

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Дальневосточный федеральный университет»
(ДФУ)

На правах рукописи

Панькова Марина Владимировна

**СТРУКТУРА И ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОВ ГОРМОНА РОСТА
ЛОСОСЁВЫХ РЫБ (SALMONIDAE)**

03.02.07 – генетика

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук, профессор
Брыков Владимир Алексеевич

Владивосток – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1.История изучения гормона роста.....	9
1.2.Гормон роста человека.....	10
1.3.Ген гормона роста человека.....	15
1.4.Гормон роста позвоночных.....	18
1.5.Ген гормона роста позвоночных.....	25
1.6.Эволюция гена гормона роста позвоночных.....	33
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
2.1.Объект исследования.....	40
2.2.Аmplификация ДНК.....	42
2.3.Молекулярное клонирование.....	44
2.4.Секвенирование	45
2.5.Филогенетический анализ.....	46
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	49
3.1.Структура генов.....	49
3.1.1. Характеристика кодирующих последовательностей – экзонов...49	
3.1.2. Характеристика некодирующих последовательностей – интронов.....	62
3.2.Дивергенция кодирующих и некодирующих последовательностей генов GH гольцов рода <i>Salvelinus</i> и других лососёвых рыб.....	67
3.2.1 Дивергенция экзонов в генах-паралогах	67
3.2.2 Дивергенция интронов в генах-паралогах.....	81
3.3 Дивергенция последовательностей интронов С и D генов GH лососёвых рыб	86
3.3.1 Дивергенция интронов С и D гольцов рода <i>Salvelinus</i>	86

3.3.2 Дивергенция интронов С и D паралогичных генов гормона роста лососевых рыб.....	90
4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	93
4.1. Структура генов	93
4.2. Дивергенция кодирующих последовательностей генов-паралогов.....	100
4.3. Дивергенция интронных последовательностей генов-паралогов.....	105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	117
ВЫВОДЫ	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	119
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	139

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Дубликации генов играют очень важную роль в эволюции. Как правило, копии дублицированных или амплифицированных генов оказываются под меньшим давлением отбора, накапливают изменения с более высокой частотой и, со временем могут приобретать новые функции.

Гормон роста (GH), также известный как соматотропин, является ключевым белком, ответственным за регуляцию соматического роста и участвует в многочисленных физиологических процессах, включая ионный баланс, липидный и белковый обмен, размножение, иммунный ответ, а также различные аспекты поведения (Coker, Arman, 2009). Очевидно из функции, что последовательность гена гормона роста должна быть консервативной. В большинстве групп позвоночных животных, где этот ген представлен единичной копией, это действительно так (Wallis, 1996; Rajesh, Mudjumdar, 2007), хотя в некоторых таксонах скорости дивергенции могут отличаться на порядок величины.

Ген гормона роста типично представлен в геноме млекопитающих и птиц одной копией, в то же время есть исключения. Два гена GH найдено у воробьиных птиц (Yuri et al., 2008; Arai, Iigi, 2010). У высших приматов он представлен кластером из пяти гомологичных генов, которые, за исключением собственно гена гормона роста, экспрессируются только в плаценте (Hirt et al., 1987), но у других приматов такого кластера пока не обнаружено. У большинства исследованных видов рыб ген гормона роста представлен двумя несвязанными функциональными паралогичными генами, GH1 и GH2 (Devlin, 1993). Структура генов у рыб типична для позвоночных и включает 6 экзонов и 5 интронов, при этом показано, что у рыб ген гормона роста обладает более высоким уровнем изменчивости, чем у других позвоночных, и эволюционирует с большей скоростью (Ruynänen, Primmer,

2006), что, вероятно, обусловлено наличием двух функциональных копий гена.

Лососевые рыбы представляют собой уникальную группу, сформировавшуюся после события автотетраплоидизации и последующей дивергенции, и, таким образом, являются естественными и относительно недавними полиплоидами (Allendorf, Thorgaard, 1984). Как следствие, многие гены в этой таксономической группе видов оказались множественными, в том числе и ген гормона роста.

Целью настоящей работы было сравнение структуры и дивергенции последовательностей двух генов гормона роста (GH1 и GH2) у видов гольцов рода *Salvelinus*. Для этого были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить полные нуклеотидные последовательности двух генов гормона роста и определить их структуру у четырёх азиатских видов гольцов (*S. curilus*, *S. malma*, *S. taranetzi* и *S. levanidovi*).
2. Провести сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей двух генов GH у четырёх азиатских видов гольцов и лососевых в целом.
3. Провести филогенетический и сравнительный анализ дивергенции интронных и экзонных последовательностей генов GH лососевых рыб.

Степень разработанности. Известно, что многие гены в геномах эукариот являются дублированными или множественными. Значимость дубликаций генов для эволюции видов очевидна, однако сам процесс приобретения новых функций у дублированных копий изучен слабо (Zhang, 2003; Magadum et al., 2013). Гены гормона роста во многих группах позвоночных являются дублированными. Наиболее изученными являются гены гормона роста у человека. Менее изученными являются дублированные гены гормона роста у рыб, хотя использование их в генетической инженерии оказалось очень успешным (Du et al., 1992; Wu et al., 2003). Полные последовательности гена гормона роста известны у немногих видов даже у лососёвых рыб. Практически нет данных по

сравнению дивергенции функционально различных участков генов-паралогов внутри таксонов. Большая часть публикаций по GH лососёвых посвящена исследованию интронных участков (Driscoll et al., 1998; Oakley, Phillips, 1999; Phillips et al., 2004). Возможно, что субфункционализация генов-паралогов определяется не только кодирующими последовательностями, но и некодирующими участками.

Научная новизна. Впервые получены и детально охарактеризованы полные нуклеотидные последовательности двух генов гормона роста, GH1 и GH2, у четырёх азиатских видов гольцов: *S. curilus*, *S. malma*, *S. taranetzi*, *S. levanidovi*. Полученные последовательности зарегистрированы в международной базе данных GenBank/NCBI. Впервые проведён сравнительный анализ дивергенции интронных и экзонных последовательностей генов GH гольцов рода *Salvelinus*. Показано, что скорость дивергенции двух паралогичных генов гормона роста лососевых рыб различна. Это обусловлено влиянием разнонаправленного и отличающегося по силе отбора на дублицированные в процессе эволюции гены. Филогенетический и сравнительный анализы экзонных и интронных последовательностей свидетельствуют о давней независимой эволюции генов GH1 и GH2.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные результаты дополнили существующие на сегодняшний день представления о структуре гена гормона роста рыб. Настоящая работа вносит существенный вклад в исследования эволюции дублицированных генов гормона роста рыб, а также филогении гольцов и семейства лососёвых рыб (Salmonidae) в целом. Результаты работы могут быть использованы для разработки практических заданий для студентов университета при анализе длинных фрагментов ДНК. Полученные результаты используются в настоящее время для создания полноразмерной генетической конструкции гормона роста с целью получения трансгенных линий рыб с более высокой скоростью роста в условиях аквакультуры.

Методология и методы диссертационного исследования. В данной работе были применены различные молекулярно-генетические методы получения и анализа фрагментов ДНК. Для амплификации фрагментов генов GH использовали методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) и клонирования. Для разделения продуктов ПЦР и определения размеров полученных фрагментов использовали метод электрофореза в агарозном геле. При определении нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК использовали метод флуоресцентно-меченых терминаторов (ddNTP). Полученные данные обработаны с помощью современных статистических программ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Ген гормона роста представлен у лососёвых рыб двумя паралогичными генами, которые имеют сходную структуру.
2. Гены GH1 и GH2 лососёвых находятся под разным давлением очищающего отбора.
3. Направленность и сила отбора в генах-параалогах может быть различной в разных филетических линиях.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов исследования была обеспечена использованием современных молекулярно-генетических подходов и статистической обработкой материалов. О достоверности экспериментальных результатов также свидетельствует анализ многих клонов при клонировании фрагментов и воспроизводимость полученных последовательностей.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на X и XI Региональных конференциях студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России «Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии» (Владивосток, 2011 и 2012 гг.), на VII Международном симпозиуме по гольцам (Южно-Сахалинск, 2012) и на II Международной конференции «Современные проблемы биологической эволюции» (Москва, 2014).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 работ, в том числе три статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 140 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа содержит 32 таблицы и 20 рисунков. Список литературы состоит из 174 наименований, из них 167 на английском языке.

Личный вклад автора. Экспериментальная часть работы была выполнена соискателем самостоятельно. Соискатель непосредственно участвовал в анализе и интерпретации полученных результатов, в представлении результатов на конференциях и подготовке публикаций по результатам исследований.

Благодарности. Выражаю огромную благодарность своему научному руководителю д.б.н. Вл.А. Брыкову за руководство, помощь и ценные советы на всех этапах исследования; д.б.н. Э.Я. Костецкому за поддержку и внимание в период аспирантуры. Отдельную благодарность выражаю к.б.н. В.В. Паньковой и к.б.н. Д.М. Атопкину за помощь в освоении методов молекулярной биологии и разностороннее содействие и поддержку, оказанные в ходе проведения работы.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 14-50-00034), ДВО РАН (грант № 09-И-П22-01) и Правительства РФ (грант № 11.G34.31.0010).

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. История изучения гормона роста

Гормон роста (соматотропин, соматотропный гормон) – это полипептидный гормон, синтезируемый соматотрофными клетками передней доли гипофиза. Гормон роста играет очень важную роль во многих жизненно важных процессах. Он вызывает ускорение линейного роста, стимулирует обновление тканей внутренних органов, действует на иммунную систему, увеличивая количество Т-лимфоцитов. Соматотропин оказывает влияние на метаболизм белков, жиров и углеводов. Он ускоряет синтез белка и тормозит его распад, стимулирует расщепление жиров в жировой ткани, вызывает выраженное повышение уровня глюкозы в крови и является антагонистом инсулина по действию на углеводный обмен (Воротникова и др., 2011).

Впервые гормон роста был открыт в 20-х годах прошлого века, по способности вызывать рост скелета и увеличение веса тела молодых животных. Первые попытки получения этого гормона начались в середине 1940-х годов для лечения детей, страдающих дефицитом гормона роста. Впервые гормон роста был выделен в 1945 году из бычьего гипофиза учеными Лайем и Эвансом (Калифорния, Беркли) (Li, Evans, 1945) и Фишманом (Йельский университет) (Fishman et al., 1947). Свиной гормон роста был получен М. Рабеном и В. Вестермайером (Массачусетс, университет Тафтса) (Raben, Westermeyer, 1951). Однако попытка применить эти препараты для лечения карликовости была неудачной из-за видовой специфичности гормона роста.

В 1956 году учеными Лайем и Папковым (Калифорния) (Li, Parkoff, 1956) и эндокринологом М. Рабеном (Массачусетс) (Raben, 1956) впервые был выделен гормон роста гипофиза человека, источником которого, на тот момент, был человеческий мозг трупов. Уже в 1958 году М. Рабен (Raben, 1958) впервые ввел соматотропин ребенку, страдающему дефицитом гормона роста, и сообщил о результатах его действия на рост.

Использование трупного гормона роста было приостановлено в 1985 году вследствие развития у пациентов болезни Крейтцфельда-Якоба, редкого вирусного заболевания, характеризующегося прогрессирующим слабоумием и потерей контроля над мышцами, и убивающего в течение примерно 5 лет. Возникла очень трудная проблема – получение синтетического гормона.

В 1964 году была установлена аминокислотная последовательность гормона роста человека (Meisinger et al., 1964). Определение его биохимической структуры в 1972 году и развитие методов генной инженерии привели к разработке в 1981 году рекомбинантного гормона роста, впервые клонированного в 1979 году (Fiddes et al., 1979). В 1985 году компания Генентек (Genentech) (Сан-Франциско, Калифорния) создала синтетическое лекарство на основе рекомбинантной ДНК (Cronin, 1997).

Как следствие этих усилий, в настоящее время наиболее изученным является гормон роста человека.

1.2. Гормон роста человека

Гормон роста человека принадлежит к семейству структурно схожих белков, которое включает пролактин, соматолактин, хорионический соматомаммотропин (или плацентарный лактоген), пролиферин и белки, связанные с пролактином (Niall et al., 1971). Основная часть гена гормона роста человека экспрессируется в виде двух мРНК, образующихся в результате альтернативного сплайсинга первичного продукта транскрипции. Продуктами трансляции этих мРНК являются изоформы GH массой 22 кДа (75%) и 20 кДа (20%) (Walker et al., 1991).

Изоформа 22кДа (HGH22k или hGH-N) экспрессируется в гипофизе и является основным продуктом гена гормона роста. HGH22k – это одноцепочечный белок, состоящий из 191 аминокислотного остатка с двумя дисульфидными связями, образованными между 53 и 165, 182 и 189 остатками цистеина. HGH22k отвечает за постнатальный рост, а также является важным модулятором углеводного, липидного, азотного и

минерального обмена. Это самый известный гормон и единственный из семейства HGH, который является коммерческим. Посттрансляционные модификации GH 22кДа включают аминок-ацелированную форму и две деамидированные формы (137 и 152 положения) (Lewis et al., 1979, 1981). Также была выделена гликозилированная форма GH 22кДа (Hago et al., 1996). Изоформа 20 кДа (HGH20k) имеет меньший размер (176 аминокислот) за счет устранения первых 45 нуклеотидов третьего экзона мРНК, что соответствует 32–46 аминокислотным остаткам (DeNoto et al., 1981).

Мономерные изоформы HGH22k и HGH20k способны образовывать димеры и олигомеры, связанные нековалентными или дисульфидными связями (Baumann, 2009). Известны также изоформы GH 5 кДа, 17 кДа и 27 кДа, обнаруженные, как в сыворотке крови, так и гипофизе (Such-Sanmartin et al., 2008; Baumann, 2009).

Несколько изоформ гормона роста происходят от гена, экспрессирующегося в плаценте (hGH-V). Плацентарный гормон роста присутствует в крови беременных женщин (самок млекопитающих) и, высвобождаясь в кровоток матери, тормозит биосинтез изоформы hGH-N в гипофизе. Наиболее распространённая форма мРНК этого гена также кодирует изоформу массой 22 кДа и имеет структуру, сходную с hGH-N (13 аминокислотных замен). Вторая изоформа берёт своё начало от мРНК, в которой сохранён четвертый интрон и, благодаря этому, кодирует белок массой 26 кДа (Cooke et al., 1988). Также известны изоформы 20 кДа, 24 кДа, 25 кДа (Boguszewski et al., 1998).

Функции многочисленных изоформ гормона роста человека, за исключением HGH22k, полностью не определены, и их биологическая активность изучается.

Третичная структура GH человека – это 4 альфа-спирали (1–4), расположенные в необычной конфигурации (верх-верх-вниз-вниз), и включающие в себя аминокислотные остатки 9–34, 72–92, 106–128, 155–184 соответственно. NH₂- и COOH-концевые альфа-спирали (1 и 4) длиннее (26 и

30 остатков), чем две другие спирали (21 и 23 остатка). Спираль 1 и 2 связаны между собой остатками 35–71, спираль 3 и 4 остатками 129–154, спираль 2 и 3 через 93–105 остатки соответственно. Помимо четырёх основных альфа-спиралей, найдены три дополнительных альфа-спиральных участка: два между спиральями 1 и 2 (38–47 и 64–70 соответственно) и один между спиральями 2 и 3 (94–100) (Vos et al., 1992; Воробьёв, Мирошников, 2005).

Гормон роста синтезируется в виде предшественника длиной 217 аминокислотных остатков, из которых 26 аминокислот N-конца представляют собой сигнальный пептид. Сигнальный пептид предшественника инициирует перенос растущей пептидной цепи через мембрану эндоплазматического ретикулума, выступает в роли якоря, удерживающего молекулу предшественника на мембране. После получения специфического сигнала, связанная с мембраной пептидаза I разрезает белок-предшественник между 26 и 27 остатками (Chawla et al., 1983; Molhoj, Degan, 2004; Tuteja, 2005). Полученный зрелый белок, состоящий из 191 аминокислотного остатка, высвобождается в полость ретикулума и экспортируется из клетки.

Гормон роста действует как непосредственно через свой собственный рецептор (GHR), так и косвенно, путём стимуляции производства инсулиноподобного фактора роста I типа (IGF-I). GHR в основном экспрессируется в печени, но также он присутствует в плазматической мембране клеток жировой ткани, яичках, жёлтом теле, скелетных мышцах, хрящевой ткани, мозге, лёгких, поджелудочной железе, кишечнике, сердце, почках и лимфоцитах. GHR является членом семейства гемопозитиновых рецепторов или семейством цитокиновых рецепторов I типа. Одна молекула гормон роста взаимодействует с двумя молекулами мембранного рецептора (Wells, 1996), которые связаны с цитоплазматическими протеинкиназами – янус-киназами (JAK-2). Присоединение гормона вызывает аутофосфорилирование и активацию янус-киназ, которые, в свою очередь,

фосфорилируют рецептор. Комплекс фосфорилированного димера рецептора с янус-киназами связывает особые цитоплазматические белки (STAT), которые также фосфорилируются янус-киназами (Meyer et al., 1994; Xu et al., 1996). Фосфорилированные белки STAT активируются, образуя димер. Димер STAT перемещается из цитозоля в ядро, связывается с промоторным участком ДНК и индуцирует транскрипцию генов (рис. 1.1). В ряде исследований показано, что рецептор гормона роста взаимодействует с киназой Src, а также активирует митоген-активируемую протеинкиназу (MARK), отвечающую за регуляцию внеклеточных сигналов (Воротникова и др, 2011). Таким образом, сигнализация осуществляется путем запуска либо MARK-каскада, либо STAT-каскада.

После связывания с рецептором, гормон роста стимулирует в клетках печени продукцию и секрецию инсулиноподобного фактора роста-1, который является важнейшим эндокринным посредником действия гормона роста, почему и называется «соматомедин С». IGF-I синтезируется как в клетках печени, так и в других тканях в ответ на стимуляцию их соматотропиновых рецепторов (Coker, Arman, 2009).

Синтез и секреция ГН гипофиза находится под контролем двух гормонов гипоталамуса: соматолиберина (соматотропин-рилизинг гормон) и соматостатина. Соматолиберин – это полипептид размером 108 аминокислот, который кодируется геном GHRH, расположенным на 20 хромосоме (q11.2). Связывание соматолиберина со своим рецептором приводит к увеличению уровня Ca^{2+} и индуцированию секреции ГН клетками гипофиза. Соматостатин ингибирует секрецию ГН путем уменьшения уровня Ca^{2+} .

Секреция гормона роста также саморегулируется по типу обратной связи. Когда уровень гормона роста в крови достигает определенного порога, гормон роста стимулирует рецепторы в гипофизе, чтобы остановить дальнейшую секрецию гормона роста. Он также стимулирует рецепторы в гипоталамусе, чтобы остановить секрецию соматолиберина и включить выработку соматостатина. IGF-I также обеспечивает обратную связь с

гипоталамусом и гипофизом. При низком уровне IGF-I в крови секреция соматолиберина и гормона роста возрастает, а соматостатина снижается, и наоборот (Coker, Arman, 2009).

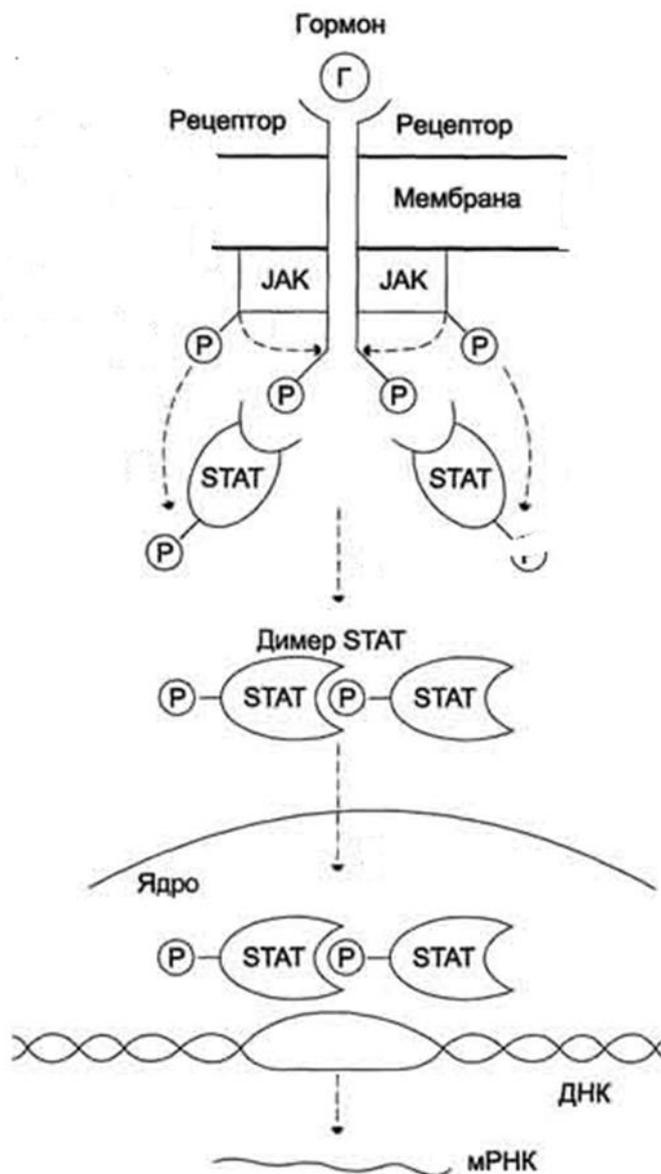


Рис. 1.1. Механизм передачи сигнала через мембранные рецепторы.

Кроме того секрецию гормона роста вызывает природный гормон грелин (Tannenbaum, 1991; Malagon et al., 2003). Грелин представляет собой 28-аминокислотный пептид, синтезируемый в желудке, кишечнике и центральной нервной системе. Связывание этого белка с грелин-рецептором

увеличивает уровень внутриклеточного Ca^{2+} , что стимулирует секрецию ГН через секрецию соматолиберина (Casanueva et al., 2008).

Таким образом, гормон роста синтезируется преимущественно в виде двух основных изоформ с молекулярной массой 22 кДа, одна из которых экспрессируется в гипофизе, а другая в плаценте. Альтернативный сплайсинг увеличивает число изоформ и предполагает возможность их специализации в воздействии на разные ткани.

1.3. Ген гормона роста человека

Гормон роста человека кодируется геном hGH-N, который входит в состав кластера генов GH, состоящего из 5 тесно связанных генов (двух hGH и трёх hPL): гипофизарного гормона роста (hGH-N), хорионического соматомаммотропина L (hCS-L или hPL), хорионического соматомаммотропина A (hCS-A или hPL-2), плацентарного гормона роста (hGH-V) и хорионического соматомаммотропина B (hCS-B или hPL-3). Гены hPL и hGH-V экспрессируются исключительно в плаценте, hGH-N – в гипофизе. Гены GH располагаются в следующем порядке: hGH-N, hCS-L, hCS-A, hGH-V, hCS-B (рис. 1.2) (Barrera-Saldana, 1998; Chen E.Y. et al., 1989). Все они сгруппированы на участке ДНК длиной около 50 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.), расположенном на длинном плече 17 хромосомы на полосах q22–24 (Harper et al., 1982). Гены hCS-A, hCS-B, hCS-L располагаются на участке 2,9 т.п.н. длиной, а hGH-N и hGH-V – 2,6 т.п.н. длиной. Их транскрипционные единицы, разделенные межгенными спейсерами длиной 6–13 т.п.н., имеют одинаковую ориентацию и высокий уровень сходства кодирующих (> 90%) и фланкирующих последовательностей генов. Экспрессия кластера GH управляется регуляторной областью (LCR), которая находится в 14,5–32 т.п.н. выше по течению от гена GH-N (Jones et al., 1995; Su et al., 2000).

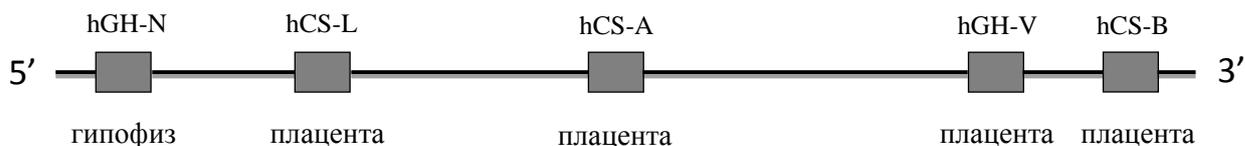


Рис. 1.2. Кластер гена гормона роста человека.

Все члены семейства GH включают 5 экзонов (I–V) и 4 интрона (A–D). Положения и длины четырёх интронов идентичны у генов hGH-N, hGH-V и hCS. Экзон I включает несколько нуклеотидов 5'-нетранслируемой области, первые три кодона и первый нуклеотид четвёртого кодона сигнального пептида. Второй экзон кодирует остальные аминокислоты сигнального пептида и с 1 по 31 аминокислоты зрелого белка. Экзоны III, IV, V кодируют 32–71, 72–126, 127–191 аминокислоты соответственно. Интроны A, B, C, D содержат 256, 209, 93, 253 пар оснований соответственно. Каждый интрон начинается динуклеотидом GT и заканчивается AG (Chawla et al., 1983).

С обеих сторон к кодирующей области прилегают особые участки мРНК, не выступающие в качестве матрицы для синтеза белка. Они называются 5' и 3'-нетранслируемые области (UTR). 5'-нетранслируемая область (5'-UTR) или лидерная последовательность предшествует иницирующему кодону АУГ, а 3'-UTR располагается после стоп-кодонов РНК. Эти области транскрибируются в составе того же самого транскрипта, что и кодирующий участок. Для них характерно наличие шпилек, внутренних инициаторных кодонов и коротких открытых рамок считывания, сайтов связывания рибосомы, различных цис-регуляторных элементов, связывающихся с РНК-связывающими белками. Нетранслируемые области играют важнейшие роли в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, включая модуляцию транспорта мРНК из ядра, эффективность

трансляции, внутриклеточную локализацию мРНК и её стабильность (Molhoj, Degan, 2004; Льюин, 2012).

Высокая степень гомологии пяти генов семейства GH дала основание полагать, что все они берут начало от одного общего предкового гена (primordial gene), неоднократная дупликация которого привела к формированию большого гена-предшественника (precursor gene), содержащего пять экзонов и четыре интрона (Niall et al., 1971).

Предполагается, что изначально предковый ген содержал промотор и два экзона. Позже второй экзон был дублирован, что привело к возникновению экзона II и IV. Обратный транскрипт мРНК этой дублированной области был вставлен ниже по течению, что привело к образованию пятого экзона, или же пятый экзон сформировался путём включения дублированного фрагмента, содержащего два экзона, интрон между которыми был впоследствии удалён. Отдельно был вставлен третий экзон. Дупликация и дивергенция этого гена, содержащего пять экзонов, привели к возникновению генов-предшественников гормона роста, плацентарного лактогена (PL), и пролактина (Prl), относящихся к одному семейству полипептидных гормонов (Miller, Eberhardt, 1983; Selby et al., 1984; Slater et al., 1986) (рис. 1.3). Ген пролактина имеет меньше гомологии с генами GH и PL и располагается на шестой хромосоме. Это дало основание предполагать, что они берут начало от разных генов-предшественников (Yamano et al., 1991).

Доказательством того, что ген-предшественник был сформирован путём дупликации, служит наличие четырёх гомологичных областей, расположенных во втором, четвёртом и пятом экзонах полипептидов GH, PL, Prl. При этом в пятом экзоне присутствуют две гомологичные области, вероятно, вследствие удаления интрона между третьей и четвёртой копиями. (Miller, Eberhardt, 1983; Selby et al., 1984).

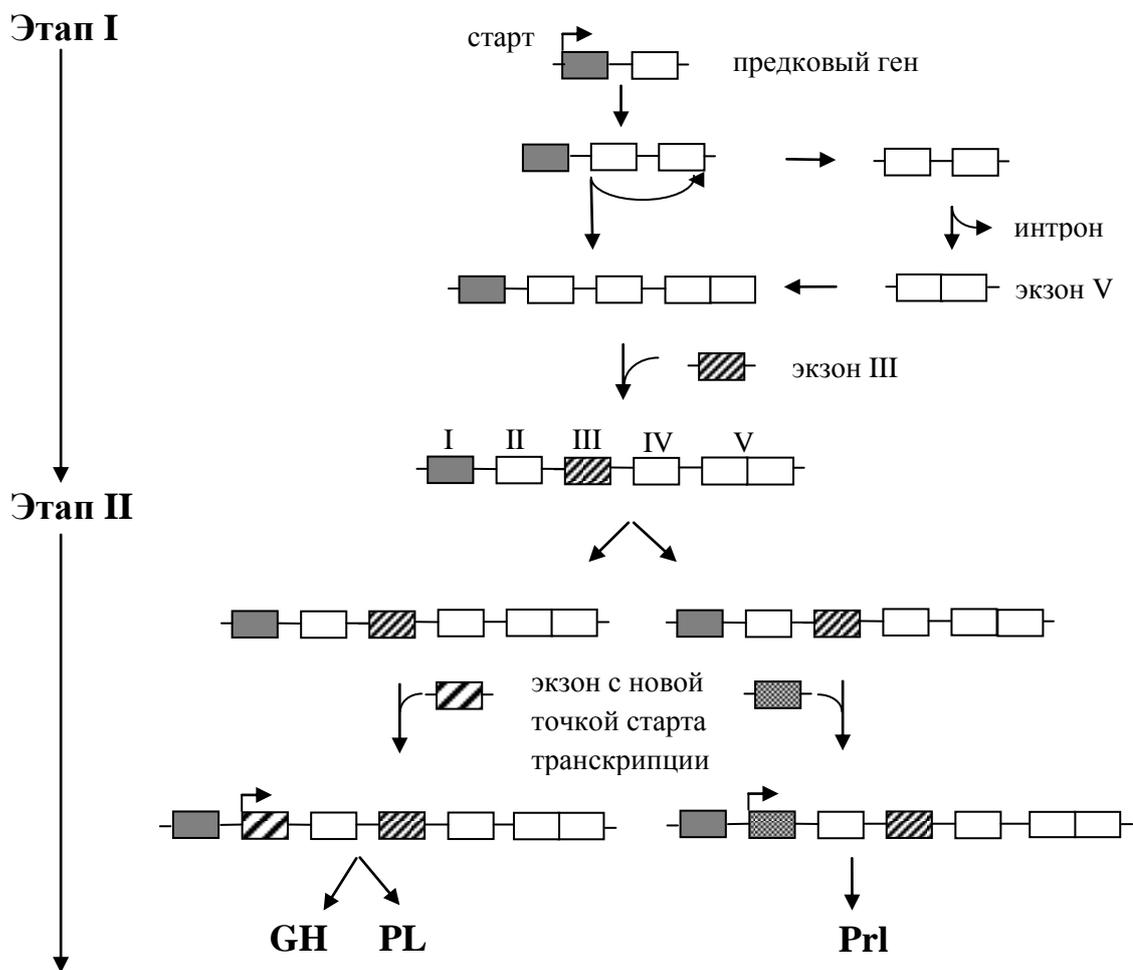


Рис. 1.3. Модель эволюции генов GH семейства. Заштрихованные боксы – экзоны, которые, как полагают некоторые исследователи, имеют независимое происхождение (по: Selby et al., 1984).

1.4. Гормон роста позвоночных

Гормон роста присутствует у большинства позвоночных животных. Убедительным доказательством этого является идентификация гормона роста у одного из древнейших представителей позвоночных – миноги (Kawauchi et al., 2002). Основным источником гормона роста у позвоночных являются соматотрофные клетки гипофиза. Гормон роста секретируется в

плазму и разносится по всему организму. У курицы разные изоформы ГН были выделены из тканей глаза, сердца. У форели ГН был обнаружен в гипофизе, печени, селезенке, вилочковой железе, кишечнике (Von Schalburg et al., 2008).

Помимо своих основных функций, характерных для всех позвоночных, гормон роста у разных видов проявляет дополнительные функции. У рыб ГН влияет на половое созревание и адаптацию к морской воде (Bolton et al., 1987; Vjörnsson, 1997). У птиц ГН участвует в процессах размножения, созревания и продукции яиц (Buggiotti et al., 2006).

Аминокислотная последовательность гормон роста позвоночных очень консервативна (Santome et al., 1973; Shoji et al., 1990; Castro-Peralta, Barrera-Saldana, 1995; Liao et al., 2003). Последовательность ГН свиньи и собаки, представляющих два разных отряда плацентарных, идентична (Wallis, 1994). ГН панды отличается от этих последовательностей двумя аминокислотными заменами, на 98,4% идентичен ГН кота (три аминокислотные замены) и на 93% идентичен ГН грызунов (Liao et al., 2003). Последовательность гормона роста кота на 98,5% идентична последовательности собаки и свиньи (одна аминокислотная замена) и на 93,9%, 87,9%, 62,5% идентична последовательности гормона роста норки, овцы и человека соответственно (Castro-Peralta, Barrera-Saldana, 1995). Бычий ГН имеет высокую степень гомологии с ГН человека и овцы, 63% и 97% соответственно (Santome et al., 1973).

Гормон роста различных видов позвоночных имеет сходную структуру и подобно ГН человека, представлен одной полипептидной цепью и имеет в своей структуре четыре основных альфа спирали. Абдель-Магид с коллегами (Abdel-Meguid et al., 1987) нашли четыре спиральных домена в ГН свиньи. Молекула ГН линя (*Tinca tinca*), представителя отряда Карпообразные (Cypriniformes), также состоит из 4-х альфа-спиралей (Panicz et al., 2012). Четыре высоко консервативных домена, обозначенные как А (8–31 аминокислота), В (52–92), С (101–123) и D (155–186) были установлены при

сравнении последовательностей ГН камбалообразных рыб (*Verasper moseri*, *Paralichthys olivaceus*, *Solea senegalensis*). Эти консервативные домены соответствуют четырём антипараллельным альфа-спиралям ГН свиньи. Области А и С располагаются на поверхности молекулы, а области В и D находятся внутри молекулы (Peyush et al., 2000). Структура ГН рыбы Паку также включает четыре антипараллельные альфа-спирали. Первая альфа-спираль включает 6–34 аминокислотных остатков, вторая – 74–106, третья – 115–139, четвёртая – 174–188 (Pinheiro et al., 2008). Гормон роста нерки (*Oncorhynchus nerka*), представителя семейства Лососёвые, также имеет подобную вторичную структуру белка (Devlin, 1993).

Последовательность гормона роста большинства млекопитающих имеет близкие размеры. Так, длина предшественника ГН свиньи, собаки, панды, кошки, норки, слепыша и грызунов идентична (Shoji et al., 1990; Castro-Peralta, Barrera-Saldana, 1995; Lioupis et al., 1999; Liao et al., 2003). Все они включают 26 аминокислот сигнального пептида и 190 аминокислот зрелого белка по сравнению с 191 аминокислотой зрелого белка приматов (Chen E.Y. et al., 1989) и 27 аминокислотами сигнального пептида парнокопытных (Lioupis et al., 1997; Wallis, Wallis, 2001; Maniou et al., 2004). Последовательность ГН мухоловки (*Ficedula hypoleuca*) и большеклювой вороны (*Corvus macrorhynchos*) составляет 217 аминокислотных остатков в длину, из которых 27 аминокислот сигнального пептида и 190 аминокислот зрелого белка (Buggiotti et al., 2006; Arai, Iigo, 2010).

Гормон роста у рыб более вариабелен. Сигнальный пептид рыб короче на 4–5 аминокислот, чем у млекопитающих. ГН сома (*Pangasianodon gigas*, Siluriformes) содержит 22 аминокислоты сигнального пептида и 178 остатков зрелого белка (Lemaire et al., 1994). Камбалообразные (*Verasper moseri*) и окунеобразные (*Epinephelus lanceolatus*) имеют сходный размер сигнального пептида (17 остатков), но отличаются размером зрелого белка, 186 и 187 остатков соответственно (Peyush et al., 2000; Dong et al., 2010). Зрелая аминокислотная последовательность азиатского паралихта (*Paralichthys*

olivaceus), другого представителя камбалообразных, короче на 14 аминокислот (140–153) (Watahiki et al., 1989). Эта особенность также найдена в ГН Паку (*Piaractus mesopotamicus*, Characiformes), у которого, в результате делеции 10 аминокислот на N-конце, длина зрелого белка составляет 178 аминокислот (Pinheiro et al., 2008). Длина гормона роста карповых рыб (Chao et al., 1989; Zhu et al., 1992; Hong, Scharl, 1993; Law et al., 1996; Rajesh, Majumdar, 2007; Bart et al., 2010; Panicz et al., 2012) идентична длине ГН лососёвых (Kawauchi et al., 1986; Rentier-Delrue et al., 1989; Devlin, 1993), и включает 210 аминокислотных остатков, из которых 22 аминокислоты сигнального пептида и 188 аминокислот зрелого белка. Данная структура характерна для аминокислотной последовательности как ГН1, так и ГН2 лососёвых рыб (Devlin, 1993). Предшественник ГН миноги, представителя низших позвоночных, включает 203 аминокислоты, из которых 22 аминокислоты сигнального пептида и 181 аминокислота зрелого гормона (Kawauchi et al., 2002).

Некоторые виды позвоночных животных содержат два варианта гормона роста, вследствие присутствия двух генов ГН. Два гена ГН были выявлены у жвачных (Valinsky et al., 1990; Wallis, Wallis, 2001; Yamano et al., 1991), у представителей отряда Китопарнокопытные (Cetartiodactyla) (Maniou et al., 2004), у птиц отряда Воробьинообразные (Passeriformes) (Yuri et al., 2008; Arai, Iigo, 2010). У приматов серия дупликаций привела к возникновению кластера ГН-родственных генов, некоторые из которых экспрессируются в плаценте. Многие виды рыб (Chao et al., 1989; Koren et al., 1989; Chiou et al., 1990; Ver, Daniel, 1992; Law et al., 1996; Bart et al., 2010), в том числе и лососёвые рыбы (Agellon, Chen, 1986; Kawauchi et al., 1986; Agellon et al., 1988; Johansen et al., 1989; Rentier-Delrue et al., 1989; Male et al., 1992; Devlin, 1993; Du et al., 1993; Forbes et al., 1994; McKay et al., 1996), также содержат два гена гормона роста, ГН1 и ГН2.

Последовательности зрелого гормона роста различных видов рыб отличаются первым аминокислотным остатком. У карповых

последовательность зрелого белка начинается серином (Chao et al., 1989; Hong, Scharl, 1993; Clements et al., 2004; Rajesh, Majumdar, 2007). Зрелая белковая последовательность двух копий GH у *Salmo salar* начинается метионином (Johansen et al., 1989), в отличие от видов рода *Oncorhynchus*, у которых копии GH отличаются первым аминокислотным остатком. Полипептидная последовательность GH1 начинается изолейцином, а GH2 – метионином (Sekine et al., 1985; Rentier-Delrue et al., 1989).

Молекула гормона роста позвоночных содержит как минимум четыре остатка цистеина (Cys), которые находятся в сходных положениях. Остатки цистеина участвуют в образовании двух дисульфидных связей, которые необходимы для формирования третичной структуры белка и поддержания рост-стимулирующей активности гормона. В белковой молекуле гормона роста быка два дисульфидных мостика образуются между остатками 53 и 162 и 179 и 187 соответственно (Santome et al., 1973). Две дисульфидные связи GH птиц формируются 79 и 190, 207 и 215 цистеиновыми остатками (Arai, Iigo, 2010). Четыре цистеиновых остатка найдены в GH многих рыб, к которым относятся представители отрядов Окунеобразные (69, 177, 194, 202) (Dong et al., 2010) и Лососеобразные (49, 161, 178, 186) (Rentier-Delrue et al., 1989). Карпообразные рыбы содержат дополнительный непарный пятый остаток цистеина в положении 123 (49, 123, 161, 178, 186). Непарный остаток цистеина найден в GH пёстрого толстолобика (*Hypophthalmichthys nobilis*), белого толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*), белого амура (*Stenopharyngodon idella*) (Chang et al., 1992). У видов рода *Labeo* GH также содержит пять цистеиновых остатков в положениях, характерных для других карпообразных рыб, за исключением *Labeo rohita*, GH которого в результате делеции трёх аминокислот имеет отличное от других видов *Labeo* положение цистеинов (49, 120, 158, 175, 183) (Rajesh, Majumdar, 2007). Функция дополнительного цистеина не известна, но замена этого аминокислотного остатка у карповых рыб на аланин снижает сродство белковой молекулы

гормона к рецептору. Также считается, что он влияет на укладку белковой молекулы и её биологическую активность (Rajesh, Majumdar, 2007).

Интересным является различие дублицированных копий GH по числу цистеиновых остатков у видов карповых, содержащих два гена GH. Клементс с коллегами (Clements et al., 2004) обнаружили два различных варианта кДНК GH у малоротого буффало (*Ictiobus bubalus*). Один из них содержит четыре цистеиновых остатка, а другой вариант GH имеет дополнительный остаток цистеина (Clements et al., 2004), что характерно и для других видов семейства Чукучановые (Catostomidae) (Bart et al., 2010). Дублицированные копии GH золотой рыбки (*Carassius auratus*) также отличаются по числу цистеиновых остатков (Law et al., 1996). Пятый остаток цистеина найден у *Verasper moseri*, представителя отряда Камбалообразные (Pleuronectiformes), в положении 84 (52, 84, 160, 177, 185) (Peyush et al., 2000). В GH Паку (*Piaractus mesopotamicus*, Characiformes) дополнительный остаток находится в положении 113 (49, 113, 151, 168, 176) (Pinheiro et al., 2008). Пять остатков цистеина найдено в GH сома (*Pangasianodon hypophthalmus*) (71, 135, 173, 190, 198) (Sekar et al., 2014). У лососёвых рыб два GH содержат по четыре цистеиновых остатка (49, 161, 178, 186) (Rentier-Delrue et al., 1989; Devlin, 1993;).

Несмотря на высокое сходство зрелых последовательностей гормона, сигнальный пептид менее консервативен. Так, сигнальный пептид панды отличается от сигнального пептида кошек и собак тремя аминокислотными заменами, а от сигнального пептида свиньи – пятью остатками (Liao et al., 2003). При сравнении трёх видов птиц (*Gallus gallus*, *Anas platyrhynchos*, *Ficedula hypoleuca*) сигнальный пептид также более изменчив, чем последовательность зрелого белка (Buggiotti et al., 2006). Сравнение известных последовательностей GH костистых рыб показало, что N-терминальный конец, который представлен сигнальным пептидом, более изменчив по сравнению со зрелым белком и C-терминальным концом. Участок длиной 13 аминокислотных остатков на C-конце

(CFKKDMHKVETYL) консервативен у всех костистых рыб. Вероятно, он важен для взаимодействия молекулы гормона с его рецептором (New et al., 1989; Venkatesh, Brenner, 1997). При сравнении карбоксильного конца молекулы ГН радужной форели (от Asn-155 до Arg-179) с ГН крысы, человека и быка также обнаружена высокая гомология данного участка – 76%, 64% и 72% соответственно (Agellon, Chen, 1986).

Ватахики с коллегами (Watahiki et al., 1989), сравнивая последовательность ГН камбалы с последовательностями гормона роста и плацентарного лактогена других видов позвоночных, от рыб до млекопитающих, выделил 37 консервативных аминокислотных остатка, необходимых для функционирования ГН. Эти остатки располагаются в пяти областях белковой молекулы (GD1–GD5). В области GD1 содержится восемь консервативных остатков, в GD2 – четыре, в GD3 – семь, в GD4 – пять, в GD5 – тринадцать остатков. GD1, GD2, GD3 и GD4 домены, как полагают авторы (Watahiki et al., 1989), ответственны за специфическое связывание ГН, в то время как область GD5, расположенная на С-терминальном конце, вероятно, участвует в формировании и стабилизации структуры ГН. Наибольшее значение для активности ГН у камбалы имеют Arg-16, Leu-20, His-21, Ala-24 (GD1); Ser-54 (GD2); Ser-78 (GD3); Leu-106, Leu-116 и Asp-122 (GD4) (Watahiki et al., 1989). Эти консервативные домены были обнаружены в ГН сома *Pangasianodon gigas* (Lemaire et al., 1994). При сравнении шести видов рода *Labeo* все выявленные аминокислотные замены не входили в состав этих областей (Rajesh, Majumdar, 2007).

Таким образом, структура гормона роста различных видов позвоночных, от млекопитающих до рыб, очень консервативна и схожа со структурой гормона роста человека.

1.5. Ген гормона роста позвоночных

Структура гена GH очень консервативна среди позвоночных и обычно включает 5 экзонов и 4 интрона (Barta et al., 1981; Gordon et al., 1983; Byrne et al., 1987; Vize, Wells, 1987; Das et al., 1996; Lioupis et al., 1999; Buggiotti et al., 2006; Arai, Iigo, 2010). Границы экзонов и интронов соответствуют консенсусным последовательностям сайтов сплайсинга эукариотических генов (Breathnach, Chambon, 1981). Интроны начинаются с динуклеотида GT на 5' конце и заканчиваются динуклеотидом AG на 3' конце.

Ген GH млекопитающих и птиц имеет сходную структуру и включает 5 экзонов и 4 интрона (Barta et al., 1981; Gordon et al., 1983; Byrne et al., 1987; Vize, Wells, 1987; Das et al., 1996; Lioupis et al., 1999; Buggiotti et al., 2006; Arai, Iigo, 2010). Длина гена гормона роста млекопитающих составляет около 2 т.п.н. (Barta et al., 1981; Gordon et al., 1983; Byrne et al., 1987; Vize, Wells, 1987; Das et al., 1996; Lioupis et al., 1999), ген гормона роста птиц значительно больше. Размер генов GH мухоловки, курицы, утки составляет 3,3, 3,5, 5,2 т.п.н. соответственно (Tanaka et al., 1992; Buggiotti et al., 2006; Kansaku et al., 2008). Размер генов варьирует в основном за счёт разной длины интронов. Вариация размеров интронов происходит как за счёт инсерций/делеций, так и за счёт присутствия повторяющихся элементов в составе интронов. Второй интрон у крысы значительно длиннее (718 п.н.) второго интрона генов GH мыши, быка, свиньи, овцы (118, 227, 210, 231 п.н. соответственно) за счёт присутствия трёх длинных повторов, входящих в состав сегмента длиной 508 п.н. (Barta et al., 1981). Первый интрон гена GH утки почти в два раза больше (1500 п.н.), чем первый интрон курицы и мухоловки, 715 и 645 п.н. соответственно (Buggiotti et al., 2006).

Ген гормона роста, как правило, представлен в геноме млекопитающих и птиц одной копией. Один ген GH найден у крысы (Barta et al., 1981), мыши (Das et al., 1996), кролика (Wallis, Wallis, 1995), свиньи (Vize, Wells, 1987), быка (Gordon et al., 1983). В тоже время есть исключения. Так, гормон роста

человека кодируется геном hGH-N, который входит в состав кластера генов GH, состоящего из 5 тесно связанных генов. Также у макак-резус существуют, по меньшей мере, пять генов, которые кодируют GH-подобные белки, один экспрессируется в гипофизе и четыре в плаценте (Wallis et al., 1998). Два очень похожих гена GH были найдены у гиппопотама (*Hippopotamus amphibius*) и жирафа (*Giraffa camelopardalis*), представителей отряда Китопарнокопытные (Cetartiodactyla). Несмотря на наличие нуклеотидных замен между двумя копиями гена GH, у двух видов они кодируют идентичные белки (Maniou et al., 2004).

Некоторые жвачные также имеют два гена GH. На основе анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (RFLP), Валинский с соавторами (1990) обнаружили два гена GH у овец. Один ген (GH1) представлен одной копией, в то время как другой ген GH дублирован (GH2-N и GH2-Z гены). Гены GH1, GH2-N и GH2-Z очень похожи (Valinsky et al., 1990). Два типа фрагментов обнаружено при исследовании GH козы. Первый фрагмент содержит один ген гормона роста (gGH1), а во втором фрагменте найдено два гена GH, расположенных в тандеме (gGH2 и gGH3) (Yamano et al., 1991). Малый оленёк, или канчи́ль (*Tragulus javanicus*) также имеет две копии гена GH (Wallis, Wallis, 2001).

Две копии гена GH найдены у представителей отряда Воробьинообразные (Passeriformes), зебровой амадины и большеклювой вороны (Yuri et al., 2008; Arai, Iigo, 2010). Интересно, что два гена GH зебровой амадины располагаются на разных хромосомах. Ген GH1A расположен на хромосоме 1, а GH1B – на хромосоме 27 (Arai, Iigo, 2010).

Ген гормона роста рыб обладает более высоким уровнем изменчивости, по сравнению с генами GH млекопитающих и птиц. Размер первичных транскриптов варьирует от 1,7 до 4 т.п.н. Вариация размеров генов GH также происходит за счёт присутствия инсерций/делеций и повторяющихся элементов в составе интронов. Так, у рыбы фугу были найдены тетра-нуклеотидный повтор (CTGT)₂₈ и тринуклеотидный повтор (GAT)₇₉ во

втором и пятом интронах соответственно (Venkatesh, Brenner, 1997). Более короткий последний сателлит также найден в пятом интроне тилапии (Ber, Daniel, 1992), камбалы (Tanaka et al., 1995), баррамунди (Yowe, Epping, 1995) и, вероятно, присутствовал в ГН общего предка отрядов Иглобрюхообразные (Tetraodontiformes), Камбалообразные (Pleuronectiformes) и Окунеобразные (Perciformes) (Venkatesh, Brenner, 1997). Размер гена ГН щукообразных рыб (Esociformes) варьирует за счёт присутствия в четвёртом интроне 33-нуклеотидного повтора, количество которого колеблется от 7 до 16 копий. Данная микросателлитная последовательность также присутствует в единичной копии в гене ГН лососёвых рыб, и не обнаружена у других видов позвоночных (Barnett et al., 2007). В случае видов рода *Labeo* вариация размеров генов ГН возникает скорее благодаря присутствию делеций, чем повторяющихся элементов (Rajesh, Majumdar, 2007).

У разных видов рыб структура гена ГН также отличается. Ген ГН карповых рыб (Cypriniformes), подобно гену ГН млекопитающих и птиц, состоит из пяти экзонов и четырёх интронов (Chiou et al., 1990; Zhu et al., 1992; Hong, Scharl, 1993; Rajesh, Majumdar, 2007; Panicz et al., 2012). Однако интроны и нетранслируемые области гена ГН карповых рыб значительно длиннее. 3'-нетранслируемая область гена ГН белого толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*) больше, чем 3'-область генов ГН млекопитающих и птиц (500 п.н. у рыб, 100 п.н. у млекопитающих и курицы).

Ген гормона роста сомообразных рыб (Siluriformes) похож на ГН карповых и содержит пять экзонов и четыре интрона (Anathy et al., 2001; Sekar et al., 2014). Аминокислотная последовательность ГН гигантского шильбового сома (*Pangasianodon gigas*) на 80% идентична ГН карпа (Lemaire et al., 1994).

Другие гены ГН рыб, изученные до сих пор, состоят из 6 экзонов и 5 интронов. Такую структуру имеет ген гормона роста нильской тилапии (*Tilapia nilotica*) и большого жёлтого горбыля (*Pseudosciaena crocea*),

представителей отряда Окунеобразные (Perciformes) (Ber, Daniel, 1992; Chen et al., 2004). Ген GH азиатского паралихта (*Paralichthys olivaceus*), представителя отряда Камбалообразные (Pleuronectiformes), бурого фугу (*Fugu rubripes*), представителя отряда Иглобрюхообразные (Tetraodontiformes), и изученные виды лососёвых рыб также содержит 6 экзонов и 5 интронов (Agellon et al., 1988; Tanaka et al., 1995; Venkatesh, Brenner, 1997). Ген GH данной группы рыб отличается от гена GH млекопитающих наличием дополнительного интрона, который, разрывая пятый экзон, приводит к образованию еще одного экзона (экзон VI) (Almuly et al., 2000). Сравнительный анализ генов GH радужной форели и человека показал, что первые четыре экзона обоих генов кодируют одни и те же области. Пятый экзон гена GH человека эквивалентен пятому и шестому экзонам гена GH форели (Chen T.T. et al., 1989).

Наличие или отсутствие пятого интрона в генах GH рыб во многих исследованиях используется для установления родства видов (Agellon et al., 1988; Venkatesh, Brenner, 1997). Венкатеш и Бренер (Venkatesh, Brenner, 1997) разделяют костистых рыб на две группы. Первая группа рыб, к которой относятся члены надотряда Ostariophysi (Костнопузырные), имеют четыре интрона. Ген GH второй группы, включающей надотряды Protacanthopterygii (Протолучеперые) и Acanthopterygii (Колючепёрые), содержит пять интронов. Сходные результаты получили Раджеш и Маджумдар (Rajesh, Majumdar, 2007). Используя кодирующие области (кДНК) GH различных видов рыб, они показали, что виды, имеющие одинаковое количество экзонов и интронов в гене GH, кластеризуются вместе. Виды, представляющие отряды Лососеобразные (Protacanthopterygii), Окунеобразные и Камбалообразные (Acanthopterygii), группировались отдельно от видов отрядов Карпообразные и Сомобразные (Ostariophysi).

Пятый интрон гена GH общего предка надотрядов Protacanthopterygii и Acanthopterygii либо был приобретён после отделения от надотряда Ostariophysi, либо изначально существовал у общего предка, но затем был

утрачен в линии, давшей начало надотряду Ostariophysii и четвероногим (Venkatesh, Brenner, 1997). Гипотезу, что введение пятого интрона в ген GH рыб произошло после расхождения рыб и четвероногих, поддерживает анализ гена GH тилапии. Ген гормона роста тилапии – один из наименьших генов GH, определённых в настоящее время у рыб (около 1,7 Кб). Однако структура этого гена аналогична крупнейшим генам GH и включает шесть экзонов и пять интронов. Таким образом, тилапия, вероятно, представляет промежуточную стадию эволюции генов GH рыб (Ber, Daniel, 1992).

Янг с соавторами, выделяют три типа гена GH рыб (Yang et al., 1997). Первый тип гена GH рыб схож с генами гормона роста млекопитающих и птиц, которые не содержат пятый интрон. Этот тип гена GH свойственен видам карпообразных и сомообразных рыб (Chiou et al., 1990; Zhu et al., 1992; Hong, Schartl, 1993; Lemaire et al., 1994; Rajesh, Majumdar, 2007; Panicz et al., 2012). Гены GH второго типа содержат небольшой пятый интрон длиной около 70–100 п.н. Тилапия, азиатский паралихт и желтохвост имеют этот тип гена GH (Ber, Daniel, 1992; Tanaka et al., 1995). Третий тип гена GH содержит большой пятый интрон, 200–600 п.н. Такую структуру гена GH имеют лососёвые рыбы (Agellon et al., 1988; Johansen et al., 1989; Devlin, 1993; Du et al., 1993).

В геноме многих исследованных видов рыб ген GH представлен двумя несвязанными функциональными паралогичными генами, GH1 и GH2. Два гена GH обнаружено у *Tilapia nilotica* (Perciformes). Две копии гена GH тилапии высоко гомологичны, имеют аналогичную структуру (5 интронов, 6 экзонов), и обе кодируют идентичный полипептид (Ber, Daniel, 1993). Среди карповых рыб два гена GH присутствуют у карпа, золотой рыбки и у видов семейства Чукучановые (Catostomidae) (Law et al., 1996; Bart et al., 2010). Однако у некоторых карповых ген GH найден в единственной копии. Так один ген обнаружен в геноме белого амура, который, в отличие от карпа и чукучановых рыб, является диплоидным (Zhu et al., 1992), а также у белого

толстолобика (Hong, Scharl, 1993) и у видов рода *Labeo* (Rajesh, Majumdar, 2007).

У лососёвых рыб ген гормона роста также представлен двумя копиями. Два гена GH были идентифицированы в геноме кеты (*Oncorhynchus keta*), радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*), нерки (*Oncorhynchus nerka*), чавычи (*Oncorhynchus tshawytscha*), кижуча (*Oncorhynchus kisutch*), атлантического лосося (*Salmo salar*) (Agellon, Chen, 1986; Kawauchi et al., 1986; Agellon et al., 1988; Johansen et al., 1989; Rentier-Delrue et al., 1989; Male et al., 1992; Devlin, 1993; Du et al., 1993; Forbes et al., 1994; McKay et al., 1996).

Размер генов GH лососёвых составляет ~ 4 т.п.н., что почти в два раза больше гена GH млекопитающих. Разница в длине между генами GH лососёвых и млекопитающих возникает за счёт присутствия в гене GH лососёвых дополнительного интрона, а также за счёт увеличения общего размера интронов и нетранслируемой области, которая почти в 4 раза больше, чем у млекопитающих (Chen T.T. et al., 1989, Johansen et al., 1989).

Размер генов GH отличается как у разных видов лососёвых, так и между двумя копиями GH одного вида, и также возникает за счёт разной длины интронов. У тихоокеанских лососей (*Oncorhynchus*) пятый интрон (E) в гене GH1 намного больше (~600 п.н.), чем в гене GH2 (~200–250 п.н.). Интрон С в генах GH1 тихоокеанского и атлантического лосося больше (~700–800 п.н.), чем интрон С в генах GH2 (~450–500 п.н.) (Male et al., 1992; Yang et al., 1997). Длина гена GH1 нерки составляет 4138 п.н., а гена GH2 – 3440 п.н. Различие в длине возникает из-за вставок/делеций, которые присутствуют во всех, кроме второго, интронах (Delvin, 1993).

Структура гена двух копий GH лососёвых сходна и включает 6 экзонов и 5 интронов. Все интрон-экзонные границы фланкированы соответствующими консенсусными последовательностями (GT/AG). Кодрующие области двух генов высоко консервативны. Размер экзонов идентичен у двух генов у всех видов лососёвых и составляет 74 п.н., 140 п.н., 117 п.н., 156 п.н., 147 п.н. и 63 п.н. для 1–6 экзонов соответственно.

Некодирующие и фланкирующие области двух генов GH менее консервативны и включают много нуклеотидных замен, делеций и инсерций, что указывает на независимую эволюцию двух генов в течение значительного периода времени. Гены GH1 и GH2 радужной форели имеют 78,6% и 89,2% гомологии в 3' и 5'-нетранслируемых областях соответственно, по сравнению с 96,8% гомологии в кодирующих областях (Chen T.T. et al., 1989). Анализ генов GH нерки показал, что некодирующие области двух генов существенно отличаются, вероятно, вследствие небольшого генетического обмена между двумя генами. Дивергенция генов GH1 и GH2 нерки составляет 5,2% и 18,1% для кодирующих и некодирующих последовательностей соответственно. Это согласуется с предположением, что два гена GH располагаются на разных хромосомах (Devlin, 1993). Две копии GH отличаются стоп-кодоном. В гене GH1 радужной форели стоп-кодон представлен триплетом TAG, а в гене GH2 – TAA (Rentier-Delrue et al., 1989).

Исследование гена гормона роста у радужной форели (Yang et al., 1997) показало, что гены GH1 и GH2 неравномерно экспрессируются в гипофизе рыб разного пола и на разных стадиях развития. Уровень мРНК GH1 был заметно выше, чем уровень мРНК GH2 у 10-дневных мальков и 2-летних самок. Однако эта разница не была очевидной для самцов того же возраста. Более высокий уровень экспрессии GH1 у самок авторы связывают с присутствием в гене GH1 эстроген-чувствительного элемента (ERE), который отсутствует в гене GH2 (Yang et al., 1997). Функциональных различий между копиями GH пока не выявлено.

В то же время было обнаружено, что ген GH2 у кижуча и чавычи находится в половой Y- хромосоме (Forbes et al., 1994). В дальнейшем было показано, что в этой хромосоме в действительности находится псевдоген гормона роста (GHΨ). Результаты показали, что данный ген не является функциональным и, вероятно, происходит от гена GH2. Доказательством нефункциональности гена GHΨ, является наличие делеции и стоп-кодона в

пятом экзоне и неправильного сайта сплайсинга на границе первого интрона и второго экзона. Идентификация гена GH Ψ только у самцов дала основание полагать, что он сцеплен с полом и расположен на Y-хромосоме (Du et al., 1993).

5'-фланкирующий регион гена GH позвоночных содержит консенсусные последовательности ТАТА боксов и многочисленные сайты связывания транскрипционных факторов, таких как Pit-1, CRE, ERE и др.

Pit-1 – транскрипционный фактор передней доли гипофиза. Было показано, что для активации транскрипции гена GH млекопитающих необходимо взаимодействие Pit-1 фактора с двумя цис-элементами промотора (Rhodes, Rosenfeld, 1996). В промоторе гена GH курицы также выявлено два сайта Pit-1 (Ip et al., 2004). В отличие от млекопитающих и птиц, промотор гена GH рыб содержит большее количество Pit-1-связывающих сайтов. У *Sparus aurata* найдено два сайта Pit-1 в проксимальной части, и несколько предполагаемых сайтов Pit-1 в дистальной части промотора (Almuly et al., 2005). Промотор радужной форели содержит, по крайней мере, четыре таких элемента (Yamada et al., 1993; Yang et al., 1997). Несколько сайтов связывания Pit-1 выявлено в генах GH лосося и чавычи (Von Schalburg et al., 2008).

Элементы CRE (цАМФ-ответные элементы) млекопитающих содержат либо симметричный (палиндромный) TGACGTCA участок, либо ассиметричный TGACG мотив. Так для цАМФ активации гена GH человека необходимо наличие двух TGACG мотивов (Cohen et al., 1999). Среди рыб три непалиндромных последовательности CRE (CGTCA) были идентифицированы по всей длине 5' области гена GH *Sparus aurata* (Almuly et al., 2005). В генах GH лососёвых рыб также найден ассиметричный цАМФ-элемент (Argenton et al., 1996; Yang et al., 1997; Von Schalburg et al., 2008).

Эстроген-чувствительный элемент (ERE) найден только в одной копии гена GH. У форели ERE обнаружен в гене GH1 (Yang et al., 1997). У лосося и чавычи, наоборот, ERE найден в промоторе гена GH2 (Von Schalburg et al.,

2008). Различное положение регуляторных элементов предполагает, что гены GH1 и GH2 регулируются разными способами и, вероятно, отличаются по выполняемым функциям или экспрессируются на разных стадиях развития лососёвых (Von Schalburg et al., 2008).

Регуляторные участки для транскрипционных факторов также присутствуют в интронных последовательностях гена GH. Это свидетельствует о том, что экспрессия гена GH регулируется путём взаимодействия с регуляторными элементами, находящимися в составе единицы транскрипции. Разное количество Pit-1-связывающих последовательностей найдено в третьем интроне гена GH у разных видов рода *Labeo* (Rajesh, Majumdar, 2007). Бернардини с коллегами обнаружили сайты Pit-1 в третьем интроне радужной форели (Bernardini et al., 1999). Палиндромный CRE-элемент найден в четвёртом интроне GH лосося и чавычи (Von Schalburg et al., 2008). В 5'-фланкирующих областях и интронах генов GH лососёвых также присутствуют консенсусные последовательности, родственные регуляторным элементам тиреоидного гормона, ретиноевой кислоты, прогестерона, глюкокортикоидного гормона (Yang et al., 1997; Von Schalburg et al., 2008).

1.6. Эволюция гена гормона роста позвоночных

Скорость эволюции последовательностей GH отличаются у разных групп позвоночных.

Последовательность гормона роста млекопитающих очень консервативна (Santome et al., 1973; Shoji et al., 1990; Castro-Peralta, Barrera-Saldana, 1995; Liao et al., 2003). Последовательности GH свиньи и собаки, которые представляют два разных отряда плацентарных, полностью идентичны. Эти последовательности очень сходны с GH лошади, кита, слона (не более 4 аминокислотных замен) и лишь незначительно отличается от последовательности GH кролика или грызунов (7–10 аминокислотных

замен). Консенсусная последовательность, основанная на этих консервативных последовательностях GH, совпадает с последовательностью GH свиньи, которая, вероятно, идентична предковой последовательности GH плацентарных млекопитающих. Из этого следует, что на протяжении большей части эволюции плацентарных, скорость эволюции GH была очень медленной ($0,21-0,28 \times 10^{-9}$ аминокислотных замен на сайт в год) (Wallis, 1994, 1996; Wallis, Wallis, 2001).

Тем не менее, скорость эволюции GH млекопитающих заметно увеличивалась (в 25–50 раз), по крайней мере, в двух случаях – во время эволюции приматов (Primates) и китопарнокопытных (Cetartiodactyla). Скорость увеличивалась на относительно коротком интервале времени, а затем снижалась до базовой скорости, характерной для других млекопитающих (Forsyth, Wallis, 2002; Maniou et al., 2004).

У китопарнокопытных ускорение эволюции GH произошло в линии, ведущей к жвачным животным (после дивергенции жвачных и мозолоногих, но до дивергенции козы и быка). Последовательности GH этой группы животных имеют большое сходство и существенно отличаются от предполагаемой предковой последовательности GH плацентарных (Lioupis et al., 1997). Скорость эволюции GH в этот период составила $5,0 \times 10^{-9}$ аминокислотных замен на сайт в год. С другой стороны, последовательности GH двух других представителей китопарнокопытных, верблюда и гиппопотама, очень схожи с последовательностью GH свиньи. Это подтверждает, что в течение большего периода времени GH китопарнокопытных эволюционировал с медленной базовой скоростью ($0,25 \times 10^{-9}$ аминокислотных замен на сайт в год) (Maniou et al., 2004). В линии приматов всплеск быстрой эволюции GH произошёл до расхождения широконосых и узконосых обезьян (Adkins et al, 2001; Wallis et al, 2001). Скорость эволюции GH приматов в этот период составила $10,8 \times 10^{-9}$ аминокислотных замещений на сайт в год (Lioupis et al., 1997; Wallis et al.,

2001; Ye et al., 2005). У грызунов скорость эволюции GH в определенные периоды, возможно, также слегка увеличивалась (в 2–3 раза) (Wallis, 1996).

Увеличение скорости эволюции аминокислотных последовательностей GH могло быть результатом либо адаптивных изменений в ответ на действие положительного отбора, либо произошло вследствие ослабления очищающего отбора из-за потери функции. Соотношение количества несинонимичных замен к количеству синонимичных замен (dN/dS), приходящихся на сайт, часто используется для определения силы и направления отбора. $dN/dS = 1$ характеризует эволюционную нейтральность, $dN/dS > 1$ – положительный отбор, а $dN/dS < 1$ – отрицательный отбор. Обычно скорость синонимичных замен намного выше, чем скорость несинонимичных замен ($dN/dS < 1$). Для периода быстрой эволюции GH китопарнокопытных dN/dS величина составила 1,23 (Maniou et al., 2004), а для GH приматов – 1,26 (Wallis et al., 2001).

Наиболее вероятно, что увеличение скорости объясняется положительным отбором, связанным с функциональными изменениями, так как никаких доказательств потери функции не было обнаружено, и GH жвачных и приматов сохраняет стимулирующую рост активность. Кроме того, скорость эволюции и dN/dS величина после периода быстрой эволюции возвращаются к низким базовым значениям (Wallis et al., 2001; Maniou et al., 2004).

Быстрая эволюция, наблюдаемая для аминокислотных последовательностей GH приматов и китопарнокопытных, по-видимому, является специфичной по отношению к несинонимичным сайтам последовательности зрелого белка. Анализ последовательностей сигнального пептида, интронов, 5' и 3'-нетранслируемых областей не обнаружил увеличения скорости эволюции (Wallis, Wallis, 2001; Wallis et al., 2001; Maniou et al., 2004).

Во время эволюции приматов дупликации гена GH привели к появлению кластера генов и семейства белков, большинство из которых

экспрессируется в плаценте (Chen E.Y. et al., 1989). Сходство генов кластера указывает на то, что дубликации генов произошли после периода быстрой эволюции (Wallis, 1996). Для объяснения увеличения скорости эволюции GH приматов был предложен механизм – "разделения функций" (Wallis, 1997), согласно которому GH, к своей основной функции (стимуляция роста), принял вторую дополнительную функцию, вероятно, связанную с метаболическим действием или взаимодействием с лактогеновыми рецепторами. Это привело ко многим адаптивным заменам в белке. Давление отбора на ген в этой ситуации было бы снижено благодаря появлению дополнительной копии гена GH, которая могла бы принимать на себя вторую функцию, оставляя исходному гену только основную функцию – регуляцию роста. Это согласуется с ситуацией, наблюдаемой в GH приматов, где возвращение скорости эволюции GH к базовому уровню произошло примерно в то же время, что и дубликации генов (Wallis et al., 2001).

Существует три возможных варианта эволюции дублицированных генов: один из дубликатов становится псевдогеном, вследствие дегенеративных мутаций; один из дубликатов получает новую функцию за счет новой, выгодной мутации (неофункционализация); первоначальные функции одной копии гена могут быть разделены между дубликатами (субфункционализация) (Zhang, 2003; Magadum et al., 2013). Большинство дубликаций гена, по-видимому, сохраняются субфункционализацией (Lynch, Force, 2000), и этот процесс может начинаться с различий в экспрессии генов, отражающий небольшие изменения в регуляторных областях дублицированных генов (Force et al., 1999). Так как многие гены выполняют несколько различных функций, действие отбора, возможно, привело к оптимальной последовательности для каждой выполняемой функции. После того, как функции дублицированных копий гена начинают расходиться, аминокислотные изменения, связанные с функциональной специализацией каждой копии, вероятно, будут адаптивными, и оба дубликата будут быстро эволюционировать, пока субфункционализация не будет завершена (Hughes,

1994). Таким образом, субфункционализация может объяснить быструю эволюцию аминокислотной последовательности, которая часто наблюдается в копиях гена после события дупликации генов (Wallis, 1996).

Периоды быстрой эволюции GH, наблюдаемые в некоторых линиях млекопитающих, и которые, как предполагают, были вызваны позитивным отбором, не очевидны для птиц. Анализ последовательностей GH 6 видов птиц показал, что большинство аминокислотных сайтов зрелого белка подвергались очищающему отбору. Скорость эволюции GH птиц немного выше ($0,56-0,80 \times 10^{-9}$), чем скорость эволюции GH млекопитающих в «медленной фазе» ($0,21-0,28 \times 10^{-9}$), но значительно ниже, чем скорость «быстрой фазы» эволюции GH млекопитающих. В целом, скорость эволюции GH у птиц более постоянна, чем у млекопитающих, и увеличивается максимум в 1,4 раза (Buggiotti, Primer, 2006).

В то же время скорость аминокислотных замен в сигнальном пептиде GH птиц в 1–19 раз выше, чем наблюдается для зрелой последовательности белка. Соотношение dN/dS для сигнального пептида в 3–33 раза выше, а скорость эволюции сигнального пептида в 2,0–4,4 раза выше, чем для зрелого GH (Buggiotti, Primer, 2006). Сигнальный пептид птиц, вероятно, может участвовать в посттрансляционных модификациях, которые приводят к наблюдаемому структурному разнообразию GH птиц. Высокий уровень изменчивости сигнального пептида может лежать в основе функциональной сложности (Buggiotti, Primer, 2006).

В GH птиц было выявлено 4 аминокислотных сайта, находящихся под действием положительного отбора, и все они входили в состав 27 кодонов сигнального пептида. Две из этих четырёх аминокислот (в положении -3 и -1) важны для правильного отщепления сигнального пептида при созревании белка. Для сравнения, эти же позиции у млекопитающих были гораздо более высоко консервативными. Высокий уровень несинонимичных замен, наблюдаемых в этих сайтах у птиц, и то, что эти сайты подверглись положительному отбору, подразумевает, что изменение последовательности

сигнального пептида у птиц носит адаптивный характер. Такая изменчивость последовательности сигнального пептида ГН, вероятно, может приводить к разным уровням эффективности секреции ГН, и потенциально может являться объектом естественного отбора, например, как средство контролирующее скорость роста (Buggiotti, Primer, 2006).

У птиц гены ГН воробьиных эволюционируют быстрее и на нуклеотидном и на аминокислотном уровне, по сравнению с последовательностями генов ГН других птиц (не воробьиных) (Yuri et al., 2008). Скорость синонимичных замен в 2 раза больше, а скорость эволюции аминокислотной последовательности в 10 раз больше в ГН воробьиных, чем в ГН других птиц. Из 6 изученных таксонов птиц, наиболее отличающийся по аминокислотной последовательности ГН, был представитель воробьиных птиц, европейская мухоловка-пеструшка (*Ficedula hypoleuca*), отличающаяся от других полипептидов ГН птиц 18–27 аминокислотами, тогда как расхождение между другими пятью таксонами колебалось от 2 до 22 аминокислот. Этот уровень аминокислотной дивергенции сравним с дивергенцией, найденной между ГН зеленой морской черепахи (*Chelonia mydas*) и полипептидами ГН птиц (23–29 аминокислот) (Yuri et al., 2008).

Для большинства низших позвоночных характерна низкая скорость эволюции ГН ($0,19\text{--}0,39 \times 10^{-9}$ аминокислотных замен в год), которая сравнима со скоростью, полученной для ГН млекопитающих ($0,21\text{--}0,28 \times 10^{-9}$). Однако костистые рыбы и, возможно, амфибии составляют исключение. Со времени дивергенции амфибий и высших позвоночных, в ГН амфибий (лягушка-бык) накопилось около 57 замен ($0,86 \times 10^{-9}$) по сравнению с 25, 29, 32 заменами в ГН черепахи, курицы и свиньи соответственно. Со времени дивергенции костистых и хрящевых рыб, в ГН костистых рыб (угорь) накопилось около 85 аминокислотных замен ($1,52 \times 10^{-9}$), а в ГН хрящевых рыб (осётр) только 18 (Wallis, 1996).

Аминокислотные последовательности ГН костистых рыб также значительно отличаются друг от друга. Это указывает на то, что общая

скорость эволюции GH костистых рыб была высокой и непостоянной (Bernardi et al., 1993, Wallis, 1996). Тем не менее, значение dN/dS , посчитанное для GH костистых рыб, в некоторых случаях близко к значениям, наблюдаемым для медленно эволюционирующих последовательностей GH млекопитающих. Это доказывает, что хотя скорость эволюции GH костистых рыб была высокой, в некоторых случаях она снижалась до базовой скорости, наблюдаемой в эволюции большинства позвоночных. Таким образом, обычно наблюдаемый случай эволюции GH – медленная базовая скорость с редкими периодами быстрой эволюции – кажется, также применим в отношении костистых рыб, за исключением того, что всплески быстрой эволюции происходили чаще, чем в других группах (Wallis, 1996).

Таким образом, анализ имеющихся данных в литературе позволяет считать гены гомона роста очень интересной модельной системой для изучения организации и эволюции их в различных таксонах позвоночных животных. Особенно это касается рыб, где эти гены могут быть уникальными, но могут быть дублированными, причем оба гена являются функциональными. В то же время в некоторых группах рыб могут обнаруживаться псевдогены. Исследованию генов гормона роста у лососевых рыб посвящена настоящая работа.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследования

Объектами исследования послужили 4 вида гольцов северо-западной части Тихого Океана: северная мальма – *Salvelinus malma*, южная мальма – *S. curilus*, *syn. S. malma krascheninnikovi*, голец Таранца – *S. taranetzi*, голец Леванидова – *S. levanidovi* (табл. 2.1). Материал для исследования был взят из коллекции лаборатории генетики ИБМ ДВО РАН. В работе использовалась одна особь каждого вида. Для сравнительного и филогенетического анализа из базы данных GenBank/NCBI были взяты полные последовательности ДНК генов GH нерки – *Oncorhynchus nerka* (U14551, U14535.1), чавычи – *Oncorhynchus tshawytscha* (EU621900.1, EU621901.1), атлантического лосося – *Salmo salar* (X61938, EU621899.1), обыкновенного сига – *Coregonus lavaretus* (AY498872.1); последовательности мРНК GH кумжи – *Salmo trutta* (JX277097.1, JX277098.1), микижи – *Oncorhynchus mykiss* (M22731.1, M22732.1), щуки – *Esox lucius* (NM_001303940.1), а также последовательности интронов C и D генов GH1 и GH2 видов отряда лососевых (Salmonidae) (табл. 2.2).

Таблица 2.1

NCBI номера полных последовательностей GH исследованных видов гольцов

Вид	GH1	GH2
<i>S. malma</i>	KF772972	KF772976
<i>S. curilus</i>	KF772971	KF772975
<i>S. taranetzi</i>	KF772973	KF772977
<i>S. levanidovi</i>	KF772974	KF772978

NCBI номера интронов С и D генов гормона роста исследуемых видов
лососевых рыб

Вид	GH1C	GH1D	GH2C	GH2D
<i>S. alpinus</i>	AF005921	AY125164	AF005909	AY125163
<i>S. leucomaenis</i>	AY125182	AY125184	AY125180	AY125183
<i>S. fontinalis</i>	AY125178	AY125179	AY125174	AY125175
<i>S. namaycush</i>	AF005922	AY125192	AF005910	U29954
<i>S. malma</i>	HE978488	HE978492	HE978496	HE978500
<i>S. curilus</i>	HE978487	HE978491	HE978495	HE978499
<i>S. taranetzi</i>	HE978485	HE978489	HE978493	HE978497
<i>S. levanidovi</i>	HE978486	HE978490	HE978494	HE978498
<i>O. clarki</i>	AF005924	AY125131	AF005913	AY125133
<i>O. mykiss</i>	AF005923	AY125186	J03797	J03797
<i>O. gorbuscha</i>	AF005926	AY125094	AY125089	AY125090
<i>O. keta</i>	AF005927	AF541853	L04688	AF541854
<i>O. nerka</i>	U14551	U14551	U14535	U14535
<i>O. kisutch</i>	AF005925	AF541852	U04930	U28359
<i>O. masou</i>	AF541855	AF541856	AF541857	AF541858
<i>O. tschawytcha</i>	EU621900	EU621900	AF005914	AY125157
<i>S. salar</i>	X61938	AY125198	M21573	AY125200
<i>S. trutta</i>	AY125208	AY125204	AF005912	AY125206
<i>A. ohridana</i>	AY125143	AY125141	AF005915	AY125139
<i>P. perryi</i>	AF005920	AY125113	AF005908	AY125115
<i>H. hucho</i>	AY125124	AY125119	AF005906	AY125121
<i>H. taimen</i>	AY125129	AY125125	AF005907	AY125127
<i>B. lenok</i>	AF005918	AY125095	AF005916	AY125097

2.2. Амплификация ДНК

На первом этапе фрагменты гена GH1 северной и южной мальмы амплифицировали в полимеразной цепной реакции (ПЦР), с использованием прямого GH1-1 (5' TCATCCTTGGCAATTAAGAGTA 3') и обратного GH1-2 (5' GTTCTGGTAGTAGTTCCTCGTAG 3') праймеров. Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси, включающей 20–50 нг тотальной ДНК, 2,5 мкл 10-кратного буфера Таq-полимеразы (60 mM Tris-HCl (pH 8,5), 1,5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 10 mM 2-меркаптоэтанол, 0,1% Тритон X-100), 2,5 мкл суммы дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (2,5 mM), по 2,0 мкл каждого праймера (2,5 μM), 1,5 ед. Таq-полимеразы (СибЭнзим), и деионизированную воду. ПЦР проводили по следующей схеме: начальная денатурация (94°C – 5 мин), 35 циклов, включающих денатурацию (94°C – 30 с), отжиг праймеров (51°C – 1 мин), элонгацию (72°C – 2 мин 40 с) и достройка цепей (72°C – 5 мин).

Полученный продукт ПЦР, размером около 3000 п.н., обрабатывали двумя эндонуклеазами рестрикции – PstI и MboI. После гидролиза ДНК каждой из двух рестриктаз было получено по четыре фрагмента (рис. 2.1).

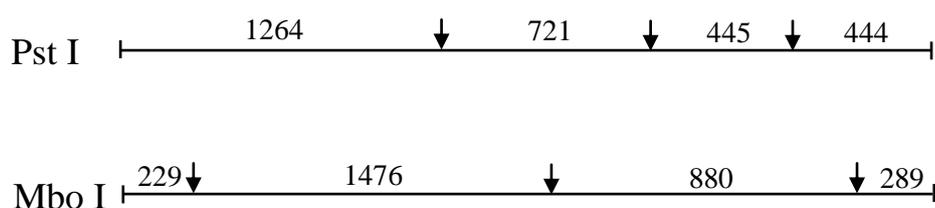


Рис. 2.1. Рестрикционная карта участка гена GH1 *S. curilus*

Фрагменты ДНК разделяли в 1,2 % агарозном геле, приготовленном на 0,5X буфере TBE. Гель окрашивали этидиумбромидом и фотографировали в проходящем УФ свете. Продукты рестрикции выделяли из геля с помощью набора PureLink™ QuickGelExtraction (Invitrogen, Germany) согласно

инструкции изготовителя и далее использовали для клонирования и секвенирования.

Полученный фрагмент гена (2874, 2882 п.н. для *S. curilus*, *S. malma* соответственно) включал четыре полных экзона (1–4), неполный 5-ый экзон и 4 интрона (A–D). На основе этого фрагмента были подобраны четыре пары специфических праймеров (табл. 2.3), с использованием которых был амплифицирован аналогичный участок гена GH2 у *S. curilus* и *S. malma*, и последовательности генов GH1 и GH2 у *S. taranetzi* и *S. levanidovi*. Для получения полной последовательности пятого экзона, пятого интрона (E) и шестого экзона, была подобрана дополнительная пара праймеров, GHtf1/GHtr1 (табл. 2.3) (рис. 2.2).

Таблица 2.3

Последовательности пар праймеров, используемых для амплификации генов GH1 и GH2

№	Пара праймеров	Последовательность 5'→3'
1	GH1-1 GH1R1	TCATCCTTGGCAATTAAGAGTA
		CAGCCAGGTTACTTACTGAACT
2	GH1F2 GH1R2	GACTTCTGTAACCTCCGACTC
		GTTTCTGACTATGAGGCTGT
3	GH1F3 GH1R3	GTCTGATTGAATCCTGGGAG
		GGAAACCCGTTGCACTTAAT
4	GH1F4 GH1-2	CAACCATGTCTCTGTCACTAAC
		GTTCTGGTAGTAGTTCCCGTAG
5	GHtf1 GHtr1	AAGCAAATATTGATATGCACAC
		CCТААТСТGTATATGGGAAACC

ПЦР для GH1-1/GH1R1 и GH1F4/GH1-2 проводили по схеме: начальная денатурация (94°C – 5 мин), 35 циклов (94°C – 30 с, 51°C – 1 мин,

72°C – 1 мин) и достройка цепей (72°C – 5 мин). Для пар праймеров GH1F2/GH1R2, GH1F3/GH1R3, GHtf1/ GHtr1 при следующих условиях: 94°C – 5 мин, 35 циклов (94°C – 1 мин, 55°C – 1 мин, 72°C – 1 мин), 72°C – 5 мин. С каждой парой праймеров амплифицировалось по два фрагмента ДНК, соответствующие генам GH1 и GH2. Фрагменты двух генов, полученные с парой праймеров GH1-1/GH1R1 имели сходный размер. Продукты амплификации также разделяли в 1,2% агарозном геле, вырезали и далее использовали для клонирования и секвенирования.

2.3. Молекулярное клонирование

Лигирование полученных фрагментов ДНК осуществляли с помощью набора для клонирования CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas) согласно инструкции изготовителя. Компетентные клетки *Escherichia coli* (*E. coli*), предварительно охлаждённые при 4°C (30 мин), трансформировали рекомбинантной ДНК методом теплового шока (42°C, 1 мин). Полученные трансформанты инкубировали 1 час при 37°C в 1мл жидкой среды Лурия-Бертани (LB среда) (табл. 2.4) и высевали на твёрдую LB среду (табл. 2.4), содержащую 50 мг/мл ампицилина.

Таблица 2.4

Ингредиенты, необходимые для получения 1л среды Лурия-Бертани
(LB среда)

Ингредиенты	жидкая LB среда	твёрдая LB среда
Бакто-триптон	10 г	10 г
Бакто-дрожжевой экстракт	5 г	5 г
NaCl	10 г	10 г
Агар	—	12 г

Скриннинг трансформированных рекомбинантных клеток не требовался, поскольку pJET1/blunt является вектором положительного

отбора. Вектор pJET1/blunt содержит ген эндонуклеазы рестрикции, которая является летальной для всех штаммов *E. coli*. Лигирование фрагмента ДНК разрывает этот летальный ген. В результате только клетки с рекомбинантными плазмидами способны размножаться.

Отбор искомых рекомбинантных ДНК проводился на основании оценки размера встроенных в векторную молекулу фрагментов. Для этого проводился ПЦР-анализ клеточных колоний с праймерами, комплементарными к нуклеотидной последовательности вектора. Амплификацию проводили в 10 мкл реакционной смеси, включающей 1 мкл 10-кратного буфера Таq-полимеразы, 0,5 мкл суммы дезоксинуклеотидтрифосфатов (2,5 мМ), по 0,5 мкл каждого праймера (2,0 мМ), 1,5 ед. Таq-полимеразы (СибЭнзим), и деионизированную воду. Реакцию проводили по следующей схеме: начальная денатурация (98°C – 2 мин), 26 циклов (95°C – 15 с, 55°C – 15 с, 72°C – 1 мин) и достройка цепей (72°C – 5 мин). Продукты ПЦР разделяли в 1,2% агарозном геле и очищали путём осаждения этанолом. Концентрация очищенной вставки также анализировалась методом электрофореза в агарозном геле.

2.4. Секвенирование

Определение нуклеотидных последовательностей полученных фрагментов генов GH (рис. 2.2) проводили с помощью набора реактивов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1 (Applied Biosystems, USA) по методике производителя. Для секвенирования использовали праймеры, входящие в состав Clone JET™ PCR Cloning Kit. Реакцию проводили в следующих условиях: начальная денатурация (96°C – 1 мин), 26 циклов (96°C – 10 с, 55°C – 10 с, 60°C – 4 мин). Последовательности нуклеотидов определяли на автоматическом секвенаторе ABI 3130 xl (Applied Biosystems) на Кафедре клеточной биологии и генетики ДВФУ.

Сборку нуклеотидных последовательностей осуществляли в пакете программ SeqScape V.2.6 (Applied Biosystems). Анализ нуклеотидных последовательностей и множественное выравнивание проводили с помощью пакета программ MEGA-5.0 (Tamura et al. 2011) При выравнивании использовали алгоритмы ClustalW (Thompson et al., 1994) и Muscle (Edgar, 2004).

Перевод нуклеотидных последовательностей в аминокислотные осуществляли с использованием программ Gene Runner, версия 5.0 (Hastings Software, Inc., <http://www.generunner.com>). Определение нуклеотидного и аминокислотного состава осуществляли с помощью программ MEGA 5.0 (Tamura et al. 2011).

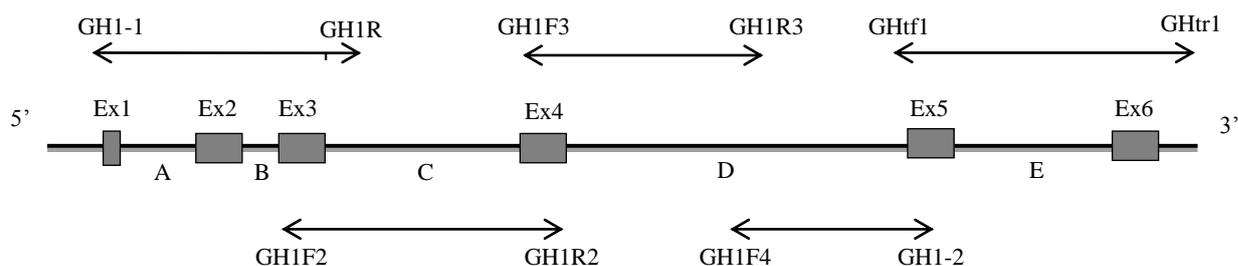


Рис. 2.2. Стратегия амплификации и секвенирования генов GH1 и GH2 видов рода *Salvelinus*.

2.5. Филогенетический анализ

Построение филогенетических деревьев выполняли методом объединения ближайшего соседа (Neighbor-Joining, NJ), максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) в программе PAUP 4b10 (Swofford, 2002), и Байесовским методом (Bayesian Inference, BI) в программе MrBayesV.3.1.2 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001; Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Устойчивость полученных NJ и ML филогенетических деревьев оценивали методом бутстреп-анализа (bootstrap analysis; Felsenstein, 1985) используя 1000 реплик. При построении филогенетических деревьев методом

ближайших соседей использовали p -дистанцию (p -distance). При реконструкции филогении по алгоритму максимального правдоподобия использовали эвристический поиск деревьев методом TBR со случайным включением последовательностей. При VI-анализе создавали 1 млн. генераций цепей Маркова, отбирая пробы каждые 100 генераций. Первые 500 (5%) проб исключали из анализа как «burnin».

Оптимальные модели нуклеотидного замещения выбирали с использованием программы Modeltest 3.7 (Posada, Crandall, 1998). В качестве критерия при выборе модели использовали Akaike Information Criterion (AIC) (Posada, Buckley, 2004). Реконструкцию филогении по последовательностям экзонов осуществляли на основе модели нуклеотидных замещений TrN+I+G. Для анализа последовательностей C и D интронов использовали TVM+I+G модель нуклеотидных замещений, для анализа последовательностей всех пяти интронов – GTR+G.

Построение филогенетических деревьев по аминокислотным последовательностям выполняли методом объединения ближайшего соседа (Neighbor-Joining, NJ) и максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) с помощью программы MEGA 5.0 (Tamura et al. 2011). При построении филогенетических деревьев методом ближайших соседей использовали p -дистанцию (p -distance). Реконструкцию ML деревьев осуществляли на основе модели JTT. Оценка достоверности полученной топологии выполнялась методом бутстреп-анализа (bootstrap analysis; Felsenstein, 1985) с использованием 1000 реплик.

Количество синонимичных замен на синонимичный сайт (синонимичная дистанция, dS) и количество несинонимичных замен на несинонимичный сайт (несинонимичная дистанция, dN), используемые в тесте на отбор, были оценены методом Нея-Годжобори (Nei-Gojobori, 1986) в программе MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011). Определение вида отбора произведено с помощью дифференции несинонимичной и синонимичной дистанций ($Dd = dN - dS$). Вероятность отклонения от нулевой гипотезы

определяли Z-тестом в программе MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011).

Для определения сайтов, находящихся под действием отбора были использованы три метода (SLAC – single-likelihood ancestor counting, FEL – fixed effects likelihood, REL – random effects likelihood), которые входят в пакет программ HyPhy, доступного на сервере Datamonkey (www.datamonkey.org, Kosakovsky Pond, Frost, 2005a). Эти три метода используют разные статистические подходы для анализа числа dS и dN. Метод SLAC признан наиболее консервативным среди них. Он может пропустить некоторые сайты, находящиеся под действием отбора, которые будут выявлены другими методами. Однако достоверность обнаруживаемых методом SLAC сайтов наиболее высока по сравнению с другими подходами. Анализы SLAC, FEL проводили при уровне значимости $p=0,1$, при проведении анализа REL байесовский фактор составил 50. Последовательности GH1 *S. malma*, GH1 *O. mykiss* и GH2 *S. malma* были удалены программой, так как они идентичны последовательностям GH1 *S. curilus*, GH1 *S. trutta* и GH2 *S. curilus* соответственно. Модель нуклеотидных замен, использованная при анализе GH1 генов – F81, GH2 – НКУ85, двух генов (GH1 + GH2) – НКУ85. Соотношение dN/dS (ω) разных ветвей дерева было оценено с использованием программы GA-Branch также доступной на Datamonkey сервере (Kosakovsky Pond, Frost, 2005b).

РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Структура генов

3.1.1 Характеристика кодирующих последовательностей – экзонов

Структура генов GH1 и GH2 у всех исследованных видов совпадает и включает в себя 6 экзонов (1–6) и 5 интронов (A, B, C, D, E) (рис. 3.1). Последовательности гена GH1 для четырёх видов гольцов составили: *S. curilus* (3666 п.н.), *S. malma* (3673 п.н.), *S. taranetzi* (3675 п.н.), *S. levanidovi* (3672 п.н.). Для гена GH2: *S. curilus* (3305 п.н.), *S. malma* (3305 п.н.), *S. taranetzi* (3300 п.н.), *S. levanidovi* (3299 п.н.). Сравнительный анализ экзонов показал, что размер каждого экзона двух генов идентичен у всех видов гольцов и составляет 74 п.н., 140 п.н., 117 п.н., 156 п.н., 147 п.н., и 63 п.н. соответственно.

Первый экзон генов GH включает нетранслируемую область, кодирующую лидерную последовательность от точки начала транскрипции до стартового кодона ATG и транслируемую область длиной 10 п.н., которая включает первые три кодона и первый нуклеотид четвёртого кодона сигнального пептида, отщепляемого после трансляции при созревании функционального белка (рис. 3.1). Второй экзон включает последние два нуклеотида четвёртого кодона и остальные нуклеотиды для 18 аминокислот сигнального пептида, а также аминокислот зрелого белка с 1 по 28. Экзоны III, IV, V, VI кодируют 29–67, 68–119, 120–168, 169–188 аминокислоты соответственно.

Сравнительный анализ кодирующей части полученных генов GH гольцов рода *Salvelinus* показал, что нуклеотидная последовательность каждого экзона в каждом гене идентична у двух видов мальмы, *S. curilus* и *S. malma*, и несколько отличается у других видов. Последовательность транслируемой области 1-го экзона (10 п.н.) идентична в обоих генах у всех видов гольцов.

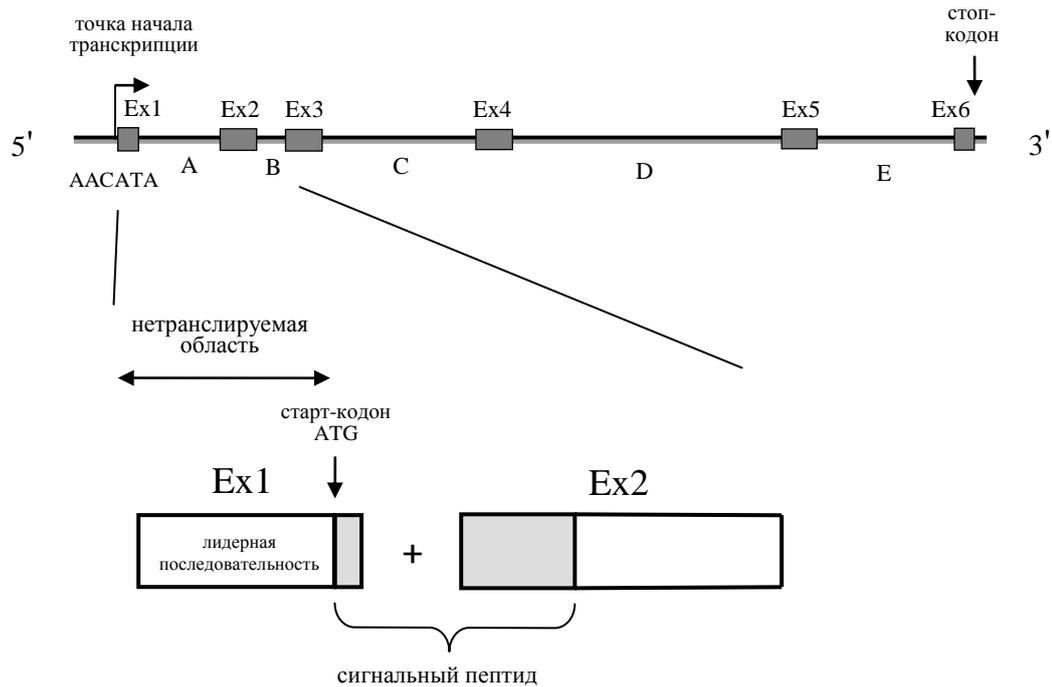


Рис. 3.1. Схематичное изображение структуры гена гормона роста.

В гене GH1 нуклеотидные последовательности 2-го, 4-го, 6-го экзона полностью идентичны у всех четырёх видов гольцов. Последовательность 3-го экзона мальмы идентична последовательности *S. taranetzi*, и отличается от *S. levanidovi* одной нуклеотидной заменой. Последовательность 5-го экзона мальмы, наоборот, идентична *S. levanidovi*, последовательность *S. taranetzi* отличается от неё одним нуклеотидом. Эти одиночные нуклеотидные замены в генах GH1 *S. levanidovi* и *S. taranetzi* не приводят к изменению последовательности белка.

В гене GH2 нуклеотидная последовательность 6-го экзона полностью идентична у всех 4-х видов. Третий экзон *S. taranetzi*, также как и в гене GH1, идентичен последовательности *S. curilus* и *S. malma*, последовательности 2-го, 4-го, 5-го экзона *S. taranetzi* отличаются от аналогичных последовательностей мальмы одним нуклеотидом в каждом экзоне. Нуклеотидная замена в четвёртом экзоне приводит к изменению

аминокислотной последовательности (лизин→треонин). Последовательности 2-го, 3-го, 4-го экзона *S. levanidovi* имеют по одной нуклеотидной замене, по сравнению с другими видами. Замена в четвёртом экзоне приводит к изменению аминокислотной последовательности (изолейцин→метионин). Последовательность 5-го экзона *S. levanidovi* имеет 4 нуклеотидные замены, одна из которых совпадает с нуклеотидной заменой в гене *S. taranetzi* по сравнению с мальмой.

Таким образом, сравнительный анализ кодирующей части гена GH1 четырёх видов гольцов рода *Salvelinus* выявил две нуклеотидные замены, обе типа транзиции. Эти замены не изменяют аминокислотную последовательность GH1. В кодирующей части гена GH2 обнаружено 9 нуклеотидных замен, из которых 3 трансверсии и 6 транзиций. Две замены приводят к изменению аминокислотной последовательности: 96 аминокислота представлена изолейцином у *S. curilus*, *S. malma*, *S. taranetzi* и метионином у *S. levanidovi* (ATA→ATG), 119 аминокислота *S. taranetzi* представлена треонином, а у трёх остальных видов – лизином (AAG→ACG) (табл. 3.1). Нуклеотидные последовательности сигнального пептида каждой копии гена GH полностью идентичны.

Всего при сравнении последовательностей генов GH1 и GH2 гольцов выявлено 34 нуклеотидные замены (9 трансверсий, 25 транзиции). Последовательности зрелого белка отличаются 8 аминокислотными заменами, одна из которых (96 аминокислота) характерна только для GH2. В нуклеотидных последовательностях сигнального пептида выявлено две замены, одна из которых приводит к изменению аминокислотной последовательности. В GH1 восьмая аминокислота сигнального пептида представлена лейцином (TTG), а в GH2 – метионином (ATG) (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Нуклеотидные замены в кодирующих последовательностях генов GH гольцов рода *Savelinus*

	Положение замены, п.н.	Тип замены	Изменение АК-ты	GH1				GH2			
				<i>S. curilus</i>	<i>S. malma</i>	<i>S. taranetzi</i>	<i>S. levanidovi</i>	<i>S. curilus</i>	<i>S. malma</i>	<i>S. taranetzi</i>	<i>S. levanidovi</i>
Сигнальный пептид	22	трансверсия	Leu→Met	T	T	T	T	A	A	A	A
	45	транзиция	-	T	T	T	T	C	C	C	C
Зрелый белок	15	трансверсия	-	G	G	G	G	T	T	T	G
	27	транзиция	-	C	C	C	C	T	T	T	T
	30	транзиция	-	G	G	G	G	A	A	A	A
	57	транзиция	-	A	A	A	A	G	G	G	G
	58	трансверсия	Met→Leu (20)	A	A	A	A	C	C	C	C
	81	транзиция	-	C	C	C	C	C	C	T	C
	89	трансверсия	Val→Gly (30)	T	T	T	T	G	G	G	G
	90	транзиция		T	T	T	T	C	C	C	C
	100	транзиция	Pro→Ser (34)	C	C	C	C	T	T	T	T
	126	транзиция	-	G	G	G	A	G	G	G	G
	153	транзиция	-	C	C	C	C	C	C	C	T
	183	трансверсия	His→Gln (61)	C	C	C	C	G	G	G	G
	231	транзиция	-	T	T	T	T	C	C	C	C
	265	транзиция	-	T	T	T	T	C	C	C	C
	268	транзиция	Thr→Ala (90)	A	A	A	A	G	G	G	G
	288	транзиция	Ile→Met (96)	A	A	A	A	A	A	A	G
	356	трансверсия	Thr→Lys (119)	C	C	C	C	A	A	C	A
	369	транзиция	-	T	T	T	T	C	C	C	C
	375	транзиция	-	A	A	G	A	A	A	A	A
	405	трансверсия	Gln→His (135)	G	G	G	G	T	T	T	T
	429	транзиция	-	C	C	C	C	T	T	T	C
	435	транзиция	-	C	C	C	C	T	T	T	T
	441	трансверсия	-	G	G	G	G	C	C	G	G
	444	транзиция	-	C	C	C	C	C	C	C	T
	450	трансверсия	-	A	A	A	A	C	C	C	C
	468	транзиция	-	C	C	C	C	T	T	T	C
	472	транзиция	-	T	T	T	T	C	C	C	C
	501	транзиция	-	C	C	C	C	T	T	T	T
507	транзиция	-	C	C	C	C	T	T	T	T	
528	транзиция	-	C	C	C	C	T	T	T	T	
543	транзиция	-	A	A	A	A	G	G	G	G	

Также проведён анализ генов GH других представителей семейства Salmonidae. При сравнении последовательностей зрелого белка GH1 *S. salar* и *S. trutta* выявлено 9 аминокислотных замен, нуклеотидная последовательность содержат 15 замен. Последовательности гена GH2 двух видов рода *Salmo* отличаются 14 нуклеотидными заменами, которые приводят к 3 аминокислотным заменам (табл. 3.2). Последовательности зрелого белка GH1 трёх видов тихоокеанских лососей (*O. nerka*, *O. mykiss*, *O. tshawytscha*) отличаются 4 аминокислотными остатками, нуклеотидная последовательность содержит 8 замен. В гене GH2 видов рода *Oncorhynchus* обнаружено 16 нуклеотидных замен, которые приводят к 9 аминокислотным заменам (табл. 3.2).

Сигнальный пептид двух видов рода *Salmo* в GH2 отличается одним аминокислотным остатком и полностью идентичен в GH1. Нуклеотидные последовательности отличаются 2 и 3 заменами, для генов GH1 и GH2 соответственно. Последовательность сигнального пептида трёх видов рода *Oncorhynchus* содержит по одной нуклеотидной замене в каждом гене, которые приводят к изменению аминокислотной последовательности (табл. 3.3).

Последовательности зрелого белка GH1 и GH2 у *S. salar* и *S. trutta* отличаются 12 аминокислотными остатками, нуклеотидные последовательности содержат 35 замен. В сигнальном пептиде, при сравнении двух GH *Salmo*, выявлено 4 нуклеотидных и 1 аминокислотная замены. Нуклеотидные последовательности трёх видов *Oncorhynchus*, кодирующие зрелый белок GH1 и GH2, отличаются 40 нуклеотидами, которые приводят к 18 аминокислотным заменам. Сигнальный пептид двух GH тихоокеанских лососей отличается 3 нуклеотидными и 2 аминокислотными заменами (табл. 3.2, 3.3).

Сравнительный анализ кодирующей части генов GH гольцов рода *Salvelinus* с другими представителями лососёвых рыб: *O. nerka*, *O. mykiss*, *O. tshawytscha*, *S. salar* и *S. trutta* выявил 36 нуклеотидных замен в гене GH1 и

48 замен в гене GH2. Нуклеотидные последовательности, кодирующие зрелый белок GH1, отличаются 32 нуклеотидами, которые приводят к 16 аминокислотным заменам. В сигнальном пептиде GH1 выявлены 2 аминокислотные замены, нуклеотидная последовательность содержит 4 замены. Последовательности, кодирующие зрелый белок GH2, отличается 44 нуклеотидами, которые приводят к 14 аминокислотным заменам. В сигнальном пептиде GH2 выявлена 1 аминокислотная замена, нуклеотидная последовательность содержит 4 замены (табл. 3.2, 3.3).

Всего при сравнении экзонов генов GH1 и GH2 лососёвых рыб выявлено 83 нуклеотидные замены. Последовательности, кодирующие зрелый белок, отличаются 76 нуклеотидами, которые приводят к 23 аминокислотным заменам. Сигнальный пептид двух генов отличается 3 аминокислотными заменами, нуклеотидная последовательность содержит 7 замен (табл. 3.2, 3.3).

При анализе кодирующих последовательностей генов GH1 и GH2 гольцов обнаруживаются отличия по частоте использования кодонов. В ряде случаев наблюдаются фиксированные отличия в кодировании аминокислот, когда триплеты, используемые в одном гене, не используются в другом. Так триплеты CTA, GCG и GGA, кодирующие лейцин, аланин и глицин соответственно, присутствуют в гене GH1, но отсутствуют в гене GH2. Триплеты TCG, GCA, TAT, GGT, кодирующие серин, аланин, тирозин и глицин соответственно, наоборот, присутствуют в гене GH2, но отсутствуют в гене GH1 (табл. 3.4). При анализе кодирующих последовательностей генов GH1 и GH2 всех исследуемых видов лососёвых рыб триплеты TCG и GCA, кодирующие серин и аланин соответственно, присутствуют в гене GH2, но отсутствуют в гене GH1. Триплет GGA, кодирующий глицин, наоборот, присутствует в гене GH1, но отсутствует в гене GH2 (табл. 3.5).

Таблица 3.2

Аминокислотные замены в GH лососёвых рыб

	Положение замены	Сигнальный пептид			Зрелый белок																							
		8	13	18	1	12	20	29	30	34	46	50	58	61	73	76	90	96	100	119	123	125	134	135	149	152	181	
GH1	<i>S. curilus</i>	L	V	S	M	N	M	E	V	P	L	N	I	H	H	Y	T	I	S	T	D	V	Q	Q	D	V	S	
	<i>S. malma</i>
	<i>S. taranetzi</i>
	<i>S. levanidovi</i>
	<i>S. salar</i>	M	G	L	.	F	.	M	.	K
	<i>S. trutta</i>	M	.	.	I	S	L	D	G	.	.	.	V	.	.	F	I	M	A
	<i>O. nerka</i>	M	A	.	I	S	L	D	G	.	.	I	V	.	.	F	I	M	A	H	E	.	.
	<i>O. tshawytscha</i>	M	.	.	I	S	L	D	G	.	.	.	V	.	.	F	I	M	A	.	.	L
	<i>O. mykiss</i>	M	.	.	I	S	L	D	G	.	.	.	V	.	.	F	I	M	A
GH2	<i>S. curilus</i>	M	L	.	G	S	.	.	.	Q	.	.	A	.	.	K	H	.	.	.
	<i>S. malma</i>	M	L	.	G	S	.	.	.	Q	.	.	A	.	.	K	H	.	.	.
	<i>S. taranetzi</i>	M	L	.	G	S	.	.	.	Q	.	.	A	H	.	.	.
	<i>S. levanidovi</i>	M	L	.	G	S	.	.	.	Q	.	.	A	M	.	K	H	.	.	.
	<i>S. salar</i>	M	L	.	G	S	.	.	.	Q	.	F	A	M	.	K	H	.	I	.
	<i>S. trutta</i>	M	.	G	.	.	L	.	G	Q	.	F	.	M	.	K	H	.	.	.
	<i>O. nerka</i>	M	L	.	G	S	.	.	.	Q	R	F	.	M	.	E	E	I	.	.	H	.	.	.
	<i>O. tshawytscha</i>	M	L	.	G	S	V	.	.	Q	.	F	.	M	Y	K	.	.	.	L	H	.	.	.
	<i>O. mykiss</i>	M	.	G	.	.	L	.	G	Q	.	F	.	M	.	K	H	.	.	Y

Таблица 3.3

Последовательность сигнального пептида GH1 и GH2 лососёвых рыб

Ген	Вид	Нуклеотидная последовательность	Аминокислотная последовательность
GH1	<i>S. curilus</i>	ATGGGACAAGTGTTCCTGCTGTTGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTTTCTGAGTCAAGGGGCAGCG	MGQVFL L LPVLLVSCFLSQGAA
	<i>S. malma</i>	ATGGGACAAGTGTTCCTGCTGTTGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTTTCTGAGTCAAGGGGCAGCG	MGQVFL L LPVLLVSCFLSQGAA
	<i>S. taranetzi</i>	ATGGGACAAGTGTTCCTGCTGTTGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTTTCTGAGTCAAGGGGCAGCG	MGQVFL L LPVLLVSCFLSQGAA
	<i>S. levanidovi</i>	ATGGGACAAGTGTTCCTGCTGTTGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTTTCTGAGTCAAGGGGCAGCG	MGQVFL L LPVLLVSCFLSQGAA
	<i>O. nerka</i>	ATGGGACAAGTGTTCCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGCCAGTTGTTTCCTGAGTCAAGGGGCAGCG	MGQVFL L LPVLLVSCFLSQGAA
	<i>O. tshawytscha</i>	ATGGGACAAGTGTTCCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTTCCTGAGTCAAGGGGCAGCG	MGQVFL L LPVLLVSCFLSQGAA
	<i>O. mykiss</i>	ATGGGACAAGTGTTCCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTTCCTGAGTCAAGGGGCAGCG	MGQVFL L LPVLLVSCFLSQGAA
	<i>S. trutta</i>	ATGGGACAAGTGTTCCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTTCCTGAGTCAAGGGGCAGCG	MGQVFL L LPVLLVSCFLSQGAA
	<i>S. salar</i>	ATGGGACAAGTGTTCCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTTTCTGAGCCAAGGGGCAGCG	MGQVFL L LPVLLVSCFLSQGAA
GH2	<i>S. curilus</i>	ATGGGACAAGTGTTCCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGCTTTCTGAGTCAAGGGGCAGCG	MGQVFL L LPVLLVSCFLSQGAA
	<i>S. malma</i>	ATGGGACAAGTGTTCCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGCTTTCTGAGTCAAGGGGCAGCG	MGQVFL L LPVLLVSCFLSQGAA
	<i>S. taranetzi</i>	ATGGGACAAGTGTTCCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGCTTTCTGAGTCAAGGGGCAGCG	MGQVFL L LPVLLVSCFLSQGAA
	<i>S. levanidovi</i>	ATGGGACAAGTGTTCCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGCTTTCTGAGTCAAGGGGCAGCG	MGQVFL L LPVLLVSCFLSQGAA
	<i>O. nerka</i>	ATGGGACAAGTGTTCCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTTCCTGAGTCAAGGGGCAGCG	MGQVFL L LPVLLVSCFLSQGAA
	<i>O. tshawytscha</i>	ATGGGACAAGTGTTCCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTTCCTGAGTCAAGGGGCAGCG	MGQVFL L LPVLLVSCFLSQGAA
	<i>O. mykiss</i>	ATGGGACAAGTGTTCCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTTCCTGGGTCAAGGGGCAGCG	MGQVFL L LPVLLVSCFLSQGAA
	<i>S. trutta</i>	ATGGGACAAGTGTTCCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTTCCTGGGTCAAGGGGCAGCG	MGQVFL L LPVLLVSCFLSQGAA
	<i>S. salar</i>	ATGGGACAAGTGTTCCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTTTCTGAGTCAAGGGGCAGCG	MGQVFL L LPVLLVSCFLSQGAA

Примечание. Нуклеотидные и аминокислотные замены выделены жирным шрифтом и указаны в каждом гене по сравнению с аналогичной последовательностью гольцов.

Средние частоты кодонов зрелого GH1 и GH2 четырёх видов
гольцов рода *Salvelinus*

Кодон	GH1	GH2	Кодон	GH1	GH2
UUU(F)	1	1	UAU(Y)	0	1,5
UUC(F)	5	5	UAC(Y)	7	5,5
UUA(L)	0	0	UAA(*)	0	0
UUG(L)	4	2	UAG(*)	0	0
CUU(L)	0	0	CAU(H)	1	3
CUC(L)	7	7	CAC(H)	4	2
CUA(L)	1	0	CAA(Q)	2	2
CUG(L)	15	19	CAG(Q)	9	9
AUU(I)	1	2	AAU(N)	2	3
AUC(I)	8	7	AAC(N)	14	13
AUA(I)	2	1,8	AAA(K)	2,3	2
AUG(M)	4	3,3	AAG(K)	9,8	10,8
GUU(V)	1	1	GAU(D)	3	2,3
GUC(V)	6	5	GAC(D)	9	9,8
GUA(V)	0,8	1	GAA(E)	4	4
GUG(V)	3,3	3	GAG(E)	6	6
UCU(S)	3	4,3	UGU(C)	1	1
UCC(S)	5	4,8	UGC(C)	3	3
UCA(S)	2	1	UGA(*)	0	0
UCG(S)	0	1	UGG(W)	1	1
CCU(P)	2	1	CGU(R)	1	0,8
CCC(P)	2	2	CGC(R)	1	2
CCA(P)	1	1	CGA(R)	0	0
CCG(P)	0	0	CGG(R)	2	1,3
ACU(T)	2	2	AGU(S)	1	1
ACC(T)	5	4	AGC(S)	6	6
ACA(T)	0	0	AGA(R)	2	2
ACG(T)	1	0,3	AGG(R)	3	3
GCU(A)	1	2	GGU(G)	0	0,3
GCC(A)	3	3	GGC(G)	3	5,3
GCA(A)	0	1	GGA(G)	1	0
GCG(A)	1	0	GGG(G)	3	2,5

Средние частоты кодонов зрелого GH1 и GH2 лососёвых рыб

Кодон	GH1	GH2	Кодон	GH1	GH2
UUU(F)	1	1	UAU(Y)	0,1	0,8
UUC(F)	5,6	5,6	UAC(Y)	6,3	5,9
UUA(L)	0	0	UAA(*)	0	0
UUG(L)	3,9	2,4	UAG(*)	0	0
CUU(L)	0,1	0,1	CAU(H)	1,6	3
CUC(L)	6,4	6,4	CAC(H)	3,4	1,9
CUA(L)	1,7	1	CAA(Q)	2,1	2
CUG(L)	15,6	18	CAG(Q)	8,8	8,9
AUU(I)	1,2	1,4	AAU(N)	2,2	2,1
AUC(I)	7,9	7,7	AAC(N)	13,2	13,9
AUA(I)	1,9	1,4	AAA(K)	2	2
AUG(M)	3,7	3,7	AAG(K)	10,1	10,8
GUU(V)	0,4	1	GAU(D)	3	2,7
GUC(V)	6,4	4,9	GAC(D)	9,3	9,2
GUA(V)	0,8	0,9	GAA(E)	3,7	4,4
GUG(V)	3,1	3,1	GAG(E)	6	5,8
UCU(S)	3,6	4,2	UGU(C)	1	1
UCC(S)	4	4,3	UGC(C)	3	3
UCA(S)	2	1,3	UGA(*)	0	0
UCG(S)	0	0,7	UGG(W)	1	1
CCU(P)	2	1,3	CGU(R)	1	0,4
CCC(P)	2	2	CGC(R)	1	2
CCA(P)	1	0,9	CGA(R)	0	0
CCG(P)	0	0	CGG(R)	2	1,7
ACU(T)	2	2	AGU(S)	1,1	1
ACC(T)	4,6	4,4	AGC(S)	6,3	6
ACA(T)	0	0	AGA(R)	2	2,1
ACG(T)	0,9	0,1	AGG(R)	3	2,9
GCU(A)	1,4	1,9	GGU(G)	0,7	0,1
GCC(A)	3	2,7	GGC(G)	3	5
GCA(A)	0	0,6	GGA(G)	0,9	0
GCG(A)	1	0,4	GGG(G)	3	2,9

Кодирующая область генов GH1 и GH2 исследованных видов рода *Salvelinus* (630 п.н.) соответствует аминокислотной последовательности предшественника длиной 210 остатков, включающих 188 аминокислот зрелого белка и 22 аминокислоты сигнального пептида, что характерно и для других видов лососёвых рыб. Открытая рамка считывания генов GH1 гольцов, начинается ATG кодоном и заканчивается стоп-кодоном TAG. Открытая рамка считывания генов GH2 также начинается ATG кодоном, но заканчивается стоп-кодоном TAA. Копии генов GH нерки, чавычи, радужной форели, атлантического лосося и кумжи также отличаются стоп-кодонами, которые представлены триплетами, характерными для гольцов. Последовательность зрелого белка двух GH гольцов начинается с метионина.

Аминокислотный состав двух гормонов роста *Salvelinus* практически не отличается и включает 27 кислых, 32–33 основных, 77 неполярных, 111 полярных аминокислот. Наиболее часто в белковой молекуле гормона роста гольцов встречается лейцин (14,36 и 14,89%), серин (9,04 и 9,57%), аспарагин (8,51%), аспарагиновая кислота (6,38%), лизин (6,38 и 6,91%), глутамин (5,85%), изолейцин (5,85%), валин (5,85 и 5,32%) для GH1 и GH2 соответственно. Аминокислотный состав GH других лососёвых рыб сходен с аминокислотным составом GH гольцов.

Ген гормона роста содержит транскрибируемую, но не транслируемую лидерную последовательность (рис. 3.1), которая от точки начала транскрипции до стартового кодона ATG гена GH1 полностью идентична у четырёх видов *Salvelinus*. Лидерная последовательность в гене GH2 варьирует. Если у *S. malma* и *S. curilus* она полностью совпадает, то лидерная последовательность гена GH2 *S. levanidovi* отличается от неё двумя нуклеотидными заменами. Длина лидерной последовательности одинакова в обоих генах у большинства видов (64 п.н.), за исключением последовательности гена GH2 *S. taranetzi*, которая имеет длину 59 п.н. и отличается от трёх других видов вставкой остатка аденина и тремя нуклеотидными заменами, две из которых идентичны заменам *S. levanidovi*.

Различие в длине образуется за счёт делеции шести нуклеотидов – ТТТСАА. При выравнивании лидерных последовательностей двух генов, за исключением вариабельной последовательности GH2 *S. taranetzi*, показано, что последовательность гена GH1 отличается пятью нуклеотидными заменами от последовательности GH2 мальмы и тремя нуклеотидными заменами от последовательности GH2 *S. levanidovi* (табл. 3.6).

Таблица 3.6

Лидерная последовательность генов GH

Вид	GH1
<i>S. curilus</i>	AACATACTCAACCGACCACCGCACTTTCAAGTTAAGTAACCATCCTTGGCAATTAAGAGTAAAA
<i>S. malma</i>	
<i>S. taranetzi</i>	
<i>S. levanidovi</i>	
<i>O. nerka</i>	
<i>O. tshawytscha</i>	
<i>O. mykiss</i>	
<i>S. trutta</i>	
<i>S. salar</i>	AACATACTCAACCGACCACCGCACTTTCAAGTTAAGTAATCATCCTTGGCAATTAAGAGTAAAA
	GH2
<i>S. curilus</i>	AACATACTCAACCGACCACCGCACTTTCAAGTGAAAT- AATCATCCTTGGCAATTAAGAGAGAAA
<i>S. malma</i>	
<i>S. taranetzi</i>	AACATACTCAACCGACCACACAC-----GTGAAGT- AATCATCCTTGGCAATTAAGAGAAAAA
<i>S. levanidovi</i>	AACATACTCAACCGACCACCGCACTTTCAAGTGAAGT- AATCATCCTTGGCAATTAAGAGAAAAA
<i>O. nerka</i>	AACATACT GA ACCGACCACCACTTTCAAGTGAAGT AA AATCATCCTTGGCAATTAAGAGAGAAA
<i>O. tshawytscha</i>	AACATACT GA ACCGACCACCACTTTCAAGTGAAGT- AATCATCCTTGGCAATTAAGAG AGAA
<i>O. mykiss</i>	AACATACT GA ACCGACCACCACTTTCAAGTGAAGT- AATCATCCTTGGCAATTAAGAG AAAAA
<i>S. trutta</i>	AACATACT GA ACCGACCACCACTTTCAAGTGAAG A - AATCATCCTTGGCAATTAAGAG AAAAA
<i>S. salar</i>	AACATACTCAACCGACCACCGCACTTT CACGTGAAGT- AATCATCCTTGGCAATTAAGAG AAAAA

Примечание. Нуклеотидные замены выделены жирным шрифтом и указаны в каждом гене по сравнению с лидерной последовательностью мальмы.

Лидерная последовательность гена GH1 тихоокеанских лососей (*O. nerka*, *O. tshawytscha*, *O. mykiss*) и *S. trutta* идентична лидерной последовательности гена GH1 гольцов. Лидерная последовательность *S. salar* имеет одну нуклеотидную замену. В гене GH2 лидерная последовательность варьирует (табл. 3.6). Длина лидерной последовательности этих видов в гене

GH1 одинакова и совпадает с длиной лидерной последовательности гольцов (64 п.н.). Длина лидерной последовательности в гене GH2 составляет 65 п.н., за исключением гена GH2 *O. tshawytscha*, в котором лидерная последовательность имеет длину 64 п.н.

В генах GH гольцов найдено пять кодонов для цистеина, положение которых идентично в генах-паралогах у всех четырёх видов. Первый остаток цистеина, входящий в состав сигнального пептида, кодируется в гене GH1 триплетом TGT, а в гене GH2 – триплетом TGC. Четыре остальных остатка входят в состав зрелого белка (Cys49, Cys161, Cys178 и Cys186). Первый остаток цистеина, кодируется вторым экзоном, 2-ой – третьим, 3-й – пятым, 4-й и 5-й – шестым экзоном. Такое расположение цистеиновых остатков характерно и для других исследованных видов лососевых рыб.

Нуклеотидный состав последовательностей, кодирующих зрелый белок генов GH1 и GH2, у всех исследуемых видов лососёвых практически не отличается и в среднем составляет: в гене GH1 – 27%, 20,2%, 28,5%, 24,3%, в гене GH2 – 27,1%, 20,3%, 28,5%, 24,2% для А, Т, С, G соответственно. Насыщение 1-ой, 2-ой, 3-ей позиции кодонов в целом совпадает у разных видов и незначительно отличается между двумя генами. В первой позиции кодона преобладает аденин, во второй – аденин и тимин, в третьей – цитозин и гуанин (табл. 3.7).

Таблица 3.7

Средние значения частот оснований в 1-ом, 2-ом, 3-ем положениях кодона в генах GH лососёвых рыб, %

Основание	GH1			GH2		
	1-ое	2-е	3-е	1-е	2-е	3-е
A	32,9	38,6	9,5	32,6	39,3	9,3
T	17	32	12	17	31	13
C	25,7	14,5	45,3	26,3	14,2	44,9
G	24,2	15,3	33,3	24,1	15,4	33

3.1.2 Характеристика некодирующих последовательностей – интронов

При анализе некодирующих последовательностей установлено, что нуклеотидные последовательности 1-го интрона идентичны у *S. malma* и *S. curilus* в каждом гене. Последовательность 2-го интрона гена GH1 идентична у *S. curilus*, *S. malma*, *S. taranetzi*. Пятый интрон гена GH1 идентичен у *S. malma* и *S. levanidovi*, а пятый интрон гена GH2 идентичен у *S. curilus* и *S. malma*. Длина первых двух интронов гена GH1 идентична у всех видов гольцов и составляет 455 п.н. и 136 п.н. соответственно. Длины остальных интронов в генах GH1 и GH2 гольцов варьируют, но незначительно (табл. 3.8).

Таблица 3.8

Длины интронов генов GH1 и GH2 лососёвых рыб, п.н.

Вид	Интроны GH1					Интроны GH2				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
<i>S. curilus</i>	455	136	715	1043	620	463	124	624	1171	226
<i>S. malma</i>	455	136	721	1044	620	463	124	624	1171	226
<i>S. taranetzi</i>	455	136	721	1044	622	465	123	623	1171	226
<i>S. levanidovi</i>	455	136	721	1043	620	463	123	623	1168	225
<i>S. salar</i>	464	142	821	1117	218	461	136	454	1176	220
<i>O. nerka</i>	392	136	710	1145	586	470	138	445	964	220
<i>O. tshawytscha</i>	403	136	723	1170	592	457	138	445	1108	217

Размеры интронов каждой копии гена GH незначительно отличаются у разных видов гольцов, но варьируют между GH1 и GH2. Сравнительный анализ показал, что наибольшую разницу в длине последовательности имеет пятый интрон (E). Длина этого интрона в гене GH1 гольцов примерно на 400 нуклеотидов больше, чем в гене GH2. Размер интрона E также отличается между двумя изученными генами GH тихоокеанских лососей. Длина пятого

интрона в генах GH1 и GH2 *S. salar* почти совпадает, разница составляет 2 п.н. (табл. 3.8).

Два гена GH у видов рода *Oncorhynchus* и *S. salar* также отличаются размером интрона C, который в среднем на 300 п.н. больше в генах GH1, чем в GH2. У гольцов рода *Salvelinus* разница в длине интрона C составила ~ 100 п.н. (табл. 3.8).

Нуклеотидный состав интронов генов GH1 и GH2 у разных видов практически не отличается, и в среднем составляет: в гене GH1 – 30,0%, 31,9%, 21,1%, 17,0%, в гене GH2 – 30,9%, 32,0%, 20,0%, 17,1% для А, Т, С, G соответственно.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей интронов гена GH1 выявил наличие делеции у одного из видов размером 6 нуклеотидов – GTCTAC в третьем интроне (C). У *S. malma*, *S. taranetzi* и *S. levanidovi* присутствуют две тандемные копии этого участка, а у *S. curilus* – одна (табл. 3.9). У американских видов гольцов (*S. alpinus*, *S. namaycush*, *S. leucomaenis*, *S. fontinalis*) также обнаружены две копии данного участка за исключением *S. fontinalis*, у которого в результате нуклеотидной замены присутствует одна копия данного участка. В генах GH1 *O. nerka*, *O. tshawytscha* и *S. salar* одна из копий этого участка также содержит нуклеотидные замены. В интроне C гена GH1 *S. namaycush* выявлена делеция размером 9 п.н. – ATCACAATC. Такая же делеция, но на 3 п.н. короче (ACAATC), присутствует у *O. nerka*, *O. tshawytscha*.

При сравнении 8 видов гольцов в четвёртом интроне (D) гена GH1 обнаружена делеция размером 11 нуклеотидов – ACAGTGACATG. У *S. leucomaenis* присутствуют две тандемные копии этого участка, а у остальных видов гольцов – одна (табл. 3.10). В интроне D *O. tshawytscha* и *S. salar* также выявлена одна копия данного участка, у *O. nerka* это участок содержит одну нуклеотидную замену.

Таблица 3.9

Отличающиеся участки в интроне С гена GH1 гольцов рода *Salvelinus*

Вид	Инtron C GH1
<i>S. alpinus</i>	GTGGTTTGTCTACGTCTACATTCTCAG
<i>S. leucomaenis</i>	GTGGTTTGTCTACGTCTACATTCTCAG
<i>S. fontinalis</i>	GTGGTTTGTCTATGTCTACATTCTCAG
<i>S. namaycush</i>	GTGGTTTGTCTACGTCTACATTCTCAG
<i>S. curilus</i>	GTGGTTTGTCTAC-----ATTCTCAG
<i>S. malma</i>	GTGGTTTGTCTACGTCTACATTCTCAG
<i>S. taranetzi</i>	GTGGTTTGTCTACGTCTACATTCTCAG
<i>S. levanidovi</i>	GTGGTTTGTCTACGTCTACATTCTCAG

Таблица 3.10

Отличающиеся участки в интроне D гена GH1 гольцов рода *Salvelinus*

Вид	Инtron D GH1
<i>S. leucomaenis</i>	TTGGGGTTTACAGTGACATGACAGTGACATGAAAGGGAAA
<i>S. alpinus</i>	TTGGGGTTT-----ACAGTGACATGAAAGGGAAA
<i>S. fontinalis</i>	TTGGGGTTT-----ACAGTGACATGAAAGGGAAA
<i>S. namaycush</i>	TTGGGGTTT-----ACAGTGACATGAAAGGGAAA
<i>S. curilus</i>	TTGGGGTTT-----ACAGTGACATGAAAGGGAAA
<i>S. malma</i>	TTGGGGTTT-----ACAGTGACATGAAAGGGAAA
<i>S. taranetzi</i>	TTGGGGTTT-----ACAGTGACATGAAAGGGAAA
<i>S. levanidovi</i>	TTGGGGTTT-----ACAGTGACATGAAAGGGAAA

При сравнении последовательностей интронов гена GH2 у *S. leucomaenis* в третьем интроне обнаружена делеция размером 167 п.н., которая также имеется у *O. nerka*, *O. tshawytscha*, *S. salar*. В четвёртом интроне гена GH2 *S. levanidovi* выявлен участок, отличающийся от остальных исследованных нами трёх видов (табл. 3.11). Этот участок также присутствует у трёх американских гольцов, *S. namaycush*, *S. leucomaenis*, *S. fontinalis*, а в гене *S. alpinus* идентичен *S. curilus*, *S. malma*, *S. taranetzi*. Данный участок также обнаружен в гене GH2 *O. tshawytscha* и *S. salar*, но

отсутствует у *O. nerka* в результате протяжённой делеции в этой области. В четвёртом интроне азиатских видов гольцов, а также у *S. alpinus* и *S. namaycush* выявлена делеция размером 6 п.н. – AGATAT, по сравнению с *S. leucomaenis* и *S. fontinalis*. В генах нерки, чавычи и атлантического лосося данная делеция не обнаружена.

Таблица 3.11

Отличающиеся участки в интроне D гена GH2 гольцов рода *Salvelinus*

Вид	Инtron D GH2
<i>S. leucomaenis</i>	CTAGTTAGAAA-----GCATA—GTGTAGGA
<i>S. fontinalis</i>	CTAGTTAGAAA-----GCATA—GTGTGGGA
<i>S. namaycush</i>	CTAGTTAGAAA-----GCATA—GTGTAGGA
<i>S. levanidovi</i>	CTAGTTAGAAA-----GCATA—GTGTAGGA
<i>S. alpinus</i>	TAACTAGGAAAAGAGGCAGACGTGTAGGA
<i>S. curilus</i>	TAACTAGGAAAAGAGGCAGACGTGTAGGA
<i>S. malma</i>	TAACTAGGAAAAGAGGCAGACGTGTAGGA
<i>S. taranetzi</i>	TAACTAGGAAAAGAGGCAGACGTGTAGGA

При анализе интронных участков генов GH гольцов обнаружены элементы ответа, ранее выявленные в генах GH других видов лососёвых (Bernardini et al., 1999, Phillips et al., 2004, Von Schalburg et al., 2008). Так, в четвёртом интроне (D) генов GH у всех видов гольцов обнаружен элемент CRE. Этот элемент ответственен за связывание с цАМФ-зависимым транскрипционным фактором (CREB) и может участвовать в регуляции транскрипции (Montminy et al., 1990). В гене GH1 гольцов CRE-элемент представлен палиндромной последовательностью (ACTGCAGT). Элемент CRE в гене GH2 отличается от последовательности гена GH1 одной нуклеотидной заменой (рис. 3.2, табл. 4.5).

В интроне C генов GH гольцов обнаружен эстроген-чувствительный элемент (ERE) (Driscoll et al., 1998) (рис. 3.2). Элемент ERE – это инвертированный палиндромный повтор, GGTCAnnnTGACC, связываясь с

которым рецепторы эстрогенов активируют транскрипцию соответствующих генов (Klein-Hitpass et al., 1988). При сравнении последовательностей ERE восьми видов гольцов выявлено по одной нуклеотидной замене в каждом гене. В гене GH1 замена обнаружена в последовательности ERE *S. malma* и *S. curilus*, в гене GH2 у *S. leucomaenis* и *S. fontinalis*. (табл. 4.2). Последовательность ERE-элемента у остальных видов гольцов (*S. alpinus*, *S. namaycush*, *S. taranetzi*, *S. levanidovi*) идентична в каждом гене. Два гена GH отличаются одним нуклеотидом (рис. 3.2, табл. 4.2).

Также в интроне С обнаружены консенсусные последовательности сайтов связывания гипофиз-специфичного транскрипционного фактора Pit-1 (A/T₃NCAT), входящие в состав двух АТ-богатых областей интрона С и ранее выявленные в гене GH2 микижи (Bernardini et al., 1999). В гене GH2 гольцов последовательность Pit-1-связывающего сайта первой области содержит одну нуклеотидную замену по сравнению с *O. mykiss*. Исключение составляет *S. leucomaenis*, у которого в данном сайте обнаружено 2 нуклеотидные замены (табл. 4.3). Последовательность первого сайта Pit-1 второй области идентична последовательности *O. mykiss*, за исключением *S. fontinalis* и *S. leucomaenis*, сайт Pit-1 которых содержит по одной нуклеотидной замене по сравнению с *O. mykiss*. Последовательность второго сайта Pit-1 идентична у всех видов гольцов, и отличается от *O. mykiss* одной нуклеотидной заменой и делецией одного нуклеотида (табл. 4.3).

Последовательность Pit-1-связывающего сайта первой области гена GH1 гольцов консервативна у всех видов и идентична последовательности сайта гена GH2 гольцов (табл. 4.4). Первый сайт Pit-1 второй области гена GH1 гольцов значительно отличается от гена GH2 и обнаруживает консервативность только в центральной своей части. Второй сайт Pit-1 консервативен у всех видов гольцов и идентичен аналогичной последовательности гена GH2 (табл. 4.4).

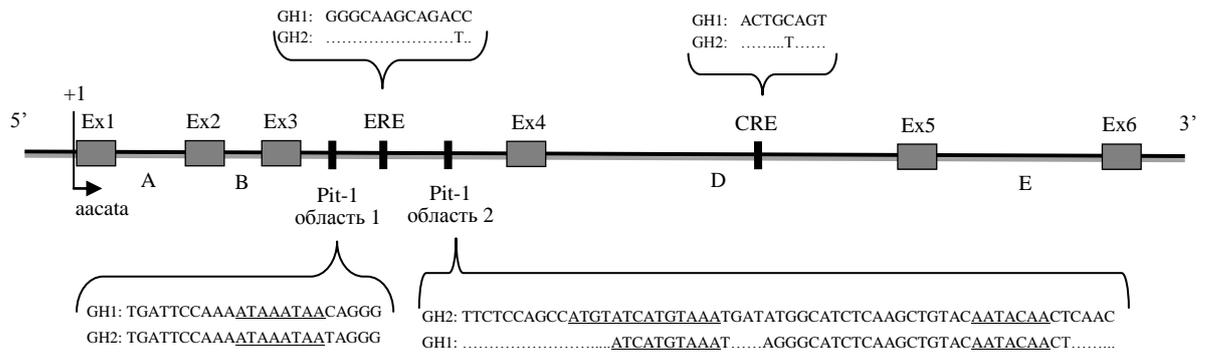


Рис. 3.2. Схема расположения регуляторных элементов в интронах генов GH рыб семейства Salmonidae. Последовательности элементов указаны для *S. levanidovi*. Сайты связывания Pit-1 подчеркнуты.

3.2. Дивергенция кодирующих и некодирующих последовательностей генов GH гольцов рода *Salvelinus* и других лососёвых рыб

3.2.1 Дивергенция экзонов в генах-паралогах

В качестве внешней группы в филогенетическом анализе кодирующих последовательностей была использована последовательность гена гормона роста *Esox lucius*, поскольку предполагается, что щуковые (Esociformes) являются предковой группой для лососевых рыб (Ramsden et al., 2003; Osinov, Lebedev, 2004; Campbell et al., 2013). После выравнивания экзонов генов GH1 и GH2, в том числе экзонов генов-паралогов других представителей семейства лососевых (нерки, чавычи, микижи, атлантического лосося, кумжи), длина исследуемой последовательности составила 639 п.н., из которых 126 вариабельные и 52 филогенетически информативные. По данным нуклеотидных последовательностей экзонов GH генов были рассчитаны генетические дистанции (табл. 3.12). Средняя величина различий между кодирующими последовательностями паралогов у лососевых рыб составила 4,8% нуклеотидных замен, внутри видов рода *Salvelinus* 4,4%.

Таблица 3.12

p-дистанции между экзонами генов GH1 и GH2, %

	Вид	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	<i>S. curilus</i> gh1																		
2	<i>S. malma</i> gh1	0,00																	
3	<i>S. taranetzi</i> gh1	0,16	0,16																
4	<i>S. levanidovi</i> gh1	0,16	0,16	0,32															
5	<i>S. salar</i> gh1	2,37	2,37	2,53	2,53														
6	<i>S. trutta</i> gh1	2,84	2,84	3,00	3,00	2,69													
7	<i>O. nerka</i> gh1	3,63	3,63	3,79	3,79	3,48	1,11												
8	<i>O.tshawytschagh1</i>	3,32	3,32	3,48	3,48	3,16	0,79	1,11											
9	<i>O. mykiss</i> gh1	2,84	2,84	3,00	3,00	2,69	0,00	1,11	0,79										
10	<i>S. curilus</i> gh2	4,42	4,42	4,58	4,58	4,74	6,16	6,79	6,48	6,16									
11	<i>S. malma</i> gh2	4,42	4,42	4,58	4,58	4,74	6,16	6,79	6,48	6,16	0,00								
12	<i>S. taranetzi</i> gh2	4,27	4,27	4,42	4,42	4,90	6,00	6,64	6,32	6,00	0,47	0,47							
13	<i>S. levanidovi</i> gh2	4,27	4,27	4,42	4,42	4,27	5,37	6,00	5,37	5,37	1,11	1,11	1,26						
14	<i>S. salar</i> gh2	4,58	4,58	4,74	4,74	3,79	4,90	5,37	5,21	4,90	3,32	3,32	3,48	2,69					
15	<i>S. trutta</i> gh2	4,11	4,11	4,27	4,27	3,16	3,79	4,42	4,11	3,79	3,95	3,95	4,11	3,16	2,69				
16	<i>O. nerka</i> gh2	5,06	5,06	5,21	5,21	4,11	4,74	5,37	4,90	4,74	4,11	4,11	4,27	3,32	3,00	1,58			
17	<i>O.tshawytschagh2</i>	4,90	4,90	5,06	5,06	3,95	4,58	5,21	4,90	4,58	4,27	4,27	4,42	3,48	2,84	1,42	1,74		
18	<i>O. mykiss</i> gh2	4,11	4,11	4,27	4,27	3,16	3,79	4,42	4,11	3,79	4,11	4,11	4,27	3,32	2,84	0,63	1,90	1,74	
19	<i>E. lucius</i> gh	12,82	12,82	12,98	12,98	12,98	13,62	14,10	13,46	13,62	12,66	12,66	12,98	12,18	13,14	12,82	13,30	13,30	12,66

При анализе различными методами были получены сходные топологии филогенетических деревьев (рис. 3.3, 3.4, 3.5). Как видно, последовательности каждого из генов с высокой поддержкой объединяются в отдельные кластеры. При этом топологии обеих клад в целом согласуются друг с другом, хотя по некоторым ветвям обнаруживаются различия.

Последовательности генов видов родов *Salvelinus* и *Oncorhynchus* формируют отдельные субкластеры, в то время как последовательности генов видов рода *Salmo* не образуют такого субкластера. Только в случае гена GH1 *S. salar* формирует отдельный субкластер, а *S. trutta* находится в субкластере с видами рода *Oncorhynchus*. В случае гена GH2 *S. trutta* также находится в субкластере с тихоокеанскими лососями, а *S. salar* группируется с гольцами рода *Salvelinus*. Во всех случаях бутстреп поддержка этих положений велика, от 0,94 до 1,00.

Филогенетические деревья, основанные на аминокислотных последовательностях, приведены на рисунках 3.6 и 3.7. Ветви поддерживаются слабо, что очевидно обусловлено небольшим числом информативных признаков. Тем не менее, положение видов рода *Salmo* на филограмме, как и в случае с экзонными последовательностями (рис. 3.3, 3.4, 3.5), противоречиво. Наиболее вероятной причиной несоответствия могут быть различные формы отбора.

Присутствие отбора было проанализировано путём проверки нулевой гипотезы ($H_0: dN = dS$) против трёх альтернативных гипотез (H_1): 1) тест на наличие отбора ($dN \neq dS$), 2) положительный отбор ($dN > dS$), 3) отрицательный отбор ($dN < dS$), используя Z-тест. Определение вида отбора произведено с помощью дифференции несинонимичной и синонимичной дистанций ($Dd = dN - dS$).

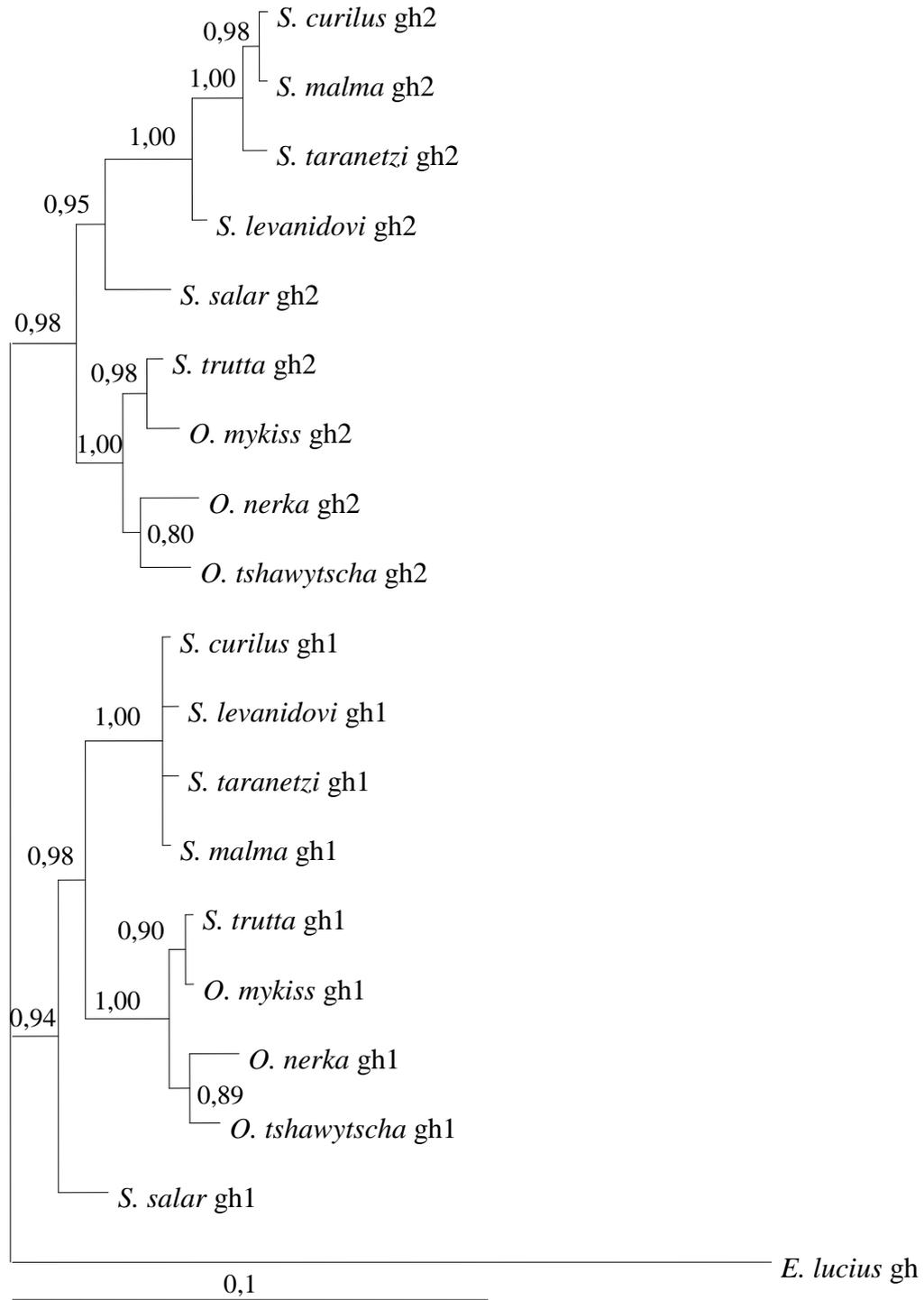


Рис. 3.3. Филогенетическое дерево, реконструированное по данным экзонов генов GH1 и GH2 с помощью байесового моделирования.

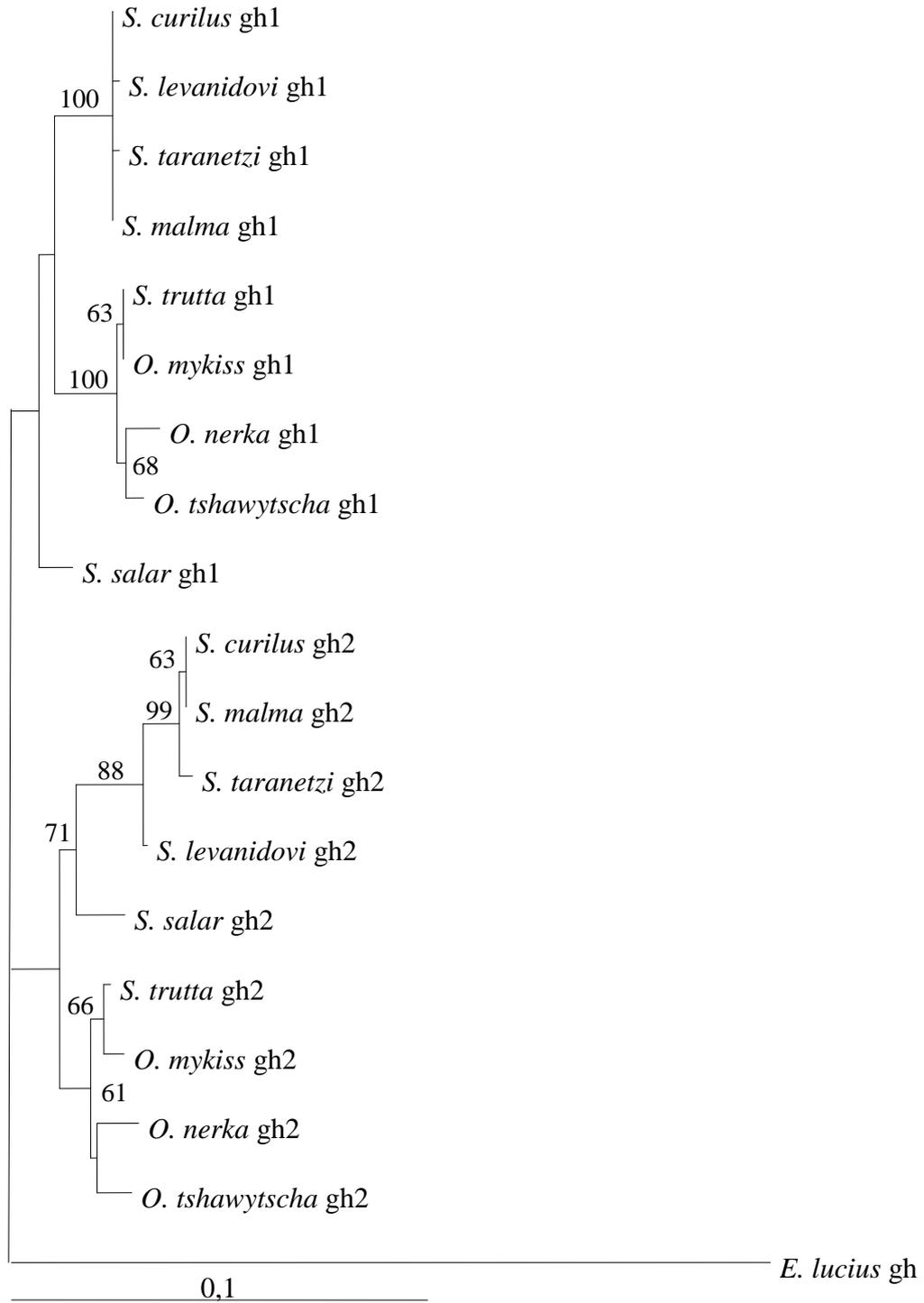


Рис. 3.4. Филогенетическое дерево, реконструированное по данным экзонов генов GH1 и GH2 методом максимального правдоподобия.

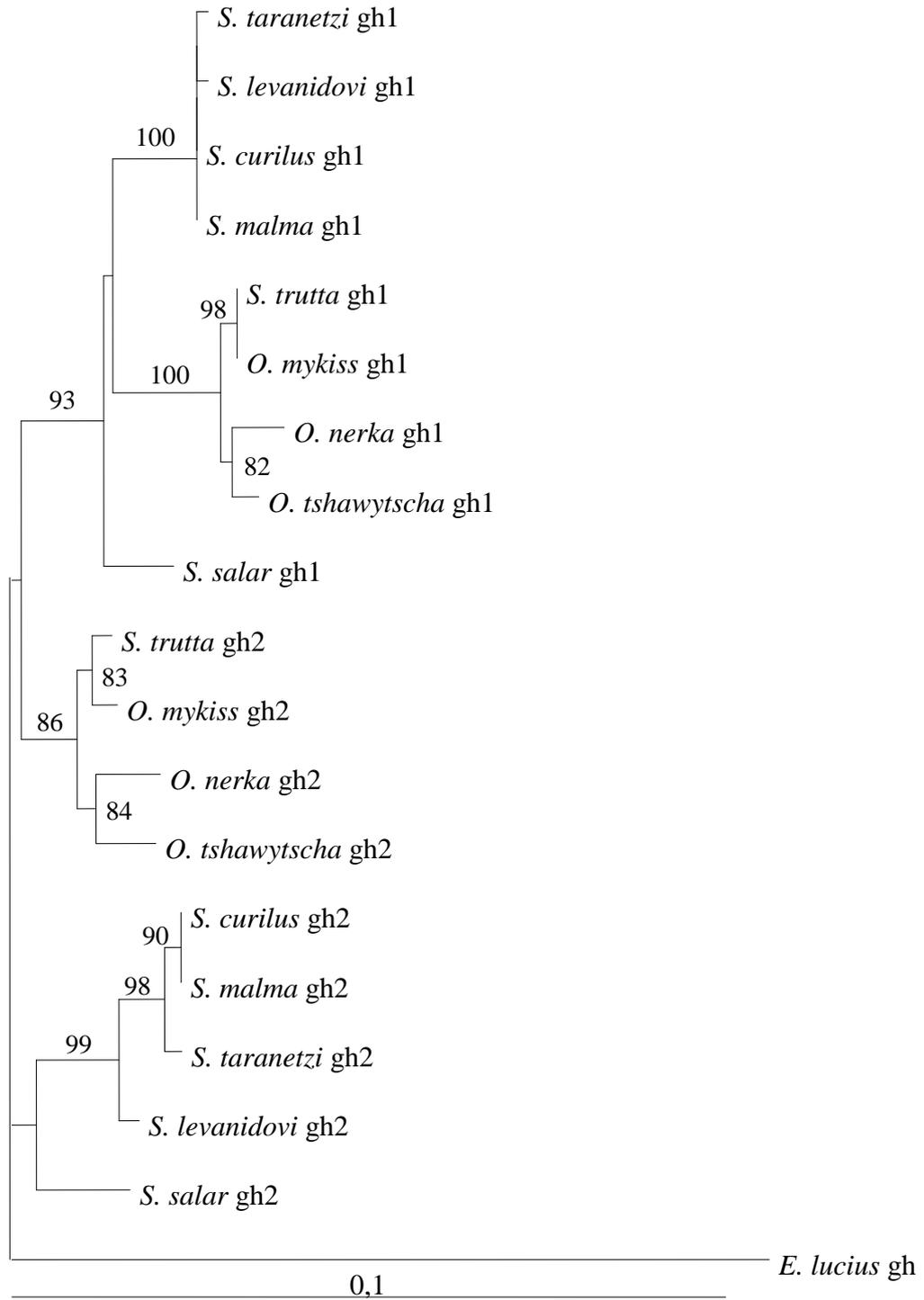


Рис. 3.5. Филогенетическое дерево, реконструированное по данным экзонов генов GH1 и GH2 с помощью метода объединения соседей.

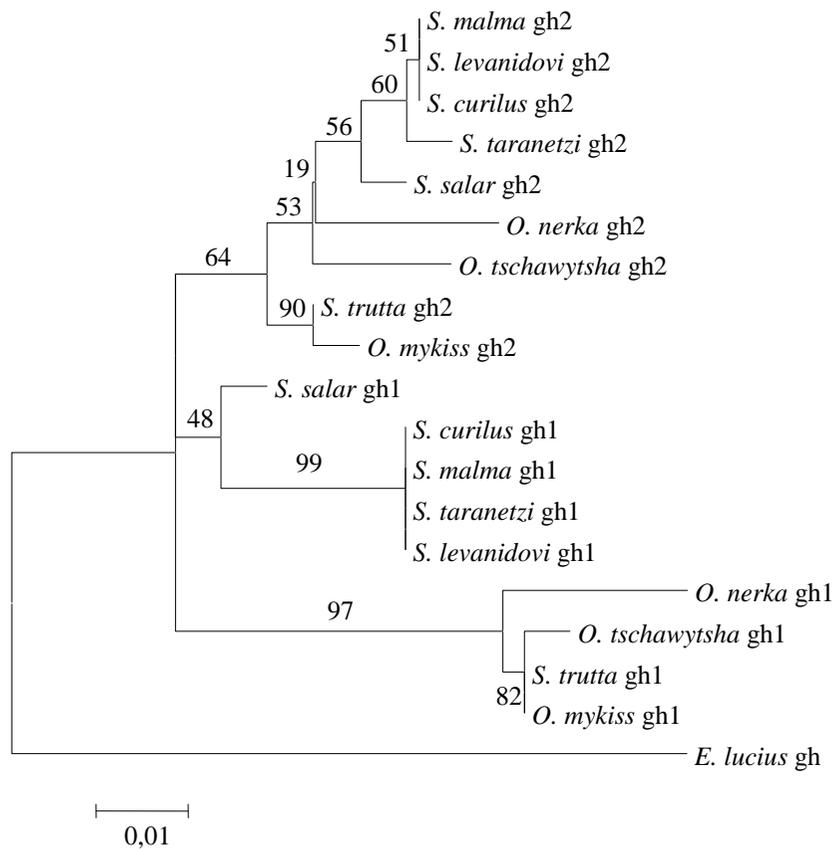


Рис. 3.6. Филогенетическое дерево, реконструированное на основе аминокислотных последовательностей генов GH1 и GH2 методом максимального правдоподобия.

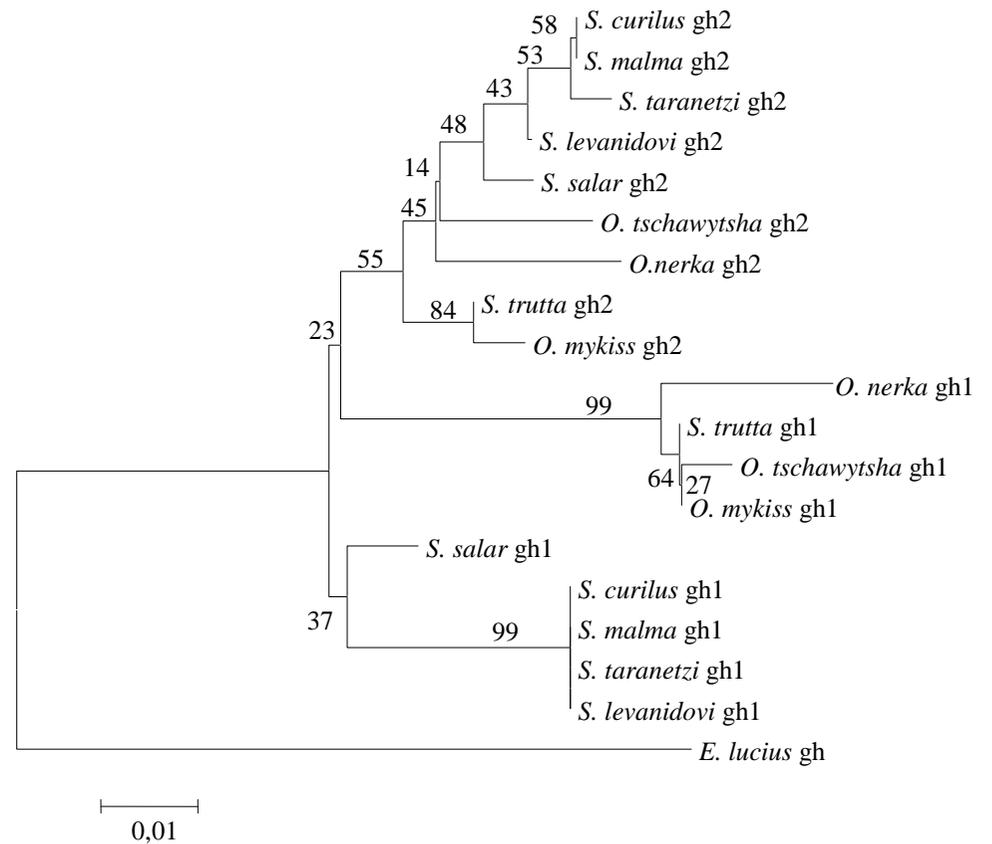


Рис. 3.7. Филогенетическое дерево, реконструированное на основе аминокислотных последовательностей генов GH1 и GH2 методом объединения соседей.

Для генов GH1 и GH2 получены отрицательные значения дифференции дистанций ($dN - dS$) (табл. 3.13), что позволяет предположить очищающий отбор. Для определения статистической достоверности этого предположения был проведён Z-тест. В тесте на наличие отбора ($dN \neq dS$) и тесте на очищающий отбор ($dN < dS$) получены значения вероятности (p) меньше 0,05 (табл. 3.13). Следовательно, нулевая гипотеза ($dN = dS$) отклоняется в пользу альтернативной гипотезы отрицательного отбора. Таким образом, эволюция GH1 и GH2 происходила в режиме очищающего отбора.

Таблица 3.13

Средние значения синонимичных и несинонимичных дистанций, дифференций дистанций, вероятностей отклонения нулевой гипотезы в пользу альтернативных (p) по результатам Z-теста для генов GH1 и GH2 лососёвых рыб

	GH1	GH2
dN	0,0158 ± 0,0036	0,0095 ± 0,0027
dS	0,0434 ± 0,0105	0,0900 ± 0,0161
Dd ($dN - dS$)	-0,0276 ± 0,0109	-0,0804 ± 0,0161
p ($dN \neq dS$)	0,0201	0,0000027
p ($dN > dS$)	1,0000	1,0000
p ($dN < dS$)	0,0073	0,0000016

Примечание. Значения $p < 0,05$ считать значимыми.

Результаты NuPhy анализа кодирующих последовательностей генов GH1 и GH2 представлены в таблицах 3,14 и 3,15 соответственно. Средняя величина ω , оцененная методом SLAC, составила 0,255 для GH1 и 0,149 для GH2. Ни один из использованных методов (SLAC, FEL, REL) не выявил сайтов, находящихся под положительным отбором. В гене GH1 количество кодонов, находящихся под действием отрицательного отбора, составило 4 и 12 для SLAC и FEL соответственно. Метод REL все кодоны распознал как находящиеся под очищающим отбором. Четыре сайта (16-Phe, 18-Ser, 95-His,

121-Asn) идентифицированные SLAC, также выявлены методом FEL (табл. 3.14). Это говорит о том, что эти сайты находятся под очищающим отбором с очень большой вероятностью.

Таблица 3.14

Суммарный результат HyPhy анализа кодирующих последовательностей генов GH1 лососёвых рыб

Кодон	SLAC		FEL		REL	
	dN – dS	p	dN – dS	p	dN – dS	Байесовский фактор
16	-82,739	0,098	-379,327	0,039	-0,746	0,000
18	-82,739	0,098	-276,193	0,050	-0,746	0,000
34	-73,716	0,187	-2352,750	0,056	-0,746	0,000
45	-71,026	0,127	-348,762	0,046	-0,746	0,000
64	-64,656	0,139	-173108,000	0,003	-0,746	0,000
95	-82,739	0,098	-284,269	0,053	-0,746	0,000
96	-37,324	0,218	-848,547	0,026	-0,746	0,000
121	-82,739	0,098	-3383,410	0,002	-0,746	0,000
157	-55,947	0,251	-3621,570	0,039	-0,746	0,000
170	-24,407	0,333	-209,308	0,087	-0,746	0,000
178	-82,739	0,129	-996,858	0,016	-0,746	0,000
182	-24,407	0,333	-166,707	0,096	-0,746	0,000

Примечания: Статистически значимые величины выделены жирным шрифтом. Положения кодонов указаны для полной аминокислотной последовательности, включая сигнальный пептид. Метод REL идентифицировал все кодоны, как находящиеся под отрицательным отбором.

В гене GH2 количество кодонов, находящихся под действием отрицательного отбора, составило 1, 17 и 30 для SLAC, FEL и REL соответственно. Один сайт (179-Glu) обнаруженный методом SLAC, также выявлен двумя другими методами. Кодоны, идентифицированные методом FEL, также выявлены методом REL (табл. 3.15).

При сравнении результатов HyPhy анализа генов GH1 и GH2 обнаружено, что четыре кодона (16-Phe, 95-His, 170-Gly, 178-Tyr), находящиеся под действием очищающего отбора в гене GH1, также выявлены в гене GH2 (табл. 3.14, 3.15).

Суммарный результат HyPhy анализа кодирующих последовательностей
генов GH2 лососёвых рыб

Кодон	SLAC		FEL		REL	
	dN – dS	p	dN – dS	p	dN – dS	Байесовский фактор
15	-25,436	0,235	-58,510	0,098	-2,086	12389,700
16	-25,436	0,222	-76,658	0,098	-2,084	13858,200
21	-16,909	0,333	-56,199	0,109	-2,085	18859,100
27	-14,715	0,383	-68,153	0,112	-2,083	20213,100
31	-20,263	0,278	-93,224	0,086	-2,083	14875,400
32	-33,819	0,111	-142,658	0,015	-2,085	218827000,000
38	-25,436	0,222	-76,658	0,110	-2,082	13785,000
41	-20,880	0,291	-77,446	0,127	-2,079	143578000,000
42	-11,057	0,525	-56,952	0,209	-2,079	11000,900
48	-25,436	0,222	-76,658	0,102	-2,083	13846,800
49	-25,436	0,222	-23062,000	0,014	-2,084	23665,000
73	-33,819	0,112	-107,914	0,029	-2,085	167160000,000
79	-16,909	0,333	-43,442	0,153	-2,084	16442,400
95	-17,108	0,408	-28,848	0,635	-1,957	5798,790
117	-11,174	0,504	-39,815	0,253	-2,080	15242,200
126	-16,909	0,333	-36,598	0,158	-2,085	14446,900
137	-25,436	0,222	-219,906	0,035	-2,083	20335,600
145	-18,009	0,397	-46,897	0,471	-1,960	6439,530
146	-16,909	0,333	-115,778	0,061	-2,085	23328,400
159	-16,909	0,333	-102,529	0,068	-2,084	25318,400
165	-25,436	0,249	-189,048	0,054	-2,083	25792,500
167	-25,436	0,222	-106,115	0,073	-2,083	13868,600
169	-16,909	0,333	-104,951	0,063	-2,085	23430,300
170	-16,909	0,333	-156,255	0,024	-2,085	39262,000
171	-25,436	0,222	-219,906	0,032	-2,084	20411,200
176	-18,701	0,302	-144,322	0,040	-2,085	17953,800
178	-25,436	0,249	-189,048	0,054	-2,083	25792,500
179	-46,787	0,063	-255,229	0,012	-2,084	128071000,000
198	-16,909	0,333	-36,300	0,157	-2,085	14361,100
203	-24,526	0,296	-122,102	0,140	-1,960	66334400,000

Примечания: Статистически значимые величины выделены жирным шрифтом. Положения кодонов указаны для полной аминокислотной последовательности, включая сигнальный пептид.

Результаты HyPhy анализа, проведённого на основе двух объединённых генах GH, представлены в таблице 3.16. Средняя величина ω , оцененная методом SLAC, составила 0,213. Ни один из использованных методов (SLAC, FEL, REL) не выявил сайтов, находящихся под положительным отбором. Количество кодонов, находящихся под действием очищающего отбора, составило 4, 21 и 45 для SLAC, FEL и REL соответственно. Четыре сайта (16-Phe, 73-Ser, 178-Tyr, 179-Glu) идентифицированные SLAC, также выявлены двумя другими методами (табл. 3.16).

GA-Branch анализ выявил 3 класса ω . В целом, 40% ветвей имеют $\omega=0,038$, 32% имеют $\omega=0,246$ и 28% с $\omega=0,857$ (рис. 3.8). Наименьшая величина ω (0,038) для последовательностей GH гольцов показывает, что они эволюционируют под влиянием строгого очищающего отбора (рис. 3.8). Результат GA-Branch анализа представлен в таблице 3.17.

Суммарный результат НуPhy анализа кодирующих последовательностей
двух объединённых генов GH лососёвых рыб

Кодон	SLAC		FEL		REL	
	dN – dS	p	dN – dS	p	dN – dS	Байесовский фактор
15	-13,365	0,224	-15,588	0,109	-1,596	5075,350
16	-26,729	0,044	-43,885	0,020	-1,581	12048100,000
18	-9,223	0,389	-8,007	0,567	-0,858	1021,340
21	-8,399	0,333	-13,805	0,131	-1,590	10552,300
27	-7,134	0,392	-18,410	0,124	-1,573	11787,300
31	-10,280	0,272	-33,976	0,072	-1,573	6326,740
32	-16,798	0,111	-46,603	0,014	-1,590	141528000,000
34	-9,823	0,375	-49,145	0,214	-0,836	1681,470
38	-13,365	0,209	-16,956	0,135	-1,572	5789,920
41	-10,452	0,287	-20,076	0,140	-1,540	75353200,000
45	-12,415	0,237	-17,716	0,124	-1,575	5304,920
48	-13,365	0,209	-16,957	0,127	-1,577	5951,700
49	-13,365	0,209	-68,172	0,037	-1,583	13308,200
52	-4,199	0,556	-9,867	0,535	-0,849	11928,800
64	-11,811	0,249	-70,045	0,038	-1,576	15170,200
73	-25,196	0,037	-40,510	0,010	-1,588	956304000000,000
79	-8,399	0,333	-12,639	0,158	-1,580	9790,060
83	-3,424	0,602	-54,568	0,348	-0,684	71,125
95	-22,540	0,118	-26,160	0,238	-0,827	712748,000
96	-10,280	0,272	-46,714	0,054	-1,574	14633,000
99	-8,399	0,333	-16,484	0,125	-1,580	11963,300
111	-5,201	0,540	-14,583	0,232	-1,539	2448,650
117	-10,995	0,259	-22,736	0,113	-1,543	84781300,000
121	-13,365	0,209	-293,174	0,017	-1,577	16846,500
126	-8,399	0,333	-11,060	0,159	-1,589	8644,600
137	-13,365	0,209	-63,459	0,041	-1,577	7227,370
145	-9,771	0,377	-9,766	0,553	-0,840	626,620
146	-8,399	0,333	-26,429	0,073	-1,590	15180,700
147	-0,204	0,696	4,788	0,787	-0,701	9380,970
159	-8,399	0,333	-26,282	0,084	-1,580	15190,500
165	-13,365	0,239	-51,966	0,053	-1,571	18387,700
167	-13,365	0,209	-41,446	0,058	-1,577	5675,480
169	-8,399	0,333	-25,823	0,074	-1,590	15130,900
170	-16,798	0,111	-83,395	0,004	-1,590	214544000,000
171	-9,780	0,376	-63,182	0,169	-0,841	1258,900
172	-8,399	0,338	-21,974	0,088	-1,589	13551,900
176	-9,405	0,298	-37,163	0,053	-1,591	6421,590
178	-26,729	0,057	-162,882	0,003	-1,571	190385000,000
179	-23,876	0,061	-162,247	0,001	-1,581	66278500,000
180	-5,539	0,518	-15,004	0,221	-1,541	2201,830
182	-8,399	0,333	-22,064	0,086	-1,590	14105,700
189	-13,365	0,209	-20,690	0,114	-1,572	4069,780
191	-8,399	0,333	-14,652	0,154	-1,571	11013,600
198	-16,798	0,111	-30,775	0,028	-1,590	111435000,000
203	-11,894	0,311	-27,394	0,196	-0,834	6127650,000

Примечания: Статистически значимые величины выделены жирным шрифтом. Положения кодонов указаны для полной аминокислотной последовательности, включая сигнальный пептид.

Результат GA-Branch анализа

Ветвь	Среднее dN/dS	Стандартное отклонение	2,5%	Медиана	97,5%	Вероятность {dN>dS}
<i>S. curilus</i> GH2	0,051	0,080	0,025	0,038	0,228	0,000
<i>S. taranetzi</i> GH2	0,280	0,135	0,065	0,243	0,782	0,001
Node4	0,053	0,052	0,031	0,038	0,205	0,000
<i>S. levanidovi</i> GH2	0,109	0,180	0,025	0,038	0,818	0,000
Node3	0,039	0,011	0,025	0,038	0,066	0,000
<i>S. salar</i> GH2	0,043	0,031	0,025	0,038	0,080	0,000
Node2	0,386	0,244	0,082	0,261	0,919	0,006
<i>S. trutta</i> GH2	0,059	0,091	0,025	0,038	0,255	0,000
<i>O. mykiss</i> GH2	0,254	0,108	0,045	0,240	0,587	0,000
Node10	0,711	0,225	0,253	0,790	0,991	0,022
<i>O. nerka</i> GH2	0,720	0,200	0,284	0,791	0,989	0,000
<i>O. tshawytscha</i> GH2	0,638	0,232	0,240	0,752	0,917	0,000
Node13	0,186	0,266	0,025	0,040	0,918	0,005
Node9	0,039	0,016	0,025	0,038	0,066	0,000
<i>S. trutta</i> GH1	0,064	0,097	0,025	0,038	0,269	0,000
<i>O. nerka</i> GH1	0,783	0,177	0,375	0,816	1,191	0,037
<i>O. tshawytscha</i> GH1	0,274	0,134	0,046	0,242	0,747	0,000
Node20	0,048	0,065	0,025	0,038	0,208	0,000
Node18	0,786	0,167	0,401	0,816	1,156	0,036
<i>S. curilus</i> GH1	0,296	0,282	0,031	0,229	0,948	0,006
<i>S. taranetzi</i> GH1	0,061	0,092	0,025	0,038	0,291	0,000
<i>S. levanidovi</i> GH1	0,062	0,091	0,025	0,038	0,275	0,000
Node23	0,302	0,130	0,188	0,247	0,675	0,000
Node17	0,327	0,197	0,048	0,247	0,831	0,000
<i>S. salar</i> GH1	0,086	0,086	0,033	0,039	0,261	0,000
Node16	0,253	0,073	0,078	0,241	0,449	0,000

3.2.2 Дивергенция интронов в генах-паралогах

Как известно, помимо кодирующих белки нуклеотидных последовательностей (экзонов), имеются некодирующие последовательности (интроны). Предполагается и есть экспериментальные данные, что скорость накопления нуклеотидных замен в интронах существенно выше, чем в экзонах (Phillips et al., 2004), поскольку их последовательности не подвержены отбору и, таким образом, интроны в большей степени подходят для филогенетических построений. С целью проверки таких предположений мы провели филогенетический анализ интронных участков генов GH гольцов рода *Salvelinus* и других видов лососевых рыб.

Нуклеотидные последовательности всех интронов для двух генов GH известны у немногих видов лососевых рыб, поэтому для сравнения использовали доступные в базе данных GenBank/NCBI последовательности *O. nerka*, *O. tshawytscha*, *S. salar*. В качестве внешней группы были взяты последовательности интронов гена GH *C. lavaretus*. После выравнивания 5-ти объединенных интронов генов GH1 и GH2, длина исследуемой последовательности составила 3612 п.н., из которых 656 вариабельные и 343 филогенетически информативные. По данным нуклеотидных последовательностей интронов генов GH были рассчитаны генетические дистанции. Средняя величина различий между интронами паралогичных генов оказалась в 2 раза больше, чем между экзонами и составила в среднем 9,6% нуклеотидных замен для всех видов, а внутри видов рода *Salvelinus* – 9,0% (табл. 3.18).

При анализе различными методами были получены сходные топологии филогенетических деревьев (рис. 3.9, 3.10, 3.11). Аналогично тому, что наблюдается по экзонам (рис. 3.3, 3.4, 3.5), данные подтверждают давнюю независимую эволюцию генов гормона роста. Интроны каждого из генов объединяются в отдельные кластеры, и с высокой поддержкой отличаются друг от друга. Из данных также видно, что интроны видов рода *Salvelinus* и

Таблица 3.18

p-дистанции между интронами генов GH1 и GH2, %

	Вид	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	<i>S. curilus</i> gh1														
2	<i>S. malma</i> gh1	0,30													
3	<i>S. taranetzi</i> gh1	0,61	0,64												
4	<i>S. levanidovi</i> gh1	0,44	0,27	0,71											
5	<i>O. nerka</i> gh1	5,39	5,44	5,47	5,51										
6	<i>O. tshawytscha</i> gh1	5,63	5,65	5,75	5,65	2,37									
7	<i>S. salar</i> gh1	5,82	5,80	5,76	5,88	6,51	6,58								
8	<i>S. curilus</i> gh2	9,20	9,26	9,21	9,31	9,97	10,40	9,06							
9	<i>S. malma</i> gh2	9,01	9,07	9,02	9,12	9,79	10,22	9,02	0,35						
10	<i>S. taranetzi</i> gh2	8,45	8,51	8,42	8,56	9,05	9,58	8,45	1,19	1,16					
11	<i>S. levanidovi</i> gh2	9,23	9,29	9,24	9,34	9,86	10,20	8,92	1,47	1,66	2,13				
12	<i>O. nerka</i> gh2	10,66	10,78	10,67	10,83	11,04	11,30	10,44	5,27	5,45	5,34	5,20			
13	<i>O. tshawytscha</i> gh2	10,30	10,41	10,22	10,46	10,60	11,02	10,05	4,93	5,10	4,99	5,07	2,31		
14	<i>S. salar</i> gh2	8,71	8,69	8,64	8,64	9,35	9,65	8,66	3,51	3,64	3,44	3,57	4,69	4,52	
15	<i>C. lavaretus</i> gh	9,30	9,31	9,31	9,36	9,68	9,99	8,64	8,73	8,73	8,28	8,64	9,84	9,62	8,04

Oncorhynchus формируют отдельные субкластеры внутри кластеров генов-паралогов.

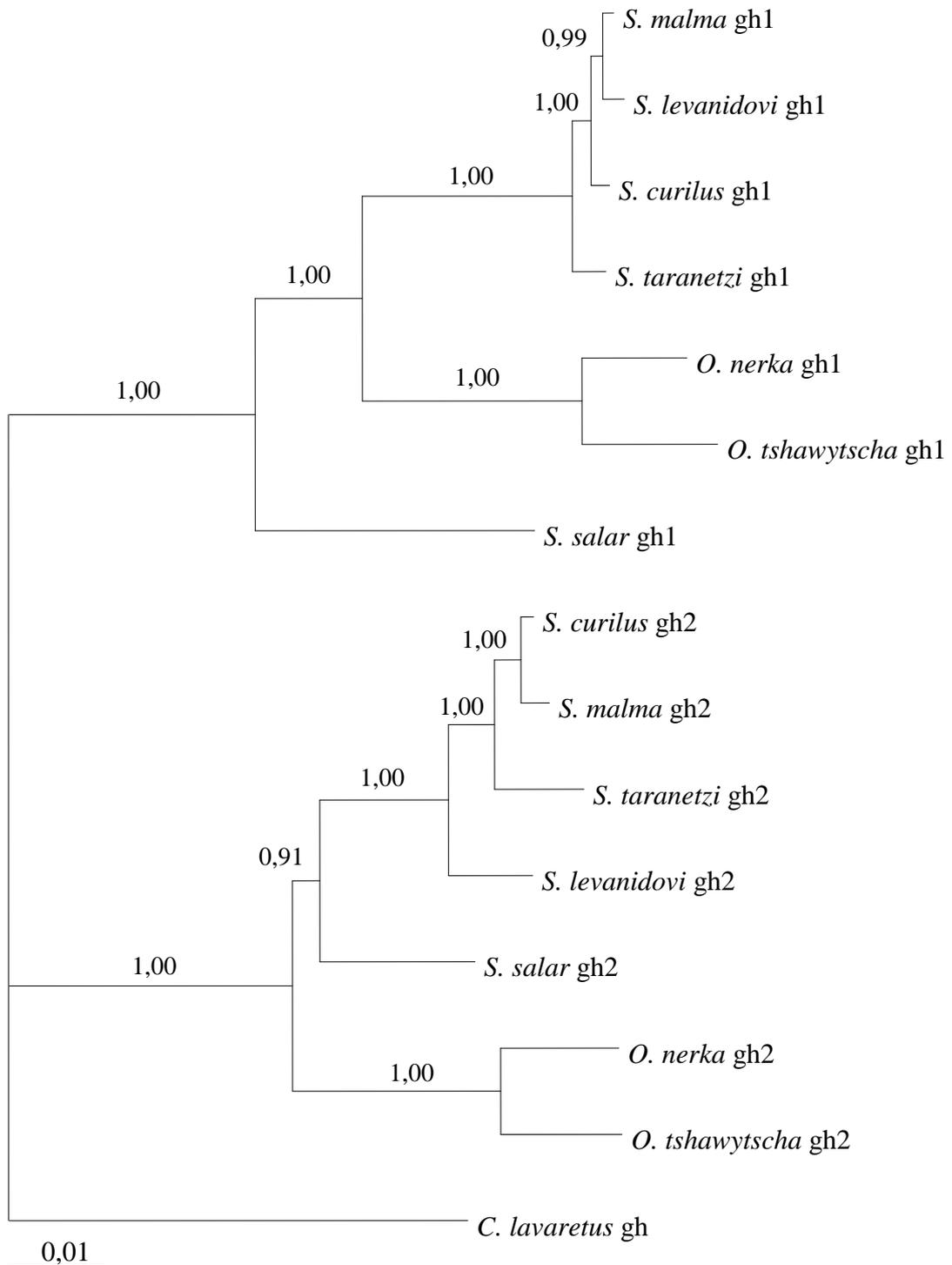


Рис. 3.9. Филогенетическое дерево, реконструированное по данным интрон-генов GH1 и GH2 с помощью байесового моделирования.

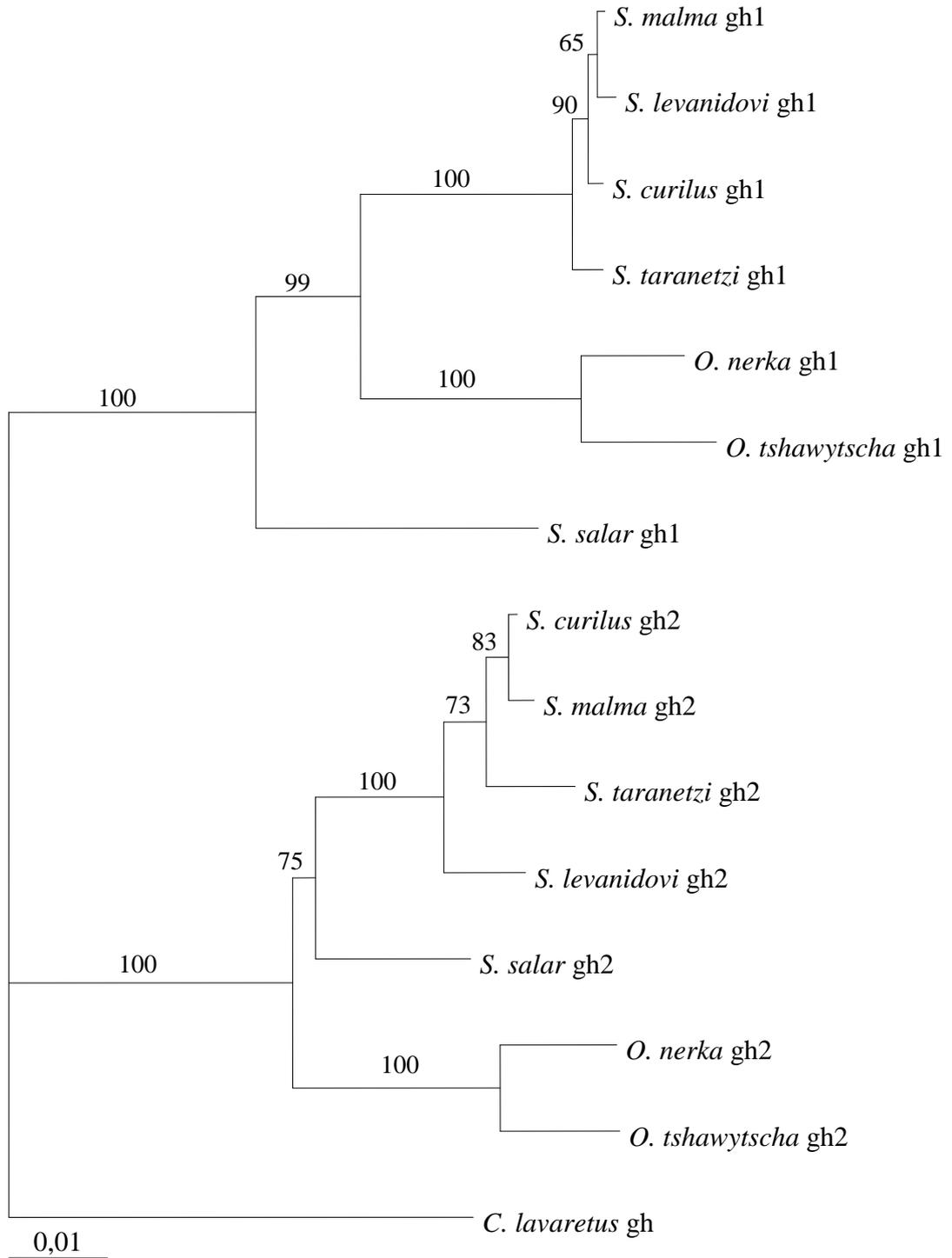


Рис. 3.10. Филогенетическое дерево, реконструированное по данным интронов генов GH1 и GH2 с помощью метода максимального правдоподобия.

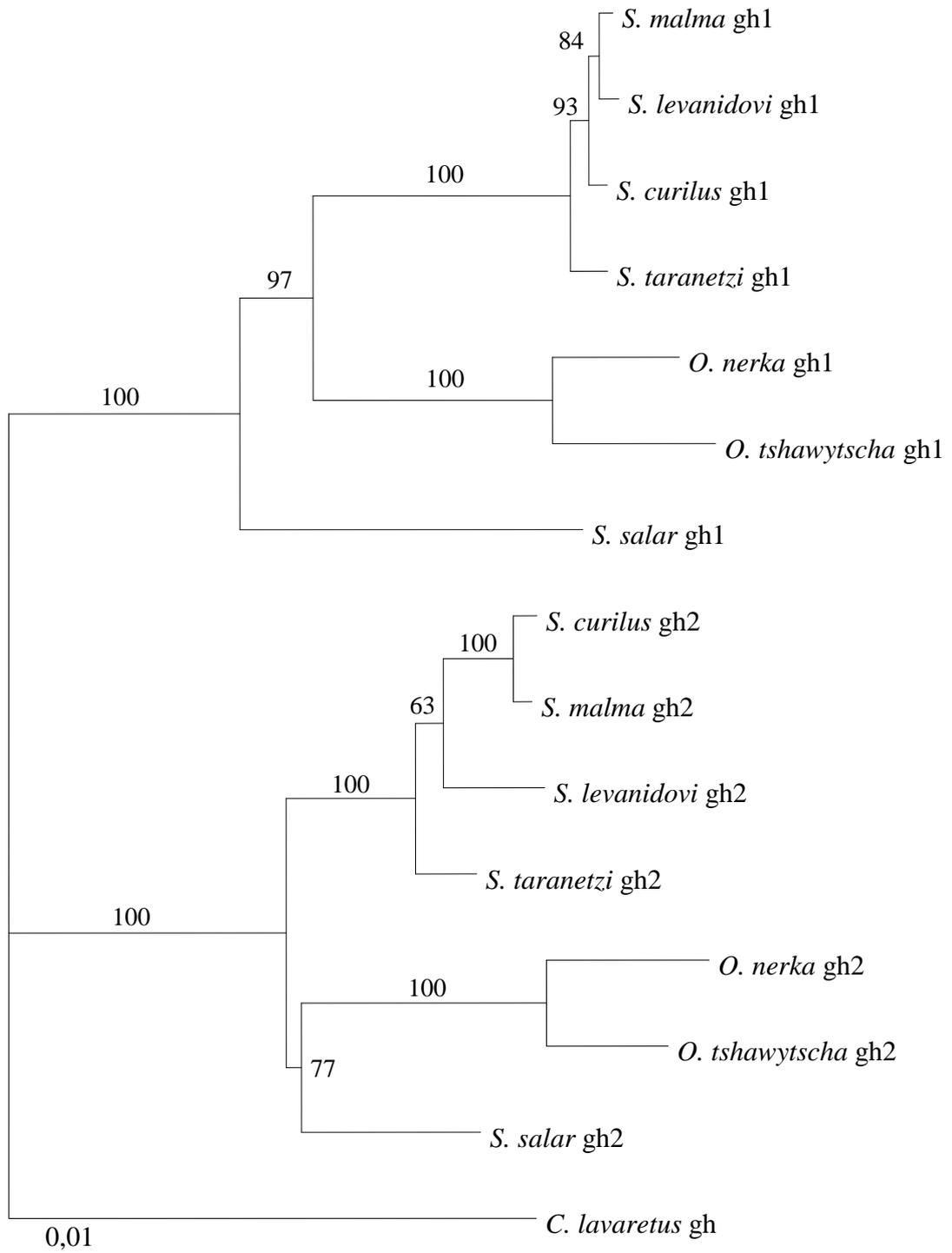


Рис. 3.11. Филогенетическое дерево, реконструированное по данным интронов генов GH1 и GH2 с помощью метода объединения соседей.

3.3. Дивергенция последовательностей интронов С и D генов GH лососёвых рыб

3.3.1. Дивергенция интронов С и D гольцов рода *Salvelinus*

Дивергенция интронов С и D гена GH1

В генетических базах данных имеется много последовательностей интронных участков С и D генов гормона роста для большинства филогенетических линий семейства Salmonidae. Представляло интерес сравнительного анализа их с целью выяснения возможных закономерностей эволюции генов. Ниже приведены результаты такого сравнения.

На первом этапе работы наши данные по последовательностям интронов С и D объединяли с последовательностями интронов С и D гольцов рода *Salvelinus* доступными в базе данных GenBank: *S. alpinus*, *S. leucomaenis*, *S. fontinalis* и *S. namaycush*. После выравнивания длина исследуемой последовательности составила 1789 п.н., из которых 53 переменные и 9 филогенетически информативные. По данным нуклеотидных последовательностей гена GH1 гольцов были рассчитаны генетические дистанции (табл. 3.19). Наиболее высокой величиной дивергенцией интронов внутри рода характеризовались *S. fontinalis* и *S. alpinus* (1,37%), наименьшей – *S. malma* и *S. levanidovi*, *S. malma* и *S. curilus* (0,34%).

Таблица 3.19

p-дистанции между интронами гена GH1 гольцов рода *Salvelinus*, %

	Вид	1	2	3	4	5	6	7
1	<i>S. alpinus</i>							
2	<i>S. leucomaenis</i>	0,92						
3	<i>S. fontinalis</i>	1,37	1,26					
4	<i>S. namaycush</i>	0,80	0,92	1,14				
5	<i>S. curilus</i>	0,92	0,69	1,26	0,92			
6	<i>S. malma</i>	0,80	0,69	1,14	0,80	0,34		
7	<i>S. taranetzi</i>	1,09	0,86	1,32	1,09	0,63	0,63	
8	<i>S. levanidovi</i>	0,69	0,69	1,14	0,69	0,46	0,34	0,63

При филогенетическом анализе различными методами были получены сходные топологии филогенетических деревьев. Филогенетическое дерево по интронам гена GH1, построенное с использованием дистантного метода NJ приведено на рис. 3.12. Как видно, последовательности генов у видов рода *Salvelinus* формируют две клады. Одна из них объединяет *S. alpinus* (практически циркумполярный вид) и *S. namaycush* (североамериканский вид), вторая – четырёх видов гольцов азиатского побережья. Кунджа, *S. leucomaenis*, занимает базальное положение в кладе, *S. fontinalis* формирует независимую ветвь. В кладе азиатских гольцов наиболее удаленным являются последовательности интронов гольца Леванидова (*S. levanidovi*) и гольца Таранца (*S. taranetzi*), *S. malma* и *S. curilus* определяются как самые молодые и близкие виды. Низкий уровень поддержки ветвей обусловлен невысоким уровнем дивергенции (табл. 3.19) и небольшим числом информативных сайтов (синапоморфий).

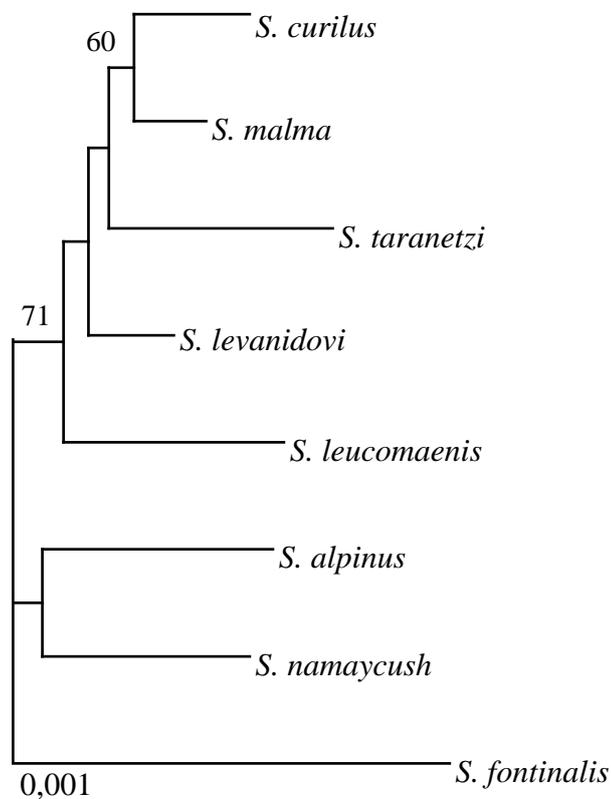


Рис. 3.12. Филогенетическое дерево, реконструированное по данным интронов С и D гена GH1 гольцов с помощью метода объединения соседей.

Дивергенция интронов С и D гена GH2 гольцов

После объединения последовательностей интронов С и D гена GH2, длина исследуемой последовательности составила 1811 п.н., из которых 124 были вариабельными и 25 филогенетически информативными. По данным нуклеотидных последовательностей гена GH2 гольцов были рассчитаны генетические дистанции (табл. 3.20). Наиболее высокой дивергенцией внутри рода характеризуются *S. leucomaenis* и *S. taranetzi* (3,66%), наименьшей – *S. alpinus* и *S. curilus* (0,37%).

Таблица 3.20

p-дистанции между интронами гена GH2 гольцов рода *Salvelinus*, %

	Вид	1	2	3	4	5	6	7
1	<i>S. alpinus</i>							
2	<i>S. leucomaenis</i>	2,86						
3	<i>S. fontinalis</i>	3,10	3,60					
4	<i>S. namaycush</i>	1,86	2,98	2,98				
5	<i>S. curilus</i>	0,37	2,73	2,86	1,61			
6	<i>S. malma.</i>	0,68	3,04	3,17	1,92	0,43		
7	<i>S. taranetzi</i>	1,55	3,66	3,54	2,42	1,30	1,37	
8	<i>S. levanidovi</i>	1,49	2,61	2,67	1,49	1,24	1,55	2,17

Филогенетическое дерево, построенное с использованием метода NJ, приведено на рис. 3.13. В этом случае интроны гена GH2 трех видов азиатских гольцов *S. curilus*, *S. malma* и *S. taranetzi* объединяются с *S. alpinus* в одну кладу. Интроны GH2 *S. levanidovi* ближе к последовательностям американских видов гольцов. Последовательности *S. leucomaenis* занимают базальное положение в дереве.

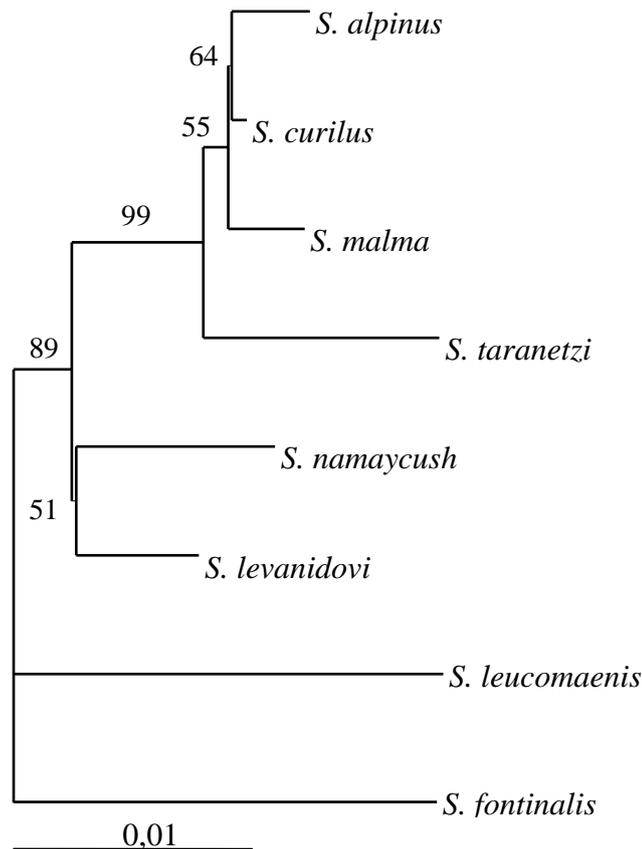


Рис. 3.13. Филогенетическое дерево, реконструированное по данным интронов С и D гена GH2 гольцов с помощью метода объединения соседей.

Дивергенция по интронам С и D двух генов GH

При объединении последовательностей интронов С и D генов GH1 и GH2, длина исследуемой последовательности составила 3600 п.н., из которых 177 были вариабельные и 34 филогенетически информативные. Филогенетическое дерево по интронам двух генов, построенное с использованием Байесовского метода, приведено на рис. 3.14. Согласно филограмме первый этап дивергенции последовательностей интронов связан с отделением *S. fontinalis* и *S. leucomaenis*, в кластере других видов последовательно дивергируют интроны *S. namaycush*, *S. levanidovi*, *S. taranetzi*. Последовательности *S. curilus* и *S. malma* определяются как сестринские, самые молодые виды и близкие к арктическому гольцу *S. alpinus*.

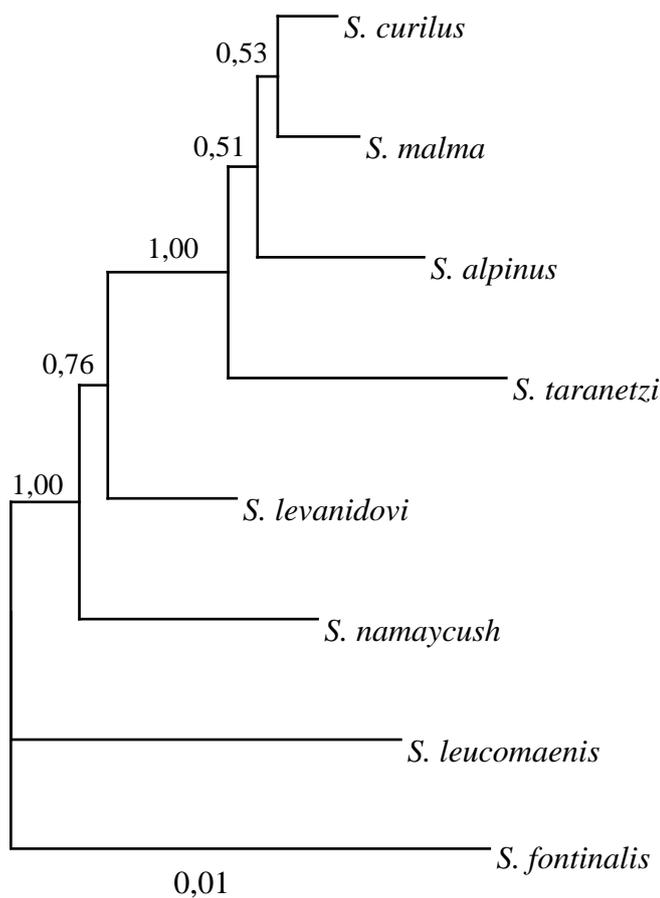


Рис. 3.14. Филогенетическое дерево, реконструированное по данным интронов С и D двух генов GH гольцов с помощью байесовского моделирования.

3.3.2. Дивергенция интронов С и D паралогичных генов гормона роста лососевых рыб

В анализе использовались данные по последовательностям интронов С и D большинства линий Salmonidae. Также, как и в предыдущем случае последовательности интронов С и D объединяли при анализе каждого гена. По данным нуклеотидных последовательностей были рассчитаны генетические дистанции (Приложение).

При филогенетическом анализе различными методами были получены сходные топологии филогенетических деревьев. В качестве внешней группы были использованы гомологичные участки гена GH1 ленка *Brachymistax lenok*, одного из рано дивергировавших видов лососевых рыб. На рисунке

3.15 приведено филогенетическое древо интронов, полученное с использованием VI-метода построения деревьев. Также как и в предыдущих случаях, интронные участки формируют два независимых кластера, соответствующих двум генам-паралогам. Внутри каждого кластера эволюция интронных участков обоих генов в значительной степени согласуется с филогенетическими схемами эволюции в этой группе видов. Отчетливо формируются в случае интронов обоих генов субкластеры, объединяющие виды *Oncorhynchus*, *Salvelinus*, *Salmo* (рис. 3.15).

В то же время, очевидно, что положение некоторых видов по разным генам в филогенетической схеме отличается. В частности, наиболее существенные различия касаются положения сахалинского тайменя *Parahucho perryi* и гольца *S. alpinus* (рис. 3.15). В случае гена GH1, *S. alpinus* объединяется с *S. namaycush*, а гена GH2 - с двумя видами мальмы. *P. perryi* объединяется с *H. hucho* в случае гена GH1, а в случае гена GH2 кластеризуется с гольцами (рис. 3.15).

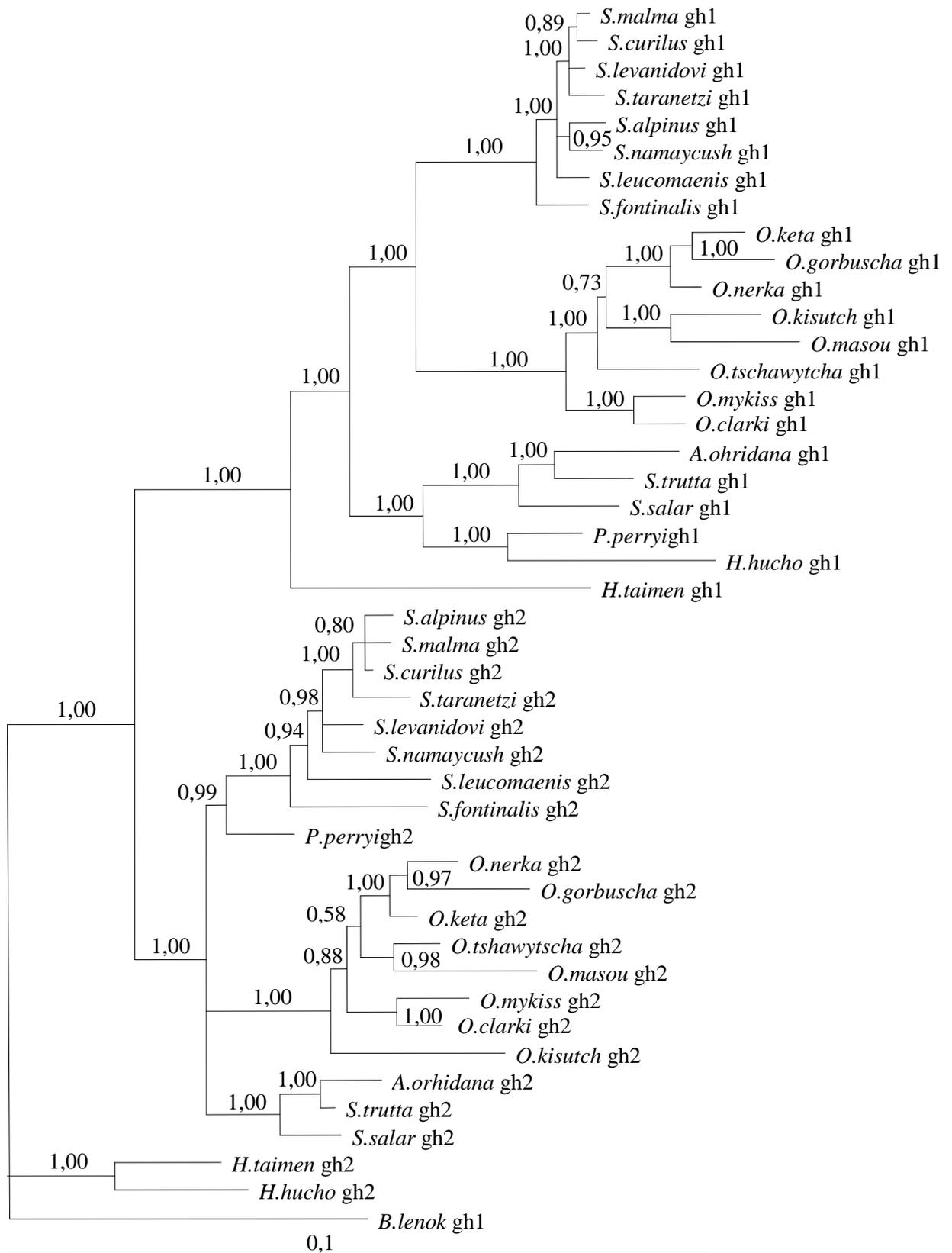


Рис. 3.15. Филогенетическое дерево, реконструированное по данным интронов С и D двух генов GH лососевых рыб с помощью байесовского моделирования.

ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Структура генов

Сравнение паралогичных генов показало, что оба гена GH гольцов содержат 6 экзонов и 5 интронов. Все интрон-экзонные границы фланкированы соответствующими консенсусными последовательностями (GT/AG).

Размер полученных последовательностей GH гольцов (~3600 и 3300 п.н. для гена GH1 и GH2 соответственно) согласуется с размером генов GH других лососёвых рыб, полная длина генов GH которых, включая 5' и 3'-области, составляет ~ 4000 п.н. (Agellon, Chen, 1986; Kawauchi et al., 1986; Agellon et al., 1988; Johansen et al., 1989; Rentier-Delrue et al., 1989; Male et al., 1992; Devlin, 1993; Du et al., 1993; Forbes et al., 1994; McKay et al., 1996). Размер последовательности каждой копии гена GH незначительно отличается между разными видами гольцов, но варьирует между GH1 и GH2. Разница в длине между копиями GH возникает за счёт разной длины интронов. Последовательность гена GH2 гольцов в среднем на 370 нуклеотидов короче последовательности гена GH1, в основном из-за существенно большего размера пятого интрона (E) гена GH1. Длина интрона E также отличается между двумя изученными генами GH тихоокеанских лососей (табл. 3.8).

Размер копий гена GH тихоокеанского и атлантического лосося к тому же варьирует за счёт разной длины третьего интрона (C), который в среднем на 300 п.н. больше в генах GH1, чем в GH2 (табл. 3.8). Различия в длине третьего интрона также отмечены у чукучановых рыб. Длина интрона C гена GH1 чукучановых варьирует от 592 до 1188 п.н., а GH2 от 311 до 320 п.н. (Bart et al., 2010). У гольцов рода *Salvelinus* разница в длине интрона C составила ~ 100 п.н.

Кодирующие области двух генов высоко консервативны. Размер экзонов идентичен в генах GH1 и GH2 у всех видов гольцов и составляет 10

п.н., 140 п.н., 117 п.н., 156 п.н., 147 п.н., 63 п.н., для 1-6 экзонов соответственно. Эта структура генов согласуется с данными других авторов для других видов лососевых рыб (Agellon, Chen, 1986; Kawauchi et al., 1986; Agellon et al., 1988; Johansen et al., 1989; Rentier-Delrue et al., 1989; Male et al., 1992; Devlin, 1993; Du et al., 1993; Forbes et al., 1994; McKay et al., 1996).

Длины экзонов генов GH лососёвых рыб сопоставимы с длиной экзонов генов GH представителей отрядов Окунеобразные (Ber, Daniel, 1992; Chen et al., 2004), Камбалообразные (Tanaka et al., 1995) и Иглобрюхообразные (Venkatesh, Brenner, 1997), ген гормона роста которых также включает 6 экзонов и 5 интронов. Так, размер экзонов большого жёлтого горбыля (*Pseudosciaenacrocea*, Perciformes) составляет 10, 134, 117, 144, 147, 63 п.н., а камбалы (*Paralichthys olivaceus*, Pleuronectiformes) – 10, 134, 117, 144, 105, 63 п.н. для 1–6 экзонов соответственно (Tanaka et al., 1995; Chen et al., 2004). Размер экзонов GH карпообразных рыб, ген гормона роста которых содержит 5 экзонов и 4 интрона, также сходен с размером экзонов генов GH лососёвых рыб. Исключение составляет пятый экзон, который в генах GH карповых рыб значительно длиннее, чем в генах GH лососёвых. Так у видов рода *Labeo* экзоны гена GH включают 10, 140, 117, 162 и 201 п.н., для 1–5 экзонов соответственно (Rajesh, Majumdar, 2007).

Сравнительный анализ последовательностей генов GH разных видов позвоночных животных показал, что длина третьего экзона консервативна между рыбами и млекопитающими и составляет 117 п.н., за исключением человека (120 п.н.); длина пятого экзона консервативна у всех видов рыб, содержащих пять интронов, и составляет 147 п.н., за исключением камбалы (105 п.н.) (Almuly et al., 2000).

Открытая рамка считывания генов GH1 и GH2 гольцов включает 630 п.н. и начинается в обоих генах стартовым кодоном ATG. Стоп-кодон отличается между генами GH1 и GH2. Открытая рамка считывания генов GH1 гольцов заканчивается стоп-кодом TAG, а генов GH2 стоп-кодом TAA. Копии генов GH других представителей лососёвых нерки (Devlin,

1993), чавычи (Du et al., 1993), атлантического лосося (Male et al., 1992) и радужной форели (Rentier-Delrue et al., 1989) также отличаются стоп-кодонами, которые представлены триплетами, характерными для гольцов.

У других видов рыб, представляющих отряды Камбалообразные (Tanaka et al., 1995; Peyush et al., 2000), Карпообразные (Chiou et al., 1990; Rajesh, Majumdar, 2007), Сомообразные (Lemaire et al., 1994), Окунеобразные (Ber, Daniel, 1992; Dong et al., 2010), а также у различных видов млекопитающих (Barta et al., 1981; Byrne et al., 1987; Vize, Wells, 1987), открытая рамка считывания начинается иницирующим кодоном ATG и заканчивается стоп-кодом TAG. У карпообразных рыб, содержащих две копии GH, к которым относится *Ictiobus bubalis* (Clements et al., 2004), представитель семейства Чукучановые, и *Carassius auratus* (Law et al., 1996) из семейства Карповые, стоп-кодон не отличается между двумя копиями GH и также представлен триплетом TAG.

Оба гена GH гольцов *Salvelinus*, как и гены GH других видов лососёвых рыб (Kawauchi et al., 1986; Rentier-Delrue et al., 1989; Devlin, 1993), кодируют последовательность белка предшественника длиной 210 аминокислотных остатков, из которых 188 аминокислот входят в состав зрелого белка и 22 аминокислоты формируют сигнальный пептид.

Зрелая белковая последовательность двух генов GH гольцов начинается с метионина, также как и у *S. salar* (Johansen et al., 1989). Первый аминокислотный остаток у *S. trutta* и видов рода *Oncorhynchus* отличается между двумя зрелыми копиями GH. Полипептидная последовательность GH1 начинается изолейцином, а GH2 – метионином (Sekine et al., 1985; Rentier-Delrue et al., 1989). У карповых рыб последовательность зрелого белка начинается с серина (Chao et al., 1989; Hong, Scharl, 1993; Clements et al., 2004; Rajesh, Majumdar, 2007), а у млекопитающих (Castro-Peralta, Barrera-Saldana, 1995; Lioupis et al., 1999; Liao et al., 2003) и птиц с фенилаланина (Buggiotti et al., 2006).

В зрелой последовательности генов GH1 и GH2 гольцов найдено четыре функционально важных остатка цистеина, положение которых совпадает в генах-паралогах у всех четырёх видов (49, 161, 178, 186). Идентичное положение цистеинов характерно для GH других представителей семейства Salmonidae (Rentier-Delrue et al., 1989).

При сравнительном анализе аминокислотных последовательностей зрелого GH гольцов с последовательностями других лососёвых рыб (*O. nerka*, *O. mykiss*, *O. tshawytscha*, *S. salar* и *S. trutta*) обнаружено, что GH1 более изменчив (16 аминокислотных замен), чем GH2 (14 аминокислотных замен). Количество нуклеотидных замен, наоборот, больше в гене GH2 (44 замен), чем в GH1 (32 замен).

Однако при сравнении последовательностей GH отдельно для видов каждого рода (*Salvelinus*, *Oncorhynchus*, *Salmo*), показано, что у видов *Salvelinus* и *Oncorhynchus* последовательность GH1 более консервативна, чем GH2. Аминокислотная последовательность GH1 у четырёх видов гольцов полностью идентична, в GH2 выявлено две аминокислотные замены. Последовательности зрелого GH у *O. nerka*, *O. mykiss*, *O. tshawytscha* содержат 4 и 9 аминокислотных замен, для GH1 и GH2 соответственно. У видов рода *Salmo*, наоборот, последовательность GH2 более консервативна, чем GH1 (9 и 3 аминокислотных замен, для GH1 и GH2 соответственно).

При сравнительном анализе аминокислотных последовательностей сигнального пептида GH гольцов с последовательностями других исследуемых видов лососёвых рыб обнаружено, что последовательность GH1 более вариабельна (2 замены), чем GH2 (1 замена). Сравнение сигнального пептида видов рода *Salvelinus*, показало, что последовательности каждой копии GH полностью идентичны. Последовательность сигнального пептида трёх видов рода *Oncorhynchus* содержит одну аминокислотную замену в каждом гене. Сигнальный пептид у видов рода *Salmo* менее консервативен в GH2, чем в GH1, несмотря на то, что последовательность зрелого белка, наоборот, более консервативна в GH2, чем в GH1. Аминокислотная

последовательность сигнального пептида GH1 двух видов рода *Salmo* оказалась полностью идентична (2 нуклеотидные замены), GH2 отличается 1 аминокислотой (3 нуклеотидных замены).

Ватахики, с коллегами (Watahiki et al., 1989), сравнивая последовательности гормона роста и плацентарного лактогена разных видов позвоночных, выделил 37 консервативных аминокислотных остатков, необходимых для функционирования GH, и входящих в состав пяти областей: GD1–GD5 (табл. 4.1). Аминокислоты, входящие в состав этих областей, также консервативны в GH1 и GH2 гольцов и других исследуемых видов лососёвых, за исключением *O. nerka*. В GD4 области GH2 нерки, аспарагиновая кислота, один из пяти консервативных аминокислотных остатков, заменена на глутаминовую кислоту (табл. 4.1). Сравнительный анализ показал, что область GD5 идентична в GH1 и GH2 сравниваемых видов лососёвых. Исключение составляет *O. mykiss*, у которого в GH2 данная область содержит одну аминокислотную замену (табл. 4.1). В состав GD5 входит наибольшее количество консервативных аминокислот (13), а также три из четырёх остатков цистеина.

На С-конце белковой последовательности GH1 и GH2 найден участок длиной 13 аминокислотных остатков (CFKKDMHKVETYL), который консервативен у всех костистых рыб и который, как предполагают, важен для взаимодействия молекулы гормона с его рецептором (Hew et al., 1989; Venkatesh, Brenner, 1997). Этот участок также присутствует у лососёвых рыб (Hew et al., 1989) и входит в состав области GD5. Сравнение последовательностей GH *O. nerka*, *O. mykiss*, *O. tshawytscha*, *S. salar* и *S. trutta* с полученными нами последовательностями гольцов показало, что положение этого участка у всех этих видов идентично – 161–173 аминокислотных остатков зрелого белка.

Таблица 4.1

Области GD1–GD5 в GH1 и GH2 лососёвых рыб

№	Вид	Ген	GD1 (6-28 а.о.)	GD2 (49-64 а.о.)	GD3 (71-89 а.о.)	GD4 (107-123 а.о.)	GD5 (158-186 а.о.)
1	<i>S. salar</i>	GH1	<u>L</u> F <u>N</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>M</u> <u>F</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>E</u>	<u>C</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u>	<u>L</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>L</u>	<u>L</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>D</u>	<u>L</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>M</u> <u>H</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>C</u>
2	<i>S. trutta</i>	S..... L V • HT.....
3	<i>O. nerka</i>	S..... L	• I V • HT.....
4	<i>O. tshawytscha</i>	S..... L V • HT.....
5	<i>O. mykiss</i>	S..... L V • HT.....
6	<i>S. curilus</i>	 HY.....T.....
7	<i>S. malma</i>	 HY.....T.....
8	<i>S. taranetzi</i>	 HY.....T.....
9	<i>S. levanidovi</i>	 HY.....T.....
10	<i>S. salar</i>	GH2 L Q
11	<i>S. trutta</i>	 L Q
12	<i>O. nerka</i>	 L Q ...	•• R E •• E
13	<i>O. tshawytscha</i>	 L Q
14	<i>O. mykiss</i>	 L QY.....
15	<i>S. curilus</i>	 L QY.....
16	<i>S. malma</i>	 L QY.....
17	<i>S. taranetzi</i>	 L QY.....T.....
18	<i>S. levanidovi</i>	 L QY.....

Примечания: Отличающиеся аминокислотные остатки выделены жирным шрифтом. Консервативные аминокислоты подчеркнуты.

Таким образом, показано, что структура генов гормона роста у гольцов рода *Salvelinus* сходна со структурой генов GH других видов лососёвых рыб. Этого следовало ожидать, исходя из важной функциональной роли гормона роста в функционировании организмов рыб. Показано, что у всех четырех видов рода *Salvelinus* имеются дублицированные гены-паралоги, как и у других исследованных видов лососевых рыб. Полученные в работе данные дают основание считать, что оба гена функциональны. В пользу этого говорят следующие факты: 1. Оба паралога консервативны в кладе гольцов; 2. Последовательности экзонов паралогов у всех видов содержат открытую рамку считывания общей длиной 630 п.н.; 3. Предсказанная аминокислотная последовательность высоко консервативна, включая положения цистеиновых остатков; 4. Последовательности обоих генов GH сходны с теми, которые выявлены у *S. salar* и *O. tshawytscha*, у которых оба гена функциональны (Von Schalburg et al., 2008); 5. Последовательности обоих генов находятся под влиянием очищающего отбора. Все же остается неизвестным, почему и для чего существуют паралогичные гены в геноме лососевых рыб.

Существующая гипотеза, согласно которой, дублицированные гены со временем в эволюции могут приобретать новые функции, подтверждается в случае многих семейств генов (Ohno, 1970). Одним из подходов для понимания закономерностей эволюции множественных генов, является сравнительный и филогенетический анализы, позволяющие оценить влияние разных факторов, включая различные формы отбора, на структуру и дивергенцию различных участков генов в процессе эволюции видов.

4.2 Дивергенция кодирующих последовательностей генов-паралогов

Полученные данные по объединению кодирующих последовательностей генов GH1 и GH2 в отдельные кластеры доказывают давнюю независимую их эволюцию и наличие двух генов гормона роста уже у предковых форм лососевых рыб.

Дивергенции таксонов, к которым относятся исследованные нами виды, основанная на морфологических и молекулярных данных представляется следующим образом: от некоей предковой формы дивергировала ветвь, приведшая к образованию рода *Salmo*, и последовательно отделились ветви, включающие роды *Salvelinus* и *Oncorhynchus* (Crete-Lafrenière et al., 2012).

В целом филогения родов *Oncorhynchus* и *Salvelinus*, полученная на основе последовательностей обоих генов GH, достаточно хорошо согласуется с филогенией этих таксонов, основанных на других подходах и признаках. В то же время положение видов рода *Salmo* на филограмме с высокой поддержкой не всегда конгруэнтно с имеющимися схемами дивергенции видов в этой группе. В случае филогении по гену GH1, *S. salar* действительно формирует базальный кластер по отношению к гольцам и тихоокеанским лососям. В то же время *S. trutta* с высокой поддержкой кластеризуется с видами рода *Oncorhynchus*, но не с близкородственным видом *S. salar*. Аналогично, в случае филогении по гену GH2, *S. trutta* также объединяется с тихоокеанскими лососями, а *S. salar* кластеризуется с гольцами рода *Salvelinus* (рис. 3.3, 3.4, 3.5). Данные по аминокислотным последовательностям подтверждают неопределенность в положении рода *Salmo* относительно двух других таксонов (рис. 3.6, 3.7). Ранее несоответствие положения видов рода *Salmo* в филогенетических деревьях было обнаружено при сравнении интронных последовательностей гена гормона роста (Oakley, Phillips, 1999). Нами также было отмечено несовпадение дивергенции интронных участков гена GH и эволюции таксона

(Панькова, Брыков, 2013). Крете-Лафрини с коллегами также указывают на неопределенность положения видов этого рода в филогенетическом древе как следствие несогласованности филогении по митохондриальным и ядерным генам (Crete-Lafrenière et al., 2012).

Одним из основных принципов молекулярной филогенетики является допущение, что накопление нуклеотидных замен происходит равномерно во времени (Лукашов, 2009). Очевидно, что в нашем случае мы наблюдаем это не всегда. Наиболее вероятным следует полагать, что это явление может быть обусловлено отбором. Во всех случаях очевидно влияние очищающего отбора, при котором $dN < dS$ (табл. 3.17). При этом отбор, по-видимому, был разнонаправлен. Поскольку тесты не выявляют каких-либо сайтов, находящихся под влиянием положительного отбора, необходимо предположить, что это обусловлено разным давлением очищающего отбора на гены-паралоги.

Это также следует при сравнении изменчивости в последовательностях экзонов и интронов генов GH. Известно, что интронные участки генов дивергируют с большей скоростью по сравнению с экзонными, поскольку находятся под меньшим давлением отбора. В нашем случае средняя величина различий между экзонами гена GH1 у всех видов гольцов составила 0,16% нуклеотидных замен, а между интронами этого же гена 0,49%, и различия значимы ($p < 0,05$). В гене GH2 среднее различие по экзонам составило 0,74%, а по интронам – 1,32% ($p < 0,01$).

Необходимо отметить низкий уровень изменчивости в кодирующих участках в целом. Так, при сравнении обоих генов у двух близких видов (*S. curilus* и *S. malma*) отсутствуют мутации не только в несинонимичных положениях, но даже в синонимичных. Время независимой дивергенции этой пары видов по митохондриальной ДНК оценивается в 2–2,5 млн. лет (Oleinik et al., 2007). Отсутствие даже синонимичных замен за столь длительное независимое существование видов может определяться одной из форм отбора, при котором также существенно положение нуклеотидов во втором и

в третьем положении кодонов. Существование такого отбора согласуется с наблюдением, когда в одном из генов-паралогов некоторые аминокислоты кодируются одними триплетами, а в другом гене – другими (табл. 3.4).

Полученные данные дают основание полагать, что скорость накопления мутаций в паралогичных генах отличается. Несмотря на то, что оба гена находятся под влиянием очищающего отбора, его величина у лососевых рыб в большинстве случаев меньше в гене GH2. Об этом свидетельствует факт смещения величин дивергенции в гене GH2 в сторону больших значений по сравнению с GH1. В целом это согласуется с ранними предположениями о возможности снижения давления отбора по одному из дублицированных локусов (Ohno, 1970; Zhang, 2003; Han et al., 2009).

Более убедительными и доказательными являются данные по сравнению аминокислотных последовательностей. В нашем случае особенно заметны различия паралогов по скорости аминокислотных замен. Время формирования лососевых рыб датируется от 25 до 100 млн. лет (Allendorf, Thorgaard, 1984). На это же время, по-видимому, приходится появление двух паралогов гормона роста. Мы рассчитали скорость аминокислотных замен в каждом таксоне для каждой копии GH. Скорость аминокислотных замен для всех видов, исходя из максимального времени начальной дивергенции паралогичных генов, составила $0,182 \times 10^{-9}$ для GH1 и $0,109 \times 10^{-9}$ для GH2 на сайт в год. Если рассчитывать отдельно для каждого таксона, то выявляются различия. В GH1 у гольцов вообще не обнаружено аминокислотных замен, в GH2 хотя и обнаруживаются аминокислотные замены, но скорость низкая – $0,0238 \times 10^{-9}$ на сайт в год. В GH2 у лососей рода *Oncorhynchus* скорость накопления аминокислотных замен ($0,158 \times 10^{-9}$) выше в 2 раза по сравнению с GH1 ($0,079 \times 10^{-9}$). В то же время у представителей рода *Salmo* обнаруживается обратная картина: скорость накопления аминокислотных замен в GH1 ($0,214 \times 10^{-9}$) превышает скорость в GH2 ($0,095 \times 10^{-9}$) более чем в 2 раза. Очевидно, что в одном таксоне

очищающий отбор более интенсивный по одному гену-паралогу, а в остальных таксонах – по-другому.

Таким образом, наши данные дают основания полагать, что скорость эволюции паралогичных генов GH у лососевых рыб может сильно отличаться как внутри одного таксона, так и между таксонами. Скорость аминокислотных замен в родах *Salmo* и *Oncorhynchus* сопоставима, но низкая скорость аминокислотных замен (практически на порядок величины) в обоих генах у гольцов рода *Salvelinus* оказалась неожиданной. Эта группа видов характеризуется высоким уровнем экологической и морфологической пластичности (Christiansen et al., 2013). Внутри одного вида могут существовать проходные и жилые экотипы, в одном водоеме могут обитать несколько хорошо отличающихся морфологических и даже генетических форм. Поэтому можно было ожидать действия разнонаправленного отбора, в том числе и по GH генам, но это оказалось не так. Возможно, что эта пластичность, в том числе и по скорости роста, связана не со структурой гена GH, а с изменениями в регуляторных элементах.

Полученные данные в определенной степени согласуются с результатами, полученными на других группах рыб и позвоночных животных. Частичная, а у ряда видов полная, последовательность сравнивалась в паралогичных генах гормона роста, GH1 и GH2, у чукучановых рыб (Cypriniformis, Catostomidae) (Bart et al., 2010). Так же, как в нашем случае, паралоги сходны по аминокислотным и нуклеотидным последовательностям больше чем на 90% и показано, что оба гена находятся под действием очищающего отбора. Величина дивергенции между GH1 и GH2 больше, чем в нашем случае, и в среднем составляет 9,61%. Средняя попарная дистанция внутри паралогов по нуклеотидным последовательностям оказалась также больше и составила 4,46 и 2,43% для GH1 и GH2 соответственно (Bart et al., 2010). Большая величина различий связана, очевидно, с большим временем существования карповых рыб, и соответственно, паралогичных генов GH.

Риинейнен и Приммер рассчитывали скорость дивергенции аминокислотных последовательностей генов GH у 64 видов рыб из 4-х отрядов (Ruunänen, Primmer, 2006). Они нашли, что средняя скорость эволюции в кодирующих последовательностях составляет $1,15 \times 10^{-9}$ для зрелого белка и $1,58 \times 10^{-9}$ для сигнального пептида, при этом вариации внутри отрядов были 4-х кратные (Ruunänen, Primmer, 2006). Наибольшей скоростью характеризовались представители отряда Perciformes ($1,30 \times 10^{-9}$ замен на сайт в год), наименьшей – представители Siluriformes ($0,32 \times 10^{-9}$ замен на сайт в год) (Ruunänen, Primmer, 2006).

Неравномерность скорости дивергенции гена GH во времени показана даже в тех группах позвоночных, где этот ген уникален. У грызунов и зайцеобразных (Lagomorpha) выявленная скорость составляет $0,49 \times 10^{-9}$ аминокислотных замещений на сайт в год (Lioupis et al., 1997). В то же время у млекопитающих выявлено два периода быстрых изменений, когда скорость накопления изменений в гене увеличивается значительно, в 25–50 раз. Один из периодов связан с дивергенцией парнокопытных ($10,5 \times 10^{-9}$ аминокислотных замещений на сайт в год), второй – с дивергенцией высших приматов ($10,8 \times 10^{-9}$ аминокислотных замещений на сайт в год) (Wallis, 1996; Lioupis et al., 1997; Wallis., Wallis, 2001; Wallis et al., 2001; Maniou et al., 2004; Ye et al., 2005). Более того, у высших приматов скорость накопления несинонимичных замен превышает скорость накопления синонимичных, и даже скорость изменений нуклеотидов в интронных участках, что подтверждает в этом случае наличие положительного отбора (Wallis et al., 2001). В более поздней работе базовая скорость аминокислотных замещений оценивается в $\sim 0,25 \times 10^{-9}$, а в случае периодов быстрой эволюции $\sim 5,0 \times 10^{-9}$ (Maniou et al., 2004).

4.3 Дивергенция интронных последовательностей генов-паралогов

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что интронные последовательности, несмотря на то, что скорость накопления нуклеотидных замен в них выше по сравнению с экзонными, также относительно консервативны и находятся, по-видимому, под влиянием отбора. Наличие отбора по интронным участкам может быть обусловлено тем, что 5' и 3' концевые последовательности играют важную роль в процессе сплайсинга (Zhu et al., 2009). Кроме того, консервативность последовательностей в интронах может определяться тем, что они несут определенную функциональную нагрузку. То, что интронные участки в генах гормона роста могут нести функциональную нагрузку и могут находиться под действием отбора, следует из наличия в интроне С обоих генов эстроген-чувствительной последовательности (estrogene responsible element, ERE) (Driscoll et al., 1998). Рецептор эстрогена (ER) является транскрипционным фактором, связывающимся со специфическими последовательностями ДНК, найденными в эстроген-чувствительных генах (Driscoll et al., 1998), к которым, вероятно, относятся и гены GH.

Последовательность ERE в генах GH1 и GH2 *B. lenok* идентична, но отличается у паралогов других видов лососёвых (табл. 4.2). Последовательность, идентичная последовательности ERE ленка, также обнаружена в генах GH1 гольцов, за исключением *S. malma* и *S. curilus*, у которых ERE содержит одну нуклеотидную замену, а также у видов рода *Oncorhynchus* и *H. taimen*. Эстроген-чувствительный элемент гена GH2 отличается от последовательности ERE *B. lenok* одной нуклеотидной заменой, а у *S. leucomaenis* и *S. fontinalis* в последовательности ERE выявлено две нуклеотидные замены (табл. 4.2).

Последовательности ERE генов GH1 и GH2

Вид	GH1	GH2
<i>B. lenok</i>	G G G C A A G C A G A C C	G G G C A A G C A G A C C
<i>C. artedi</i> C . . A A .
<i>C. clupeaformis</i> A .
<i>T. arcticus</i>	. . . T . . . A . A T
<i>H. taimen</i> T
<i>H. hucho</i>	. T . A
<i>P. perryi</i>	. T . A T .
<i>A. ohridana</i>	. . . A A T .
<i>S. salar</i>	. . . A T .
<i>S. trutta</i>	. . . A T .
<i>O. masou</i> T .
<i>O. mykiss</i> T .
<i>O. clarki</i> T .
<i>O. kisutch</i> T .
<i>O. nerka</i> T .
<i>O. tshawytscha</i> T .
<i>O. keta</i> T .
<i>O. gorbuscha</i> T .
<i>S. alpinus</i> T .
<i>S. leucomaenis</i> G T .
<i>S. fontinalis</i> G T .
<i>S. namaycush</i> T .
<i>S. curilus</i>	. C T .
<i>S. malma</i>	. C T .
<i>S. taranetzi</i> T .
<i>S. levanidovi</i> T .

Еще один предполагаемый регуляторный участок обнаружен в том же интроне С. Ранее в гене GH2 у *O. mykiss* были выявлены две АТ-богатые области, содержащие предполагаемые Pit-1-связывающие сайты (Bernardini et al., 1999). Последовательность Pit-1-связывающего сайта первой области гена GH2 у всех видов *Oncorhynchus* идентична последовательности *O. mykiss* и содержит одну нуклеотидную замену по сравнению с остальными видами. Исключение составляет *S. leucomaenis*, у которого в данной последовательности обнаружено 2 нуклеотидные замены. Элементы Pit-1 второй области более вариабельны (табл. 4.3). Так, первый сайт *O. nerka*, *S.*

leucomaenis, *S. fontinalis*, *A. ohridana* содержит по одной нуклеотидной замене по сравнению с последовательностью остальных видов, а у кижуча этот участок почти полностью отсутствует. Последовательность второго сайта Pit-1 идентична у всех видов, кроме тихоокеанских лососей, и отличается от *O. mykiss* одной нуклеотидной заменой и делецией одного нуклеотида (табл. 4.3).

При сравнении двух генов показано, что последовательность сайта связывания Pit-1, содержащегося в первой области гена GH1, консервативна у всех видов и имеет замену одного нуклеотида по сравнению с геном GH2 *O. mykiss*. Первый сайт Pit-1 второй области гена GH1 значительно отличается от гена GH2 и обнаруживает консервативность только в центральной своей части. Второй сайт Pit-1 консервативен у всех видов и идентичен аналогичной последовательности гена GH2, за исключением видов *Oncorhynchus* (табл. 4.4).

В других интронах у других представителей лососевых выявлено еще несколько вероятных сайтов связывания с транскрипционными факторами (Yang et al., 1997; Bernardini et al., 1999; Von Schalburg et al., 2008), которые обнаруживаются и у гольцов. В четвертом интроне (D) найден цАМФ-ответственный элемент (cAMP responsible element, CRE). В гене GH1 CRE присутствует у всех исследованных видов лососей и представлен палиндромной последовательностью, за исключение ленка и двух видов рода *Coregonus*. Последовательность CRE гена GH2 отличается от последовательности CRE гена GH1 одной нуклеотидной заменой у большинства видов. В гене GH2 двух видов тихоокеанских лососей (*O. clarki* и *O. masou*) CRE не обнаружен, как результат присутствия в этом положении протяженной делеции (табл. 4.5).

Последовательности АТ-богатых областей, расположенных в интроне С гена GH2

	Область 1			Область 2		
				Сайт 1		Сайт 2
<i>O. mykiss</i>	CGATTCCAAC	ATGAATAA	TAGGG	TTC- TCCAGC-----C	ATGTATCATGTAAA	TGATATGGCATCTCAAGCTGTAC AATTACAT CTCAAC
<i>O. clarki</i>	CGATTCCAAC	ATGAATAA	TATGG	TTC- TCCAGC-----C	ATGTATCATGTAAA	TGATATGGCATCTCAAGCTGTAC AATTACAT CTCAAC
<i>O. gorbuscha</i>	CAATTCCAAC	ATGAATAA	TAGGG	TTCATGCAGC-----A	ATGTATCATGTAAA	TGATATGGCATCTCAAGCTGTAC AATTACAA CTCAAC
<i>O. keta</i>	CAATTCCAAC	ATGAATAA	TAGGG	TTC- TCCAGC-----A	ATGTATCATGTAAA	TGATATGGCAATCTCAAGCTGTAC AATTACAA CTCAAC
<i>O. nerka</i>	CAATTCCAAC	ATGAATAA	TAGGG	TTC- TCCAGC-----A	ATGTGTCATGTAAA	TGATATGGCATCTCAAGCTGTAC AATTACAA CTCAAC
<i>O. kisutch</i>	CAATTCCAAC	ATGAATAA	TAGGG	TTC- TCCAGC-----A	ATGT-----	TTATGTGGCATCTCAAGCTGTAC AATTACAA CTCAAC
<i>O. masou</i>	CAATTCCAAC	ATGAATAA	TAGGG	TTC- TCCAGC-----C	ATGTATCATGTAAA	TGATATGGCACCTCAAGCTGTAC AA-TACAA CTCAAC
<i>O. tshawytscha</i>	CAATTCCAAC	ATGAATAA	TAGGG	TTC- TCCAGC-----A	ATGTATCATGTAAA	TGATATGGCATCTCAAGCTGTAC AATTACAA CTCAAC
<i>S. alpinus</i>	TGATTCCAAA	ATAAATAA	TAGGG	TTC- TCCAGC-----C	ATGTATCATGTAAA	TGATATGGCATCTCAAGCTGTAC AA-TACAA CTCAAC
<i>S. leucomaenis</i>	TGATTCCAAA	AGAAATAA	TAGGG	TTC- TCCAGC-----C	ATGTGTCATGTAAA	TGACATGGCATCTCAAGCTGTAC AA-TACAA CTCAAC
<i>S. fontinalis</i>	GGATTCCAAA	ATAAATAA	TAGGG	TTC- TCCAGC-----C	ACGTATCATGTAAA	TGACATGGCATCTCAAGCTGTAG AA-TACAA CTCAAC
<i>S. namaycush</i>	TGATTCCAAA	ATAAATAA	TAGGG	TTC- TCCAGC-----C	ATGTATCATGTAAA	TGATATGGCATCTCAAGCTGTAC AA-TACAA CTCAAC
<i>S. curilus</i>	TGATTCCAAA	ATAAATAA	TAGGG	TTC- TCCAGC-----C	ATGTATCATGTAAA	TGATATGGCATCTCAAGCTGTAC AA-TACAA CTCAAC
<i>S. malma</i>	TGATTCCAAA	ATAAATAA	TAGGG	TTC- TCCAGC-----C	ATGTATCATGTAAA	TGATATGGCATCTCAAGCTGTAC AA-TACAA CTCAAC
<i>S. taranetzi</i>	TGATTCCAAA	ATAAATAA	TAGGG	TTC- TCCAGC-----C	ATGTATCATGTAAA	TGATATGGCATCTCAAGCTGTAC AA-TACAA CTCAAC
<i>S. levanidovi</i>	TGATTCCAAA	ATAAATAA	TAGGG	TTC- TCCAGC-----C	ATGTATCATGTAAA	TGATATGGCATCTCAAGCTGTAC AA-TACAA CTCAAC
<i>S. salar</i>	AGATTCCAAA	ATAAATAA	TAGGG	TTC- TCCAGC-----C	ATGTATCATGTAAA	TGATATGGCATCTCAAGCTGTAC AA-TACAA CTCAAC
<i>S. trutta</i>	TGATTCCGAA	ATAAATAA	TAGGG	TTC- TCCAGC-----C	ATGTATCATGTAAA	TGATATGGCATCTCAAGCTGTAC AA-TACAA CTCAAC
<i>A. ohridana</i>	TGATTCCGAA	ATAAATAA	TAGGG	TTC- TCCAGC-----C	GTGTATCATGTAAA	TGATATGGCATCTCAAGCTGTAC AA-TACAA CTCAAC
<i>P. perryi</i>	TGATTCCAAA	ATAAATAA	TAGGG	TTC- TCCAGC-----C	ATGTATCATGTAAA	TGATATGGCATCTCAAGCTGTAC AA-TACAA CTCAAC
<i>H. hucho</i>	TGATTCCAAA	ATAAATAA	TAGGA	TTA- TCCAGC-----C	ATGTATCATGTAAA	TGATATGGCATCTCAAGCTGTAC AA-TACAA CTCAAC
<i>H. taimen</i>	TGATTCCAAA	ATAAATAA	TAGGA	TTA- TCCAGC-----C	ATGTATCATGTAAA	TGATATGGCATCTCAAGCTGTAC AA-TACAA CTCAAC
<i>B. lenok</i>	TGATTCCAAA	ATAAATAA	TAGGA	TTA- TCCAGC-----C	ATGTATCATGTAAA	TGATATGGCATCTCAAGCTGTAC AA-TACAA CTCAAC

Примечание. В рамках указаны Pit-1-связывающие сайты.

Последовательности АТ-богатых областей, расположенных в интроне С гена GH1

	Область 1			Область 2				
				Сайт 1		Сайт 2		
<i>O. mykiss</i> GH2	CGATTCC- AAC	ATGAATAA	TAGGG	TTCTCCAGCG	ATGTATCATGT-AAA	TGAT-ATGGCATCTCAAGCTGTAC	AATTACAT	CTCAAC
<i>O. mykiss</i>	AGATTCCAAAA	ATAAATAA	TAGGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----AGGGCATCTCAAGCTGTAC	AA-TACAA	CTCAAC
<i>O. clarki</i>	AGATTCCAAAA	ATAAATAA	TAGGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----AGGGCATCTCAAGCTGTAC	AA-TACAA	CTCAAC
<i>O. gorbuscha</i>	AGATTCCAAAA	ATAAATAA	TAGGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----AGGGCATCTCAAGCTGTAC	AA-TACAA	CTCAAC
<i>O. keta</i>	AGATTCCAAAA	ATAAATAA	TAGGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----AGGGCATCTCAAGCTGTAC	AA-TACAA	CTCAAC
<i>O. nerka</i>	AGATTCCAAAA	ATAAATAA	TAGGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----AGGGCATCTCAAGCTGTAC	AA-TACAA	CTCAAC
<i>O. kisutch</i>	AGATTCCAAAA	ATAAATAA	TAGGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----AGGGCATCTCAAGCTGTAC	AA-TACAA	CTCAAC
<i>O. masou</i>	AGATTCCAAAA	ATAAATAA	TAGGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----ATGGCATCTGAAGCTGTAC	AA-TACAA	CCCAAC
<i>O. tshawytscha</i>	AGATTCCAAAA	ATAAATAA	TAGGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----AGGGCATCTCAAGCTGTA-	AA-TACAA	CTCAAC
<i>S. alpinus</i>	TGATTCC- AAA	ATAAATAA	CAGGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----AGGGCATCTCAAGCTGTAC	AA-TACAA	CTTCAT
<i>S. leucomaenis</i>	TGATTCC- AAA	ATAAATAA	CAGGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----AGGGCATCTCAAGCTGTAC	AA-TACAA	CTTCAT
<i>S. fontinalis</i>	TGATTCC- AAA	ATAAATAA	CAGGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----AGGGCATCTCAAGCTGTAG	AA-TACAA	CTTAAT
<i>S. namaycush</i>	TGATTCC- AAA	ATAAATAA	CAGGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----AGGGCATCTCAAGCTGTAC	AA-TACAA	CTTCAT
<i>S. curilus</i>	TGATTCC- AAA	ATAAATAA	CAGGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----AGGGCATCTCAAGCTGTAC	AA-TACAA	CTTCAT
<i>S. malma</i>	TGATTCC- AAA	ATAAATAA	CAGGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----AGGGCATCTCAAGCTGTAC	AA-TACAA	CTTCAT
<i>S. taranetzi</i>	TGATTCC- AAA	ATAAATAA	CAGGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----AGGGCATCTCAAGCTGTAC	AA-TACAA	CTTCAT
<i>S. levanidovi</i>	TGATTCC- AAA	ATAAATAA	CAGGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----AGGGCATCTCAAGCTGTAC	AA-TACAA	CTTCAT
<i>S. salar</i>	TGATTCC- AAA	ATAAATAA	TATGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----AGGGAATCTCAAGCTGTAC	AA-TACAA	CGCAAC
<i>S. trutta</i>	TGATTCC- AAA	ATAAATAA	TATGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----AGGGCATCTCAAGCTGTAC	AA-TACAA	CGCAAC
<i>A. ohridana</i>	TGATTCC- AAA	ATAAATAA	TATGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----AGGGCATCTCAAGCTGTAC	AA-TACAA	CGCAAC
<i>P. perryi</i>	TGATTCC- AAA	ATAAATAA	TAGGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----AGAGCATCTCAAGCTGTAC	AA-TACAA	CTCAAC
<i>H. hucho</i>	TGATTCC- AAA	ATAAATAA	TAGGG	-----	-----ATCATGT-AAA	T-----AAAAGCATCTCAAGCTGTAC	AA-TACAA	CTCAAC
<i>H. taimen</i>	AGATTCCAAAA	ATAAATAA	TAGGG	-----	-----ATCATGT-AAA	TGAT- ATGGCATCTCAAGCTGTAC	AA-TACAA	CTCAAC
<i>B. lenok</i>	TGATTCC- TGA	ATAAATAA	TAGGG	-----	-----ATCAGGT-AAA	C----- AGGGCATCTCAAGCTGTAC	AA-TACAA	CTCAAC

Примечание. В рамках указаны Pit-1-связывающие сайты.

CRE-элемент в интроне D генов GH1 и GH2 лососёвых

Вид	GH1	GH2
<i>O. tshawytscha</i>	A C T G C A G T	A C T G T A G T
<i>O. mykiss</i>
<i>O. clarki</i>	---
<i>O. gorbuscha</i>
<i>O. keta</i>
<i>O. nerka</i>
<i>O. kisutch</i> A
<i>O. masou</i>	---
<i>S. alpinus</i>
<i>S. leucomaenis</i>
<i>S. fontinalis</i>
<i>S. namaycush</i>
<i>S. curilus</i>
<i>S. malma</i>
<i>S. taranetzi</i>
<i>S. levanidovi</i>
<i>S. salar</i>
<i>S. trutta</i>
<i>A. ohridana</i>
<i>P. perryi</i>
<i>H. hucho</i> T C
<i>H. taimen</i> T C
<i>B. lenok</i>	. T . . T . . C	. T C
<i>T. arcticus</i> C . . .
<i>C. artedi</i> C C .
<i>C. clupeaformis</i> C C .

В интроне D обнаружена еще одна консервативная последовательность, которая включает в себя несколько прямых повторов GATT, названная Маккеем и соавторами «микросателлитом» (McKay et al., 2004). Две копии этого повтора обнаруживаются в гене GH1 гольцов, как и у большинства других видов лососёвых. Ген GH2 содержит три GATT повтора, подобно *S. salar* и *S. trutta*. Исключение составляет ген GH2 *S. leucomaenis*, у которого, в результате делеции четырёх нуклеотидов, имеется только два повтора (табл. 4.6). В отличие от родов *Salmo* и *Salvelinus*, количество повторов в гене GH2 у тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus* варьирует от двух (чавыча и кижуч) до четырёх (горбуша и кета). Наибольшее

количество повтора GATT выявлено в четвёртом интроне *H. huchó* и *H. taimen*, 5 и 9 повторов соответственно. Очевидно, что столь консервативная последовательность является не просто микросателлитом (McKay et al., 2004), но скорее несет функцию регуляции, основанную на взаимодействии с белками.

То, что длина и последовательность нуклеотидов не только экзонов, но и интронов, подвержены отбору, известны для других генов в различных таксонах. В последние десятилетия накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что в интронных участках содержится большое количество элементов, регулирующих процессы транскрипции и созревания мРНК: нетранслируемые РНК, сайты и РНК, регулирующие сплайсинг и др. (Zhu et al., 2009). Выявлены различия в числе замещений на сайт при сравнении интронов генов у человека и шимпанзе, обнаружена строгая положительная корреляция между длиной интрона и величиной дивергенции, строгая отрицательная корреляция между длиной интрона и содержанием ГЦ пар оснований (Gazave et al., 2007). Также показано, что скорость дивергенции варьирует у интронов и зависит от их порядкового номера внутри гена. Различия в скорости дивергенции интронных областей и межгенных областей у видов дрозофил также интерпретируется как наличие факторов отбора, не связанных со скоростью мутаций или рекомбинаций (Ometto et al., 2006). Аналогично, при анализе генов 13 эукариотических геномов растений и животных показано, что существуют некие общие факторы, возможно – отбор, влияющие на структуру и эволюцию как экзонных участков, так и интронных в гомологичных генах (Zhu et al., 2009).

Таблица 4.6

Структура (GATT)_n микросателлита, расположенного в интроне D генов GH

Вид	GH1	GH2
<i>O. tshawytscha</i>	CATTGAGTGATTGATTC-----ATT	CATTGAGTGATTGATT-----GATC
<i>O. mykiss</i>	CATTGAGTGATTGATTC-----ATT	CATTGAGTGATTGATTGATT-----CATC
<i>O. clarki</i>	CATTGAGTGATTGATTC-----ATT	CATTGAGTGATTGATTGATGGATT-----CATC
<i>O. gorbuscha</i>	CATTGAGTGATTGATTC-----ATT	CATTGAGTGATTGATTGATTGATT-----CATC
<i>O. keta</i>	CATTGAGTGATTGATTC-----ATT	CATTGAGTGATTGATTGATTGATT-----CATC
<i>O. nerka</i>	CATTGAGTGATTGATTC-----ATT	CATTGAGTGATTGATTCATTCATT-----CATC
<i>O. masou</i>	CATTGAGTGATTGATTC-----ATT	CATTGAGTGATTGATTGATT-----CATC
<i>S. alpinus</i>	CATGGAGTGATTGATTC-----ATC	CATTGAGTGATTGATTGATT-----AATT
<i>S. leucomaenis</i>	CATGGAGTGATTGATTC-----ATC	CATTGAGTGATTGATT-----CATC
<i>S. fontinalis</i>	CATGGAGTGATTGATTC-----ATC	CATTGAGTGATTGATTGATT-----AATT
<i>S. namaycush</i>	CATGGAGTGATTGATTC-----ATC	CATTGAGTGATTGATTGATT-----AATT
<i>S. curilus</i>	CATGGAGTGATTGATTC-----ATC	CATTGAGTGATTGATTGATT-----AATT
<i>S. malma</i>	CATGGAGTGATTGATTC-----ATC	CATTGAGTGATTGATTGATT-----AATT
<i>S. taranetzi</i>	CATGGAGTGATTGATTC-----ATC	CATTGAGTGATTGATTGATT-----AATT
<i>S. levanidovi</i>	CATGCAGTGATTGATTC-----ATC	CATTGAGTGATTGATTGATT-----AATT
<i>S. salar</i>	CATTGAGTGATTGATTC-----ATC	CATTGAGTGATTGATTGATT-----AATT
<i>S. trutta</i>	CATTGAGTGATTGATTC-----ATC	CATTGAGTGATTGATTGATT-----AATT
<i>A. ohridana</i>	CATTGAGTGATTGATTC-----ATC	CATTGAGTGATTGATTGATT-----AATT
<i>P. perryi</i>	CATTGAGTGATTGATTC-----ATT	CATTGAGTGATTGATTGATT-----AATC
<i>H. hucho</i>	CATTGAGTGATTAATTC-----ATC	CATTGAGTGATTGATTGATTGATT-----AATC
<i>H. taimen</i>	CATTGAGTGATTAATTC-----ATC	CATTGAGTGATTGATTGATTGATTGATTGATTGATTGATTGATTGATTAATC
<i>B. lenok</i>	CATCGAGTGATTGATTGATTAATC	CATCGAGTGATTGATTGATT-----AATC
<i>T. arcticus</i>	CATTGAGTGATTGATTGATTAATC	CATTGAGTGATTGATTGATT-----AATC
<i>C. artedi</i>	CATTGAGGGATTGATTGATTAATC	CATTGAGGGATTGATTGATT-----AATC
<i>C. clupeaformis</i>	CATTGAGGGATTGATTGATTAATC	CATTGAGGGATTGATTGATT-----AATC

Дополнительными факторами, способными оказывать влияние на консервативность и различия в скорости дивергенции интронных последовательностей в паралогичных генах, являются эффект хичхайкинга и/или эффект Хилла-Робертсона (Fay, Wu, 2000; Comeron, Kreitman, 2002). Представляется, что отрицательный отбор по экзонам не только ограничивает возможность изменений даже по синонимичным положениям в самих экзонах, но отбор интерферирует на прилежащие некодирующие интронные участки (Comeron, Kreitman, 2002). В нашем случае при сравнении дивергенции в генах-паралогах видно, что высокая консервативность экзонных участков в гене GH1 определяет и большую консервативность интронных участков в этом гене (табл. 3.12, 3.18). Снижение давления отбора по экзонным последовательностям гена GH2 снижает давление отбора и по интронам.

Полученные нами данные поддерживают некоторые представления о неравномерности скорости эволюции генов GH в таксонах и возможной связи изменений в скорости эволюции с дупликациями генов GH. В эволюции млекопитающих (Cetacea, Artiodactyla (Cetartiodactyla) и Primates), а также у воробьиных (Passeriformes), отмечаются периоды «взрывного» видообразования (Wallis, 1996; Wallis, Wallis, 2001; Liu et al., 2001; Maniou et al., 2004; Yuri et al., 2008; Tamaki et al., 2008). В этих же таксонах выявляются дупликации генов GH, и периоды увеличения скорости изменения в этих генах в несколько раз, в том числе и в кодирующих последовательностях (Wallis, 1996; Wallis, Wallis, 2001; Liu et al., 2001; Yuri et al., 2008; Tamaki et al., 2008). У лососевых рыб, у которых ген GH дуплицирован, и для которых был характерен этап быстрого образования новых видов, мы также обнаружили неравномерность скорости изменений генов GH.

Таким образом, сравнительный анализ генов гормона роста показал, что дупликация их, образование генов-паралогов произошло в эволюции лососевых рыб очень рано, до разделения их на основные линии

подсемейства *Salmoninae* (*Salvelinus*, *Salmo*, *Onchorynchus*, *Brachymistax*, *Hucho*, *Parahucho*).

Известно, что чем больше число признаков (увеличение длины анализируемой последовательности), тем более надежными (близкими к истинным) должны быть результаты реконструкции эволюционных отношений (Лукашов, 2009). Филограмма, основанная на объединенных данных по двум генам GH гольцов (оба интрона двух генов гормона роста), в значительной степени согласуется с существующими представлениями о близости видов и последовательности их дивергенции. *S. namaycush*, *S. fontinalis*, *S. leucomaenis* и *S. levanidovi* являются рано дивергировавшими видами, с высоким уровнем поддержки формируется кластер *S. malma*, *S. curilus*, *S. alpinus* и *S. taranetzi* (рис. 3.14). Последовательность дивергенции ранее проанализированных видов, по генам гормона роста (Oakley, Phillips, 1999; Westrich et al., 2002; Phillips et al., 2004), сходна с полученной нами. Добавленные нами виды гольцов располагаются на филограмме в соответствии с данными, полученными ранее с использованием других подходов и методов: *S. curilus* обнаруживается как сестринский вид по отношению к *S. malma*, *S. alpinus* и *S. taranetzi* находится в одном кластере с *S. malma* и *S. curilus*, а *S. levanidovi*, как и предполагалось ранее (Behnke, 1980; Глубоковский, 1995; Радченко, 2005; Oleinik et al., 2007), является одним из наиболее рано отделившихся видов от общей ветви гольцов и близок к североамериканским видам.

Более интересные результаты следуют из сравнения деревьев, полученных на основе сравнительного анализа двух больших интронов в двух генах гормона. Как видно из приведенных данных (рис. 3.12 и 3.13), между деревьями обнаруживаются существенные отличия. Так, при построении филогенетического дерева по интронам гена GH1 гольцов, линии *S. fontinalis* и *S. leucomaenis* формируют наиболее дивергировавшие отдельные ветви. *S. alpinus* и *S. namaycush* кластеризуются с высоким уровнем поддержки. Все азиатские линии (*S. taranetzi*, *S. levanidovi*, *S. malma*

и *S. curilus*), между которыми наблюдаются близкие генетические дистанции, образуют общий кластер (рис. 3.12).

В случае анализа интронов в гене GH2 гольцов, линии *S. fontinalis* и *S. leucomaenis* также представлены отдельными ветвями, но *S. namaycush* образует общий кластер с *S. levanidovi*. При этом с высоким уровнем поддержки формируется кластер, объединяющий *S. alpinus*, *S. malma*, *S. curilus* и *S. taranetzi* (рис. 3.13).

Наиболее существенные различия заключаются в положении линии арктического гольца *S. alpinus*. Если последовательности интронов гена GH1 более сходны с одним из наиболее древних в группе гольцом рода – *S. namaycush*, то интроны гена GH2 – с наиболее молодыми *S. malma* и *S. curilus*. Очевидно, что результаты анализа последовательностей интронов гена GH1 гольцов во многих отношениях отличаются от филогенетических схем, основанных на морфологических, биохимических и генетических данных (Behnke, 1980; Глубоковский, 1995; Радченко, 2005; Oleinik et al., 2007). Топология дендрограмм, полученных для интронов гена GH2 гольцов в большей степени представляется конгруэнтной с существующими схемами дивергенции этой группы видов (Behnke, 1980; Глубоковский, 1995; Радченко, 2005). Из полученных данных следует, что как скорость, так и направление эволюции интронов в паралогичных генах гормона роста отличается. Как видно из табл. 3.19 и 3.20 максимальная величина дивергенции внутри рода *Salvelinus* по интронам гена GH1 составляет 1,37% (*S. fontinalis* vs. *S. alpinus*), в то же время различия в гене GH2 – 3,66 % (*S. taranetzi* vs. *S. leucomaenis*). Более чем в два раза величина различий обнаруживается при сравнении между всеми парами видов гольцов: среднее значение между всеми видами по GH1 равно 0,87%, по GH2 – 2,19%, и эти различия высоко значимы ($p \ll 0,01$). Эти данные дают основания предполагать, что интронные последовательности могут находиться под действием отбора, и интенсивность отбора может быть различна для генов-паралогов. При этом очевидно, что нуклеотидная последовательность

интронов в гене GH1 гольцов более консервативна по сравнению с GH2 и, по-видимому, находится под большим давлением отбора.

О существовании отбора разной направленности и давления, свидетельствует также тот факт, что филогения, основанная на интронных последовательностях гена GH1 гольцов, в определенной степени отличается от филогенетических построений, основанных на морфологических, биохимических данных и данных по мтДНК (Behnke, 1980; Глубоковский, 1995; Oakley, Phillips, 1999; Westrich et al., 2002; Phillips et al., 2004; Радченко, 2005; Oleinik et al., 2007).

Парафилия генов также очевидна из филограммы, построенной на основе интронов С и D для большинства видов лососёвых рыб (рис. 3.15). Интроны гена GH1 всех видов лососевых формируют одну филогенетическую группу, интроны GH2 – другую группу. Это доказывает существование двух генов уже у предковой формы лососевых. Однако если сравнивать генетические дистанции между всеми видами лососевых рыб (исключив виды рода *Salvelinus*), то средняя генетическая дистанция по интронам GH1 составляет 6,77%, а по GH2 – 5,14%, и различия высоко значимы ($p \ll 0,01$). Таким образом, у большинства видов лососевых рыб более консервативными оказались последовательности интронов гена GH2, а не GH1, как в случае с гольцами, и можно полагать, что у большинства видов лососевых рыб интроны гена GH2 находятся под большим влиянием отбора. В главе 3.2 мы показали, что скорости дивергенции экзонных и интронных последовательностей в определенной степени согласованы. При этом более высокая скорость изменений в экзонах сопровождается более высокой скоростью накопления изменений в интронах. Если это так, тогда можно предположить, что в целом для лососевых рыб (за исключением гольцов) характерна большая консервативность гена GH2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили выяснить закономерности организации и эволюции паралогичных генов гормона роста у лососевых рыб. Сравнительный анализ структуры паралогичных генов гормона роста у всех видов лососевых рыб, включая гольцов, показал высокое сходство и консервативность. Экзонные последовательности генов оказались весьма консервативными и находятся под влиянием очищающего отбора. Эти факты дают основание считать, что оба гена-паралога функциональны и, возможно, характеризуются тканеспецифичной экспрессией.

Филогенетический анализ экзонных и интронных последовательностей показал, что скорость дивергенции паралогичных генов гормона роста различается в разных филетических линиях у лососевых рыб и это определяется разным давлением отрицательного отбора.

Сравнительный анализ последовательностей генов GH показал, что интронные участки дивергируют с более высокой скоростью, примерно в 2 раза, по сравнению с экзонами. В то же время, очевидно, что и интронные последовательности находятся под влиянием отрицательного отбора. Это может определяться как эффектом хичхайкинга и Хилла-Робертсона, так и тем, что в интронах обнаруживаются потенциальные регуляторные последовательности.

ВЫВОДЫ

1. Ген гормона роста гольцов рода *Salvelinus*, как у других видов лососёвых рыб, представлен двумя несвязанными паралогичными генами, GH1 и GH2.
2. Структура генов GH1 и GH2 гольцов сходна и включает 6 экзонов и 5 интронов. Размер каждого экзона двух генов идентичен у всех видов гольцов. Длина генов варьирует за счёт длины интронов.
3. Филогенетический анализ экзонных и интронных последовательностей генов GH1 и GH2 свидетельствует о давней дупликации гена гормона роста и парафилетичности двух генов в семействе Salmonidae.
4. Высокая гомология последовательностей экзонов и тест на отбор подтверждают эффект отрицательного отбора по кодирующим последовательностям генов GH у всех видов гольцов. Последовательности экзонов гена GH2 гольцов накапливают нуклеотидные замещения с большей скоростью, чем экзоны гена GH1, и, следовательно, находятся под меньшим влиянием отбора.
5. Открытая рамка считывания, высокая консервативность предсказанной аминокислотной последовательности, идентичное положение цистеиновых остатков и наличие очищающего отбора дают основание считать, что оба гена-паралога функциональны.
6. Интронные последовательности в генах гормона роста также находятся под действием отрицательного отбора, вследствие наличия в них потенциальных регуляторных элементов, а также, вероятно, эффектов хичхайкинга и Хилла-Робертсона.
7. Неконгруэнтность топологий филогенетических отношений и разная скорость дивергенции как экзонов, так и интронных последовательностей генов-паралогов свидетельствуют о влиянии на них отрицательного и отличающегося по силе отбора в разных филетических линиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Воротникова С.Ю., Пигарова Е.А., Дзеранова Л.К.* Метаболические эффекты гормона роста // *Ожирение и метаболизм*. 2011. Т. 4. С. 55–59.
2. *Воробьев И.И., Мирошников А.И.* Гормон роста человека: структура, функции и биотехнологический потенциал // *Российский химический журнал (Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева)*. 2005. Т. 49, №1. С. 46–54.
3. *Глубоковский М.К.* Эволюционная биология лососевых рыб. М.: Наука, 1995. 306 с.
4. *Лукашов В.В.* Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. М.: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2009. 256 с.
5. *Льюин Б.* Гены. М: Бином, 2012. 896 с.
6. *Панькова М.В., Брыков Вл.А.* Дивергенция интронов в паралогичных генах гормона роста у лососевых рыб выявляет эффект отбора // *Доклады академии наук*. 2013. Т. 451, № 3. С. 351–354.
7. *Радченко О.А.* Изменчивость митохондриальной ДНК гольцов рода *Salvelinus*. Магадан: СВНЦ, 2005. 153 с.
8. *Abdel-Meguid S.S., Shieh H-S., Smith W.W., Dayringer H.E., Violand B.N., Bentle L.A.* Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987. Vol. 84, № 18. P. 6434–6437.
9. *Adkins R.M., Nekrutenko A., Li W.H.* Bushbaby growth hormone is much more similar to nonprimate growth hormones than to rhesus monkey and human growth hormones // *Molecular Biology and Evolution*. 2001. Vol. 18, №. 1. P. 55–60.
10. *Agellon L.B., Chen T.T.* Rainbow trout growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli* // *DNA*. 1986. Vol. 5, № 6. P. 463–471.

11. Agellon L.B., Davies S.L., Chen T.T., Powers D.A. Structure of a fish (rainbow trout) growth hormone gene and its evolutionary implications // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988. Vol. 85. P. 5136–5140.
12. Allendorf F.W., Thorgaard G.H. Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes // *Evolutionary Biology of Fishes*. Ed. B.J. Turner. N.Y.: Plenum Press, 1984. P. 1–53.
13. Almuly R., Cavari B., Ferstman H., Kolodny O., Funkenstein B. Genomic structure and sequence of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone-encoding gene: Identification of minisatellite polymorphism in intron I // *Genome*. 2000. Vol. 43. P. 836–845.
14. Almuly R., Poleg-Danin Y., Gorshkov S., Gorshkova G., Rapoport B., Soller M., Kashi Y., Funkenstein B. Characterization of the 5'-flanking region of the growth hormone gene of the marine teleost, gilthead sea bream *Sparus aurata*: analysis of a polymorphic microsatellite in the proximal promoter // *Fisheries Science*. 2005. Vol. 71. P. 479–490.
15. Anathy V., Venugopal T., Koteeswaran R., Pandian T.J., Mathavan S. Cloning, sequencing and expression of cDNA encoding growth hormone from Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*) // *Journal of Biosciences*. 2001. Vol. 26. P. 315–324.
16. Arai N., Iigo M. Duplicated growth hormone genes in a passerine bird, the jungle crow (*Corvus macrorhynchos*) // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010. Vol. 397, № 3. P. 553–558.
17. Argenton F., Bernardini S., Puttini S., Colombo L., Bortolussi M. A TGACG motif mediates growth-hormone-factor-1/pituitary-transcriptional-activator-1-dependent cAMP regulation of the rainbow trout growth-hormone promoter // *European Journal of Biochemistry*. 1996. Vol. 238. P. 591–598.

18. Barnett K.R., Hopkins R.L., Peyton D.K. A minisatellite in the growth hormone gene of Esocidae is derived from a single copy element in the salmonid genome // *Copeia*. 2007. Vol. 1. P. 205–211.
19. Barrera-Saldana H.A. Growth hormone and placental lactogen: biology, medicine and biotechnology // *Gene*. 1998. Vol. 211, № 1. P. 11–18.
20. Bart H.L., Reneau P.C., Doosey M.H., Bell C.B. Evolutionary divergence of duplicate copies of the growth hormone gene in suckers (Actinopterygii: Catostomidae) // *International Journal of Molecular Sciences*. 2010. Vol. 11. P. 1090–1102.
21. Barta A., Richards R.I., Baxter J.D., Shine J. Primary structure and evolution of rat growth hormone gene // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981. Vol. 78, № 8. P. 4867–4871.
22. Baumann G.P. Growth hormone isoforms // *Growth Hormone & IGF Research*. 2009. Vol. 19, № 4. P. 333–340.
23. Behnke R.J. A systematics review of the genus *Salvelinus* // *Charrs: Salmonid Fishes of the Genus Salvelinus*. The Hague: Dr. W. Junk Publ., 1980. P. 441–480.
24. Ber R., Daniel V. Structure and sequence of the growth hormone-encoding gene from *Tilapia nilotica* // *Gene*. 1992. Vol. 113. P. 245–250.
25. Ber R., Daniel V. Sequence analysis suggests a recent duplication of growth hormone encoding gene in *Tilapia nilotica* // *Gene*. 1993. Vol. 125. P. 143–150.
26. Bernardi G., D'Onofrio G., Caccio S., Bernardi G. Molecular phylogeny of bony fishes, based on the amino acid sequence of the growth hormone // *Journal of Molecular Evolution*. 1993. Vol. 37, № 6. P. 644–649.
27. Bernardini S., Argenton F., Vianello S., Colombo L., Bortolussi M. Regulatory regions in the promoter and third intron of the growth hormone gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum // *General and Comparative Endocrinology*. 1999. Vol. 116. P. 261–271.

28. Björnsson B.T. The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance // *Fish Physiology and Biochemistry*. 1997. Vol. 17. P. 9–24.
29. Boguszewski C.L., Svensson P.A., Jansson T., Clark R., Carlsson L.M.S., Carlsson B. Cloning of two novel growth hormone transcripts expressed in human placenta // *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1998. Vol. 83, № 8. P. 2878–2885.
30. Bolton J.P., Collie N.L., Kawauchi H., Hirano T. Osmoregulatory actions of growth hormone in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // *Journal of Endocrinology*. 1987. Vol. 112. P. 63–68.
31. Breathnach R., Chambon R. Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins // *Annual Review of Biochemistry*. 1981. Vol. 50. P. 349–383.
32. Buggiotti L., Hellstrom M.A., Primmer C.R. Characterization of the first growth hormone gene sequence for a passerine bird – the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) // *DNA Sequence*. 2006. Vol. 17, № 6. P. 401–406.
33. Buggiotti L., Primmer C.R. Molecular evolution of the avian growth hormone gene and comparison with its mammalian counterpart // *Journal of Evolutionary Biology*. 2006. Vol. 19, № 3. P. 844–854
34. Byrne C.R., Wilson B.W., Ward K.A. The isolation and characterisation of the ovine growth hormone gene // *Australian Journal of Biological Sciences*. 1987. Vol. 40, № 4. P. 459–468.
35. Campbell M.A., Lopez J.A., Sado T., Miya M. Pike and salmon as sister taxa: Detailed intraclade resolution and divergence time estimation of Esociformes + Salmoniformes based on whole mitochondrial genome sequence // *Gene*. 2013. Vol. 530. P. 57–65.
36. Casanueva F.F., Camina J.P., Carreira M.C., Pazos Y., Varga J.L., Schally A.V. Growth hormone-releasing hormone as an agonist of the ghrelin receptor GHS-R1a // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. Vol. 105, № 51. P. 20452–20457.

37. *Castro-Peralta F., Barrera-Saldana H.A.* Cloning and sequencing of cDNA encoding the cat growth hormone // *Cene*. 1995. Vol. 160, № 2. P. 311–312.
38. *Chang Y.S., Liu C.S., Huang F.L., Lo T.B.* The primary structures of growth hormones of three cyprinid species: bighead carp, silver carp, and grass carp // *General and comparative endocrinology*. 1992. Vol. 87. P. 385–393.
39. *Chao S.C., Pan F.M., Chang W.C.* Purification of carp growth hormone and cloning of the complementary DNA // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1989. Vol. 1007. P. 233–236.
40. *Chawla, R.J., Parks, J.S. Rudman, D.* Structural variants of human growth hormone: biochemical, genetic and clinic aspects // *Annual review of medicine*. 1983. Vol. 34. P. 519–547.
41. *Chen T.T., Agellon L.B., Lin C.M., Tsai H.J., Zhang P., Gonzalez-Villasenor L.I., Powers D.A.* Evolutionary implications of two rainbow trout growth hormone genes // *Fish Physiology and Biochemistry*. 1989. Vol. 7. P. 381–385.
42. *Chen E.Y., Liao Y.C, Smith D.H., Barrera-Saldana H.A., Gelinas R.E., Seeburg P.H.* The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution // *Genomics*. 1989. Vol. 4, № 4. P. 479–497.
43. *Chen Y., Wang Y., He S., Zhu Z.* Cloning and sequencing of the growth hormone gene of large yellow croaker and its phylogenetic significance // *Biochemical Genetics*. 2004. Vol. 42. P. 365–375.
44. *Chiou C.S., Chen H.T., Chang W.C.* The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from the common carp (*Cyprinus carpio*) // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1990. Vol. 1087. P. 91–94.
45. *Christiansen J.S., Reist J.D., Brown R.J., Brykov V.A., Christiansen G., Christoffersen K., Cott P., Crane P., Dempson J.B., Docker M., Dunmall K., Finstad A., Gallucci V.F., Hammar J., Harris L.N., Heino J., Vanov E., Karamushko O.V., Kirillov A., Kucheryavyy A., Lehtonen H., Lynghammar A., Mecklenburg C.W., Moller P.D.R., Mustonen T., Oleinik A.G., Power M., Reshetnikov Y.S., Romanov V.I., Sandlung O.T., Sawatzky C.D., Svenning*

- M., Swanson H.K., Wrona F.J.* Fishes. In: Arctic Biodiversity Assessment. Status and trends in Arctic biodiversity. Ed. H. Meltofte. Akureyri: Conservation of Arctic Flora and Fauna, 2013. P. 192–245.
46. *Clements M.D., Bart H.L., Hurley D.L.* Isolation and characterization of two distinct growth hormone cDNAs from the tetraploid smallmouth buffalofish (*Ictiobus bubalus*) // *General and Comparative Endocrinology*. 2004. Vol. 136. P. 411–418.
 47. *Cohen L.E., Hashimoto Y., Zanger K., Wondisford F., Radovick S.* CREB-independent regulation by CBP is a novel mechanism of human growth hormone gene expression // *Journal of Clinical Investigation*. 1999. Vol. 104. P. 1123–1128.
 48. *Coker A., Arman A.* Human growth hormone // *Advances in Molecular Biology*. 2009. Vol. 3, № 1-2. P. 9–16.
 49. *Comeron J.M., Kreitman M.* Population, evolutionary and genomic consequences of interference selection // *Genetics*. 2002. Vol. 161. P. 389–410.
 50. *Cooke N.E., Ray J., Emery J.G., Liebhaber S.A.* Two distinct species of human growth hormone-variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone proteins // *Journal of Biological Chemistry*. 1988. Vol. 263, № 18. P. 9001–9006.
 51. *Crete-Lafrenière A., Weir L.K., Bernatchez L.* Framing the salmonidae family phylogenetic portrait: A more complete picture from increased taxon sampling // *Public Library of Science one*. 2012. Vol. 7, № 10: e46662.
 52. *Cronin M.J.* Pioneering recombinant growth hormone manufacturing: pounds produced per mile of height // *The Journal of Pediatrics*. 1997. Vol. 131, № 1(2). P. 5–7.
 53. *Das P., Meyer L., Seyfert H.M., Brockmann G., Schwerin M.* Structure of the growth hormone encoding gene and its promoter in mice // *Gene*. 1996. Vol. 169, № 2. P. 209–213.

54. *DeNoto F.M., Moore D.D., Goodman H.M.* Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing // *Nucleic Acids Research*. 1981. Vol. 9, № 15. P. 3719–3730.
55. *Devlin R.H.* Sequence of sockeye salmon type 1 and 2 growth hormone genes and the relationship of rainbow trout with Atlantic and Pacific salmon // *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1993. Vol. 50. P. 1738–1748.
56. *Dong H., Zeng L., Duan D., Zhang H., Wang Y., Li W., Lin H.* Growth hormone and two forms of insulin-like growth factor I in the giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*): molecular cloning and characterization of tissue distribution // *Fish Physiology and Biochemistry*. 2010. Vol. 36. P. 201–212.
57. *Driscoll M.D., Sathya G., Klinge C.M., Hilf R., Bambara R.* Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen responsible elements // *Journal of Biological Chemistry*. 1998. Vol. 273, № 45. P. 29321–29330.
58. *Du S.J., Gong Z., Fletcher G.L., Shears M.A., King M.J., Idler D.R., Hew C.L.* Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an “all fish” chimeric growth hormone gene construct // *Nature Biotechnology*. 1992. Vol. 10. P. 176–181.
59. *Du S.J., Devlin R.H., Hew C.L.* Genomic structure of growth hormone genes in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): presence of two functional genes, GH-I and GH-II, and a male-specific pseudogene, GH- ψ // *DNA and Cell Biology*. 1993. Vol. 12, № 8. P. 739–751.
60. *Edgar R.C.* Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucleic Acids Research*. 2004. Vol. 32, № 5. P. 1792–1797.
61. *Fay J.C., Wu C.I.* Hitchhiking under positive Darwinian selection // *Genetics*. 2000. Vol. 155. P. 1405–1413.

62. *Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // *Evolution*. 1985. Vol. 39. P. 783–791.
63. *Fishman J.B., Wilhelmi A.E., Russell J.A.* A Crystalline pituitary protein with high growth activity // *Science*. 1947. Vol. 106, № 2756. P. 402–402.
64. *Fiddes J.C., Seeburg P.H., DeNoto F.M., Hallewell R.A., Baxter J.D., Goodman H.M.* Structure of genes for human growth hormone and chorionic somatomammotropin // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979. Vol. 76, №9. P. 4294–4298.
65. *Forbes S.H., Knudsen K.L., North T.W., Allendorf F.W.* One of two growth hormone genes in coho salmon is sex-linked // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994. Vol. 91, № 5. P. 1628–1631.
66. *Force A., Lynch M., Pickett F.B., Amores A., Yan Y., Postlethwait J.* Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations // *Genetics*. 1999. Vol. 151, № 4. P. 1531–1545.
67. *Forsyth I.A., Wallis M.* Growth hormone and prolactin – molecular and functional evolution // *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2002. Vol. 7, №. 3. P. 291–312.
68. *Gazave E., Marques-Bonet T., Fernando O., Charlesworth B., Navarro A.* Patterns and rates of intron divergence between human and chimpanzees // *Genome Biology*. 2007. Vol. 8, № 2: R21.
69. *Gordon D.F., Quick D.P., Erwin C.R., Donelson J.E., Maurer R.A.* Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene // *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1983. Vol. 33, № 1. P. 81–95.
70. *Han M.V., Demuth J.P., McGrath C.L., Casola C., Hahn M.W.* Adaptive evolution of young gene duplicates in mammals // *Genome Research*. 2009. Vol. 19. P. 859–867.
71. *Haro L.S., Lewis U.J., Garcia M., Bustamante J., Martinez A.O., Ling N.C.* Glycosylated human growth hormone (hGH): a novel 24 kDa hGH-N

- variant // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996. Vol. 228, № 2. P. 549–556.
72. Harper M.E., Barrera-Saldana H.A., Saunders G.F. Chromosomal localization of the human placental lactogen-growth hormone gene cluster to 17q22-24 // *American Journal of Human Genetics*. 1982. Vol. 34, № 2. P. 227–234.
73. Hew C.L., Trinh K.Y., Du S.J., Song S. Molecular cloning and expression of salmon pituitary hormones // *Fish Physiology and Biochemistry*. 1989. Vol. 7. P. 375–380.
74. Hirt H., Kimelman J., Birnbaum M.J., Chen E.Y., Seeburg P.H., Eberhardt N.L., Barta A. The human growth hormone locus: structure, evolution and allelic variation // *DNA*. 1987. Vol. 6. P. 59–70.
75. Hong Y., Schartl M. Sequence of the growth hormone (GH) gene from the silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and evolution of the GH genes in vertebrates // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1993. Vol. 1174. P. 285–288.
76. Huelsenbeck J.P., Ronquist F. MRBAYES: bayesian inference of phylogeny // *Bioinformatics*. 2001. Vol. 17. P. 754–755.
77. Hughes A.L. The evolution of functionally novel proteins after gene duplication // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 1994. Vol. 256. P. 119–124.
78. Ip S.C.Y., Lau J.S., Au W.L., Leung F.C. Characterization of the 59-flanking transcriptional regulatory region of chicken growth hormone gene // *Experimental Biology and Medicine*. 2004. Vol. 229. P. 640–649.
79. Johansen B., Johnsen O.C., Valla S. The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from Atlantic salmon (*Salmo salar*) // *Gene*. 1989. Vol. 77. P. 317–324.
80. Jones B.K., Monks B.R., Liebhaber S.A., Cooke N.E. The human growth hormone gene is regulated by a multicomponent locus control region // *Molecular and cellular biology*. 1995. Vol. 15, № 12. P. 7010–7021.

81. *Kansaku N., Soma A., Furukawa S., Hiyama G., Okabayashii H., Guemene D., Kuhnlein U., Zadworny D.* Sequence of the domestic duck (*Anas platyrhynchos*) growth hormone-encoding gene and genetic variation in the promoter region // *Animal Science Journal*. 2008. Vol. 79. P.163–170.
82. *Kawauchi H., Moriyama S., Yasuda A., Yamaguchi K., Shirahata K., Kubota J., Hirano T.* Isolation and characterization of chum salmon growth hormone // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1986. Vol. 244, № 2. P. 542–552.
83. *Kawauchi H., Suzuki K., Yamazaki T., Moriyama S., Nozaki M., Yamaguchi K., Takahashi A., Youson J., Sower S.A.* Identification of growth hormone in the sea lamprey, an extant representative of a group of the most ancient vertebrates // *Endocrinology*. 2002. Vol. 143, № 12. P. 4916–4921.
84. *Klein-Hitpass L., Ryffel G.U., Heitlinger E., Cato A.C.B.* A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor // *Nucleic Acids Research*. 1988. Vol. 16. P. 647–663.
85. *Koren Y., Sarid S., Ber R., Daniel V.* Carp growth hormone: molecular cloning and sequencing of cDNA // *Gene*. 1989. Vol. 77. P. 309–315.
86. *Kosakovsky Pond S.L., Frost S.D.* Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection // *Molecular Biology and Evolution*. 2005a. Vol. 22, № 5. P. 1208–1222.
87. *Kosakovsky Pond S.L., Frost S.D.* A genetic algorithm approach to detecting lineage-specific variation in selection pressure // *Molecular Biology and Evolution*. 2005b. Vol. 22, № 3. P. 478–485.
88. *Law M.S., Cheng K.W., Fung T.Z., Chan Y.H., Yu K.L., Chan K.M.* Isolation and characterization of two distinct growth hormone cDNAs from the goldfish, *Carassius auratus* // *Archives of biochemistry and biophysics*. 1996. Vol. 330, №. 1. P. 19–23.

89. *Lemaire C., Warit S., Panyim S.* Giant catfish *Pangasianodon gigas* growth hormone-encoding cDNA: cloning and sequencing by one-sides polymerase chain reaction // *Gene*. 1994. Vol. 149, № 2. P. 271–276.
90. *Lewis U.J., Singh R.N.P., Bonewald L.F., Lewis L.J., Vanderlaan W.P.* Human growth hormone: additional members of the complex // *Endocrinology*. 1979. Vol. 104, № 5. P. 1256–1265.
91. *Lewis U.J., Singh R.N.P., Bonewald L.F., Seavey B.K.* Altered proteolytic cleavage of human growth hormone as a result of deamidation // *Journal of Biological Chemistry*. 1981. Vol. 256, № 22. P. 11645–11650.
92. *Li C.H., Evans H.M., Simpson M.E.* Isolation and properties of the anterior hypophyseal growth hormone // *Journal of Biological Chemistry*. 1945. Vol. 159. P. 353–366.
93. *Li C.H., Papkoff H.* Preparation and properties of growth hormone from human and monkey pituitary glands // *Science*. 1956. Vol. 124, № 3235. P. 1293–1294.
94. *Liao M.J., Zhu M.Y., Zheng X., Zhang Z.H., Zhang A.J.* cDNA cloning of growth hormone from giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) and its expression in *Escherichia coli* // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2003. Vol.135. P. 109–116.
95. *Lioupis A., Wallis O.C., Wallis M.* Cloning and characterisation of the gene encoding red deer (*Cervus elaphus*) growth hormone: implications for the molecular evolution of growth hormone in artiodactyls // *Journal of Molecular Endocrinology*. 1997. Vol. 19, № 3. P. 259–266.
96. *Lioupis A., Nevo E., Wallis M.* Cloning and characterisation of the gene encoding mole rat (*Spalax ehrenbergi*) growth hormone // *Journal of Molecular Endocrinology*. 1999. Vol. 22. P. 29–36.
97. *Liu J.C., Makova K.D., Adkins R.M., Gibson S.* Episodic evolution of growth hormone in primates of the species specificity of human growth hormone receptor // *Molecular Biology and Evolution*. 2001. Vol. 18, № 6. P. 945–953.

98. Lynch M., Force A. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization // *Genetics*. 2000. Vol. 154, № 1. P.459–473.
99. Magadum S., Banerjee U., Murugan P., Gangapur D., Ravikesavan R. Gene duplication as a major force in evolution // *Journal of Genetics*. 2013. Vol. 92, №. 1. P. 155–161.
100. Malagon M.M., Luque R.M., Ruiz-Guerrero E., Rodriguez-Pacheco F., Garcia-Navarro S., Casanueva F.F., Gracia-Navarro F., Castano J.P. Intracellular signaling mechanisms mediating ghrelin-stimulated growth hormone release in somatotropes // *Endocrinology*. 2003. Vol. 144, № 12. P. 5372–5380.
101. Male R., Nerland A.N., Lorens J.B., Telle W., Lossius I., Totland G.K. The complete nucleotide sequence of the Atlantic salmon growth hormone I gene // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1992. Vol. 1130. P. 345–348
102. Maniou Z., Wallis O.C., Wallis M. Episodic molecular evolution of pituitary growth hormone in Cetartiodactyla // *Journal of Molecular Evolution*. 2004. Vol. 58. P. 743–753.
103. McKay S.J., Devlin R.H., Smith M.J. Phylogeny of Pacific salmon and trout based on growth hormone type-2 and mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 DNA sequences // *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1996. Vol. 53. P. 1165–1176.
104. McKay S.J., Trautner J., Smith M.J., Koop B.F., Delvin R.H. Evolution of duplicated growth hormone genes in autotetraploid salmonid fishes // *Genome*. 2004. Vol. 47. P. 714–723.
105. Meisinger M.A., Cirillo V.J., Davis G.E., Reisfeld R.A. Amino acid composition of human growth hormone // *Nature*. 1964. Vol. 201. P. 820–821.
106. Meyer D.J., Campbell G.S., Cochran B.H., Argetsinger L.S., Larner A.C., Finbloom D.S., Carter-Su C., and Schwartz J. Growth hormone induces a DNA binding factor related to the interferon-stimulated 91-kDa

- transcription factor // *Journal of Biological Chemistry*. 1994. Vol. 269, № 7. P. 4701–4704.
107. *Miller W.L., Eberhardt N.L.* Structure and evolution of the growth hormone gene family // *Endocrine reviews*. 1983. Vol. 4, № 2. P. 97–130.
108. *Molhoj M., Degan F.D.* Leader sequences are not signal peptides // *Nature Biotechnology*. 2004. Vol. 22, № 12. P. 1502–1502.
109. *Montminy M.R., Gonzalez G.A., Yamamoto K.K.* Regulation of cAMP-inducible genes by CREB // *Trends in Neurosciences*. 1990. Vol. 13. P. 184–188.
110. *Nei M., Gojobori T.* Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions // *Molecular Biology and Evolution*. 1986. Vol. 3, № 5. P. 418–426.
111. *Niall H.D., Hogan M.L., Sauer R, Rosenblum I.Y., Greenwood F.C.* Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1971. Vol. 68, № 4. P. 866–869.
112. *Oakley T.H., Phillips R.B.* Phylogeny of Salmonine fishes based on growth hormone introns: Atlantic (*Salmo*) and Pacific (*Oncorhynchus*) salmon are not sister taxa // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1999. Vol. 11, № 3. P. 381–393.
113. *Ohno S.* Evolution by gene duplication. New York: Springer Verlag, 1970
114. *Oleinik A.G., Skurikhina L.A., Brykov V.A.* Divergence of *Salvelinus* species from northeastern Asia based on mitochondrial DNA // *Environmental Biology of Fishes*. 2007. Vol. 16. P. 87–98.
115. *Ometto L., De Lorenzo D., Stephan W.* Contrasting patterns of sequence divergence and base composition between *Drosophila* introns and intergenic regions // *Biology Letters*. 2006. Vol. 2, № 4. P. 604–607.
116. *Osinov A.G., Lebedev V.S.* Salmonid fishes (Salmonidae, Salmoniformes): the systematic position in the superorder Protocanthopterygii, the main

- stages of evolution, and molecular dating // *Journal of Ichthyology*. 2004. Vol. 44, № 9. P. 690–715.
117. *Panicz R., Sadowski J., Drozd R.* Genetic and structural characterization of the growth hormone gene and protein from tench, *Tinca tinca* // *Fish Physiology and Biochemistry*. 2012. Vol. 38, № 6. P. 1645–1653.
118. *Peyush P., Moriyama S., Takahashi A., Kawauchi H.* Molecular cloning of growth hormone complementary DNA in barfin flounder (*Verasper moseri*) // *Marine Biotechnology*. 2000. Vol. 2. P. 21–26.
119. *Phillips R.B., Matsuoka M.P., Konkel N.R., McKay S.* Molecular systematic and evolution of the growth hormone introns in the Salmoninae // *Environmental Biology of Fishes*. 2004. Vol. 69. P. 433–440.
120. *Pinheiro J.S., Wolff J.L.C., de Carvalho Araújo R., Hilsdorf A.W.S.* Molecular cloning and sequence analysis of growth hormone cDNA of neotropical freshwater fish Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) // *Genetics and Molecular Biology*. 2008. Vol. 31, № 1. P. 381–384.
121. *Posada D., Crandall K.A.* Modeltest: testing the model of DNA substitution // *Bioinformatic*. 1998. Vol. 14, № 9. P. 817–818.
122. *Posada D., Buckley T.R.* Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests // *Systematic Biology*. 2004. Vol. 53, № 5. P. 793–808.
123. *Raben M.S., Westermeyer V.M.* Recovery of growth hormone in purification of corticotrophin // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1951. Vol. 78, № 2. P. 550–551.
124. *Raben M.S.* Chromatographic separation of growth hormone and other peptides // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1956. Vol. 93, № 2. P. 338–340.
125. *Raben M.S.* Treatment of a pituitary dwarf with human growth hormone // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1958. Vol. 18, № 8. P. 901–903.

126. *Rajesh R., Majumdar K.C.* A comparative account of the structure of the growth hormone encoding gene and genetic interrelationship in six species of the genus *Labeo* // *Fish Physiology and Biochemistry*. 2007. Vol. 33. P. 311–333.
127. *Ramsden S.D., Brinkmann H., Hawryshyn C.W., Taylor J.S.* Mitogenomics and the sister of Salmonidae // *Trends in Ecology and Evolution*. 2003. Vol. 18, № 12. P. 607–610.
128. *Rentier-Delrue F., Swennen D., Mercier L., Lion M., Benrubi O., Martial J.A.* Molecular cloning and characterization of two forms of trout growth hormone cDNA: expression and secretion of tGH-II by *Escherichia coli* // *DNA*. 1989. Vol. 8, № 2. P. 109–117.
129. *Rhodes S.J., Rosenfeld M.G.* Molecular involvement of the Pit-1 gene in anterior pituitary cells commitment // *Journal of Animal Science*. 1996. Vol. 74. P. 94–106.
130. *Ronquist F., Huelsenbeck J.P.* MRBAYES 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics*. 2003. Vol. 19. P. 1572–1574.
131. *Ryynänen H.J., Primmer C.R.* Varying signals of the effects of natural selection during teleost growth hormone gene evolution // *Genome*. 2006. Vol. 49. P. 42–53.
132. *Santome J.A., Dellacha J.M., Paladini A.C., Pena C., Biscoglio M.J., Daurat S.T., Poscus E., Wolfenstein C.E.M.* Primary structure of bovine growth hormone // *European journal of biochemistry*. 1973. Vol. 37, № 1. P. 164–170.
133. *Sekar M., Singh S.D., Gupta S.* Cloning and characterization of *Pangasianodon hypophthalmus* growth hormone gene and its heterologous expression // *Applied biochemistry and biotechnology*. 2014. Vol. 173. P. 1446–1468.
134. *Sekine S., Mizukami T., Nishi T., Kuwana Y., Saito A., Sato M., Itoh S., Kawauchi H.* Cloning and expression of cDNA for salmon growth

- hormone in *Escherichia coli* // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1985. Vol. 82. P. 4306–4310.
135. Selby M.J., Barta A., Baxter J.D., Bell G.I., Eberhardt N.L. Analysis of a major human chorionic somatomammotropin gene // Journal of biological chemistry. 1984. Vol. 259, № 21. P. 13131–13138.
136. Shoji K., Ohara E., Watahiki M., Yoneda Y. Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding the mink growth hormone // Nucleic Acids Research. 1990. Vol. 18, №. 21. P. 6424–6424.
137. Slater E.P., Baxter J.D., Eberhardt N.L. Evolution of the growth hormone gene family // American Zoologist. 1986. Vol. 26, № 4. P. 939–949.
138. Su Y., Liebhaber S.A., Cooke N. The Human growth hormone gene cluster locus control region supports position-independent pituitary- and placenta-specific expression in the transgenic mouse // Journal of Biological Chemistry. 2000. Vol. 275, № 11. P. 7902–7909.
139. Such-Sanmartin G., Bosch J., Segura J, Wu M., Du H., Chen G., Wang S., Vila-Perello M., Andreu D., Gutierrez-Gallego R. Characterisation of the 5 kDa growth hormone isoform // Growth Factors. 2008. Vol. 26, №. 3. P. 152–162.
140. Swofford, D.L. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sunderland, MA: Sinauer Associates. 2002.
141. Tamaki Y., Kimball R.T., Braun E.L., Braun M.J. Duplication of accelerated evolution and growth hormone gene in passerine birds // Journal of Molecular Evolution. 2008. Vol. 25, № 2. P. 352–361.
142. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Molecular Biology and Evolution. 2011. Vol. 28. P. 2731–2739.
143. Tanaka M., Hosokawa Y., Watahiki M., Nakashima K. Structure of the chicken growth hormone-encoding gene and its promoter region // Gene. 1992. Vol. 112. P. 235–239.

144. *Tanaka M., Toma Y., Ohkubo T., Sudo S., Nakashima K.* Sequence of the flounder (*Paralichthys olivaceus*) growth hormone-encoding gene and its promoter region // *Gene*. 1995. Vol. 165. P. 321–322.
145. *Tannenbaum G.S.* Neuroendocrine control of growth hormone secretion // *Acta paediatrica Scandinavica*. Supplement. 1991. Vol. 372. P. 5–16.
146. *Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.* CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucleic Acids Research*. 1994. Vol. 22. P. 4673–4680.
147. *Tuteja R.* Type I signal peptidase: an overview // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2005. Vol. 441. P. 107–111.
148. *Valinsky A., Shani M., Gootwine E.* Restriction fragment length polymorphism in sheep at the growth hormone locus is the result of variation in gene number // *Animal biotechnology*. 1990. Vol. 1, № 2. P. 135–144.
149. *Venkatesh B., Brenner S.* Genomic structure and sequence of the pufferfish (*Fugu rubripes*) growth hormone-encoding gene: a comparative analysis of teleost growth hormone genes // *Gene*. 1997. Vol. 187. P. 211–215.
150. *Vize P.D., Wells J.R.E.* Isolation and characterization of the porcine growth hormone gene // *Gene*. 1987. Vol. 55, № 2. P. 339–344.
151. *Von Schalburg K.R., Yazawa R., de Boer J, Lubieniecki K.P., Goh B., Straub C.A., Beetz-Sargent M.R., Robb A., Davidson W.S., Devlin R.H., Koop B.F.* Isolation, characterization and comparison of Atlantic and chinook salmon growth hormone 1 and 2 // *BMC Genomics*. 2008. Vol. 9:522
152. *Vos A.M., Ultsch M., Kossiakoff A.A.* Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex // *Science*. 1992. Vol. 255, № 5042. P. 306–312.
153. *Walker W.H., Fitzpatrick S.L., Barrera-Saldana H.A., Resendez-Perez D., Saunders G.F.* The human placental lactogen genes: structure, function,

- evolution and transcriptional regulation // *Endocrine Reviews*. 1991. Vol. 12, № 4. P. 316–328.
154. Wallis M. Variable evolutionary rates in the molecular evolution of mammalian growth hormones // *Journal of Molecular Evolution*. 1994. Vol. 38, № 6. P. 619–627.
155. Wallis O.C., Wallis M. Cloning and characterization of the rabbit growth hormone-encoding gene // *Gene*. 1995. Vol. 163, № 2. P. 253–256.
156. Wallis M. The molecular evolution of vertebrate growth hormones: a pattern of near-stasis interrupted by sustained bursts of rapid change // *Journal of Molecular Evolution*. 1996. Vol. 43, № 2. P. 93–100.
157. Wallis M. Function switching as a basis for bursts of rapid change during the evolution of pituitary growth hormone // *Journal of Molecular Evolution*. 1997. Vol. 44, № 3. P. 348–350.
158. Wallis M., Lioupis A., Wallis O.C. Duplicate growth hormone genes in sheep and goat // *Journal of Molecular Endocrinology*. 1998. Vol. 21. P. 1–5.
159. Wallis O.C., Wallis M. Molecular evolution of growth hormone (GH) in Cetartiodactyla: cloning and characterization of the gene encoding GH from a primitive ruminant, the chevrotain (*Tragulus javanicus*) // *General and Comparative Endocrinology*. 2001. Vol. 123, № 1. P. 62–72.
160. Wallis O.C., Zhang Y.P., Wallis M. Molecular evolution of GH in primates: characterisation of the GH genes from slow loris and marmoset defines an episode of rapid evolutionary change // *Journal of Molecular Endocrinology*. 2001. Vol. 26. P. 249–258.
161. Watahiki M., Yamamoto M., Yamakawa M., Tanaka M., Nakashima K. Conserved and unique amino acid residues in the domains of the growth hormones. Flounder growth hormone deduced from the cDNA sequence has the minimal size in the growth hormone prolactin gene family // *Journal of Biological Chemistry*. 1989. Vol. 264, № 1. P. 312–316.

162. Wells J.A. Binding in the growth hormone receptor complex // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996. Vol. 93, № 1. P. 1–6.
163. Westrich K.M., Konkol N.R., Matsuoka M.P., Phillips R.B. Interspecific relationships among charrs based on phylogenetic analysis of nuclear growth hormone intron sequences // Environmental Biology of Fishes. 2002. Vol. 64. P.217–222.
164. Wu G., Sun Y., Zhu Z. Growth hormone gene transfer in common carp // Aquatic Living Resources. 2003. Vol. 16. P. 416–420.
165. Xu B.C., Wang X., Darus C.J., Kopchick J.J. Growth hormone promotes the association of transcription factor STAT5 with the growth hormone receptor // Journal of Biological Chemistry. 1996. Vol. 271, №. 33. P. 19768–19773.
166. Yamada S., Hata J., Yamashita S. Molecular cloning of fish Pit-1 cDNA and its functional binding to promoter of gene expressed in the pituitary // Journal of Biological Chemistry. 1993. Vol. 268, № 32. P. 24361–24366.
167. Yamano Y., Abe M., Mikawa S., Kioka N., Manabe E., Sakai H., Komano T., Utsumi K., Iritani A. Structural analysis of repetitive DNA sequences the goat growth hormone gene region // Agricultural and biological chemistry. 1991. Vol. 55, № 3. P. 633–639.
168. Yang B.Y., Chan K.M., Lin C.M., Chen T.T. Characterization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth hormone 1 gene and the promoter region of growth hormone 2 gene // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1997. Vol. 340, № 2. P. 359–368.
169. Ye C., Li Y., Shi P., Zhang Y. Molecular evolution of growth hormone gene family in old world monkeys and hominoids // Gene. 2005. Vol. 350, № 2. P. 183–192.
170. Yowe D. L., Epping R. J. Cloning of the barramundi growth hormone-encoding gene: a comparative analysis of higher and lower vertebrate GH genes // Gene. 1995. Vol. 162. P. 255–259.

171. Yuri T., Kimball R.T., Braun E.L., Braun M.J. Duplication of accelerated evolution and growth hormone gene in passerine birds // *Molecular Biology and Evolution*. 2008. Vol. 25, № 2. P. 352–361.
172. Zhang J. Evolution by gene duplication: an update // *Trends in Ecology and Evolution*. 2003. Vol.18, № 6. P. 292–298.
173. Zhu Z., He L., Chen T.T. Primary-structural and evolutionary analyses of the growth-hormone gene from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) // *European journal of biochemistry*. 1992. Vol. 207. P. 643–648.
174. Zhu L., Zhang Y., Zhang W., Yang S., Chen J-Q., Tian D. Pattern of exon-intron variation of genes in eucariotic genomes // *BMC Genomics*. 2009. Vol. 10: 47.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица

p-дистанции между интронами (C+D) генов GH1 и GH2 лососёвых рыб

№	Вид	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	<i>S. curilus</i> gh1																						
2	<i>S. malma</i> gh1	0,34																					
3	<i>S. taranetzi</i> gh1	0,63	0,62																				
4	<i>S. levanidovi</i> gh1	0,46	0,34	0,62																			
5	<i>S. alpinus</i> gh1	0,91	0,79	1,08	0,68																		
6	<i>S. namaycush</i> gh1	0,91	0,80	1,08	0,68	0,80																	
7	<i>S. leucomaenis</i> gh1	0,68	0,68	0,85	0,68	0,96	0,91																
8	<i>S. fontinalis</i> gh1	1,31	1,19	1,36	1,19	1,36	1,19	1,30															
9	<i>O. nerka</i> gh1	5,44	5,47	5,65	5,47	5,53	5,53	5,58	5,46														
10	<i>O. gorbuscha</i> gh1	6,22	6,25	6,42	6,25	6,25	6,31	6,25	6,35	1,73													
11	<i>O. keta</i> gh1	5,69	5,73	5,91	5,73	5,79	5,77	5,84	5,71	1,23	1,77												
12	<i>O. tshawytscha</i> gh1	5,50	5,54	5,71	5,42	5,59	5,60	5,53	5,46	2,54	3,44	3,11											
13	<i>O. masou</i> gh1	5,57	5,67	5,79	5,67	5,73	5,73	5,72	5,77	3,55	4,35	3,88	4,02										
14	<i>O. kisutch</i> gh1	5,45	5,43	5,49	5,43	5,49	5,49	5,48	5,53	3,14	3,82	3,29	3,17	2,87									
15	<i>O. mykiss</i> gh1	5,36	5,39	5,45	5,39	5,45	5,58	5,45	5,55	2,94	3,92	3,58	3,02	3,90	3,25								
16	<i>O. clarki</i> gh1	5,42	5,45	5,63	5,45	5,51	5,65	5,51	5,56	2,83	3,37	3,46	3,14	4,07	3,58	1,31							
17	<i>S. salar</i> gh1	6,06	5,92	5,98	5,92	6,04	5,94	5,92	5,90	7,42	8,21	7,77	7,25	7,97	7,59	7,36	7,30						
18	<i>S. trutta</i> gh1	5,97	5,95	6,01	5,95	5,94	5,97	5,94	5,99	7,30	8,27	7,83	7,35	7,91	7,53	7,41	7,30	2,76					
19	<i>A. ohridana</i> gh1	6,14	6,06	6,12	6,06	6,17	6,19	6,05	6,10	7,90	8,91	8,26	7,77	8,46	8,06	8,04	7,99	3,22	2,72				
20	<i>P. perryi</i> gh1	4,84	4,76	4,99	4,82	4,99	4,84	4,76	4,98	6,80	7,64	7,13	6,57	7,32	6,80	6,67	6,67	4,58	4,64	5,16			
21	<i>H. hucho</i> gh1	7,16	7,07	7,36	7,08	7,13	7,03	7,07	7,23	8,66	9,51	8,99	8,47	9,41	8,71	8,78	8,83	6,31	6,34	6,97	3,75		
22	<i>H. taimen</i> gh1	7,11	7,08	7,14	7,08	7,14	7,10	7,02	7,18	7,88	8,69	8,13	7,81	8,10	7,94	6,84	7,19	7,77	7,99	8,62	7,15	5,00	
23	<i>S. curilus</i> gh2	7,70	7,74	7,66	7,67	7,88	7,57	7,59	7,73	8,82	9,85	9,00	8,88	9,54	9,02	8,74	8,81	7,91	7,67	8,55	6,94	9,39	8,32
24	<i>S. malma</i> gh2	7,41	7,45	7,37	7,38	7,59	7,27	7,29	7,44	8,55	9,57	8,71	8,61	9,26	8,74	8,46	8,54	7,84	7,60	8,48	6,74	9,33	8,32
25	<i>S. taranetzi</i> gh2	6,43	6,47	6,39	6,40	6,61	6,29	6,31	6,46	7,56	8,59	7,69	7,69	8,26	7,76	7,40	7,54	6,95	6,70	7,52	6,13	8,45	7,53
26	<i>S. levanidovi</i> gh2	7,84	7,88	7,80	7,81	8,02	7,64	7,73	7,87	8,94	9,96	9,05	8,94	9,59	9,13	8,86	8,93	7,97	7,73	8,60	7,01	9,57	8,44
27	<i>S. alpinus</i> gh2	7,86	7,96	7,89	7,89	8,11	7,79	7,81	7,96	9,03	10,0	9,22	9,10	9,76	9,23	8,95	9,03	8,05	7,88	8,75	7,07	9,53	8,52
28	<i>S. namaycush</i> gh2	7,70	7,74	7,66	7,67	7,88	7,57	7,59	7,73	8,98	10,0	9,17	9,05	9,71	9,18	8,76	8,84	7,87	7,50	8,51	6,91	9,35	8,29
29	<i>S. leucomaenis</i> gh2	7,70	7,73	7,66	7,66	7,88	7,56	7,58	7,58	9,35	10,3	9,55	9,41	10,0	9,54	9,27	9,28	8,29	7,94	8,93	7,20	9,70	8,57
30	<i>S. fontinalis</i> gh2	8,68	8,71	8,63	8,50	8,71	8,40	8,55	8,55	9,79	10,7	10,0	9,51	10,3	9,84	9,51	9,58	8,66	8,50	9,36	7,75	10,3	9,30
31	<i>O. gorbuscha</i> gh2	9,33	9,36	9,26	9,18	9,26	9,06	9,06	9,45	10,2	10,9	10,5	9,89	10,6	10,4	10,0	10,1	9,42	9,07	10,4	8,40	10,8	9,61
32	<i>O. nerka</i> gh2	8,93	8,97	8,88	8,89	8,88	8,61	8,62	8,96	9,96	10,5	10,1	9,63	10,4	9,79	9,71	9,80	9,06	8,81	10,1	7,92	10,3	8,95
33	<i>O. keta</i> gh2	8,31	8,35	8,27	8,28	8,35	8,10	8,11	8,34	9,36	10,2	9,51	9,14	9,76	9,14	8,99	9,14	8,19	8,09	9,19	7,11	9,69	8,32
34	<i>O. tshawytscha</i> gh2	8,35	8,38	8,30	8,31	8,38	8,21	8,14	8,37	9,76	10,6	9,90	9,53	10,2	9,60	9,39	9,39	8,70	8,19	9,36	7,27	9,79	8,34
35	<i>O. masou</i> gh2	9,62	9,54	9,28	9,55	9,41	9,24	9,27	9,65	10,7	11,1	10,9	10,3	10,8	10,4	9,96	10,2	9,01	8,78	9,88	8,22	10,3	9,13
36	<i>O. kisutch</i> gh2	9,66	9,68	9,61	9,54	9,68	9,37	9,45	9,67	10,7	11,7	10,8	10,6	11,1	10,6	10,4	10,5	9,81	9,53	10,5	8,28	10,6	9,35
37	<i>O. mykiss</i> gh2	8,92	8,95	8,88	8,88	8,95	8,71	8,72	8,95	10,2	11,1	10,3	10,0	10,6	9,99	9,93	9,94	9,15	8,58	9,74	7,85	10,3	8,92
38	<i>O. clarki</i> gh2	8,74	8,77	8,52	8,70	8,77	8,50	8,51	8,76	10,0	10,8	10,1	9,72	10,1	9,62	9,71	9,55	8,48	7,83	8,92	7,55	10,0	8,40
39	<i>S. salar</i> gh2	7,37	7,41	7,33	7,19	7,41	7,16	7,33	7,40	8,37	9,39	8,46	8,43	9,22	8,49	8,35	8,43	7,94	7,57	8,57	6,84	9,20	7,69
40	<i>S. trutta</i> gh2	7,42	7,45	7,38	7,39	7,53	7,28	7,30	7,45	8,54	9,56	8,71	8,54	8,98	8,40	8,25	8,33	7,84	7,48	8,61	6,69	8,99	7,55
41	<i>A. ohridana</i> gh2	7,77	7,80	7,73	7,74	7,88	7,64	7,65	7,80	9,15	10,0	9,34	9,15	9,60	9,00	8,87	8,80	8,17	7,81	8,81	7,27	9,38	8,06
42	<i>P. perryi</i> gh2	6,94	6,98	6,91	6,91	7,12	6,81	6,83	6,97	8,16	9,17	8,31	8,15	8,72	8,28	8,00	8,01	6,95	6,58	7,64	5,83	8,49	7,26
43	<i>H. hucho</i> gh2	9,41	9,44	9,52	9,28	9,19	9,01	9,43	9,43	10,6	11,6	11,0	10,3	11,1	10,1	10,0	10,4	9,28	9,09	9,70	8,21	10,6	8,45
44	<i>H. taimen</i> gh2	8,37	8,32	8,40	8,16	8,07	7,88	8,23	8,23	9,43	10,2	9,76	9,10	10,0	9,01	8,86	9,13	7,99	7,80	8,48	7,10	8,79	6,46
45	<i>B. lenok</i> gh1	8,45	8,51	8,51	8,52	8,42	8,23	8,42	8,33	9,55	10,4	9,89	9,29	10,2	9,29	9,32	9,59	8,24	8,21	8,43	7,49	9,75	9,85

Таблица (Продолжение)

№	Вид	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
1	<i>S. curilus</i> gh1																						
2	<i>S. malma</i> gh1																						
3	<i>S. taranetzi</i> gh1																						
4	<i>S. levanidovi</i>																						
5	<i>S. alpinus</i> gh1																						
6	<i>S. namavcush</i>																						
7	<i>S. leucomaenis</i>																						
8	<i>S. fontinalis</i> gh1																						
9	<i>O. nerka</i> gh1																						
10	<i>O. gorbuscha</i>																						
11	<i>O. keta</i> gh1																						
12	<i>O. tshawytscha</i>																						
13	<i>O. masou</i> gh1																						
14	<i>O. kisutch</i> gh1																						
15	<i>O. mykiss</i> gh1																						
16	<i>O. clarki</i> gh1																						
17	<i>S. salar</i> gh1																						
18	<i>S. trutta</i> gh1																						
19	<i>A. ohridana</i> gh1																						
20	<i>P. perrvi</i> gh1																						
21	<i>H. hucho</i> gh1																						
22	<i>H. taimen</i> gh1																						
23	<i>S. curilus</i> gh2																						
24	<i>S. malma</i> gh2	0,39																					
25	<i>S. taranetzi</i> gh2	0,90	0,95																				
26	<i>S. levanidovi</i>	1,01	1,30	1,59																			
27	<i>S. alpinus</i> gh2	0,39	0,67	1,18	1,30																		
28	<i>S. namavcush</i>	1,19	1,47	1,65	1,18	1,47																	
29	<i>S. leucomaenis</i>	2,25	2,57	2,83	2,36	2,44	2,56																
30	<i>S. fontinalis</i> gh2	2,54	2,82	3,00	2,46	2,82	2,58	3,40															
31	<i>O. gorbuscha</i>	5,18	5,42	5,38	5,10	5,42	5,61	5,43	6,09														
32	<i>O. nerka</i> gh2	4,47	4,69	4,57	4,29	4,69	4,75	4,88	5,27	2,10													
33	<i>O. keta</i> gh2	4,04	4,23	4,13	4,00	4,24	4,28	4,66	4,82	1,95	1,07												
34	<i>O. tshawytscha</i>	4,12	4,31	4,21	4,08	4,32	4,36	4,81	4,90	2,69	1,66	1,43											
35	<i>O. masou</i> gh2	5,14	5,48	5,37	5,25	5,48	5,37	5,62	6,12	4,05	3,45	2,99	2,31										
36	<i>O. kisutch</i> gh2	5,53	5,73	5,50	5,61	5,73	5,62	6,15	6,24	4,72	3,42	3,01	3,55	5,14									
37	<i>O. mykiss</i> gh2	4,70	4,90	4,73	4,66	4,90	4,94	5,32	5,41	3,59	2,63	2,25	2,48	3,81	4,01								
38	<i>O. clarki</i> gh2	4,74	4,89	4,85	4,77	4,97	4,85	5,31	5,71	3,16	2,50	2,00	2,03	3,22	3,65	1,48							
39	<i>S. salar</i> gh2	3,52	3,71	3,54	3,56	3,84	3,70	4,13	4,47	4,73	4,10	3,97	4,05	5,28	5,39	4,76	4,58						
40	<i>S. trutta</i> gh2	3,32	3,50	3,34	3,41	3,63	3,43	4,04	4,39	4,78	3,86	3,69	3,83	5,23	5,10	4,47	4,18	1,43					
41	<i>A. ohridana</i> gh2	3,88	4,07	3,90	3,97	4,19	3,92	4,60	4,94	5,72	4,78	4,46	4,60	5,56	5,81	5,25	4,40	1,98	0,92				
42	<i>P. perrvi</i> gh2	2,43	2,62	2,38	2,53	2,74	2,54	3,28	3,51	4,46	3,71	3,54	3,55	4,31	5,01	4,13	4,08	2,80	2,54	3,28			
43	<i>H. hucho</i> gh2	6,40	6,56	6,48	6,41	6,17	6,77	7,22	7,39	7,37	7,55	7,23	7,02	7,37	8,54	7,74	7,27	6,26	6,02	6,87	5,69		
44	<i>H. taimen</i> gh2	5,72	5,88	5,80	5,81	5,80	6,01	6,30	6,41	7,55	7,35	7,02	6,80	7,59	8,16	7,52	7,11	5,44	5,35	6,21	4,93	3,07	
45	<i>B. lenok</i> gh1	8,21	8,21	8,29	8,36	8,46	8,50	9,03	9,12	9,91	9,92	9,35	8,97	10,0	10,5	9,94	9,59	8,71	8,29	9,09	7,53	6,25	7,19