реконструкция предковых X-хромосом. С использованием флуоресцентной *in situ* гибридизации, анализа в LiftOver (UCSC Gemome browser) порядка BAC-клонов в геномах различных видов (человека, лошади, козы, мыши, крысы) и литературных данных [Murphy et al., 2007] был исследован феномен консервативности X-хромосомы в четырех надотрядах: Laurasiatheria, Euarchontoglires, Afrotheria и Xenarthra. В предковом состоянии X-хромосома эутерий была субметацентрической, и центромера, располагалась в СБХ1.

Биоинформатический анализ показал изменения порядка BAC-клонов на X-хромосомах человека и лошади в СБХ1. Предположительно, обнаруженная инверсия произошла у предка Cetartiodactyla и закрепилась в ходе эволюции. Мы подтвердили консервативность X-хромосомы в базальных ветвях Cetartiodactyla: Suoidea, Tylopoda, Cetacea и Hippopotamidae. По сравнению с консервативной X-хромосомой базальных групп Cetartiodactyla были найдены множественные перестройки, произошедшие в течение эволюции у Ruminantia. Вероятно, у предка жвачных произошел центромерный сдвиг, приведший к изменению морфологии X-хромосомы от субметацентрика к метацентрику (Рисунок 5). BAC-клоны, выявляющие границы трех консервативных сегментов, очерчивают области частых перестроек X-хромосом у Cetartiodactyla, что указывает на наличие EBR [Pevzner, Tesler, 2003]. Несколько BAC-клонов выявляют границы внутрихромосомных перестроек, где инверсии происходили, по меньшей мере, дважды, что указывает на феномен прохождения перестроек в одних и тех же EBR. На основе анализа сравнительных карт X-хромосомы 23 видов Cetartiodactyla было установлено, что, по меньшей мере, произошло девять парацентрических, две перицентрические инверсии и шесть центромерных сдвигов.

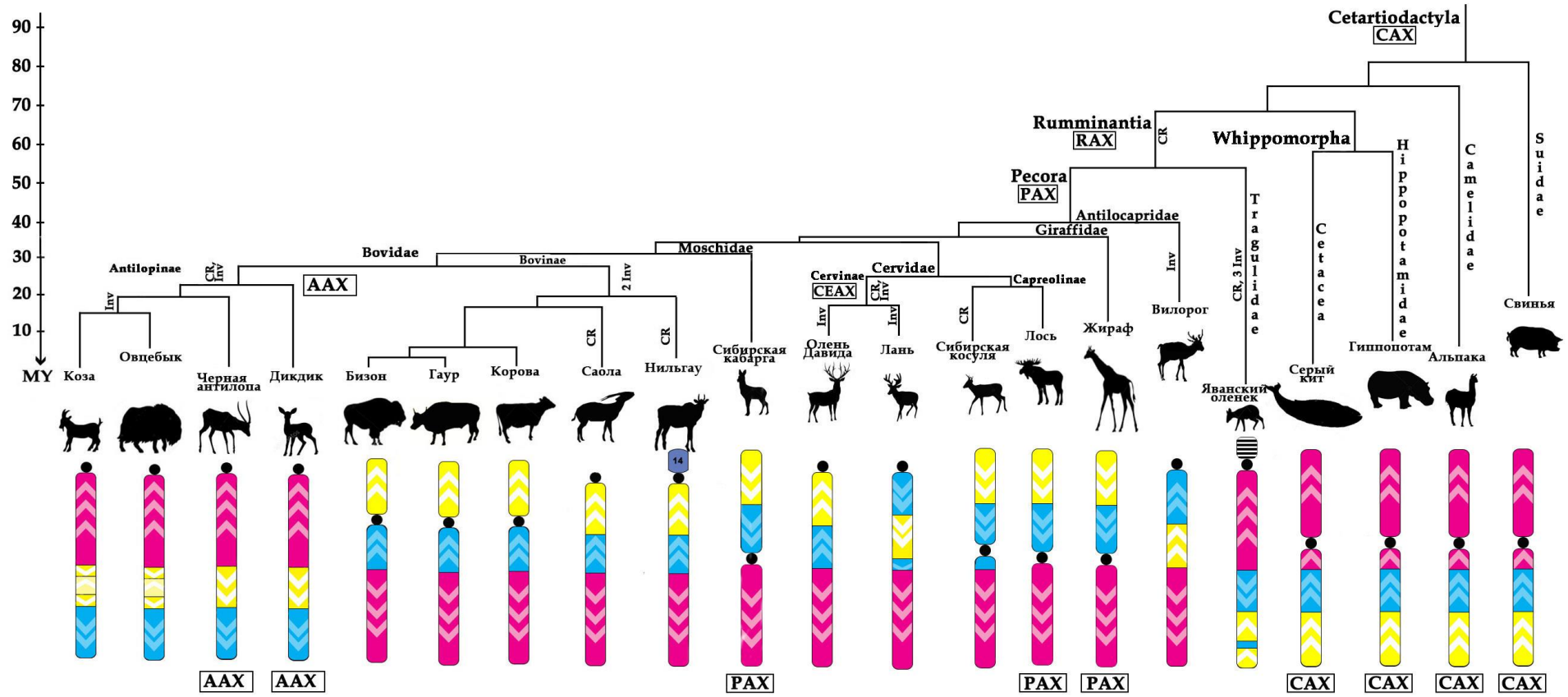

Рисунок 5. Филогенетическое древо, построенное на основании исследования [Hassanin et al., 2012] со схематическим изображением Х-хромосом представителей отряда. Розовым (СБХ1), желтым (СБХ2) и голубым (СБХ3) выделены консервативные блоки, а стрелками их направления. Черными кругами указаны центромеры. Сегменты, окрашенные полосками, являются гомологичными локализации рДНК. Центромеры обозначены черными кружками. Inv – инверсии, CR- центромерный сдвиг. Предковые ассоциации показаны в черных рамочках: Cetartiodactyla ancestral X (CAX), Ruminantia ancestral X (RAX), Pecora ancestral X (PAX), Antilopinae ancestral X (AAX), Cervinae ancestral X (CEAX).

Предковая X-хромосома Cetartiodactyla отличается от предковой X-хромосомы эутерий только одной небольшой инверсией. Одно дополнительное изменение положения центромеры произошло при формировании предковой X-хромосомы Ruminantia. Большинство других выявленных перестроек произошло в течение оставшихся 55 миллионов лет радиации Ruminantia. X-хромосома коровы была образована, по крайней мере, двумя перестройками, которые отличают ее от предковой X-хромосомы Pecora, что соответствует скорости перестроек приблизительно 1 на 15 миллионов лет. Это сравнимо со скоростью, определенной в качестве средней для эволюции аутосом большинства отрядов млекопитающих [Murphy, Stanyon, O'Brien, 2001]

ВЫВОДЫ

1. С помощью сравнительного хромосомного пэйнтинга впервые построены сравнительные карты хромосом человека, одногорбого верблюда и представителей отряда Cetartiodactyla: серого кита (*Eschrichtius robustus*) и овцебыка (*Ovibos moschatus*). Показано, что их кариотипы близки к предковым кариотипам Cetartiodactyla и Pecora, соответственно. Хромосомные наборы Cetacea обладают высокой степенью консерватизма, на что указывает идентичность карт районов гомологии хромосом двух ветвей китообразных – усатых и зубатых китов.
2. С помощью локализации BAC-клонов коровы внесены уточнения в сравнительные карты хромосом жирафа (*Giraffa camelopardalis*) и яванского оленька (*Tragulus javanicus*). Реконструкции предковых кариотипов Cetartiodactyla, Ruminantia, Pecora и Bovidae дополнены информацией о порядке и ориентации консервативных блоков на основании данных о выявленных внутрихромосомных перестройках. Установлено, что предковый кариотип Ruminantia в основном сформирован за счет внутрихромосомных перестроек, тогда как предковый кариотип Pecora – за счет межхромосомных перестроек.
3. Локализация BAC-клонов и биоинформатический анализ показали консервативность X-хромосомы у представителей базальных семейств Cetartiodactyla (Suidae, Camelidae,

Cetacea, Hippopotamidae) и млекопитающих из отрядов Primates, Perissodactyla, Carnivora. X-хромосомы большинства отрядов Boreoeutheria имеют одинаковую морфологию, положение центромеры и, в целом, одинаковый порядок консервативных сегментов.

4. X-хромосомы представителей Ruminantia не являются консервативными. Вариабельность морфологии гоносомы внутри подотряда вызвана инверсиями, изменениями положения центромеры, аутосомными транслокациями, амплификациями или переносами повторенных элементов. Темпы эволюции X-хромосомы у Ruminantia сравнимы с таковыми для аутосом у большинства отрядов млекопитающих и составляют одну перестройку на 15 миллионов лет.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Farré M., Li Q., Darolti I., Zhou Y., Damas J., **Proskuryakova A.A.**, Kulemzina A.I., Chemnick L.G., Kim J., Ryder O.A., Ma J., Graphodatsky A.S., Zhang G., Larkin D.M., Lewin H.A. An integrated chromosome-scale genome assembly of the Masai giraffe (*Giraffa camelopardalis tippelskirchi*).// GigaScience. V. 8. № 8.
2. Farré M., Kim J., **Proskuryakova A.A.**, Zhang Y., Kulemzina A.I., Li Q., Zhou Y., Xiong Y., Johnson J.L., Perelman P., Johnson W.E., Warren W.C., Kukekova A.V., Zhang G., O'Brien S.J., Ryder O.A., Graphodatsky A.S., Ma J., Lewin H.A., Larkin D.M. Evolution of gene regulation in ruminants differs between evolutionary breakpoint regions and homologous synteny blocks. // Genome Res. 2019. V. 29. № 4. P. 576-589.
3. **Proskuryakova A.A.**, Kulemzina A.I., Perelman P.L., Makunin A.I., Lemskaya N.A., Beklemisheva V.R., Larkin D.M., Farre M., Kukekova A.V., Ryder O.A., O’Brien S.J., Graphodatsky A.S. Evolution of X chromosome in the order Cetartiodactyla // Материалы международной конференции "Хромосома 2018". Новосибирск, 2018. С. 63.
4. **Proskuryakova A.A.**, Kulemzina A.I., Perelman P.L., Serdukova N.A., Ryder O.A., Graphodatsky A.S. The case of X and Y localization of nucleolus organizer regions (NORs) in *Tragulus*

javanicus (Cetartiodactyla, Mammalia). // Genes. 2018. V. 9. № 6. P. 312.

5. **Proskuryakova A.A.**, Kulemzina A.I., Perelman P.L., Makunin A.I., Lemskaya N.A., Beklemisheva V.R., Larkin D.M., Farre M., Kukekova A.V., Ryder O.A., O'Brien S.J., Graphodatsky A.S. X chromosome evolution in Cetartiodactyla // 23rd International Colloquium on Animal Cytogenetics and Genomics, SaintPetersburg, Russia. 9-12 June, 2018. P.24.
6. **Proskuryakova A.A.**, Kulemzina A.I., Perelman P.L., Makunin A.I., Larkin D.M., Farré M., Kukekova A.V., Johnson J.L., Lemskaya N.A., Beklemisheva V.R., Roelke-Parker M.E., Bellizzi J., Ryder O.A., O'Brien S.J., Graphodatsky A.S. X chromosome evolution in Cetartiodactyla // Genes. 2017. V. 8. № 9. P. 216.
7. Kulemzina A.I., **Proskuryakova A.A.**, Beklemisheva V.R., Lemskaya N.A., Perelman P.L., Graphodatsky A.S. Comparative chromosome map and heterochromatin features of the gray whale karyotype (Cetacea) // Cytogenet Genome Res. 2016. V.148. P. 25-34.
8. **Proskuryakova A.A.**, Kulemzina A.I., Beklemisheva V.R., Lemskaya N.A., Perelman P.L., Graphodatsky A.S. Chromosome organization features of the grey whale (Cetacea) // 22nd International Colloquium on Animal Cytogenetics and Genomics, 2–5 July 2016, Toulouse – France. C. 28.
9. Makunin A.I., Kichigin I.G., Larkin D.M., O'Brien P.C.M., Ferguson-Smith M.A., Yang F., **Proskuryakova A.A.**, Vorobieva N.V., Chernyaeva E.N., O'Brien S.J., Graphodatsky A.S., Trifonov V.A. Contrasting origin of B chromosomes in two cervids (Siberian roe deer and grey brocket deer) unravelled by chromosomespecific DNA sequencing // BMC Genomics. 2016. V.17. P.618.
10. **Проскурякова А. А.** Хромосомная организация генома серого кита (*Eschrichtius robustus*) // Международная научная студенческая конференция МНСК-2015. Новосибирск, 11-17 апреля 2015 г. С. 123.

Разные этапы работы были поддержаны грантами РФФИ и РНФ (№17-00-00146 и № 16-14-10009).