

*На правах рукописи*

**КОРОЛЕВА**  
**Анастасия Геннадьевна**

**ВОЗРАСТНОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕРНОЙ ДНК У  
БАЙКАЛЬСКИХ ПЛАНАРИЙ (TURBELLARIA, TRICLADIDA) И  
МОЛЛЮСКОВ (GASTROPODA, PROSOBRANCHIA, BENEDICTIIDAE)**

03.01.07 – молекулярная генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата биологических наук**

**Новосибирск - 2018**

Работа выполнена в лаборатории ихтиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Научный руководитель: **Кирильчик Сергей Васильевич**, кандидат биологических наук, доцент, руководитель группы эволюционной генетики в лаборатории ихтиологии, с.н.с., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Научный консультант: **Тимошкин Олег Анатольевич**, доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией биологии водных беспозвоночных, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Оппоненты: **Жданова Наталья Сергеевна**, доктор биологических наук, в.н.с., Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск  
**Оловников Алексей Матвеевич**, кандидат биологических наук, в.н.с., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, г. Москва

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, г. Санкт-Петербург

Защита состоится: \_\_\_\_\_ 2018 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 003.074.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН (630090, Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 8/2, тел. (383)-373-02-49, e-mail: [ovant@mcb.nsc.ru](mailto:ovant@mcb.nsc.ru)). С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН [https://www.mcb.nsc.ru/diss\\_council/autoref](https://www.mcb.nsc.ru/diss_council/autoref)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

О.В. Антоненко

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность.** Интерес к биологии теломер не угасает в течение последних тридцати лет. Это связано не только с вовлеченностью теломер и теломеразы в процессы старения клеток и организма [Baird, 2008], но и с тем, что длина теломерной ДНК (тДНК) коррелирует с изменениями в физиологии [Calado, Young, 2012; Asghar *et al.*, 2016] и чувствительна к разнообразным внешним воздействиям [Yin, Jiang, 2013; Rehkopf *et al.*, 2014]. Причем, длина тДНК и ее динамика часто являются видоспецифичными [Hausmann *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2011]. Несмотря на интенсивные исследования, в биологии теломер остаются нерешенные вопросы. Например, не до конца понятно, чем определяется длина и динамика тДНК, как именно она связана с полом, почему укорочение теломер может происходить при активной теломеразе, и ряд других.

Некоторым представителям свободноживущих плоских червей и моллюсков присущи особые физиологические свойства, связь которых с биологией теломер уже была изучена. Так, определенные виды плоских червей обладают исключительной способностью к регенерации. Было показано, что механизм поддержания длины тДНК при регенерации у видов планарий, размножающихся половым и бесполом путем, зависит от способа размножения [Tan *et al.*, 2012; Tasaka *et al.*, 2013]. Среди моллюсков недавно были обнаружены редкие долгожители с продолжительностью жизни (ПЖ) 400-500 лет [Wanamaker *et al.*, 2008; Sosnowska *et al.*, 2014]. Анализ динамики длины теломерных районов у них выявил поддержание тДНК в процессе онтогенеза [Gruber *et al.*, 2014]. Наряду с этими особенностями, существует немало других интересных аспектов биологии планарий и моллюсков, что делает этих беспозвоночных животных интересными объектами для исследования связи теломер с разными факторами. Богатое биоразнообразие фауны планарий и моллюсков оз. Байкал, населяющих разные экологические ниши, в том числе абиссаль, позволяет выбирать для изучения отдельные виды с определенными физиологическими, морфологическими и экологическими особенностями и сравнивать их между собой. Анализ биологии теломер байкальских моллюсков может пролить свет на связь

этих концевых районов хромосом с возрастом, размером тела, скоростью роста, полом, плодовитостью и условиями обитания. В экосистеме Байкала в процессе эволюции развилась уникальная фауна гигантских пресноводных планарий, аналогов которой нет нигде в мире [Мамкаев и др., 1999]. Сравнение биологии теломер у этих гигантов и планарий небольшого размера, которые также обитают в озере, позволит понять, как гигантизм у беспозвоночных животных связан с теломерами, и как в процессе эволюции длина теломер менялась у этих видов. Помимо этого, исследование длины и динамики тДНК у эндемичных планарий Байкала и общесибирских видов, обитающих в совершенно других условиях, поможет оценить влияние экологии на биологию теломер у этих организмов. До начала этой работы не было никаких сведений о биологии теломер у байкальских гидробионтов. Изучение теломеро-теломеразного комплекса у моллюсков и планарий оз. Байкал внесет значительный вклад в понимание связи динамичных молекулярных структур с морфофизиологическими и экологическими особенностями организмов.

**Цель исследования** – выяснить, какие сходства и различия существуют в структуре, длине и возрастной динамике тДНК у байкальских планарий и моллюсков. В рамках этой цели поставлены следующие **задачи**:

1. Определить структуру и длину тДНК у байкальских брюхоногих моллюсков, а также у эндемичных байкальских и общесибирских планарий.

2. Установить, как менялась средняя длина теломер в процессе эволюции исследуемых животных.

3. Провести анализ динамики количества тДНК в течение онтогенеза у нескольких видов планарий, отличающихся размерами тела, и у самцов и самок нескольких видов гастропод.

4. Выявить присутствие или отсутствие активной теломеразы в тканях планарий и моллюсков.

**Научная новизна и практическая ценность.** Исследование биологии теломер байкальских моллюсков и планарий проводится впервые и является оригинальной работой, вносящей вклад в понимание функционирования теломер у беспозвоночных животных. С одной стороны, ее уникальность связана с объектами исследования – гидробионтами оз. Байкал,

крупнейшей экосистемы, имеющей значимость мирового масштаба. С другой стороны, эта работа затрагивает ранее не изученные аспекты биологии теломер беспозвоночных животных и характеризуется фундаментальной направленностью. Получение новых данных по биологии теломер у свободноживущих плоских червей и моллюсков будет способствовать более глубокому пониманию роли концевых районов хромосом в клетках разных животных. Возможно, знание особенностей возрастной динамики тДНК и ее связи с разными факторами у эволюционно далеких животных позволит в будущем выявить дополнительные причины, которые влияют на длину теломер. В свою очередь, эта информация может помочь в решении проблемы старения как биологического феномена

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Несмотря на глубокий эндемизм, особые условия обитания, экологическую диверсификацию, морфологические и физиологические особенности байкальских моллюсков и байкальских и общесибирских планарий, в их геноме присутствует теломерный повтор TTAGGG, который широко распространен среди Metazoa, что еще раз подчеркивает консерватизм структуры тДНК.

2. В процессе эволюции планарий длина тДНК практически не менялась, несмотря на значительные изменения в размерах тела, и для большинства видов составляет 7-8 тпн. Возрастная динамика тДНК, напротив, отличается у сестринских видов и имеет сходный характер у эволюционно далеких видов.

3. У моллюсков с одинаковой продолжительностью жизни длина и возрастная динамика тДНК отличаются. Крупным видам присущи более длинные теломеры, а самки в период полового созревания имеют больше теломерных повторов в геноме, чем самцы. Возрастная динамика тДНК также имеет половую специфичность и отличается по характеру: у разных видов наблюдается укорочение, поддержание или удлинение тДНК в зависимости от половой принадлежности особей.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы представлены на международных конференциях в виде устных докладов: «Хромосома 2009» (Новосибирск, 2009), «Генетика продолжительности жизни и старения» (Сыктывкар, 2010), «Хромосома 2012» (Новосибирск, 2012).

**Вклад автора.** На всех этапах реализации поставленных задач исследования и в интерпретации результатов автор принимал непосредственное участие. Данные по длине тДНК у байкальских планарий и моллюсков, а также препараты хромосом для FISH были получены совместно с к.б.н. Евтушенко Е. В. в лаборатории д.б.н. Вершинина А. В. (ИМКБ СО РАН, г. Новосибирск). Данные по возрастной динамике тДНК и активности теломеразы у моллюсков получены совместно с к.б.н. Максимовой Н. В. и д.б.н. Ситниковой Т. Я. (ЛИН СО РАН, г. Иркутск). Определение возраста и видовой принадлежности моллюсков осуществлялось к.б.н. Максимовой Н. В. Определение видовой принадлежности планарий проводилось автором под руководством к.б.н. Зайцевой Е. П. и д.б.н. Тимошкина О. А. (ЛИН СО РАН, г. Иркутск).

**Структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, а также заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, в которые входит 279 ссылки. Работа изложена на 186 страницах, содержит 11 таблиц, 29 рисунков и 8 приложений на 40 листах.

**Публикации.** Результаты исследования опубликованы в 7 научных работах, из них четыре – в журналах из списка ВАК и три – в сборниках материалов конференций.

**Благодарности.** Автор от всего сердца благодарит своего научного руководителя Кирильчика С. В. и своего научного консультанта Тимошкина О. А. за их профессиональное руководство, обучение и всяческую поддержку. Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории ихтиологии и лаборатории биологии водных беспозвоночных ЛИН СО РАН за их помощь в освоении методов, ценные советы и информацию, особенно к.б.н. Максимовой Н. В., к.б.н. Зайцевой Е. П., к.б.н. Сухановой Л. В. и д.б.н. Ситниковой Т. Я. Отдельную благодарность автор приносит сотрудникам ИМКБ СО РАН к.б.н. Евтушенко Е. В., д.б.н. Вершинину А. В., Иванкиной Е. А. и Иванкину А. В. за помощь в освоении методик, обсуждение результатов и содействие в выполнении работы. Автор искренне благодарит за сбор материала Галимову (Перцеву) Ю. А. (ИМКБ, г. Новосибирск), к.б.н. Анненкову Н. В. (ЛИН СО РАН, г. Иркутск) и к.б.н. Ханаева И. В. (ЛИН СО РАН, г. Иркутск).

Работа выполнена в рамках бюджетной темы ЛИН СО РАН 0345-2016-0002 (АААА-А16-116122110066-1) «Молекулярная экология и эволюция живых систем Центральной Азии в условиях глобальных экологических изменений» и при финансовой поддержке грантов РФФИ №12-04-32052, №13-04-01270 и №15-29-02515, интеграционных проектов СО РАН № 45, 37 и 51.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

Обзор литературы содержит сведения о структуре тДНК у разных организмов, ее длине и функциях. Также уделено внимание разным механизмам поддержания длины теломерных районов в течение онтогенеза, особенно ферменту теломеразе. Рассмотрены варианты динамики тДНК в процессе старения у разных организмов. Отдельные пункты затрагивают проблему связи биологии теломер с полом и влияние на нее разнообразных факторов окружающей среды. Особо представлены данные о биологии теломер плоских червей и моллюсков.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Структура и длина тДНК исследовалась у 10 видов планарий, эндемичных для оз. Байкал (*Baikalobia guttata*, *B. copulatrix*, *B. variegata*, *Rimacephalus arecepta*, *R. pulvinar*, *Sorocelis hepatizon*, *S. nigrofasciata*, *Protocotylus* sp., *Baikaloplana valida*, *Bdellocephala baikalensis*) и одного общесибирского вида (*Phagocata sibirica*), который в Байкале не встречается. Динамика тДНК в процессе онтогенеза была изучена у особей четырех видов (у 154 особей *B. guttata*, 117 особей *Ph. sibirica*, 75 особей *R. arecepta* и 46 особей *S. hepatizon*), для которых, кроме того, была определена активность теломеразы. Поскольку в настоящее время не существует доступных методов оценки возраста плоских червей, в качестве его меры мы использовали размер тела животного (сумму длины и ширины). Основанием для этого послужила работа Е. П. Зайцевой с соавт., в которой для вида *B. guttata* была показана положительная корреляция размеров тела и возраста [Zaytseva, Mizandroutsev, Timoshkin, 2006].

Структура, длина, возрастная динамика тДНК в хромосомах и активность теломеразы исследовалась у трех эндемичных байкальских моллюсков (95 особей *Benedictia fragilis*, 157 особей *B. baicalensis* и 111 особей *Kobeltocochlea martensiana*).

Анализировались особи разного возраста и пола. Максимальная ПЖ для них составляет 8 лет [Maximova *et al.*, 2017].

Межиндивидуальные различия в количестве тДНК отдельно анализировались у 49 ювенильных особей планарии *B. guttata* и 37 эмбрионов улитки *B. baicalensis*, которые развивались в коконах и яйцевых капсулах, отложенных соответственно червями и моллюсками *in vitro*.

**ДНК и экстракт, содержащий белки и РНК**, получали из глотки, передней части или всего тела планарий, а также из ноги моллюсков. Для выделения ДНК из фиксированного в 96% этаноле материала применялся метод фенол-хлороформной экстракции с переосаждением спиртом и ацетатом натрия. Для получения экстракта, содержащего белки и РНК, использовались живые или замороженные в жидком азоте ткани. После гомогенизации этот материал помещался в холодный CHAPS буфер с ингибитором РНКаз и выдерживался 30 мин на льду. Далее раствор центрифугировался при 12 тыс. об. и 4°C, супернатант расфасовывался по пробиркам и хранился при -70°C.

**Определение структуры тДНК.** Структура ДНК определялась с помощью dot-blot гибридизации, ПЦР с одним праймером, комплементарным тДНК [Frydrychova *et al.*, 2004], и секвенирования по Сэнгеру [Hijri, Niculita, Sanders, 2007].

**TRF-анализ.** Тотальную ДНК (1 мкг) обрабатывали мелкощепящими рестриктазами *Hinfl* и *RsaI*. Фрагменты ДНК после рестрикции разделяли пульс-электрофорезом в аппарате CHEF-DR III. Далее из агарозного геля переносили ДНК на нейлоновую мембрану и гибридизовали по Саузерну с меченым [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP зондом (TTAGGG)<sub>15</sub>. После автордиографии анализ длины тДНК осуществляли по маркерам молекулярного веса, используя программу TotalLab TL120 1D v2009.

**FISH.** Хромосомные препараты получали из семенников моллюсков и регенеративной бластемы планарий. Гибридизацию проб на препаратах проводили в соответствии с протоколом, описанным в работе [Joffe, Solovei, Macgregor, 1998].

**ПЦР в реальном времени** осуществлялась на приборе Rotor-Gene Q 6000 по методике, описанной в работе Sawthon, 2002. Относительная длина тДНК (ОДТ) рассчитывалась как соотношение числа копий теломерного повтора к числу копий референсного гена актина, выраженных в значениях пороговых

циклов или концентрации ДНК с учетом эффективности реакций. При этом применялся метод стандартных кривых или метод, предложенный в работе Pfaffl, 2001.

**TRAP (определение активности теломеразы).** Сначала к экстракту, содержащему белки и РНК, добавляли специальные праймеры АСХ и TS [Kim *et al.*, 1994; Kim, Wu, 1997], которые являются субстратом для фермента теломеразы. Далее проводили амплификацию полученных продуктов и разделяли их в полиакриламидном геле, после чего осуществляли окраску нитратом серебра и визуализировали как описано в [Sanguinetti, Neto, Simpson, 1994; Dalla Torre *et al.*, 2002].

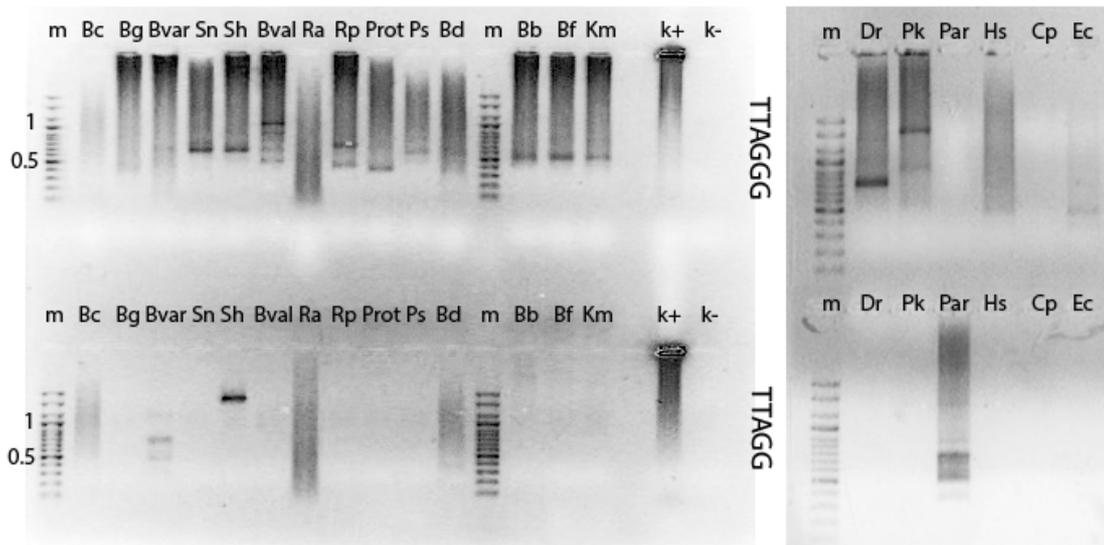
**Филогенетический анализ.** Для филогенетического анализа байкальских планарий были выбраны два участка рибосомальных генов (18S рРНК и ITS1-5.8S-ITS2 (далее *ITS-5.8S*)) и участок гена актина. Структура праймеров на эти регионы представлена в работах [Carranza *et al.*, 1997; Kiesling *et al.*, 2002; Королева и др., 2013]. Реакция Сэнгера проводилась с набором BigDye® Terminator v3.1. Анализ продуктов этой реакции осуществляли с помощью генетического анализатора 3500xL. Филогенетическую реконструкцию проводили с помощью MEGA6 и MrBayes (3.1.2).

**Статистический анализ.** Выборки проверяли на нормальность распределения посредством критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk test). Наличие выбросов анализировали с помощью теста Граббса (Grubbs test). Для установления связи между ОДТ, размерами тела и возрастом применяли регрессионный анализ и рассчитывали коэффициенты корреляции Пирсона или Спирмена. Для определения статистически значимых различий между группами, на которые были разделены образцы каждого вида, использовали при нормальном распределении дисперсионный анализ ANOVA и критерий Тьюки (Tukey HSD test), а при ненормальном распределении и небольших выборках – непараметрический U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test) и критерий Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis test). Повторяемость эксперимента оценивали с помощью T-теста для зависимых выборок и корреляционного анализа. Различия считали достоверными, если нулевая гипотеза опровергалась на уровне значимости (p) менее 0.05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Структура тДНК.** Посредством секвенирования, dot-blot и FISH гибридизации, ПЦР с одним праймером (рис. 1) мы подтвердили присутствие ТТАGGG повтора в ДНК байкальских планарий, а посредством последних трех методик – в ДНК байкальских моллюсков. Помимо того, что в тотальной ДНК исследуемых видов присутствовал повтор ТТАGGG, у некоторых видов байкальских планарий (*B. copulatrix*, *B. variegata*, *S. hepatizon*, *R. arecepta* и *B. baikalensis*) с помощью однопраймерной ПЦР мы обнаружили присутствие артроподного повтора ТТАGG (рис. 1).

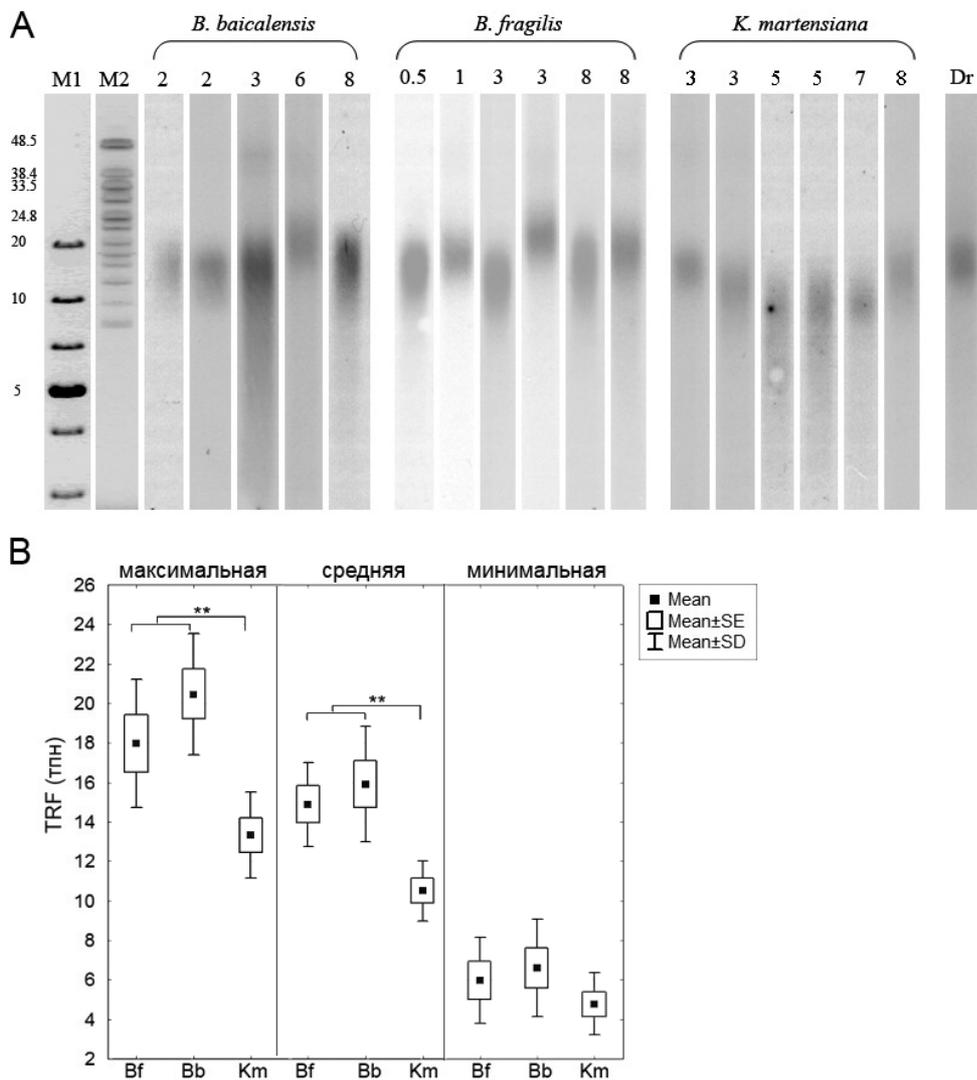
Результаты FISH-гибридизации указывают не только на локализацию ТТАGGG повторов на концах хромосом у планарий *B. guttata* и *B. variegata*, но и на присутствие этого повтора внутри хромосом этих червей. У моллюска *B. baikalensis* теломерные повторы выявлялись только на концах хромосом.



**Рисунок 1.** Продукты, полученные в ПЦР с одним праймером (тип праймера указан вертикально). Планарии: Bc – *B. copulatrix*, Bg – *B. guttata*, Bvar – *B. variegata*, Sn – *S. nigrofasciata*, Sh – *S. hepatizon*, Bval – *B. valida*, Ra – *R. arecepta*, Rp – *R. pulvinar*, Prot – *Protocotilus* sp., Ps – *Ph. sibirica*, Bd – *B. baikalensis*. Моллюски: Bb – *B. baikalensis*, Bf – *B. fragilis*, Km – *K. martensiana*. Другие организмы: Dr – рыба *Danio rerio*, Pk – рыба *Paracottus knerii* (каменная широколобка), Par – таракан *Paratemnopteryx*, Hs – человек *Homo sapiens*, Cp – комар *Culex pipiens*, Ec – кишечная палочка *E. coli*; m – маркер молекулярного веса, k- – отрицательный контроль, k+ – положительный контроль.

**Длина тДНК.** Результаты TRF анализа длины теломерных районов хромосом моллюсков свидетельствуют о вариативности размеров тДНК у каждого из исследуемых видов. Анализировалось 5-6 особей каждого вида. Размах изменчивости

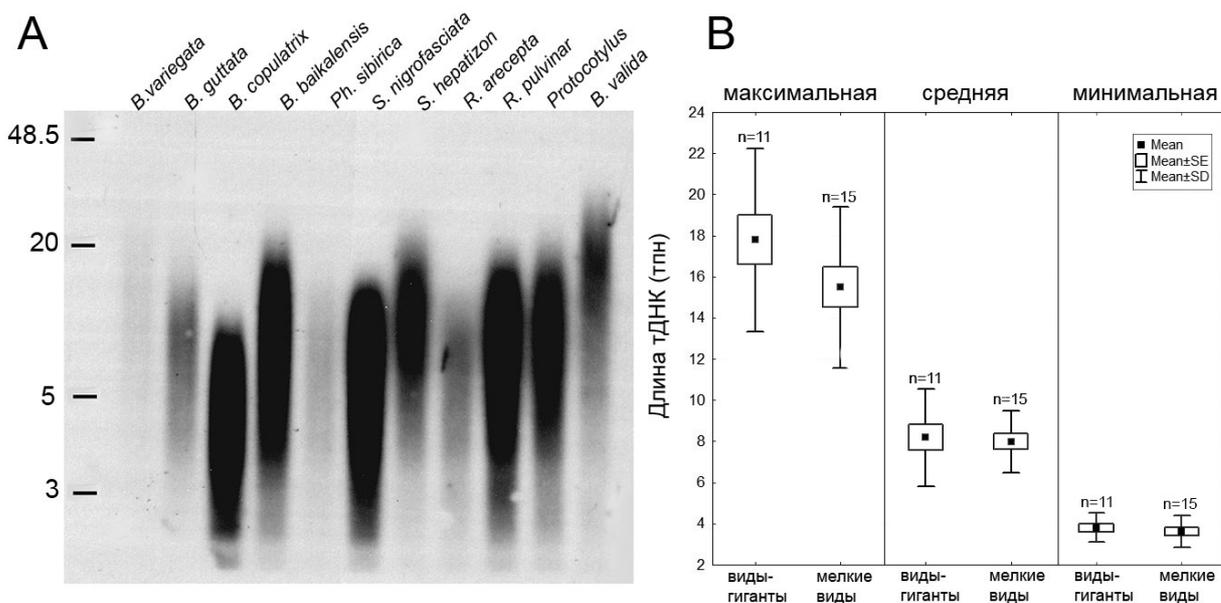
минимальных значений тДНК составил 3-11 тпн, средних 9-18 тпн, максимальных – 11-25 тпн (рис. 2А). Сравнение этих значений между видами обнаружило, что у моллюска *K. martensiana* с маленькой раковиной максимальные и средние значения длины тДНК ( $13.3 \pm 2.2$  и  $10.5 \pm 1.5$  тпн,  $\pm SD$ ) достоверно меньше (Kruskal-Wallis test:  $H(1, n=17)=8.49-9.73, p<0.005$ ), чем у более крупных *B. fragilis* и *B. baicalensis* (максимальная длина тДНК –  $20.5 \pm 3.1$  и  $18 \pm 3.2$  тпн, средняя –  $16 \pm 2.9$  и  $15 \pm 2.1$  тпн, соответственно) (рис. 2В).



**Рисунок 2.** Результаты TRF анализа моллюсков [Королева и др., 2015]. **А:** слева указаны значения маркеров молекулярного веса М1 (1kb Plus, Fermentas) и М2 (8-48 kb, Bio Rad) в тпн. Цифрами сверху указан возраст в годах. Dr – тДНК рыбы *D. rerio*, выступающая в роли положительного контроля длины теломер, которая составляет около 16 тпн [Anchelin et al., 2011]. **В:** сравнение максимальной, средней и минимальной длины тДНК между видами; \*\* –  $p<0.005$  (Kruskal-Wallis test); Mean – среднее; SE – стандартная ошибка среднего; SD – стандартное отклонение от среднего; Bf – *B. fragilis*, Bb – *B. baicalensis*, Km – *K. martensiana*.

У исследованных видов планарий максимальный размер тДНК имел значения от 9 до 27.4 тпн, средний – от 4.8 до 15.7 тпн и минимальный – от 2.4 до 5.5 тпн (таблица, рис. 3А). Разделение исследованных планарий на группы по размеру тела и последующее сравнение длины тДНК не выявило статистических отличий между длиной теломер у этих групп (Kruskal-Wallis test:  $H(1, n=26)=0.27-1.26, p>0.05$ ) (рис. 3В).

Внутривидовая и межвидовая вариабельность в длине теломер была характерна для моллюсков и планарий. Гетерогенность в длине теломер между особями одного вида выявлялась при измерении длины тДНК как методом TRF (SD для моллюсков составило 14-18 %, для планарий – 11-29%), так и методом ПЦР в реальном времени (SD для моллюсков составило 21-34 %, для планарий – 16-27%). Такая вариабельность обнаруживалась уже у эмбрионов моллюсков (*B. baicalensis*) и вышедших из коконов планарий (*B. guttata*).



**Рисунок 3.** Длина тДНК у 11 видов планарий [Королева и др., 2013]. **А:** результат TRF анализа после автордиографии, слева показаны значения маркера молекулярного веса в тпн. **В:** сравнение максимальной, средней и минимальной длины тДНК у видов-гигантов и мелких видов планарий. Статистически значимых отличий между группами не обнаружено (Kruskal-Wallis test); n – общее число особей, принадлежащих разным видам.

Что касается межполовых отличий в длине теломер, то у всех видов моллюсков по данным ПЦР в реальном времени самки имеют большее количество тДНК, чем самцы в возрасте 4-6 лет (рис. 4В). У *B. fragilis* длина теломер у женских особей больше на

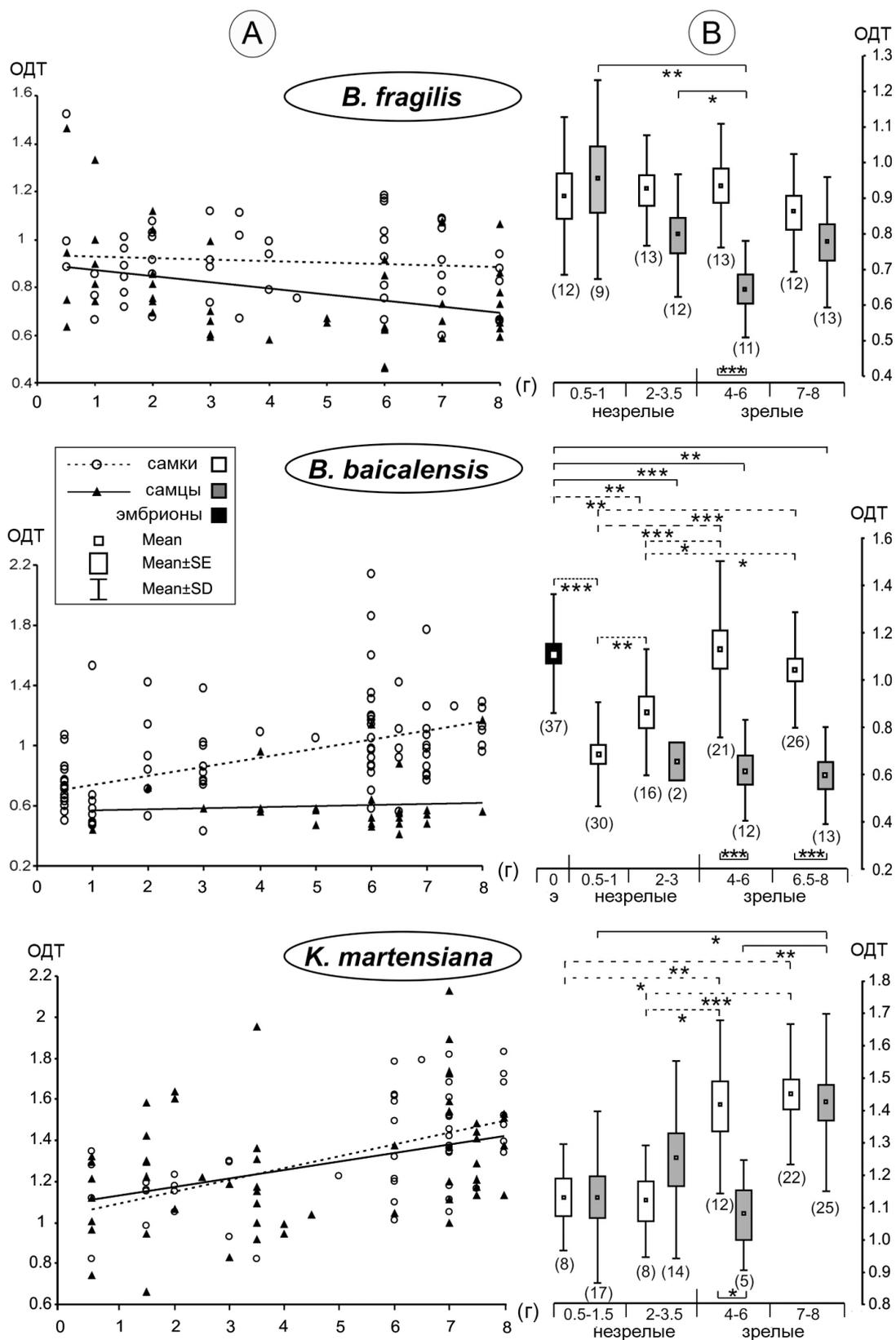
33%, у *B. baicalensis* – на 44% (эти отличия сохранились и у 7-8 летних особей), а у *K. martensiana* – на 17%.

**Таблица.** Значения длины тела и длины тДНК у планарий

Вид	Длина тела, см	Максимальная длина тДНК, тпн±SD	Средняя длина тДНК, тпн±SD	Минимальная длина тДНК, тпн±SD
<i>B. variegata</i>	2.5-2.8	14.9±3.96	7.9±1.59	3.7±0.12
<i>B. guttata</i>	1.8-2	15.9±3.85	8.6±1.6	3.6±0.61
<i>B. copulatrix</i>	2.5	8.5	4.8	2.4
<i>B. baikalensis</i>	3-4	18	7.6	2.5
<i>Ph. sibirica</i>	2	17.1±3.55	8.2±0.97	3.95±0.92
<i>S. nigrofasciata</i>	2-2.2	12.5	6.9	2.6
<i>S. hepaticum</i>	7	18.1±3.07	8.1±0.85	3.55±0.37
<i>R. arecepta</i>	12	14.4±1.91	6.4±0.42	3.4±0.57
<i>R. pulvinar</i>	11	17.6±2.35	7.2±0.32	3.97±0.35
<i>Protocotylus</i> sp.	10	16.6±6.87	8.2±1.42	4.1±0.12
<i>B. valida</i>	до 40	27.4	15.7	5.5

\* Примечание. Стандартное отклонение не указано для видов, у которых анализировалась одна особь.

**Возрастная динамика тДНК у моллюсков** исследовалась с помощью ПЦР в реальном времени (рис. 4). Параметрические и непараметрические статистические методы на уровне значимости  $p < 0.05$  выявляют межполовые отличия в количестве и возрастной динамике тДНК. У самок *B. fragilis* мы видим поддержание количества тДНК в течение онтогенеза, тогда как у самцов наблюдается ее уменьшение в возрасте 4-6 лет на 30%, когда они становятся половозрелыми, а потом разница у молодых и старых особей сокращается до 12% ( $R_{\delta} = -0.31$ ,  $p = 0.0391$ ) (рис. 4В). При анализе динамики ОДТ у *B. baicalensis* обнаруживается значительное уменьшение количества тДНК в первый год жизни у самок по сравнению с эмбрионами на 39%. У самцов также теломерные повторы теряются в первые три года жизни примерно на тот же порядок (на 47%). Далее в процессе онтогенеза у самок наблюдается увеличение количества тДНК ( $R_{\phi} = 0.51$ ,  $p = 0.0000$ ) и в возрасте 4-6 лет оно становится сопоставимым с количеством тДНК у эмбрионов. У самцов ОДТ больше не меняется (рис. 4). Возрастная динамика тДНК у *K. martensiana* отличается от таковой у представителей рода *Benedictia* тем, что как у самцов, так и у самок ОДТ увеличивается с возрастом примерно на 20% ( $R_{\delta} = 0.31$ ,  $p = 0.0161$  и  $R_{\phi} = 0.56$ ,  $p = 0.0000$ ) (рис. 4).

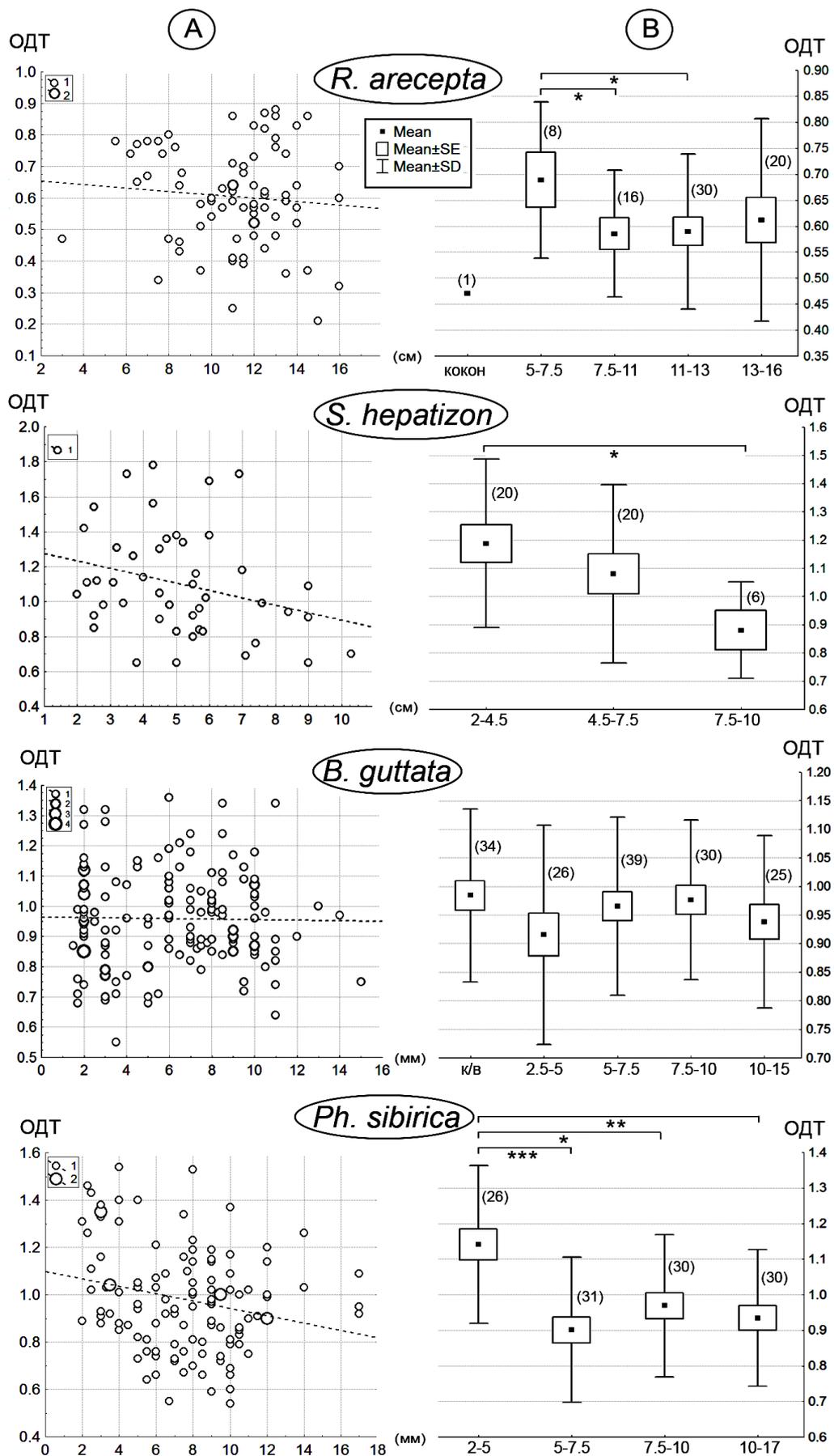


**Рисунок 4.** Возрастная динамика ОДТ у самцов и самок моллюсков [Махимова, Koroleva *et al.*, 2017]. **А:** корреляция между возрастом и ОДТ. **В:** сравнение ОДТ между возрастными группами. Цифры в скобках обозначают размер выборки, э – эмбриональная стадия, г - годы. Значимые отличия между группами: \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.005$ ; \*\*\* -  $p < 0.0005$  (Mann-Whitney U Test).

**Возрастная динамика тДНК у планарий.** При проведении корреляционного анализа была выявлена зависимость количества тДНК от размера тела (возраста) у двух видов планарий: *S. hepatizon*, байкальского гиганта ( $R=-0.3$ ,  $p=0.0456$ ), и *Ph. sibirica*, общесибирского вида небольшого размера ( $R=-0.23$ ,  $p=0.011$ ) (рис. 5А). Последующее сравнение размерных групп у этих видов показало, что у *S. hepatizon* уменьшение количества тДНК происходит постепенно в течение онтогенеза, а статистически значимые отличия в ОДТ обнаруживаются только между группами 2-4.5 см и 7.5-10 см, т.е. между молодыми и старыми особями (рис. 5В). При этом ОДТ укорачивалась на 26%. У *Ph. sibirica* количество тДНК уменьшалась на 20% только в ювенильный период онтогенеза: отличия в ОДТ были выявлены между самой молодой размерной группой (2-5 мм) и всеми остальными группами (5-7.5 мм, 7.5-10 мм и 10-17 мм). При сравнении последних размерных групп *Ph. sibirica* между собой статистически значимых отличий не было выявлено, т.е. количество теломерных повторов в течение дальнейшего роста не изменялось (рис. 5В). Подобная динамика тДНК наблюдалась у другого байкальского гиганта *R. arecepta*: особи размером 5-7.5 см имели больше тДНК по сравнению с особями, разделенными на размерные группы 7.5-11 и 11-13 см (рис. 5В). Только в этом случае ОДТ у молодых особей была больше на 15%. У байкальского мелкого эндемика *B. guttata* статистически значимых отличий в количестве тДНК между размерными группами не наблюдалось, и зависимости ОДТ от возраста червей не было выявлено (рис. 5).

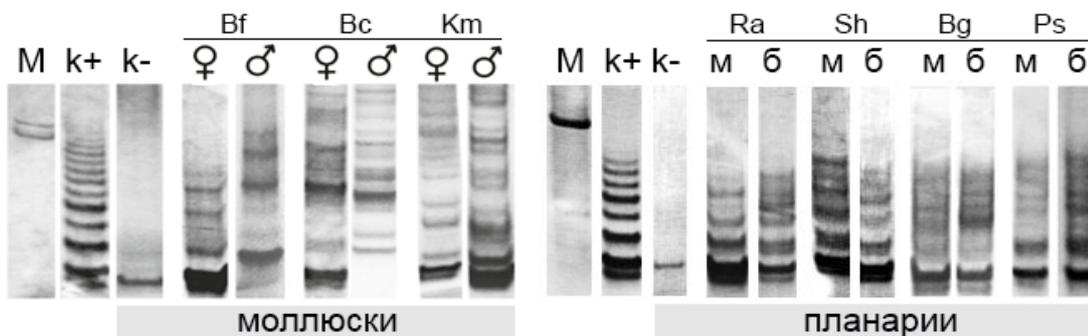
**Активность теломеразы** была выявлена с помощью TRAP анализа у всех анализируемых видов планарий и моллюсков разного размера, возраста и пола (рис. 6). С учетом разной динамики количества тДНК, в том числе уменьшения на некоторых этапах онтогенеза (см. выше), присутствие активной теломеразы указывает на постоянную потребность в этом ферменте и на его неоднозначную роль в жизни клеток, которая не ограничивается только поддержанием длины тДНК.

**Длина теломерной ДНК и филогения байкальских планарий.** Для каждого вида были получены нуклеотидные последовательности генов 18S рРНК, *ITS-5.8S* и актина. Длина



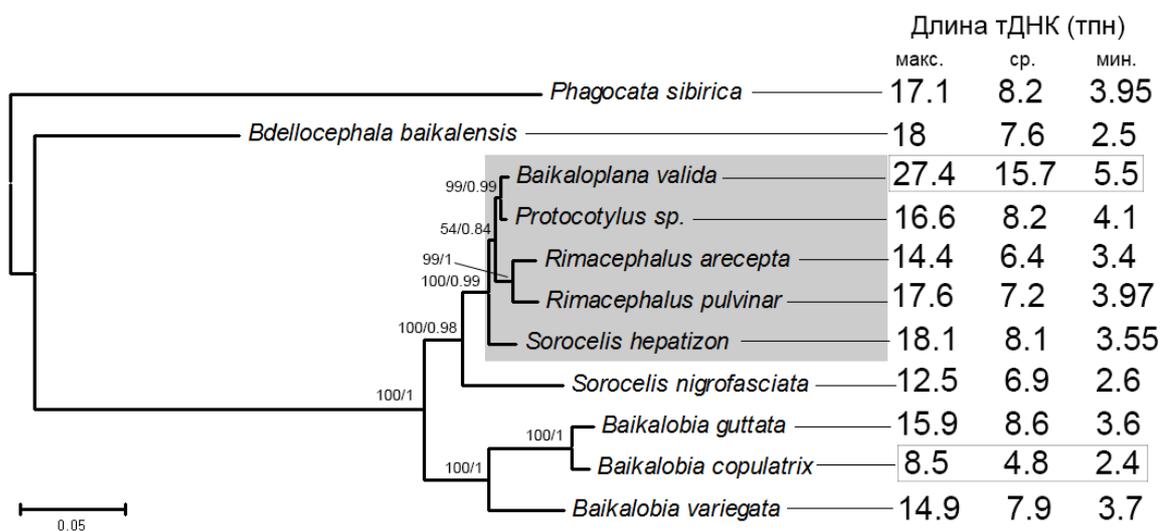
**Рисунок 5.** Динамика ОДТ у планарий в процессе роста тела (~ возрастная динамика ОДТ). **А:** диаграммы рассеяния значений ОДТ в выборке (размер круга указывает на число особей) в зависимости от размера тела. **В:** сравнение ОДТ между

размерными группами. Цифры в скобках обозначают размер выборки, к/в – группа, состоящая из коконов и особей, вышедших из коконов (возрастом 1-2 дня). Значимые отличия между группами: \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.005$ ; \*\*\* -  $p < 0.0005$ . ОДТ *R. arecepta* и *S. hepatizon* анализировалась с помощью Mann-Whitney U Test, ОДТ *B. guttata* и *Ph. sibirica* – с помощью ANOVA и Tukey HSD test.



**Рисунок 6.** Активность теломеразы у моллюсков и планарий. М – маркер молекулярного веса (~100 пн); k+ - теломераза в раковых клетках; k- - экстракт из тканей моллюска или планарии, прогретый при 95°C в течение 30 мин; м – особи маленького размера; б – особи большого размера. Самки и самцы моллюсков в возрасте 6-7 лет. Расшифровку видов см. в подписи к рис. 1. Результаты по активности теломеразы для других особей этих видов см. в тексте диссертации.

анализируемых регионов после выравнивания составила 1713, 1086 и 714 пн, соответственно. Филогенетическая реконструкция, представленная на рисунке 7, осуществлялась при их объединении. Это дерево демонстрирует, что высокую



**Рисунок 7.** Филогенетические отношения исследованных видов планарий и длина их тДНК. Дерево реконструировано по объединенным нуклеотидным последовательностям ядерных генов 18S рРНК, *ITS-5.8S* и актина (MrBayes (3.1.2) и Mega6). Серым цветом выделены виды-гиганты. Прямоугольниками отмечены самые большие и самые маленькие значения длины тДНК. В узлах указаны значения бутстрэпа/апостериорной вероятности. Шкала указывает генетические расстояния. Макс. – максимальная, ср. – средняя, мин. – минимальная длина тДНК.

статистическую поддержку имеют две монофилетичные группы: (1) – представители рода *Baikalobia* и (2) – представители родов *Sorocelis*, *Rimacephalus*, *Baikaloplana*, *Protocotylus*. Виды *S. hepatizon* и *S. nigrofasciata* не образуют родового кластера, что согласуется с полученными ранее данными [Кузнецов, Тимошкин, Кумарев, 1996]. Все планарии большого размера входят в кластер (2) и имеют схожую длину тДНК (6.4-8.2 тпн). Только самая крупная планария *B. valida* имеет самые длинные теломеры (15.7 тпн). Самые короткие теломеры (4.8 тпн) характерны для мелкой планарии *B. copulatrix* из группы (1). У остальных планарий средняя длина тДНК имеет схожие значения с таковой у гигантов, в том числе и у сибирского вида *Ph. sibirica*.

Таким образом, длина тДНК не является филогенетически информативным признаком у планарий. Вероятно, в процессе эволюции она практически не менялась, за исключением двух видов с самыми длинными и самыми короткими теломерами.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Теломеры – уникальные структуры хромосом, изменение которых связано с таким разнообразием факторов, что до сих пор не сложилась ясная и точная картина регуляции их длины. Сравнительное исследование биологии теломер байкальских планарий и моллюсков, с одной стороны, указывает на видовую специфику в длине и динамике тДНК, а с другой выявляет некоторые общие характеристики. Так, моллюски и планарии имеют теломерный повтор ТТАGGG (рис. 1), который характерен для многих Metazoa [Traut *et al.*, 2007]. Однако у пяти видов планарий, кроме этого повтора, выявляется мотив ТТАGG, свойственный членистоногим животным, что может указывать на некоторую вырожденность тДНК или на локализацию артроподных повторов в прителомерной или любой другой области хромосом. В целом, теломеры планарий и моллюсков можно отнести к коротким теломерам (меньше 20 тпн) (рис. 2, 3, таблица). Такой размер концевых районов хромосом наиболее часто встречается среди разных животных [Lorite, Carrillo, Palomeque, 2002; Haussmann *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2011]. С эволюционной точки зрения длина теломер у планарий довольно стабильна и не зависит от размера тела (рис. 3В, 7), также как у млекопитающих, хотя у последних она отрицательно коррелирует с ПЖ [Gomes *et al.*, 2011]. Эта связь важна для предотвращения

неконтролируемого деления клеток [Seluanov *et al.*, 2007]. Среди байкальских гастропод, напротив, независимо от ПЖ, крупные филогенетически близкие виды бенедикций имели более длинные теломеры (рис. 2В). Это может объясняться как отличиями в физиологии (например, в скорости роста), так и в экологии (обитают на разных субстратах, питаются разной пищей). Изменения во внешних условиях в процессе эволюции приводят к изменению в длине теломер и у некоторых двустворчатых моллюсков [Estabrooks, 2007; Godwin *et al.*, 2012].

Специфика в количестве и возрастной динамике тДНК, вероятно, определяется генетическими, физиологическими и экологическими особенностями каждого вида. Байкальские моллюски – раздельнополые животные, и это отражается на биологии теломер у некоторых из них (рис. 4А). У всех исследованных видов зрелые самки имели большее количество тДНК, чем самцы (рис. 4В). Межполовые отличия довольно часто встречаются у других раздельнополых животных [Barrett, Richardson, 2011], что обычно связывают с влиянием половых гормонов на активность теломеразы, а также с разными репродуктивными стратегиями видов, энергетическими затратами на размножение и т. п. [Kotrschal, Ilmonen, Penn, 2007; Gao, Munch, 2015; Bauch, Becker, Verhulst, 2013; Olsson, Wapstra, Friesen, 2017]. Самки и самцы отличаются не только количеством тДНК, но и характером ее динамики. В процессе онтогенеза разная динамика тДНК наблюдалась у самцов и самок бенедикций. У другого вида *K. martensiana* количество тДНК с возрастом увеличивалось у особей обоих полов (рис. 4). Возможно, этот вид байкальских моллюсков не имеет репликативного старения, которое связано с укорочением тДНК, как и некоторые беспозвоночные долгожители, в число которых входит моллюск *Arctica islandica* и морской еж *Strongylocentrotus franciscanus*. У них также не наблюдалось укорочения теломер [Gruber *et al.*, 2014; Francis *et al.*, 2006]. Важно отметить, что при любой динамике тДНК у моллюсков теломераза была активна (рис. 6). По-видимому, существуют межполовые и межвидовые отличия в регуляции этого фермента или, наряду с теломеразой, активны другие механизмы, контролирующие длину теломер. То же можно сказать и о теломеразе планарий, т. к. она была активна у видов с разной динамикой тДНК (рис. 6). В процессе онтогенеза

у них тДНК укорачивалась или поддерживалась независимо от размера тела (рис. 5). Конкретные причины, которые обуславливают тот или иной характер динамики тДНК у байкальских гидробионтов, еще предстоит изучить.

## ВЫВОДЫ

1. В геноме всех исследованных моллюсков и планарий присутствует повтор TTAGGG, который считается базовым теломерным повтором для многоклеточных животных. У пяти видов планарий (*B. copulatrix*, *B. variegata*, *S. hepatizon*, *R. arecepta* и *B. baikalensis*) наряду с базовым выявлен артроподный повтор TTAGG.

2. Согласно результатам TRF анализа, теломеры планарий и моллюсков относятся к коротким теломерам: их средняя длина варьирует в пределах 5-16 тпн.

3. Размеры теломерных районов у планарий оказались эволюционно стабильными и для большинства видов составляют 7-8 тпн. Для сестринских видов моллюсков рода *Benedictia* с крупными раковинами была характерна более длинная тДНК (15-16 тпн), чем для мелкой улитки *K. martensiana* (10.5 тпн).

4. Результаты количественной ПЦР свидетельствуют о разном характере возрастной динамики тДНК у планарий, не зависимо от того, какой размер тела они имеют. Количество тДНК с увеличением размера тела либо уменьшалось, либо поддерживалось постоянным как у гигантов, так и у мелких видов.

5. У байкальских моллюсков были выявлены все известные варианты возрастной динамики тДНК (поддержание, удлинение, укорочение) и ее половая специфичность.

6. Во время полового созревания в геноме самок всех исследованных видов моллюсков присутствовало больше тДНК, чем в геноме самцов.

7. Обнаружение активной теломеразы при разных вариантах возрастной динамики тДНК у планарий и моллюсков может указывать на разную эффективность работы этого фермента, а также на выполнении им функций, не связанных с поддержанием теломер.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в журналах, рекомендованных ВАК:

1. **Королева, А. Г.**, Кирильчик, С. В., Тимошкин, О. А. Межвидовая изменчивость длин теломерных последовательностей некоторых общесибирских и эндемичных для Байкала планарий (Plathelminthes, Tricladida) / А. Г. Королева, С. В. Кирильчик, О. А. Тимошкин // Генетика. – 2010. – Т. 46(9). – С. 1237–1240.
2. **Королева, А. Г.**, Евтушенко, Е. В., Тимошкин, О. А., Вершинин, А. В., Кирильчик, С. В. Длина теломерной ДНК и филогения байкальских и сибирских планарий (Turbellaria, Tricladida) / А. Г. Королева [и др.] // Цитология. – 2013. – Т. 55(4). – С. 247–252.
3. **Королева, А. Г.**, Евтушенко, Е. В., Максимова, Н. В., Вершинин, А. В., Ситникова, Т. Я., Кирильчик, С. В. Длина и структура теломерной ДНК у трех видов байкальских брюхоногих моллюсков (Caenogastropoda: Hydrobioidea: Benedictiidae) / А. Г. Королева [и др.] // Генетика. – 2015. – Т. 51(3). – С. 362–370.
4. Maximova, N., **Koroleva, A.**, Sitnikova, T., Khanaev, I., Bukin, Yu., Kirilchik, S. Age dynamics of telomere length of Baikal gastropods is sex specific and multidirectional / N. Maximova [et al.] // Folia Biologica (Krakow). – 2017. – Vol. 65(4). – P. 187–197.

### Прочие публикации:

1. **Королева, А. Г.** Теломеры не перестают удивлять / А. Г. Королева // Наука и жизнь. – 2013. – №12. – С. 18.
2. **Королева, А. Г.** Длина теломер и времена года [Электронный ресурс] / А. Г. Королева // Научно-попул. сайт «Биомолекула». – 2015, 27 окт. – Режим доступа: <https://biomolecula.ru/articles/dlina-telomer-i-vremena-goda>.
3. **Королева, А. Г.** Структура и длина теломер: загадкам нет конца / А. Г. Королева // Наука из первых рук. – 2016. – №2(68). – С. 59–69.
4. **Королева, А. Г.**, Кирильчик, С. В., Тимошкин, О. А. Исследование длины теломерных последовательностей у ресничных червей (Plathelminthes, Turbellaria, Tricladida)

- озера Байкал: связь с продолжительностью жизни и эволюцией / А. Г. Королева, С. В. Кирильчик, О. А. Тимошкин: материалы междунар. конф. «Хромосома 2009» (Новосибирск, 31 августа – 6 сентября 2009 г.). – С. 36–37.
5. **Королева, А. Г.**, Кирильчик, С. В., Тимошкин, О. А. Динамика изменения длины теломерных последовательностей ДНК у некоторых планарий (*Plathelminthes*, *Turbellaria*, *Tricladida*) озера Байкал / А. Г. Королева, С. В. Кирильчик, О. А. Тимошкин: тез. докл. междунар. конф. «Генетика продолжительности жизни и старения» (Сыктывкар, Республика Коми, 12-15 апреля 2010 г.). – С. 12–13.
6. **Королева, А. Г.**, Максимова, Н. В., Ситникова, Т. Я., Евтушенко, Е. В., Тимошкин, О. А., Вершинин, А. В., Кирильчик, С. В. Динамика теломерной ДНК у байкальских планарий и моллюсков / А. Г. Королева [и др.]: материалы междунар. конф. «Хромосома 2012» (Новосибирск, 2–7 сентября 2012 г.). – С. 115–116.

Королева Анастасия Геннадьевна

«Возрастное изменение длины теломерной ДНК у байкальских планарий (*Turbellaria*, *Tricladida*) и моллюсков (*Gastropoda*, *Prosobranchia*, *Benedictiidae*)»

Автореф. дисс. на соискание учёной степени кандидата биологических наук.  
Подписано в печать \_\_\_\_\_. Заказ № \_\_\_\_\_. Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз.  
Отпечатано в типографии Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН  
664033 Иркутск, ул. Улан-Баторская 1