

На правах рукописи



ПЛОШНИЦА Анна Ивановна

**ВЛИЯНИЕ ОСТРОВНОЙ ИЗОЛЯЦИИ И
ЭФФЕКТА «БУТЫЛОЧНОГО ГОРЛЫШКА» НА ГЕНЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИМОРФИЗМ КОМАНДОРСКИХ ПЕСЦОВ
(*ALOPEX LAGOPUS BERINGENSIS* И *A. L. SEMENOV*)**

03.02.04 – зоология

03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена на кафедре зоологии позвоночных биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
Гольцман Михаил Ефимович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Холодова Марина Владимировна
Институт проблем экологии и
эволюции им. А.Н. Северцова
РАН

кандидат биологических наук
Семенова Серафима
Константиновна Институт
биологии гена РАН

Ведущая организация:

Зоологический институт РАН

Защита диссертации состоится 24 мая 2010 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета Д 501.001.20 при Московском государственном университете им. М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. М-1.
Факс: 8 (495) 939 17 46; эл. почта: tadorna@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

Автореферат диссертации разослан 22 апреля 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



А.Б. Поповкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Дифференциация популяций и видообразование на океанических островах служит предметом изучения зоологов, начиная с Дарвина и Уоллеса (см., например, MacArthur, Wilson, 1967, van der Geer *et al.*, 2010). Изоляция, простые экосистемы, небольшие размеры популяций и высокая скорость эволюционных изменений делают островные виды привлекательными для исследователей. Однако островные популяции особенно уязвимы к любым средовым изменениям, и гораздо беззащитнее материковых перед антропогенными угрозами (Alcover *et al.*, 1998, Frankham, 1998). Исследование изменений, происходящих при сокращении небольших изолированных популяций, тем более актуально, что все больше фрагментированных материковых популяций превращается в «островные» из-за непреодолимых антропогенных преград. Радикальные изменения и исчезновения популяций происходят не на эволюционных временах, а на протяжении лишь десятков лет, а иногда значительно быстрее. Процессы, происходящие на этих временах, то есть временах поколений, изучены очень слабо (Johnson, 2003). Морфологические индикаторы слишком инерционны, а экологические характеристики, напротив, слишком изменчивы и бывают редко известны для более чем десяти поколений.

Командорские песцы представляют исключительно удобную модель для исследования этих процессов. Популяции изолированы на океанических островах, по крайней мере, в течение нескольких десятков тысяч лет, на краю ареала, в условиях относительно простой экосистемы, но с исключительно стабильными и богатыми кормовыми ресурсами (Гольцман и др., 2003; Goltzman *et al.*, 2005).

Одна из командорских популяций, популяция о-ва Медный в 1970-х годах прошла через демографическое «бутылочное горлышко» из-за внезапной эпизоотии ушной чесотки (Goltzman *et al.*, 1996). После этого популяция восстановилась до 10-15% былой численности и стабильно сохраняет этот уровень в течение 30 лет. Сейчас эта популяция занесена в Красную Книгу РФ, в категорию редкости 1, как находящаяся под угрозой исчезновения (Гольцман, Крученкова, 2001). История командорских песцов хорошо документирована, а в музее хранится коллекция черепов, добытых около 100 лет назад. Кроме того, в начале прошлого века были предприняты успешные попытки интродукции командорских песцов на острова Ушишир Курильской гряды (Воронов, 1963; Костенко и др., 2004). Это дает уникальную возможность испытать применимость молекулярно-генетического подхода в исследовании популяционных процессов в масштабе времени десятков поколений, и изучить влияние островной изоляции и прохождения популяции через «бутылочное горлышко».

Нейтральные маркеры, такие как D-петля мтДНК или микросателлиты, информативны в исследовании филогенетических связей, популяционной истории, молекулярных часов, потока генов и родства (Blouin *et al.*, 1996; Nabata *et al.*, 2004; Bruford, Wayne, 1993; Selkoe, Toonen, 2006; Balloux, Lugon-Moulin, 2002; Kasapidis *et al.*, 2005; Lemay, Bouldin, 2009). Но они не могут дать полноценную информацию о селективных процессах, протекающих в популяции, и ее адаптивных возможностях. В последнее время особый интерес привлекают гены ГКГ,

полиморфизм которых важен в формировании адекватного иммунного ответа на разнообразные патогены (Klein, 1986; Parham & Ohta, 1996; Aranius *et al.*, 1997; Ploegh & Watts 1998; Hedrick, 1999; Sommer, 2005). Предполагается, что балансирующий отбор, действующий в генах ГКГ и направленный на поддержание высокого уровня разнообразия, способен снижать эффект дрейфа генов и замедлять скорость фиксации аллелей (Richman, 2000).

Цель и задачи. Целью работы было исследовать влияние островной изоляции и эффекта «бутылочного горлышка» на нейтральный и адаптивно значимый генетический полиморфизм командорских песцов.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Описать нейтральный полиморфизм D-петли мтДНК и микросателлитов у песцов предковой популяции о-ва Медный и микросателлитов у современных островных и континентальных песцов.
2. Определить полиморфизм адаптивно значимых последовательностей DRB и DQB генов II класса ГКГ у предковых и современных островных, а также континентальных песцов.
3. Оценить интенсивность балансирующего отбора в антигенсвязывающем регионе генов II класса ГКГ.
4. Оценить влияние островной изоляции и демографического «бутылочного горлышка» на полиморфизм адаптивно значимых генов II класса ГКГ и нейтральных маркеров песцов.
5. На основании анализа мтДНК выяснить происхождение песцов о-ва Янкича (о-ва Ушишир Курильской гряды).

Научная новизна. Впервые описан полиморфизм DRB и DQB генов II класса ГКГ у песца (*Alopex lagopus*). Получены данные о разнообразии нейтральных (D-петля мтДНК и микросателлиты) и селективных (гены II класса ГКГ) маркеров в исторической популяции песцов о-ва Медный до последнего демографического «бутылочного горлышка». Впервые исследовано влияние прохождения популяции через «бутылочное горлышко» на генетическое разнообразие генов ГКГ на основе прямого сравнения данных по разнообразию в современных образцах с таковым в исторических образцах животных, добытых до спада численности. С помощью молекулярно-генетических методов проведено сравнение командорских популяций песцов между собой и с материковыми популяциями. Исследован уровень полиморфизма в генетических маркерах, находящихся под действием разных селективных сил. Найдены генетические подтверждения того, что современные песцы о-ва Янкича происходят с о-ва Медный.

Теоретическое и практическое значение результатов работы. Сравнительное исследование островных и континентальных песцов позволило оценить влияние островной изоляции на формирование современной генетической изменчивости популяций песцов Командорских островов. Показано, что генетический полиморфизм в популяциях островных песцов значительно ниже, чем у континентальных, при этом более крупная по размерам популяция о-ва

Беринга способна сохранять более высокий генетический полиморфизм как в нейтральных, так и в селективных маркерах, чем меньшая популяция о-ва Медный. Полученные данные важны для понимания того, как демографические события (эффект «бутылочного горлышка») отражаются на разнообразии нейтральных генетических локусов и локусов, находящихся под действием балансирующего отбора. Понимание микроэволюционных процессов в генах ГКГ, которые определяют способность организма формировать иммунный ответ, – важный этап в исследовании эволюции иммунной системы. Полученные данные являются важными сведениями об адаптивных способностях островных популяций и имеют большое значение в определении дальнейших путей их охраны.

Апробация работы. Основные результаты диссертации доложены на международных симпозиумах «Сохранение разнообразия животных и охотничье хозяйство России» (Москва, 2006), «Молекулярно-генетические основы сохранения биоразнообразия млекопитающих Голарктики» (Черноголовка, 2007), а также на 87^{ой} ежегодной встрече Американской Ассоциации Маммологов (87th annual meeting of American Society of Mammalogists – Albuquerque, USA, 2007), на 6^{ом} и 7^{ом} международных симпозиумах по физиологии, поведению, генетике и охране диких животных (International Zoo and Wildlife Research Conference on Behaviour, Physiology and Genetics – Berlin, Germany, 2007, 2009) и на 1^{ой} международной конференции, посвященной генетике сообществ (1st Community Genetics meeting – Manchester, UK, 2010). Результаты работы обсуждались на лабораторных семинарах кафедры зоологии позвоночных биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова и в исследовательской группе иммуногенетики IZW в Берлине.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 5 статей, из них 1 в журнале из списка ВАК.

Объем и структура работы. Текст диссертации изложен на 114 страницах и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования и их обсуждение, выводы и список литературы. Работа иллюстрирована 10 рисунками и 10 таблицами. Список литературы включает 228 источников, в том числе 200 – на иностранных языках.

Благодарности. Я признательна всем, кто помогал на разных этапах этой работы. Прежде всего, хочу выразить огромную благодарность моему научному руководителю М.Е.Гольцману, а также моим руководителям в лабораториях университета Манчестера (Великобритания) L.J.Kennedy и заведующей исследовательской группой иммуногенетики IZW (Германия) S.Sommer за чуткое руководство, терпение, внимание и помощь в работе. Хочу особо поблагодарить М.В. Холодову, А.А.Банникову, А.А.Колесникова и Н.А.Формозова за ценные рекомендации, полезные замечания и помощь в редакции работы. Я признательна всем тем, кто помогал в организации и участвовал в экспедициях на Командорские острова: С.В.Загребельному, Н.Н.Павлову, Л.О.Дорониной, А.Н.Шиенку. Особая благодарность всем тем, кто осуществлял помощь в проведении лабораторных

анализов, а также давал ценные рекомендации и советы, делился опытом: Е.Л.Джикии, П.А.Сорокину, В.А.Орехову, С.В.Найденко, А.С.Карнаухову. Большое спасибо коллективу зоологического музея МГУ им. М.В.Ломоносова: О.Г.Нановой, С.В.Крускопу и В.С.Лебедеву за доброжелательное отношение, интерес к исследованию и предоставление исторических образцов костей. Хочу поблагодарить А.Ю.Косорукову и участников проекта "Arctic predators as indicators of tundra ecosystem" за предоставление современных образцов из Сибири. Я особенно признательна D.W.Macdonald и K.Jewgenow за помощь в организации поездок в Великобританию и Германию для проведения там лабораторных работ, а так же В.К.Боженко за возможность работы в лаборатории ФГУ РНЦРР (Москва). И, конечно, отдельно я хочу поблагодарить моих родных: маму Т.С.Плошницу, брата И.И.Плошницу, тетю Н.С.Захарову, а также моего молодого человека A.de Palma Garrido за помощь и поддержку.

Исследование финансировали: Peoples Trust for Endangered Animals to DWM; DAAD-project Leonard-Euler: A08/01104 и 50077303; Sigma-Xi, Grants-in-Aid: G20063112503926; РФФИ: 07-04-007-45a.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обосновывается актуальность темы, формулируется цель и задачи исследования.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В первой части обзора литературы описаны основные нейтральные и селективно значимые маркеры, используемые для оценки генетического разнообразия популяции. Рассмотрена структура, функция и специфика генов ГКГ. Подробно рассмотрены предполагаемые селективные механизмы, действующие на гены ГКГ, их теоретическое обоснование и экспериментальная проверка.

Во второй части обзора рассматриваются эволюционные силы, действующие на кодирующие и не кодирующие последовательности: описывается взаимодействие факторов, снижающих генетическое разнообразие в популяции, и сил балансирующего отбора, направленного на поддержание полиморфизма в генах ГКГ. Рассмотрены исследования естественных популяций, свидетельствующие о влиянии дрейфа генов на полиморфизм. Описаны случаи, когда при малой популяционной численности балансирующий отбор способен поддерживать разнообразие генов ГКГ, несмотря на утрату полиморфизма нейтральных маркеров.

В третьей части обзора описывается специфика биологии популяций песцов на Командорских островах, самых древних изолированных эндемичных тихоокеанских популяций песка. Описывается история популяций после открытия островов, характер основных антропогенных воздействий и проблемы, возникшие в связи с распространением на о-ве Медный эпизоотии ушной чесотки и прохождением популяции через демографическое «бутылочное горлышко».

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Сбор образцов

В настоящей работе были использованы образцы из популяций песцов Командорских островов ($n=137$), острова Янкича ($n=3$), континентальной Аляски ($n=24$) и Сибири ($n=33$).

Современные образцы тканей песцов о-ва Медный ($n=41$) были получены во время ежегодного мечения (июнь-август) с 1997 по 2006 гг. Выборка проб от современных песцов о-ва Беринга ($n=44$) включает фрагменты шкур животных, добытых во время зимнего промысла 2001 года, которые любезно предоставлены сотрудниками Командорского природного биосферного заповедника (КПБЗ) С.В. Загребельным и М.В. Жалгаубаевым, а также пробы тканей, собранные автором во время экспедиций 2008 и 2009 гг. Образцы тканей песцов с о-ва Янкича (о-ва Ушишир) собраны в 2007 г. и любезно предоставлены М.Е. Гольцманом и Е.П. Крученовой. Генетические пробы современных континентальных песцов Сибири предоставлены А.Ю. Косоруковой, образцы ДНК песцов Аляски – Л.Дж. Кеннеди (L.J. Kennedy, University of Manchester, UK). Собранные во время отлова и мечения мягкие ткани уха песцов, а также ткани обнаруженных мертвыми или убитых во время охоты животных фиксировали в 96% этиловом спирте.

Исторические образцы (череп) командорских песцов были любезно предоставлены сотрудниками зоологического музея МГУ им. М. В. Ломоносова (Москва). Для анализа использовали образцы предковых песцов о-ва Медный ($n=43$), добытых с 1911 по 1946 гг. Кроме этого, были проанализированы 9 исторических образцов с о-ва Беринга, добытых в тот же период времени.

2.2. Выделение ДНК

2.2.1. Выделение современной ДНК из мягких тканей

Современную ДНК из мягких тканей песцов выделяли фенол-хлороформным методом (Sambrook *et al.*, 1989) с модификациями. Перед процедурой экстракции ДНК фрагменты ткани промывали в бидистиллированной воде и измельчали скальпелем. Добавляли 650 мкл буфера NET100, 65 мкл саркозила натрия 35% концентрации и протеиназы *K* до конечной концентрации 200-400 ед. Смесь инкубировали 4 часа при 65°C и 9-12 часов при 37°C, после инкубации добавляли 1/5 часть объема 5 М хлорида натрия, после чего проводили последовательную экстракцию ДНК сначала равным объемом фенола, потом смесью хлороформа с изоамиловым спиртом (24:1) и в заключении – хлороформом. ДНК осаждали 1/10 объемом 3 М ацетата натрия и 2,2 объемами охлажденного этилового спирта. Осадок ДНК дважды промывали 70% этиловым спиртом и высушивали. ДНК растворяли в стерильной бидистиллированной воде, а полученный раствор хранили при -20°C.

2.2.2. Выделение исторической ДНК из костной ткани

Историческую ДНК выделяли из нижнечелюстных костей (*mandibulare*) и зубов песцов, хранившихся в Зоологическом музее МГУ им. М. В. Ломоносова. Распил и выделение проводили в специальной лаборатории. Кости тщательно мыли, после чего обрабатывали ультрафиолетовым излучением в течение не менее 60 мин. Распил проводили, используя стерильные стоматологические боры. Костную пудру хранили до выделения ДНК при -20°C .

Историческую ДНК выделяли по методу, предложенному Yang *et al.* (1998) и модифицированному Холодовой и др. (2005) с использованием набора mini elute PCR purification kit (Qiagen). К каждому образцу костной пудры объемом примерно 300-400 мкл добавляли 700 мкл Е буфера (ЕДТА – 0,5 М, Tris-HCl – 10 мМ, саркозил Na – 3,5%, рН 8,5) и 200-300 ед. протеиназы K, инкубировали 24 часа при температуре 55°C и постоянном перемешивании. После инкубации к надосадочной жидкости добавляли 5 объемов (примерно 3,5 мл) РВ буфера (поставляется в наборе), тщательно перемешивали и пропускали через колонку (поставляется в наборе), центрифугируя при 14 000 об/мин. в течение 1 мин. После этого в колонку добавляли 40 мкл нагретого до 50°C ЕВ буфера (поставляется в наборе). ДНК с колонки снимали центрифугированием. Процедуру проводили дважды. Полученный раствор ДНК хранили при -20°C .

2.3. Амплификация фрагмента D-петли мтДНК

Для амплификации полного I гипервариабельного региона D-петли мтДНК длиной примерно 300 нуклеотидных пар (н.п.) использовались праймеры Pex1F и H3R (Dalén *et al.*, 2002). Если из-за деградации исторической ДНК не удавалось получить ПЦР-продукт всего фрагмента целиком, использовали дополнительные праймеры Pex1R, Pex2F, pex2R и pex3R (Nyström *et al.*, 2006), а также CytF (Джикия и др., 2007), которые позволяют получить ПЦР-продукты трех перекрывающихся фрагментов исследуемого участка ДНК меньшей длины (примерно 85-155 н.п.).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) фрагмента D-петли проводили в объеме 20 мкл, содержащем 5 мкл исторической ДНК (2 мкл ДНК в случае современных образцов), 0,3 мМ смеси дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP's, Fermentas), однократный ПЦР-буфер без детергентов (Qiagen), 2,25 ед. Hotstar Taq полимеразы (Qiagen), прямой и обратный праймеры по 0,5 мкМ, 1,8 мМ MgCl_2 (Qiagen) и деионизованную воду. Реакцию проводили в следующих условиях: предварительная денатурация 95°C – 15 мин. Далее следовало 43 цикла (30 для современной ДНК) со стандартной денатурацией при 95°C – 30 с; отжигом праймеров на протяжении 30 с при 50°C и элонгацией 40 с при 72°C . После окончания программы проводили заключительный цикл достройки при 72°C в течение 5 мин. Для оценки концентрации, специфичности полученного ПЦР-продукта и отсутствия контаминации проводили электрофорез в 2% агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

2.4. Определение последовательности ДНК

Перед анализом нуклеотидной последовательности проводили очистку 1-5 мкл полученного ПЦР-продукта с помощью 10 ед. щелочной фосфатазы теленка (CIAP, Fermentas) и 2 ед. экзонуклеазы I (ExoI, Fermentas), инкубируя при 37°C в течение 15 мин., потом при 85°C – 15 мин. Секвенирование каждого фрагмента проводили как минимум дважды (с прямого и обратного праймеров) используя набор для секвенирования BigDye® Terminator v1.1 или v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Для секвенирования применяли те же праймеры, что и для амплификации фрагментов. Реакцию секвенирования проводили в объеме 20 мкл, в состав которого входили: 2 мкл очищенного ПЦР-продукта, 0,1 мкМ одного из праймеров, 0,5 мкл набора для секвенирования BigDye®, 3,75 мкл 5-кратного буфера для секвенирования (Applied Biosystems) и деионизованная вода. Режим реакции секвенирования: 96°C в течение 1 мин., после чего следовали 25 циклов с денатурацией 96°C – 15 с, отжигом праймеров 50°C – 15 с и стадией элонгации 60°C в течение 1 мин. 40 с. Очистку продукта после реакции секвенирования проводили, используя 3 мкл ацетата натрия (3 М, pH 4.6), 14,5 мкл воды и 62,5 мкл этилового спирта. Смесь тщательно перемешивали и 15 минут инкубировали при комнатной температуре. После центрифугирования аккуратно удаляли надосадочную жидкость, а осадок дважды промывали 70% этанолом. После высушивания осадок растворяли в 20 мкл Hi-Di формамида (Applied Biosystems). Раствор денатурировали 2 минуты при 96°C и сразу охлаждали во льду. Электрофорез проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems) в соответствии с протоколом производителя.

2.5. Анализ микросателлитов

Для генотипирования песцов были протестированы и отобраны две группы микросателлитов: локусы, расположенные во II классе главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) – CFA12-4, CFA12-9, CFA12-17, CFA12-21 и CFA12-22 и локусы в интронах других генов (CXX140, CXX173, CXX250, 377 и 771) (Ostrander *et al.*, 1993; Ostrander *et al.*, 1995; Mellersh *et al.*, 1997; Debenham *et al.*, неопубл. данные). Используемые локусы изначально были выделены и описаны для собаки (*Canis familiaris*).

Для исследования микросателлитов, связанных с ГКГ, использовались прямые праймеры, меченые флуоресцентными красителями. Для анализа микросателлитов в составе других генов применяли систему из трех праймеров, содержащую удлинённый прямой праймер, на 5' конце которого добавлялась последовательность праймера M13, обратный праймер и флуоресцентно-меченый праймер M13.

Полимеразную цепную реакцию каждого локуса проводили отдельно, в объеме 10 мкл, содержащем 1 мкл ДНК (3 мкл ДНК в случае исторических образцов), 0,3 мМ смеси dNTP's (Fermentas или Amersham), однократный ПЦР-буфер без детергентов (Qiagen), 1,25 ед. Hotstar Taq полимеразы (Qiagen) и деионизованную воду. Для микросателлитных локусов ГКГ в смесь для ПЦР

добавляли по 0,5 мкМ прямого и обратного праймеров и 0,2 мМ MgCl₂ (Qiagen). В случае маркеров в составе других генов смесь содержала 0,02 мкМ удлинённого прямого праймера и по 0,5 мкМ обратного и M13 праймеров, а также 1,5 мМ MgCl₂ (Qiagen). Реакцию проводили используя метод “touch down 58” в следующих условиях: предварительная денатурация 95°C – 15 мин. Далее следовало 35 циклов (45 циклов для исторических образцов ДНК) со стандартной денатурацией при 95°C – 30 с; отжигом праймеров на протяжении 30 с при начальной температуре 65°C, которая в течение первых 15 циклов каждый последующий цикл снижалась на 0,5°C до температуры 58°C; элонгация 1 мин. при 72°C. После окончания программы проводили заключительный цикл элонгации при 72°C в течение 5 мин. Для предварительной оценки концентрации полученного ПЦР-продукта проводили электрофорез в 2% агарозном геле.

Анализ микросателлитных локусов делали на генетическом анализаторе ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems) в соответствии с протоколом производителя, используя стандарты длины ROX-400HD или ROX-500 (Applied Biosystems).

2.6. Главный комплекс гистосовместимости

2.6.1. Амплификация фрагмента β-цепи II класса ГКГ

Для амплификации антигенсвязывающего региона β-цепи (DRB и DQB гены) II класса ГКГ применяли следующие праймеры: DM-1/DM-2 (Hedrick *et al.*, 2000) и DQB1/DQB2 (Fernandez-Vina *et al.*, 1997).

Амплификацию фрагмента проводили в объеме 20 мкл, содержащем 2-5 мкл ДНК, 0,2 мМ смеси dNTP's (QBIОgene), однократный ПЦР буфер без детергентов (Qiagen), 4 ед. Hotstar *Taq* полимеразы (Qiagen), прямой и обратный праймеры по 0,5 мкМ, 2 мМ MgCl₂ (Q BIОgene) и деионизованную воду. ПЦР проводили в следующих условиях: предварительная денатурация и активация фермента 95°C – 15 мин., после чего следовало 35-45 циклов со стандартной денатурацией при 94°C – 60 с; отжигом праймеров на протяжении 60 с при соответствующей праймерам температуре и элонгацией 60 с при 72°C. После окончания программы проводили заключительный цикл достройки при 72°C в течении 10 мин. Для оценки концентрации, специфичности полученного ПЦР-продукта и отсутствия контаминации проводили электрофорез в агарозном геле. Далее определяли генетический полиморфизм исследуемых фрагментов, применяя два независимых подхода: (а) прямое секвенирование полученных ПЦР-продуктов и (б) анализ полиморфизма методом дифференциального дисплея (SSCP) с последующим секвенированием отдельных вырезанных из геля аллелей. Результаты прямого секвенирования сопоставляли с профилями SSCP-гелей и последовательностями отдельных аллелей.

2.6.2. Определение полиморфизма ГКГ методом дифференциального дисплея (SSCP)

Для получения профилей дифференциального дисплея ПЦР-продукт анализируемого фрагмента (2-5 мкл) смешивали с 8-10 мкл денатурирующего буфера для нанесения (подготовленный по протоколу ETC-manual, ETC Elektrophoresetechnik). Смесь денатурировали при 95°C, а после охлаждали на льду. После этого 6 мкл смеси наносили на 15% акриламидный гель (CleanGel DNA-HP, ETC. Elektrophoresetechnik), который готовили, следуя инструкциям производителя. Электрофорез проводили при температуре 12°C на горизонтальной охлаждаемой системе (Amersham Pharmacia Biotech) при условиях: 200 V, 20 mA, 10 W в течение 20 мин., после чего 450 V, 30 mA, 20 W в течение 3 час. 30 мин. Затем гель фиксировали и окрашивали серебрением (DNA Plus One Silver Staining Kit, Amersham Pharmacia Biotech). Каждый образец анализировали как минимум два раза. На каждый SSCP-гель для сравнения рядом с новыми образцами всегда наносили все известные аллели. Как минимум три образца каждой аллели были вырезаны из геля, повторно амплифицированы и секвенированы.

2.7. Историческая ДНК: аутентичность и контроль контаминации

Все процедуры подготовки образцов, распила, выделения ДНК и амплификации проводились в строгом соответствии с правилами работы с историческим материалом (Cooper, Poinar, 2001). Меры предосторожности по предотвращению контаминации были предприняты на всех этапах работы с историческим материалом. Распил костей проводили в специализированном боксе, оборудованном УФ лампой. Перед распилом бокс и оборудование вымывали хлорсодержащим дезинфицирующим раствором и облучали ультрафиолетом не менее 60 минут.

Выделение ДНК из музейных образцов и последующий анализ проводили в трех разных лабораториях (Россия, Великобритания, Германия). Для работы использовали специальный набор пипеток. Комнаты для выделения исторической ДНК и постановки ПЦР были пространственно разделены с комнатами, где проводились выделение современной ДНК и работа с ПЦР-продуктами. Музейные пробы, современные образцы и реагенты для их анализа хранили раздельно. Контроль контаминации проводили во всех случаях, где это было возможно. Для многих образцов делали повторное выделение ДНК. И для таких образцов результаты анализа совпадали. В очень редких случаях удавалось получить ПЦР-фрагмент длиной более 300 н.п.

Чтобы исключить вероятность учета ложных гомозигот при анализе ядерных маркеров, проводили многократные повторные исследования (фрагментный анализ микросателлитов, секвенирование и дифференциальный дисплей генов ГКГ) со стадии ПЦР или экстракции ДНК. Для исключения возможных артефактов секвенирования для тех образцов, которые обладали новыми последовательностями, проводили два дополнительных повторных секвенирования.

2.8. Анализ молекулярно-генетических данных

Редактирование и выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). Определение длин фрагментов микросателлитов и генотипирование проводили, используя программы Genotyper v.3.6. и Genemapper v.3. (Applied Biosystems).

Число варьируемых позиций, среднее число попарных нуклеотидных и аминокислотных замен, а также среднее по всем сайтам нуклеотидное разнообразие аллелей ГКГ определяли в программе MEGA 4.0. Действие балансирующего отбора на последовательности второго экзона исследованных генов ГКГ оценивали по количеству синонимичных (d_S) и несинонимичных (d_N) замен в кодонах, участвующих (ABS) и не участвующих в антигенсвязывании (non-ABS). Для оценки достоверности различий применяли Z-тест (в программе MEGA 4.0), исходя из предположения нейтральности исследуемых кодонов ($d_N = d_S$).

Построение Neighbor Joining филогенетического дерева выполняли также в программе MEGA 4.0 (Saitou, 1987), используя модель Tamura – Nei. Для статистической поддержки топологии применяли бутстреп анализ (1000 реплик). Построение медианных сетей проводили с помощью программы NETWORK 4.5.1.0 (Bandelt *et al.*, 1999).

Программа ARLEQUIN v3.1 (Schneider *et al.*, 2000) использовалась для оценки нуклеотидного и гаплотипного разнообразия D-петли мтДНК согласно Nei (1987), проведения F_{ST} теста по методу Tamura-Nei (Tamura, Nei, 1993), а также для определения среднего числа аллелей в микросателлитах – A_A и средней гетерозиготности – H_A (Tajima, 1983). Исходя из уравнения Харди-Вайнберга, наблюдаемую (H_o) и ожидаемую (H_e) гетерозиготности микросателлитов оценивали вместе с отклонениями от самого уравнения, используя алгоритм цепи Маркова (100 000 шагов) и dememorisation в 100 000 шагов (Levene, 1949). Оценку сцепленности микросателлитных локусов (Slatkin, 1994) проводили, используя EM алгоритм с 1000 пермутаций.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. D-петля митохондриальной ДНК

Консенсусные последовательности I гиперварибельного региона D-петли мтДНК длиной 297 н.п. были получены для 31 образца исторической популяции о-ва Медный, 1 образца исторической популяции о-ва Беринга, 3 образцов песцов о-ва Янкича (о-ва Ушишир) и 10 образцов песцов современной популяции континентальной Аляски.

В исторической популяции о-ва Медный у 26 проанализированных животных был обнаружен гаплотип, последовательность которого идентична гаплотипу MEDN (610 н.п., Genbank: DQ630748), ранее описанному для современных песцов о-ва Медный (Джикия и др., 2007). У остальных 5 образцов была зафиксирована гетероплазмия в 37-ой нуклеотидной позиции от начала последовательности D-петли. В указанной позиции наравне с характерным для гаплотипа MEDN аденином наблюдали также присутствие цитозина (рис. 1).

											*	*		1	1	1	1	2	2	2	4	4
	n	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	9	2	4	5	9	2	3	8	3	4
MEDN (610)	30	C	C	C	-	-	C	C	C	C	A	A	A	T	T	C	A	T	T	T	T	G
MEDN (297)	29	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	n	n
MEDN-H	5	.	.	.	-	-	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	n	n
BA1	1	.	.	.	-	-	.	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.	n	n
B1	2	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.
B2	9	.	.	.	-	-	.	.	.	A	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.	G	.
B3	2	.	.	.	-	-	.	.	.	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	-
B4	4	.	.	.	-	-	.	.	.	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.
B5	4	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	.
B6	7	.	.	.	-	-	.	.	.	A	.	.	.	C	T	.	.	.	.	.	.	.
B7	2	.	.	.	-	-	.	.	A	A	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.	G	.
S2	4	T	A	A	C	T	T	A	A	A	.	.	.	C	.	G	.	.	.	.	n	n
H2	2	T	A	A	C	T	T	A	A	A	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	n	n
C1	1	T	G	A	C	T	T	A	A	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	n	n
N1	2	T	A	A	-	T	T	A	A	A	.	.	.	C	.	.	.	C	.	C	n	n
H5	1	T	A	A	-	T	T	A	A	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	n	n

Рисунок 1. Вариабельные позиции фрагмента D-петли мтДНК песцов Командорских островов и Аляски. Гаплотипы MEDN (610) (современная популяция о-ва Медный) и B1-B7 (современная популяция о-ва Беринга) опубликованы Джикия и др. (2007); *n* – количество животных с данным гаплотипом. Мономорфные позиции обозначены звездочкой.

У изученных песцов о-ва Янкича был выявлен такой же, как и у песцов с о-ва Медный, гаплотип MEDN.

В историческом образце с о-ва Беринга был зарегистрирован новый, ранее не описанный, гаплотип ВА1, отличающийся от гаплотипа В1, описанного для современных песцов о-ва Беринга (Джикия и др., 2007), наличием цитозина в 37-й позиции. Примечательно, что именно эта позиция является полиморфной в случае гетероплазмы, выявленной у исторических образцов популяции о-ва Медный.

У материковых песцов Аляски было выявлено 5 разных гаплотипов (S2, H2, C1, N1 и H5). В обнаруженных последовательностях было зарегистрировано 7 полиморфных позиций (6 замен и 1 вставка). Наиболее распространенным гаплотипом в изученной выборке популяции Аляски оказался гаплотип S2, который был выявлен у 4 животных. Интересно, что этот гаплотип ранее был обнаружен только у песцов Сибири (Dalén *et al.*, 2005). Гаплотип C1 был найден у песцов Канады, гаплотип N1 – распространен по всей Неоарктике, а H2 и H5 – по всей Голарктике (Dalén *et al.*, 2005).

3.2. Микросателлиты

Тридцать шесть исторических и 27 современных образцов ДНК песцов с о-ва Медный, 12 современных образцов с о-ва Беринга и 24 континентальных образца с Аляски были успешно генотипированы по 10 микросателлитным локусам. Исключение составил связанный с ГКГ микросателлит CFA12-21, который не удалось проанализировать в исторической популяции песцов о-ва Медный.

Общее количество аллелей в 10 микросателлитах для песцов о-ва Беринга составило 43, для песцов с Аляски – 80, а у современных животных с о-ва Медный обнаружено всего 14 аллелей. Даже, несмотря на то, что локус CFA12-21 для исторических образцов о-ва Медный не удалось проанализировать, общее количество аллелей по оставшимся 9 локусам составило 17. Таким образом, для 9 микросателлитов, изученных в обеих выборках песцов о-ва Медный, все аллели, встреченные в современной выборке, фиксировали у предковых образцов. В то же время, 5 аллелей, выявленных у предковых песцов, не были обнаружены у современных животных. В исторической популяции о-ва Медный 3 локуса уже были мономорфны, а эффект «бутылочного горлышка» привел к фиксации мономорфизма еще в 3 микросателлитах.

Командорские песцы характеризуются значительно более низким полиморфизмом микросателлитов, чем континентальные животные Аляски. Генетическое разнообразие в предковой популяции песцов о-ва Медный оказалось немного выше, чем в современной популяции, но все же обе выборки с о-ва Медный менее вариабельны по сравнению с современной популяцией песцов о-ва Беринга (табл. 1).

Таблица 1. Количество выявленных аллелей (N_A) в 10 микросателлитных локусах, а также средние показатели количества аллелей (A_A) и гетерозиготности (H_A) для песцов о-ва Медный, о-ва Беринга и Аляски. * – без данных по локусу CFA12-21.

Популяция	Количество аллелей N_A	Среднее число аллелей на локус $A_A \pm SD$	Средняя гетерозиготность $H_A \pm SD$	Количество образцов N
Истор. о. Медный	17*	1.89 ± 0.64	0.26 ± 0.17	36
Совр. о. Медный	14 12*	1.40 ± 0.49 $1.33 \pm 0.47^*$	0.19 ± 0.12 $0.16 \pm 0.11^*$	27
Совр. о. Беринга	43	4.30 ± 1.00	0.60 ± 0.33	12
Аляска	80	8.00 ± 2.00	0.79 ± 0.41	24

В исторической и современной популяциях песцов о-ва Медный ни для одного из локусов не было выявлено отклонений от равновесия Харди-Вайнберга. Однако для песцов о-ва Беринга достоверное отклонение было зафиксировано в 377 локусе ($H_O=0.417$, $H_E=0.493$; $P=0.025$), а для микросателлита CFA12-4 в составе ГКГ отклонение было достоверным как для популяции о-ва Беринга ($H_O=0.333$, $H_E=0.547$; $P=0.029$), так и для популяции Аляски ($H_O=0.458$, $H_E=0.854$; $P=0.000$).

Результаты фрагментного анализа были также протестированы на наличие сцепленности между исследуемыми локусами. Случаи сцепления аллелей были зарегистрированы среди микросателлитов, связанных с ГКГ, что и ожидалось, так как эти микросателлиты находятся в близко расположенных генах II класса ГКГ в составе одной (12-й) хромосомы.

3.3. Главный комплекс гистосовместимости

3.3.1. Филогенетическая связь и полиморфизм DRB и DQB генов II класса ГКГ песцов

Генетический полиморфизм генов β -цепи II класса ГКГ был проанализирован для 184 образцов ДНК песцов, 47 из которых были взяты у континентальных животных. Среди 137 образцов с Командорских островов были проанализированы исторические образцы о-ва Медный ($n=43$), и о-ва Беринга ($n=9$), а также современные образцы о-ва Медный ($n=41$) и о-ва Беринга ($n=44$). Всего было выявлено 25 уникальных аллелей фрагмента β -цепи II класса ГКГ. Несмотря на то, что праймеры DM-1/DM-2 и DQB1/DQB2 сконструированы для DRB и DQB локусов, соответственно, многие аллели были выявлены обоими парами одновременно. Основываясь на результатах сопоставления аллелей ГКГ песцов с генетической базой данных (GenBank), а также на основании филогенетического анализа (см. ниже) выявленные у песцов аллели были названы как *Alla*-DRB*01 – *13 и *Alla*-DQB*01 – *12 согласно предложенной Klein *et al.* (1990) схеме номенклатуры аллелей ГКГ. Большинство аллелей было описано на основании анализа 207 н.п., но последовательности *Alla*-DQB*01, *08 и *12 описаны только по 172 н.п.

Филогенетическая связь аллелей ГКГ песцов. Для того чтобы оценить принадлежность выявленных у песцов аллелей к DRB или DQB локусу, было проведено построение медианных сетей, а также филогенетического дерева с использованием neighbor-joining алгоритма (рис. 2). Оба построения отражают взаимосвязь между аллелями сходным образом. При анализе топологии полученных построений четко прослеживалось разделение всех исследуемых аллелей на две ветви (кластера), одна из которых включала DRB последовательности, другая – DQB. Последовательность *Alla*-DRB*05 расположена относительно близко к области разделения DRB и DQB ветвей медианных сетей. Однако в случае построения филогенетического дерева указанная аллель располагалась в составе DRB кластера.

BLASTn. Сравнение с генетической базой данных подтвердило, что все описанные аллели являются фрагментом β -цепи II класса ГКГ и показало высокий процент сходства с другими DRB или DQB аллелями представителей семейства песцов. При анализе первых десяти наиболее сходных последовательностей из базы данных *Alla*-DRB*01 - 13 обладали 100% сходством с DRB геном, анализ *Alla*-DQB*04, 05, 07 и 09-12 выявил 100% сходства с DQB геном. Аллели *Alla*-DQB*02, 03 и 06 также обладали высоким уровнем сходства с DQB локусом, но 10-40% последовательностей среди первой десятки были аллелями DRB гена. Среди первых десяти наиболее сходных с *Alla*-DQB*01 и 08 аллелями 80% принадлежало DRB гену, тогда как только 20% – DQB локусу.

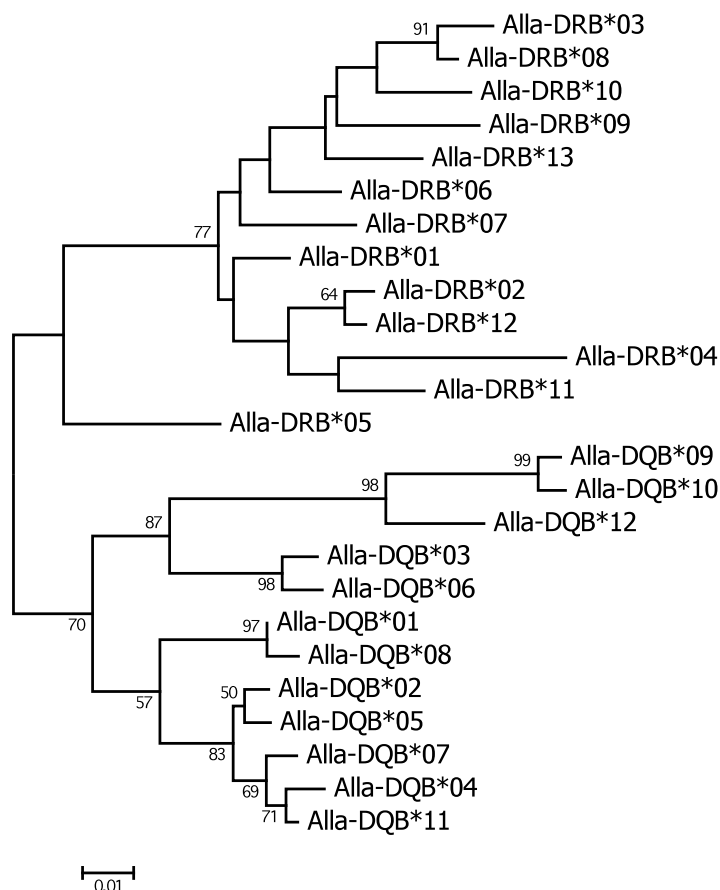


Рисунок 2. Филогенетическое дерево выявленных у песцов 25 аллелей β -цепи II класса ГКГ (*Alla-DRB*01–*13*, *Alla-DQB*01–*12*), построенное по алгоритму neighbor-joining. В узлах – результаты бутстреп анализа.

Нуклеотидная и аминокислотная вариабельность. Для последовательностей DRB локуса число вариабельных нуклеотидных позиций составило 32 (16 аминокислот). Для DQB аллелей выявлено 34 нуклеотидных 18 аминокислотных замен (табл. 2). Среднее число попарных нуклеотидных замен составило $13,6 \pm 2,3$ (от 2 до 25 н.п.) для DRB аллелей и $14,6 \pm 2,3$ (1–27 н.п.) для DQB аллелей.

Среди описанных аллелей не было выявлено инсерций/делеций или стоп-кодонов. Все описанные для песцов аллели обладали уникальной нуклеотидной и аминокислотной последовательностями. Исключение составили *Alla-DQB*01* и *Alla-DQB*08*, которые различались одной синонимичной заменой и обладали идентичной аминокислотной последовательностью.

Число различных аллелей β -цепи II класса ГКГ, зарегистрированных одновременно в одном образце, варьировало от 2 до 5. В подавляющем большинстве случаев (91,3%) для каждого из DRB или DQB генов фиксировали 1 или 2 аллели. Однако в 8,7% случаев фиксировали до 3 аллелей каждого гена. Наблюдаемое распределение аллелей указывает на то, что исследуемые локусы у некоторых животных могут быть дублированы. Анализ гаплотипов исследованных образцов подтвердил, что дупликация DRB или DQB генов встречается не у всех образцов и связана с определенными сочетаниями аллелей.

Таблица 2. Основные характеристики генетического разнообразия DRB и DQB аллелей II класса ГКГ песцов. Показатели приведены со стандартной ошибкой (SE).

	<i>DRB</i> локус	<i>DQB</i> локус
<u>Вариабельные позиции</u>		
Нуклеотиды	32	34
Аминокислоты	16	18
<u>Среднее число попарных замен</u>		
Нуклеотиды	13.6 ± 2.3 (2-25)	14.6 ± 2.3 (1-27)
Аминокислоты	8.2 ± 1.9 (2-13)	8.1 ± 1.8 (0-17)
<u>Нуклеотидное разнообразие, среднее по всем сайтам</u>		
	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.02

3.3.2. Балансирующий отбор β -цепи II класса ГКГ

Исследуемый участок β -цепи II класса ГКГ участвует в распознавании антигенов и формировании иммунного ответа, однако не все сайты, кодирующие этот пептид, а только антигенсвязывающие сайты принимают в этом непосредственное участие (Brown *et al.*, 1988; 1993). Поэтому в составе исследованного региона разные кодоны испытывают разное селективное давление. В результате анализа аминокислотных последовательностей было выявлено, что большинство вариабельных позиций аллелей ГКГ песцов расположено именно в антигенсвязывающих сайтах (ABS, рис. 3).

Соотношение синонимичных (d_S) и несинонимичных (d_N) замен было вычислено для входящих и не входящих в состав антигенсвязывающего участка позиций (ABS и non-ABS, соответственно, таблица 3). Для антигенсвязывающих сайтов (ABS), число несинонимичных мутаций оказалось значительно выше, чем синонимичных, а их соотношение составило 3,3 ($P=0.009$) и 3,4 ($P=0.007$), для DRB и DQB последовательностей, соответственно. Напротив, для сайтов, не участвующих в узнавании антигенов (non-ABS), соотношение между несинонимичными заменами и синонимичными оказалось близким к единице. Такой характер распределения нуклеотидных замен указывает на действие селективных сил в антигенсвязывающем регионе, направленных на поддержание высокого уровня аминокислотной вариабельности.

Alla-DRB*01	NGTERVRFLE	RHI	YNREE	LVRFDS	DVGEY	RAVTELGR	PD	AEY	WNGQ	KE	ILED	AARAA	VD	TYCR	HN	YGVGE
Alla-DRB*02	YQ	..Y	FA													
Alla-DRB*03	D		FA		F		S	S		RR						I
Alla-DRB*04	YQ	..Y	Q				S	S	R			RV				I
Alla-DRB*05								R		EK	V	RV				I
Alla-DRB*06	D						I	S								I
Alla-DRB*07							I	S	R		Q					
Alla-DRB*08	D		FA		F		S			RR						I
Alla-DRB*09	D	Y	Y							RR	E					
Alla-DRB*10	D	Y	Y		F				R		RL					I
Alla-DRB*11	YQ	..Y	FA			S	S	R								
Alla-DRB*12	YQ	..Y	Y													
Alla-DRB*13	D						I	S		RR	E					I
Alla-DQB*01	?.....A	AK	Y		F				R		EK	E	R	???	???	???
Alla-DQB*02		AK			F				R		EK	V	RV			E
Alla-DQB*03	A	AK	FM							RR	E	V	K			E
Alla-DQB*04		AK	Y		F		S	P		EK	V	RV				E
Alla-DQB*05		AK	Y		F				R		EK	V	RV			E
Alla-DQB*06	A	AK	H							RR	E	V	K			E
Alla-DQB*07		AK			F		W		R		EK	V	RV			E
Alla-DQB*08	?.....A	AK	Y		F				R		EK	E	R	???	???	???
Alla-DQB*09	A	AK	FM			I	SL	R	DEVDRV		V					E
Alla-DQB*10	...L..A	AK	FM			I	SL	R	DEVDRV		V					E
Alla-DQB*11		AK	Y		F		W		R		EK	V	RV			E
Alla-DQB*12	?.....A	AK			F				R	DEVDRV		???	???	???	???	???

Рисунок 3. Аминокислотный полиморфизм выявленных у песцов DRB и DQB аллелей ГКГ с указанием сайтов, участвующих в антигенсвязывании, по Brown *et al.*, 1988; 1993 (выделено серым цветом). Точками отмечены позиции, идентичные с верхней последовательностью.

Таблица 3. Соотношение синонимичных (d_S) и несинонимичных (d_N) замен, вычисленных для сайтов, участвующих в связывании антигенов (*ABS*) и сайтов, не участвующих в антигенсвязывании (*non-ABS*). n - количество кодонов; P указывает на достоверность различий и определено при помощи Z -теста.

Сайты	n	$d_N \pm SE$	$d_S \pm SE$	d_N/d_S	P
DRB аллели					
ABS	21	0.22±0.06	0.07±0.05	3.3	0.009
Non-ABS	48	0.03±0.02	0.03±0.02	0.9	0.880
BCE	69	0.08±0.02	0.04±0.02	2.1	0.029
DQB аллели					
ABS	21	0.19±0.06	0.06±0.04	3.4	0.007
Non-ABS	48	0.05±0.02	0.06±0.03	0.9	0.809
BCE	69	0.09±0.02	0.06±0.02	1.6	0.216

3.3.3. Сопоставление генетического разнообразия ГКГ в командорских и материковых популяциях песцов

В настоящем исследовании ГКГ было выявлено отсутствие дифференциации материковых популяций ($F_{ST}=0.051$, $P=0.071$). Из 25 аллелей, выявленных у песцов, 20 различных последовательностей регистрировали у континентальных особей: 9 DRB аллелей (*Alla-DRB*02* и **06-13*) 11 DQB аллелей (*Alla-DQB*01*, **02* и **04-12*; Таблица 4). И только 8 аллелей было выявлено у песцов Командорских

островов (*Alla*-DRB*01-*05 и *Alla*-DQB*01-*03). Три из всех описанных аллелей (*Alla*-DRB*02, *Alla*-DQB*01 и *02) оказались общими для популяций командорских и континентальных песцов.

Таблица 4. Относительная частота DRB и DQB аллелей II класса ГКГ у песцов. В скобках указано число особей, у которых регистрировали данную аллель; *n* – размер выборки.

	Континентальные песцы			Песцы Командорских островов			
	Сибирь	Аляска	ВСЕГО	Истор. о.Беринга	Истор. о.Медный	Совр. о.Беринга	Совр. о.Медный
	<i>n</i> =33	<i>n</i> =14	<i>n</i> =47	<i>n</i> =09	<i>n</i> =43	<i>n</i> =44	<i>n</i> =41
<i>Alla</i> -DRB*01	-	-	-	0.44 (4)	0.81 (35)	0.50 (22)	1.00 (43)
<i>Alla</i> -DRB*02	0.73 (24)	0.93 (13)	0.79 (37)	0.56 (5)	-	0.52 (23)	-
<i>Alla</i> -DRB*03	-	-	-	0.11 (1)	-	0.07 (3)	-
<i>Alla</i> -DRB*04	-	-	-	0.33 (3)	-	0.23 (10)	-
<i>Alla</i> -DRB*05	-	-	-	0.44 (4)	0.42 (18)	0.45 (20)	-
<i>Alla</i> -DRB*06	-	0.21 (3)	0.06 (3)	-	-	-	-
<i>Alla</i> -DRB*07	0.39 (13)	0.36 (5)	0.38 (18)	-	-	-	-
<i>Alla</i> -DRB*08	0.03 (1)	-	0.02 (1)	-	-	-	-
<i>Alla</i> -DRB*09	0.27 (9)	0.07 (1)	0.21 (10)	-	-	-	-
<i>Alla</i> -DRB*10	0.03 (1)	-	0.02 (1)	-	-	-	-
<i>Alla</i> -DRB*11	0.03 (1)	0.07 (1)	0.04 (2)	-	-	-	-
<i>Alla</i> -DRB*12	0.12 (4)	-	0.09 (4)	-	-	-	-
<i>Alla</i> -DRB*13	0.09 (3)	-	0.06 (3)	-	-	-	-
<i>Alla</i> -DQB*01	0.61 (20)	0.29 (4)	0.51 (24)	0.11 (1)	0.95 (41)	0.34 (15)	1.00 (43)
<i>Alla</i> -DQB*02	0.64 (21)	0.93 (13)	0.72 (34)	0.78 (7)	0.33 (14)	0.84 (37)	-
<i>Alla</i> -DQB*03	-	-	-	0.67 (6)	0.33 (14)	0.52 (23)	-
<i>Alla</i> -DQB*04	0.18 (6)	-	0.13 (6)	-	-	-	-
<i>Alla</i> -DQB*05	-	0.07 (1)	0.02 (1)	-	-	-	-
<i>Alla</i> -DQB*06	0.06 (2)	0.14 (2)	0.09 (4)	-	-	-	-
<i>Alla</i> -DQB*07	0.03 (1)	0.14 (2)	0.06 (3)	-	-	-	-
<i>Alla</i> -DQB*08	-	0.07 (1)	0.02 (1)	-	-	-	-
<i>Alla</i> -DQB*09	0.12 (4)	-	0.09 (4)	-	-	-	-
<i>Alla</i> -DQB*10	0.06 (2)	-	0.04 (2)	-	-	-	-
<i>Alla</i> -DQB*11	0.06 (2)	-	0.04 (2)	-	-	-	-
<i>Alla</i> -DQB*12	0.12 (4)	-	0.09 (4)	-	-	-	-

У всех проанализированных образцов песцов о-ва Медный в каждом из исследованных генов было выявлено по одной аллели (*Alla*-DRB*01 и *Alla*-DQB*01), которые находились в гомозиготном состоянии. Однако среди проанализированных исторических образцов с о-ва Медный, добытых до начала эпизоотии, было выявлено 5 аллелей ГКГ. Кроме упомянутых аллелей для современных песцов, в исторической популяции были обнаружены *Alla*-DRB*05, *Alla*-DQB*02 и *03. Наиболее распространенными последовательностями были *Alla*-DRB*01 и *Alla*-DQB*01, которые встречались в 81% и 95% образцов исторической популяции о-ва Медный, соответственно.

В исторической популяции песцов о-ва Беринга, как и у современных песцов, были зарегистрированы 8 аллелей (*Alla*-DRB*01-*05 и *Alla*-DQB*01-*03). Изменения частот аллелей за последние 80-100 лет в популяции песцов о-ва Беринга не обнаружено ($F_{ST} = -0.009$, $P=0.544$). Последовательности *Alla*-DRB*02-*04 были уникальными для популяции о-ва Беринга, тогда как остальные пять

аллелей встречались в обеих командорских популяциях. Таким образом, популяция предковых медновских песцов характеризовалась подвыборкой аллелей ГКГ, выявленных в популяции о-ва Беринга.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Гетероплазмия D-петли мтДНК песцов о-ва Медный

Полученные данные являются, по-видимому, первым свидетельством гетероплазмии мтДНК песцов. Вероятность ошибки анализа была минимизирована многократными и независимыми повторами (экстракция ДНК, ПЦР, секвенирование). Возникновение полиморфной позиции в результате контаминации в данном случае также исключено. Нуклеотидная последовательность MEDN является уникальной, и, если бы обнаруженный полиморфизм был результатом контаминации, вариабельность фиксировали бы и в других позициях.

Ранее считалось, что гетероплазмия мтДНК – явление крайне редкое, однако в последнее время публикуется все большее количество результатов исследований, свидетельствующих об обратном (Calloway *et al.*, 2000; Grzybowski, 2000; Kmiec *et al.*, 2006). Гетероплазмия, рассматриваемая как следствие мутационного процесса, представляет собой промежуточное состояние от возникновения полиморфизма до того момента, как новый вариант мтДНК будет фиксирован в популяции как отдельный гаплотип или же утерян (Kmiec *et al.*, 2006; Millar *et al.*, 2008). Темп сегрегации разных вариантов гетероплазмы может варьировать в широких пределах в зависимости от вида организма и типа гетероплазмы (Bendall, Sykes, 1995; Gocke *et al.*, 1998).

4.2. Разнообразие микросателлитов: локусы, связанные с ГКГ и другими генами

В настоящей работе в анализе нейтрального полиморфизма использовали микросателлиты, расположенные в некодирующей части генов, находящихся под разными селективными силами. Гены ГКГ находятся под влиянием балансирующего отбора, остальные микросателлиты расположены в генах, не испытывающих такого селективного воздействия. При сравнении исследованных локусов не было выявлено более высокой вариабельности в локусах, связанных с генами ГКГ, по сравнению с микросателлитами других генов (табл. 5).

Наиболее вероятно, что дефицит наблюдаемой гетерозиготности, выявленный в локусе 377 и в локусе, связанном с ГКГ (CFA12-4), является следствием наличия нулевых аллелей. Праймеры, используемые в настоящей работе, были сконструированы на основании ДНК собаки (*C. familiaris*). Возможная мутация в области отжига праймеров, которая могла возникнуть у песцов, не позволяет фиксировать мутантный аллель. Отклонение от равновесия Харди–Вайнберга было зарегистрировано только в популяции о-ва Беринга и Аляски. Присутствие не выявленных аллелей микросателлитов в этих популяциях

только подтверждает более высокое их аллельное разнообразие по сравнению с песцами о-ва Медный.

Таблица 5. Средняя гетерозиготность (H_A) микросателлитов в составе ГКГ и других генов (всего 10 локусов) в исследованных популяциях песцов (с указанием стандартного отклонения, SD). * – без данных по локусу CFA12-21; n – число проанализированных проб.

Микросателлиты	Истор. о. Медный	Совр. о. Медный	Совр. о. Беринга	Аляска
Другие гены	0.32±0.21	0.29±0.20	0.65±0.39	0.84±0.47
Связанные с ГКГ	- 0.18±0.15*	0.09±0.09 0.00*	0.54±0.33	0.73±0.42
ВСЕ	- 0.26±0.16*	0.19±0.12 0.16±0.11*	0.60±0.33	0.79±0.41

4.3. Сходство DRB и DQB генов II класса ГКГ песцов

Исследованные гены β -цепи II класса ГКГ выполняют общую функцию распознавания, связывания антигенов и последующей репрезентации Т-лимфоцитам и характеризуются сходной структурой (Klein, 1986). О высокой степени сходства между аллелями указанных генов ранее сообщалось в других исследованиях представителей семейства псовых (Seddon, Ellegren, 2002). Объяснением сходства DRB и DQB аллелей может быть действие отбора, конвергенция, но более вероятно причиной является межгенная рекомбинация (Andersson, Mikko, 1995; Seddon, Ellegren, 2002).

В случае филогенетического построения разделение аллелей на два кластера прослеживается весьма четко. Каждый из кластеров содержал *Alla*-DRB*01 или *Alla*-DQB*01 аллель. Все исследованные образцы о-ва Медный характеризовались одинаковым генотипом, представленным одновременным присутствием указанных последовательностей, что неоспоримо свидетельствует о гомозиготном состоянии каждого из локусов. Принадлежность аллелей к DRB или DQB гену в большинстве случаев также подтверждалась результатами сравнения с генетической базой данных (BLASTn).

Для 8,7% образцов была выявлена дупликация DRB или DQB гена. События дупликации генов ГКГ неоднократно фиксировали для некоторых видов и отдельных популяций (Slieker *et al.*, 1997; Baker *et al.*, 2006; Van Oosterhout *et al.*, 2006; Rosal-Sánchez *et al.*, 2008). Считается, что дупликация играет важную роль в эволюции ГКГ, одним из следствий чего является повышение полиморфизма, так как увеличивается число возможных аллелей дублированного локуса в отдельном организме.

4.4. Влияние островной изоляции на генетический полиморфизм

4.4.1. Нейтральные маркеры

Проведенный анализ выявил значительную утрату нейтрального генетического разнообразия в островных формах песцов по сравнению с континентальными. Кроме того, уровень полиморфизма коррелирует с размером острова. Исследование исторических образцов подтвердило крайне низкий нейтральный полиморфизм песцов о-ва Медный еще до эпизоотии. За исключением выявленной гетероплазмы D-петли (MEDN-H), не было зафиксировано гаплотипного разнообразия мтДНК. Также был зарегистрирован низкий уровень разнообразия в микросателлитах. Предковые песцы о-ва Медный характеризовались значительно более низким разнообразием по сравнению с более крупной популяцией о-ва Беринга. Таким образом, результаты проведенного исследования подтверждают негативное влияние продолжительной островной изоляции на генетический полиморфизм командорских песцов.

Уточнение данных по нейтральному генетическому разнообразию современных песцов о-ва Медный. Полученные в настоящем исследовании данные по вариативности мтДНК в исторической популяции о-ва Медный свидетельствуют об отсутствии гаплотипного полиморфизма. Единственный гаплотип, зарегистрированный в исторической популяции, является идентичным последовательности, выявленной в современной популяции гаплотипа MEDN. Отсутствие вариативности в исторических образцах подтверждает мономорфизм современных песцов, обнаруженный Джикией и др. (2007). Кроме того, в трех исследованных образцах песцов с о-ва Янкича из популяции, интродуцированной с о-ва Медный еще в начале прошлого века, был выявлен тот же единственный гаплотип MEDN, что и в исторических образцах о-ва Медный. Опубликованное Geffen *et al.*, (2007) митохондриальное разнообразие современных медновских песцов (в 7 пробах было выявлено 3 гаплотипа) не согласуется с мономорфизмом мтДНК в исторической популяции.

Происхождение песцов о-ва Янкича.

Результаты нуклеотидного анализа фрагмента D-петли мтДНК подтверждают происхождение песцов о-ва Янкича из популяции о-ва Медный. В 3 образцах из популяции о-ва Янкича выявлен тот же уникальный гаплотип MEDN, что и в популяции о-ва Медный. Исследованная выборка слишком мала для каких-либо популяционных выводов, однако она составляет примерно 10-15% от всей популяции (Гольцман, персональное сообщение). Стоит отметить, что мтДНК наследуется только по материнской линии, поэтому нельзя с уверенностью утверждать об отсутствии самцов-предков из других популяций.

4.4.2. Селективно значимый полиморфизм ГКГ

Полученные в данной работе результаты свидетельствуют о том, что командорские песцы характеризуются значительно меньшим генетическим разнообразием генов II класса ГКГ, чем континентальные животные. В случае сравнения вариативности ГКГ между командорскими популяциями те песцы,

которые населяли меньший по площади остров (о-в Медный), характеризовались более низким разнообразием, чем большая популяция о-ва Беринга. Понижение уровня селективно значимого генетического разнообразия в островных популяциях песцов по сравнению с материковыми сопоставимо с таковым в нейтральных локусах.

Выявленная общность аллелей ГКГ командорских песцов подтверждает их общее происхождение и указывает на влияние эффекта основателя в момент отделения популяции о-ва Медный от песцов о-ва Беринга. Сохранение сходного аллельного разнообразия генов ГКГ также может быть результатом эволюционирования популяций в сходных экологических условиях.

Фиксирование трех общих аллелей ГКГ у командорских и континентальных песцов указывает на длительную их устойчивость в природе, по крайней мере, до момента, когда командорские песцы отделились от предковой популяции. Одним из объяснений продолжительной устойчивости указанных последовательностей может быть следствие балансирующего отбора (Nigenda-Morales *et al.*, 2007). Можно также предположить, что указанные аллели обладают более высокой адаптивной ценностью по сравнению с другими аллелями.

4.5. Влияние демографического «бутылочного горлышка» на генофонд изолированной популяции песцов

4.5.1. Нейтральное генетическое разнообразие

Столь низкий полиморфизм мтДНК, выявленный у песцов о-ва Медный еще до эпизоотии, не позволил использовать этот маркер в описании влияния прохождения популяции через «бутылочное горлышко» на её генетическую изменчивость.

Использование более вариабельных микросателлитов позволило провести сравнение нейтрального разнообразия до и после эпизоотии. Следствием эпизоотии была утрата 5 из 17 аллелей в 9 проанализированных локусах и мономорфизм в трех локусах. Средняя гетерозиготность (H_A) уменьшилась в популяции с $0,26 \pm 0,17$ до $0,16 \pm 0,11$ (рассчитано для 9 локусов). Таким образом, были зарегистрированы четкие признаки утраты генетического разнообразия популяцией о-ва Медный в связи с прохождением ей демографического «бутылочного горлышка».

4.5.2. Полиморфизм генов ГКГ

После эпизоотии вариабельность была утеряна в обоих исследованных локусах ГКГ песцов о-ва Медный, в то время как до эпизоотии оба гена сохраняли полиморфизм. Таким образом, интенсивность потери генетического разнообразия генов II класса ГКГ сопоставима или даже превышает потерю полиморфизма в нейтральных локусах (микросателлиты). Важно отметить, что две аллели, которые были наиболее распространены в исторической популяции (*Alla*-DRB*01 и *Alla*-DQB*01), сохранились у современных особей, в то время как три более редкие последовательности были утеряны. Песцы о-ва Беринга не испытали столь значительного сокращения численности в прошлом веке. В исторических образцах

популяции о-ва Беринга, как и в современных, фиксировали те же 8 аллелей ГКГ, а их частоты за последние 80-100 лет не изменились.

Объяснение того, что наиболее распространенные аллели исторических песцов о-ва Медный сохранились в современной популяции, потому что эти последовательности антигенсвязывающего региона были наиболее адаптивно ценными, представляется маловероятным. Скорее всего, при малой популяционной численности, когда песцы переживали эпизоотию, дрейф генов являлся главным фактором, определяющим частоту каждой из аллелей в последующих поколениях. Таким образом, в случае малой численности локусы ГКГ, испытывающие силы балансирующего отбора, подвержены дрейфу генов так же, как и нейтральные последовательности.

4.6. Генетический полиморфизм и приспособленность

Популяция о-ва Медный с сильно редуцированным нейтральным полиморфизмом, но сохранявшая вариабельность генов β -цепи II класса ГКГ, была способна успешно существовать продолжительное время в условиях изоляции и значительного антропогенного воздействия. Однако эпизоотия, приведшая к незначительному уменьшению и без того предельно низкого нейтрального полиморфизма, кардинально повлияла на гены ГКГ. В результате прохождения популяцией «бутылочного горлышка» оба исследованных локуса ГКГ утратили полиморфизм полностью. Современная популяция о-ва Медный остается на критически низком уровне, не восстанавливаясь до прежних размеров уже более 30 лет, несмотря на благоприятные условия среды (отсутствие конкурентов, антропогенного влияния, стабильность кормовых ресурсов, мягкий климат).

Возможно, что полиморфизм генов ГКГ в популяции песцов о-ва Медный до эпизоотии был недостаточным для формирования адекватного иммунного ответа на эктопаразита – ушного клеща, скорее всего, интродуцированного на Командорские острова с собаками, и это оказалась решающим фактором в высокой чувствительности к заболеванию.

Современные песцы о-ва Беринга обладают бóльшим числом аллелей, чем предковые песцы о-ва Медный, но значительно меньшим, чем континентальные песцы. Стоит отметить, что частые случаи инфицирования ушной чесоткой, ведущие к смерти щенков, также регистрировали у современных песцов о-ва Беринга (наблюдения автора). Учитывая историю популяции о-ва Медный и современное состояние песцов о-ва Беринга, численность которых находится в пределах 600-800 особей, мы рекомендуем обратить особое внимание на охрану этой популяции. Популяция о-ва Беринга может оказаться уязвимой в случае значительного снижения численности, ведущего к потере имеющегося полиморфизма, или проникновения новых патогенов.

ВЫВОДЫ

1. Впервые проведенное описание антигенсвязывающего региона DRB и DQB генов II класса ГКГ у песцов выявило 25 уникальных последовательностей, в

- которых обнаружены свидетельства действия балансирующего отбора, направленного на поддержание высокого аминокислотного разнообразия.
2. Результаты анализа ГКГ и нейтральных маркеров свидетельствуют о потоке генов между популяциями песцов Северной Америки и Азии и о значительно более высоком генетическом полиморфизме у континентальных, чем у островных песцов.
 3. Продолжительная изоляция песцов ведет к снижению генетического полиморфизма. На о-ве Медный еще до последнего демографического «бутылочного горлышка» было полностью утрачено разнообразие гаплотипов D-петли мтДНК, и в значительной степени разнообразие микросателлитов и генов β -цепи II класса ГКГ (Alla-DRB*01,*05 и Alla-DQB*01-*03).
 4. Демографическое «бутылочное горлышко» на о-ве Медный привело к еще большему снижению полиморфизма микросателлитов (исчезновению 5 из 17 аллелей в 9 локусах) и к полной утрате разнообразия антигенсвязывающего региона II класса ГКГ.
 5. Большая по размерам популяция о-ва Беринга сохранила более высокий уровень полиморфизма, чем популяция о-ва Медный;: большее число аллелей в микросателлитах и генах β -цепи II класса ГКГ (Alla-DRB*01-*05 и Alla-DQB*01-*03). При этом в генах ГКГ с начала прошлого века изменений в частотах и аллельном разнообразии не произошло.
 6. Анализ D-петли мтДНК подтверждает происхождение песцов о-ва Янкича из популяции о-ва Медный.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Джикия Е.Л., Плошница А.И., Колесников А.А., Гольцман М.Е. 2008. Генетический мономорфизм второго экзона гена DRB1 главного комплекса гистосовместимости у песцов острова Медный (*Alopex lagopus semenovi* Ognev, 1931). ДАН. Т. 418. №2. С. 277-278.

Джикия Е.Л., Чудакова Д.А., Плошница А.И., Загребельный С.В., Колесников А.А., Гольцман М.Е. 2006. Генетический полиморфизм Командорских популяций песца // Сохранение разнообразия животных и охотничье хозяйство России: сборник материалов международной конференции, Москва. С. 47-48.

Джикия Е.Л., Плошница А.И., Колесников А.А., Гольцман М.Е. 2007. Генетический мономорфизм второго экзона гена DRB1 главного комплекса гистосовместимости у песцов (*Alopex lagopus semenovi* Ognev, 1931) острова Медный (Командорские острова). // Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей: Материалы VIII международной научной конференции, посвященной 275-летию с начала Второй Камчатской экспедиции (1732–1733 гг.). С.312.

Джикия Е.Л., Плошница А.И., Колесников А.А., Гольцман М.Е. 2007. Генетический мономорфизм в популяции песцов острова Медный // Молекулярно-

генетические основы сохранения биоразнообразия млекопитающих Голарктики: сборник материалов международной конференции (Черноголовка). М.: Товарищество научных изданий КМК. С. 57-60.

Плошница А.И., Джикия Е.Л., Гольцман М.Е. 2007. Анализ контрольного региона исторической мтДНК в изолированной популяции песцов до прохождения через «бутылочное горлышко» // Молекулярно-генетические основы сохранения биоразнообразия млекопитающих Голарктики: сборник материалов международной конференции (Черноголовка). М.: Товарищество научных изданий КМК. С. 191-195.

Ploshnitsa A., Dzhikiya E., Goltsman M. 2007. The MHC-DRB1 monomorphism in the island subspecies of Arctic foxes (*Alopex lagopus semenovi*, Ognev 1931) // 87th Annual Meeting of American Society of Mammalogists: conference contributions, Albuquerque, New Mexico, USA. P. 68.

Ploshnitsa A. 2007. Genetic monomorphism (control region mtDNA and MHC-DRB1) in the Mednyi Arctic fox // 6th International Zoo and Wildlife Research Conference on Behavior, Physiology and Genetics: conference contributions, Berlin, Germany. P.172.

Bocharova N., Ploshnitsa A., Doronina L., Solomatnikova A., Goltsman M. 2007. Preliminary study of the blood in the endemic insular Arctic fox population // 6th International Zoo and Wildlife Research Conference on Behavior, Physiology and Genetics: conference contributions, Berlin, Germany. P.44.

Bocharova N., Stefanski V., Ploshnitsa A., Doronina L., Goltsman M. 2009. Preliminary immunologic study in endangered Arctic fox subspecies (*Alopex lagopus semenovi*, Ognev. 1931) // 7th International Zoo and Wildlife Research Conference on Behavior, Physiology and Genetics: conference contributions, Berlin, Germany. P. 67.

Ploshnitsa A., Goltsman M., Kennedy L., Macdonald D., Sommer S. 2009. Effects of historical founder effects and a recent bottleneck on MHC variability in Commander arctic foxes // 7th International Zoo and Wildlife Research Conference on Behavior, Physiology and Genetics: conference contributions, Berlin, Germany. P. 194.

Ploshnitsa A., Goltsman M., Kennedy L., Macdonald D.W., Sommer S. 2010. The β -chain MHC class II variability in Arctic foxes // 1st Community Genetics meeting: conference contributions, Manchester, UK. P. 12.