

А. А. САЗАНОВ, А. Л. САЗАНОВА

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА СОБАКИ И КОШКИ

Монография

---



Ленинградский государственный университет  
имени А.С. Пушкина

**А.А. Сазанов, А.Л. Сазанова**

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА СОБАКИ И  
КОШКИ**

Монография

Санкт-Петербург

2010

УДК 575.1 575.2

*Рецензенты:*

**А.В. Кулев**, кандидат педагогических наук, доцент кафедры естествознания и географии Ленинградского государственного университета имени А.С. Пушкина

**Т.В. Матвеева**, кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики и селекции Санкт-Петербургского государственного университета

**Сазанов А.А., Сазанова А.Л.** Молекулярная генетика собаки и кошки: монография / А.А. Сазанов, А.Л. Сазанова. - СПб.: ЛГУ им. А.С. Пушкина, 2010. – 124 с.

Монография посвящена вопросам молекулярной генетики собаки и кошки как представителей наиболее близких человеку видов домашних животных. Необходимые начальные сведения по основам молекулярной генетики приведены в первой и второй главах. Вопросы молекулярной организации геномов собаки и кошки, молекулярно-генетических механизмов наследования окрасов и наследственных аномалий освещены наиболее подробно.

Книга предназначена для широкого круга читателей: специалистов, студентов и преподавателей биологии, генетиков и селекционеров.

*Печатается по решению редакционно-издательского совета Ленинградского государственного университета имени А. С. Пушкина*

**ISBN 978-5-8290-1026-3**

©

Ленинградский государственный  
университет (ЛГУ)  
имени А. С. Пушкина, 2010

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ.....	
СПИСОК	
СОКРАЩЕНИЙ.....	
ГЛАВА I. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот	
1.1 Ядро и митохондрии	
1.2 Структура ДНК	
1.3 Репликация ДНК	
1.4 Теломеры. Теория старения в связи с динамикой структуры теломеры	
1.5 Репарация ДНК. Репликативная репарация. Эксцизионная репарация, ферменты. Болезни, обусловленные дефектами репарации. SOS-репарация.	
1.6 Рекомбинация. Понятие об общей (гомологичной) и сайт-специфической рекомбинации. Различие молекулярных механизмов общей и сайт-специфической рекомбинации.	
1.7 Генная конверсия.	
1.8 Подвижные элементы генома про- и эукариот. Транспозоны эукариот.	
1.9 Транскрипция. Транскрипция у прокариот. Транскрипция у эукариот.	
1.10 Хроматин. Структурная организация нуклеосом. Модификация гистонов и динамическая структура хроматина. Сборка нуклеосом.	

Закономерность расположения нуклеосом относительно промоторов и участков начала репликации.

1.11 Процессинг РНК. Определение процессинга. Интроны, сплайсинг. Классификация интронов. Особенности структуры и механизмы сплайсинга. Рибозимы, их специфичность. Сплайсинг пре-мРНК в ядре.

1.12 Мутации

ГЛАВА II. Современное состояние, задачи и методы молекулярной генетики

2.1 Геномика, транскриптомика, протеомика.

2.2 Клонирование ДНК.

2.3 Гибридизация нуклеиновых кислот – дот-блот, саузерн-блот, нозерн-блот, *in situ*.

2.4 Геномные библиотеки.

2.5 Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

2.6 Секвенирование ДНК. Сборка сиквенсов геномов.

2.7 Биоинформатика и системная биология.

ГЛАВА III. Молекулярная организация генома собаки

ГЛАВА IV. Молекулярная организация генома кошки

ГЛАВА V. Генотипирование собак и кошек

ГЛАВА VI. Молекулярная генетика наследственных аномалий собак

6.1 Заболевания нервной системы

6.2 Заболевания глаз

6.3 Заболевания сердечно-сосудистой системы, крови и иммунной системы

6.4 Аномалии обмена веществ и ферментов

6.5 Мышечные заболевания

6.6 Аномалии кожи и выделительной системы

6.7 Чувствительность к медикаментам

ГЛАВА VII. Молекулярная генетика наследственных аномалий кошек

ГЛАВА VIII. Молекулярная генетика окрасов и длины шерсти собак

8.1 Основные окрасы шерсти собак

8.2 Оттенки основных окрасов шерсти собак.

8.3 Пятнистый рисунок и белые отметины.

ГЛАВА IX. Молекулярная генетика окрасов и длины шерсти кошек

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Генетика - одна из основ общебиологического образования. Предметом этой научной дисциплины являются наследственность и изменчивость – наиболее общие свойства живых организмов. Концептуальный характер генетики позволяет считать ее точной наукой наряду с математикой, физикой и химией. Таким образом, связывая биологию с другими естественнонаучными дисциплинами, генетика дает возможность формировать у студентов научное мышление на основе анализа и синтеза. Освоение логики генетического анализа содействует развитию дисциплины научного мышления. Прикладное значение генетики в медицине, биотехнологии и сельском хозяйстве стремительно возрастает, что настоятельно требует качественного повышения уровня генетического образования в высшей и средней школах.

Преподавание биологических дисциплин в высшей школе подразумевает знакомство с современным понятийным аппаратом, печатными источниками и электронными базами данных по молекулярной организации нуклеиновых кислот и белков. Геномика наряду с системной биологией, транскриптомикой и протеомикой является одной из наиболее бурно развивающихся областей биологии. Огромный массив накопленных данных требует регулярной систематизации и обобщения в форме книг и обзорных статей.

Теоретической основой дисциплины «Генетика с основами селекции» являются достижения мировой и отечественной генетической науки, преимущественно, те ее направления, которые актуальны для понимания наиболее общих закономерностей

наследственности и изменчивости как наиболее фундаментальных свойств живых организмов. К числу таковых, по мнению авторов, относятся исследования в области молекулярной генетики самых близких спутников человека – собаки и кошки, которые широко известны как домашние любимцы, представлены большим количеством пород с выраженным генетическим разнообразием, наследственные заболевания которых исследованы клинически и лабораторно, и которые являются удачными модельными объектами для изучения наследственных патологий человека. Авторы посвящают данную монографию своим четвероногим друзьям собаке Джою и коту Симбе.



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТ	– пара нуклеотидов аденин-тимин
ГЦ	– пара нуклеотидов гуанин-цитозин
кДНК	– комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
мРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота
пг	– пикограмм
п.н.	– пара нуклеотидов
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
т.п.н.	– тысяча пар нуклеотидов
сМ	– сантиморган
ЯОР	– район ядрышкового организатора
ВАС	– искусственная бактериальная хромосома
СФА	– хромосома собаки
EST	– экспрессирующаяся нуклеотидная последовательность
FCA	- хромосома кошки
FISH	– флуоресцентная гибридизация ДНК-ДНК <i>in situ</i>
GTP	– гуанозин-трифосфат
MHC	- главный комплекс гистосовместимости
HSA	– хромосома человека
ORF	– открытая рамка считывания
PAC	- искусственная хромосома на основе бактериофага P1
SNP	– сайт мононуклеотидного полиморфизма
YAC	– искусственная хромосома дрожжей

## ГЛАВА I. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот

### *1.1 Ядро и митохондрии*

Ядро (лат. nucleus) — органелла эукариотической клетки, содержащий молекулы ДНК, которые несут генетическую информацию. В ядре происходят важнейшие для жизни процессы: репликация — удвоение молекул ДНК, а также транскрипция — синтез молекул РНК на молекуле ДНК. Здесь же синтезированные молекулы РНК подвергаются ряду модификаций, и только после этого выходят в цитоплазму. В особых структурах внутри ядра — ядрышках — происходит образование субъединиц рибосом.

Ядро отделено от цитоплазмы ядерной оболочкой, образованной за счёт расширения и слияния друг с другом цистерн эндоплазматической сети таким образом, что у ядра образовались двойные стенки за счёт окружающих его узких компартментов. Полость ядерной оболочки называется люменом или перинуклеарным пространством. Внутренняя поверхность оболочки ядра подстилается ядерной ламиной - жёсткой белковой структурой, образованной белками-ламинами, к которой прикреплены нити хромосомной ДНК. Ламины прикрепляются к внутренней мембране ядерной оболочки при помощи заякоренных в ней трансмембранных белков — рецепторов ламинов. В местах слияния внутренней и внешней мембран ядерной оболочки образуются так называемые ядерные поры, через которые происходит обмен веществ между ядром и цитоплазмой. Пора не является дыркой в ядре. Это сложная

структура, организованная несколькими десятками особых белков — нуклеопоринов. С помощью электронной микроскопии было установлено, что ядерная пора представляет собой структуру, состоящую из восьми связанных друг с другом белковых гранул с внешней, и восьми - с внутренней стороны ядерной оболочки [1].

Ядрышко – структура, находящаяся внутри ядра, не имеющая собственной мембранной оболочки, однако хорошо различимая как под световым, так и под электронным микроскопом. Основная функция ядрышка - синтез рибосом. В геноме клетки имеются так называемые ядрышковые организаторы - специальные участки, содержащие гены рибосомной РНК (рРНК), вокруг которых и формируются ядрышки. В ядрышке полимераза I синтезирует рРНК. После созревания этой РНК происходит сборка рибосомных субчастиц. В ядрышке локализуются белки, принимающие участие в этих процессах. Для некоторых из этих белков характерно наличие особой аминокислотной последовательности — сигнала ядрышковой локализации. Следует отметить, что в ядрышке локализуется около 600 видов различных белков. Это самая высокая концентрация белка в клетке. Считается, что для осуществления функций ядрышка необходима лишь небольшая часть этих белков, а остальные попадают туда неспецифически [1].

Применение методов электронной микроскопии позволило выделить в ядрышке несколько субкомпарментов: так называемые фибриллярные центры окруженные участками плотного фибриллярного компонента, где и происходит синтез рРНК, и гранулярные компоненты, которые располагаются снаружи от

плотного фибриллярного компонента и представляют собой скопление созревающих рибосомных субчастиц [2].

Митохондрии — органеллы, имеющиеся в цитоплазме многих эукариотических клеток. Именно в митохондриях происходит синтез АТФ - основного источника химической энергии клетки. Эффективность работы митохондрий очень высока. На фотографиях митохондрий обычно видно обилие внутренних мембран [1].

Оболочка митохондрий состоит из двух мембран, между которыми имеется межмембранное пространство. Пространство, ограниченное внутренней мембраной, называется матриксом. В матриксе располагаются митохондриальные ДНК, РНК и рибосомы, содержатся ферменты, участвующие в цикле Кребса, протекают реакции окисления жирных кислот. Внутренняя мембрана образует многочисленные гребневидные складки — кристы, существенно увеличивающие площадь ее поверхности. На обращенной к матриксу стороне внутренней мембраны митохондрий локализуются особые молекулы АТФ-синтазы, состоящие из головки, ножки и основания. При прохождении через них протонов происходит синтез АТФ. В основании частиц, заполняя собой всю толщу мембраны, располагаются компоненты дыхательной цепи. Наружная мембрана митохондрий имеет маленькие отверстия, образованные специальными белками, через которые могут проникать небольшие молекулы и ионы. Внутренняя мембрана таких отверстий не имеет. В местах соприкосновения наружной и внутренней мембран находится специальный белок-рецептор, способствующий транспорту митохондриальных белков, закодированных в ядре, в матрикс митохондрии [3].

ДНК митохондрий наследуются почти исключительно по материнской линии. В митохондриальной ДНК наблюдается высокая частота мутаций. Мутации митохондриальной ДНК являются причиной целого ряда наследственных заболеваний животных и человека [1].

## *1.2 Структура ДНК*

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) — один из двух типов нуклеиновых кислот, обеспечивающих хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической информации в процессе развития и функционирования живых организмов. Основная роль ДНК в клетках — долговременное хранение информации о структуре РНК и белков [1].

Как уже было сказано, у эукариот ДНК находится в ядре клетки в составе хромосом, а также в некоторых клеточных органоидах (митохондриях и пластидах). В клетках прокариотических организмов (бактерий и архей) кольцевая или линейная молекула ДНК, так называемый нуклеоид, прикреплена изнутри к клеточной мембране. У них и у низших эукариот (например, дрожжей) встречаются также небольшие автономные, преимущественно кольцевые молекулы ДНК, называемые плазмидами. Кроме того, геном некоторых вирусов также может быть представлен одноцепочечными или двуцепочечными молекулами ДНК [1].

С химической точки зрения, ДНК — это длинная полимерная молекула, состоящая из повторяющихся блоков, нуклеотидов. Каждый нуклеотид состоит из азотистого основания, сахара

(дезоксирибозы) и фосфатной группы. Связи между нуклеотидами в цепи образуются за счёт дезоксирибозы и фосфатной группы. В подавляющем большинстве случаев (кроме некоторых вирусов, содержащих одноцепочечную ДНК) ДНК представляет собой двойную спираль, сахарофосфатный остов которой находится снаружи, а азотистые основания ориентированы внутрь макромолекулы [3].

В состав ДНК входят четыре вида азотистых оснований: аденин, гуанин, тимин и цитозин. Азотистые основания одной из цепей соединены с азотистыми основаниями другой цепи водородными связями согласно принципу комплементарности: аденин соединяется только с тимином, гуанин — только с цитозином. В 1949 – 1951 гг Чаргаффом и сотрудниками для аденина (А), тимина (Т), гуанина (Г) и цитозина (Ц) были выявлены следующие соотношения:

Количество аденина равно количеству тимина, а количество гуанина — количеству цитозина:  $A=T$ ,  $G=C$ .

Количество пуринов равно количеству пиримидинов:  $A+G=T+C$ .

Количество оснований с 6 аминогруппами равно количеству оснований с 6 кетогруппами:  $A+C=G+T$ .

Эти соотношения, названные правилами Чаргаффа, наряду с данными рентгеноструктурного анализа, сыграли решающую роль в расшифровке структуры ДНК Дж. Уотсоном и Фрэнсисом Криком [3].

Соотношение  $(A+T):(G+C)$  в ДНК может быть различным у разных видов. У одних преобладают пары АТ, в других — ГЦ. Последовательность нуклеотидов позволяет «кодировать»

информацию о различных типах РНК, наиболее важными из которых являются информационные, или матричные (мРНК), рибосомальные (рРНК) и транспортные (тРНК). Все эти типы РНК синтезируются на матрице ДНК в процессе транскрипции и принимают участие в процессе трансляции (биосинтезе белков). Помимо кодирующих последовательностей, ДНК клеток содержит последовательности, выполняющие регуляторные и структурные функции [3].

### *1.3 Репликация ДНК*

Репликация ДНК — это процесс синтеза дочерней молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты, который происходит в процессе деления клетки на матрице родительской молекулы ДНК. При этом генетический материал, зашифрованный в ДНК, удваивается и делится между дочерними клетками. Репликацию ДНК осуществляет фермент ДНК-полимераза [1].

Для протекания процесса репликации необходимо расплести двойную спираль ДНК, вращать макромолекулу и удерживать ее в расплетенном состоянии. Эти функции выполняют хеликаза, топоизомераза и ДНК-связывающие белки. Точность репликации обеспечивается принципом комплементарности пар оснований и свойствами ДНК-полимеразы, благодаря которым этот фермент способен распознать и исправить ошибку. У эукариотических организмов в процессе репликации принимают участие несколько типов ДНК-полимераз. Далее происходит суперспирализация синтезированных молекул и дальнейшая компактизация ДНК. Процесс репликации требует затрат энергии [2].

Ранее существовали 3 модели механизма репликации ДНК. Согласно консервативному механизму в результате репликации одна молекула ДНК состоит только из родительских цепей, а другая — только из дочерних цепей. Дисперсионная модель предполагала, что все получившиеся в результате репликации молекулы ДНК состоят из цепей, одни участки которых вновь синтезированы, а другие взяты из родительской молекулы ДНК). Полуконсервативный механизм репликации заключается в том, что каждая молекула ДНК состоит из одной цепи исходной родительской молекулы и одной вновь синтезированной цепи. Полуконсервативный механизм был доказан в 1958 г. опытами Мэтью Мезельсона и Франклина Сталя [1].

#### *1.4 Теломеры. Теория старения в связи с динамикой структуры теломеры*

Теломеры — это концевые участки хромосом. Теломерные участки хромосом выполняют защитную функцию, они не способны соединяться с другими хромосомами или их фрагментами [1].

У большинства эукариот теломерные последовательности ДНК представляет собой короткие тандемные повторы. В теломерных участках хромосом ДНК вместе с белками, специфически связывающимися с теломерными повторами, образует нуклеопротеидный комплекс — конститутивный (структурный) теломерный гетерохроматин. Теломерные повторы — весьма консервативные последовательности. У всех позвоночных они представляют собой многократные повторы шести нуклеотидов



ТТАГГГ. Теломерные повторы всех насекомых — ТТАГГ, а у большинства растений — это повторы ТТТАГГГ [2].

Установлено, что у человека критическая длина теломеры, при которой хромосомы начинают соединяться друг с другом, составляет 12,8 теломерных повторов.

Из-за того, что ДНК-полимераза не способна синтезировать копию ДНК до самого конца, с каждым циклом деления теломеры клетки укорачиваются. Данный феномен называется концевой недорепликацией и является одним из важнейших факторов биологического старения. Тем не менее, вследствие этого явления теломеры должны укорачиваться весьма медленно - по несколько (3-6) нуклеотидов за клеточный цикл, т.е. за количество делений, соответствующее пределу Хейфлика, они укоротятся всего на 150-300 нуклеотидов. В настоящее время предложена эпигенетическая теория старения, которая предполагает, что из-за рекомбинаций в теломерной ДНК, вызванных функционированием клеточных систем репарации, процесс укорочения теломер ускоряется в десятки и сотни раз. Системы репарации активируются при повреждениях ДНК, возникающих в результате дерепрессии с возрастом мобильных элементов генома, что и предопределяет биологический феномен старения [2].

В стволовых и половых клетках активно работает особый фермент — теломераза, который при помощи собственной РНК-матрицы достраивает теломерные повторы и удлиняет теломеры. Однако в большинстве дифференцированных клеток теломераза заблокирована [2].

*1.5 Репарация ДНК. Репликативная репарация. Эксцизионная репарация, ферменты. Болезни, обусловленные дефектами репарации. SOS-репарация.*

Репарация — особая функция клеток, заключающаяся в способности исправлять повреждения в молекулах ДНК, возникшие из-за ошибок ДНК полимеразы в процессе репликации или в результате воздействия физических или химических агентов. Процессы репарации осуществляются специальными ферментными системами клетки. Дефекты ферментов систем репарации приводят к развитию ряда наследственных заболеваний, таких как пигментная ксеродерма [3].

У бактерий имеется, по крайней мере, две ферментные системы репарации — прямая и эксцизионная.

Прямая репарация представляет собой наиболее простой путь устранения повреждений ДНК, в котором задействованы специфические ферменты, способные быстро (обычно в одну стадию) устранять соответствующее повреждение, восстанавливая исходную структуру нуклеотидов. Так действует, например, Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза, которая переносит метильную группу с азотистого основания на один из собственных остатков цистеина [2].

Эксцизионная репарация заключается в удалении (эксцизии) повреждённых азотистых оснований из ДНК с последующим восстановлением нормальной структуры молекулы.

Каждая из систем репарации включает следующие компоненты [2]:

- фермент, "узнающий" химически изменённые участки в цепи ДНК и осуществляющий разрыв цепи вблизи повреждения
- фермент, удаляющий повреждённый участок
- фермент (ДНК-полимераза), синтезирующий соответствующий участок цепи ДНК взамен удалённого
- фермент (ДНК-лигаза), восстанавливающий непрерывность полимерной цепи

Системы репарации существуют также в клетках животных и человека, у которых они изучаются на культурах тканей.

*1.6 Рекомбинация. Понятие об общей (гомологичной) и сайт-специфической рекомбинации. Различие молекулярных механизмов общей и сайт-специфической рекомбинации.*

Генетическая рекомбинация – процесс, при котором происходит разрыв молекулы нуклеиновой кислоты (обычно ДНК, но возможно и РНК) и соединение с другой молекулой ДНК. Рекомбинация может происходить как между сходными молекулами ДНК – гомологичная рекомбинация – так и между различающимися – негомологичная рекомбинация. Процесс рекомбинации – общий способ репарации ДНК и у бактерий, и у эукариот. У эукариот рекомбинация происходит в процессе мейоза в ходе кроссинговера. Процесс кроссинговера приводит к появлению потомков с комбинациями

генов, отличными от родительских, и появлению новых химерных аллелей. У организмов, имеющих адаптивную иммунную систему, имеется особая система рекомбинации, благодаря которой быстро образуется большое разнообразие лимфоцитов, способных узнавать новые антигены. В генной инженерии под рекомбинантной ДНК понимают молекулы, полученные в результате искусственно осуществленной рекомбинации молекул ДНК, часто принадлежащих разным видам. Лучшим примером такого подхода является получение рекомбинантных белков, нашедших свое применение в фармакологии и медицине. Этот метод очень важен для биомедицинских исследований, поскольку позволяет изучать эффекты определенных генов. В процессе рекомбинации задействовано множество различных ферментов, называемых рекомбиназами [1].

В мейозе в процессе кроссинговера происходит рекомбинация между спаренными гомологичными хромосомами, унаследованными от каждого из родителей. В ходе профазы I все четыре хроматиды расположены достаточно близко друг от друга, так что две хроматиды могут перекрещиваться одна с другой, и в этот момент может происходить обмен генетической информацией в гомологичных сайтах [2].

### *1.7 Генная конверсия.*

Генная конверсия – это случай генетической рекомбинации, который часто происходит в процессе мейоза, но который также происходит и в соматических клетках. Это процесс, при котором информация последовательности ДНК передается (переносится) с

одной спирали ДНК, которая остается неизменной, на другую спираль ДНК, последовательность которой изменяется. Это один из механизмов генных мутаций. Генная конверсия может быть причиной неменделевского наследования и часто происходит у грибов [2].

Такая конверсия одной аллели в другую происходит по причине репарации неправильно спаренных оснований в ходе рекомбинации. При конъюгации одной из четырех нитей с другой из гомологичной хромосомы репарация неправильно спаренных оснований может пройти по матрице другой хромосомы, что приводит к замене аллели [2].

В норме диплоидный организм несет по одной аллели от каждого из родителей (соотношение гамет в мейозе 1A:1a у гетерозиготы). При конверсии это соотношение изменяется (3A:1a, 1A:3a, 5A:3a или 3A:5a). Генные конверсии могут быть причиной наследственных заболеваний [3].

### *1.8 Подвижные элементы генома про- и эукариот. Транспозоны эукариот.*

Мобильные генетические элементы (МГЭ) представляют собой тип ДНК, способные перемещаться по геному [2]. К ним относятся:

- транспозоны
- плазмиды
- бактериофаги
- интроны группы 2

Для млекопитающих из всех МГЭ наиболее характерны транспозоны.

Транспозон — это последовательность ДНК, которая способна перемещаться внутри генома в результате процесса, который называется транспозицией. Встраиваясь в геном, транспозоны могут вызывать различные мутации, в том числе и хромосомные перестройки. Эти мобильные элементы играют важную роль в процессе горизонтального переноса генов (обмен генетической информацией между различными видами в природе и в экспериментах по генной инженерии), переноса генов устойчивости к антибиотикам среди микроорганизмов [2].

Транспозоны обычно состоят из двух прямых или инвертированных повторяющихся последовательностей ДНК, между которыми находятся гены, необходимые для транспозиции. Иногда в составе центральной части транспозонов находятся гены, обеспечивающие селективное преимущество для организма, содержащего мобильный элемент. Различают два класса транспозонов - (1) класс 1 включает ретротранспозоны, которые перемещаются по геному путём обратной транскрипции с их РНК и (2) ДНК-транспозоны, которые перемещаются путём прямого вырезания и вставки с использованием кодируемого транспозоном фермента транспозазы [2].

Транспозоны могут играть важную роль в геноме организма. Так, например, некоторые гены-регуляторы, обеспечивающие адекватную реакцию растений на изменения освещенности, появились в результате встраивания в их геном транспозонов. Транспозоны

могут быть причиной дестабилизации генома. Не менее 80 % мутаций являются следствием активности этих мобильных элементов. Выше было сказано о возможном влиянии происходящей с возрастом дерепрессии транспозонов на темп укорочения теломер, что предопределяет старение как биологический феномен [3].

### *1.9 Транскрипция. Транскрипция у прокариот. Транскрипция у эукариот.*

Транскрипцией называется происходящий во всех живых клетках процесс синтеза РНК с использованием ДНК в качестве матрицы. Другими словами, это перенос генетической информации с ДНК на РНК [2].

Процесс синтеза РНК протекает в направлении от 5'- к 3'- концу, то есть по матричной цепи ДНК ДНК зависимая РНК-полимераза – фермент, осуществляющий транскрипцию, движется в направлении 3'->5'.

Инициация транскрипции — сложный процесс, зависящий от последовательности ДНК, находящейся вблизи транскрибируемой последовательности (а у эукариот также и от более далеких участков генома — энхансеров и сайленсеров), и от наличия или отсутствия различных белковых факторов.

Момент перехода РНК-полимеразы от инициации транскрипции к элонгации точно не определен. У кишечной палочки этот переход характеризуется тремя биохимическими событиями [2]:

- отделение сигма-фактора,

- первая транслокация молекулы фермента вдоль матрицы
- сильная стабилизация транскрипционного комплекса, состоящего из РНК-полимеразы, растущей цепи РНК и транскрибируемой ДНК. Эти же явления характерны и для эукариот.

При переходе транскрипции от стадии инициации к элонгации происходит разрыв связей между ферментом, промотором и факторами инициации транскрипции. Иногда в этот момент РНК-полимераза переходит в состояние компетентности в отношении элонгации. Следующая фаза процесса транскрипции называется терминацией. В этот момент растущий транскрипт освобождается и происходит диссоциация РНК-полимеразы и ДНК-матрицы [1].

В период элонгации в ДНК расплетено примерно 18 пар нуклеотидов. Примерно 12 нуклеотидов матричной нити ДНК образует гибридную спираль с растущей цепью РНК. По мере движения РНК-полимеразы по матрице впереди нее происходит расплетание, двухцепочечной молекулы ДНК, а позади фермента двойная спираль ДНК восстанавливается. В этот момент из комплекса освобождается очередное звено растущей цепи РНК с матрицей и РНК-полимеразой. Все эти перемещения должны сопровождаться относительным вращением РНК-полимеразы и ДНК. Поэтому не исключено, что для предотвращения такого вращения (особенно в случае эукариот, у которых ДНК связана с белками и образует хроматин)двигающуюся по ДНК РНК-полимеразу сопровождают топоизомеразы. На стадии элонгации в процессе транскрипции немаловажную роль играют также основные



элонгирующие факторы, которые необходимы для предотвращения преждевременной терминации матричного процесса [3].

В момент завершения стадии терминация транскрипции у эукариот происходит разрезание РНК, а затем к её 3' концу с помощью фермента добавляется несколько аденинов. Стабильность полученного транскрипта зависит от количества этих добавочных нуклеотидов [1].

В целом ряде экспериментов было показано, что процесс транскрипции осуществляется в огромных комплексах (до 10 МДа), которые содержат около восьми РНК-полимераз II и компоненты последующего процессинга, сплайсинга и корректирования новосинтезированного транскрипта [2].

*1.10 Хроматин. Структурная организация нуклеосом. Модификация гистонов и динамическая структура хроматина. Сборка нуклеосом. Закономерность расположения нуклеосом относительно промоторов и участков начала репликации.*

Хроматин — это вещество, из которого состоят хромосомы эукариотических клеток, представляющее собой комплекс ДНК, РНК и белков. Именно в составе хроматина происходит реализация генетической информации, а также репликация и репарация ДНК [3].

Основную массу хроматина составляют белки гистоны. Гистоны H2A, H2B, H3 и H4 образуют нуклеосомы — особые структуры, участвующих в самом первом этапе упаковки ДНК в хромосомы. В состав каждой нуклеосомы входит по две молекулы каждого из

указанных видов гистонов (всего восемь молекул). Из-за того, что нуклеосомы располагаются регулярно, образующаяся структура напоминает бусы. Наиболее крупный из всех гистонов – гистон H1-связывается с ДНК в месте ее входа на нуклеосому [1].

Нить ДНК с нуклеосомами образует структуру, похожую на соленоид толщиной около 30 нанометров, так называемую 30 нм фибриллу. В зависимости от степени плотности дальнейшей упаковки этой фибриллы различают несколько конденсированный или гетерохроматин и эу- или интерхроматин. Гетерохроматиновые участки очень интенсивно окрашиваются при дифференциальной окраске хромосом и хорошо видны под микроскопом. ДНК, находящаяся в гетерохроматине, не транскрибируется, что характерно для незначущих или молчащих участков. На стадии интерфазы гетерохроматин, как правило, располагается по периферии ядра (пристеночный гетерохроматин) [2].

ДНК в эухроматине упакована неплотно. Эухроматиновые районы значительно слабее окрашиваются при дифференциальном окрашивании хромосом. Гены, находящиеся в эухроматиновых районах, активно транскрибируются. Плотность упаковки хроматина зависит от модификаций гистонов (метиличирования, ацетилирования, фосфорилирования) [1].

В настоящее время полагают, что каждый участок хромосомы имеет собственную «территорию» в ядре, что существуют так называемые функциональные домены хроматина (ДНК одного домена содержит приблизительно 30 тысяч пар оснований). Пространственное распределение хроматина в ядре изучено пока

недостаточно. Известно, что теломерные и центромерные участки хромосом прикрепляются к белкам ядерной ламина [1].

*1.11 Процессинг РНК. Определение процессинга. Интроны, сплайсинг. Классификация интронов. Особенности структуры и механизмы сплайсинга. Рибозимы, их специфичность. Сплайсинг пре-мРНК в ядре.*

Между транскрипцией и трансляцией молекула иРНК претерпевает ряд последовательных изменений, которые обеспечивают созревание матричной РНК для синтеза полипептидной цепочки. Биологическое значение процессинга в эукариотической клетке заключается в возможности получения различных комбинаций экзонов гена, а значит, получения большего разнообразия белков, кодируемых одной нуклеотидной последовательностью ДНК [2].

В процессе кэпирования происходит к 5'-концу транскрипта присоединяется 7-метилгуанозин посредством трифосфатного моста, соединяющего их в необычной позиции 5'-5', а также метилирование рибоз двух первых нуклеотидов. Кэпирование начинается ещё до окончания транскрипции молекулы пре-мРНК.

Кэп-группа выполняет следующие функции [3]:

- регулирование экспорта мРНК из ядра;
- защита 5'-конца транскрипта от экзонуклеаз;
- участие в инициации трансляции

Исходной точкой кэпирования является 5'-атом углерода молекулы мРНК. Немодифицированный 5'-атом углерода соединен эфирной связью с тремя остатками фосфорной кислоты. Один концевой фосфат удаляется ферментом фосфатазой. Фермент гуанилтрансфераза отщепляет два концевых фосфата от молекулы ГТФ и присоединяет остаток ГМФ к концевому 5'- атому углерода. Образуется 5'-5' трифосфатная связь. N7- атом гуанозина метилируется ферментом метилтрансферазой. Для метилирования 5' проксимальных нуклеотидов используются и другие метилтрансферазы [2].

Существуют убедительные данные, свидетельствующие о том, что перед началом транскрипции ядерные ферменты, осуществляющие кэпирование, связаны с РНК-полимеразой II. Сразу после синтеза 5'-конца транскрипта мРНК указанные ферменты связываются с ним и осуществляют кэпирование. Этот процесс имеет сходство с полиаденилированием.

Основные функции 5'-кэпа следующие [2]:

- Регуляция экспорта мРНК из ядра.
- Предотвращение разрушения 5'-конца транскрипта в результате действия экзонуклеаз .
- Стимуляция трансляции.
- Способствование удалению интрона, проксимального к 5'-концу.

Полиаденилирование – это процесс присоединения к 3'-концу транскрипта адениловой кислоты (от 100 до 200 остатков), который осуществляется особым ферментом poly(A)-полимераза.

Процесс вырезания определенных нуклеотидных последовательностей из молекул РНК и соединения последовательностей, сохраняющихся в «зрелой» молекуле, в ходе процессинга РНК, называется сплайсингом. Наиболее часто этот процесс встречается при созревании информационной РНК (мРНК) у эукариот. В ходе сплайсинга из мРНК участки, не кодирующие белок (интроны) удаляются, а экзоны - участки, кодирующие аминокислотную последовательность, соединяются друг с другом, и незрелая пре-мРНК превращается в зрелую мРНК, с которой синтезируются (транслируются) белки клетки [1].

В природе существует несколько вариантов сплайсинга. Какой из них будет проходить в каждом случае, зависит от структуры интрона и катализатора, необходимого для реакции.

Сплайсосомные интроны часто находятся в генах, кодирующих белки. Для сплайсинга необходимо наличие специальных 3'- и 5' — последовательностей. Важная роль в защите 5'-конца мРНК от деградации под воздействием экзонуклеаз принадлежит 5'-кэпу. Сплайсинг катализируется, состоящим из РНК и белков большим комплексом, который называется сплайсосомой. Сплайсосома включает также пять малых ядерных рибонуклеопротеидов (мяРНП). РНК, входящая в состав мяРНП, взаимодействует с интроном и, возможно, участвует в катализе. По составу мяРНП, сплайсосомы делятся на два типа: главную и дополнительную [1].

Главная сплайсосома состоит из мяРНП: U1, U2, U4, U5 и U6. Она принимает участие в сплайсинге интронов, содержащих в 5' сайте гуанин и урацил (GU), и аденин и гуанин (AG) в 3' сплайсинг-сайте.

У эукариот пре-мРНК некоторых генов в процессе созревания могут подвергаться альтернативному сплайсингу. Альтернативный сплайсинг заключается в том, что имеющиеся в составе пре-мРНК интроны вырезаются в разных альтернативных комбинациях, при которых вырезаются и некоторые экзоны. В разные периоды развития организма или в разных тканях, а также у разных особей одного вида могут осуществляться разные варианты альтернативного сплайсинга одной пре-мРНК. Некоторые из продуктов альтернативного сплайсинга пре-мРНК нефункциональны, как например, при определении пола у плодовой мушки дрозофилы, однако часто в результате альтернативного сплайсинга пре-мРНК одного гена образуются многочисленные мРНК и их белковые продукты [2].

В настоящее время известно, что у человека 94 % генов подвержено альтернативному сплайсингу (остальные 6 % генов не содержат интронов). Альтернативный сплайсинг у многоклеточных эукариот является ключевым механизмом увеличения разнообразия белков, не создавая избыточных копий гена, а также позволяет осуществлять регуляцию экспрессии генов, в том числе тканеспецифической [3].

### *1.12 Мутации*

Мута́ция (лат. *mutatio* — изменение) — это изменение генотипа, происходящие под влиянием внешней или внутренней среды, которое может быть унаследовано потомками данной клетки [2].

Мутации принято подразделять на спонтанные (самопроизвольно возникающие в течение всей жизни организма в

условиях окружающей среды, являющихся нормальными для данного организма) и индуцированные – передающиеся по наследству изменения генома, возникающие под воздействием неблагоприятных условий окружающей среды или в ходе экспериментов в лабораторных условиях. Частота возникновения спонтанных мутаций колеблется в пределах  $10^{-9}$  —  $10^{-12}$  на нуклеотид за клеточную генерацию [3].

В живой клетке постоянно происходят такие процессы как репликация ДНК, репарация ДНК и генетическая рекомбинация, входе которых постоянно возникают мутации. К возникновению мутаций приводят спонтанные изменения химической структуры нуклеотидов, которые происходят при репликации. Так, например, при дезаминировании цитозина в одной из цепей ДНК образуется урацил. В этом случае вместо канонической пары оснований Ц-Г появляется пара У-Г. В дальнейшем в процессе репликации в новую цепь комплиментарно урацилу включается уже аденин, и образуется пара У-А, а в следующем цикле репликации она заменяется на каноническую пару Т-А. Таким образом, происходит транзиция – точечная замена одного пиримидина на другой пиримидин. Аналогично происходит и замена одного пурина на другое пуриновое основание [2].

Из всех рекомбинационных процессов мутации чаще всего происходят в ходе неравного кроссинговера. Как правило, неравный кроссинговер происходит в тех участках хромосом, где локализуется несколько копий одного и того же гена, возникших в результате дупликации или мультипликации, и сохранивших высокую степень гомологии. В результате неравного кроссинговера в одной из

хромосом появляется делеция некоторого участка, а в другой – его дупликация [3].

В течение жизни любой клетки довольно часто происходят спонтанные повреждения ДНК. Для того, чтобы устранять эти повреждения существуют особые ферментные системы - системы репарации (например, системы фотореактивации, когда фермент ДНК-фотолиаза расщепляет пиримидиновые димеры с образованием нормальных оснований, и эксцизионной репарации, когда поврежденные нуклеотиды вырезаются и на их место ставятся нормальные основания). Если по каким-либо причинам в работе систем репарации происходит сбой, возникают мутации. Мутации могут появляться и в генах, кодирующих сами ферменты систем репарации, что приводит к резкому повышению (мутаторный эффект) или снижению (антимутаторный эффект) частоты мутаций других генов. У человека известно заболевание пигментная ксеродерма, при котором под действием ультрафиолетового облучения возникают дерматиты, а позднее и злокачественные новообразования кожи. Причиной данного заболевания является мутация, в результате которой нарушается работа системы репарации [1].

Существенно увеличить частоту мутаций могут не только изменения в системах ферментов репарации клетки, но и многие другие факторы, которые называются мутагенными. Различают химические (вещества, вызывающие мутации, например, нитрозометилмочевина, этиленимин и др.), физические (ионизирующее и ультрафиолетовое излучения, высокая температура и т.д.) и биологические (ретровирусы, ретротранспозоны) мутагены.



Существует несколько классификаций мутаций. Мы остановимся на современной классификации, в основе которой лежит характер изменения структуры отдельных генов, хромосом и целого генома. В рамках этой классификации различают следующие виды мутаций: геномные, хромосомные и генные.

К геномным мутациям относятся полиплоидия (изменение числа хромосом в геноме, кратное гаплоидному –  $3n$ ,  $4n$ ,  $6n$  и т.п.) и анеуплоидия или гетероплоидия (изменение числа хромосом, не кратное гаплоидному). Полиплоидные организмы и клетки, хромосомные наборы которых получены от разных видов в результате гибридизации, называются аллополиплоидами. Если полиплоид образуется в результате увеличения числа хромосом собственного вида, то такой полиплоид называется аутополиплоидом [3].

К хромосомным мутациям относят различные перестройки хромосом: делеции (потери участков хромосом), дупликации (удвоение участков хромосом), инверсии (изменение ориентации сегментов хромосом в отдельных хромосомах) и транслокации (перенос части генетического материала с одной хромосомы на другую или объединение целых хромосом, т. н. робертсоновские транслокации) [1].

Генные мутации встречаются чаще, чем другие типы мутаций. Генные мутации представляют собой замены, делеции и вставки одного или нескольких нуклеотидов, транслокации, дупликации и инверсии различных частей гена. Мутация, затрагивающая только один нуклеотид, называется точковой. Замены одного нуклеотида другим называются транзициями (замена пурина на пурин или

пиримидина на пиримидин) или трансверсиями (замена пурина на пиримидин или наоборот). Последствия точковых мутаций могут быть различными. Если в результате замены нуклеотида смысл кодона сохраняется из-за вырожденности генетического кода, то такая замена называется синонимической. Нуклеотидная замена может изменить смысл кодона и привести к замене соответствующего данному кодону аминокислотного остатка в полипептидной цепи (миссенс-мутация). В результате замены одного нуклеотида возможна также преждевременная терминация трансляции из-за образования бессмысленного кодона: амбер — UAG, охр — UAA или опал — UGA. Подобные мутации называются также нонсенс-мутациями. В соответствии с тем, какой из стоп-кодонов образуется в результате замены, нонсенс-мутациями называются амбер, охр и опал. Возможны также мутации, приводящие к замене стоп-кодонов на смысловые [2].

Из-за триплетности генетического кода, в случае если происходит делеция или вставка числа нуклеотидов, не кратного трем, происходит сдвиг рамки считывания.

Следует различать первичную (прямую) мутацию и реверсию или обратную мутацию, т.е. такую мутацию, которая восстанавливает исходную структуру гена. Однако не всегда фенотипическая реверсия бывает обусловлена обратной мутацией. Подобное явление может быть обусловлено супрессорной мутацией, которая может произойти как в другой области того же самого гена (интрагенная супрессорная мутация), так и в другом неаллельном гене (экстрагенная супрессорная мутация). Некоторые мутации кардинально изменяют процессы, протекающие в клетке. Такая клетка, как правило,

распознается системами контроля гомеостаза, происходит запуск программ апоптоза и клетка погибает. Если по каким-то причинам измененная клетка не была элиминирована, она дает начало новой популяции клеток с измененным генотипом и, как следствие с новыми функциями. Если подобная мутация произошла в соматической клетке, то это может привести к развитию злокачественных или доброкачественных новообразований или к появлению новых организмов с совершенно иными свойствами, если мутантная клетка была генеративной [3].

Подавляющее большинство мутаций приводят к снижению жизнеспособности организмов и клеток вплоть до их гибели. Однако очень редко происходят мутации, которые приводят к появлению у мутантных особей полезных признаков и оказывают положительное влияние на приспособленность к условиям среды. Такие мутации являются средством адаптации клеток и организмов к условиям окружающей среды и называются адаптационными [2].

Мутации, затрагивающие «молчащие» участки генома, и синонимические нуклеотидные замены обычно не имеют фенотипического проявления. Их можно обнаружить только с применением современных молекулярно-биологических методов. Принимая во внимание тот факт, что подавляющее большинство мутаций являются спонтанными, частоту возникновения мутаций можно считать величиной постоянной. На этом основано изучение мутаций в «молчащих» генах с целью исследования филогении различных таксонов, в том числе и человека. Результаты исследований мутаций, затрагивающих митохондриальный геном и наследующихся исключительно по материнской линии, а также

мутаций, локализующихся в Y-хромосоме, которые наследуются только по мужской линии, находят широкое применение в эволюционной биологии [2].

Аллелью дикого типа называют наиболее распространенный вариант гена, а мутантной аллелью – менее распространенный вариант.

## **ГЛАВА II. Современное состояние, задачи и методы молекулярной генетики**

### *2.1 Геномика, транскриптомика, протеомика.*

Генóмика — раздел молекулярной генетики, посвященный изучению генома и генов живых организмов.

Геномика сформировалась как особое направление в 1980—1990-х гг. в период создания первых проектов по секвенированию геномов некоторых видов живых организмов. Первым был полностью секвенирован геном бактериофага Ф-Х174 (5 368 нуклеотидов). Это событие произошло в 1977 г. В 1995 году был секвенирован геном бактерии *Haemophilus influenzae* (1.8 Mb). После этого были получены полные сиквенсы геномов еще нескольких видов, включая геном человека (2001 — первый черновой вариант, 2003 — завершение проекта) [1]. Развитие геномики стало возможно не только благодаря совершенствованию биохимических методов, но и благодаря появлению более мощной вычислительной техники, которая позволила работать с огромными массивами данных, поскольку

протяженность геномов у живых организмов очень часто измеряется миллиардами пар оснований (генома человека состоит из 3 млрд. пар оснований) [1,2] .

Структурная геномика – раздел геномики, изучающий содержание и организация геномной информации. Ее целью является изучение генов с известной структурой, что необходимо для понимания их функции, а так же определение пространственного строения максимального числа «ключевых» белковых молекул и его влияния на взаимодействия [3].

Функциональная геномика изучает реализацию записанной в геноме информации от гена — к признаку;

Сравнительная (эволюционная) геномика — раздел геномики, предметом которого являются исследования содержания и организации геномов разных организмов в сравнительном аспекте [3].

Транскриптомом называют совокупность всех транскриптов, которые синтезируются в одной клетке или группе клеток (в том числе мРНК и некодирующие РНК). Понятие транскриптом может обозначать полный набор транскриптов, синтезируемых в данном организме, или специфический набор транскриптов (молекул РНК), представленный в клетках определенного типа [4].

Если геном у всех клеток одной линии, как правило, одинаков, то транскриптом может быть весьма изменчив и зависит от условий окружающей среды. Понятие «транскриптом» отражает профиль экспрессии генов в данный момент времени, поскольку включает в себя все транскрипты данной клетки. Наиболее часто в экспериментах

по изучению транскриптома используют биочипы (ДНК-микроаррей) [4].

Протеомика — это наука, изучающая белки и их взаимодействия в живых организмах. Учёные, работающие в области протеомики, исследуют биосинтез, посттрансляционные модификации, декомпозицию и замену белков в организме [1].

Часто можно проследить связь между изменениями белков и их взаимодействием и болезненными состояниями. Таким образом, протеомика может значительно ускорять разработку лекарственных средств. Сегодня более 95 процентов всех имеющихся на рынке фармакологических средств оказывают свое воздействие именно на белки [2]. Системные подходы протеомики могут помочь гораздо эффективнее идентифицировать и оценивать новые целевые белки, а, следовательно, ускорить разработку новых диагностических систем и терапевтических средств.

Белки служат для выполнения огромного числа функций в организме [3]:

- Энзимная (ферментная). Многие белки служат катализаторами биохимических реакций, протекающих в живых организмах;
  
- Транспортная. Некоторые белки, такие как гемоглобин, трансферрин и др. переносят различные вещества от одних клеток, тканей и органов к другим;

- Структурная. Белки входят в состав подавляющего большинства структурных компонентов клеток и тканей живых организмов. Например, коллаген и эластин обеспечивают фиброзную основу соединительных тканей у животных;

- Резервная (запасная) Некоторые белки, такие как казеин, являются главным источником аминокислот для организмов детёнышей млекопитающих;

- Регуляторная. Гормоны, принимающие участие в регуляции многих процессов, протекающих в живом организме, по своей химической природе являются белками.

- Рецепторная. Существуют белки, встроенные в мембраны клеток, которые распознают химические сигналы, передаваемые другими клетками;

- Моторная. Сократимые белки, такие как миозин, который играет большую роль в движении мышц

- Защитная. Белками являются антитела, которые защищают организм от болезней.

Белки синтезируются через посредника — рибонуклеиновую кислоту (РНК), структура которой определяется последовательностью ДНК. Процесс реализации генетической информации о структуре белка или РНК называется «экспрессией» [1]. Молекулы белков представляет собой высокомолекулярные органические вещества, состоящие из одной или нескольких аминокислотных цепочек. Порядок, в котором выстраиваются аминокислоты, диктуется последовательностью нуклеотидов в ДНК. Каждый нуклеотид содержит сахарную группу (в случае ДНК это дезоксирибоза), фосфатную группу и одно из четырёх азотистых оснований — аденин, тимин, цитозин или гуанин [1]. Каждая из 20 аминокислот, входящих в состав белков, кодируется последовательностью из трех нуклеотидов. Эта последовательность называется кодоном. Некоторые аминокислоты кодируются не одним, а двумя и более кодонами. Так, например, последовательность нуклеотидов АУГ кодирует метионин, кодон триптофана - УГГ, для лизина существует два кодона – ААА и ААГ, а для изолейцина – три: АУУ, АУЦ. Это явление говорит о том, что генетический код вырожденный. Таким образом, в нуклеотидной последовательности ДНК закодированы многочисленные аминокислоты, которые затем связываются друг с другом, формируя первичную структуру белка.

Многие болезни могут быть прослежены до изменений, происходящих на уровне белков. К примеру, известно, что при серповидно-клеточной анемии аномальный белок гемоглобин вызывает изменение формы красных кровяных телец. Аномальные эритроциты имеют серповидную форму. Серповидноклеточная



анемия обусловлена мутацией, приводящей к замене глутаминовой кислоты на валин в бета-цепи гемоглобина (гемоглобин S) [2].

Часто после синтеза (трансляции), для того, чтобы выполнять определенные функции в организме, белки требуют модификации. Например, белки, которые вызывают образование кровяных тромбов, остаются неактивными до тех пор, пока не претерпевают соответствующих изменений. Следовательно, неправильная посттрансляционная модификация также является причиной неправильного функционирования белков [1].

## *2.2 Клонирование ДНК.*

Клонирование генов (не путать с клонированием организмов) — это процесс выделения генов и, в результате генноинженерных манипуляций, получения большого количества продукта данного гена. Клонлируемый ген амплифицируют методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), затем встраивается в вектор — фрагмент ДНК, переносящий чужеродный ген в тот же самый или другой, удобный для выращивания, организм. В качестве векторов используют, например, вирусную ДНК, плазмиды, космиды и искусственные хромосомы бактерий. Введение в организм чужеродных генов обычно используют для получения продукта этого гена — РНК или, чаще всего, белка. Именно так, в промышленных количествах получают многие белки для использования в сельском хозяйстве, медицине и др. [2,3,4].

### *2.3 Гибридизация нуклеиновых кислот – дот-блот, саузерн-блот, нозерн-блот, in situ.*

Гибридизация нуклеиновых кислот (в т.ч. гибридизация ДНК) — это образование *in vitro* двуцепочечных молекул нуклеиновых кислот из комплементарных одноцепочечных молекул [3]. При полной комплементарности процесс гибридизации происходит легко и быстро, а в случае частичной некомплементарности слияние цепочек замедляется, что позволяет оценить степень комплементарности [2]. Возможна гибридизация ДНК-ДНК и ДНК-РНК. Процесс гибридизации ДНК/ДНК проводится следующим образом. Двуцепочечную ДНК разогревают в соответствующем буфере. На этом этапе водородные связи между комплементарными азотистыми основаниями становятся термодинамически невыгодными и цепочки расходятся. Происходит денатурация ДНК. Препарат денатурированной ДНК затем смешивается с другой денатурированной ДНК. Далее эта смесь медленно охлаждается. В это время одноцепочечные ДНК отжигаются друг на друга (образуются водородные связи между комплементарными основаниями) и образуется «гибридная» молекула ДНК[2].

Анализ скорости отжига одноцепочечных ДНК позволяет оценивать сходство и различие последовательностей ДНК разных видов живых организмов или разных особей одного вида [4].

Существует два вида гибридизации нуклеиновых кислот. Оба метода используют меченную одноцепочечную ДНК с известной последовательностью нуклеотидов для определения последовательности в другой одноцепочечной ДНК или РНК.

Саузерн блоттинг (от англ. Southern blot) — метод, применяемый в молекулярной биологии для выявления определенной последовательности ДНК в образце. Метод Саузерн блоттинга сочетает электрофорез в агарозном геле для фракционирования ДНК с методами переноса полученных фрагментов ДНК на мембранный фильтр для гибридизации. Метод получил свое название по имени изобретателя, английского биолога Эдвина Саузерна [4].

Метод гибридизации нуклеиновых кислот *in situ* применяют для выявления или установления точной локализации в клетке, клеточном ядре или хромосомах, определенных последовательностей ДНК или РНК. С этой целью используют меченые одноцепочечные полинуклеотидные зонды, комплементарные искомым последовательностям нуклеиновых кислот, в сочетании с процедурами, позволяющими выявить меченые нуклеиновые кислоты [2].

#### *2.4 Геномные библиотеки.*

Возможность быстрого получения препаративных количеств ДНК протяженных (более 30 т.п.н.) фрагментов генома является необходимым условием большинства экспериментов по молекулярно-генетическому и цитогенетическому анализу геномов. Гридированные геномные библиотеки, то есть имеющие адресное указание индивидуальных клонов, позволяют получать протяженные фрагменты ДНК, содержащие интересующую исследователей последовательность, и широко используются для анализа генома с использованием различных подходов [4].

Первая генетическая система для масштабного клонирования протяженных фрагментов генома была создана Бурке в 1987 году. Она была основана на искусственных хромосомах дрожжей (YACs), включающих центромеру, теломеры, автономно-реплицирующиеся последовательности, сайт клонирования и гены селективных маркеров. Система позволяла клонировать нуклеотидные последовательности до 1000 т.п.н. Поскольку в начале 90-х годов интенсивно проводилось секвенирование генома человека, такие системы были быстро востребованы и использованы для создания геномных библиотек [5]. Однако, существенные недостатки этого рода библиотек — высокий уровень химеризма, нестабильность геномной вставки и трудность приготовления препаративных количеств клонированных последовательностей ДНК — не позволили их использовать в качестве основного инструмента геномного клонирования. Большое количество тандемных повторов генома млекопитающих приводило в дрожжевой системе к сайт-специфической рекомбинации и потере фрагментов вставки, либо к образованию химерных клонов, то есть клонов, содержащих фрагменты ДНК из разных областей генома-донора. Цитологически химерные клоны выявляются при гибридизации *in situ* вследствие локализации в двух и более сайтах [4].

Поскольку прокариотические системы рекомбинации оставляют меньше вероятности нежелательных обменов, кроме того эписомы прокариот отличаются относительной стабильностью и могут существовать в суперскрученной форме, бактерии оказались более привлекательными как организмы-хозяева для геномных клонов. Плазмидные векторы не только проще хромосомных эукариотических

векторов (не содержат центромеры, теломеров, и, следовательно конструирование библиотек с ними менее трудоемко), но и позволяют существенно упростить процедуру выделения клонированной ДНК из основанных на них клонов путем полного разрушения хромосомной ДНК [4].

Первые геномные банки с использованием клеток кишечной палочки *Escherichia coli* были основаны на группе векторов — производных фага лямбда. Существуют фаговые векторы традиционной структуры, представляющие собой молекулы ДНК, способные только к литическому расщеплению *in vitro*. Космидные векторы формально являются дефектными фагами — плазмидами разных типов, содержащими *cos*-участки фага лямбда и не способными к лизису. Наконец, фагмидный (фаг + плазида) вектор, существенной особенностью которого является способность к литическому развитию *in vivo*, поддерживается в виде плазмиды [5,6]. Все подобные конструкции широко используются для получения клонотек и банков генов. Их общим недостатком является довольно большое число клонов до 10<sup>6</sup>, необходимое для уверенного представления любого фрагмента генома млекопитающих или птиц при сравнительно небольшом размере вставки — 20–40 т.п.н [5,6].

Особо стоит упомянуть космиды – плазмиды, содержащие сегмент ДНК фага  $\lambda$  с соединенными липкими концами (*cos*-сайты). Важной чертой большинства космидных векторов для клонирования является их способность включать вставки до 45 т.п.н. Если кольцевую космидную ДНК разрезать по какому-то уникальному сайту, смешать с фрагментами ДНК, содержащими липкие концы и произвести отжиг, то образуются длинные конкатемеры. При

смешении этих конкатемеров с белками, осуществляющими упаковку фага  $\lambda$ , они разрезаются по *cos*-сайтам и ДНК упаковывается в головку фага [4]. Этот процесс позволяет отобрать вставки большой протяженности, так как для того, чтобы ДНК упаковывалась в головку фага, расстояние между *cos*-сайтами должно быть 38–52 т.п.н. Такая смесь может содержать фрагменты вовсе без вставки или с несколькими повторяющимися вставками, что отражается на качестве полученной библиотеки и затрудняет ее применение для геномного анализа. Реципиентные клетки приобретают упакованные космиды в результате инфицирования «фальшивыми» фаговыми частицами, причем этот процесс более эффективен, чем трансфекция плазмидной ДНК [4]. Попав в клетку-хозяина, рекомбинантная ДНК амплифицируется и сохраняется в виде плазмиды. Полученные рекомбинантные клоны могут быть гридированы – выращены на платах с точным указанием адреса каждого клона. Получение отпечатков (реплик) на нитроцеллюлозных или других фильтрах для переноса клонов с последующим разрушением клеточных стенок бактерией и отмыванием белков позволяет проводить скринирование таких библиотек при помощи обычной дот-блот ДНК-ДНК гибридизации [6]. Недостатком космидных геномных библиотек является относительно (по сравнению с искусственными хромосомами дрожжей) небольшая величина вставки (до 45 т.п.н.) и, следовательно, большой объем библиотеки [для геномов млекопитающих около  $2 \times 10^5$  клонов]. Для того чтобы совместить преимущества космидных библиотек (высокая стабильность ДНК-клонов, относительно низкий уровень химеризма, простота конструирования, удобство выделения ДНК) и дрожжевых библиотек (большая длина вставки и компактность всей библиотеки), было

разработано две системы клонирования – на основе искусственных хромосом бактерий (ВАС) и искусственных хромосом фага P1 (РАС) [6]. Впервые РАС вектор (pСУРАС-1) был использован для переноса рекомбинантной ДНК в клетки *E. coli* при помощи электропорации. Разделенные при помощи пульс-электрофореза фрагменты геномной ДНК человека были упакованы в головки частиц бактериофага P1. Заражение такими фаговыми частицами штамма *E. coli*, экспрессирующего рекомбиназу Cre, привело к возникновению эписомных копий генома рекомбинантных фаговых частиц. Полученная геномная библиотека содержала 15000 клонов со средним размером вставки 130–150 т.п.н. Тридцать четыре клон были гибридизованы на митотических хромосомах методом FISH, при этом не было выявлено ни одного случая химеризма. Продолжительное культивирование бактерий не выявило нестабильности вставки на примере 20 клонов [5,6].

Искусственные хромосомы бактерий (ВАСs) основаны на F-факторе (факторе фертильности) – низкокопийной плазмиде, которая существует в бактериальных клетках в суперскрученной кольцевой форме и может включать вставку до 500 т.п.н [5]. Репликация фактора фертильности жестко контролируется клеточными механизмами, что существенно снижает уровень рекомбинации в эписомах этого рода. Кроме того, геномная ДНК вида-донора находится практически все время в суперскрученном состоянии, следовательно вероятность нежелательных обменов между фрагментами вставки теоретически приближается к нулю [5,6]. Первая такая библиотека была получена на основе вектора pВАС108L, включающего фактор фертильности и cosN-сайт. Размер вставки варьировал от 10 до 300 т.п.н., составляя в

среднем 100 т.п.н. Стабильность вставки (по признаку сохранения профиля рестрикционных фрагментов) подтверждена в течение 100 поколений бактериальных клеток. Проверка клонов на химеризм методом гибридизации *in situ* позволила обнаружить только один случай обмена из 28 случайно выбранных трансформантов. Дальнейшие работы с использованием этой библиотеки также показали низкую частоту транслокаций [6]. Следует отметить в среднем меньшую длину клонированных фрагментов в системах искусственных хромосом бактерий по сравнению с дрожжевыми и основанными на бактериофаге P1. Однако, указанные выше недостатки дрожжевых систем не позволяют им конкурировать с бактериальными. Преимуществом же ВАС-библиотек перед РАС-библиотеками является относительная простота их конструирования: исключается использование бактериофагов, перенос донорной ДНК проводится при помощи обычной трансформации. Таким образом, оптимальными системами для клонирования протяженных геномных последовательностей более 50 т.п.н. признаны искусственные хромосомы бактерий, а для фрагментов менее 50 т.п.н. (которые имеют преимущества для использования в некоторых исследованиях геномов) таковыми остаются космиды [4,5,6].

## 2.5 Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — это экспериментальный метод молекулярной биологии, который применяется при необходимости многократного увеличения малых концентраций отдельных фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом



материале (образце) с целью введения мутаций, получения гибридных фрагментов ДНК, диагностики наследственных и инфекционных заболеваний, установления отцовства, а также для клонирования и выделения новых генов [2,3].

Принцип полимеразной цепной реакции заключается в многократном избирательном копировании (амплификации) определённого участка ДНК, проводимом *in vitro* с помощью фермента *taq*-полимеразы. Условия реакции подбираются так, чтобы амплифицировался только заданный фрагмент ДНК и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. Отличие ПЦР от процесса репликации, проходящего в клетках живых организмов, состоит в том, что полимеразная цепная реакция позволяет амплифицировать относительно короткие участки ДНК (не более 3000 пар оснований) [3]. Использование смеси нескольких полимераз, например, *taq* и *rvc*, при определенных условиях возможна амплификация фрагментов ДНК длиной 20 – 40 т.п.н., однако эти фрагменты всё равно значительно короче хромосомной ДНК эукариотической клетки [4,5,6].

Короткие (18—30 н.п.) синтетические олигонуклеотиды, называемые праймерами, гибридизуются ДНК-матрицей согласно принципу комплементарности пар оснований, что обуславливает специфичность ПЦР. Каждый из праймеров комплементарен участку одной из цепей двуцепочечной матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого фрагмента[3].

## *2.6 Секвенирование ДНК. Сборка сиквенсов геномов.*

Секвенирование биополимеров (белков и нуклеиновых кислот — ДНК и РНК) — определение их первичной аминокислотной или нуклеотидной последовательности (от англ. sequence — последовательность).

Для секвенирования применяются методы Эдмана, Сэнгера и другие [3,4]. Дезоксинуклеотидный метод, или метод «обрыва цепи», был разработан Ф. Сэнгером в 1977 году и в настоящее время широко используется для определения нуклеотидной последовательности ДНК. До начала секвенирования производят ПЦР-амплификацию участка ДНК, последовательность которого требуется определить, с использованием в качестве предшественников молекулы дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddNTP). При дидезокси-секвенировании происходит гибридизация синтетического олигонуклеотида-праймера длиной 17—20 п.н., поставляющего 3'-гидроксильную группу для инициации синтеза цепи, комплементарной матрице, со специфическим участком одной из цепей секвенируемого фрагмента. Раствор с праймером распределяют по четырем пробиркам, в каждой из которых находятся четыре дезоксинуклеотида - dATP, dCTP, dGTP и dTTP (один из них — меченный радиоактивным изотопом) - и один из четырех 2',3'-дидезоксинуклеотидов (ddATP, ddTTP, ddGTP или ddCTP). Дидезоксинуклеотид включается по всем позициям в смеси растущих цепей, и после его присоединения рост цепи сразу останавливается. В результате этого в каждой из четырех пробирок образуется уникальный набор олигонуклеотидов разной длины, включающих праймерную последовательность. Далее в пробирки добавляют формамид для денатурации фрагментов ДНК и проводят электрофорез

в полиакриламидном геле на четырех дорожках. После разделения фрагментов ДНК проводят радиоавтографию, которая позволяет «прочитать» нуклеотидную последовательность секвенируемого сегмента ДНК [4].

В настоящее время дидезоксинуклеотиды метят четырьмя разными флуоресцентными красителями и проводят ПЦР в одной пробирке. Затем во время электрофореза в полиакриламидном геле луч лазера в определенном месте геля возбуждает флуоресценцию красителей, и детектор определяет, какой нуклеотид в настоящий момент мигрирует через гель. Современные приборы используют для секвенирования ДНК капиллярный электрофорез [3,4,5].

Метод дробовика (Shotgun sequencing или шотган-секвенирование/клонирование) используется для секвенирования протяженных фрагментов ДНК. При методе дробовика ДНК случайным образом дробится на мелкие сегменты, которые затем секвенируются обычными методами, использующими обрыв цепи (метод Сэнгера) [6]. Полученные перекрывающиеся случайные фрагменты ДНК затем собирают с помощью специальных программ в одну большую последовательность. Однако некоторую трудность при сборке могут представлять ДНК-повторы.

## *2.7 Биоинформатика и системная биология.*

Биоинформатика или вычислительная биология — один из разделов биологии, предметом которого являются молекулярные процессы, но в данном случае исследования проводятся не *in vitro*, а *in silico*, т.е. не в пробирке, а при помощи компьютеров [6].

Под биоинформатикой понимают любое использование компьютеров для обработки биологической информации. На практике часто это понятие сужается и включает в себя только использование компьютеров для обработки экспериментальных данных по структуре биологических макромолекул (белков и нуклеиновых кислот) с целью получения биологически значимой информации [1,6].

В биоинформатике используются методы прикладной математики, статистики и информатики. Исследования в областях биоинформатики и системной биологии зачастую пересекаются. Основные усилия исследователей, работающих в области биоинформатики, направлены на изучение геномов, анализ и предсказание структуры белков, предсказание взаимодействий различных белков друг с другом и другими молекулами, а также реконструкция процессов эволюции [1,5,6].

Биоинформатика помогает ученым, используя последовательности ДНК, прогнозировать структуры и возможные функции кодируемых ими белковых молекул, и, таким образом, связывает геномные и протеомные проекты [1].

Велика роль биоинформатики в процессе маркировки генов и других объектов в последовательности ДНК.

Эволюционная биология исследует происхождение и появление видов, также как их развитие с течением времени. Методы биоинформатики активно используются биологами эволюционистами для решения целого ряда задач [6]:

- изучение эволюции большого числа организмов, включая эволюцию молекул ДНК, а не только строения или физиологии;

- сравнение целых геномов, что позволяет изучать такие явления как дупликация генов, горизонтальный перенос генов, и предсказывать бактериальные специализирующие факторы;
- построение компьютерных моделей популяций, с целью предсказания поведения систем во времени;

Системная биология — включает а себя целый ряд существующих и перспективных направлений в биологии. Системную биологию можно определить как междисциплинарную науку о жизни, изучающую сложные взаимодействия в живых системах и использующую новый подход в биологии: холизм вместо редукционизма. Задачами системной биологии являются исследование и моделирование свойств сложных биологических систем, которые нельзя объяснить суммой составляющих ее свойств.

Для верификации создаваемых моделей системная биология работает с самыми различными типами экспериментальных данных, описывающих как отдельные составляющие, так и систему в целом. В системной биологии часто используются данные, полученные в других областях биологии: биохимии, биофизики, молекулярной биологии [1].

Биологические системы являются очень сложными объектами. Для их описания используется огромное количество параметров, переменных и уравнений, а значит, развитие современной системной биологии невозможно без использования компьютерных технологий.

### **ГЛАВА III. Молекулярная организация генома собаки**

Кариотип собаки представлен 38-ю парами аутосом и парой половых хромосом, диплоидный набор – 78 хромосом. Такое большое число хромосом не характерно для млекопитающих. При реципрокных гибридизациях *in situ* полнохромосомных ДНК-зондов собаки и человека на митотических хромосомах выявляется относительно небольшое число консервативных сегментов, уровень перестроек незначителен. Примерная длина генетических карт собаки - 2700 сМ [1].

Успех исследований молекулярно-генетической природы заболеваний и захватывающей истории эволюции собаки очень сильно зависит от развития ключевых геномных ресурсов – генетических карт, библиотек ДНК [2], контигов протяженных клонов, баз данных. Первыми общедоступными генетическими картами в конце 90-х годов прошлого столетия были рекомбинационные карты на основе классических маркеров и карты, полученные на базе изучения поведения хромосом в клетках радиационных гибридов. Первые сравнительные карты собака-человек и собака-мышь позволили экстраполировать детальную информацию о геноме человека и мыши на вид *Canis familiaris*. Наиболее продвинутой сравнительной картой собака человек была основана на панели радиационных гибридов длиной 9000 рад и включала 10348 маркеров собаки, из которых 9850 были ортологами маркеров человека [3].

Геном собаки состоит из примерно 2,5 млрд. п.н. Исследования в рамках проекта полного секвенирования (прочтения нуклеотидной последовательности) генома собаки начались в июне 2003 года. Было выделено около 30 млн. долларов на его выполнение. Через год – в

июле 2004 года – был опубликован черновой вариант полного сиквенса генома самки боксера по кличке Таша (CanFam1.0), причем длина прочтенной последовательности была в семь с половиной раз больше длины всей ДНК этого вида [4].

Оказалось, что эухроматиновая часть генома собаки на 18% меньше, чем у человека и на 6% чем у домашней мыши. По всей видимости, это объясняется меньшим числом инсерционных повторов в геноме собаки по сравнению с человеком и домашней мышью. Это обстоятельство позволило исследователям добиться высокого качества сборки полного сиквенса генома, что подтверждается высокой конкордантностью с ранее опубликованными генетическими картами и с результатами физического картирования методом FISH отдельных ВАС-клонов [1].

Анализ собранной полногеномной последовательности домашней собаки позволил выявить значительное число протяженных сегментов эволюционного консерватизма с геномами человека и домашней мыши, которые составляют до 94% всей последовательности. Число генов, выявленных при секвенировании генома собаки - 19000 оказалось несколько ниже, чем у человека (около 25000). 14200 генов собаки представляют собой ортологичную группу 1-1-1 собака-человек-домашняя мышь. Примерно 5,4% ортологичных нуклеотидов собаки и человека подвергались движущему отбору, который более жестким в линии собаки, чем в линии человека, но более мягким, чем в линии домашней мыши. Однако, давление отбора несколько различалось для ортологов с различными функциями. Гены, вовлеченные в функционирование нервной системы эволюционировали у собаки и человека быстрее, чем у домашней

мышь. Было показано, что распространенность семейств генов у собаки ниже, чем у других изученных в этом отношении плацентарных животных, что несомненно является архаичной чертой [4].

Следует отметить, что собака отличается необычайно высоким уровнем генетической изменчивости - около 27%. Для сравнения наиболее удаленные популяции человека различаются по последовательностям ДНК на 5-10%.

Более чем семикратное покрытие генома при сборке полногеномной последовательности было достигнуто за счет использования геномной библиотеки CHORI-82 на основе искусственных хромосом бактерий (BAC), которая содержит 197975 клонов со средним размером вставки 171,5 т.п.н. Кроме этой библиотеки, существует геномная библиотека RPCI – 81, приготовленная из ДНК самца породы доберман пинчер (число клонов – 157255, средний размер вставки – 155 т.п.н.) [2]. Сравнение геномной последовательности боксера Таши с ДНК других пород позволило выявить большое число сайтов мононуклеотидного полиморфизма, которые могут быть маркерами полезных признаков и наследственных заболеваний.

#### **ГЛАВА IV. Молекулярная организация генома кошки**

Геном кошки, состоящий из 19 пар хромосом. Методом гибридизации *in situ* особых пэйнтинговых ДНК-зондов, полученных от различных видов млекопитающих, на хромосомах домашней кошки (ZOO-FISH) было показано наличие высокого уровня эволюционного



консерватизма порядка расположения генов (консервативная синтения) как среди видов семейства кошачьих, так и среди всего отряда хищных и среди плацентарных млекопитающих вообще [1].

Сравнение генетических карт, полученных на основе радиационных гибридов, выявило также высокую степень эволюционного консерватизма хромосомных районов домашней кошки и человека, даже более высокую, чем при сравнении хромосом человека с хромосомами многих других видов млекопитающих. Например, по сравнению с геномом человека в геноме домашней кошки в ходе эволюции происходило в 2 - 3 раза меньше хромосомных перестроек, чем в геномах грызунов семейства мышинных (крысы, мыши). У млекопитающих по-видимому в процессе эволюции хромосомные перестройки и обмены происходили очень редко, что видно при сравнении человека и домашней кошки. В то же время как исключение наблюдаются масштабные перетасовки, как это происходило в ходе эволюции гиббонов, медведей, собак и грызунов семейства мышинных. Параллелизм геномов человека и кошки позволяет ожидать обнаружение значительно более протяженных участков синтении этих видов при построении более полной сборки сиквенса генома *Felis catus*.

Существующая генетическая карта кошки на основе радиационных гибридов общей длиной 5000 рад включает 784 маркера I типа (кодирующие последовательности), что дает плотность маркеров 1 на 4,3 сМ, и 1086 микросателлитных локусов (маркеры II типа) с плотностью 1 на 3,5 сМ. Интегрированная карта включает 1881 маркер со средним интервалом 1,8 сМ [1].

Путем анализа косегрегации аллелей у потомков межвидового скрещивания домашней кошки *Felis catus* и бенгальской кошки *Prionailurus bengalensis* была построена рекомбинационная генетическая карта, которая включает 248 микросателлитов и 81 маркер I типа, ее длина (усредненно по полу) 3300 сМ со средним интервалом 8 сМ. При участии компании Нестле-Пурина была построена генетическая карта на основе анализа продуктов 483 мейозов у 256 животных с использованием 705 микросателлитов. Таким образом, плотность карты составила 1 маркер на 4,7 сМ, что значительно хуже, чем на карте, полученной с использованием радиационных гибридов [2].

На данный момент сконструировано три геномных библиотеки домашней кошки [3].

1) Геномная библиотека с использованием в качестве векторов для клонирования искусственных хромосом на основе бактериофага P1A с 2X эквивалентом генома, сконструированная на основе ДНК нормального самца домашней кошки, состоит из 91900 P1-клонов со средним размером вставки 80 т.п.н.

2) Усовершенствованная геномная библиотека на основе искусственных хромосом бактерий с 10-кратным эквивалентом генома и содержащая 234349 ВАС-клонов со средним размером вставки 137 т.п.н. была сконструирована с использованием ДНК самца домашней кошки. Эти ресурсы были с успехом применены для реализации множества проектов, включая создание контига ВАС- и P1-клонов размером 3 млн.п.н., перекрывающего весь район МНС

домашней кошки, секвенирования регионов класса I и класса II, изоляции и клонирования генов PKD1, PKD2, ASIP и MC1R.

Космидная библиотека Y-хромосомы кота включает 3648 клонов и имеет покрытие 4,3 эквивалента FCAУ. Эта библиотека активно используется для построения контига эухроматиновой области Y-хромосомы.

Целью проводимых ныне исследований по полному секвенированию генома домашней кошки является создание высококачественной сборки из примерно 100-120 ультраконтигов, что по мнению исполнителей проекта должно быть достаточно для покрытия генома на 95%. Эта оценка основана на результатах подобного проекта по секвенированию генома домовой мыши, где 89 ультраконтигов обеспечили покрытие на 96% [4].

Шесть пород кошек - американская короткошерстная, норвежская лесная, ориентальная короткошерстная, мэнкс, японский бобтейл и шотландская вислоухая - предполагается использовать для построения генетической карты на основе мононуклеотидных полиморфизмов (SNP), что, по мнению исполнителей, должно обеспечить достаточный уровень разнообразия для насыщения карты примерно 250000 маркеров [4].

Опубликованный в настоящее время полный сиквенс ядерного генома домашней кошки получен методом дробовика и представляет двухкратный эквивалент всей ДНК этого вида [4]. Отсутствие полной сборки существенно ограничивает возможности его применения.

Митохондриальный геном вида *Felis catus* (идентификационный номер NC\_001700) секвенирован полностью. Он состоит из 17.009 п.н.

и содержит 13 генов. При этом 66% эписомной ДНК представлена кодирующими последовательностями [4].

Следует отметить, что к настоящему времени геном этого вида намного менее подробно охарактеризован, чем геном собаки.

## **ГЛАВА V. Генотипирование собак и кошек**

Микросателлитные локусы в силу своей молекулярной структуры обладают необыкновенной изменчивостью и, будучи селективно-нейтральными признаками, не подвержены действию отбора. Комбинация аллелей таких локусов является уникальной характеристикой особи, причем наборы аллелей приходят от обоих родителей. Степень сходства генотипов по микросателлитным локусам абсолютно точно отражает степень кровного родства.

Американским Кеннел клубом рекомендована система генотипирования собак на основе полиморфизма длин десяти микросателлитов (PEZ 1 - 92–136 п.н., FHC 2054 - 140–183 п.н., FHC 2010 - 210–260 п.н., PEZ 5 - 97–121 п.н., PEZ 20 - 170–201 п.н., PEZ 12 - 250–320 п.н., PEZ 3 - 95–154 п.н., PEZ 6 164–214 п.н., PEZ 8 - 222–260 п.н., FHC 2079 - 263–299 п.н.), которая нашла широкое практическое применение [1].

Для контроля происхождения и индивидуальной идентификации кошек используют систему маркеров, рекомендованную Международным обществом генетики животных (ISAG) в 2006 году. Она состоит из девяти микросателлитных

локусов: FCA069 - 88–116 п.н., FCA075 - 112–146 п.н., FCA105 - 173–207 п.н., FCA149 - 120–136 п.н., FCA220 - 208–224 п.н., FCA229 - 150–174 п.н., FCA310 - 112–138 п.н., FCA441 - 133–173 п.н., FCA678 - 222–236 п.н.[2].

Существующие системы позволяют проводить контроль происхождения и со 100% точностью идентифицировать особь.

## **ГЛАВА VI. Молекулярная генетика наследственных аномалий собак**

Большое количество наследственных аномалий собак имеют моногенный характер наследования. Причем, зачастую рецессивным (т.е. скрытым) бывает аллель, определяющий заболевание или летальность. В популяции долго могут существовать гетерозиготные носители, не проявляющие признаков наследственной аномалии, до тех пор, пока не появятся потомки родительской пары таких носителей. В таком случае в помете одна четверть щенков будут больными, половина — носителями. Поскольку в современном собаководстве зачастую используется ограниченное число производителей, вероятность такой встречи достаточно велика. По законам популяционной генетики отбор против рецессивных гомозигот не эффективен. Требуется выявление и исключение (по возможности) гетерозиготных носителей из разведения. В случае, если носитель обладает исключительной племенной ценностью, следует проводить тестирование его потомков. Современные методы на основе ПЦР позволяют выявлять гетерозиготное носительство

около 50 различных типов наследственных аномалий. Ниже приведены данные по молекулярной генетике наследственных аномалий собак из источников, реферированных в PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

### *6.1 Заболевания нервной системы.*

#### **Цероидный липофусциноз. Такса.**

Аутосомно-рецессивное заболевание, относящееся к группе болезней лизосомного накопления, характеризуется прогрессирующей нейропатией и накоплением автофлуоресцирующих цитоплазматических гранул. Обычно начинается в возрасте 9 месяцев, проявляется рвотой, умственной заторможенностью, забыванием ранее усвоенных команд. Затем развивается дезориентация в пространстве, атаксия, генерализованные припадки. Смерть наступает обычно в возрасте 12 месяцев. Делеция цитозина в 325 положении нуклеотида экзона 4 гена TPP1 (трипептидил пептидаза 1) приводит к появлению стоп-кодона и является молекулярной причиной этого заболевания [1].

**Дегенеративная миелопатия.** *Боксер, вельш корги кардиган, чесапик бей ретривер, немецкая овчарка, вельш корги пемброк, родезийский риджбек, большой (стандартный) пудель.*

Аутосомно-рецессивное смертельное нейродегенеративное заболевание. Обычно спастичность и проприоцептивная атаксия возникают в возрасте 8 лет. Если эвтаназия не была проведена,

начинается вялый тетрапарез и другие нейрональные нарушения. Транзиция гуанина на аденин в кодирующей последовательности гена SOD1 (супероксид дисмутаза 1) приводит к замене глутаминовой кислоты на лизин в 40-м кодоне [2].

### **Глободная клеточная лейкодистрофия (болезнь Краббе).**

*Ирландский сеттер керн-терьер и вест хайленд-уайт-терьер.*

Аутосомно-рецессивное заболевание центральной нервной системы. Недостаточность активности лизосомального фермента бета-галактоцереброзидазы приводит к нарушению синтеза миелина – одного из основных компонентов нервных клеток. Клинически проявляется в потере координации, слабости и треморе. Мутация, ответственная за эту аномалию – вставка величиной 78 п.н. (16 п.н. – дупликация сайта инсерции и 64 п.н. последовательности малой ядерной РНК U4) в гене GALC, кодирующем бета-галактоцереброзидазу [3].

### **GM1-Ганглиозидоз. Хаски, шиба ину.**

Аутосомно-рецессивное нейродегенеративное заболевание, вызванное недостаточностью бета-галактозидазы – фермента, участвующего в синтезе миелина. Болезнь развивается в возрасте 5-7 месяцев и проявляется в нарушении зрения, летаргии, затрудненном передвижении. Смерть обычно наступает в 8-12 месяцев. Молекулярной основой этой аномалии является дупликация 19 п.н. в положении нуклеотида 1688-1706 по кДНК гена GLB1 (бета-галактозидазы). В результате мутации с последовательности гена

GLB1 считывается два транскрипта – один содержит стоп-кодон в экзоне 15, другой вообще не содержит экзона 15 [4].

### **L2-Гидроксиглутаровая ацидурия.** *Стаффордширский бультерьер.*

Аутосомно-рецессивное нейрометаболическое заболевание, сопровождающееся прсихомоторной ретардацией, припадками и атаксией. Биохимическим маркером является накопление L2-гидроксиглутаровой кислоты в спинномозговой жидкости, плазме и моче. Причиной этой аномалии являются две мутации – замена тимина на цитозин в положении 1297 (лейцина на пролин в кодоне 433) и цитозина на тимин в 1299-м положении (гистидина на тирозин в 434-м кодоне) экзона 10 гена L2HGDH (дегидрогеназа L2-гидроксиглутаровой кислоты) [5].

### **Мукополисахаридоз типа IIIA.** *Новозеландская овчарка.*

Аутосомно-рецессивное заболевание связано с недостаточностью активности гепаран сульфат сульфамидазы, приводящей к накоплению в лизосомах и выведению с мочой глкозамингликан гепарансульфата. Клинически проявляется тяжелой дегенерацией нервной системы. К появлению этой аномалии приводит вставка цитозина в 708-709 положении нуклеотида гена SGSH (гепаран сульфат сульфамидазы) [6].

### **Нарколепсия.** *Такса, доберман пинчер, лабрадор ретривер.*

Аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся излишней сонливостью в дневное время, катаплексией, сонным



параличом. У разных пород описаны несколько мутаций гена HCRTR2 (гипокретин\орексин рецептора 2), приводящих к нарколепсии. У такс это замена гуанина на аденин в 451-м положении нуклеотида (соответственно, глутаминовой кислоты на лизин в 54-кодоне), у лабрадор ретривера и доберман пинчера – это пропуск экзонов того же гена, приводящий к появлению полипептидных последовательностей длиной 247 и 330 аминокислотных остатков соответственно, вместо 444 у особей дикого типа [7].

**Неонатальная энцефалопатия с припадками.** *Большой (стандартный) пудель.*

Аутосомно-рецессивная аномалия. Больные щенки отстают в росте и развитии, многие погибают в течение первой недели жизни. К 4-6-й неделе развивается атаксия, тремор всего тела, генерализованные припадки. Обычно к 7-й неделе наступает смерть. Причиной заболевания является трансверсия тимина на гуанин, приводящая к замене метионина на аргинин в кодоне 51 в гене ATF-2 (активирующий домен транскрипционного фактора 2) [8].

**Нейрональный цероидный липофусциноз.** *Американский бульдог, такса, английский сеттер.*

Аутосомно-рецессивная аномалия, относится к группе болезней лизосомного накопления. Проявляется нейродегенерацией, упадком двигательной и познавательной активности, нарушением координации движений, аномальным поведением. Заболевание обычно развивается

в возрасте 1-2 лет и заканчивается летально. В гене CTSD (катепсина Д) выявлена транзиция гуанина на аденин, приводящая к замене метионина на изолейцин в 199-м кодоне, которая является молекулярной основой заболевания [9].

## 6.2 Заболевания глаз.

**Мультифокальная ретинопатия.** *Мастиф, бульмастиф, пиринейская горная собака, бордосский дог и котон де тулеар.*

Аутосомно-рецессивное заболевание. Обычно в возрасте 4-х месяцев на сетчатке появляются розовато-серые пятна, различные по форме и величине, позднее наступает полная потеря зрения. За это заболевание ответственны две мутации гена BEST1 (бестрофин 1):

- у пиринейской горной собаки, английского мастиффа, бульмастифа и родственных пород присутствует стоп-кодон в положении 25 (экзон 2);

- у собак породы котон де тулеар произошла миссенс-мутация – замена глицина на аспарагиновую кислоту в кодоне 161 (экзон 5) [10].

**Аномалия глаз колли.** *Австралийская овчарка, бордер колли, длинношерстный и короткошерстный колли, новошотландский ретривер, шетландская овчарка (шелти).*

Аутосомно-рецессивное заболевание, которое обусловлено аномальным развитием глазного яблока примерно на 30-е сутки эмбрионального развития (Рисунок 3). При мезодермальных нарушениях наблюдается среднетяжелая форма заболевания: гипоплазия хороида, недостаточное количество пигмента сетчатки, недоразвитие кровеносных сосудов, полная слепота наступает редко.

В случае эктодермальной инвазии развивается тяжелая форма: колобомы, внутриглазные кровотечения, полная слепота. Причиной этого заболевания является делеция величиной 7,8 т.п.н. в интроне гена NHEJ1 (фактор 1, соединяющий негомологичные концы ДНК). В пределах делетированного фрагмента находится большое число сайтов связывания транскрипционных факторов, что приводит уменьшению числа копий мРНК этого гена [11].

**Дегенерация колбочек.** *Курицхаар, маламут, норвежский элкхаунд.*

Аутосомно-рецессивное заболевание, сходное с ахроматопсией у человека, проявляется дневной слепотой и отсутствием или недостатком колбочек в сетчатке взрослых особей (Рисунок 4). Причиной данного заболевания у маламутов является делеция всех экзонов гена CNGB3 (циклического нуклеотид зависимого канала бета 3). У курицхааров к возникновению описываемой аномалии приводит миссенс мутация в 784 положении нуклеотида в экзоне 6 этого же гена, приводящая к замене аспарагиновой кислоты на аспарагин в 262 кодоне [12].

**Врожденная постоянная ночная слепота.** *Бриар.*

Аутосомно-рецессивное заболевание, проявляется слепотой в ночное время и разной степенью нарушения дневного зрения от нормального до слепоты.

Причиной заболевания является делеция четырех нуклеотидов AAGA в положении 487-490 нуклеотидной последовательности гена RPE65, кодирующего эпителий-специфический протеин пигмента сетчатки,

молекулярная масса которого 65 kDa. В результате данной мутации происходит сдвиг рамки считывания и появляется преждевременный стоп-кодон [13].

**Наследственная катаракта.** *Австралийская овчарка, бостон терьер, стаффордширский бультерьер, венгерский пули.*

Существует два типа наследственной катаракты. При первом – раннем - типе заболевание начинается очень рано, затрагивает оба глаза, быстро прогрессирует и приводит к полной слепоте в течение первых нескольких месяцев жизни животного. При втором – позднем - типе наследственной катаракты заболевание начинается в возрасте 3 лет и старше, выраженность клинических признаков и скорость прогрессирования заболевания варьируют (Рисунок 5). У стаффордширских бультерьеров и бостон терьеров данное заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу, а у австралийских овчарок – по аутосомно-доминантному. Причиной наследственной катаракты являются мутации в гене HSF4 транскрипционного фактора 4 теплового шока. Ранняя наследственная катаракта у бостон терьеров и стаффордширских терьеров ассоциирована с инсерцией цитозина в 9-м экзоне гена HSF4, а у австралийских овчарок с делецией в том же экзоне [14].

**Прогрессирующая атрофия сетчатки.** *Вельш корги кардеган, ирландский сеттер, самоед, хаски, дворняжка, американский эскимосский шпиц, бульмастиф, чесапик бей ретривер, китайская хохлатая собака, американский коккер спаниель, английский коккер*

*спаниель, энглебухер зенненхунд, финский лаппхунд, кувас, лабрадор ретривер, мастифф, карликовый пудель, цвергшнауцер, новошотландский ретривер, той пудель, португальская водяная собака, шведский лаппхунд.*

Группа глазных аномалий со сходными проявлениями (Рисунок 6). Вначале болезнь проявляется дегенерацией палочек и потерей ночного зрения, а затем и дневного зрения в результате дегенерации колбочек. У собак породы вельш корги кардиган известна аутосомно-рецессивная форма заболевания *gcd3*, которая обусловлена делецией аденина в положении 1939-1940 (кодон 616) гена *PDE6A* (альфа-субъединица фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата), приводящей к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона. У ирландских сеттеров *gcd1*-форма прогрессирующей атрофии сетчатки связано с появлением стоп-кодона в 807 положении экзона 21 гена *PDE6B* (бета-субъединица фосфодиэстеразы). У самоедов и хаски заболевание сцеплено с полом и вызвано делецией ГАГАА в гене *RPGR* (пигментный ретинит, регулятор ГТФазы). У дворняжек X-сцепленная форма заболевания обусловлена делецией ГА в том же гене. Замена гуанина на аденин во втором кодоне гена *PCRD* (прогрессирующая дегенерация палочек и колбочек) является молекулярной причиной *pcrd*-формы (сходной с пигментным ретинитом человека) этого заболевания у восемнадцати пород [15].

### *6.3 Заболевания сердечно-сосудистой системы, крови и иммунной системы.*

**Недостаточность адгезии лейкоцитов.** *Ирландский красный и красно-белый сеттеры.*

Это аутосомно-рецессивное заболевание было впервые описано в США у ирландских сеттеров в середине 1980-х годов. Для пораженных собак вследствие недостаточности иммунной системы характерны часто повторяющиеся бактериальные инфекции, медленное заживление ран, выраженный лейкоцитоз. Причиной заболевания является мутация в гене бета-2 интегрина, приводящая к замене в 36-м кодоне цистеина на серин. У ирландских сеттеров европейского разведения идентифицирована миссенс мутация в 107 положении нуклеотида в гене ITGB2, кодирующем бета-2 субъединицу интегрина, которая приводит к описанной выше замене цистеина на серин в 36-м кодоне [16].

**Недостаточность фактора VII.** *Бигль, эрдельтерьер, аляскинский кли кай, ризенинауцер, шотландский дирхаунд.*

Недостаточность фактора VII у собак - аутосомно-рецессивный признак, первоначально был выявлен у биглей. Заболевание проявляется склонностью к небольшим или умеренным кровотечениям. Причиной данной аномалии является миссенс-мутация - замена гуанина на аденин в экзоне 5 гена сFVII, кодирующего домен, подобный эпидермальному ростовому фактору. Эта мутация приводит к замене глицина на глутаминовую кислоту в 96-м кодоне [17].

**Тромбастения Гланцмана.** *Оттерхаунд, пиринейская горная собака.*

Это аутосомно-рецессивное заболевание, проявляющееся склонностью к кровотечениям из-за качественной или количественной недостаточности гликопротеинов альфа-2-B и бета-3 в мембранах тромбоцитов. Причина данной аномалии заключается в инсерции 14 нуклеотидов в экзоне 13 и дефектном сплайсинге интрона 13 гена ITGA2B, кодирующего субъединицу альфа-2-B интегрина. В результате инсерции происходит сдвиг рамки считывания и образуется стоп-кодон. Продукт поврежденного гена не имеет трансмембранного и цитоплазматического домена и значительной части внеклеточного домена [18].

### **Циклическая нейтропения (синдром серых колли).**

*Короткошерстный и длинношерстный колли.*

Данная аномалия наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Пораженные собаки имеют серебристо-серый цвет шерсти, периодически с интервалом 10 – 12 дней подвержены различным инфекциям. Больные животные часто погибают в возрасте до 1 года, редко доживают до 2 – 3 лет. Необычная восприимчивость к инфекциям обусловлена периодическим (каждые 10 – 12 дней) снижением количества нейтрофилов в крови пораженных собак до критического уровня. Причиной данного заболевания является инсерция дополнительного аденина в гомополимерный блок, состоящий из 9 аденинов, в экзоне 21 гена AP3B1, кодирующего бета-1 субъединицу адаптер-связанного белкового комплекса 3, что приводит к сдвигу рамки считывания [19].

**Ювенильная дилатационная кардиомиопатия. Португальская водяная собака.**

Аутосомно-рецессивное заболевание, внезапная быстрая смерть больных собак наступает в возрасте от 6 недель до 7 месяцев. В некоторых случаях за 12 – 48 часов до смерти у животного наблюдаются потеря аппетита, слабость, рвота, затрудненное дыхание. Выявлено сцепление локуса DCM (дилационная кардиомиопатия) с маркером FH3316 на хромосоме CFA8, что позволяет проводить молекулярную диагностику заболевания [20].

**Недостаточность пируваткиназы. Басенджи, вест хайленд-уайт терьер.**

Это аутосомно-рецессивное заболевание проявляется гемолитической анемией (бледные слизистые оболочки десен, глаз, век и других органов, тахикардия, общая слабость, возможно увеличение селезенки и печени). Клинические признаки заболевания появляются в возрасте от 4 месяцев до 1 года. Большинство собак, страдающих недостаточностью пируваткиназы, погибают в возрасте от 1 до 4 лет из-за прогрессирующей анемии и печеночной недостаточности. Причиной данной аномалии является делеция цитозина в 433 положении нуклеотида в комплиментарной ДНК гена PKLR, кодирующего пируват киназу R-типа у басенджи и вставка 6 п.н. в экзоне 10 того же гена у вест хайленд уайт терьеров [21].

**Тромбопатия. Оттерхаунд.**

Данная аномалия наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Проявляется в склонности к кровотечениям. Причина аномалии заключается в замене цитозина на гуанин в положении 1193 в экзоне 12 гена ITGA2B, кодирующего тромбоцитарный гликопротеин 2-b. В результате этой мутации происходит замена гистидина на



аспарагиновую кислоту в 398 кодоне в третьем кальций связывающем домене гликопротеина 2-b [22].

**Болезнь фон Виллебранда.** *Бернский зенненхунд, дратхаар, доберман пинчер, керри блю терьер, койкерхондье (голландский спаниель), манчестерский терьер, папильон, вельш корги пемброк, пудель, скотчтерьер, шетландская овчарка (шелти), стабихон, все пойнтеры.*

Аномалия проявляется в склонности к кровотечениям из-за недостатка (или отсутствия) в плазме фактора фон Виллебранда (vWF). Заболевание бывает трех типов:

- 1-й тип. Аномалия вызвана недостатком мультимеров фактора фон Виллебранда в плазме. Встречается у бернских зенненхундов, доберман пинчеров, керри блю терьеров, манчестерских терьеров, вельш корги пемброков, пуделей и папильонов. Известно, что у доберман пинчеров заболевание имеет полигенный тип наследования, хотя для развития заболевания необходима мононуклеотидная мутация в гене VWF (фактор фон Виллебранда).

- 2-й тип. Аутосомно-рецессивное заболевание, связанное с недостатком фактора фон Виллебранда и его мультимеров. Встречается у пойнтеров. Аномалия связана с заменой аденина на гуанин в экзоне 28 гена VWF.

- 3-й тип. Летальная аномалия шелти, скотч терьеров, койкерхондье. Характеризуется полным отсутствием фактора фон Виллебранда в плазме. У собак породы скотч терьер заболевание обусловлено делецией одного нуклеотида в экзоне 4 гена VWF. У койкерхондье

известна замена гуанина на аденин в донорном сайте сплайсинга интрона 16 гена VWF (ТГГТААГТ на ТГАТААГТ) [23].

#### *6.4 Аномалии обмена веществ и ферментов.*

**Врожденный гипотиреозидизм с припадками.** *Американский той-фокстерьер, рэт-терьер.*

Аутосомно-рецессивное заболевание, связанное с недостатком гормона щитовидной железы. Щенки отличаются непропорциональной карликовостью, поздним развитием остевых волос, летаргией, нарушением мыслительной деятельности. Замена цитозина на тимин, приводящая к образованию стоп-кодона в гене ТРО (тиреоидной пероксидазы), является причиной аномалии [24].

**Медный токсикоз.** *Бедлингтонтерьер.*

Аутосомно-рецессивное заболевание, проявляется в нарушении выведения меди печенью, что приводит к лизосомному накоплению меди и прогрессирующему хроническому активному гепатиту. Чаще отмечается хроническое, прогрессирующее течение, которое часто заканчивается циррозом или асцитом. Симптомы: апатия, анорексия, рвота, летаргия, а при остром течении желтуха и смерть в течение 72 ч. Делеция 39,7 т.п.н., точки разрыва которой находятся в интронах 1 и 2 гена COMMD1 (домен 1 метаболизма меди), обуславливает эту аномалию [25].

**Фукозидоз.** *Английский спрингер спаниель.*

Аномалия связана с недостаточной активностью фермента альфа-L-фукозидазы (один из ферментов лизосом), наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Основные симптомы: слепота, глухота, поведенческие и двигательные расстройства, рвота. Заболевание начинается в возрасте от 18 месяцев до 4 лет и очень быстро прогрессирует. Смерть больного животного наступает в течение нескольких недель. У английских спрингер спаниелей причиной этого заболевания является делеция 14 пар нуклеотидов в 3'конце экзона 1 гена FUCA1, кодирующего альфа-L-фукозидазу, что приводит к сдвигу рамки считывания и появлению в 152-й позиции белка стоп кодона. Как следствие 25 новых кодонов считываются с экзона 2 до терминации транскрипции [26].

#### **Гликогеноз типа Ша. Курчавошерстный ретривер.**

Это редкое заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу, характеризуется снижением или отсутствием активности амило-1,6-глюкозидазы и (или) олиго-1,4-трансглюкозидазы - ферментов, ответственных за метаболизм гликогена, что приводит к накоплению гликогена в организме и, как следствие, дисфункции различных органов - печени, сердца и почек, скелетной мускулатуры. Причиной данной аномалии является делеция аденина в экзоне 32 гена AGL, кодирующего амило-1,6-глюкозидазу, 4-альфа-глюканотрансферазу, вследствие чего происходит сдвиг рамки считывания и появляется преждевременный стоп-кодон, завершающий трансляцию после 126-го аминокислотного остатка [27].

**Недостаточность пируватдегидрогеназы фосфатазы.** *Кламбер спаниель, суссекс-спаниель.*

Аутосомно-рецессивная аномалия, имеет летальное действие. Нонсенс мутация – замена гуанина на тимин в 277 положении по кДНК и, соответственно, глутаминовой кислоты на стоп-кодон в 93-м положении аминокислотной последовательности гена PDP1 (каталитической субъединицы 1 пируватдегидрогеназы фосфатазы) является причиной заболевания [28].

**Недостаточность фосфофруктокиназы.** *Американский кокер спаниель, английский спрингер спаниель, помеси разных пород.*

Данная аномалия относится к группе гликогенозов и обусловлена отсутствием или снижением активности фосфофруктокиназы, что приводит к гемолизу и миопатии. Причина заболевания заключается в нонсенс-мутации (замена гуанина на аденин в 2228-й нуклеотидной позиции) в предпоследнем экзоне гена PFKM, кодирующем мышечную фосфофруктокиназу, что приводит к быстрой деградации усеченной (40 аминокислотных остатков) нестабильной молекулы фермента [29].

#### *6.5 Мышечные заболевания.*

**Центроядерная миопатия.** *Лабрадор ретривер.*

Данная аномалия относится к группе редких врожденных миопатий и наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Наиболее известной формой является миотубулярная миопатия. При этом заболевании ядра в клетках скелетных мышц находятся в центре, а не

на периферии, как у здоровых собак. Болезнь проявляется мышечной слабостью, снижением тонуса мышц, из-за слабости мышц, участвующих в акте дыхания, возможны осложнения со стороны легких. Причина заболевания состоит в наличии инсерции короткого интерсперсного повторяющегося элемента (SINE) в экзоне 2 гена *PTPLA*, кодирующего протеин, подобный тирозин фосфатазе, элемент А. Этот элемент оказывает разрушительное влияние на процесс созревания мРНК гена *PTPLA*, в результате чего у больных животных наблюдается не более 1% нормального транскрипта [30].

**Коллапс, индуцированный упражнениями.** *Чесапик бей ретривер, прямошерстный ретривер, лабрадор ретривер.*

Данное аутосомно-рецессивное заболевание проявляется мышечной слабостью, отсутствием координации и угрожающим жизни коллапсом после интенсивных упражнений вследствие нарушения проведения нервных импульсов в синаптических пузырьках. Причиной данной аномалии является мутация гена *DNM1*, кодирующего динамин 1, в результате которой в высококонсервативном районе белка аргинин в положении 256 заменяется на лейцин [31].

**Врожденная миотония.** *Цвергшнауцер.*

Это нервно-мышечное заболевание, связанное с нарушением функционирования ионных каналов в мембранах клеток скелетных мышц, наследуется как аутосомно-рецессивное. Проявляется ригидностью и гипертрофией мышц, судорогами и болями в мышцах. Молекулярная причина аномалии - транзиция цитозина на тимин в

268-м кодоне гена *CLC1* (зависимый от напряжения хлоридный канал скелетной мускулатуры) приводит к замене треонина на метионин [32].

#### *6.6 Аномалии кожи и выделительной системы.*

##### **Цистинурия.** *Французский и английский бульдоги, ньюфаундленд.*

Это аутосомно-рецессивное заболевание из группы первичных тубулопатий. У больных животных нарушен транспорт цистина в клетках слизистой оболочки кишечника и в почечных канальцах, что приводит к высокой концентрации цистина в моче, образованию камней в почках, приступам почечной колики. Возможно развитие пиелонефрита и почечной недостаточности. У французских и английских бульдогов аномалия возникла вследствие замены аденина на тимин в 217-м положении нуклеотида в гене *SLC7A9*, кодирующего белок A9 семейства 7 транспортеров растворенных веществ. Заболевание у бульдогов может быть также вызвано заменой изолейцина на валин в 192 кодоне белка A1 семейства 3 транспортеров растворенных веществ, кодируемого геном *SLC3A1*, или заменой серина на глицин в 698 кодоне того же белка. Причиной цистинурии у ньюфаундлендов является нонсенс мутация замены цитозина на тимин в 663 положении нуклеотида в экзоне 2 гена *SLC3A1*, кодирующего белок A1 семейства 3 транспортеров растворенных веществ [33].

##### **Наследственный нефрит (синдром Альпорта).** *Самоед.*

Группа заболеваний, которые характеризуются гломерулонефритом, гематурией и почечной недостаточностью. У разных пород встречаются сцепленные с полом, аутосомно-рецессивные и аутосомно-доминантные формы аномалии. У самоедов это рецессивное сцепленное с полом заболевание. Аномалия возникает вследствие делеции 10 нуклеотидных пар в экзоне 9 гена COL4A5, кодирующего альфа5 коллаген типа IV. Эта мутация приводит к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона в экзоне 10 [34].

#### **Ихтиоз. Норфолк терьер.**

Аутосомно-рецессивное заболевание, проявляющееся в утолщение кожи с выраженным гиперкератозом, развитым шелушением кожи и алопецией. Наиболее тяжело заболевание протекает у самцов. Вызывающая аномалию мононуклеотидная замена ГТ на ТТ в донорном сайте сплайсинга интрона 5 гена KRT10 (кератин 10) приводит к активации как минимум трех скрытых или альтернативных сайтов сплайсинга и появлению транскриптов, содержащих стоп-кодона [35].

#### *6.7 Чувствительность к медикаментам.*

**Чувствительность к медикаментам.** *Австралийская овчарка, бордер колли, короткошерстный колли, длинношерстный колли, шетландская овчарка (шелти), веллер, бобтейл, длинношерстный уиппет, белая швейцарская овчарка.*

Аутосомно-рецессивная аномалия, симптомы которой варьируют в зависимости от принятого лекарства от легкого токсикоза со слюнотечением и дезориентацией до коматозного состояния и смерти животного. Всего вызывают реакцию более 20 медикаментов, включая антипаразитарные, антимикробные, противораковые и сердечные средства. Все они содержат субстрат для Р-гликопротеина. Мутация nt230 – делеция 4 п.н. в экзоне 4 гена MDR1 (множественная устойчивость к медикаментам 1), кодирующем Р-гликопротеин, вызывает сдвиг рамки считывания, приводит к появлению нескольких стоп-кодонов и является причиной этой аномалии. В результате мутации белковый продукт теряет около 10% аминокислотной последовательности [36].

## **ГЛАВА VII. Молекулярная генетика наследственных аномалий кошек**

Ниже приведены данные по молекулярной генетике наследственных аномалий кошек из источников, реферированных в PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

### **Поликистоз почек (болезнь поликистозных почек). Персидская.**

Данное заболевание наследуется по аутосомно-доминантному типу и характеризуется прогрессирующим развитием большого числа кист с жидким содержимым и увеличением обеих почек, проявляется гематурией, инфекциями мочевыводящих путей, повышением уровня



креатинина в плазме крови, болями в почках и почечной недостаточностью. Аномалия вызвана трансверсией цитозина на аденин в положении нуклеотида 10063 в экзоне 29 гена PKD1 (болезнь поликистозных почек 1), кодирующего полицистин 1, что приводит к образованию стоп-кодона в позиции 3284 аминокислотного остатка и потере примерно 25% С-концевой части молекулы белка [1].

### **Болезнь Нимана-Пика С1.**

Это аутосомно-рецессивное заболевание, относящееся к группе лизосомных болезней накопления. Вследствие нарушения внутриклеточного транспорта холестерина у больных животных отмечается гиперрефлексия, атаксия, гиперсаливация, анартрия, гиперкинезы, эпилептические припадки, деменция, вертикальная офтальмоплегия, иногда увеличение печени и/или селезенки. Причиной аномалии является замена гуанина на цитозин в 2864 положении нуклеотида в гене NPC1 (болезнь Нимана-Пика тип С1). В результате данной мутации происходит замена цистеина на серин в 955-м кодоне [2].

### **Недостаточность бета-глюкуронидазы.**

Данная аномалия наследуется по аутосомно-рецессивному типу и относится к группе лизосомных болезней накопления. Клинические симптомы и биохимические нарушения сходны с таковыми при мукополисахаридозе VII. Заболевание вызвано транзицией гуанина на аденин в гене GUSB, кодирующем бета-глюкуронидазу, в результате

чего происходит замена глутаминовой кислоты на лизин, разрушение BssSI- сайта и потеря активности фермента [3].

### **Мукополисахаридоз тип VII.**

Это аутосомно-рецессивное заболевание, относится к группе лизосомных болезней накопления. Больные животные мелкие, имеют множественные аномалии черепа, угловую деформацию ребер, аномально короткие передние конечности, вывихи коленных чашечек, подвывихи обеих бедер, остеосклероз мозжечкового намета и многие другие дефекты. Уровень активности бета-глюкуронидазы в лейкоцитах периферической крови сильно снижен [4].

### **Мукополисахаридоз тип VI. *Сиамская.***

Данное заболевание из группы лизосомных болезней накопления наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Для больных животных вследствие дефицита фермента N-ацетилгалактозамин-4-сульфатсульфатазы (арилсульфатаза–B) и отложения в тканях дорматанеульфата характерно наличие множества скелетных аномалий, нарушение движений, увеличение печени и/или селезенки, глухота, помутнение роговицы. Причина аномалии, встречающейся у сиамских кошек северо-американского и итальянского происхождения, заключается в мутации гена ARSB, кодирующего арилсульфатазу–B, в результате которой в 476-м кодоне лейцин заменяется на пролин. Среди сиамских кошек широко распространена другая мутация гена ARSB, также приводящая к

развитию мукополисахаридоза VI типа. В результате этой мутации аспарагиновая кислота в 520-м кодоне заменяется на аспарагин [5].

### **Альфа-маннозидоз.** *Персидская, длинношерстные домашние кошки.*

Аномалия также относится к группе лизосомных болезней накопления, связана с дефицитом лизосомного фермента альфа маннозидазы и наследуется по аутосомно-рецессивному типу. У больных животных отмечаются множественные аномалии развития скелета, частая рвота, спленомегалия, макроглоссия, широкие промежутки между зубами, глухота, помутнение хрусталика, мышечная слабость. Причиной этого заболевания у персидских кошек является делеция 4 пар нуклеотидов в гене MAN2B1, кодирующем лизосомную альфа маннозидазу, которая приводит к сдвигу рамки считывания начиная с кодона 583 и появление стоп-кодона в 645 положении. У персидских кошек, гомозиготных по данной мутации, активность фермента не выявляется. У домашних длинношерстных кошек, имеющих менее выраженные симптомы альфа-маннозидоза, данная делеция не обнаружена. Эти животные имеют остаточную активность лизосомной альфа-маннозидазы на уровне 2% от нормальной. Таким образом, альфа-маннозидоз у кошек имеет гетерогенную молекулярную природу [6].

### **Гемофилия В.**

Заболевание имеет рецессивный сцепленный с полом характер наследования и связано с дефицитом фактора IX свертывания крови.

Больные животные склонны к длительным поздним кровотечениям (возникают спустя несколько часов после травмы), образованию гематом. Для них характерны гемартрозы, глубокие межмышечные кровоизлияния, длительные кровотечения из слизистых оболочек различных органов. У одного беспородного больного гемофилией В кота в гене F9, кодирующем фактор свертывания IX, выявлена однонуклеотидная замена в экзоне 8 в первой нуклеотидной позиции кодона, кодирующего аргинин (CGA на TGA) в аминокислотной позиции 338. Эта мутация приводит к появлению стоп-кодона в части гена, кодирующей каталитический домен белка. У другого пораженного кота была обнаружена однонуклеотидная замена в экзоне 4 того же гена во второй нуклеотидной позиции кодона, кодирующего 82-ю аминокислоту (TGT на TAT), что приводит к замене тирозина на цистеин. В результате этой мутации изменяется конформация белковой молекулы, что является критичным для ее функции [7].

### **Альбинизм.**

Данный признак наследуется как аутосомно-рецессивный и связан у кошек с активностью фермента тирозиназы. Для животных – альбиносов характерно отсутствие пигмента в коже, шерсти, радужной и пигментной оболочках глаз, а также повышенная чувствительность к свету и другие аномалии (Рисунок 7). Могут наблюдаться изменения в сетчатке, возникать различные расстройства зрения. Причина альбинизма заключается в делеции цитозина в 975-м положении нуклеотида в экзоне 2 гена TYR, кодирующего

тирозиназу, в результате чего возникает сдвиг рамки считывания и появляется стоп-кодон на расстоянии 9 аминокислотных остатков в 5'-направлении от мутации [8].

## **ГЛАВА VIII. Молекулярная генетика окрасов и длины шерсти собак**

### *8.1 Основные окрасы шерсти собак*

При разведении значительного числа пород собак большое внимание уделяется окрасам и длине шерсти. Традиционный анализ родословных не всегда позволяет расшифровать генотип отдельных особей по этим признакам и, следовательно, не всегда можно точно предсказать фенотипы потомков. При подборе пар для получения щенков желаемого окраса и длины шерсти может быть использована молекулярно-генетическая диагностика аллелей генов, контролирующих такие признаки. В настоящее время существуют системы диагностики на основе ПЦР с аллель-специфическими праймерами или полиморфизма длин рестрикционных фрагментов для локусов E, B, A, K, M, D, S и L, определяющих все разнообразие окрасов и длины шерсти [1].

### **Локус E (extended) – ген MC1R (рецептора меланокортина 1).**

Ген MC1R, кодирующий рецептор меланокортина 1, картирован на хромосоме 5 собаки на расстоянии 6 сантиморганов от ZuBeCa6 – высокополиморфного микросателлита, локализованного у собак на длинном плече хромосомы 5 в районе 5q12-q13. Аллель

дикого типа E определяет нормальный синтез черного (коричневого) пигмента – эумеланина. Описана рецессивная мутация гена MC1R (аллель e), приводящая к полной потере функциональной активности его продукта. В результате этой мутации цитозин заменяется на тимин в 914-м положении нуклеотида, в результате чего вместо 306-го кодона, кодирующего аргинин, появляется стоп-кодон. Собаки, гомозиготные по этой мутации, имеют чисто рыжий окрас – аллель e. Третья аллель данного локуса – E<sup>M</sup> возникла в результате замены аденина на гуанин в 799-м положении нуклеотида и, соответственно, замены метионина в 264-м кодоне на валин. Эта мутация наследуется по доминантному типу. Меланистическая маска образуется у гетерозиготных по данной мутации собак, имеющих окрас фавн или тигровый (Рисунок 8). У собак, имеющих сплошной черный, коричневый или голубой окрас, маски нет. У собак, которые со временем перецветают до серого цвета, маска появляется на какое-то время. У собаки, несущей аллель E<sup>M</sup> может не быть маски, если в той части морды, где должна быть маска, у нее локализуется белое пятно, то есть меланин в этой области не синтезируется [1].

#### **Локус В (brown). Ген TYRP1 (белок 1, связанный с тирозиназой).**

Этот ген картирован на хромосоме 11 собаки между микросателлитами C03109 и FH2004. Данный локус описан в 1957 году Литтлом как локус В. В гене TYRP1, кодирующем белок 1, связанный с тирозиназой, обнаружены три рецессивных мутации. Первая мутация связана с заменой цитозина на тимин в 991-м положении нуклеотида, что приводит к появлению преждевременного стоп-кодона в экзоне 5 в кодоне 331 вместо глутамина. Это аллель bs. Другая мутация (аллель bd) представляет собой делецию трех

нуклеотидов в положении 1033-1036, кодирующих 345-й аминокислотный остаток – пролин. Третья мутация (аллель bc) – это замена тимина на аденин в 121-м положении нуклеотида в экзоне 2 гена TYRP1, что приводит к замене серина на цистеин в 41-м кодоне. Гомозиготные по этим мутациям особи, а также животные, являющиеся компаундными гетерозиготами, имеют коричневую окраску шерсти (Рисунок 9). Аллели гена TYRP1 взаимодействуют с аллелями гена MC1R. Собаки, с генотипом e/e (ген MC1R) имеют кремовую, желтую или рыжую окраску шерсти, однако носовое зеркало, веки и подушечки лап у них черные, коричневые, голубые или изабелловые в зависимости от генотипа по локусу TYRP1. Наличие такого взаимодействия между генами MC1R и TYRP1 постулировано Темплетоном и сотрудниками, но механизм его до сих пор неясен. Все собаки, имеющие черный, коричневый или серый цвет шерсти, сплошной или пятнистый окрас, наследующийся по доминантному типу, имеют в своем генотипе, по крайней мере, одну доминантную аллель локуса E (E или EM) а также минимум одну аллель KB [1].

### **Локус A (agouti). Ген ASIP (сигнальный пептид агути).**

Ген ASIP картирован у собак на хромосоме 24 между микросателлитами АНТ 118 и АНТ125. В данном локусе у собак известны четыре аллеля со следующей иерархией доминирования: aw > at > a. Нуклеотидная последовательность аллели дикого типа aw у собаки, волка и койота идентичны. Аллель aw обуславливает зонарный окрас шерсти у собак, волков, койотов (Рисунок 10). В

локусе A у собак, как и у лошадей, есть рецессивный аллель а черной окраски шерсти. Эта мутация гена ASIP, кодирующего сигнальный пептид агути, представляет собой замену цитозина на тимин в 288-м положении нуклеотида, что влечет за собой замену аргинина в 96-м кодоне на цистеин. Этот аллель встречается в основном у овчарок, но не только у них. Например, у черных немецких овчарок, шелти, некоторых шипперке, грюнендалей и пули. Также аллель а идентифицирован у самоедов и американских эскимосских шпицев, имеющих белую окраску шерсти. Один из наиболее общих аллелей локуса A - ау, который является доминантным в данной серии аллелей. По сравнению с диким типом этот аллель имеет две однонуклеотидных замены – гуанина на тимин и гуанина на аденин в 246-м и 250-м положениях нуклеотидов соответственно, что приводит к заменам аланина на серин в 82-м кодоне и аргинина на гистидин в 83-м кодоне. Этим аллелем обусловлен соболиный (олений) окрас шерсти собак. Аллель ау обнаружен более чем в 22 породах. Ни у волков, ни у койотов этот аллель не выявлен. Т.к. 82-й аминокислотный остаток является консервативным у большего числа видов, чем 83-й, для этой мутации был разработан PCR-RFLP тест для выявления аллеля ау. Считают, что на количество черных волос у собак соболиного окраса оказывает влияние ген Mahogunin (Махагон), но это предположение не подтверждено. Четвертый аллель данного локуса известен как at, его наличием в гомозиготном состоянии обусловлен у собак черно-подпалый окрас. В кодирующей последовательности (экзоны 2-4) между аллелями at и aw различий не выявлено. Возможно, между этими аллелями существуют различия в одном из промоторов. У других видов млекопитающих, например у мышей, имеется два альтернативных промотора – дорсальный и



вентральный, однако у собак пока не обнаружены промоторы гена ASIP. У собак распространение вентрального феомеланина варьирует у разных особей и разных пород. У мышей обнаружена связь вариаций соотношения черного и рыжего в окрасе шерсти с мутацией TBX15. Хотя многими селекционерами постулировано наличие в локусе А пятого аллеля - as (чепрачный окрас), в настоящее время нет свидетельств (данных) об этом аллеле [1].

### **Локус К. Ген CBD103 (бета дефенсин 103).**

Ген бета дефенсина 103 локализован у собак на хромосоме 16. Данный локус К обуславливает наследующуюся по доминантному типу черную окраску шерсти. В 1957 году Литтл постулировал доминантный аллель А в локусе агути, но, как известно из предшествующего описания этого локуса, такого аллеля у собак нет. В некоторых породах есть рецессивный аллель локуса агути, возникший в результате мутации loss-of-function, который обуславливает сплошную черную окраску шерсти. В подавляющем большинстве пород собак для того, чтобы животное имело сплошную эумеланиновую окраску шерсти (черную, коричневую, серую), в его генотипе должна быть, как минимум, одна копия аллеля Е или ЕМ гена MC1R и, по меньшей мере, один доминантный аллель КВ в локусе К. Аллель КВ отличается от аллеля дикого типа (ку) делецией трех пар нуклеотидов, в результате чего происходит потеря глицина в 23-м кодоне. В локусе К есть еще два других аллеля. Одной копии аллеля kbr при наличии аллеля ку достаточно для того, чтобы у собаки был тигровый окрас. Тигровые полосы могут быть распространены по

всему телу животного, если в локусе агути собака имеет аллель ау (kbr/kbr ау/- или kbr/ку ау/-) или только в области подпалин (на брюшной стороне), если в локусе А у нее два аллеля at (kbr/kbr at/at или kbr/ку at/at). Собаки с генотипом ку/ку ау/- будут оленьего (соболиного) окраса, а имеющие генотип ку/ ку at/at – черно-подпалыми. У лабрадор-ретриверов соотношение эумеланина и феомеланина в окрасе шерсти определяется генотипом собак только по локусу Е (MC1R), так как по локусу К все собаки этой породы имеют генотип КВ/ КВ, причем аллель е в гомозиготном состоянии оказывает эпистатическое влияние на аллели КВ и kbr. Однако в других породах, таких как немецкий дог, окрас контролируется аллелями локуса К (КВ/- vs. ку/ку), поскольку все собаки этих пород имеют генотип ау/ау Е/- или ау/ау ЕМ/- [1].

## *8.2 Оттенки основных окрасов шерсти собак.*

### **Локус D. Ген меланофилина MLPH.**

Во многих породах собак встречаются особи, имеющие серый окрас шерсти, обусловленный локусом D (dilute). Эти животные рождаются серыми или, как еще называют этот окрас, голубыми. Щенки некоторых пород рождаются черными и перецветают с возрастом до серого цвета. Такое перецветание контролируется локусом G, и соответствующий окрас у некоторых пород называется серебристым. В некоторых породах встречаются оба этих типа серой окраски шерсти. Так немецкие доги и веймаранеры имеют окраску, обусловленную локусом D (Рисунок 11), а собаки пород керри блю терьер (Рисунок 12) и бобтейлы рождаются черными и с возрастом

переплывают, становясь серыми, что обусловлено локусом G. Оба эти локуса затрагивают как эумеланин, так и феомеланин, хотя последний подвержен влиянию этих генов в меньшей степени. Рецессивный аллель d локуса D в гомозиготе осветляет окрас шерсти. У собак оленьего окраса, имеющих меланистическую маску, она становится голубой. Носовое зеркало и подушечки лап у собак с разбавленным черным, оленьим или соболиным окрасом угольно серые. У чисто рыжих собак с генотипом e/e в локусе MC1R очень сложно определить «разбавленность» окраса. Тигровые собаки в случае гомозиготности их по аллели d (такие особи встречаются среди уиппетов и грейхаундов) будут иметь голубые полосы на палевом фоне. Такие собаки как веймаранеры, имеющие два мутантных аллеля в гене TYRP1, обуславливающих коричневый окрас, и две копии аллеля d в локусе D имеют светло-коричневую шерсть. Носовое зеркало и подушечки лап у таких собак также светло-коричневые. Этот окрас у собак породы шарпей называется лиловым, а у доберманов изабелловым. Филипом и сотрудниками в 2005 году была выявлена косегрегация разбавленной окраски шерсти собак со специфическими гаплотипами меланофилина (MLPH). У мышей, имеющих свинцово-серую окраску шерсти, обнаружена транзикация цитозина на тимин в экзоне 2 гена MLPH, кодирующего меланофин. В результате этой мутации образуется преждевременный стоп-кодон, и семь последних аминокислотных остатков экзона 2 оказываются не транслированными. У человека мутация в конце второго экзона этого гена, приводящая к замене аргинина на триптофан в 35-м кодоне, является причиной возникновения синдрома Грисцелли типа III (гипопигментация без неврологических нарушений и без гемофагоцитарного синдрома). У

собак аллель d отличается от аллеля D дикого типа наличием в гене MLPH, кодирующего меланофин, замены гуанина на аденин в 596-м положении нуклеотида и, соответственно, наличием в 199-м кодоне гистидина вместо аргинина [1].

### **Локус G. Возрастное (прогрессирующее) поседение.**

Щенки некоторых пород собак рождаются черными, но в определенном возрасте их шерсть меняет окраску и становится серой. Такое поседение начинается у собак разных пород, в которых есть такой окрас шерсти (керри блю терьеры, бобтейлы, карликовые и той пудели, бедлингтон терьеры), в разном возрасте и в различных участках тела. У некоторых собак развивается ответная реакция на вакцинацию или повреждения кожи, проявляющаяся в том, что шерсть в этой области становится темной (черной или коричневой). Однако через некоторое время она вновь становится светлой (серой или песочной). В 1957 году Литтл предположил, что этот признак (прогрессирующее поседение), наследующийся по доминантному типу, контролируется отдельным локусом G. Возрастное поседение встречается также у лошадей. Этот признак картирован у лошади на длинном плече хромосомы 25. Этот район имеет ортологию в длинном плече 9-ой хромосомы человека. Исследования показали, что данный район хромосомы 9 человека соответствует 11-й хромосоме собаки. Лошади с прогрессирующим поседением склонны к образованию опухолей кожи, однако у собак с таким окрасом шерсти подобной предрасположенности не обнаружено [1].

### **Кремовый и /или белый.**

Собаки некоторых пород рождаются белыми или кремовыми с пигментированными мочкой носа, кожей и подушечками лап. Это говорит о том, что миграция пигмента в волос и ороговевающую (кератинизированную) кожу не контролируется всецело одними и теми же генами. Одним из примеров пород собак, где в процессе селекции зафиксирован белый окрас, является самоед. Самоеды имеют аллели  $e/e$  в локусе MC1R и  $a/a$  в локусе ASIP (агути). Те же аллели  $e/e$  имеют в этих локусе в локусе MC1R белые шарпеи, акита ину, пудели, пули, немецкие овчарки, цвергшнауцеры и кавказские овчарки. Некоторые из этих собак могут быть скорее кремовыми с налетом феомеланиновой пигментации на ушах. Все акита ину, не имеющие в своем генотипе аллелей E и EM, имеют кремовый окрас или олений, если в локусе A (ASIP, агути) у них присутствует аллель  $au$ . Это предполагает наличие гена, который осветляет окрас только у особей с генотипом  $e/e$ . Все собаки таких пород как лабрадор ретривер и золотистый ретривер имеют сплошной рыжий (феомеланиновый) окрас и генотип  $e/e$  по локусу MC1R. Оттенки рыжего варьируют у разных особей от золотисто-желтого до кремового, но белых собак не встречается. Исследования показали, что кремовый оттенок шерсти у лабрадор ретриверов и золотистых ретриверов наследуется как аутосомно-рецессивный признак. Косегрегации кремового оттенка шерсти с полиморфными вариантами гена TYR, кодирующего тирозиназу, не выявлено. Показано также отсутствие косегрегации этого признака с геном SLC45A2, кодирующим белок 2 семейства 45 транспортеров растворенных веществ. Первый ген, который оказывает влияние на интенсивность феомеланиновых окрасов, был описан у мышей. У этих животных, имеющих разбавленную феомеланиновую пигментацию, была обнаружена укороченная мРНК

гена SLC7A11, кодирующего белок 11 семейства 7 транспортеров растворенных веществ. Исследования мРНК этого гена у светло-желтых собак показали, что эта молекула имеет нормальную длину (GenBank EF143580)..

В некоторых породах, таких как афган и пудель, есть кремовые или белые собаки, имеющие в локусе MC1R аллели E или EM. Молекулярно-генетические механизмы этого типа белого окраса до сих пор неизвестны [1].

### *8.3 Пятнистый рисунок и белые отметины.*

#### **Локус S. Ген транскрипционного фактора, связанный с микрофтальмией (MITF).**

Литтл постулировал наличие в локусе S четырех аллелей: S, si, sp, sw. Он также предположил наличие генов-модификаторов, оказывающих влияние на экспрессию данного признака. Собаки с генотипом S/- имеют сплошную окраску шерсти без белых пятен. У животных, имеющих генотип si/si, белые отметины появляются в первичных центрах депигментации (Рисунок 13). Аллель sp в гомозиготе обуславливает наличие у животного пегой окраски шерсти. Собаки, гомозиготные по аллелю sw, могут быть полностью белыми, у них могут быть цветные пятна в первичных центрах пигментации. В 1957 году Литтл предсказал, что далматины должны иметь тот же аллель гена, контролирующего белую пятнистость, что и боксеры, поскольку собаки этой породы рождаются белыми, а небольшие черные пятна появляются у них спустя несколько недель под влиянием другого гена. Исследования, проведенные в 2007 году

Карлссоном и сотрудниками на собаках пород боксер, бультерьер, кавалер кинг чарльз спаниель и далматин, показали, что главный ген, обуславливающий пятнистый окрас шерсти, локализуется на 20-й хромосоме собаки. Кандидатом на роль такого гена стал ген MITF, кодирующий транскрипционный фактор, ассоциированный с микрофтальмией. Вероятно, мутации гена MITF могут оказывать влияние на выживание меланобластов. Карлссон и сотрудники обнаружили мононуклеотидный полиморфизм (замена цитозина на тимин) в интроне 3 гена MITF [1].

**Локус М (Мерль, мраморный окрас). Ген SILV (гомолог гена Silver мыши).**

Доминантный аллель М этого локуса известен со времен Литтла (1957 год). Собаки, гетерозиготные по этому аллелю, имеют мраморный окрас шерсти (Рисунок 14). В гомозиготе аллель М оказывает летальное действие, вызывая внутриутробную гибель щенков. Выжившие щенки с генотипом М/М имеют белую шерсть, аномалии развития глаз и внутреннего уха. В 2006 году Кларк и сотрудники обнаружили у мраморных собак инсерцию короткого интерсперсного повтора SINE на границе интрона 10 и экзона 11 гена SILV (гомолога гена Silver мыши). Наличие делеций в области олиго dA богатом конце этого интерсперсного повтора приводит к тому, что у животного с инсерцией частично делетированного SINE-элемента не будет фенотипа мерль. Ген SILV локализуется у собак на хромосоме 10 [1].

**Локус L (длина шерсти). Ген FGF5 (фактор 5 роста фибробластов).**

Длина шерсти у собак контролируется ограниченным числом генов. Один из таких генов, мутациями которого обусловлено большинство случаев появления длинной шерсти, - это ген FGF5, кодирующий ростовой фактор 5 фибробластов. У длинношерстных собак по сравнению с короткошерстными в относительно неконсервативном районе гена FGF5 обнаружена дупликация 145\_150dupACCAGC и миссенс мутация – замена гуанина на тимин в 284-м положении нуклеотида, приводящая к замене фенилаланина на цистеин в 95-м кодоне [1].

## **ГЛАВА IX. Молекулярная генетика окрасов и длины шерсти кошек**

**Янтарный окрас. Ген MC1R (рецептор 1 меланокортина).**

Вначале янтарный окрас назывался у кошек X- цветом. Он был официально описан в 1992 году в популяции норвежских лесных кошек и ни разу не был задокументирован у кошек других пород. Все кошки янтарного окраса имели одного общего предка – кошку по кличке Kløfterhagens Babuschka, рожденную в 1981 году в Норвегии. Янтарный окрас наследуется как аутосомно-рецессивный признак. У кошек такого окраса в гене MC1R, кодирующем рецептор 1 меланокортина, обнаружены две однонуклеотидные замены, одна из которых – транзиция тимина на цитозин в 840-м положении нуклеотида - синонимическая. Другая мутация – замена гуанина на



аденин в 250-м положении нуклеотида не является синонимической и приводит к замене аспарагиновой кислоты на нейтральный полярный аспарагин в 84-м кодоне, который находится во второй трансмембранной улитковой структуре молекулы меланокортинового рецептора 1. Таким образом, янтарная окраска обусловлена у кошек единственным рецессивным аллелем *e* гена *MC1R* [1].

### **Локус С (альбинизм). Ген TYR.**

Альбиносы встречаются среди огромного числа видов животных и у человека. Альбинизм связан у многих животных с мутациями гена *TYR*, кодирующего тирозиназу. У кошек этот ген локализован на хромосоме D1. Анализ последовательности ДНК нормальных кошек и кошек-альбиносов позволил выявить у последних делецию цитозина в 975-м положении нуклеотида во 2-м экзоне гена *TYR*, в результате которой происходит сдвиг рамки считывания, и образуется преждевременный стоп-кодон через девять кодонов после мутации. В локусе С у кошек известны также и другие рецессивные аллели. Бурманский альбино – аллель *cb* – отличается от дикого типа заменой гуанина на тимин в 679-м положении нуклеотида, вследствие чего в 227-м кодоне глицин заменяется на триптофан. Аллель *cs*, называемый сиамским альбино, возник в результате замены гуанина на аденин в 901-м положении нуклеотида, которая приводит к замене в 301-м кодоне глицина на аргинин. Иерархия доминирования аллелей локуса С следующая: С (дикий тип) > *cb* (бурманский альбино) ≥ *cs* (сиамский альбино) > *c* (альбино) [2].

### **Локус D (разбавление). Ген *MLPH* (меланофилин).**

Рецессивный аллель *d* в гомозиготном состоянии приводит к осветлению (разбавлению) окраса шерсти, кожи, подушечек лап, носового зеркала и затрагивает как эумеланин, так и феомеланин. Черный цвет осветляется до серого (голубого), а рыжий – до кремового (Рисунок 15). Анализ последовательности кДНК гена *MLPH*, кодирующего меланофилин, показал, что у кошек с разбавленным (осветленным) окрасом шерсти имеется делеция одной пары нуклеотидов во 2-м экзоне, что приводит к сдвигу рамки считывания и появлению преждевременного стоп-кодона через 11 кодонов после мутации [3].

#### **Локус В (brawn). Ген TYRP1 (белок 1, связанный с тирозиназой).**

В локусе В есть два рецессивных аллеля. Один из них – *b* - обуславливает коричневую (шоколадную) окраску шерсти (Рисунок 16), а другой – *bl* – окрас, называемый циннамон, цвета корицы. Ген *TYRP1*, кодирующий белок 1, связанный с тирозиназой, является геном-кандидатом для локуса В. Этот ген локализован у кошки на хромосоме D4. Аллель шоколадного окраса (*b*) ассоциируется с двумя мутациями гена *TYRP1*. Одна мутация приводит к замене аланина на глицин в третьем кодоне сигнального пептида. Другая мутация представляет собой инсерцию, не вызывающую сдвиг рамки считывания, в донорном сайте сплайсинга интрона 6. Аллель *bl*, обуславливающий в гомозиготном состоянии окрас циннамон, отличается от аллеля В дикого типа наличием замены цитозина на тимин в 298-м положении нуклеотида, что приводит к образованию на месте сотого аминокислотного остатка (аргинин) преждевременного стоп-кодона [4].

### **Локус O. X-сцепленный красный.**

Большинство генов, оказывающих влияние на окрас шерсти у млекопитающих высоко консервативны. Однако ген, отвечающий за красный окрас, локализованный в X-хромосоме кошачьих, к их числу не относится. У самок одна из аллелей этого гена подвергается инактивации вместе с X-хромосомой, что определяет черепаховый окрас (чередование красных и черных пятен) гетерозигот. Дикий тип этого гена соответствует черной окраске, а мутантный аллель в гомо- и гемизиготе приводит к появлению красного окраса (Рисунок 17). Интересно, что черепаховый окрас наблюдается только у самок (половые хромосомы XX) и самцов, страдающих синдромом Клайнфельтера (половые хромосомы XXY). Показано, что локус O находится в пределах 14 сантиморганов от центромеры X-хромосомы.

### **Длина шерсти. Локус L. Ген FGF5 (фактор 5 роста фибробластов).**

У многих видов животных, в том числе и у кошек, цикл роста волосяных фолликулов, а, следовательно, и длина шерсти, контролируется геном ростового фактора 5 фибробластов FGF5. Этот ген картирован у кошки на хромосоме В1. Длинная шерсть (аллель l) (Рисунок 18) наследуется как аутосомно-рецессивный признак. Аллель l отличается от аллеля L дикого типа заменой аденина на цитозин в 475-м положении нуклеотида, в результате чего в 159-м кодоне треонин заменяется на пролин [5].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К сожалению, в настоящее время, весьма ограниченное количество исследований по генетике количественных признаков собаки и кошки, картированию QTL, генетическим механизмам контроля поведения у этих видов животных опубликовано. Разнообразие пород, близкая к приматам степень развития поведенческих реакций, близость этиологии многих наследственных заболеваний этих видов к аналогичным у человека открывают новые горизонты молекулярно-генетических исследований видов *Canis familiaris* и *Felis catus*. Детально разработанная молекулярная диагностика наследственных заболеваний, происхождения и окрасов этих животных отражают почти исключительно потребности заводчиков и владельцев. Учитывая сходство наследственных патологий (из 450 известных заболеваний такого рода у собак 360 встречаются у человека), наличия аналога СПИДа у кошек, близость механизмов развития онкологических заболеваний кошачьих сравнительный анализ геномов наиболее близких к человеку домашних питомцев может стать основой модернизационных прорывов в общей генетике.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### ГЛАВА I

1. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular Biology of the Cell, 5th edition // Garland Science. New-York. 2007. 1392 P.
2. Krebs J.E., Goldstein E.S., Kilpatrick S.T. Lewin's GENES X // Jones & Bartlett Learning. Sudbery. 936 P.
3. Сингер М., Берг П. Гены и геномы // М. «Мир». 1998. в 2-х Т. Т. 1. 373 С.

### ГЛАВА II

1. [www.ncbi.nlm.gov.com](http://www.ncbi.nlm.gov.com)
2. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека в 3-х Т. Москва: Мир. 1989.
3. Krebs J.E., Goldstein E.S., Kilpatrick S.T. Lewin's GENES X // Jones & Bartlett Learning. Sudbery. 936 P.
4. Сингер М., Берг П. Гены и геномы // М. «Мир». 1998. в 2-х Т. Т. 1. 373 С.
5. А.А. Сазанов. Молекулярная организация генома птиц // СПб. ЛГУ им. А.С. Пушкина. 2010. 108 С.

6. M.N. Romanov, A.A. Sazanov, I. Moiseyeva, A.F. Smirnov. Poultry // In: Genome Mapping and Genomics in Animals. V. 3. Ed. by N.E. Cockett and C. Kole. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg. 2009. P. 75-141.

### **ГЛІАВА ІІІ**

1. Ostrander E.A., Wayne K.A. The canine genome // Genome Res. 2005. V. 15. P. 1706-1716

2. <http://bacpac.chori.org/>

3. [http://www.vgl.ucdavis.edu/research/canine/projects/linkage\\_map/data/](http://www.vgl.ucdavis.edu/research/canine/projects/linkage_map/data/)

4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/dog/>

### **ГЛІАВА ІV**

1. <http://www.genome.gov/Pages/Research/Sequencing/SeqProposals/CatSEQ.pdf>

2. <http://bacpac.chori.org/>

3. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map\\_search.cgi?taxid=9685](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9685)

4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/cat/>

### **ГЛІАВА V**

1. [http://www.akc.org/dna/parentage\\_evaluation.cfm](http://www.akc.org/dna/parentage_evaluation.cfm)

2. Lipinski MJ, Amigues Y, Blasi M, Broad TE, Cherbonnel C, Cho GJ, Corley S, Daftari P, Delattre DR, Dileanis S, Flynn JM, Grattapaglia D, Guthrie A, Harper C, Karttunen PL, Kimura H, Lewis GM, Longeri M, Meriaux JC, Morita M, Morrin-O'donnell RC, Niini T, Pedersen NC, Perrotta G, Polli M, Rittler S, Schubbert R, Strillacci MG, Van Haeringen H, Van Haeringen W, Lyons LA. An international parentage and identification panel for the domestic cat (*Felis catus*) // *Anim Genet*. 2007 V. 38(4). P. 371-377.

## **ГЛАВА VI**

1 - Awano T, Katz ML, O'Brien DP, Sohar I, Lobel P, Coates JR, Khan S, Johnson GC, Giger U, Johnson GS. A frame shift mutation in canine TPP1 (the ortholog of human CLN2) in a juvenile Dachshund with neuronal ceroid lipofuscinosis // *Mol Genet Metab*. 2006. V. 89(3). P. 254-260.

2 - Awano T, Johnson GS, Wade CM, Katz ML, Johnson GC, Taylor JF, Perloski M, Biagi T, Baranowska I, Long S, March PA, Olby NJ, Shelton GD, Khan S, O'Brien DP, Lindblad-Toh K, Coates JR. Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. V. 106(8). P. 2794-2799.

3 - McGraw RA, Carmichael KP. Molecular basis of globoid cell leukodystrophy in Irish setters // *Vet J*. 2006. V. 171(2). P. 370-372.

4 - Kreutzer R, Leeb T, Müller G, Moritz A, Baumgärtner W. A duplication in the canine beta-galactosidase gene GLB1 causes exon skipping and GM1-gangliosidosis in Alaskan huskies // *Genetics*. 2005. V. 170. P. 1857-1861.

- 5 - Penderis J, Calvin J, Abramson C, Jakobs C, Pettitt L, Binns MM, Verhoeven NM, O'Driscoll E, Platt SR, Mellersh CS. L-2-hydroxyglutaric aciduria: characterisation of the molecular defect in a spontaneous canine model // *J Med Genet*. 2007. V. 44. P. 334-340.
- 6 - Yogalingam G, Pollard T, Gliddon B, Jolly RD, Hopwood JJ. Identification of a mutation causing mucopolysaccharidosis type IIIA in New Zealand Huntaway dogs // *Genomics*. 2002. V. 79(2). P. 150-153.
- 7 - Eggermann E, Serafin M, Bayer L, Machard D, Saint-Mleux B, Jones BE, Mühlethaler M. Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurons // *Neuroscience*. 2001. V. 108(2). P. 177-181.
- 8 - Chen X, Johnson GS, Schnabel RD, Taylor JF, Johnson GC, Parker HG, Patterson EE, Katz ML, Awano T, Khan S, O'Brien DP. A neonatal encephalopathy with seizures in standard poodle dogs with a missense mutation in the canine ortholog of ATF2 // *Neurogenetics*. 2008. V. 9(1). P. 41-49.
- 9 - Awano T, Katz ML, O'Brien DP, Taylor JF, Evans J, Khan S, Sohar I, Lobel P, Johnson GS. A mutation in the cathepsin D gene (CTSD) in American Bulldogs with neuronal ceroid lipofuscinosis // *Mol Genet Metab*. 2006. V. 87(4). P. 341-348.
- 10 - Guziewicz KE, Zangerl B, Lindauer SJ, Mullins RF, Sandmeyer LS, Grahn BH, Stone EM, Acland GM, Aguirre GD. Bestrophin gene mutations cause canine multifocal retinopathy: a novel animal model for best disease // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007. V. 48. P. 1959-1967.
- 11 - Parker HG, Kukekova AV, Akey DT, Goldstein O, Kirkness EF, Baysac KC, Mosher DS, Aguirre GD, Acland GM, Ostrander EA. Breed relationships facilitate fine-mapping studies: a 7.8-kb deletion cosegregates



with Collie eye anomaly across multiple dog breeds // *Genome Res.* 2007. V. 17. P. 1562-1571.

12 - Sidjanin DJ, Lowe JK, McElwee JL, Milne BS, Phippen TM, Sargan DR, Aguirre GD, Acland GM, Ostrander EA. Canine CNGB3 mutations establish cone degeneration as orthologous to the human achromatopsia locus ACHM3 // *Hum Mol Genet.* 2002 V. 11(16). P. 1823-1833.

13. Aguirre GD, Baldwin V, Pearce-Kelling S, Narfström K, Ray K, Acland GM.

Congenital stationary night blindness in the dog: common mutation in the RPE65 gene indicates founder effect // *Mol Vis.* 1998. V. 4. P. 23.

14 - Mellersh CS, Pettitt L, Forman OP, Vaudin M, Barnett KC. Identification of mutations in HSF4 in dogs of three different breeds with hereditary cataracts // *Vet Ophthalmol.* 2006. V. 9(5). P. 369-378.

15 - Petersen-Jones SM, Zhu FX. Development and use of a polymerase chain reaction-based diagnostic test for the causal mutation of progressive retinal atrophy in Cardigan Welsh Corgis // *Am J Vet Res.* 2000. V. 61(7). P. 844-846.

16 - Foureman P, Whiteley M, Giger U. Canine leukocyte adhesion deficiency: presence of the Cys36Ser beta-2 integrin mutation in an affected US Irish Setter cross-breed dog and in US Irish Red and White Setters // *J Vet Intern Med.* 2002. V.16(5). P. 518-523.

17 - Callan MB, Aljamali MN, Margaritis P, Griot-Wenk ME, Pollak ES, Werner P, Giger U, High KA. A novel missense mutation responsible for factor VII deficiency in research Beagle colonies // *J Thromb Haemost.* 2006. V. 4(12). P. 2616-2622.

18 - Lipscomb DL, Bourne C, Boudreaux MK. Two genetic defects in alphaIIb are associated with type I Glanzmann's thrombasthenia in a Great

Pyrenees dog: a 14-base insertion in exon 13 and a splicing defect of intron 13 // *Vet Pathol.* 2000. V. 37(6). P. 581-588.

19 - Horwitz M, Benson KF, Duan Z, Li FQ, Person RE. Hereditary neutropenia: dogs explain human neutrophil elastase mutations // *Trends Mol Med.* 2004. V. 10(4). P. 163-170.

20 - Werner P, Raducha MG, Prociuk U, Sleeper MM, Van Winkle TJ, Henthorn PS. A novel locus for dilated cardiomyopathy maps to canine chromosome 8 // *Genomics.* 2008. V. 91(6). P. 517-521.

21 - Whitney KM, Goodman SA, Bailey EM, Lothrop CD Jr. The molecular basis of canine pyruvate kinase deficiency // *Exp Hematol.* 1994. V. 22(9). P. 866-874.

22 - Boudreaux MK, Catalfamo JL. Molecular and genetic basis for thrombasthenic thrombopathia in otterhounds // *Am J Vet Res.* 2001. V. 62(11). P. 1797-1804.

23 - Kramer JW, Venta PJ, Klein SR, Cao Y, Schall WD, Yuzbasiyan-Gurkan V. A von Willebrand's factor genomic nucleotide variant and polymerase chain reaction diagnostic test associated with inheritable type-2 von Willebrand's disease in a line of german shorthaired pointer dogs // *Vet Pathol.* 2004. V. 41(3). P. 221-228.

24 - Pettigrew R, Fyfe JC, Gregory BL, Lipsitz D, Delahunta A, Summers BA, Shelton GD. CNS hypomyelination in Rat Terrier dogs with congenital goiter and a mutation in the thyroid peroxidase gene // *Vet Pathol.* 2007. V. 44(1). P. 50-56.

25 - Coronado VA, O'Neill B, Nanji M, Cox DW. Polymorphisms in canine ATP7B: candidate modifier of copper toxicosis in the Bedlington terrier // *Vet J.* 2008. V. 177(2). P. 293-296.

- 26 - Skelly BJ, Sargan DR, Herrtage ME, Winchester BG. The molecular defect underlying canine fucosidosis // *J Med Genet.* 1996. V. 33. P. 284-288.
- 27 - Gregory BL, Shelton GD, Bali DS, Chen YT, Fyfe JC. Glycogen storage disease type IIIa in curly-coated retrievers // *J Vet Intern Med.* 2007. V. 21. P. 40-46.
- 28 - Cameron JM, Maj M, Levandovskiy V, Barnett CP, Blaser S, Mackay N, Raiman J, Feigenbaum A, Schulze A, Robinson BH. Pyruvate dehydrogenase phosphatase 1 (PDP1) null mutation produces a lethal infantile phenotype // *Hum Genet.* 2009. V. 125(3). P. 319-326.
- 29 - Smith BF, Stedman H, Rajpurohit Y, Henthorn PS, Wolfe JH, Patterson DF, Giger U. Molecular basis of canine muscle type phosphofructokinase deficiency // *J Biol Chem.* 1996. V. 271(33). P. 20070-20074.
- 30 - Pelé M, Tiret L, Kessler JL, Blot S, Panthier JJ. SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs // *Hum Mol Genet.* 2005. V. 14(11). P. 1417-1427.
- 31 - Patterson EE, Minor KM, Tchernatynskaia AV, Taylor SM, Shelton GD, Ekenstedt KJ, Mickelson JR. A canine DNMT1 mutation is highly associated with the syndrome of exercise-induced collapse // *Nat Genet.* 2008. V. 40. P. 1235-1239.
- 32 - Bhalerao DP, Rajpurohit Y, Vite CH, Giger U. Detection of a genetic mutation for myotonia congenita among Miniature Schnauzers and identification of a common carrier ancestor // *Am J Vet Res.* 2003. V. 64. P. 25.

33 - Harnevik L, Hoppe A, Söderkvist P. SLC7A9 cDNA cloning and mutational analysis of SLC3A1 and SLC7A9 in canine cystinuria // *Mamm Genome*. 2006. V.17(7). P. 769-776.

34 - Cox ML, Lees GE, Kashtan CE, Murphy KE. Genetic cause of X-linked Alport syndrome in a family of domestic dogs // *Mamm Genome*. 2003. V. 14(6). P. 396-403.

35 - Credille KM, Barnhart KF, Minor JS, Dunstan RW. Mild recessive epidermolytic hyperkeratosis associated with a novel keratin 10 donor splice-site mutation in a family of Norfolk terrier dogs // *Br J Dermatol*. 2005. V. 153(1). P. 51-58.

36 - Baars C, Leeb T, von Klopmann T, Tipold A, Potschka H. Allele-specific polymerase chain reaction diagnostic test for the functional MDR1 polymorphism in dogs // *Vet J*. 2008. V. 177(3). P. 394-397.

## **ГЛАВА VII**

1 - Criado-Fornelio A, Buling A, Barba-Carretero JC. Identification of feline polycystic kidney disease mutation using fret probes and melting curve analysis // *Res Vet Sci*. 2009. V. 86(1). P. 88-90.

2 - Somers KL, Royals MA, Carstea ED, Rafi MA, Wenger DA, Thrall MA. Mutation analysis of feline Niemann-Pick C1 disease // *Mol Genet Metab*. 2003. V. 79(2). P. 99-103.

3 - Fyfe JC, Kurzhals RL, Lassaline ME, Henthorn PS, Alur PR, Wang P, Wolfe JH, Giger U, Haskins ME, Patterson DF, Sun H, Jain S, Yuhki N. Molecular basis of feline beta-glucuronidase deficiency: an animal model of mucopolysaccharidosis VII // *Genomics*. 1999. V. 58(2). P. 121-128.

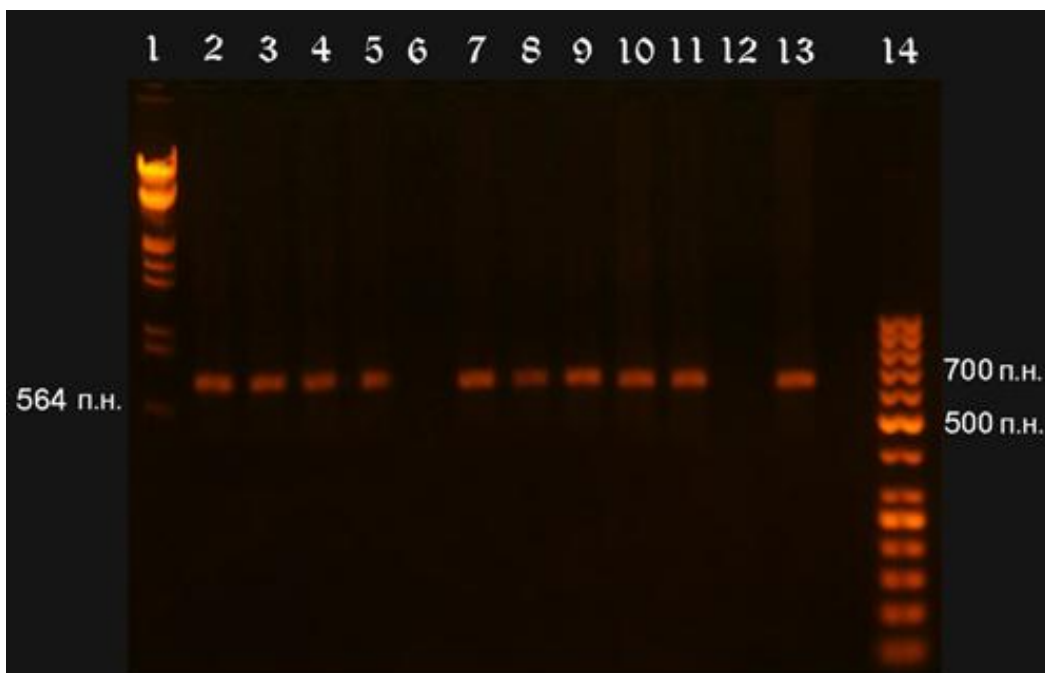
- 4 - Schultheiss PC, Gardner SA, Owens JM, Wenger DA, Thrall MA. Mucopolysaccharidosis VII in a cat // *Vet Pathol.* 2000. V. 37. P. 502-505.
- 5 - Crawley AC, Muntz FH, Haskins ME, Jones BR, Hopwood JJ. Prevalence of mucopolysaccharidosis type VI mutations in Siamese cats // *J Vet Intern Med.* 2003. V. 17(4). P. 495-498.
- 6 - Berg T, Tollersrud OK, Walkley SU, Siegel D, Nilssen O. Purification of feline lysosomal alpha-mannosidase, determination of its cDNA sequence and identification of a mutation causing alpha-mannosidosis in Persian cats // *Biochem J.* 1997. V. 328. P. 863-870.
- 7 - Goree M, Catalfamo JL, Aber S, Boudreaux MK. Characterization of the mutations causing hemophilia B in 2 domestic cats // *J Vet Intern Med.* 2005. V. 19(2). P. 200-204.
- 8 - Imes DL, Geary LA, Grahn RA, Lyons LA. Albinism in the domestic cat (*Felis catus*) is associated with a tyrosinase (TYR) mutation // *Anim Genet.* 2006. V. 37. P. 175-178.

### **ГЛАВА VIII**

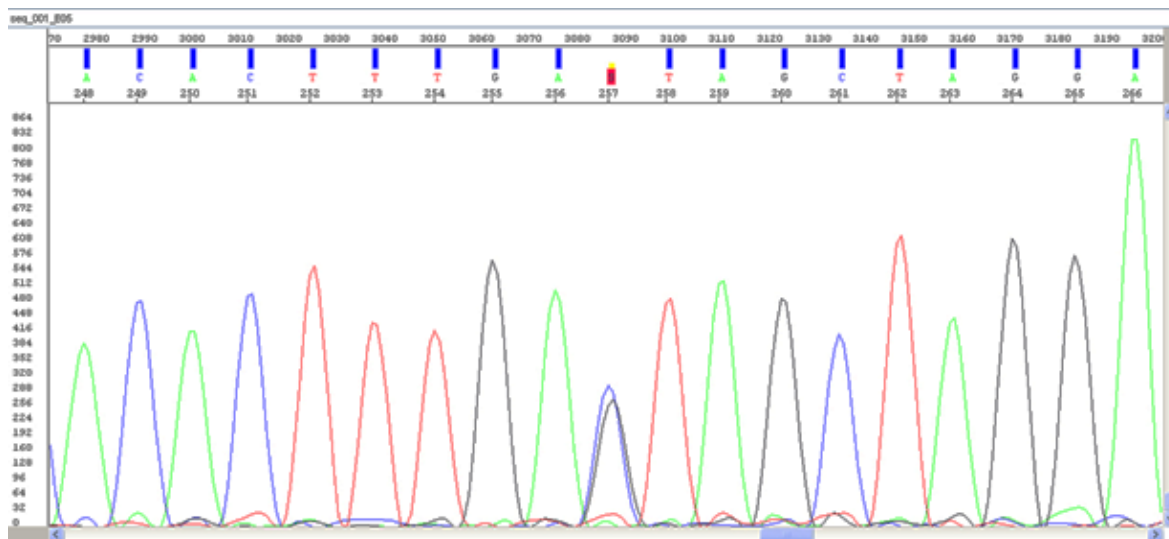
- 1 - S. M. Schmutz and T. G. Berryere. Genes affecting coat colour and pattern in domestic dogs: a review // *Animal Genetics.* 2007. V. 38. P. 539–549.

### **ГЛАВА IX**

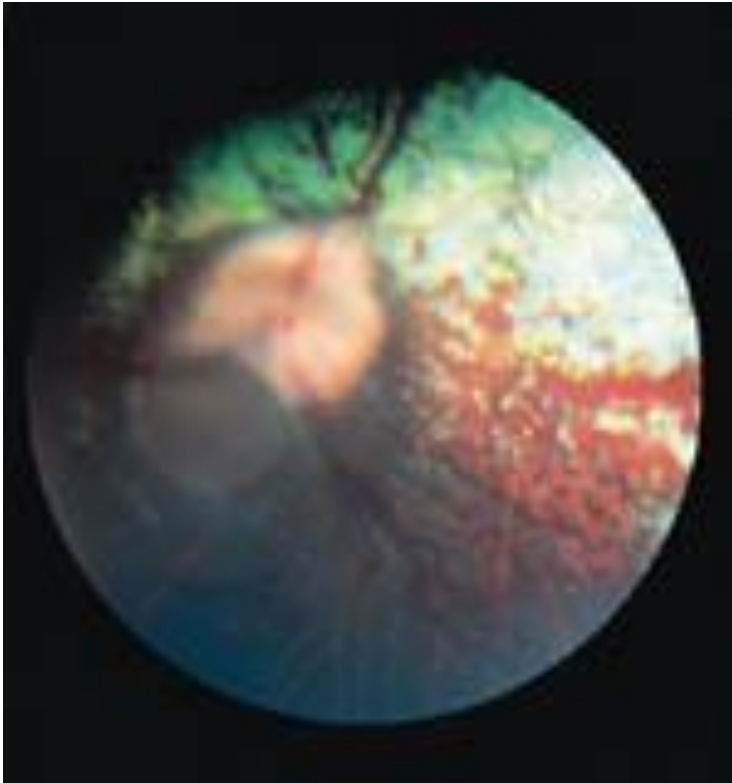
- 1 - Peterschmitt M, Grain F, Arnaud B, Deléage G, Lambert V. Mutation in the melanocortin 1 receptor is associated with amber colour in the Norwegian Forest Cat // *Anim Genet.* 2009. V. 40(4). P. 547-552.
- 2 - D. L. Imes, L. A. Geary, R. A. Grahn and L. A. Lyons. Albinism in the domestic cat (*Felis catus*) is associated with a tyrosinase (TYR) mutation // *Animal Genetics* 2006. V. 37. P. 175–178.
- 3 - Ishida Y, David VA, Eizirik E, Schäffer AA, Neelam BA, Roelke ME, Hannah SS, O'brien SJ, Menotti-Raymond M. A homozygous single-base deletion in *MLPH* causes the dilute coat color phenotype in the domestic cat // *Genomics.* 2006. V. 88(6). P. 698-705.
- 4 - Leslie A. Lyons, Ian T. Foe, Hyung Chul Rah, Robert A. Grahn. Chocolate coated cats: *TYRP1* mutations for brown color in domestic cats // *Mammalian Genome.* 2005. V. 16. P. 356–366.
- 5 - Drogemuller, C., Rufenacht, S., Wichert, B., Leeb, T. Mutations within the *FGF5* gene are associated with hair length in cats // *Animal Genetics.* 2007. V. 38(3). P. 218-221.



**Рисунок 1.** Электрофореграмма результатов ПЦР с аллелеспецифическими праймерами. Рисунок авторов.



**Рисунок 2.** Электрофореграмма результатов секвенирования фрагмента ДНК. Буквами обозначены соответствующие нуклеотиды: А – аденин, С – цитозин, Т – тимин, G – гуанин, символ S обозначает вариант мононуклеотидного полиморфного сайта (SNP) цитозин – гуанин. Рисунок авторов.



**Рисунок 3.** Аномалия глаз колли (СЕА): хориоидальная гипоплазия правого глаза. По материалам сайта [http://vets.al.ru/doc/vet/vet\\_doc/vf64/asp.html](http://vets.al.ru/doc/vet/vet_doc/vf64/asp.html)

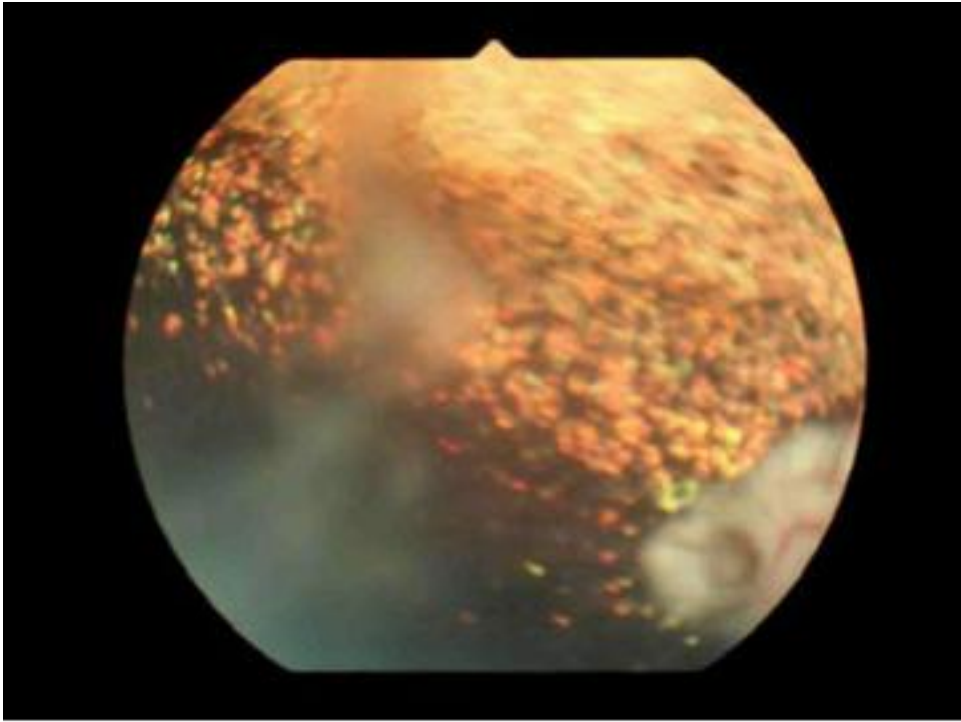




**Рисунок 4.** Дегенерация колбочек у венгерского пули. По материалам сайта [http://vets.al.ru/doc/vet/vet\\_doc/vf64/asp.html](http://vets.al.ru/doc/vet/vet_doc/vf64/asp.html)



**Рисунок 5.** Наследственная катаракта правого глаза у 10-месячной сибирской лайки. Видно диффузное заднее помутнение коры. По материалам сайта [http://vets.al.ru/doc/vet/vet\\_doc/vf64/asp.html](http://vets.al.ru/doc/vet/vet_doc/vf64/asp.html).



**Рисунок 6.** Клиническая картина прогрессирующей атрофии сетчатки у собак. По материалам сайта <http://webmvc.com/show/show.php?sec=13&art=59>



**Рисунок 7.** Кошка-альбинос. По материалам сайта <http://images.yandex.ru/>



**Рисунок 8.** Маска у мопса. По материалам сайта <http://www.fanpop.com/spots/pugs/images/239516/title/pug-photo>



**Рисунок 9.** Коричневый окрас у лабрадора. По материалам сайта <http://labrikos.ru/>



**Рисунок 10.** Зонарно-серый окрас у элкхаунда. По материалам сайта <http://www.zooclub.ru/dogs/114.shtml>



**Рисунок 11.** Голубой дог. По материалам сайта [http://www.avito.ru/items/sankt-peterburg\\_sobaki\\_schenki\\_nemetskogo\\_doga\\_golubogo\\_okrasa\\_8194181](http://www.avito.ru/items/sankt-peterburg_sobaki_schenki_nemetskogo_doga_golubogo_okrasa_8194181)



**Рисунок 12.** Серый окрас керри-блю терьера. По материалам сайта <http://natureworld.ru/eto-interesno/kerri-blyu-terer-iz-istorii-porodyi.html>



**Рисунок 13.** Ирландская пегость у шелти. Фотография авторов.



**Рисунок 14.** Мраморный окрас у шелти. По материалам сайта <http://budka.uz/2007/07/>





**Рисунок 15.** Голубо-кремовая кошка. По материалам сайта [http://oldcats.ru/porody/persidskaya\\_b\\_5.htm](http://oldcats.ru/porody/persidskaya_b_5.htm)



**Рисунок 16.** Шоколадный окрас у ориентальной кошки. По материалам сайта <http://housecats.ru/category/lysye-koshki/>



**Рисунок 17.** Кот, гемизиготный по мутации O. Фотография авторов.



**Рисунок 18.** Длинношерстная и короткошерстная кошки. А – персидская; Б – экзотическая. По материалам сайта <http://ru.wikipedia.org/wiki/>.

Научное издание

Алексей Александрович Сазанов, Анна Львовна  
Сазанова

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА СОБАКИ И  
КОШКИ**

Монография

Редактор  
Технический редактор  
Оригинал-макет

Ленинградский государственный университет  
имени А.С. Пушкина  
196605, Санкт-Петербург, Петербургское шоссе, 10