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

Гришаева Т.М.
Дадашев С.Я.
Богданов Ю.Ф.
Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН

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 последовательности ДНК, находящиеся в тесной связи с СК – SCAR DNA [1-3]. Однако этих последовательностей недостаточно, чтобы обеспечить прикрепление петель хроматина к боковым элементам СК. Мы поставили задачу разработать способ поиска специфической мейотической ДНК (мей-ДНК), выполняющей эту функцию, а также найти и охарактеризовать эти последовательности в геноме человека. При этом мы ожидали, что мей-ДНК будет представлена множеством копий на всех хромосомах, кроме Y-хромосомы, поскольку последняя практически не принимает участия в синапсисе и рекомбинации в мейозе у млекопитающих.

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 выполняли с помощью пакета STATISTICA v.6 program (StatSoft, Inc, 2001) (STATISTICA data analysis software system, version 6: www.statsoft.com).

Метод поиска мейотической ДНК отрабатывали с помощью программы NCBI BLAST 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). 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 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). Одни из них (доля на Y-хромосоме 0,003-0,004) локализовались вблизи горячих точек рекомбинации, а другие (доля 0,001-0,002) «избегали» их.

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 было изучено количество копий, доля 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. Копии ПП этого класса расположены, как правило, 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 предположению, что мей-ДНК находится у основания петель хроматина и участвует в синапсисе гомологичных хромосом.

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.1). Частота рекомбинации оказалась минимальной в районах преимущественной локализации мей-ДНК и наоборот. Это заключение было подтверждено расчетом коэффициента корреляции этих двух параметров по Спирману ($r=-0,46$ при $p<0,02$; после процедуры сглаживания $r=-0,72$ при $p<0,00002$).

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 из того, что чем больше плотность, тем больше петель, но меньше их размер. 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. Таким образом, решающее значение имеет размер петли.

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 вовлечена в организацию латеральных петель хроматина, но не в инициацию рекомбинации.

Таблица 1. Распределение по геному нескольких семейств ДНК, связанных с ядерными структурами.

Семейства повторяющихся последовательностей	SCAR DNA	Lamina DNA	CRLS DNA	SAR/MAR DNA
Всего копий	3349	4658	2220	1708
Копий на Y-хромосоме	3	12	27	4
Доля на Y-хромосоме	0,0009	0,0026	0,012	0,0023

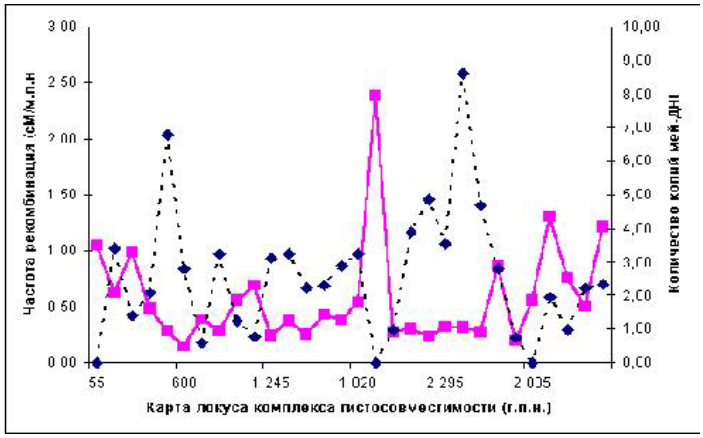

Рис.1.Распределение событий рекомбинации (сплошная линия) и последовательностей мей-ДНК (пунктир) в комплексе гистосовместимости человека

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.