

УДК 575.164

## КРУПНОМАСШТАБНЫЕ ДУПЛИКАЦИИ ГЕНОВ И ДИВЕРГЕНЦИЯ ПАРАЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ НА ПРИМЕРЕ РЫБ

© 2013 г. Н. Д. Озернюк, Н. С. Мюге

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва 119334

e-mail: ozernyuk@mail.ru, mugue@mail.ru

Поступила в редакцию 27.06.2012 г.

На примере рыб рассмотрены механизмы дивергенции дублированных генов, приводящие к небольшим (“субфункционализация”) и значительным (“неофункционализация”) изменениям паралогов. Дивергенция генов осуществляется при помощи таких механизмов, как приводящие к аминокислотным заменам мутации, реорганизация интрон-экзонной структуры и изменения регуляторных последовательностей, вызывающие различия в пространственно-временной локализации экспрессии паралогичных генов.

DOI: 10.7868/S0016675813010086

Одним из важнейших механизмов, участвующих в эволюционных преобразованиях, служат дубликации генов (в том числе, полиплоидизация геномов). Роль дубликации генов в эволюционных процессах одним из первых отмечал Н.К. Кольцов. В частности, еще в 1932 г. он писал: “В пределах некоторых родов растений и животных отдельные виды или расы (например, у пшениц) отличаются друг от друга двойным или многократным числом хромосом. Это позволяет в некоторых случаях наметить путь эволюции в данном роде, а с другой стороны – наводит на мысль о возможности получить искусственно новые формы путем экспериментального удвоения числа хромосом...” [1].

Для изучения взаимосвязи дубликации генов и эволюционных преобразований модельными объектами служат рыбы. Принято считать, что около 350 млн. лет назад произошла полная дубликация генома (полиплоидизация) предковой формы рыб, что повлекло за собой бурный всплеск видового разнообразия этой группы (эволюционная радиация) и возникновение нового таксона: костистых рыб [2–4]. Особенности этого процесса исследуются в настоящее время на полиплоидных и диплоидных видах рыб, что позволяет приблизиться к пониманию механизмов возникновения новых таксонов. Среди рыб, насчитывающих примерно 28000 видов, полиплоидия распространена в нескольких отрядах рыб: осетрообразных – представителей хрящевых ганоидов, а также лососеобразных, карпообразных, карпозубообразных, окунеобразных и некоторых других, относящихся к костистым рыбам [5–7].

Роль дубликации генов в эволюционной радиации костистых рыб хорошо иллюстрируется на примере *Hox*-генов, контролирующих формообразовательные процессы и, следовательно, опре-

деляющих в значительной мере морфологию взрослого организма [8–12].

### ОСОБЕННОСТИ ПОЛИПЛОИДИЗАЦИИ *Hox*-ГЕНОВ И ИХ ЭВОЛЮЦИОННОЕ ЗНАЧЕНИЕ

В эволюционных преобразованиях строения животных на уровне генетической регуляции важное значение отводится *Hox*-генам. Дубликация этих генов (как тандемная, так и полная) на определенных этапах филогенетического развития коррелирует с крупномасштабными эволюционными преобразованиями, в частности, формированием новых таксонов [13–15]. Показательным в этом отношении может служить возникновение таксонов в ходе эволюции костистых рыб. Этот вывод следует из сравнения особенностей строения *Hox*-генов у различных групп животных и палеонтологическими данными о времени их происхождения.

Анализ структуры *Hox*-генов, собранных обычно в кластеры, а иногда диспергированных по геному, показал, что вариации числа этих генов и особенности их кластерной организации отражают эволюционную историю генетической регуляции формообразовательных процессов [12]. Простейший тип организации *Hox*-генов в виде одного кластера появился, как предполагается, у предков всех билатеральных организмов [14]. Среди современных животных *Hox*-гены, собранные в один кластер, характерны для всех первичноротых (Protostomata), а также для примитивных вторичноротых (Deuterostomata). В частности, такое строение имеют *Hox*-гены у представителя плоских червей *Lineus sanguineus* [16] и у представителя *Drosophila melanogaster* [17]. Известно, что у представителя

современных вторичноротых ланцетника (*Branchiostoma floridae*) *Нох*-гены собраны в один кластер, включающий 14 генов [9]. *Нох*-гены, собранные в один кластер — результат тандемной дубликации предкового гена.

Происхождение позвоночных связано с широкомасштабной экспансией новых генов в результате двух раундов полной дубликации геномов (2R-гипотеза) [18, 19]. Эти события привели, в частности, к дубликации целых кластеров *Нох*-генов. В соответствии с этим современные тетраподные позвоночные, предки которых содержали один *Нох*-кластер, имеют четыре кластера данных генов. Такая организация *Нох*-генов установлена для мыши и человека (кластеры А, В, С, D) с суммарным количеством 39 генов [13]. Сходная картина 4-кластерной организации *Нох*-генов была выявлена у амфибий (шпорцевая лягушка) и птиц (курица) [20].

#### *Нох*-гены у рыб

Анализ организации *Нох*-генов у костистых рыб, первоначально проведенный на данио *Danio rerio* (отр. Сурпиниформес), дал неожиданные результаты. Оказалось, что у этих рыб *Нох*-гены организованы не в виде четырех кластеров, как у других тетраподных позвоночных, а состоят из 7 кластеров (Aa, Ab, Ba, Bb, Ca, Cb, D), содержащих 48 генов [8]. Сходная структура *Нох*-кластеров была выявлена еще у одного представителя костистых рыб медаки *Oryzias latipes* (отр. Сурпинодонтиформес) [15]. Из анализа сложной организации *Нох*-генов у этих рыб следует, что они — результат дубликации четырех *Нох*-кластеров, выявленных у других тетраподных позвоночных (амфибии, птицы, млекопитающие). При сравнительном изучении этих генов у еще одного представителя костистых рыб из сем. иглобрюхих *Takifugu rubripes* (отр. Тетраодонтиформес) также прослеживается дубликация четырех кластеров *Нох*-генов, но из восьми теоретически возможных кластеров сохранились только четыре: два А-кластера и по одному В и С, тогда как остальные были утрачены [10]. В геноме цихлид (сем. Сихлидае, отр. Перциформес) также произошла потеря *Нох*-кластеров: было выявлено шесть кластеров [21].

Вместе с тем у другой более древней группы: хрящевых рыб (Chondrichthyes), в состав которой входят, в частности, химеры, акулы и скаты, содержится четыре *Нох*-кластера (А, В, С, D), обнаруженные у *Callorhynchus millii* — представителя химерообразных рыб (отр. Химериформес); три *Нох*-кластера (А, В, D) выявлено у *Leucoraja erinacea*, относящегося к ромбовидным скатам (сем. Ражиде), и у *Scyliorhinus canicula* — представителя кошачьих акул (сем. Сцилориниде) [22]. Следует отметить, что у другого представителя акул рыб — разнозубой акулы *Heterodontus francisci*

(отр. Гетеронтиформес), обнаружено только два *Нох*-кластера, соответствующих А- и D-кластерам млекопитающих, взятых за основу классификации [12, 23].

Таким образом, произошедшая у предковых форм рыб (после отделения Асипенсериформес и Семинотиформес) дубликация четырех кластеров *Нох*-генов, характерных для позвоночных животных, привела к заметному увеличению количества этих генов, что в итоге послужило основой для всплеска разнообразия данной группы, составившей впоследствии новый крупный таксон костистых рыб [8, 10, 12].

### МЕХАНИЗМЫ ДИВЕРГЕНЦИИ ДУПЛИЦИРОВАННЫХ ГЕНОВ У КОСТИСТЫХ РЫБ: АДАПТАЦИОННЫЕ И ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ

На современном этапе развития данного направления важнейшим представляется вопрос о механизмах дивергенции дублицированных генов. Начальные этапы этого процесса можно рассматривать как элементарные эволюционные события, приводящие в итоге к эволюционным преобразованиям.

Паралогичные гены, появляющиеся в результате генных дубликаций, проходят стадию дивергенции (обычно это “субфункционализация” — образование родственных генов в результате мутаций, приводящих к небольшим функциональным изменениям, а “неофункционализация” — приобретение геном новых функций в результате мутаций) [4, 19, 24]. Следует отметить, что только менее половины дублицированных генов сохраняются в геноме длительное время и потенциально могут подвергаться дивергенции, участвуя в эволюционных и адаптационных преобразованиях [4]. Удобной моделью для анализа механизмов дивергенции дублицированных генов служат представители костистых рыб, формирование огромного разнообразия которых произошло после дубликации генома у предковых форм [4, 12, 25]. На примере костистых рыб данио *Danio rerio*, медаки *Oryzias latipes*, колюшки *Gasterosteus aculeatus*, иглобрюха *Tetraodon nigroviridis*, фугу *Takifugu rubripes*, вьюна *Misgurnus fossilis*, золотой рыбки *Carassius auratus*, тиляпии *Oreochromis niloticus* было установлено, что по крайней мере 3–4% дублицированных белок-кодирующих генов (генов-паралогов) сохранились в геноме [25]. Многие из генов-паралогов являются ключевыми для процессов развития. Белки — продукты данных генов, функционируют как транскрипционные факторы, сигнальные молекулы, ферменты и др. Почти все обсуждаемые здесь паралогичные гены прошли через дивергенцию, результатом которой стало в итоге приобретение новых белков или изменение экспрессии кодируемых этими генами

белков [25]. Последствия генных дупликаций для эволюции позвоночных, и в частности, рыб, выражаются в более специализированной регуляции процессов развития. В механизмах дивергенции паралогичных генов выделяют уровень регуляторного контроля и уровень изменения белков (прежде всего аминокислотных замен) [26, 27].

Процесс дивергенции генов осуществляется при помощи нескольких механизмов: точечные мутации, приводящие к аминокислотным заменам, изменения интрон-экзонной структуры и изменения регуляторных последовательностей, приводящие к различиям пространственно-временной локализации экспрессии паралогичных генов [28–32]. Очевидно, что выводы об особенностях дивергенции дублицированных генов, в частности заключение о “субфункционализации” или “неофункционализации”, формулируются на основе анализа структуры и функции белков, кодируемых данными генами. Поэтому важным аспектом в понимании механизмов дивергенции генов служит не только секвенирование паралогичных генов, но и изучение структуры кодируемых ими белков, что позволяет судить об их функциональных особенностях. Анализ данных механизмов на примере рыб приводится ниже.

У костистых рыб (данио, иглобрюх, медака, вьюн, цихлиды и др.) проанализировано много паралогичных генов, кодирующих важнейшие типы белков: транскрипционные факторы, ферменты, гомеозисные *Hox*-гены, мембранные рецепторы и другие белки, вовлеченные в процессы внутриклеточной сигнализации [25, 30, 31, 32]. Дублицированные *Hox*-гены у данио *D. rerio* отличаются прежде всего составом паралогов. Кластер Aa содержит 8 гомеобоксных генов, а Ab — только 5; Ba — 10 генов, а Bb — только 4 и т.д. Сходные различия получены для кластера *Hox2* иглобрюха и медаки [33]. У этих рыб кластер *Hox2a* содержит девять генов, а *Hox2b* — 5 генов. Расположение данных генов в составе кластера также отличается у этих рыб.

Много примеров дивергенции генов установлено для паралогов, кодирующих транскрипционные факторы. В частности, паралогичные гены сем. *Sox* (*Sox11a* и *Sox11b*), которые кодируют соответствующие транскрипционные факторы, выявлены в геноме данио *D. rerio* [4]. У этого вида рыб обнаружены гены-паралоги *bmp2a* и *bmp2b*, кодирующие еще один вид факторов транскрипции, принадлежащих к сем. *Vmp* [34]. Паралогичные гены *tyr* (*tyrosinase*) (*tyra* и *tyrb*), которые кодируют фермент метаболизма меланина, тирозиназу, выявлены в геноме фугу *Takifugu rubripes* и тилапии *Oryzias niloticus* [4]. Паралоги гена *Snap* (*snap25a* и *snap25b*), кодирующие белок синапсов Snap25, обнаружены в геноме данио [35]. В геноме этих рыб выявлены гены-паралоги (*fabh1a* и

*fabh1b*), кодирующие синтез белка типа 1, связывающего жирные кислоты (FABP1) [31]. Дивергенция паралогов показана также для генов легких цепей миозина (*mlc*), кодирующих синтез соответствующих мышечных белков у вьюна *Misgurnus fossilis* [30, 35]. Гены *mlc1* и *mlc3* являются паралогами, прошедшими этап дивергенции как на уровне мутаций, так и на уровне интрон-экзонной структуры.

Дупликация кластерных *Hox*-генов, регулирующих формообразовательные процессы в раннем онтогенезе и в ходе эволюционных преобразований, показана для гена *Hox2*, представленного в геноме фугу *Takifugu rubripes* и медаки *O. latipes* паралогами *Hox2a* и *Hox2b* [33]. Эти паралоги экспрессируются в различных отделах заднего мозга. Предполагается, что у данио также произошла дупликация гена *Hox2*. Однако паралог *Hox2b* сохранился в геноме, а *Hox2a* превратился в псевдоген.

Для анализа дивергенции паралогичных генов, т.е. их “субфункционализации” — наиболее часто встречаемого результата дивергенции, важно изучение структурных изменений белков, вызванных мутациями, и их функциональных свойств. Этот подход был использован для анализа паралогичных генов и их белковых продуктов у тетраплоидных рыб.

#### Субфункционализация дублицированных генов

**Точечные мутации.** Для изучения особенностей “субфункционализации” важен выбор в качестве модели генов, мутации в которых приводят к детектируемым функциональным изменениям. В связи с этим мы провели секвенирование двух паралогичных генов лактатдегидрогеназы (*ldh-A*) из быстрых скелетных мышц вьюна *Misgurnus fossilis* — тетраплоидного вида карповых рыб [32].

Фермент углеводного обмена лактатдегидрогеназа (LDH-M4), кодируемый геном *ldh-A*, в быстрых скелетных мышцах вьюна имеет структуру гомотетрамера [36]. Первоначально при изучении этого фермента при низких (5°C) и относительно высоких (18°C) температурах адаптации (акклимации) в течение 20 сут были выявлены две формы этого фермента, которые отличались кинетическими особенностями, термодинамическими свойствами, устойчивостью к действию температуры и денатурирующих агентов [36].

В мышцах вьюнов, адаптированных к низкой и высокой температуре, были обнаружены и охарактеризованы две изоформы LDH-A mRNA: короткая  $\alpha$ -изоформа (1332 пн) и длинная  $\beta$ -изоформа (1550 пн), которые имеют как 5'-UTR, так и ORF одинаковой длины (333 аминокислотных остатка), но отличаются длиной 3'-UTR [32] (рис. 1). Секвенирование этих двух mRNA выявило 44 нуклеотидные замены, которые в итоге

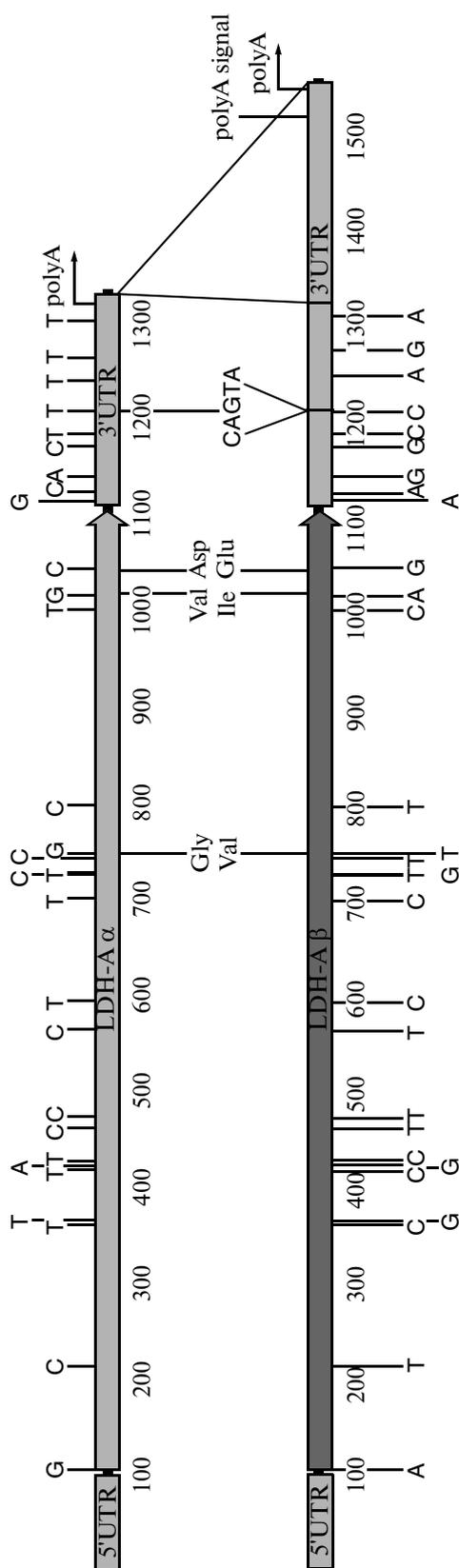


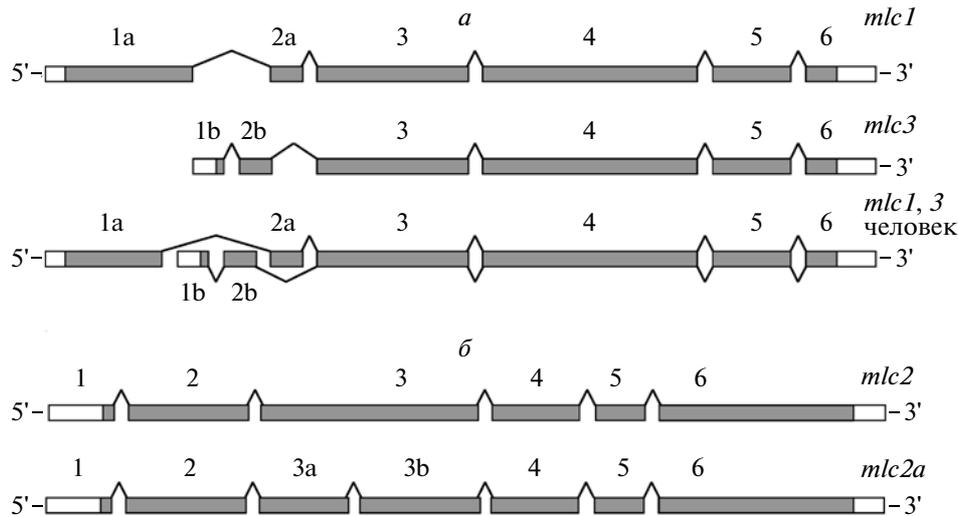
Рис. 1. Структура mRNA паралогичных копий гена LDH-A вьюна. Нуклеотидные замены указаны снаружи, а замены аминокислот указаны внутри.

привели к трем аминокислотным заменам (Gly214Val; Val304Ile и Asp312Glu). Как показало компьютерное моделирование пространственной структуры, одна из аминокислотных замен локализована в межсубъединичной области фермента, что может сказываться на особенностях его функционирования [37]. Следует отметить, что в скелетных мышцах присутствуют и  $\alpha$ - и  $\beta$ -изоформы LDH-A mRNA, но при разных температурах адаптации соотношение этих изоформ изменяется. При адаптации к 18°C это соотношение составляет 5 : 1, а при 5°C содержание  $\beta$ -изоформы снижается практически до нуля [32].

Полученные различия могут быть результатом мутаций паралогичных генов. Однако не ясно, почему за столь длительный период, прошедший после крупномасштабной дупликации генома у рыб, который привел к формированию *Teleostei*, произошло так мало аминокислотных замен. Однако цитогенетический анализ показал, что вьюн является тетраплоидом по отношению к другим близким видам семейства. Таким образом, данные различия между паралогичными генами у вьюна могут быть объяснены дупликацией генома, связанной с гибридизацией родственных предковых форм (аллотетраплоидизации). Если предположить что гибридизация происходила между холодолюбивой и теплолюбивой формами, тогда кинетические особенности двух форм данного фермента могут быть легко объяснимы.

Зависимые от температуры адаптационные изменения соотношения экспрессирующихся  $\alpha$ - и  $\beta$ -изоформ LDH-A mRNA определяют соотношение синтезируемых форм фермента LDH при низких и относительно высоких температурах, что подтверждается проведенным нами изучением кинетических, термодинамических и структурных свойств данного фермента [32, 36]. Зависящие от температуры среды функциональные различия той или другой изоформы, приводят к тому, что при низких температурах функционирует одна форма LDH, а при относительно высоких – другая. Таким образом, изменение соотношения изоформ данного фермента при разных температурах служит одним из механизмов адаптации метаболизма у этих рыб, который расширяет температурный диапазон их метаболической активности и, следовательно, температурного диапазона обитания вида.

Следует отметить, что начальные этапы дивергенции дублированных генов, как правило, сводятся к расширению или специализации функциональных возможностей исходного (предкового) белка. На этих этапах дивергенции паралогов происходят небольшие изменения структуры и функциональных свойств белков, сводящиеся к адаптационным изменениям. В связи с этим дивергенция дублированных генов LDH-A служит достаточ-



**Рис. 2.** Экзон-интронная структура генов легких цепей миозина (*mlc*). *a* – гены *mlc1* и *mlc3* данио и ген *mlc1/3* человека, кодирующий альтернативные сплайс-формы; *б* – структура генов *mlc2* и *mlc2a* данио.

но редким примером “субфункционализации”, непосредственно затрагивающей адаптационные процессы – расширение температурных границ жизнедеятельности вида и, как следствие, расширение его ареала.

**Интрон-экзонная структура.** Дивергенция дублированных генов во многих случаях связана с изменениями интрон-экзонной структуры этих генов, часто с потерей альтернативного сплайсинга предковой формы гена. Данный механизм показан для многих паралогичных генов [28–33].

Среди рыб одним из таких примеров служит дублированный ген *Syn2* фугу (*T. rubripes*), кодирующий синтез белка синапсина (*synapsin*) [29]. Следует отметить, что у человека паралог гена *Syn2* являются продуктами альтернативного сплайсинга. Паралоги этого гена (*Syn2A* и *Syn2B*) кодируют белки, которые участвуют в синаптической передаче и осуществляют *upstream* регуляцию роста аксонов и регенерацию клеток ретинальных ганглиев. У фугу паралог гена *Syn2A* состоит из 13 экзонов, а *Syn2B* – из 11 экзонов. Кроме того, паралог *Syn2A* у этого вида рыб содержит (между 5-м и 6-м экзонами) вставку в виде гена (*timp4*), который кодирует синтез тканевого ингибитора металлопротеиназ. Данный ген локализован и функционирует в паралоге *Syn2A*, однако в *Syn2B* паралогичная копия гена *timp4*, по-видимому, утрачена [29].

Потеря альтернативного сплайсинга при генной дубликации наблюдается также при анализе последовательностей гена *Mitf*. В геноме нескольких видов рыб (меченосца, фугу, иглобрюха, данио) обнаружены паралогичные гены *Mitf* (*mitf-m* и *mitf-b*), кодирующие синтез связанного с мик-

рофталмией транскрипционного фактора MITF [28]. Этот фактор транскрипции играет важнейшую роль в дифференцировке, жизнеспособности и функционировании меланоцитов. Если *mitf-b* содержит 10 экзонов, то *mitf-m* – 8 экзонов. У высших позвоночных изоформы гена *Mitf* возникли в результате использования альтернативных экзонов и промоторов исходного гена [28].

В нашей работе также был изучен механизм дивергенции дублированных генов, основанный на изменении интрон-экзонной организации паралогичных генов у рыб [30] (рис. 2). В частности, был установлен механизм формирования гена одной из легких цепей миозина (*mlc3*) из мышц костистых рыб (вьюна, данио и иглобрюха) в результате дубликации *mlc1* и последующей дивергенции генов-паралогов. У рыб паралоги *mlc1* и *mlc3* локализованы в разных хромосомах. Прежде всего была показана высокая степень гомологии *mlc1* и *mlc3*, а также сходство их экзон-интронной структуры. У этих генов-паралогов данио четыре экзона (3–6), формирующих кальций-связывающий домен EF-hand типа, имеют сходную структуру, а отличия локализованы в 5'-области: *mlc1* имеет экзоны 1а и 2а в этой области, тогда как *mlc3* – экзоны 1b и 2b, негомологичные экзонам 1а и 2а гена *mlc1* (рис. 2,а). Предполагается, что предковый ген *mlc* до дубликации имел в 5'-области другую экзонную структуру, состоящую из четырех последовательных экзонов: 1а, 1b и 2а, и кодировал две изоформы с использованием альтернативного сплайсинга. При дубликации этого гена произошла дифференциальная дегенерация альтернативных экзонов и их разделение между паралогичными генами *mlc1* и *mlc3*, которое соответствует нынешнему расположению. Следует отметить, что у высших позвоноч-

ных *mlc1* и *mlc3* являются альтернативными сплайсформами [38] и у рыб гены *mlc1* и *mlc3* образовались в результате утраты альтернативного сплайсинга, характерного для предкового гена (рис. 2). Таким образом, продукт гена *mlc3* является новой формой кальций-связывающего белка, который осуществляет более тонкую регуляцию сокращения скелетных мышц, что согласуется с одной из основных трактовок дубликации генов как способа расширения адаптивных функций в процессе эволюции.

В геноме данио была обнаружена дубликация еще одного гена легких цепей миозина (*mlc2*) [30]. Был выявлен паралог данного гена, локализованный на другой хромосоме. Из шести экзонов этих генов пять имеют идентичную структуру, а один экзон отличается: если в одном из паралогов гена *mlc2* третий экзон сохранился без изменений, то в копии *mlc2a* этот экзон разделился на два путем вставки интрона (экзоны 3a и 3b) (рис. 2, б). Таким образом, паралоги генов *mlc1* и *mlc2* позволяют увеличить в геноме количество генов и их белковых продуктов, которые обладают дополнительными более совершенными функциями.

*Пространственно-временная локализация экспрессии паралогичных генов.* Существенную роль в дивергенции дублицированных генов играют различия в локализации экспрессии генов-паралогов. Было установлено, что примерно 65% изученных дублицированных генов у данио имеют разную или частично перекрывающуюся локализацию экспрессии каждого из паралогов в тех или иных тканях и органах [25]. В большинстве этих случаев речь идет о частично перекрывающихся зонах экспрессии паралогичных генов.

На нескольких видах костистых рыб (данио, колюшка, фугу, рисовый угорь) были выявлены паралоги гена *Sox9* (*Sox9a* и *Sox9b*), которые регулируют такие процессы, как формирование хряща, образование нервного гребня, детерминацию клеток семенника [39]. Детальный анализ локализации экспрессии этих паралогов показал, что в развивающихся зародышах и личинках колюшки и данио имеются общие зоны активности: ген *Sox9a* у этих видов экспрессируется вокруг глаза и слухового пузырька, а у данио дополнительно еще и в развивающихся сомитах. Экспрессия паралогичного гена *Sox9b* у зародышей этих рыб отмечена вокруг глаза, слухового пузырька, а также, в отличие от *Sox9a*, в районе нервного гребня. Таким образом, в экспрессии этих генов-паралогов наблюдаются как перекрывающиеся, так и специфические зоны экспрессии [39].

В нашей работе изучались паралоги гена легких цепей миозина из скелетных мышц данио (*mlc2*) [30] (рис. 2). Если исходный ген *mlc2* экспрессируется в мышцах, а его белковый продукт участвует в регуляции мышечного сокращения,

то паралог этого гена (*mlc<sub>e</sub>*), как следует из анализа данных банка Unigene (Кластер Dr. 36460), экспрессируется в зародышах, эмбриональном сердце и регенерирующем плавнике данио. Возможно, паралог *mlc2* может служить матрицей для синтеза эмбриональных легких цепей миозина (MLC<sub>e</sub>), поскольку другой ген *mlc<sub>e</sub>* (помимо паралога *mlc2*), кодирующий в зародышах и личинках риб MLC<sub>e</sub>, не обнаружен [30].

Анализ различной или частично перекрывающейся локализации экспрессии дублицированных генов был проведен на разных стадиях эмбрионального развития данио [25]. В период эмбриогенеза на стадии pharyngula показано, что дублицированный ген *fabp 11* экспрессируется в сетчатке, хрусталике и венах, тогда как его паралог *fabp 11l* — только в сетчатке. Экспрессия гена *frd8a* на стадии сегментации сомитов обнаружена в 3–7 сегментах глоточных (жаберных) дуг, переднем мозге, нервной трубке, вентральной мезодерме, заднем мозге, тогда как паралог *frd8b* — только в конечном мозге и промежуточном мозге. Частично перекрывающиеся зоны экспрессии в зародышах данио показаны для паралогов гена *esrrg* [25]. Если одна из копий экспрессируется на стадии сегментации мезодермы во всех тканях зародыша, то его паралог — только в хвостовой почке. Сходная картина экспрессии обнаружена для гена *gpx1*. Паралог *gpx1a* экспрессируется в клетках боковой линии этих рыб, сетчатке, печени, кишечнике, tectum, а его копия — в клетках боковой линии и слухового пузырька. Одинаковая локализация экспрессии характерна для 5% паралогичных генов. Значительная часть генов-паралогов (30%) не имеет пространственного ограничения экспрессии [25].

Различия в пространственной локализации экспрессии установлены также для генов *Hox*-кластеров. Паралог гена *Hox2a*, активность которого выявлена в заднем мозге фугу, слабо экспрессируется в сегменте r2, тогда как *Hox2b* активно экспрессируется в сегментах r2–r6 [33].

В отношении временных отличий экспрессии следует отметить, что соотношение экспрессии отдельных паралогичных копий меняется на разных стадиях эмбрионального развития данио [25]. Было показано, что из 67 пар исследованных дублицированных генов только для четырех паралогов характерна корегуляция — отсутствие различий в экспрессии паралогичных генов на разных стадиях развития. Остальные 63 пары паралогичных генов проявляют или реципрокный (инвертированный) характер экспрессии (например, паралоги *fbx14* и *fbx14a*), или отличающуюся на разных стадиях развития динамику экспрессии (паралоги *socs3a* и *socs3b*).

Следует отметить, что среди исследованных паралогичных генов различия в пространствен-

но-временной экспрессии встречаются значительно чаще по сравнению с различиями, вызванными структурой доменов или субклеточной локализацией [25]. Таким образом, дивергенция дублированных генов может происходить за счет таких механизмов, как точечные мутации, изменения интрон-экзонной структуры, различия пространственно-временной локализации экспрессии тех или иных генов, и эти механизмы дивергенции часто функционируют параллельно (одновременно).

Работа частично поддержана грантом Программы фундаментальных научных исследований Президиума РАН “Живая природа: современное состояние и проблемы развития” (подпрограмма “Динамика и сохранение генофондов”).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Кольцов Н.К. Проблемы биологии // Социалистическая реконструкция и наука. 1932. Вып. 9–10. С. 41.
2. Taylor J.S., Van de Peer Y., Braasch I. et al. Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish // Philos. Trans. R. Soc. Land B. Biol. Sci. 2001. V. 356. P. 1661–1679.
3. Taylor J.S., Braasch I., Frickey T. et al. Genome duplication, a trait shared by 22,000 species of ray-finned fish // Genome Res. 2003. V. 13. P. 382–390.
4. Hoegg S., Brinkmann H., Naylor J.S. et al. Phylogenetic timing of the fish-specific duplication correlates with the diversification of teleost fish // J. Mol. Evol. 2004. V. 59. P. 190–203.
5. Васильев В.П. Эволюционная кариология рыб. М.: Наука, 1985. 300 с.
6. Бириштейн В.Я. Цитологические и молекулярные аспекты эволюции позвоночных животных. М.: Наука, 1987. 284 с.
7. Нельсон Дж.С. Рыбы мировой фауны. М.: Книжный дом “ЛИБРОКОМ”, 2006. 880 с.
8. Amores A., Force A., Yan Y.L. et al. Zebrafish *hox* clusters and vertebrate genome evolution // Science. 1998. V. 282. P. 1711–1714.
9. Ferrier D.E., Minguillon C., Holland P.W. et al. The amphioxus Hox cluster: deuterostome posterior flexibility and *Hox 14* // Evol. Dev. 2000. V. 2. P. 284–293.
10. Aparicio S., Chapman J., Stupka E. et al. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes* // Science. 2002. V. 297. P. 1301–1310.
11. Malaga-Trillo E., Laessing U., Lang D.M. et al. Evolution of duplicated *reggie* genes in zebrafish and goldfish // J. Mol. Evol. 2002. V. 54. P. 235–245.
12. Josefowicz C., McClintock J., Prince V. The fate of zebrafish Hox gene duplications // J. Struct. Func. Genomics. 2003. V. 3. P. 185–194.
13. McGinnis W., Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning // Cell. 1992. V. 68. P. 283–302.
14. de Rosa R., Greiner J.K., Andreeva T. et al. Hox genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution // Nature. 1999. V. 399. P. 772–776.
15. Naruse K., Fukamachi S., Mitani H. et al. A detailed linkage map of medaka *Oryzias latipes*. Comparative genomics and genome evolution // Genetics. 2000. V. 154. P. 1773–1784.
16. Kmita-Cunise M., Loosli F., Bierne J. et al. Homeobox genes in the ribbonworm *Lineus sanguineus*: evolutionary implications // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 3030–3035.
17. Kappen C., Schughart K., Ruddle F.H. Two steps in the evolution of Antennapedia-class vertebrate homeobox genes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 5459–5463.
18. Holland P.W., Garcia-Fernande J., Williams N.A. Gene duplications and the origins of vertebrate development // Development. 1994. Suppl. P. 125–133.
19. Sidow A. Gen(om)e duplications in the evolution of early vertebrates // Curr. Opin. Genet. Dev. 1996. V. 6. P. 715–722.
20. Godsave S., Dekker E.J., Holling T. et al. Expression patterns of *Hoxb* genes in the *Xenopus* embryo suggest roles in anteroposterior specification of the hindbrain and in dorsoventral patterning of the mesoderm // Dev. Biol. 1994. V. 166. P. 465–476.
21. Meyer A., Malaga-Trillo E. Vertebrate genomics: more fishy tales of *Hox* genes // Curr. Biol. 1999. V. 9. R210.
22. King D.L., Gillis J.A., Carlisle H.R. et al. A natural deletion of the HoxC cluster in elasmobranch fishes // Science. 2011. V. 334(6062). P. 1517–1521.
23. Kim C.B., Amemiya C., Bailey W. et al. Hox cluster genomics in the horn shark, *Heterodontus francisci* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 1655–1660.
24. Chen J.-M., Chuzhanova N., Stenson P.D. et al. Meta-analysis of gross insertions causing human genetic disease: novel mutational mechanisms and the role of replication slippage // Human Mutation. 2005. V. 25. P. 207–221.
25. Kassahn K.S., Dang V.T., Wilkins S.J. et al. Evolution of gene function and regulatory control after whole-genome // Genome Res. 2012. V. 19. P. 1404–1418.
26. Force A., Lynch M., Pickett F.B. et al. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations // Genetics. 1999. V. 151. P. 1531–1545.
27. Woolfe A., Elgar G. Comparative genomics using *Fugu* reveals insight into regulatory subfunctionalization // Genome Biol. 2007. V. 8. R53.
28. Altschmied J., Delfgaaw J., Wilde B. et al. Subfunctionalization of duplicate *mitf* genes associated with differential degeneration of alternative exons in fish // Genetics. 2002. V. 161. P. 259–267.
29. Yu W.P., Brenner S., Venkatesh B. Duplication, degeneration and subfunctionalization of the nested synapsin-Timp genes in *Fugu* // Trends Genet. 2003. V. 19. P. 180–183.
30. Мюге Н.С., Озернюк Н.Д. Сравнительный анализ структуры легких цепей миозина у рыб и роль дубликации генов // Изв. РАН. Серия биол. 2006. № 1. С. 38–43.
31. Sharma M.K., Liu R.-Z., Thisse C. et al. Hierarchical subfunctionalization of *fabp1a*, *fabp1b* and *fabp10* tissue-specific expression may account for retention of these duplicated genes in zebrafish (*Danio rerio*) genome // FEBS J. 2006. V. 273. P. 3216–3229.

32. Zakhartsev M., Lucassen M., Kulishova L. et al. Differential expression of duplicated LDH-A genes during temperature acclimation of weatherfish *Misgurnus fossilis*. Functional consequences for the enzyme // FEBS J. 2007. V. 274. P. 1503–1513.
33. Tümpel S., Cambroner F., Wiedemann L.M. et al. Evolution of *cis* elements in the differential expression of two *Hoxa2* coparalogous gene in pufferfish (*Tarifugu rubripes*) // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 5419–5424.
34. Martinez-Bardera J.P., Toresson H., Da Rocha S. et al. Cloning and expression of three members of the zebrafish Bmp family: *Bmp2a*, *Bmp2b* and *Bmp4* // Gene. 1997. V. 198(1–2). P. 53–59.
35. Мюге Н.С., Тихонов А.И., Озернюк Н.Д. Онтогенетический и межвидовой анализ структуры легких цепей миозина из скелетных мышц вьюна // Изв. РАН. Серия биол. 2005. № 5. С. 573–577.
36. Ozernyuk N.D., Klyachko O.S., Polosukhina E.S. Acclimation temperature affects the functional and structural properties of lactate dehydrogenase from fish (*Misgurnus fossilis*) skeletal muscles // Comp. Biochem. Physiol. 1994. V. 107B. P. 141–145.
37. Пуляхина И.В., Озернюк Н.Д. Лактатдегидрогеназа из мышц тетраплоидного вида рыб вьюна *Misgurnus fossilis* при температурной адаптации: выявление структурных различий двух форм фермента методами молекулярного моделирования // Биофизика. 2011. Т. 56. С. 609–616.
38. Weeds A.G., Lowey S. Substructure of the myosin molecule // J. Mol. Biol. 1971. V. 61. P. 701–725.
39. Cresko W.A., Yan Y.L., Baltus D.A. et al. Genome duplication, subfunction partitioning, and lineage divergence: *Sox9* in stickleback and zebrafish // Dev. Biol. 2003. V. 228. P. 480–489.

## Large-Scale Genome Duplications and Paralog Divergence in Fish

N. D. Ozernyuk and N. S. Muge

Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia  
e-mail: ozernyuk@mail.ru, muge@mail.ru

Based on fish genomic studies, we review mechanisms of divergence in duplicated genes (paralogs), resulted in small (“subfunctionalization”) or large (“neofunctionalization”) changes in paralogs. Gene divergence occurs due to several processes, such as non-synonymous substitutions, exon-intron structure rearrangement, and alterations in regulatory regions, which cause differential temporal or spatial expression of paralogous gene copies during ontogenesis.