

КАМЕНСКАЯ
Дарья Николаевна

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ
ПАРАЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ ГОРМОНА РОСТА У ЛОСОСЕВЫХ РЫБ**

1.5.7. Генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
«Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского»
Дальневосточного отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор **Брыков Владимир Алексеевич**

Официальные оппоненты:

Щербаков Дмитрий Юрьевич, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, зав. лабораторией геносистематики, главный научный сотрудник

Исаева Марина Петровна, кандидат медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук, зав. лабораторией морской биохимии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук

Защита диссертации состоится 5 июля 2023 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета 24.1.191.01 (Д 005.008.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17.

Факс: (423)2310-900, e-mail: nscmb@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук: <http://www.imb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/sovet-d-005-008-01/63-kamenskaya-darya-nikolaevna>

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Ващенко

М.А. Ващенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Дубликации генов являются одним из основных способов возникновения нового генетического материала в процессе эволюции (Ohno, 1970; Lynch, Conery, 2000). Дублицированные гены появляются в результате неравного кроссинговера, дубликации отдельных хромосом, tandemных дубликаций части хромосом или дубликации всего генома (Zhang, 2003; Magadum et al., 2013). В зависимости от значимости выполняемых функций судьба дублицированных генов может складываться по-разному. Наиболее частый случай – потеря функции в результате накопления мутаций одним из паралогов. (Lynch, Conery, 2000, Balakirev, Ayala, 2003). Другой вариант – это субфункционализация, когда оба гена остаются функциональными, но транскрибируются в разных тканях или разделяют между собой функции, которые до дубликации выполнял один ген. Известны случаи, когда дублицированный ген приобретает новую, существенно отличающуюся функцию (Walsh, 1995; Wagner, 1998). Также считается, что дублицированные последовательности играют важную роль в геноме эукариот: защищают от вредных мутаций и способствуют генетической устойчивости организма (Krakauer, Nowak, 1999).

В истории всех организмов предполагается этап полногеномной дубликации (Ohno, 1970; Zhang, 2003). В дальнейшем, вероятно, происходил этап вторичной диплоидизации геномов, при котором значительная часть множественных генов была утрачена, а часть дубликаций сохранилась в виде различных генных семейств. Встречаются виды, у которых диплоидизация не завершилась до сих пор. Одна из таких групп – лососевые рыбы.

Лососевые рыбы сформировались после событий автотетраплоидизации и последующей дивергенции. В отряде лососевых выявляются следы четырех этапов дубликации (4R). Последнее из этих событий произошло около 100 млн лет назад (Berthelot et al., 2014; Задесенец, Рубцов, 2018). А квадριвалентные комбинации хромосом в процессе митоза у некоторых видов можно встретить и сейчас. Таким образом, лососевые являются естественными и относительно недавними полиплоидами. Как следствие, многие гены у представителей этой таксономической группы оказались множественными, в том числе, и представленный двумя копиями ген гормона роста. По-видимому, оба гена гормона роста существуют на протяжении всего времени дивергенции видов в этой группе (25–100 млн лет) (Allendorf, Thorgaard, 1984) и, вероятно, оба функциональны.

Одним из подходов для понимания функциональной значимости, как самих дублицированных генов, так и их различных участков является сравнительный анализ фрагментов ДНК у нескольких видов в таксонах. Консервативность последовательностей у представителей одного таксона дает основание считать такие участки важными для

функционирования гена (Kondrashov F., Kondrashov A., 2006). На сохранение или изменение функционального потенциала дублированной копии гена гормона роста у лососевых рыб могут указывать особенности строения их регуляторных участков.

Степень разработанности темы. Нуклеотидные последовательности генов гормона роста были получены для представителей различных отрядов млекопитающих (Barta et al., 1981; Gordon et al., 1983; Chen et al., 1989), птиц (Arai, Iigo, 2010), разных видов костистых (Devlin, 1993; Tanaka et al., 1995; Venkatesh, Brenner, 1997; Panicz et al., 2012; Sekar et al., 2014) и хрящевых рыб (Yamaguchi et al., 1989; Moriyama et al., 2008) и даже для таких древних позвоночных, как миноги (Moriyama et al., 2006). Такой повышенный интерес к строению гена связан не только с важными функциями, которые выполняет гормон роста в организме, но и с особенностями его эволюции. Исследованию молекулярной эволюции гена гормона роста посвящен целый ряд работ (Miller, Eberhardt, 1983; Walker, 1991; Wallis, 1996; Daza et al., 2009). Показано, что современный ген гормона роста, который у большинства позвоночных состоит из пяти экзонов и четырех интронов, получился в результате дубликации небольшого участка гена-предшественника, а в результате дубликации самого гена гормона роста возникли другие гены семейства: пролактин, соматолактин и плацентарный лактоген (Miller, Eberhardt, 1983). У человека и других высших приматов гены гормона роста вместе с плацентарным лактогеном формируют кластер генов, расположенных друг за другом на одной хромосоме (Perez-Maya et al., 2016). Исследователи связывают появление кластера генов с увеличением скорости эволюции гена гормона роста в несколько раз на этапе дивергенции парнокопытных и приматов (Wallis, 1996; Lioupis et al., 1999). Кластерная организация генов гормона роста и плацентарных лактогенов присутствует только в геноме высших приматов (Perez-Maya et al., 2016) у всех остальных млекопитающих имеется один ген гормона роста (Das et al., 1996; Maniou et al., 2004; Wallis O., Wallis M., 2001). Исключение составляют птицы (Yuri et al., 2008) и некоторые виды рыб, у которых ген гормона роста представлен двумя несвязанными копиями (Chen et al., 1989; Ver, Daniel, 1992; Devlin, 1993).

Исследования генов гормона роста у лососевых рыб в основном были сосредоточены на создании генетических конструкций, содержащих кДНК гена гормона роста и трансформацией такими конструкциями для получения модифицированных линий рыб с высокой скоростью роста (Du et al., 1992; Devlin et al., 2004; Leggatt et al., 2012). Кроме того, целый ряд работ посвящен описанию полных нуклеотидных последовательностей генов (Male et al., 1992; Du et al., 1993; Devlin, 1993) и анализу интронных участков (Oakley, Phillips, 1999; Phillips et al., 2004). Однако до недавнего времени особенности дублированных генов гормона роста были мало изучены даже у таких экономически

важных видов рыб, как лососевые. В работах Паньковой с соавторами (Панькова и др., 2013; Панькова и др., 2017) был проведен сравнительный анализ дивергенции функционально различных участков генов-паралогов в их структурной части, показано с какой интенсивностью действует отбор на гены, возникшие в результате дупликации и выполняющие сходные функции.

Несмотря на такое количество исследований, направленных на изучение структурной части генов гормона роста, очень мало внимания уделяется регуляторным областям, в частности, промоторным участкам. Несколько публикаций посвящено промоторным областям гена гормона роста радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) (Yamada et al., 1993; Argenton et al., 1996; Bernardini et al., 1999), по другим видам лососевых данных нет. Сравнительный анализ сайтов связывания с транскрипционными факторами и путей активации транскрипции позволит оценить, насколько функционально значимы оба гена-паралога.

Цель и задачи исследования. Цель данной работы – изучение дивергенции в промоторных участках паралогичных генов гормона роста *gh1* и *gh2* у лососевых рыб.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить нуклеотидные последовательности 5'-фланкирующих промоторных участков генов *gh1* и *gh2* у четырех представителей гольцов рода *Salvelinus*: *S. malma*, *S. curilus*, *S. taranetzi*, *S. levanidovi*.
2. Провести сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей промотора двух генов *gh1* и *gh2* у рыб рода *Salvelinus* с аналогичными последовательностями других представителей семейства Salmonidae.
3. Выявить вероятные цис-регуляторные элементы в исследуемых генах.
4. Оценить уровень дивергенции транскрибируемой части и промоторных последовательностей генов гормона роста лососевых рыб.

Научная новизна. В настоящей работе впервые получены и охарактеризованы промоторные последовательности паралогичных генов гормона роста *gh1* и *gh2* у четырех видов гольцов рода *Salvelinus*. Проведен сравнительный анализ сайтов связывания с транскрипционными факторами, расположенными в промоторной области среди представителей трех родов семейства Salmonidae: *Salvelinus*, *Salmo* и *Oncorhynchus*. Показано, что гены гормона роста у всех исследованных видов содержат одинаковый набор сайтов связывания с факторами транскрипции, формирующими ядро промотора. В промоторе представлены сайты связывания как с тканеспецифичными транскрипционными факторами, так и с другими лигандами. Кроме того, впервые выполненный анализ нуклеотидного разнообразия кодирующей части генов и их промоторных участков позволил

оценить уровень дивергенции разных областей в двух паралогичных генах гормона роста у лососевых рыб.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные данные вносят значительный вклад в понимание молекулярных основ организации и транскрипции генов гормона роста у лососевых рыб. Присутствие в промоторной области сайтов связывания не только с тканеспецифичными, но и с другими транскрипционными факторами, а также с рецепторами гормонов и другими лигандами указывает на альтернативные пути регуляции транскрипции. На основе полученных данных о сайтах связывания с транскрипционными факторами в дальнейших исследованиях можно будет установить какие факторы и при каких условиях участвуют в сборке транскрипционного комплекса; происходит ли взаимодействие между транскрипционными факторами или транскрипционные факторы действуют независимо; присутствуют ли различия в пространственно-временной локализации экспрессии паралогичных генов и зависит ли их активность от стадии жизненного цикла и влияния факторов окружающей среды. Методы, использованные для оценки изменчивости, могут быть применены при изучении других генов. Полученные данные по промоторной последовательности генов гормона роста дополняют уже имеющиеся данные по кодирующей части гена гормона роста гольцов. Такая нуклеотидная последовательность, состоящая из экзонов, интронов и регуляторных областей, может выступать в качестве полноразмерной генетической конструкции для трансформации других видов рыб. Увеличение числа генов гормона роста в геноме позволит получать трансгенные линии рыб с более высокой скоростью роста в условиях аквакультуры.

Методология и методы диссертационного исследования. В данной работе были применены стандартные молекулярно-генетические методы. Разработку праймеров для амплификации фланкирующих участков выполняли с помощью программ Primer Premier 5 (Lalitha, 2000) и Primer 3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>). Амплификацию промоторных участков генов *gh* осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для разделения участков паралогичных генов гормона роста *gh1* и *gh2* очищенные продукты амплификации подвергали молекулярному клонированию. Разделяли и определяли размер полученных после ПЦР фрагментов методом электрофореза в агарозном геле. Автоматическое секвенирование нуклеотидных последовательностей проводили по методу Сэнгера. Для анализа данных использовали актуальные статистические программы. Нуклеотидное разнообразие и дивергенцию оценивали в программе DnaSP 5.10.01 (Librado, Rozas, 2009). Филогенетическую реконструкцию выполняли Байесовским методом (Bayesian Inference, BI) с помощью программы MrBayes v. 3.2.6 (Ronquist et al., 2012) и методом ближайшего соседства (Neighbor-Joining) в программе MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). Для

оценки нуклеотидного состава интронов использовали программу MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016) и GC content calculator (<https://jamiemcgowan.ie/bioinf/gc.html>).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Паралогичные гены гормона роста *gh1* и *gh2* кроме структурной части, включающей экзоны и интроны, содержат одинаковые регуляторные цис-действующие элементы.
2. В регуляторных участках паралогичных генов гормона роста *gh1* и *gh2* представлены одинаковые сайты связывания с транскрипционными факторами.
3. Регуляторные элементы CRE и Pit-1, обнаружены как в промотроной области, так и в интронах гена гормона роста.
4. Практически идентичное расположение регуляторных элементов и низкий уровень дивергенции указывают на общее происхождение и сохранение функций обоих генов.

Степень достоверности результатов. Достоверность полученных результатов обеспечена современными молекулярно-генетическими методами исследования и статистической обработкой полученных данных с помощью различного программного обеспечения, которое соответствует целям и задачам, поставленным в работе. Использование молекулярного клонирования и анализ большого числа клонов также обеспечивает достоверность результатов, полученных в ходе эксперимента. Публикация результатов в рецензируемых научных журналах подкрепляют их достоверность. Таблицы и рисунки, представленные в работе, подтверждают интерпретацию результатов, научных положений и выводов.

Личный вклад автора. Экспериментальная часть работы была выполнена автором самостоятельно. Автор освоил и применил различные программы для анализа полученных данных и интерпретации результатов. Автор готовил материалы к публикации и представлял результаты на конференциях.

Апробация результатов работы. Результаты работы были представлены на: ежегодных научных конференциях Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (Владивосток, 2015, 2016, 2018); 8 Международной школе-конференции молодых ученых «Системная биология и биоинформатика» (Новосибирск, 2016); 10 Международной научной конференции по биоинформатике, регуляции структуры геномов и системной биологии BGRS/SB-2016 (Новосибирск, 2016); XI Открытой юношеской научно-практической конференции «Будущее сильной России – в высоких технологиях» (Владивосток, 2017); Региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных

по естественным наукам (Владивосток, 2017); Международной конференции «Научно-технологические разработки в области изучения и мониторинга морских биологических ресурсов» (Владивосток, 2017); X и XI Международных симпозиумах «Современные достижения в популяционной, эволюционной и экологической генетике – МАРЕЕГ» (Владивосток, 2019, 2022), Всероссийской конференции «Морская биология в 21 веке: систематика, генетика, экология морских организмов» (памяти академика Олега Григорьевича Кусакина) (Владивосток, 2022); IV Международной конференции «Современные проблемы биологической эволюции» (Москва, 2022).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 4 статьи в журналах из списка ВАК.

Объем и структура работы. Основной текст диссертации изложен на 149 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Дополнительно представлены четыре приложения. Работа содержит 11 таблиц и 21 рисунок. Список литературы насчитывает 188 наименований, из них 176 на иностранном языке.

Благодарности. Выражаю искреннюю благодарность своему научному руководителю профессору, д.б.н. Брыкову Владимиру Алексеевичу за руководство, советы и поддержку на протяжении многих лет совместной работы. Особую благодарность выражаю к.б.н. Паньковой Марине Владимировне за помощь в освоении молекулярно-генетических методов, обсуждении полученных результатов и подготовке совместных публикаций. Благодарю к.б.н. Шарину Светлану Николаевну за предварительное ознакомление с текстом диссертационной работы и важные замечания; благодарю к.б.н. Бондарь Евгению Игоревну за ценные комментарии к некоторым главам диссертационной работы. Глубокую признательность выражаю д.б.н. Олейник Алле Геннадьевне за подробное ознакомление с текстом работы, всестороннюю поддержку, ценные замечания и рекомендации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассмотрены общие представления о структуре генов и особенности их организации у эукариот. Для большого числа таксонов позвоночных животных приводится подробное описание генов гормона роста, начиная от бесчелюстных и заканчивая млекопитающими. В отдельной подглаве рассмотрена структура гена гормона роста рыб из разных отрядов. Также рассматриваются вопросы, связанные с эволюцией генов гормона роста: этапы формирования структуры гена, которая характерна для большинства современных видов и периоды, когда в некоторых группах позвоночных

животных изменялась скорость эволюции гена гормона роста. В заключительной главе описываются регуляторные участки генов гормона роста позвоночных, отдельная подглава посвящена регуляторным участкам гена гормона роста рыб.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были выбраны четыре вида гольцов рода *Salvelinus* из северо-западной части Тихого Океана: *S. malma* – северная мальма; *S. curilus* – южная азиатская мальма; *S. levanidovi* – голец Леванидова и *S. taranetzi* – голец Таранца. Материал для исследования был взят из коллекции препаратов фиксированных тканей лаборатории генетики Национального научного центра морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН. В работе было использовано по одной особи от каждого вида. Для сравнительного анализа и оценки уровня дивергенции из базы данных GenBank (NCBI) были взяты полные нуклеотидные последовательности генов *gh1* и *gh2* лососевых, для которых известны 5'- и 3'-фланкирующие области: *Oncorhynchus nerka*, *Oncorhynchus tshawytscha*, и *Salmo salar*. В филогенетический анализ были включены последовательности гена *gh2* *Oncorhynchus keta* и *Oncorhynchus mykiss*.

Тотальную ДНК выделяли методом хлороформной экстракции из тканей сердца. В конце проверяли качество выделенной ДНК и оценивали количество полученного материала с помощью электрофореза в агарозном геле. Для амплификации фланкирующих участков генов гормона роста *gh1* и *gh2* гольцов рода *Salvelinus*, с помощью программ Primer Premier 5 (Lalitha, 2000) и Primer 3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>), были разработаны пять пар праймеров (Каменская и др., 2015). Проводили амплификацию с использованием классической полимеразной цепной реакции (ПЦР). Продукты амплификации разделяли в 1,2% агарозном геле и далее использовали для молекулярного клонирования и секвенирования.

Определение нуклеотидных последовательностей фланкирующих участков генов гормона роста проводили с использованием праймеров, входящих в состав набора для клонирования CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, США), и набора реактивов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit V. 3.1 (Applied Biosystems, США), по методике производителя. Полученные продукты ПЦР очищали путем переосаждения этанолом. Капиллярный электрофорез проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism GA3130x1 (Applied Biosystems, США) на базе Кафедры клеточной биологии и генетики, Института Мирового океана ДВФУ и анализаторе ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США) на базе Национального научного центра морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН.

Полученные хроматограммы визуально проверяли на наличие ошибок и объединяли в консенсусные последовательности с помощью пакетов программ: SeqScape V.2.6 (Applied Biosystems, США) и BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999). Анализ нуклеотидных последовательностей и множественное выравнивание проводили с помощью пакета программ MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). При выравнивании использовали алгоритмы ClustalW (Thompson et al., 1994) и Muscle (Edgar, 2004).

Филогенетическую реконструкцию, основанную на полных нуклеотидных последовательностях гена гормона роста, включающих: экзоны, интроны и фланкирующие области генов выполняли Байесовским методом (Bayesian Inference, BI) с помощью программы MrBayes v. 3.2.6 (Ronquist et al., 2012) и методом ближайшего соседства (Neighbor-Joining) в программе MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). Оптимальная модель нуклеотидных замен (T92+G) была выбрана в программе jModelTest 2.1.1 (Darriba et al., 2012) согласно информационному критерию Акаике. Уровень дивергенции (Dxy) последовательностей гена гормона роста оценивали в программе DnaSP 5.10.01 (Librado, Rozas, 2009).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Характеристика регуляторных участков гена гормона роста у гольцов рода *Salvelinus*. Для четырех видов гольцов рода *Salvelinus* были получены нуклеотидные последовательности 5'-фланкирующего промоторного участка паралогичных генов гормона роста *gh1* и *gh2*. Длина промоторного участка гена *gh1* составила: *S. malma* – 1202 п.н., *S. curilus* – 1267 п.н., *S. levanidovi* – 1197 п.н. и *S. taranetzi* – 1207 п.н.. Длина промотора гена *gh2* составила: *S. malma* – 1183 п.н., *S. curilus* – 1193 п.н., *S. levanidovi* – 1172 п.н. и *S. taranetzi* – 1193 п.н.

Промоторы обоих генов-паралогов содержат характерный для большинства генов эукариот высококонсервативный мотив – ТАТА-бокс, в положении –22 п.н. от точки инициации транскрипции. Последовательность ТАТА-бокса консервативна у всех четырех видов гольцов рода *Salvelinus* в обоих генах. Помимо ТАТА-бокса в промоторной области были обнаружены другие регуляторные элементы. К ним относятся А/Т-богатые регионы, содержащие сайты связывания с гипофиз-специфичным транскрипционным фактором Pit-1, а также области промотора, ответственные за взаимодействие с другими активаторами и инициаторами транскрипции, в частности – с рецепторами гормонов.

У гольцов с транскрипционным фактором Pit-1 взаимодействуют четыре сайта связывания: F1 – F4. Последовательность сайта F1, расположенного в положении –39/–61 п.н., консервативна в каждом гене у всех четырех видов гольцов и отличается лишь тремя нуклеотидными заменами между генами *gh1* и *gh2* (рис. 1). Изменения локализованы во

фланкирующих областях сайта и не затрагивают его центральную часть. Сайт связывания F2, расположенный в положениях –118/–140 п.н. в гене *gh1* и –117/–139 п.н. в гене *gh2*, консервативен в каждом гене и имеет две нуклеотидные замены между двумя генами. Третий сайт (F3) находится в положении –155/–183 п.н. в гене *gh1*, и в положении –153/–181 п.н. в гене *gh2*. Последовательность сайта F3 гена *gh1* консервативна у всех четырёх исследованных видов гольцов. В гене *gh2* последовательность сайта F3 у *S. curilus* и *S. malma* идентична и имеет по одной нуклеотидной замене, по сравнению с сайтом F3 *S. taranetzi* и *S. levanidovi*. Положение сайта F4 в гене *gh1* совпадает у всех гольцов –264/–295 п.н.. В гене *gh2* границы сайта F4 у *S. malma*, *S. curilus* и у *S. taranetzi* располагаются на расстоянии –263/–294 п.н., у *S. levanidovi* границы сайта F4 смещены на два нуклеотида –265/–296 п.н.. Сайты F3 и F4 в генах *gh1* и *gh2* имеют большее число нуклеотидных замен по сравнению с сайтами F1 и F2 (рис. 1).

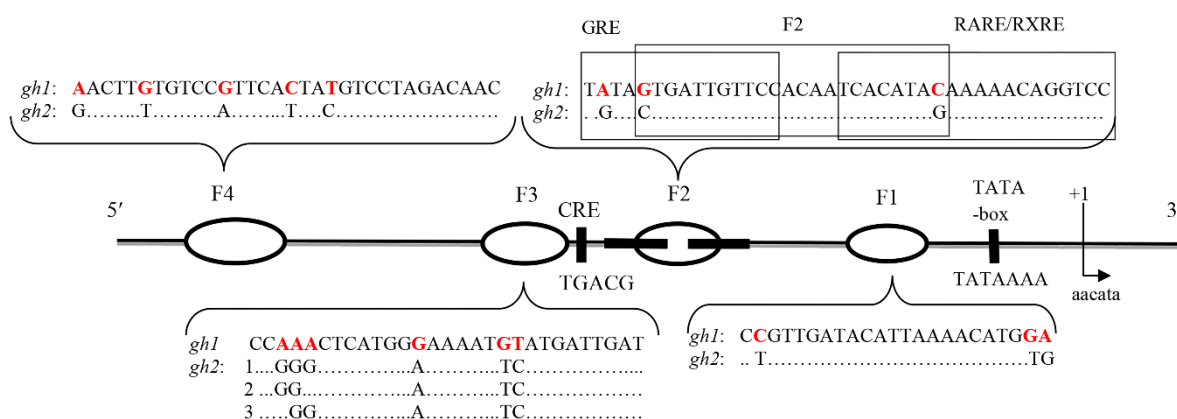


Рисунок 1 – Схема расположения сайтов связывания (F1–F4) с гипофиз-специфическим транскрипционным фактором Pit-1; элементов ответа на цАМФ (CRE) и глюкокортикоиды (GRE) и рецептора ретиноевой кислоты (RARE/RXRE) в промоторной области генов гормона роста гольцов. Цифрами обозначены виды гольцов, имеющие различия в сайте F3 гена *gh2*: 1 – *S. malma* и *S. curilus*; 2 – *S. levanidovi*; 3 – *S. taranetzi* (по: Каменская и др., 2015, с модификациями).

В промоторе обоих генов гормона роста гольцов были найдены элементы ответа на циклический АМФ (CRE), глюкокортикоиды (GRE) и сайты связывания с рецептором ретиноевой кислоты (RARE/RXRE) (рис. 1). Последовательность элемента CRE представлена в промоторах гена гормона роста *gh1* и *gh2* ассиметричным мотивом (TGACG), идентична в двух генах и располагается между сайтами F2 и F3 в положениях –148/–152 п.н. и –147/–151 п.н. в генах *gh1* и *gh2*, соответственно.

Элемент ответа на глюкокортикоиды (GRE) представлен в промоторах гена гормона роста гольцов несовершенным инвертированным повтором (рис. 1). В дистальной части элемента ответа на глюкокортикоиды имеются две нуклеотидные замены, проксимальная

часть элемента ответа консервативна в обоих генах у всех четырех видов. Положение элемента ответа на глюкокортикоиды (GRE): –130/–144 п.н. в гене *gh1* и –129/–143 п.н. в гене *gh2*.

У гольцов сайт связывания с рецептором ретиноевой кислоты (RARE/RXRE) присутствует в промоторной области обоих генов и занимает положение –105/–124 п.н. в гене *gh1* и –106/–125 п.н., в гене *gh2*. Элемент ответа на глюкокортикоиды (GRE) и сайт связывания с рецептором ретиноевой кислоты (RARE/RXRE) частично перекрываются с сайтом F2, ответственным за связывание с транскрипционным фактором Pit-1; элемент GRE перекрывается с дистальной частью, а элемент RARE/RXRE с проксимальной частью сайта F2 (рис. 1).

В процессе исследования промоторных областей паралогичных генов гормона роста гольцов рода *Salvelinus* было установлено, что большинство функциональных сайтов связывания, ответственных за взаимодействие с основными факторами транскрипции, сосредоточено вблизи стартового кодона, поэтому в дальнейший анализ по оценке нуклеотидного разнообразия и дивергенции вошли не все полученные 5'-фланкирующие последовательности, а только участки длиной 300 п.н.

Длина 3'-терминирующей последовательности генов *gh1* и *gh2* была получена только у *S. levanidovi* и составила 1196 п.н. и 606 п.н., соответственно. 3' участок обоих генов включает поли-А последовательность (ААТААА) в положениях +4137 п.н. и +3794 п.н. для *gh1* и *gh2* генов, соответственно. Других потенциальных цис-регуляторных последовательностей и шпилечных участков в терминирующей части обнаружено не было, поэтому анализ не проводили.

3.2. Структура промоторных участков гена гормона роста лососевых.

Исследование промоторных областей паралогичных генов гормона роста *gh1* и *gh2* у четырех видов гольцов рода *Salvelinus* (*S. malma*, *S. curilus*, *S. levanidovi* и *S. taranetzi*) и сравнение их с промоторами генов гормона роста нерки (*O. nerka*), чавычи (*O. tshawytscha*) и атлантического лосося (*S. salar*) показали, что у всех исследованных представителей лососевых на участке длиной 300 п.н. перед точкой инициации транскрипции, сосредоточены ключевые сайты связывания с транскрипционными факторами и другими лигандами, которые отвечают за формирование транскрипционного комплекса.

ТАТА-бокс является обязательным элементом промотора гена гормона роста всех позвоночных животных. При сравнении последовательностей промотора четырех видов гольцов рода *Salvelinus* с промоторами атлантического лосося (*S. salar*), нерки (*O. nerka*) и чавычи (*O. tshawytscha*) было показано, что у этих видов ТАТА-бокс также состоит из шести

нуклеотидов и занимает одинаковое положение относительно точки начала транскрипции в генах *gh1* и *gh2*, соответственно.

Для формирования полноценного транскрипционного комплекса обязательных элементов промотора, таких как ТАТА-бокс, как правило, бывает недостаточно. Необходимо присутствие последовательностей, с которыми будут взаимодействовать определенные тканеспецифичные факторы транскрипции. В гене гормона роста это сайты связывания с гипофиз-специфичным транскрипционным фактором Pit-1.

При сравнении промоторных областей генов гормона роста четырех видов гольцов рода *Salvelinus*, с другими представителями семейства Salmonidae (рис. 2 и 3) были найдены четыре сайта связывания с транскрипционным фактором Pit-1 в генах *gh1* и *gh2* у каждого вида. Нуклеотидная последовательность и положение сайта F1 достаточно консервативны между двумя генами *gh* у всех исследуемых видов лососевых. В сайте F1 гена *gh1* встречается больше различий между видами, чем в гене *gh2*. Замены сосредоточены на концах последовательности и не затрагивают центральную часть сайта F1 (рис. 2).

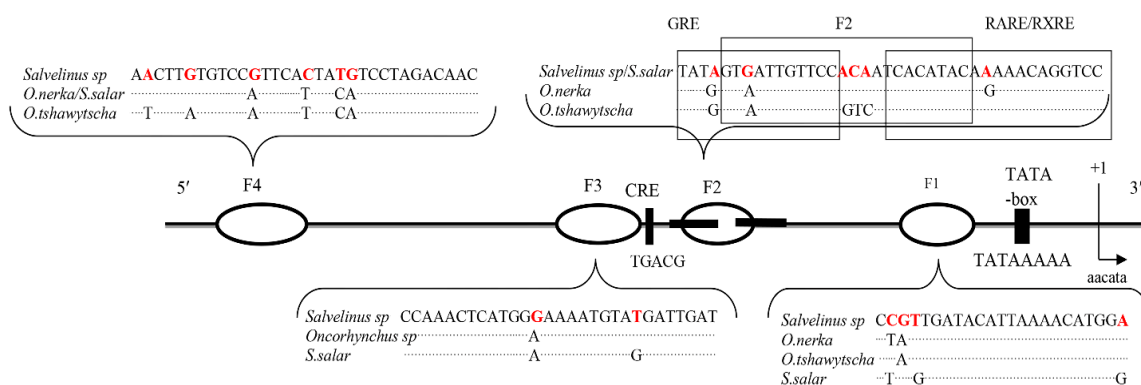


Рисунок 2 – Схема расположения сайтов связывания с транскрипционными факторами в промоторной области гена гормона роста *gh1* у представителей трех родов семейства Salmonidae. В сайтах связывания с гипофиз-специфичным транскрипционным фактором Pit-1 (F1–F4); элемента ответа на глюкокортикоиды (GRE) и рецептора ретиноевой кислоты (RARE/RXRE) отмечены различия в нуклеотидной последовательности между видами.

Сайт F1 в гене *gh2* гольцов совпадает по нуклеотидному составу у чавычи (*O. tshawytscha*) и отличается одним нуклеотидом от сайта F1 нерки (*O. nerka*) и атлантического лосося (*S. salar*) (рис. 3). В сайтах F2 и F3 у лососевых найдено больше различий по сравнению с сайтом F1. Сайт F4 в промоторе гена *gh1* оказался самым переменчивым. По четыре замены встречается в этом сайте у нерки (*O. nerka*) и атлантического лосося (*S. salar*) и пять замен у чавычи (*O. tshawytscha*). В сайт F4 гена *gh2* три замены наблюдается у представителей рода *Oncorhynchus* и две замены у атлантического лосося (*S. salar*) относительно сайта F4 гольцов рода *Salvelinus*.

Помимо сайтов связывания с тканеспецифичными факторами транскрипции в регуляторной области всех исследованных видов лососевых присутствуют сайты связывания с другими лигандами. С проксимальной частью сайта F2 совпадает участок последовательности RARE/RXRE, а большая часть элемента ответа на глюкокортикоиды GRE перекрывает дистальную часть сайта F2. Свободной от перекрытия в сайте F2 остается область из четырех нуклеотидов, которая у нерки и чавычи в генах *gh1* и *gh2* содержит разные типы мутаций (транзиции и трансверсии). Возможно, именно мутации обеспечивают пластичность данного участка при взаимодействии с транскрипционными факторами.

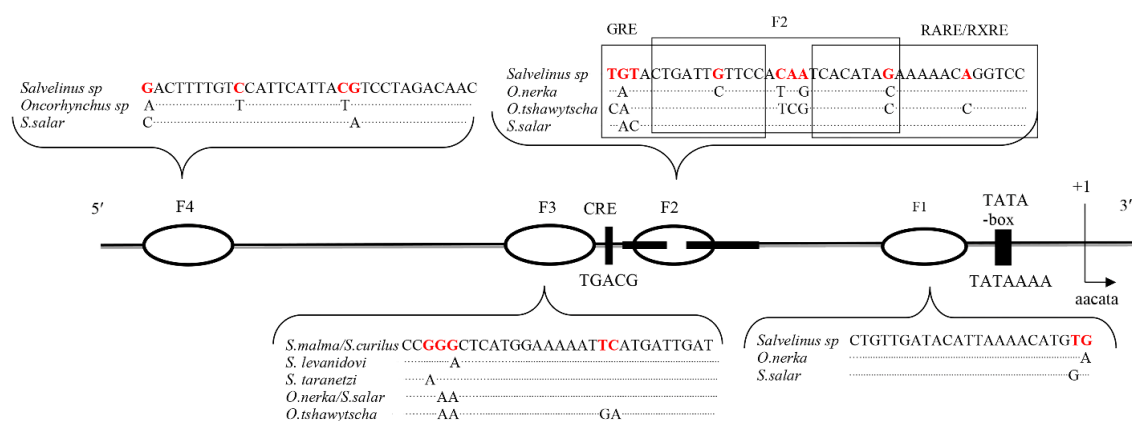


Рисунок 3 – Схема расположения сайтов связывания с транскрипционными факторами в промоторной области гена гормона роста *gh2* у представителей трех родов семейства Salmonidae. В сайтах связывания с гипофиз-специфичным транскрипционным фактором Pit-1 (F1–F4); элементе ответа на глюкокортикоиды (GRE) и рецепторе ретиноевой кислоты (RARE/RXRE) отмечены различия в нуклеотидной последовательности между видами.

Участки, ответственные за взаимодействие с рецептором ретиноевой кислоты RARE/RXRE консервативны в обоих генах-паралогах у всех исследованных видов лососевых, за исключением гена *gh2* чавычи (*O. tshawytscha*). В последовательности, разделяющей участки связывания с рецептором, имеются единичные замены в обоих генах гормона роста (рис. 3).

Элемент ответа на глюкокортикоиды (GRE), как и сайт связывания с рецептором ретиноевой кислоты, состоит из двух участков. Проксимальная часть элемента GRE (TGTTCC), которая совмещена с сайтом F2, в гене *gh1* идентична у всех видов лососевых, а в гене *gh2* у нерки имеется одна замена. Дистальная часть элемента ответа на глюкокортикоиды в гене *gh1* содержит только одну замену. В гене *gh2* встречается несколько замен в дистальной области.

Элемент ответа на цАМФ (CRE) присутствует в промоторах генов гормона роста *gh1* и *gh2* всех исследованных видов лососевых. У нерки (*O. nerka*), чавычи (*O. tshawytscha*) и атлантического лосося (*S. salar*) элемент CRE, также как и у четырех видов гольцов рода *Salvelinus*, представлен в промоторе асимметричной последовательностью (TGACG), с

которой взаимодействует транскрипционный фактор CREB. В последовательностях CRE, GRE и RARE/RXRE не найдено никаких инсерций или делеций, которые бы нарушали целостность функциональных мотивов. Положение элементов ответа на цАМФ, глюкокортикоиды и ретиноиды совпадает как в гене *gh1*, так и в гене *gh2*.

Таким образом, в результате сравнения нуклеотидных последовательностей промоторных областей генов гормона роста *gh1* и *gh2* гольцов рода *Salvelinus* с промоторами атлантического лосося (*S. salar*), нерки (*O. nerka*) и чавычи (*O. tshawytscha*) было показано, что оба гена-паралога содержат одинаковый набор сайтов связывания с факторами транскрипции. У всех исследованных видов лососевых в промоторах обоих генов встречаются ТАТА-бокс, четыре сайта связывания с гипофиз-специфичным транскрипционным фактором Pit-1 (F1–F4), сайты связывания с транскрипционным фактором CREB, с рецепторами глюкокортикоидов и ретиноевой кислотой. Расположение данных сайтов на небольшом расстоянии друг от друга дают основания предполагать, что они формируют ядро промотора гена гормона роста и играют ключевую роль в инициации транскрипции.

3.3. Изменчивость регуляторной области. Распределение изменчивых сайтов оценивалось в 5'-фланкирующем участке длиной 300 п.н. как между видами внутри рода *Salvelinus*, (рис. 4) так и при сравнении промоторных последовательностей гольцов с промоторами генов гормона роста: нерки (*O. nerka*), чавычи (*O. tshawytscha*) и атлантического лосося (*S. salar*) (рис. 5).

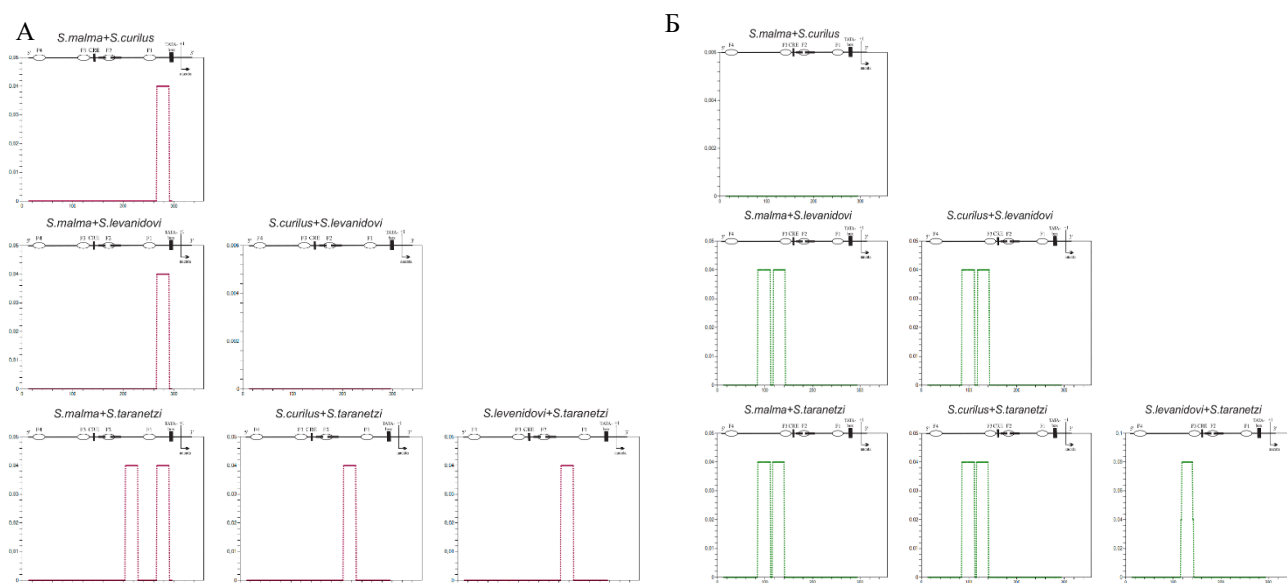


Рисунок 4 – Анализ уровня дивергенции промоторных участков генов *gh1* и *gh2* гольцов рода *Salvelinus* методом скользящего окна. Размер рамки – 25 п.н., длина шага – 1 п.н. По оси *x* отмечены положения нуклеотидов, по оси *y* – уровень дивергенции. А – промоторные участки гена *gh1*. Б – промоторные участки гена *gh2*.

Из рисунка 4 видно, что промоторные участки в обоих генах представителей рода *Salvelinus* очень консервативны по всей длине. Значения дивергенции 0,00218 и 0,00654 для промоторов генов *gh1* и *gh2*, соответственно. В гене *gh1* наблюдаются два участка изменчивости: один непосредственно прилегает к ТАТА-боксу, второй локализован между сайтами F1 и F2 (рис. 4, А). Два участка с повышенным уровнем дивергенции встречаются и в гене *gh2*, но они отличаются по своей локализации. Один находится в непосредственной близости к сайту F3, второй участок располагается между сайтами F3 и F4 (рис. 4, Б).

В результате сравнительного анализа промоторных областей генов *gh1* и *gh2* гольцов рода *Salvelinus* с другими представителями семейства Salmonidae, были показаны множественные участки дивергенции (рис. 5).

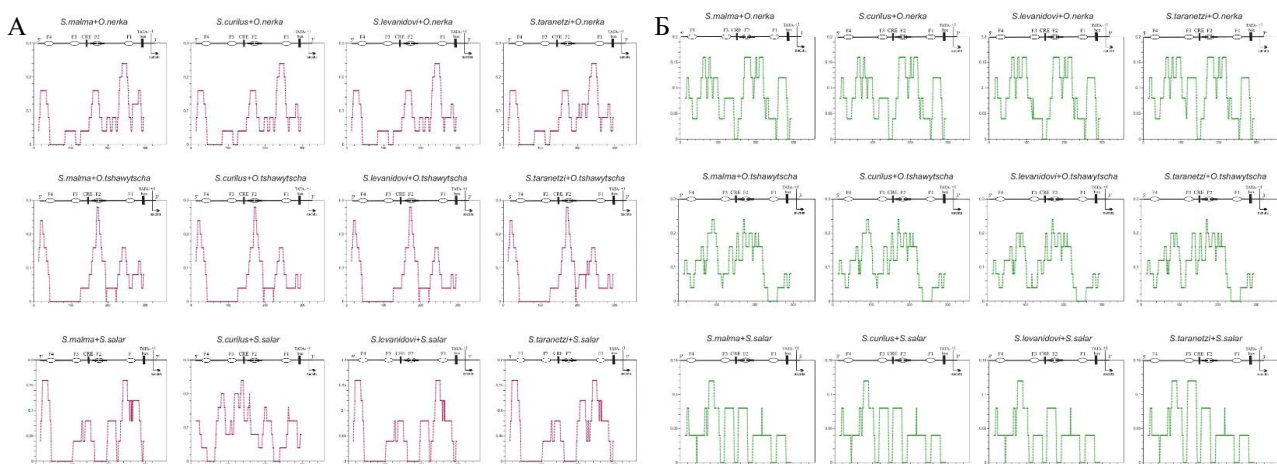


Рисунок 5 – Анализ уровня дивергенции промоторных участков генов *gh1* и *gh2* представителей трех родов семейства Salmonidae (*Oncorhynchus*, *Salmo*, *Salvelinus*) методом скользящего окна. Размер рамки – 25 п.н., длина шага – 1 п.н. По оси *x* отмечены положения нуклеотидов, по оси *y* – уровень дивергенции (Dxy). А – промоторные участки гена *gh1*. Б – промоторные участки гена *gh2*.

В промоторе гена *gh1* наиболее изменчивые участки можно наблюдать в сайте F2 и вблизи сайта F4, при сравнении четырех видов гольцов рода *Salvelinus* с чавычей (*O. tshawytscha*) (рис. 5, А). Однако, сравнивая последовательности промотора гольцов рода *Salvelinus* с неркой (*O. nerka*) участок с наибольшим уровнем дивергенции находится рядом с сайтом F1. Последовательности промотора гена *gh1* северной мальмы (*S. malma*), гольца Леванидова (*S. levanidovi*) и гольца Таранца (*S. taranetzi*) при сравнении с атлантическим лососем (*S. salar*) имеют два наиболее выраженных участка дивергенции: один прилегает к сайту F1, другой к сайту F4. Консервативность сохраняют участки ТАТА-бокса, сайта F1 и элемент ответа на цАМФ.

Последовательность промоторной области гена *gh2* оказалась более изменчива, по сравнению с промоторной областью гена *gh1* (рис. 5, Б). Участки дивергенции представлены не единичными пиками, а протяженными областями. Сравнение четырех видов гольцов рода *Salvelinus* с неркой (*O. nerka*) и чавычей (*O. tshawytscha*) показывает, что один участок

дивергенции располагается между сайтами F3 и F4, а другой включает в себя сайт F2 и часть прилегающей к нему последовательности со стороны сайта F1. При сравнении четырех видов гольцов рода *Salvelinus* с атлантическим лососем (*S. salar*) на участке между сайтами F3 и F4 наблюдается один четко выраженный пик. В паре видов *S. taranetzi* – *S. salar* можно выделить еще один пик, который приходится на сайт F3. Несмотря на повышенный уровень дивергенции, ТАТА-боксы, сайт F1, элементы RARE/RXRE и CRE остаются достаточно консервативными.

3.4. Изменчивость транскрибируемой части. Результаты анализа методом скользящего окна транскрибируемой части паралогичных генов гормона роста у гольцов рода *Salvelinus* и их сравнение с генами гормона роста других лососевых рыб представлены на рисунке 6. Как видно из рисунка 6 А, кодирующая часть гена *gh1* у гольцов рода *Salvelinus* имеет очень низкий уровень дивергенции. Консервативные участки, как правило, ассоциированы с экзонами, пики вариабельных участков приходятся на последовательности интронов. Однако некоторые интроны имеют очень низкий уровень дивергенции (рис. 6, А). Например, при сравнении северной мальмы (*S. malma*) с гольцом Леванидова (*S. levanidovi*) на достаточно протяженном участке последовательности, которая включает часть интрона D, экзон 5, интрон E целиком и экзон 6, полностью отсутствуют различия.

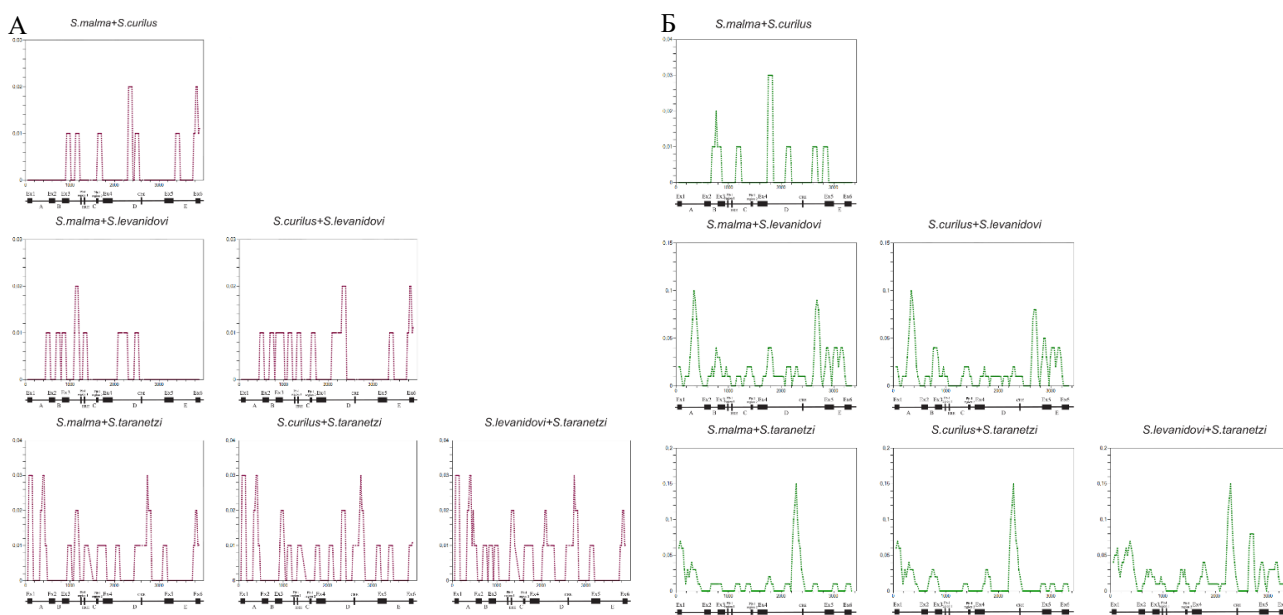


Рисунок 6 – Анализ уровня дивергенции транскрибируемой части генов *gh1* и *gh2* гольцов рода *Salvelinus* методом скользящего окна. Размер рамки – 100 п.н., длина шага – 25 п.н. По оси x отмечены положения нуклеотидов, по оси y – уровень дивергенции (Dxy). А – транскрибируемая часть гена *gh1*. Б – транскрибируемая часть гена *gh2*.

В гене *gh2* у гольцов рода *Salvelinus* консервативные интроны практически не встречаются. Исключение составляют северная мальма (*S. malma*) и южная азиатская мальма (*S. curilus*): при сравнении этих видов интроны А и Е совсем не имеют различий, а в интронах С и D встречаются небольшие консервативные участки (рис. 6, Б). У остальных

видов гольцов рода *Salvelinus* последовательности интронов изменчивы по всей длине. У гольцов в гене *gh1* наиболее высокие пики можно наблюдать в интронах А, D и E, а в гене *gh2* только в интронах А и D. Интрон E в гене *gh2* имеет средние по высоте пики. Ген *gh1* у гольцов более консервативен по сравнению с геном *gh2*.

Сравнивая транскрибируемые участки генов *gh1* и *gh2* гольцов рода *Salvelinus* отдельно с неркой (*O. nerka*), чавычей (*O. tshawytscha*) и атлантическим лососем (*S. salar*) (рис. 7), можно увидеть, что частота пиков увеличивается, участков с высоким уровнем дивергенции становится больше, ассоциированы такие участки в основном с последовательностями интронов, при этом экзоны сохраняют высокий уровень консервативности.

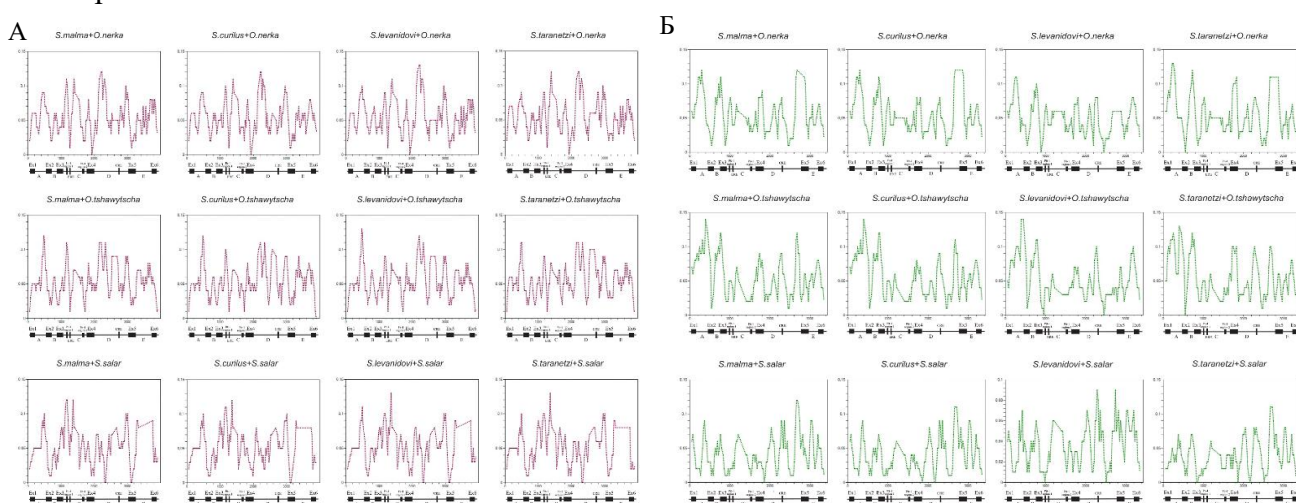


Рисунок 7 – Анализ уровня дивергенции транскрибируемой части генов *gh1* и *gh2* представителей трех родов семейства Salmonidae (*Oncorhynchus*, *Salmo*, *Salvelinus*) методом скользящего окна. Размер рамки – 100 п.н., длина шага – 25 п.н. По оси x отмечены положения нуклеотидов, по оси y – уровень дивергенции (Dxy). А – транскрибируемая часть гена *gh1*. Б – транскрибируемая часть гена *gh2*.

При сравнении гена *gh1* четырех видов гольцов рода *Salvelinus* с неркой (*O. nerka*) (рис. 7, А) участки наибольшей дивергенции встречаются в интронах С и D. Интрон А имеет самый высокий пик изменчивости при сравнении последовательностей гена *gh1* гольцов рода *Salvelinus* с чавычей (*O. tshawytscha*). Сравнивая ген *gh1* атлантического лосося (*S. salar*) и гольцов рода *Salvelinus*, видно, что общий уровень дивергенции немного меньше, чем при сравнении последовательностей гольцов с видами рода *Oncorhynchus*.

В транскрибируемой части гена *gh2*, как и в транскрибируемой части гена *gh1*, наблюдается достаточно высокий уровень дивергенции (рис. 7, Б). В тоже время, при сравнении четырех видов гольцов рода *Salvelinus* с видами рода *Oncorhynchus* самые высокие пики приходятся на интроны А и В. У атлантического лосося (*S. salar*) и гольцов рода *Salvelinus* при сравнении последовательностей гена *gh2* самым изменчивым оказался интрон D. Стоит отметить, что интроны вариабельны не на всем протяжении последовательности, также встречаются и консервативные области. На рисунке 7 видно, что

пики изменчивости приходятся преимущественно на центральные части интронов, а участки, прилежащие к концам экзонов, более консервативны. Такое распределение может быть обусловлено тем, что все интроны фланкированы одинаковыми сайтами сплайсинга (на 5'-концах интронов – GT, на 3'-концах – AG).

В случае большинства дуплицированных генов одна копия, как правило, сохраняет первоначальную функцию, а другая последовательность либо перестает функционировать, либо приобретает новую функцию. Две копии гена гормона роста появились еще у предковой формы лососевых рыб в результате процесса тетраплоидизации и сохранились на протяжении всего времени дивергенции видов в этой группе (McKay et al., 2004). Для описанных ранее последовательностей гена гормона роста известно, что обе копии не несут дополнительных стоп-кодонов, имеют открытые рамки считывания и кодируют одинаковое количество аминокислотных остатков (Agellon et al., 1988; Male et al., 1992; Du et al., 1993; Devlin, 1993). Все эти особенности указывают на то, что оба гена могли сохранить способность функционировать, несмотря на длительное существование в геноме.

В результате анализа методом скользящего окна двух копий гена гормона роста представителей трех родов семейства Salmonidae (*Oncorhynchus*, *Salmo*, *Salvelinus*) показано, что между разными видами внутри одного семейства последовательности генов *gh1* и *gh2* слабо изменчивы. Уровень дивергенции транскрибируемой части гена *gh1* при сравнении четырех видов гольцов оказался низкий и составил 0,00364. Уровень дивергенции в гене *gh2* при сравнении последовательностей четырех видов гольцов оказался в несколько раз выше 0,01064. Связано это с тем, что последовательности транскрибируемой части гена *gh2* гольцов рода *Salvelinus* оказались более вариабельны между видами. В свою очередь эти данные подтверждают, что одна из копий гена находится под меньшим давлением отбора и накапливает мутации с высокой частотой. При сравнении транскрибируемых последовательностей генов гормона роста у гольцов можно увидеть, что ген *gh1* более консервативен по сравнению с геном *gh2* (рис. 6). В меньшей степени эта закономерность прослеживается при сравнении генов *gh1* и *gh2* с другими видами лососевых.

Уровень дивергенции, полученный для промоторной области паралогичных генов гормона роста, соответствует некоторым закономерностям, установленным для транскрибируемой части гена. При сравнении регуляторных участков среди четырех видов гольцов рода *Salvelinus* промотор гена *gh1* ($D_{xy}=0,00218$) оказался более консервативен, чем промотор гена *gh2* ($D_{xy}=0,00654$). Согласно рисункам 4А и 4Б, в промоторах обоих генов наблюдается всего два пика с максимальным уровнем дивергенции, но их положение между генами не совпадает. Когда в анализ были добавлены последовательности промотора нерки (*O. nerka*), чавычи (*O. tshawytscha*) и атлантического лосося (*S. salar*), то уровень дивергенции промоторной области гена *gh1* также оказался ниже, по сравнению с промоторной областью гена *gh2* $D_{xy}=0,03523$ и $D_{xy}=0,03971$, соответственно. Несмотря на

то, что промотор гена *gh2* более изменчив, чем промоторная область гена *gh1*, количество сайтов связывания с транскрипционными факторами, необходимое для успешной инициации транскрипции, сохраняется в обоих генах у всех исследованных видов. Уровень изменчивости в промоторных областях оказался выше, чем уровень изменчивости транскрибируемой части обоих генов-паралогов.

Согласно данным, полученным Паньковой с соавторами (Панькова и др., 2017), отбор на гены гормона роста лососевых действует с разной силой, в результате в одном из паралогов мутаций возникают с более высокой частотой, что приводит к увеличению его уровня изменчивости. В свою очередь, данные, полученные по оценке дивергенции промоторного участка и транскрибируемой части паралогичных генов *gh1* и *gh2* методом скользящего окна показывают, что оба гена у лососевых достаточно консервативны, имеют низкий уровень дивергенции даже при сравнении видов внутри одного семейства. Консервативное строение промоторной области наблюдается на протяжении всего времени дивергенции лососевых и может служить еще одним свидетельством функциональности обоих генов-паралогов и их общего происхождения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование структуры промоторных областей паралогичных генов гормона роста *gh1* и *gh2* у четырех видов гольцов рода *Salvelinus* (*S. malma*, *S. curilus*, *S. levanidovi* и *S. taranetzi*) и сравнение их с промоторами генов гормона роста нерки (*O. nerka*), чавычи (*O. tshawytscha*) и атлантического лосося (*S. salar*) показали, что на участке длиной 300 п.н. перед точкой инициации транскрипции, сосредоточены ключевые сайты связывания с транскрипционными факторами и другими лигандами, которые отвечают за формирование полноценного транскрипционного комплекса и эффективную тканеспецифичную экспрессию гена гормона роста в соматотрофах. В промоторах обоих генов всех исследованных видов лососевых встречаются последовательность ТАТА-бокса, сайты связывания с гипофиз-специфичным транскрипционным фактором Pit-1 (F1–F4), сайты связывания с транскрипционным фактором CREB (CRE), с рецепторами глюкокортикоидов (GRE) и ретиноевой кислотой (RARE/RXRE). Расположение данных сайтов на небольшом расстоянии друг от друга дает основания предполагать, что они формируют ядро промотора гена гормона роста и играют важную роль в инициации транскрипции. Отсутствие существенных различий в структурных элементах промотора указывает на возможность сохранять функцию синтеза активного белка с обоих генов паралогов. Это может иметь важное значение для лососевых рыб, поскольку копии гена гормона роста могут включаться на разных стадиях жизненного цикла лососевых или при изменении условий окружающей среды, например, при колебаниях осмотического давления в процессе миграций.

ВЫВОДЫ

1. У четырех видов гольцов рода *Salvelinus*: северная мальма – *S. malma*, южная азиатская мальма – *S. curilus*, голец Леванидова – *S. levanidovi*, голец Таранца – *S. taranetzi* промоторные участки в паралогичных генах *gh1* и *gh2* представлены высококонсервативными последовательностями и включают сайты связывания необходимые для взаимодействия с тканеспецифичными транскрипционными факторами и другими лигандами.

2. Сравнительный анализ 5'-фланкирующих участков паралогичных генов гормона роста *gh1* и *gh2* четырех видов гольцов рода *Salvelinus* с последовательностями нерки (*O. nerka*), чавычи (*O. tshawytscha*) и атлантического лосося (*S. salar*) показал, что у всех исследованных видов в промоторе содержится одинаковый набор структурных элементов, необходимых для сборки транскрипционного комплекса.

3. У всех семи исследованных видов лососевых в обоих паралогичных генах на участке промотора длиной 300 п.н. встречаются ТАТА-боксы, сайты связывания с гипофиз-специфичным транскрипционным фактором Pit-1 (F1–F4), сайты связывания с транскрипционным фактором CREB (CRE), с рецепторами глюкокортикоидов (GRE) и с рецепторами ретиноевой кислоты (RARE/RXRE). Расположение данных сайтов на небольшом расстоянии друг от друга дает основания предполагать, что они формируют ядро промотора гена гормона роста и играют ключевую роль в инициации транскрипции.

4. В результате сравнительного анализа было показано, что последовательность и положение ТАТА-боксов, GRE и CRE-мотивов, RARE/RXRE и F1 сайтов, консервативны в двух генах-паралогах у всех исследованных видов лососевых. Положение сайтов F2–F4 между генами различно.

5. Паралогичные гены гормона роста *gh1* и *gh2* четырех видов гольцов рода *Salvelinus* нерки, чавычи и атлантического лосося содержат в своем промоторе четыре сайта связывания с гипофиз-специфичным транскрипционным фактором Pit-1. Такое количество сайтов связывания с Pit-1 на коротком участке промотора, прилегающем непосредственно к транскрибируемой части гена, встречается только у лососевых рыб.

6. Некоторые регуляторные элементы (CRE и Pit-1) встречаются не только в промоторных участках, но и в структурной части гена, в частности – в интронах. Возможно, что они кооперативно взаимодействуют друг с другом в составе хроматина.

7. Низкий уровень дивергенции указывает на общее происхождение паралогичных генов гормона роста и сохранение функционального потенциала обоих генов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. **Каменская Д.Н.**, Панькова М.В., Атопкин Д.М., Брыков Вл.А. Гены гормона роста у рыб: доказательства функциональности паралогичных генов гольца *Salvelinus levanidovi* // Молекулярная биология. 2015. Т. 49, № 5. С. 770–776.
2. **Каменская Д.Н.**, Панькова М.В., Атопкин Д.М., Брыков Вл.А. Дивергенция паралогичных генов гормона роста и цис-регуляторных участков у лососевых рыб // Молекулярная биология. 2017. Т. 51, № 2. С. 314–323.
3. **Каменская Д.Н.**, Брыков В.А. Гены гормона роста у рыб: структура и дивергенция // Биология моря. 2020. Т. 46, № 4. С. 219–230.
4. **Каменская Д.Н.**, Панькова М.В., Брыков Вл.А. Изменчивость экзонов и интронов в генах гормона роста у лососевых рыб // Молекулярная биология. 2020. Т. 54, № 6. С. 975–979.

Работы в материалах конференций:

5. **Kamenskaya D.N.**, Pankova M.V., Atopkin D.M., Brykov V.A. Divergence of paralogous growth hormone genes in salmonids // The 8th International Young Scientists School “Systems Biology and Bioinformatics” – SBB-2016, 22–25 August 2016, Novosibirsk, Russia. – Novosibirsk: Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS, 2016. P. 35.
6. **Kamenskaya D.N.**, Pankova M.V., Atopkin D.M., Brykov V.A. Divergence of paralogous growth hormone genes in salmonids // The 10th International Conference on Bioinformatics of genome regulation and structure\Systems biology – BGRS/SB 2016, 29 August – 2 September, 2016, Novosibirsk, Russia. – Novosibirsk: Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS, 2016. P. 115.
7. **Каменская Д.Н.**, Панькова М.В., Атопкин Д.М., Брыков В.А. Сравнительный анализ генов гормона роста у лососевых рыб // Региональная научно-практическая конференция студентов, аспирантов и молодых ученых по естественным наукам, 11 – 30 Апреля 2017, Владивосток, Россия. Владивосток: – Дальневосточный федеральный университет, 2017. С. 226–227.
8. **Kamenskaya D.N.**, Pankova M.V., Atopkin D.M., Brykov V.A. Isolation and characterization char’s growth hormone genes and their application in biotechnology // International Conference scientific and technological developments of research and monitoring of marine

biological resources, 22–24 May 2017, Vladivostok, Russia. – Vladivostok: Far Eastern Federal University, 2017. P. 58.

9. **Kamenskaya D.N.**, Pankova M.V., Brykov V.A. Promotor region in Salmonidae growth hormone gene // Modern Achievements in Population, Evolutionary and Ecological Genetics: International Symposium, Vladivostok – Vostok Marine Biological Station, September 8–13, 2019: Program & Abstracts. – Vladivostok: A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, FEB RAS, 2019. P. 28.

10. **Kamenskaya D.N.**, Brykov V.A Exon and intron divergence in salmonids growth hormone genes // Modern Achievements in Population, Evolutionary and Ecological Genetics: International Symposium, 8–12 September 2022, Vladivostok – Vostok Marine Biological Station. – Vladivostok: A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, FEB RAS, 2022. P. 38.

11. **Каменская Д.Н.**, Брыков Вл.А. Сравнительный анализ генов гормона роста у лососевых рыб // Морская биология в 21 веке: систематика, генетика, экология морских организмов»: тезисы докладов Всероссийской конференции (памяти академика Олега Григорьевича Кусакина), 20–23 сентября 2022 г., Владивосток, Россия. – Владивосток: НИЦМБ ДВО РАН, 2022. С. 152–153.

12. **Каменская Д.Н.**, Брыков В.А. Изменчивость нуклеотидного состава в генах гормона роста лососевых рыб // Современные проблемы биологической эволюции: материалы IV Международной конференции к 875-летию Москвы и 115-летию со дня основания Государственного Дарвиновского музея. 17–20 октября 2022, г. Москва. – М.: ГДМ, 2022. – С. 69–70.

КАМЕНСКАЯ
Дарья Николаевна

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ
ПАРАЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ ГОРМОНА РОСТА У ЛОСОСЕВЫХ РЫБ**

1.5.7. Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук