РАЗРАБОТКА МЕТОДА ИДЕНТИФИКАЦИИ *IN SILICO* МЕЙОТИЧЕСКОЙ ДНК

Гришаева Т.М., Дадашев С.Я., Богданов Ю.Ф.

Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, г.Москва

Разработан метод поиска in silico в геномах млекопитающих специфических повторяющихся последовательностей (ПП) ДНК, связанных с синаптонемным комплексом (мей-ДНК). Изучено распределение этих ПП по хромосомам, выявлено их низкое представительство на Y-хромосоме, показано уменьшение частоты рекомбинации в местах преимущественной локализации мей-ДНК. Полученные данные обсуждаются в связи с моделью петельной организации хроматина в мейозе при формировании синаптонемного комплекса.

У представителей всех таксонов эукариот в мейозе формируется синаптонемный комплекс (СК) – специфическая белковая структура, обеспечивающая синапсис гомологичных хромосом, прохождение рекомбинации и правильное расхождение партнеров к полюсам в первом делении мейоза. Экспериментально выделены и изучены короткие (300-1000 т.п.н.) специфические последовательности ДНК, находящиеся в тесной связи с СК, – SCAR DNA. Эти последовательности обладают рядом характерных признаков, что позволяет выделить их в специальное семейство [1-3]. Однако этих последовательностей недостаточно, чтобы обеспечить прикрепление петель хроматина к боковым элементам СК, если следовать гипотезе о петельной организации мейотического хроматина. Мы поставили задачу разработать способ поиска специфической мейотической ДНК (мей-ДНК), выполняющей эту функцию, а также найти и охарактеризовать эти последовательности в геноме человека. Предполагается, что петли хроматина прикрепляются к СК посредством ДНК-белкового взаимодействия. Так как взаимодействие должно быть однородным по длине хромосомы, мы ожидали, что соответствующие последовательности ДНК будут повторяющимися. Кроме того, известно, что Y-хромосома практически не принимает участия в синапсисе и рекомбинации в мейозе у млекопитающих. СК между X- и Y-хромосомами у человека формируется на очень небольшом участке, составляющем для Y-хромосомы не более 10%. Поэтому мы предполагали, что мей-ДНК будет представлена множеством копий на всех хромосомах, кроме Y.

В работе были использованы базы данных GENBANK (www.ncbi.nlm.nih.gov/) и Human Genome Resources database (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/). Поиск гомологичных повторяющихся последовательностей (ПП) вели с помощью программы NCBI BLAST для генома мыши и человека (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Фрагмент генома разбивали на участки размером 6 т.п.н. и исследовали с шагом 5 т.п.н. Условия поиска: Megablast – отключен, Expect – 10, Filter – by default, Descriptions – 10000, Alignments – 0. В результате поиска было выявлено несколько классов ПП. Детали их исследования описаны ниже. Если количество копий в каком-либо классе превышало 268, определяли содержание этих последовательностей на Y-хромосоме. Статистический анализ данных и построение графиков выполняли с помощью пакета STATISTICA v.6 program (StatSoft, Inc, 2001) (STATISTICA data analysis software system, version 6: www.statsoft.com).

Программа NCBI BLAST ищет последовательности, гомологичные заданной, и локализует их на хромосоме. Метод поиска мейотической ДНК отрабатывали с помощью этой программы на нескольких семействах ДНК, определяющих структуру хроматина и аннотированных в GENBANK как: 1) ДНК золотистого хомячка и крысы, тесно ассоциированная с СК (SCAR DNA) [1-3], 2) последовательности ДНК мыши, ассоциированные с ядерной ламиной (Lamina DNA) [4], 3) последовательности ДНК

сердцевины розеткоподобных структур интерфазного хроматина мыши (CRLS DNA) [5] и 4) последовательности ДНК курицы, ассоциированные с ядерным матриксом (SAR/MAR DNA) [6] (табл.1).

Таблица 1. Количество копий нескольких структурных семейств ДНК, представленных во всем геноме человека и на Y-хромосоме.

	SCAR DNA	Lamina DNA	CRLS DNA	SAR/ MAR DNA
Всего копий	3349	4658	2220	1708
На Y-хромосоме	3	12	27	4
Доля на Y-хромосоме	0,0009	0,0026	0,0120	0,0023

Все эти последовательности близки по размерам и по количеству копий в геноме и относятся к умеренно повторяющимся последовательностям. Доля от общего количества этих ПП, представленная на Y-хромосоме, для ДНК СК статистически достоверно ниже, чем для ДНК ламины ($p<0,042$) и для ДНК СРСИ ($p<0,0001$) и ниже, хотя и недостоверно, чем для ДНК SAR/MAR. Это соответствует известному факту, что большая часть Y-хромосомы млекопитающих не входит в состав СК и не претерпевает рекомбинации. Таким образом, обедненность Y-хромосомы определенным классом ПП была подтверждена на примере известной SCAR DNA. Этот признак может быть критерием отбора искомой мейотической ДНК. Мы получили инструмент для поиска *in silico* интересующих нас последовательностей в разных геномах.

Дальнейшие исследования были предприняты нами в главном комплексе гистосовместимости (КГС) человека, для которого была составлена детальная карта рекомбинации [7]. Мы обнаружили несколько классов ПП с низким представительством на Y-хромосоме (меньше 0,008 от общего числа копий) (рис.1). Мы определили коэффициенты корреляции между частотой рекомбинационных событий и плотностью ПП для этих классов. Последовательности одного класса (доля на Y-хромосоме 0,003-0,004) локализовались вблизи горячих точек рекомбинации, другие (доля 0,001-0,002) «избегали» их (соответствующие коэффициенты корреляции $r_1 = 0,3$ при $p<0,11$ и $r_2 = -0,44$ при $p<0,02$).

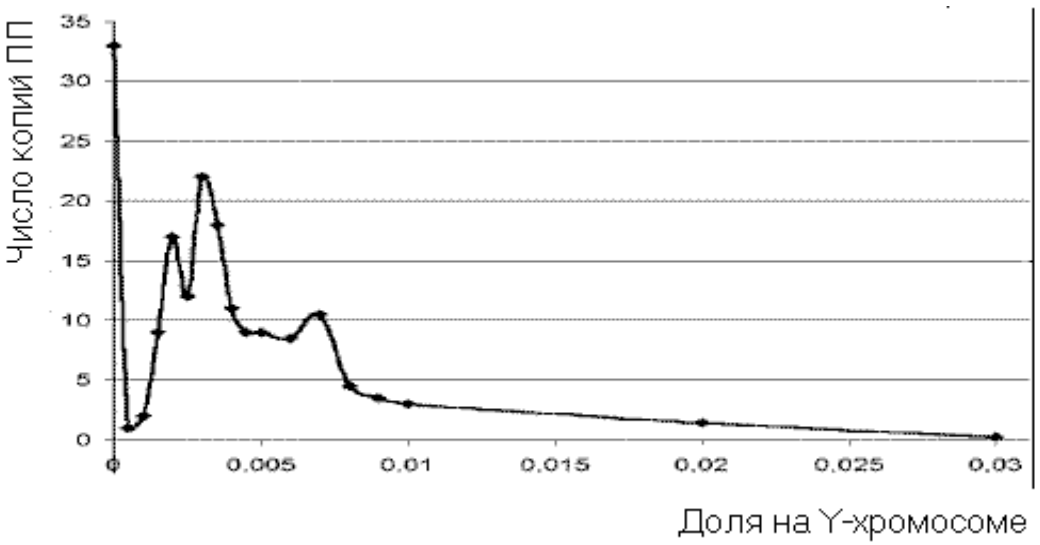

Рис.1.Распределение повторяющихся последовательностей (ПП) по классам в зависимости от представительства на Y-хромосоме

Чтобы определить, какой именно из выявленных нами классов ПП можно отнести к мейотической ДНК, мы проанализировали распределение этих классов по хромосомам. С помощью программы NCBI BLAST мы выявили ПП в случайной последовательности хромосомы 2 человека (gi 29789875:612597-2112597 H s chr2 genomic contig NT_022135.13) размером 1,5 м.п.н. Для каждого класса определяли количество копий, долю на Y-хромосоме и расстояние между копиями. Последовательность считали мей-ДНК, если число найденных копий данного класса ПП превышало 268, а доля найденных ПП, представленная на Y-хромосоме, была меньше 0,003. Числа от 268 и выше дают достоверное определение пониженного содержания искомых повторов на Y-хромосоме. Второе число (0,003) выбрано нами после изучения интервалов между копиями повторов в разных классах. Класс ПП, имеющий представительство на Y-хромосоме ниже 0,003 (0,3%), наиболее удовлетворяет модели петельной организации хроматина вокруг СК. Гистограмма частот встречаемости интервалов между последовательностями этого класса (мей-ДНК) представлена на рис.2. Копии ПП расположены преимущественно на расстоянии 10 т.п.н. или 50-60 т.п.н., что можно интерпретировать как кластеры, разделенные 50-60 т.п.н. Это соответствует модели петельной организации мейотического хроматина при том предположении, что мей-ДНК находится у основания петель и участвует в синапсисе гомологичных хромосом.

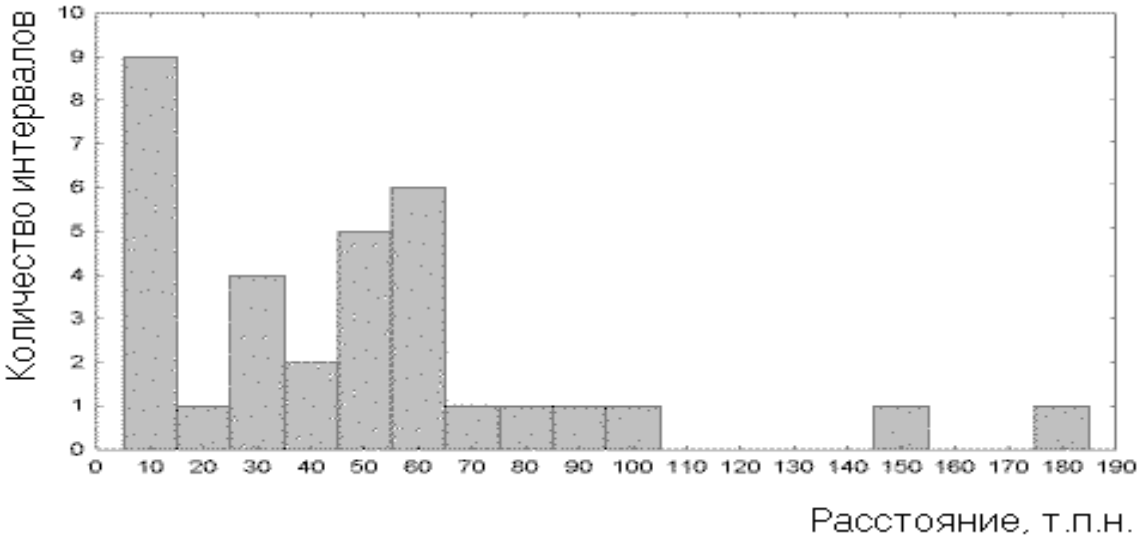

Рис.2. Встречаемость интервалов между копиями мей-ДНК

Мы изучили отношение найденной нами мей-ДНК к рекомбинации на примере упомянутого выше КГС. Данные о распределении частоты рекомбинации внутри КГС [7] мы сопоставили с распределением последовательностей мей-ДНК (рис.3). Как видно из рисунка, частота рекомбинации минимальна в районах преимущественной локализации мей-ДНК и наоборот. Это заключение было подтверждено расчетом коэффициента корреляции этих двух параметров по Спирману (табл.2).

Таблица 2. Корреляция частоты рекомбинационных событий и плотности мей-ДНК в комплексе гистосовместимости человека.

События	Количество наблюдений	Коэффициент корреляции по Спирману	p
Рекомбинация + мей-ДНК	30	-0,458798	0,010769
Рекомбинация + мей-ДНК *	28	-0,715928	0,000018

* После процедуры сглаживания данных

Нами было проверено предположение об инициации одного события мейотической рекомбинации на петлю хроматина [8]. Мы ожидали получить положительную линейную зависимость между частотой рекомбинации и плотностью распределения мей-ДНК, исходя

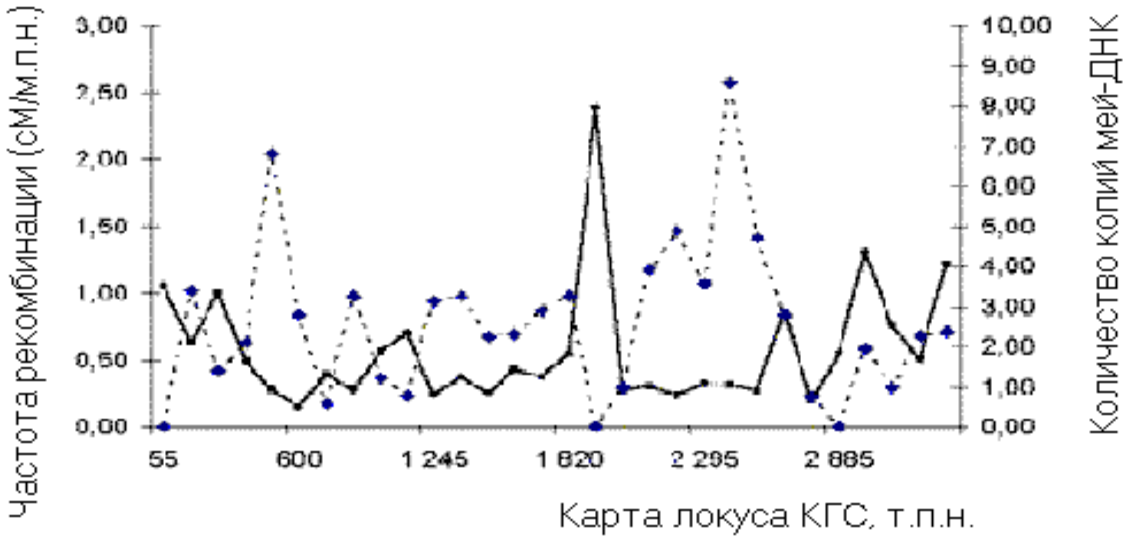

Рис.3. Распределение событий рекомбинации (сплошная линия) и последовательностей мей-ДНК (пунктир) в комплексе гистосовместимости (КГС) человека

из того, что чем больше плотность, тем больше петель, хотя размер петли меньше. Оказалось, что упомянутое предположение верно лишь до определенного предела (две копии мей-ДНК на 100 т.п.н., что соответствует размеру петли 50 т.п.н.). При дальнейшем уменьшении размера петли частота рекомбинации падает, хотя количество петель растет (рис.4).

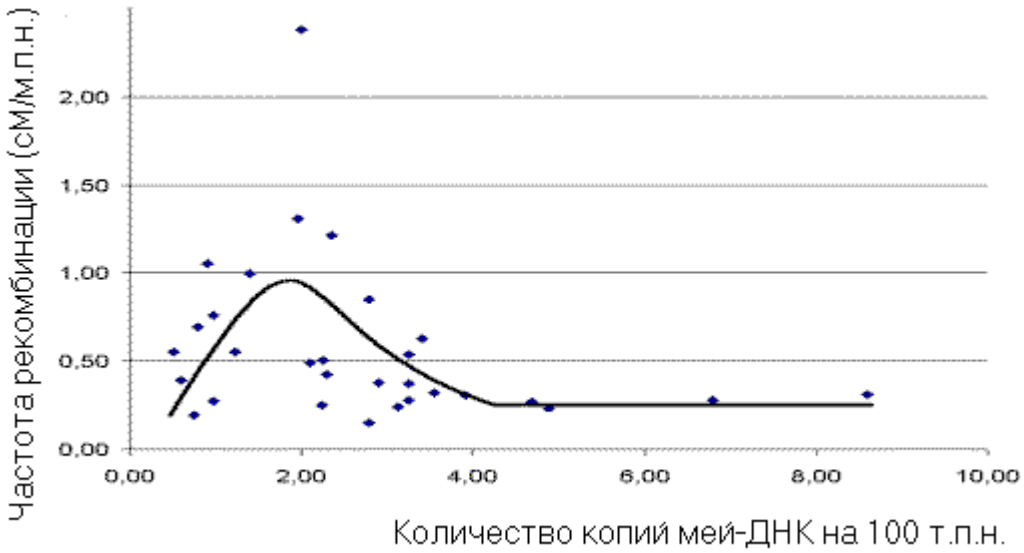

Рис.4. Зависимость частоты рекомбинации от плотности копий мей-ДНК (усредняющая кривая проведена вручную)

Данные о частоте рекомбинации были нормированы, т.е. пересчитаны на один повтор мей-ДНК (или, по нашим представлениям, на одну петлю). Если предположение об одном рекомбинационном событии на петлю, независимо от ее размера, верно, мы должны были бы получить на графике горизонтальную линию. Однако оказалось, что количество рекомбинационных событий, приходящееся на одну петлю, падает с увеличением плотности мей-ДНК и, соответственно, с уменьшением размера петли (рис.5). Это указывает на зависимость рекомбинации скорее от размера активной части петли, чем от числа петель.

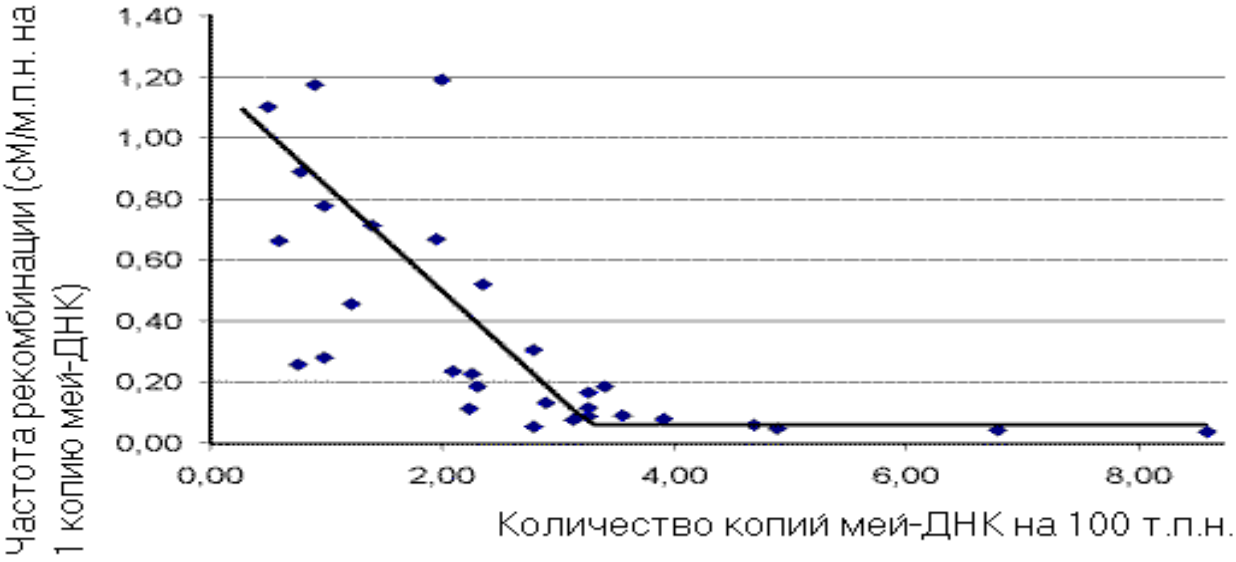

Рис.5. Зависимость частоты рекомбинации (нормированные данные) от плотности копий мей-ДНК (усредняющая кривая проведена вручную)

Заключение. Мы разработали метод идентификации *in silico* структурных последовательностей мейотической ДНК. Результаты, полученные с помощью этого метода, согласуются с экспериментальными данными и теоретическими представлениями об организации мейотической хромосомы. Мей-ДНК, видимо, вовлечена в организацию латеральных петель хроматина, но не в инициацию рекомбинации.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №02-04-48761)

Литература

1. *Karpova O.I., Safronov V.V., Zaitseva S.P., Bogdanov Iu.F.* Various properties of DNA from isolated fractions of the mouse synaptonemal complexes// Mol Biol (Mosk).1989. V.23. P.571-579.
2. *Karpova O.I., Penkina M.V., Dadashev S.I., Mil'shina N.V., Hernandes J., Radchenko I.V., Bogdanov Yu.F.*. Features of the primary structure of DNA from the synaptonemal complex of the golden hamster// Mol Biol (Mosk). 1995. V.29. P.512-521.
3. *Pearlman R.E., Tsao N., Moens P.B.* Synaptonemal complexes from DNase-treated rat pachytene chromosomes contain (GT)n and LINE/SINE Sequences// Genetics. 1992. V.130. P.865-872.
4. *Christova R., Bach I., Galcheva-Gargova Z.* Sequences of DNA fragments contacting the nuclear lamina in vivo// DNA Cell Biol. 1992. V.11. P.627-636.
5. *Glazkov M.V., Poltaraus A.B., Lebedeva I.A.* Nucleotide sequence of DNA isolated from protein cores of rosette-like structures (elementary chromomeres) of mouse interphase chromosomes// Genetika (Moscow). 1994. V.30. P.1146-1154.

6. *Krajewski W.A., Razin S.V.* Organization of specific DNA sequence elements in the region of the replication origin and matrix attachment site in the chicken alpha-globin gene domain// Mol.Gen.Genet. 1992. V.235. P.381-388.
7. *Cullen M., Perfetto S.P., Klitz W., Nelson G., Carrington M.* High-resolution patterns of meiotic recombination across the human major histocompatibility complex// Am.J.Hum.Genet. 2002. V.71. P.759-776.
8. *Kleckner N., Storlazzi A., Zickler D.* Coordinate variation in meiotic pachytene SC length and total crossover/chiasma frequency under conditions of constant DNA length// Trends Genet. 2003. V.19. P.623-628.