

ПОИСК ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ ДЛЯ МУТАЦИЙ, НАРУШАЮЩИХ
ОБРАЗОВАНИЕ СИНАПТОНЕМНОГО КОМПЛЕКСА,
В СЕКВЕНИРОВАННОМ ГЕНОМЕ РЖИ *Secale cereale*© 2023 г. Ю. В. Сопова^{1, 2, *}, П. А. Зыкин², Т. В. Долматович³, С. П. Соснихина²¹Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, 199034 Россия²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия³Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220072 Беларусь

*e-mail: y.sopova@spbu.ru

Поступила в редакцию 09.12.2022 г.

После доработки 28.02.2023 г.

Принята к публикации 02.03.2023 г.

Формирование синаптонемного комплекса между гомологичными хромосомами во время профазы I мейоза имеет первоочередное значение для нормального протекания процесса рекомбинации. Нарушения в образовании синаптонемного комплекса могут приводить как к асинapsису (при этом на стадии метафазы I будут присутствовать униваленты), так и гетерологичному синапсису (на стадии метафазы I будут выявляться как униваленты, так и мультиваленты). Ранее нами были получены мутанты ржи, у которых не наблюдалось образования синаптонемных комплексов (*sy1* и *sy9*) или синапсис был гетерологичным (*sy10*, *sy18* и *sy19*). Мы провели биоинформатический анализ аннотированного генома ржи и выявили потенциальные гены-кандидаты для каждого из этих мутантов. Выбор генов-кандидатов осуществляли на основе данных микросателлитного картирования и сопоставления их с аннотированными последовательностями генома ржи. В результате были выбраны следующие гены: *Mei2-like* для мутанта *sy1*, *MAD2* для мутанта *sy9*, *BUB3.3* и *BUB3.1* для *sy10* и *sy18* соответственно, а также *Meiosis 5* для *sy19*.

Ключевые слова: рожд, мейоз, синаптонемный комплекс, картирование мутаций.

DOI: 10.31857/S0016675823070123, **EDN:** QQPAKU

В 2021 г. были опубликованы результаты полного секвенирования генома *Secale cereale* [1, 2]. Доступность аннотированного генома ржи позволила провести биоинформатический анализ и выявить потенциальные гены-кандидаты, мутации в которых в гомозиготном состоянии, как было показано ранее [3–5], приводят к нарушению процессов синапсиса гомологичных хромосом. Для анализа были взяты гены, мутации в которых были ранее обозначены как *sy1*, *sy9*, *sy10*, *sy18* и *sy19*.

Выбор генов-кандидатов осуществляли на основе данных микросателлитного картирования [3–6] и сопоставления их с аннотированными последовательностями генома ржи. Гены *Sy9* и *Sy18* ранее были картированы на длинном плече 2R-хромосомы ржи вблизи центромеры. *Sy9* был картирован в непосредственной близости от микросателлитных локусов *Xscm43* и *Xrems1230* ржи и локуса *Xgwm132* пшеницы, тогда как *Sy18* был картирован относительно локусов *Xrems1130* и *Xrems1203* ржи. *Sy10* был локализован на длинном плече хромосомы 5R ржи вблизи микросателлит-

ных локусов *Xgwm126*, *Xgwm6* и *Xgwm538* пшеницы и *Xscm179* ржи. Мутации *sy1* и *sy19* были локализованы на длинном плече хромосомы 7R ржи рядом с локусами *Xrems1187*, *Xrems1135* и *Xrems1188* ржи (*sy1*) и локусом *Xrems1234* ржи (*sy10*). Биоинформатический анализ положения маркеров на хромосомах ржи (номер сборки генома в базе GenBank – GCA_902687465.1) производился с использованием программ: Ipcress (из пакета Exonerate версии 2.4.0) и Blastn версии 2.12.0. Расположение мутаций *sy1*, *sy9*, *sy10*, *sy18* и *sy19* на хромосомах ржи и наиболее вероятные гены-кандидаты приведены на рис. 1.

Ранее было показано, что у гомозигот по мутации *sy1* наблюдается комплекс нарушений в ходе мейоза, в частности: в профазе I формируются только осевые элементы хромосом, отсутствует синаптонемный комплекс (СК), на стадии метафазы I мейоза в 96.8% случаев наблюдаются только униваленты, белок Asy1 выявлялся в виде непрерывных линейных сигналов вдоль каждой хромосомы [7].

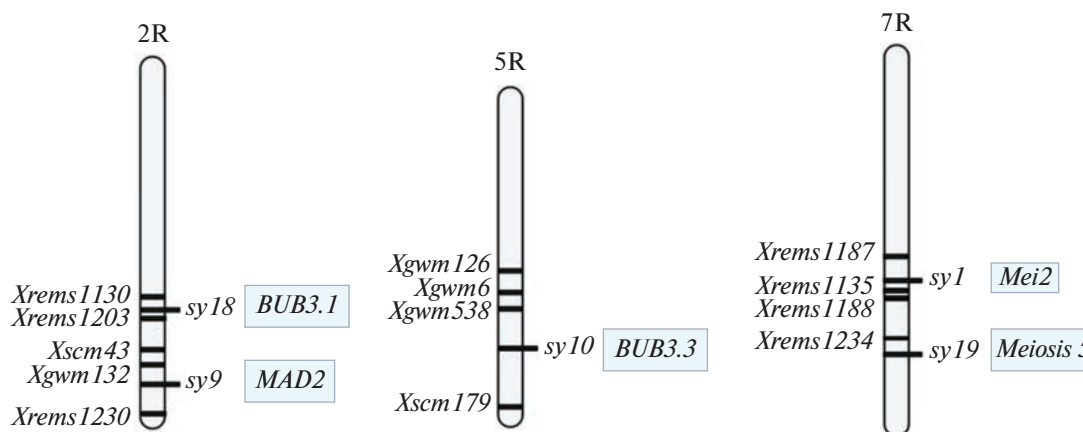


Рис. 1. Локализация мутаций *sy1*, *sy9*, *sy10*, *sy18* и *sy19* на хромосомах риса. В прямоугольных рамках — предполагаемые гены-кандидаты для этих мутаций.

Результаты хромосомного картирования мутанта *sy1* показали, что наиболее вероятным геном-кандидатом в этом случае является ген, кодирующий Mei2-подобный белок (Mei2-like protein 6). Ранее у арабидопсиса было выявлено пять генов, относящихся к семейству *Arabidopsis-mei2-Like* (AML), мутации в которых приводят к нарушениям синапсиса, образованию унивалентов, фрагментации хромосом и формированию ацентриков [8]. Mei2-подобные белки содержат уникальный домен RRM, который отвечает за связывание с РНК [9], предполагается, что они могут как напрямую посттранскрипционно регулировать активность генов, так и быть вовлеченными в организацию и ремоделинг хроматина. Это согласуется с ранее полученными данными о том, что у мутанта *sy1* отсутствуют ранние ферменты рекомбинации Rad51/Dmc1 [10], что может быть связано с нарушениями на уровне посттранскрипционной регуляции соответствующих генов. Было показано, что белок Mei2 является главным регулятором мейоза у *Schizosaccharomyces pombe*, а гены, кодирующие его ортологи, были обнаружены у разных групп эукариот, поэтому считается, что *MEI2*-подобные гены возникли на ранних этапах эволюции эукариот [9]. Сравнение аминокислотных последовательностей белков Mei2-like protein 6 риса, кукурузы, пшеницы и риса показывает, что наибольшая степень сходства между белками наблюдается именно в области С-терминального домена RRM, специфичного для Mei2-подобных белков (166–274 а.к. белка Mei2-like protein 6 риса).

Асинаптический мутант *sy9* был схож с мутантом *sy1* по цитологической картине нарушений в мейозе, однако у мутанта *sy9* в 90% клеток белок Asy1 отсутствовал, в отличие от мутанта *sy1* [11]. Анализ генов-кандидатов для мутанта *sy9* выявил ген *MAD2*, продукт которого участвует в контроле

клеточного цикла. У кукурузы белок MAD2 локализуется во внешней части мейотического кинетохора [12], для его гомолога у нематоды *C. elegans* была показана роль в регуляции мейотического синапсиса [13]. Белок MAD2 вместе с белками Bub1, Bub3, Cdc20 образует комплекс, контролирующий соединение кинетохор с микротрубочками веретена деления. MAD2 играет ключевую роль в сборке этого комплекса благодаря домену NORMA, впервые обнаруженному у белков HOP1, REV7 и MAD2. Домен NORMA взаимодействует с осевыми элементами хромосом, а также участвует в образовании белковых гомо- и гетеродимеров [14]. Белок Asy1 относится к тому же семейству белков, содержащих NORMA-домен, что и MAD2 [15]. Сравнение аминокислотных последовательностей белков MAD2 риса, кукурузы, пшеницы и риса показало практически полную их идентичность, что говорит о принципиальной важности этого белка для функционирования мейоцитов растений.

Предшествующий анализ показал, что мутации *sy10*, *sy18* и *sy19* вызывают частично негомологичный синапсис и варьирующее число унивалентов в метафазе I. У мутанта *sy10* белки Asy1 и Zyp1 образуют линейные треки, однако трехслойная структура СК не образуется, и синапсис проходит гетерологично [11]. У мутанта *sy19* вдоль хромосом наблюдается прерывистый сигнал белка Asy1 [16]. Мутанты *sy10* и *sy18*, как мы предполагаем, несут мутации в генах *BUB3.3* и *BUB3.1* соответственно. Белки BUB3.3 и BUB3.1 арабидопсиса взаимодействуют с белком MAD2 [17], у нематоды *C. elegans* была показана их роль в комплексе с белком MAD2 в регуляции синапсиса [18]. Эти белки содержат мотивы WD40, принципиальные для белок-белковых взаимодействий. Точковые мутации в консервативном мотиве

WD40 дрожжевого Bub3 нарушают его ассоциацию с Mad2, Mad3 и Cdc20 [19].

В качестве гена-кандидата для мутанта *sy19* нами был выбран ген *Meiosis 5*, продукт которого гомологичен белкам WM5 пшеницы и PDF1 арабидопсиса. У пшеницы этот ген экспрессируется на ранних стадиях мейоза, однако его роль в формировании синапсиса пока не изучена. Делеция одной из копий этого гена у пшеницы приводит к повышенному гомеологическому спариванию хромосом при межвидовом скрещивании [20]. Анализ аминокислотных последовательностей белков Mei5 из разных видов злаков выявил характерную последовательность, состоящую из остатков глицина, однако ее функциональная роль в настоящее время остается неизвестной.

Синапсис гомологичных хромосом в процессе мейотического деления является основой для генетической рекомбинации и сбалансированного расхождения хромосом в анафазе I. Нормальное протекание этих процессов зависит, в том числе, от правильного взаимодействия центромерных и теломерных областей хромосом. Изучение мутантов ржи, у которых в ходе мейоза наблюдаются различные нарушения, выявило ряд генов, продукты которых могут как посттранскрипционно регулировать активность генов, так и быть вовлеченными в организацию и ремоделлинг хроматина, а также контролировать соединение кинетохор с микротрубочками веретена деления.

Работа выполнена в рамках госзадания ИОГен РАН (тема № 0092-2022-0002).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rabanus-Wallace M.T., Hackauf B., Mascher M. et al. Chromosome-scale genome assembly provides insights into rye biology, evolution and agronomic potential // Nat. Genet. 2021. V. 53. P. 564–573. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00807-0>
2. Li G., Wang L., Yang J. et al. A high-quality genome assembly highlights rye genomic characteristics and agronomically important genes // Nat. Genet. 2021. V. 53. P. 574–584. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00808-z>
3. Соснихина С.П., Михайлова Е.И., Тихолиз О.А. и др. Генетическая коллекция мейотических мутантов ржи *Secale cereale* L. // Генетика. 2005. Т. 41. № 10. С. 1310–1321.
4. Долматович Т.В., Малышев С.В., Соснихина С.П. и др. Картирование мейотических генов ржи (*Secale cereale* L.). Локализация мутации *sy18*, нарушающей гомологичность синапсиса, с использованием микросателлитных маркеров // Генетика. 2013. Т. 49. № 4. С. 472–478. <https://doi.org/10.7868/S0016675813040036>
5. Долматович Т.В., Малышев С.В., Соснихина С.П. и др. Картирование мейотических генов ржи (*Secale cereale* L.). Локализация мутации *sy19*, нарушающей гомологичный синапсис, с помощью изозимных и микросателлитных маркеров // Генетика. 2013. Т. 49. № 5. С. 595–601. <https://doi.org/10.7868/S0016675813030053>
6. Малышев С.В., Долматович Т.В., Войлоков А.В. и др. Молекулярно-генетическое картирование асинхронических генов *sy1* и *sy9* ржи (*Secale cereale* L.) с использованием микросателлитных и изозимных маркеров // Генетика. 2009. Т. 45. № 12. С. 1634–1640.
7. Михайлова Е.И., Ловцюс А.В., Соснихина С.П. Некоторые особенности реализации ключевых событий мейоза у ржи и ее синаптических мутантов // Генетика. 2010. Т. 46. № 10. С. 1371–1375.
8. Kaur J., Sebastian J., Siddiqi I. The arabidopsis-mei2-like genes play a role in meiosis and vegetative growth in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2006. V. 18. № 3. P. 545–559. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039156>
9. Jeffares D.C., Phillips M.J., Moore S. et al. A description of the Mei2-like protein family; structure, phylogenetic distribution and biological context // Dev. Genes Evol. 2004. V. 214. P. 149–158. <https://doi.org/10.1007/s00427-004-0384-6>
10. Jenkins G., Mikhailova E.I., Langdon T. et al. Strategies for the study of meiosis in rye // Cytogenet. Genome Res. 2005. V. 109. P. 221–227.
11. Mikhailova E.I., Phillips D., Sosnikhina S.P. et al. Molecular assembly of meiotic proteins Asy1 and Zyp1 and pairing promiscuity in rye (*Secale cereale* L.) and its synaptic mutant *sy10* // Genetics. 2006. V. 174. P. 1247–1258.
12. Yu H.G., Muszynski M.G., Kelly Dawe R. The maize homologue of the cell cycle checkpoint protein MAD2 reveals kinetochore substructure and contrasting mitotic and meiotic localization patterns // J. Cell Biol. 1999. V. 145. P. 425–435. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.3.425>
13. Devigne A., Bhalla N. Mad1's ability to interact with Mad2 is essential to regulate and monitor meiotic synapsis in *C. elegans* // PLoS Genet. 2021. V. 17. P. e1009598. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009598>
14. Prince J.P., Martinez-Perez E. Functions and regulation of meiotic HORMA-domain proteins // Genes. 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3390/genes13050777>
15. Balboni M., Yang C., Komaki S. et al. COMET functions as a PCH2 cofactor in regulating the HORMA domain protein ASY1 // Curr. Biol. 2020. V. 30. № 21. P. 4113–4127. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.07.089>
16. Войлоков А.В., Соснихина С.П., Тихенко Н.Д. и др. Петергофская коллекция ржи и ее использование в генетических исследованиях // Экол. генетика. 2018. Т. 16. № 2. С. 40–49. <https://doi.org/10.17816/ecogen16240-49>
17. Caillaud M.C., Paganelli L., Lecomte P. et al. Spindle assembly checkpoint protein dynamics reveal con-

- served and unsuspected roles in plant cell division // PLoS One. 2009. V. 4. № 8. P. e6757.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006757>
18. Bohr T., Nelson C.R., Klee E., Bhalla N. Spindle assembly checkpoint proteins regulate and monitor meiotic synapsis in *C. elegans* // J. Cell Biol. 2015. V. 211. P. 233–242.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201409035>
 19. Fraschini R., Beretta A., Sironi L. et al. Bub3 interaction with *Mad2*, *Mad3* and *Cdc20* is mediated by WD40 repeats and does not require intact kinetochores // Embo J. 2001. V. 20. P. 6648–6659.
 20. Dong C., Thomas S., Becker D. et al. *WM5*: Isolation and characterisation of a gene expressed during early meiosis and shoot meristem development in wheat // Funct. Plant. Biol. 2005. V. 32. P. 249–258.
<https://doi.org/10.1071/FP04198>

Search for Candidate Genes for Mutations Disrupting Synaptonemal Complex Formation in the Sequenced Genome of Rye *Secale cereale*

J. V. Sopova^{a, b, *}, P. A. Zykin^b, T. V. Dolmatovich^c, and S. P. Sosnikhina^b

^aVavilov Institute of General Genetics, Saint-Petersburg Branch, Saint-Petersburg, 199034 Russia

^bSaint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 199034 Russia

^cInstitute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Republic of Belarus

*e-mail: y.sopova@spbu.ru

The formation of a synaptonemal complex between homologous chromosomes during prophase I of meiosis is of great importance for the normal course of the recombination process. Disturbances in the formation of the synaptonemal complex can lead to both asynapsis (in this case, univalents will be present at the metaphase I stage) and heterologous synapsis (both univalents and multivalents will be detected at the metaphase I stage). Previously, we obtained rye mutants in which no formation of synaptonemal complexes (*sy1* and *sy9*) was observed or the synapsis was heterologous (*sy10*, *sy18* and *sy19*). We performed a bioinformatics analysis of the annotated rye genome and identified potential candidate genes for each of these mutants. The choice of candidate genes was carried out on the basis of microsatellite mapping data and their comparison with annotated sequences of the rye genome. As a result, the following genes were selected: *Mei2*-like for the *sy1* mutant, *MAD2* for the *sy9* mutant, *BUB3.3* and *BUB3.1* for *sy10* and *sy18*, respectively, and *Meiosis 5* for *sy19*.

Keywords: rye, meiosis, synaptonemal complex, mutation mapping.