

**ЯДЕРНЫЕ ПСЕВДОГЕНЫ мтДНК КАК ИСТОЧНИК НОВЫХ
ВАРИАНТОВ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ НА ПРИМЕРЕ
СОЛОВЬЯ-КРАСНОШЕЙКИ *Luscinia calliope* (MUSCICAPIDAE, AVES)**

© 2016 г. Л. Н. Спиридонова, Я. А. Редькин, О. П. Вальчук

Представлено академиком РАН Ю.Н. Журавлевым 17.06.2015 г.

Поступило 22.10.2015 г.

Впервые приводятся данные о присутствии копий митохондриального гена цитохрома *b* группы подвидов *Luscinia calliope anadyrensis*–*L. c. camtschatkensis* в ядерном геноме *L. c. calliope*, что косвенно указывает на ядерную природу подвидоспецифичных митохондриальных гаплотипов соловья-красношейки. Установленный факт проясняет возникновение митохондриальных гаплотипов восточных подвидов путем обмена между гомологичными участками ядерного и митохондриального геномов с последующим закреплением по типу эффекта основателя. Впервые предложен механизм обмена фрагментами ДНК между ядром и митохондриями (межгеномная рекомбинация) и показана роль ядерных копий мтДНК в качестве источника новых таксонспецифичных митохондриальных гаплотипов, что указывает на их участие в микроэволюционных процессах и формообразовании.

DOI: 10.7868/S0869565216040241

Обмен генетической информацией между клеточными органеллами и ядром считается общим феноменом для всех эукариот. Впервые перенос большого фрагмента мтДНК (7.9 т.п.н.) в ядро был описан у домашней кошки *Felis catus* [1]. В этой работе для ядерных копий генов мтДНК предложен термин NUMT (“Nuclear copies of mitochondrial genes”) и предложена гипотетическая модель встраивания фрагмента мтДНК в ядерный геном. Однако реальные механизмы перемещения и интеграции ДНК между митохондриями и ядром пока не установлены. В настоящее время описано немало случаев обнаружения ядерных копий генов мтДНК у разных групп организмов (грибы, растения, членистоногие, птицы, млекопитающие), но факты обратной симметрии, то есть внедрения последовательностей яДНК в митохондриальный геном ранее не были известны.

В настоящей работе в ходе филогеографических исследований популяционной структуры соловья-красношейки *Luscinia calliope* (Pallas, 1776) нами был впервые установлен факт перехода последовательности ядерной копии в митохондриальный геном, приведший к происхождению

таксонспецифичных митохондриальных гаплотипов нескольких подвидов (географических рас) данного вида. Мы предлагаем и косвенно подтверждаем существование ранее не описанного механизма обмена гомологичными участками между ядерной и митохондриальной ДНК посредством симметричной рекомбинации. Результаты нашего открытия расширяют представления о процессах, происходящих в клетке, свидетельствуют о фактах взаимодействия ядерного и митохондриального геномов как сопряженной генетической системы клетки и позволяют переосмыслить значение изучения митохондриальных генов для оценки скорости микроэволюционных процессов и формообразования.

В представляемом сообщении мы приводим данные об обнаружении копий митохондриального гена цитохрома *b* (*cyt b*) северо-восточной группы подвидов *Luscinia calliope anadyrensis*–*L. c. camtschatkensis* в ядерном геноме формы *L. c. calliope*, что указывает на ядерную природу происхождения митохондриальных гаплотипов указанных подвидов соловья-красношейки. Присутствие в ядре *L. c. calliope* копий митохондриальных генов других подвидов свидетельствует о межгеномных рекомбинационных событиях, в результате которых возникли новые рекомбинантные митохондриальные гаплотипы некоторых географических рас этого вида.

Соловей-красношейка *Luscinia calliope* – широко распространенный перелётный палеарктический вид воробьиных птиц. Молекулярно-ге-

Биолого-почвенный институт
Дальневосточного отделения
Российской Академии наук, Владивосток
E-mail: spiridonova@biosoil.ru
Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

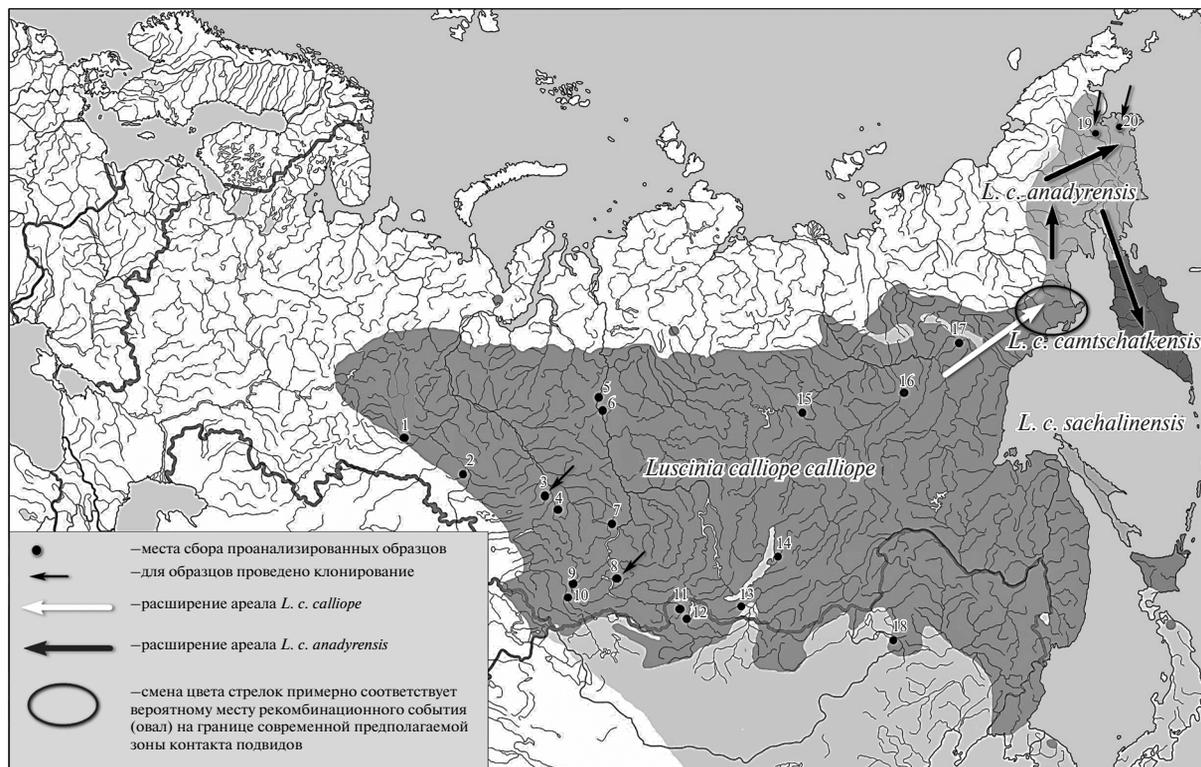


Рис. 1. Места сбора проанализированных образцов.

нетические исследования гена *cyt b* мтДНК этого вида показали его разделение на три значительно различающиеся гаплогруппы [2, 3]: “западную” (*calliope*) и две “восточных” — сахалинскую и анадырьско-камчатскую, соответствующие формам *L. c. sachalinensis* (Portenko, 1937), *L. c. anadyrensis* (Portenko, 1939) и *L. c. camtschatkensis* (Gmelin, 1789). Выраженная генетическая дивергенция между гаплогруппами *calliope*, *anadyrensis*—*camtschatkensis* и *sachalinensis* не имела логического объяснения, поскольку явных географических разрывов между ареалами подвидов “западной” и “восточных” групп практически не существует, а вся северо-восточная часть ареала (Анадырь, Камчатка, Магаданская обл.) представлена популяциями с обоими вариантами мтДНК в разных соотношениях. Кроме того, нерешенным оставался вопрос происхождения гаплогруппы *sachalinensis*, представленного исключительно на Сахалине и отсутствующего на соседних участках материка. Для разрешения этих вопросов и более полного исследования филогеографии гаплогрупп номинативного подвида *calliope* мы изучали птиц из ранее неисследованных частей ареала соловья-красношейки.

Анализировали 21 образец *L. c. calliope* из коллекции Зоологического музея МГУ, собранных в 18 локалитетах с 1906 по 2011 г. (рис. 1). ДНК выделяли из дериватов (кусочки подошвы и перья), используя набор QIAgen DNeasy® Tissue Kit

(“Qiagen, Inc.”, США) по протоколу № 9 [4]. Амплификацию фрагмента гена *cyt b* и ядерных копий того же гена проводили при участии разных пар праймеров собственного дизайна.

Визуальное тестирование на предмет качества графических аб-файлов выявило в некоторых сайтах на фоне четких сигналов одинаково повторяющиеся двойные пики, но с разной интенсивностью сигнала у 19 образцов. Поскольку все сиквенсы характеризовались сходным распределением гетероплазмичных сайтов, мы произвольно отобрали для предварительного анализа два образца из западных точек, удаленных друг от друга на 650 км (Томск и Ермаковский р-н Красноярского края). Для разделения последовательностей, обнаруженных в гетерогенном фрагменте в результате секвенирования, ампликоны были клонированы с использованием набора InsTAclone™ PCR cloning Kit (“Fermentas”, Литва) согласно инструкции производителя. Было отобрано в среднем по 10 клонов для каждого образца. Всего проанализировали 25 клонов длиной около 900 п.н.

Один из вариантов клонов обоих образцов соответствовал митохондриальному гену *cyt b* номинативного подвида *L. c. calliope*, а второй оказался ядерным псевдогеном *cyt b*, сходным с митохондриальными гаплогруппами восточной группы, обнаруженными нами ранее и свойственными подвидам *L. c. anadyrensis* и *L. c. camtschatkensis* (сход-

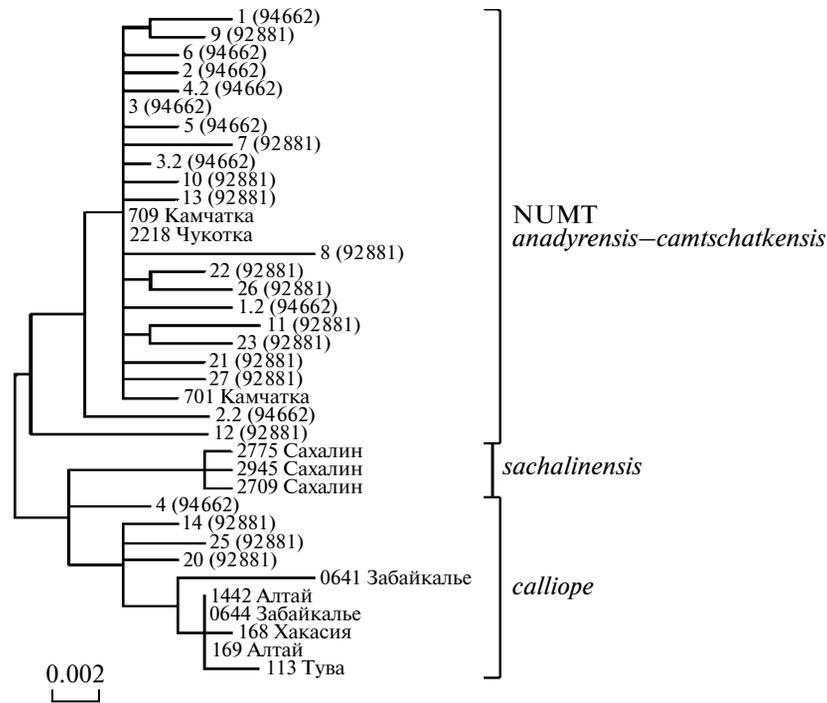


Рис. 2. Древо максимального правдоподобия (ML) для клонов фрагмента гена *cyt b* (867 н.п.) от образцов *L. c. calliope* № 94662 и 92881. Цифрами перед скобками обозначены номера клонов проанализированного образца.

ство 98%, рис. 2). Ядерные псевдогены имели детерминирующие кодоны, характерные для NUMT. Кроме того высокий уровень полиморфизма, обусловленный хаотично встречающимися мутациями, также подтверждает ядерную природу этих последовательностей.

Мы предположили, что механизмом переноса ядерной копии, идентичной подвиду *anadyrensis*, в митохондриальную ДНК могла быть симметричная рекомбинация между гомологичными участками ядерного и митохондриального геномов. Следовательно, анадырский подвид должен был иметь в ядерном геноме копию митохондриального гена *cyt b* номинативного подвида *L. c. calliope*. Чтобы подтвердить данную гипотезу, вначале мы провели тестирование особей анадырского подвида соловья-красношейки на предмет присутствия у них гетероплазмичных сайтов. Амплификация гена *cyt b* со специфическими праймерами не приводила к образованию ядерного гомолога. Мы экспериментально установили, что праймеры для более длинного фрагмента (3202 п.н.), охватывающего ген *cyt b* и контрольный регион (D-петля), захватывают как митохондриальную, так и ядерную последовательность. Поэтому мы провели две ПЦР. В первой ПЦР синтезировался длинный ампликон, включающий гены *cyt b* и *CR*, длиной 3202 п.н. Во второй реакции при участии продукта первой ПЦР происходило обогащение фракции ядерного гомолога гена *cyt b* длиной

1200 п.н. Продукты второй ПЦР были секвенированы, и образцы с гетероплазмичными сайтами использовали для последующего клонирования. Были клонированы (рис. 1) нуклеотидные последовательности двух образцов *L. c. anadyrensis* с ранее определенными митохондриальными гаплотипами: № 2053 (Acc. LK932608, гаплотип *anadyrensis-camtschatkensis* – Чукотский АО, Анадырский р-н) и № 2251 (Acc. LK932617, гаплотип *calliope* – Чукотский АО, Беринговский р-н). Клонированные последовательности особи № 2053 разделились на два варианта: ген *cyt b* группы *anadyrensis-camtschatkensis* и ядерную копию гена *cyt b* подвида *calliope*, что подтвердило нашу гипотезу. Неожиданными оказались результаты клонирования для птицы № 2251 с митохондриальным гаплотипом *calliope*. Один вариант клонов был митохондриальным геном *cyt b* номинативного подвида *L. c. calliope*, а второй – ядерной копией, идентичной гену *cyt b* подвида *L. c. sachalinensis* и ранее не обнаруженной нигде, кроме о. Сахалин.

Обнаруженные ядерные копии мтДНК косвенно указывают на то, что митохондриальные гаплотипы анадырского, камчатского и сахалинского подвида произошли путем симметричной рекомбинации гомологичных участков ядерного и митохондриального геномов и последующего распространения рекомбинантных гаплотипов по типу эффекта основателя. Поскольку в приведенных случаях происходит замена участка мито-

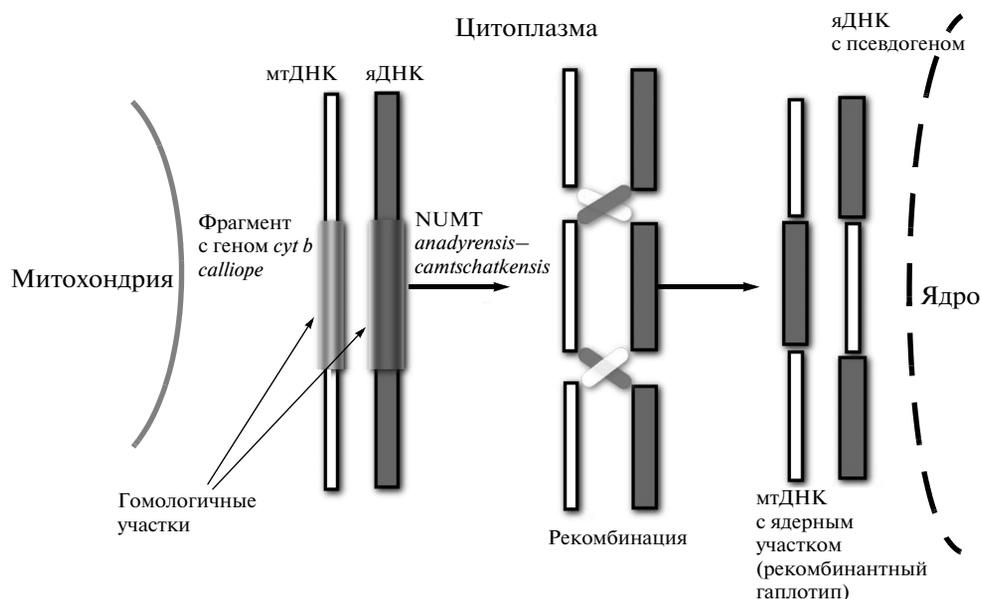


Рис. 3. Предполагаемая схема рекомбинации между мт- и яДНК, в результате которой возник рекомбинантный гаплотип подвидов *L. c. anadyrensis* и *L. c. camtschatkensis*.

хондриальной ДНК *calliope* на гомологичные ядерные копии *anadyrensis-camtschatkensis* и *sachalinensis*, — можно предположить, что ядерный геном исходного номинативного подвида *L. c. calliope*, содержащий копии митохондриальных генов, в частности, гена *cyt b*, явился источником происхождения новых таксонспецифичных вариантов митохондриальных гаплотипов.

Вероятность возникновения сложных одинаковых молекулярных переносов сразу у нескольких особей крайне низка. Мы полагаем, что рекомбинационное событие для каждого подвида произошло однократно на первых стадиях формирования половых клеток, которое в эмбриогенезе птиц происходит очень рано, в первой трети эмбриогенеза, как было экспериментально установлено в исследованиях куриных эмбрионов [5]. Деления зиготы после оплодотворения не сопровождаются делениями митохондрий, в результате чего количество копий мтДНК на клетку снижается с 200 тыс. в яйцеклетке до 5 тыс. на клетку в бластоцисте, что показано на млекопитающих [6]. После имплантации в ходе дифференцировки клеток обособляются первичные половые клетки, гонциты, в которых присутствует около 10 копий мтДНК на клетку. Митохондрии предшественников половых клеток составляют малую часть (0.01%) от всего изначального пула митохондрий зиготы. Из-за резкого уменьшения количества митохондрий (примерно в 20 тыс. раз) в клетке сильно сокращается разнообразие мтДНК [7]. Межгеномная рекомбинация, предполагаемая в нашей работе, по-видимому, произошла на стадии гонцитов, в которых присутствует наи-

меньшее количество митохондрий, что во много раз повышает возможность сохранения и передаче потомству новых вариантов митохондриальной ДНК.

Энзимология общей рекомбинации хорошо изучена только у некоторых прокариотических организмов [8]. Один из специфических ферментов, необходимых для успешной гомологичной рекомбинации, называется белком гесА. Он катализирует обмен одиночными цепями, используя энергию гидролиза АТФ до АДФ и неорганического фосфата. Первый этап рекомбинационного процесса в схеме Холлидея — гесА-зависимое внедрение одноцепочечных ДНК в гетеродуплекс с образованием двухцепочечных разрывов. Второй фермент, состоящий из трех отдельных субъединиц (В, С и D) — гесВCD-нуклеаза, обладает эндо- и экзонуклеазной, а также геликазной активностями. Механизм его действия до конца не установлен, однако известно, что гесВCD-нуклеаза индуцирует разрывы в дуплексной ДНК и благодаря присущей ей геликазной активности вместе с гесА инициирует рекомбинационный процесс. В общей рекомбинации участвуют еще несколько ферментов, катализирующих также процессы репликации и репарации ДНК [8].

Вероятность того, что межгеномная рекомбинация произошла в цитоплазме, мы объясняем известными фактами и вытекающими из них предположениями. На стадии мейоза ядерная ДНК после разрушения ядерной оболочки проникает в цитоплазму (рис. 3). Перемещение мтДНК в цитоплазму, по-видимому, может происходить под влиянием как генетических, так и

экологических факторов, таких как действие мутагенных агентов и других форм клеточного стресса, которые могут привести к повреждению митохондрий или их мембран [9].

Межгеномный обмен нуклеотидными последовательностями для случая *calliope*—*anadyrensis*—*camtschatkensis*, предположительно, произошел, на северо-восточной периферии ареала подвида *calliope* при низкой численности особей, вероятнее всего, в районе, где располагается современная зона контакта этой формы с *L. c. anadyrensis* (рис. 1). Это дало возможность новому гаплотипу закрепиться во времени и по мере становления морфологических признаков новых форм и заселения новых территорий на северо-востоке Азии стать таксонспецифичным. В популяциях соловья-красношейки бассейна Анадыря и Корякского нагорья в настоящее время происходит смешение митохондриальных гаплотипов *calliope* и восточного рекомбинантного гаплотипа примерно в равных соотношениях, при этом сохраняется стабильность морфологических признаков, свойственных анадырскому подвиду. Далее к югу, — на п-ове Камчатка, — популяции *L. c. camtschatkensis*, внешне хорошо отличимые от *anadyrensis*, представлены особями преимущественно с тем же рекомбинантным гаплотипом, тогда как гаплотип *calliope* встречается здесь очень редко. Предполагаемым местом рекомбинационного события для случая *calliope*—*sachalinensis*, возможно, был Сахалин, поскольку митохондриальный гаплотип сахалинского подвида встречается исключительно на этом острове. Явление рекомбинации, по нашему мнению, произошло в относительно недалеком прошлом, так как обнаруженные ядерные копии гена *сyt b* имеют высокое сходство (98—99%) с митохондриальными генами соответствующих подвигов “восточной” группы: *L. c. anadyrensis*, *L. c. camtschatkensis* и *L. c. sachalinensis*.

Обратное предположение о внедрении восточного гаплотипа в ядерный геном *L. c. calliope* мы считаем маловероятным по нескольким причинам. Во-первых, из-за значительной удаленности мест, где обнаружен ядерный псевдоген (Западная и Средняя Сибирь), от гнездового ареала *L. c. anadyrensis*. Во-вторых, вследствие высокого гнездового консерватизма, известного для соловья-красношейки, и постоянных путей миграций. Кроме того, по мнению орнитологов, расширение ареала *L. calliope* происходило с запада на восток [10, 11]. К тому же, собственно восточный митотип, по нашим данным, не обнаружен (кроме одного случая в Монголии) западнее Благовещенска (Амурская обл.).

В случае симметричной рекомбинации между гомологичными участками митохондриального и ядерного геномов возникновение новых митохондриальных гаплотипов происходит на основе ядерных псевдогенов. На рис. 3 представлена предпола-

гаемая нами схема рекомбинационного события между гомологичными фрагментами ядерной и митохондриальной ДНК, в результате которого возникли новые рекомбинантные гаплотипы, ныне свойственные подвидам *L. c. anadyrensis*, *L. c. camtschatkensis* и *L. c. sachalinensis*.

Псевдогены мтДНК в ядерном геноме чаще подвергаются рекомбинационным перестройкам, вследствие чего появляются их новые варианты. Например, наличие нескольких значительно дивергировавших вариантов гаплотипов, обычно разделяемых по географическому принципу на “западные” и “восточные”, у представителей некоторых родов врановых птиц (г. *Corvus* [12], г. *Pica* [13]), по-видимому, иллюстрирует общее для разных случаев явление, которое традиционно объясняют последствиями оледенений, приводивших к обособлению в условиях длительной изоляции группировок популяций тех или иных видов в удаленных рефугиумах. При определенном стечении обстоятельств, описанных выше, случайные межгеномные рекомбинации гораздо быстрее приводят к появлению новых вариантов гаплотипов митохондриальных генов по сравнению с процессами спонтанных мутаций в самом митохондриальном геноме и могут быть альтернативной причиной описанных выше случаев.

Таким образом, в нашей работе впервые описаны факты обнаружения яДНК в митохондриальном геноме и предложен механизм обмена фрагментами ДНК между ядром и митохондриями (межгеномная рекомбинация). Также показана роль ядерных копий мтДНК в качестве источников новых таксонспецифичных митохондриальных гаплотипов, что указывает на их значение в микроэволюционных процессах и формообразовании. С филогенетической точки зрения NUMT часто рассматриваются как помехи, приводящие к ошибочным интерпретациям родственных связей таксонов [14]. Наши данные позволяют по-новому взглянуть на присутствие последовательностей NUMT в составе ядерного генома и раскрывают новые возможности использования подобных случаев в филогенетических исследованиях.

Мы благодарим академика РАН Ю.Н. Журавлева и А.П. Крюкова за внимание к нашим исследованиям, помощь и ценные замечания, К.В. Рожкована — за методические советы на этапе клонирования.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 14—50—00029 “Научные основы создания национального банка-депозитария живых систем”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lopez J.V., Yuhki N., Masuda R., Modi W., O'Brien S.J. // J. Mol. Evolut. 1994. V. 39. № 5. P. 174—190.

2. Спиридонова Л.Н., Вальчук О.П., Белов П.С., Масловский К.С. // Генетика. 2013. Т. 49. № 6. С. 735–742.
3. Spiridonova L.N., Valchuk O.P., Red'kin Ya.A., Saitoh T. // XXVI Intern. Ornithol. Congress. Tokyo, 2014. P. 382.
4. Nishiguchi M.K., Doukakis P., Egan M., et al. Methods and Tools in Biosciences and Medicine. Wash.; Basel: Birkhauser Verlag, 2002. P. 249–287.
5. Стрижикова С.В., Стрижиков В.К., Житенко Н.В. // Успехи соврем. естествознания. 2002. № 4. С. 77–78.
6. White D.J., Wolff J.N., Pierson M., Gemmell N.J. Revealing the Hidden Complexities of mtDNA Inheritance // Mol. Ecol. 2008. V. 17. № 23. P. 4925–4942.
7. Shoubridge E.A., Wai T. // Curr. Top. Develop. Biol. 2007. V. 77. P. 87–111.
8. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. М.: Мир, 1998. Т. 2. 373 с.
9. Blanchard J.L., Schmidt G.W. // J. Mol. Evolut. 1996. V. 13. № 6. P. 537–548.
10. Назаренко А.А. // Зоол. журн. 1979. Т. 58. С. 1680–1691.
11. Доржиев Ц.З. // Вестн. Бурят. гос. ун-та. Сер. Спец. 2006. № 4. С. 68–91.
12. Haring E., Ddubl B., Pinsker W., Kryukov A., Gamauf A. // J. Zool. Syst. & Evolut. Res. 2012. V. 50. № 3. P. 230–246.
13. Kryukov A., Iwasa M.A., Kakizawa R., Suzuki H., Pinsker W., Haring E. // J. Zool. Syst. & Evolut. Res. 2004. V. 42. № 4. P. 342–351.
14. Bernt M., Braband A., Schierwater B., Stadler P.F. // Mol. Phys. and Evolut. 2013. V. 69. № 2. P. 328–338.