

ВВЕДЕНИЕ

Doublesex (dsx) - ключевой ген, участвующий в определении пола и половом диморфизме многих филумов. Dsx является транскрипционным фактором и подвергается альтернативному сплайсингу с образованием изоформ, специфичных для самцов и самок, в ответ на определяющие пол стимулы и регулирует экспрессию некоторых генов, принимающих участие в развитии организма в соответствии с его полом. В белке doublesex есть два основных домена: ДНК-связывающий домен (характерный для всех DMRT генов) и домен, обеспечивающий димеризацию транскрипционного фактора (содержит мотивы, как специфичные для пола, так и нет). Dsx регулирует экспрессию некоторых генов, вовлеченных в репродуктивные системы самок и самцов таких как, развитие гениталий, образование желтка, откладывание жировых телец в самках и.т.п. В последние десятилетие некоторые исследования показывают, что dsx так же участвует в регуляции полового диморфизма и полового поведения у разных насекомых. Например, у женских особей вида *Papilio polytes*, ген обеспечивает образование мимикрирующих фенотипов, в то время, как у *Bombyx mori* он участвует в образовании феромонов. Такое разнообразие функций достигается путем а) альтернативных аллелей, б) органо-, ткане-, полоспецифичной экспрессией, с) дифференциальной экспрессии на различных стадиях развития. Для того, чтобы такой необходимый ген, как dsx приобрел такие разные роли с сохранением его изначальной функции, его основные домены должны оставаться нетронутыми, в то время, как остальная последовательность должна быть подвержена эволюционным изменениям. Нашей целью было понять, каким образом dsx добивается такой изменчивости. Мы сравнили последовательности трнскриптов dsx из 5 видов чешуекрылых (бабочки и моль) и нашли сайты в каждом экзоне, которые претерпевают синонимичные и несинонимичные замены. Мы так же сделали сравнение транскриптов, специфичных для самцов, в 11 видах для того, чтобы определить горячие точки мутаций. В заключение, мы построили филогенетическое дерево для этих 11 видов по гену dsx.

МЕТОДЫ

Поиск гена *doublesex* в геномах бабочек

Мы загрузили геномы видов *Lepidoptera* из NCBI с транскриптомными данными. Используя последовательность белка *doublesex (dsx)* из вида *Papilio polytes*, мы определили положение гена с помощью программы BLAST 2.6.0+.

Получение последовательностей экзонов

С помощью Integrative Genomics Viewer (IGV, ver. 2.3.94) мы нашли координаты и расположение экзонов для транскриптов гена *dsx*. Нуклеотидные и белковые последовательности были выравнены программой MEGA 7 и использованы для подсчёта числа синонимичных и несинонимичных замен с помощью скрипта на Python. Графики показывают консервативные и неконсервативные сайты белков

Обзор гена *doublesex* у различных видов *Lepidoptera*

Мы загрузили последовательности гена мужских особей других видов бабочек для создания филогенетического древа.

В мокрой части нашей лаборатории мы освоили методы, которые применяются для подготовки к секвенированию ДНК

- Диссекция крыла бабочки *Papilio polytes* в стадии куколки
- Экстрагирование ДНК из тканей с помощью набора ExtractMe
- Амплификация ДНК гена 16S рРНК с помощью ПЦР

РЕЗУЛЬТАТЫ

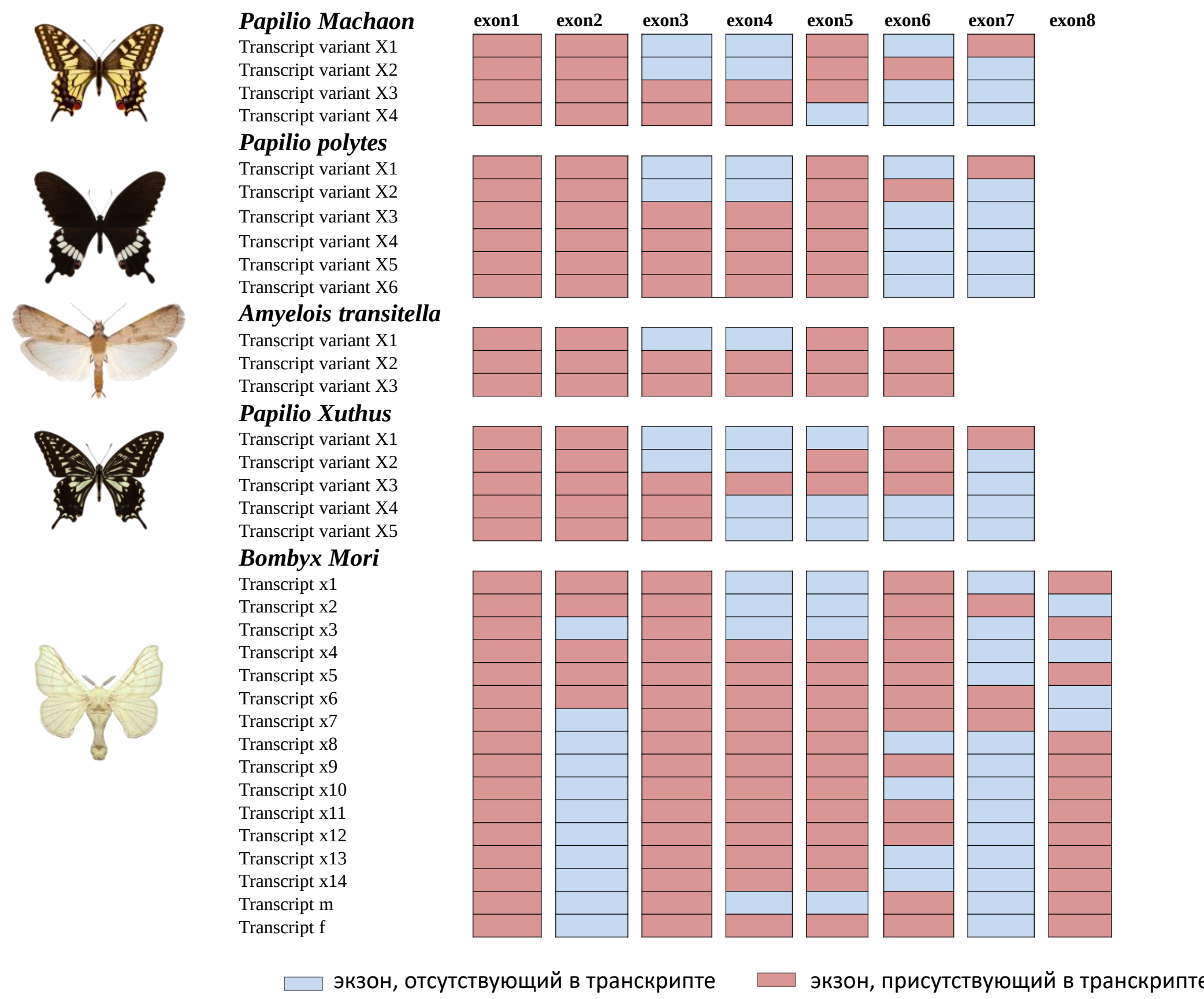


Рис.1 Использование экзонов в пяти видах чешуекрылых

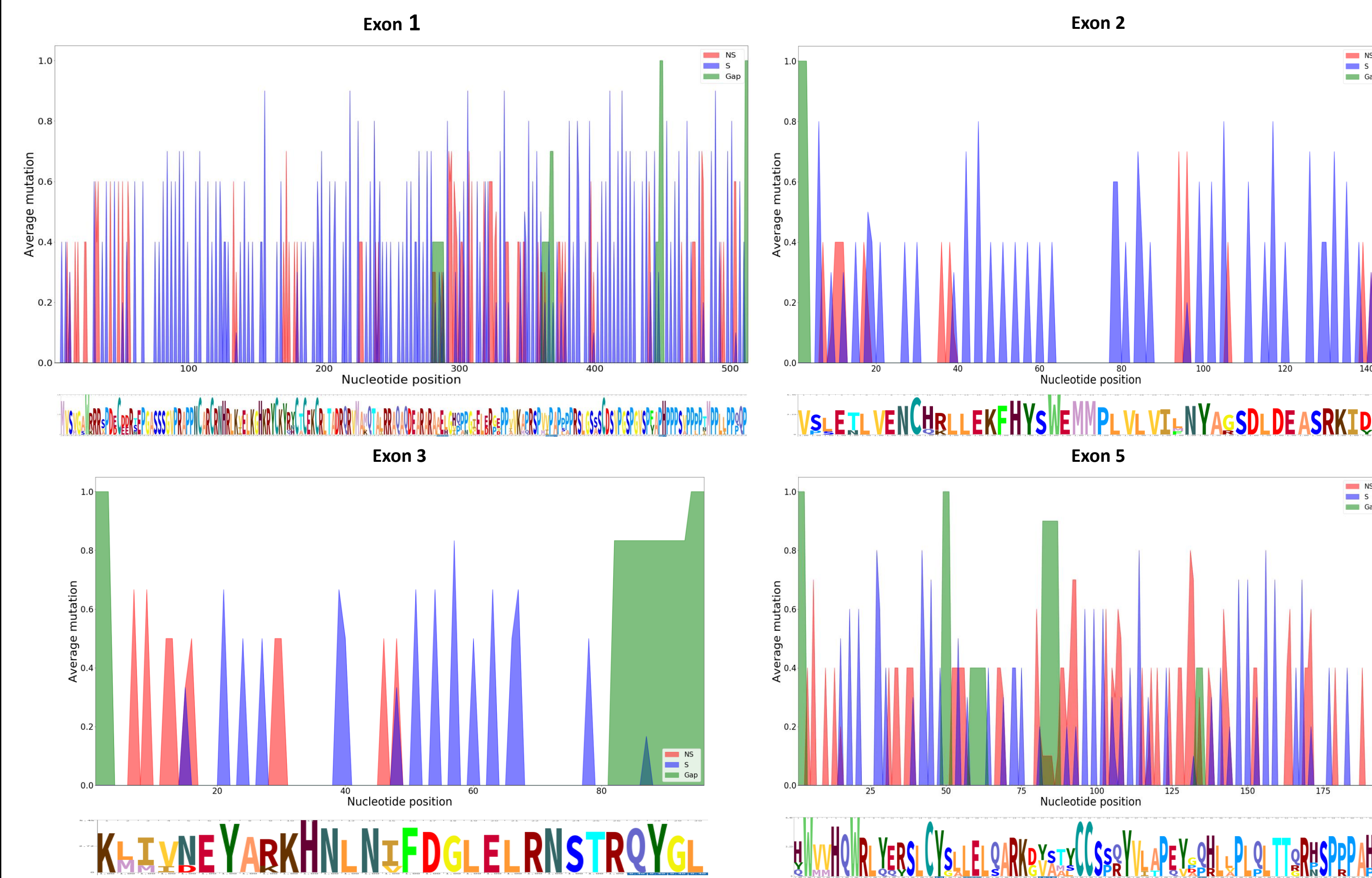


Рис. 2 Среднее число мутаций и консервативность аминокислот
Х ось – позиции нуклеотидов, Y ось – усредненное кол-во мутаций

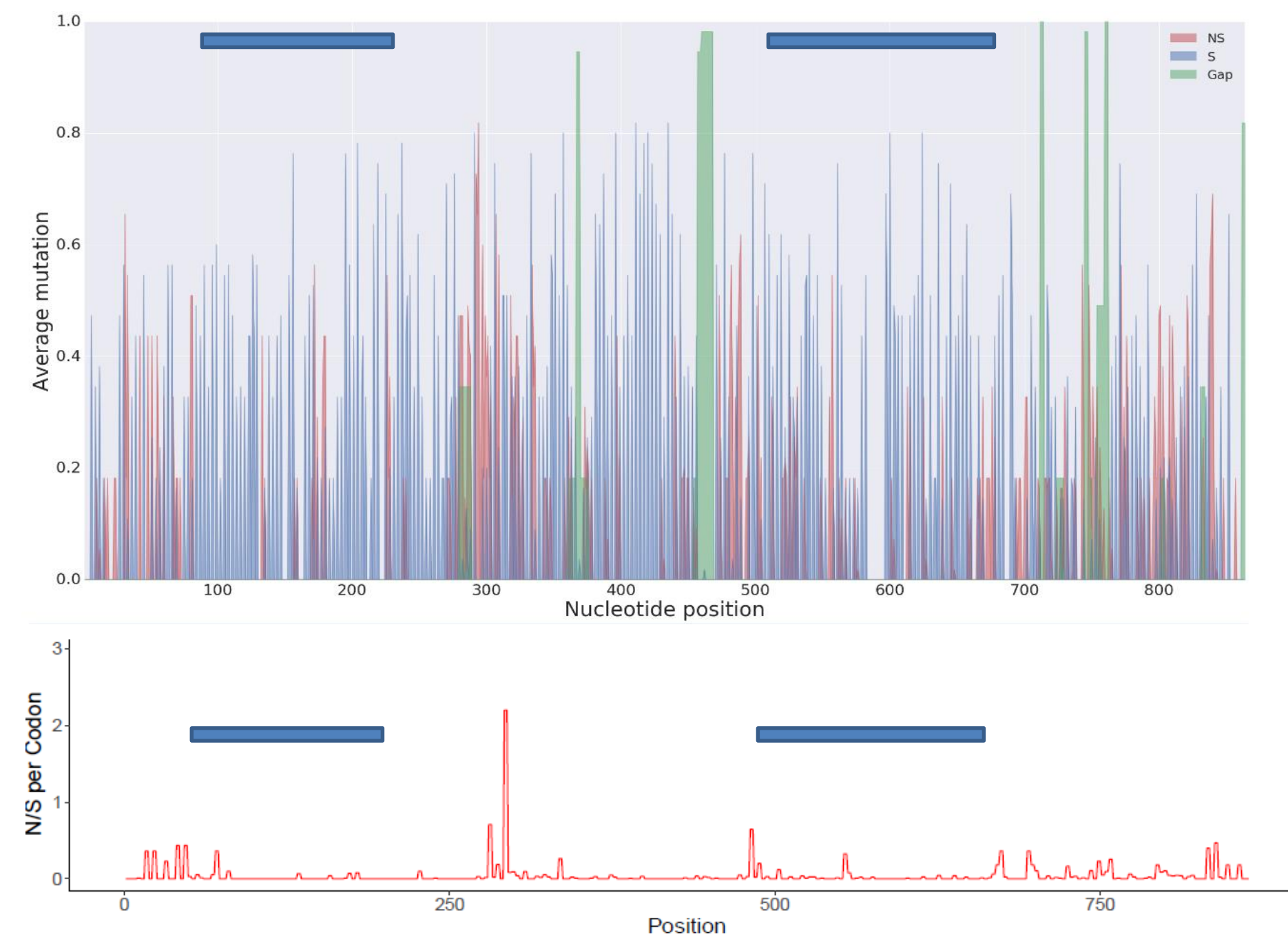


Рис. 3 Среднее число мутаций в dsx в специфических для мужских особей транскриптах. Голубые линии показывают участки белковых доменов (DM и димеризационный). На нижнем графике изображено отношение несинонимичных к синонимичным заменам в кодонах. X ось – нуклеотидные позиции, Y ось – среднее число мутаций

РЕЗУЛЬТАТЫ

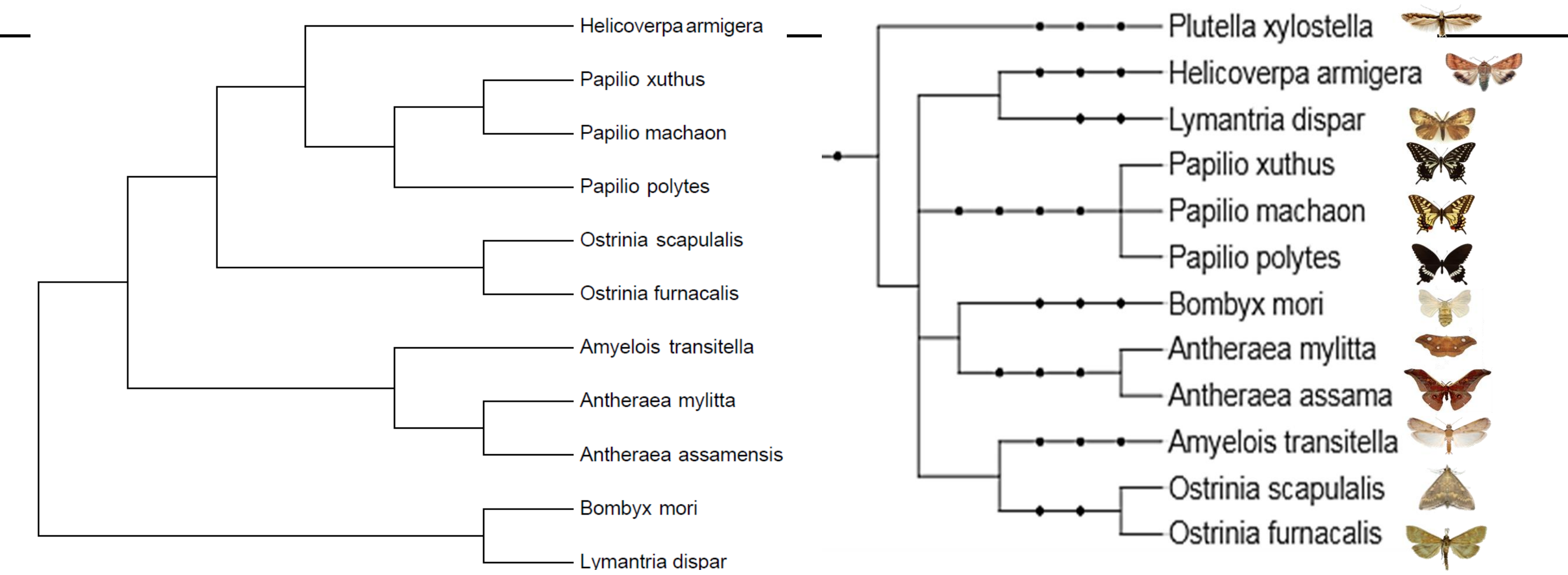


Рис. 4 Генетическое дерево, построенное с использованием специфичными для самцов транскриптов гена dsx (слева) и дерево видов, показывающее филогенетическое отношение между 11 видами чешуекрылых.

	Ostrinia scapularis	Ostrinia furnacalis	Lymantria dispar	Helicoverpa armigera	Antheraea mylitta	Antheraea assama	Papilio xuthus	Papilio polytes	Bombyx mori	Papilio machaon	Amyelois transitella
Ostrinia scapularis	0										
Ostrinia furnacalis	0,007	0									
Lymantria dispar	0,093	0,095	0								
Helicoverpa armigera	0,038	0,044	0,088	0							
Antheraea mylitta	0,054	0,059	0,101	0,053	0						
Antheraea assama	0,053	0,057	0,101	0,052	0,009	0					
Papilio xuthus	0,054	0,056	0,106	0,061	0,072	0,072	0				
Papilio polytes	0,072	0,072	0,126	0,081	0,088	0,087	0,027	0			
Bombyx mori	0,112	0,113	0,14	0,119	0,131	0,123	0,12	0,18	0		
Papilio machaon	0,052	0,052	0,111	0,061	0,074	0,073	0	0,027	0,119	0	
Amyelois transitella	0,041	0,045	0,105	0,047	0,064	0,065	0,073	0,087	0,118	0,073	0

Рис. 5 Попарное сравнение несинонимичных замен между специфичными для самцов транскриптов гена dsx.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ген doublesex имеет многочисленные транскрипты среди разных видов, появившиеся в результате альтернативного сплайсинга. Эти транскрипты могут выполнять различные функции в разных органах бабочки. Но различия экспрессии изоформ и их функции ещё не до конца изучены. Тогда как первый и второй экзоны используются и мужскими и женскими особями, третий и четвертый экзоны используются только самками, а пятый - только самцами.

Гены наиболее консервативны в тех местах, где сосредоточены наиболее важные функциональные участки, т.е. белковые домены, благодаря большому количеству синонимичных замен в сравнение с количеством несинонимичных замен в этих регионах. В экзонах, специфичных для мужского пола, с другой стороны, наблюдается большое число несинонимичных замен. Следует изучить эти участки, чтобы понять их возможное влияние на половой отбор.

Филогенетическое дерево, построенное на основании последовательности гена *doublesex*, различается с филогенетическим деревом видов, созданным на сайте филогенетической базы данных phyloT. Это говорит о том, что вероятно, ген doublesex находится под влиянием отбора в различных видах (например, в *Papilio polytes*). Для того чтобы подтвердить это, нужно осуществить анализ последовательности этого гена у большего

ИСТОЧНИКИ

1. Verhulst, E. C., & van de Zande, L. (2015). Double nexus—*Doublesex* is the connecting element in sex determination. *Briefings in Functional Genomics*, 14(6), 396–406. <http://doi.org/10.1093/bfpg/elv005>
2. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *Journal of Molecular Biology*. 215:403-410.
3. James T. Robinson, Helga Thorvaldsdóttir, Wendy Winckler, Mitchell Guttman, Eric S. Lander, Gad Getz, Jill P. Mesirov. (2011), Integrative Genomics Viewer. *Nature Biotechnology* 29, 24–26
4. Kumar S, Stecher G, and Tamura K (2016) *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874