

На правах рукописи

Бондарева Ольга Васильевна

**Молекулярные адаптации
грызунов к подземному образу жизни на примере
подсемейства полевочных (Arvicolinae, Rodentia)**

Специальность 03.02.04 — «Зоология»

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург — 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
«Зоологический институт Российской академии наук»

Научный руководитель: **Абрамсон Наталья Иосифовна**
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты:
Чабовский Андрей Всеволодович,
доктор биологических наук,
Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова
РАН,
зав. лаборатории популяционной экологии.

Недолужко Артем Валерьевич,
кандидат биологических наук,
Европейский университет в Санкт-Петербурге,
зав. лаборатории палеогеномики

Ведущая организация:

**Научно-исследовательский институт биологии
Иркутского государственного университета**

Автореферат разослан «____» _____ 20____.

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования. К подземным грызунам относят примерно 250 видов, проводящих всю или почти всю свою жизнь под землей. Они распространены по всем континентам за исключением Австралии и Антарктиды (**Fang2015**). Уход под землю помогает избежать открытых контактов с хищниками и сильных температурных колебаний, но приводит к возникновению новых стрессовых факторов: темнота, кислородная недостаточность и гиперкапния, повышенный инфекционный фон. Существование в этих условиях приводит к формированию сходных морфо-физиологических адаптаций у филогенетически далеких форм. Несмотря на изученность морфологических адаптаций, молекулярные основы этого процесса остаются не до конца понятными. К настоящему моменту в открытых базах данных уже накопилось достаточное количество последовательностей как отдельных генов, так и полногеномных данных, позволяющих проводить сравнения и поиск следов адаптаций на различных таксономических уровнях.

Подсемейство полевочки (Arvicolinae) – одна из самых молодых и многочисленных групп отряда, распространенная практически во всех ландшафтных зонах Северного полушария. Они представляет собой удобную модель для тестирования гипотез о темпах и формах адаптивной эволюции, прежде всего связанную с роющим и подземным образом жизни. Предыдущие исследования молекулярных адаптаций к подземному образу жизни выполнялись на немногочисленных и полностью подземных представителях филогенетически далеких таксонов из разных семейств и подотрядов (слепыши, землекопы, тuco-tuco). Полевки, в свою очередь, предоставляют уникальные возможности для изучения этих механизмов за счет сравнения близкородственных пар подземных и наземных видов в пределах одного семейства.

Степень разработанности темы исследования. Несмотря на очень интенсивную историю исследования подсемейства с применением молекулярных методов, мало что известно относительно молекулярных механизмов их быстрой адаптивной радиации. За относительно недолгий период эволюции группы ее представители независимо переходили к жизни под землей.

Среди подземных полевочных активно изучались только молекулярные адаптации *Lasiopodomys mandarinus* Milne-Edwards, 1871. Однако, авторы исследований проводили сравнения не в рамках подсемейства, а с отдельными подземными грызунами из других филогенетически очень далеких семейств (*Heterocephalus glaber* Rüppell, 1842, *Fukomys damarensis* Ogilby, 1838 и несколькими видами рода *Spalax*) Guldenstaedt, 1770 (**Sun2020;Sun2018a; Dong2020**).

Не смотря на то, что в подсемействе есть другие виды, которые независимо перешли к подземному образу жизни, исследования их молекулярных адаптаций не проводилось. Также как и не делались сравнения и анализ конвергенции молекулярных признаков с другими более эволюционно древними подземными грызунами.

Цели и задачи работы. Целью данной работы является проведение молекулярно-генетических сравнений филогенетически независимых подземных форм подсемейства

полевочных (Arvicolinae, Cricetidae, Rodentia) и их наземных сестринских таксонов и выявление следов отбора при освоении подземной ниши на молекулярном уровне.

Для достижения поставленной цели были сформированы следующие задачи:

1. Сравнить направление и силу отбора для гена *CYT B*, митохондриальных и ядерных белок-кодирующих генов у подземных и наземных грызунов;
2. Провести поиск параллельных аминокислотных замен в ядерных и митохондриальных генах в независимых линиях подземных полевочных;
3. Выявить функции генов с измененным уровнем отбора относительно наземных грызунов и параллельными аминокислотными заменами, определить биохимические процессы, в которые они вовлечены;
4. Сравнить количество генов со следами адаптации к подземному образу жизни, среди подземных представителей подсемейства Arvicolinae;
5. Провести сравнение геномных изменений у эволюционно молодых подземных полевочных с представителями эволюционно более древних семейств подземных грызунов.

Научная новизна. В рамках работы впервые проведены масштабные исследования представителей подсемейства полевочьи (Arvicolinae, Rodentia) для поиска следов конвергентной эволюции в филогенетически независимых линиях подземных грызунов. Исследование выполнено на нескольких уровнях: от анализа отдельного филогенетического маркера *CYT B* до пула ядерных белок-кодирующих генов. Впервые проанализированы паттерны аминокислотных замен и выявлены сайты с параллельными заменами, характерными для подземных грызунов. Для всех белок-кодирующих митохондриальных и ряда ядерных (112) генов проведена оценка силы и направления отбора несколькими методами (codeml branch model, RELAX, aBSREL). В ходе выполнения работы в лаборатории эволюционной геномики и палеогеномики ЗИН РАН получено 36 новых митохондриальных геномов и более 15 транскриптомов, что представляет существенный вклад для дальнейшего изучения эволюционной истории подсемейства.

Теоретическая и практическая значимость работы. В работе получены фундаментальные данные, описывающие молекулярные адаптации к подземному образу жизни представителей подсемейства полевочьи. Также впервые дана сравнительная характеристика различий в уровне отбора между филогенетически независимыми подземными видами. Обнаруженные гены с измененным уровнем отбора и параллельными заменами могут служить источником для более детального изучения адаптивной и эволюционной физиологии. Собранные и опубликованные в открытом доступе митохондриальные геномы и транскриптомы будут использованы в работах по филогеографии, филогении и изучении других эволюционных процессов внутри подсемейства Arvicolinae сотрудниками как Зоологического института РАН, так и учебных и научных заведений всего мира. Результаты исследования могут быть использованы в курсах лекций по эволюционной биологии в вузах, школах и секциях дополнительного образования.

Положения, выносимые на защиту.

1. Наблюдается ослабление уровня отбора в большинстве митохондриальных белок-кодирующих генах у подземных форм полевочных.
2. У подземных форм подсемейства полевочьи присутствуют параллельные аминокислотные замены в генах, которые вовлечены в процессы адаптации к низкой концентрации кислорода.
3. Интенсивность уровня отбора на митохондриальные и ядерные гены коррелирует с степенью специализации к подземному образу жизни и не зависит от возраста таксона.
4. Направления адаптивной изменчивости у подземных форм полевочных имеют тот же характер, что и в других древних специализированных подземных грызунов семейств Spalacidae, Ctenomyidae, Bathergidae.

Степень достоверности и апробации результатов. Материалы диссертации представлены на 7 международных конференциях и конгрессах: международных конференциях по вычислительной биологии МССМВ в 2017 и 2019 г. (Москва, Россия); XI международной конференции по биоинформатике и системной биологии BGRS (Новосибирск, 2018); 16 международной конференции Rodens et Spatium (Потсдам, Германия, 2018); VII международном конгрессе общества генетиков и селекционеров ВОГиС (Санкт-Петербург, 2019); 45 конгрессе федерации европейского биохимического сообщества (FEBS) (дистанционно, 2021); XI Съезде Териологического общества при РАН (2022). Материалы также представлены на итоговой отчетной сессии ЗИН РАН в 2020 году, семинарах лаборатории эволюционной геномики факультета биоинформатики и биоинженерии МГУ (Москва, 2018, 2021) и биоинформационном семинаре Университета ИТМО (2022).

Публикации. Основные результаты по теме диссертации изложены в 15 печатных изданиях, из них 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК и 8 — тезисы научных докладов.

Объем и структура работы. Работа состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы. Основная часть работы изложена на 75 страницах, содержит 15 рисунков и 12 таблиц. Список литературы включает 147 наименований, из которых 7 на русском языке и 140 — на английском. Приложения к работе содержат 4 таблицы на 16 страницах.

Благодарности. В первую очередь хочу поблагодарить мою научную руководительницу Наталью Иосифовну Абрамсон за помощь и поддержку при выполнении диссертации, ценные советы и доверие в выборе методик анализа. Отдельную благодарность хотелось бы выразить всему коллективу лаборатории эволюционной геномики и палеогеномики ЗИН РАН за неоценимый вклад в мое зоологическое образование, освоение филогенетических и филогеографических методик: Семену Бодрову, Татьяне Петровой и Евгению Генельт-Яновскому. За помощь в изучении биоинформационных подходов искренне благодарю Институт биоинформатики, а за обсуждение полученных результатов и ценные замечания — А.В. Сморкачеву и сотрудников ИППИ РАН, ФББ

МГУ и ИОГеН РАН: Надежду Потапову, Артема Касьянова, Алексея Пенина, Марию Логачеву, Егора Базыкина и А.С. Кондрашова.

За моральную поддержку во время написания работы хочу поблагодарить в первую очередь своего супруга Станислава Бондарева, а также Евгения Генельт-Яновского, Ольгу Бочкареву, Александру Пантелееву, Анну Гнетневу, Анну Ганюкову, членов моей семьи, друзей и коллектив Института биоинформатики. Отдельную благодарность хочу выразить моей бабушке, Паненковой Галине Ильиничне, которая до конца верила, что у меня все получится.

За помощь в организации рабочего времени выражают огромную благодарность Татьяне Смирновой и Екатерине Копейкиной, без которых получение результатов и написание диссертации заняло бы гораздо больше времени. Отдельную благодарность выражают композиторам компаний CR Project Red, Guerrilla Games и FromSoftware, под произведения которых данная работа была написана.

Работа выполнена в рамках темы государственного задания № АААА–А19–119020790106–0 в лаборатории эволюционной геномики и палеогеномики ЗИН РАН. Исследования поддержаны грантами РФФИ №18-04-00730, №15-04-04602, №18-34-20118 и РНФ № 19-74-20110.

Содержание работы

Глава 1. Обзор литературы.

Глава представлена тремя разделами. Первый раздел посвящен описанию морфо-физиологических изменений у грызунов, которые возникают при переходе к подземному образу жизни. Второй раздел освещает изучение молекулярных адаптаций подземных грызунов и показывает потенциальную возможность адаптивных изменений генов как в митохондриальном, так и в ядерном геномах. Третий раздел посвящен подсемейству Arvicolinae, описанию основных подземных представителей этого подсемейства и обзору изучения молекулярных адаптаций у его представителей.

Глава 2. Материал и методы

Работа включает в себя поиск следов отбора в разном масштабе: в пределах одного митохондриального филогенетического маркера *CYTB*, среди полных митохондриальных геномах и ядерных генах. Количество видов, взятых в анализ на каждом из этапов, отличается из-за доступности материала и количества данных, выложенных в открытый доступ в базе данных GenBank. Все сиквенсы, проанализированные в рамках данной работы, были получены из материала коллекции или из открытой базы данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Ген *CYTB* был выбран как самый распространенный филогенетический маркер и, следовательно, дал возможность взять в анализ большое количество подземных и наземных видов. В каждом случае мы использовали максимально репрезентативную филогенетическую выборку из доступных на момент исследования видов для адекватного таксономического контекста.

Выделение ДНК. Образцы мышечной и кожной ткани хранили в 96% этаноле при -20 °C в коллекции тканей и ДНК лаборатории эволюционной геномики и палеогеномики ЗИН РАН (Английский проспект 32, Санкт-Петербург, Россия).

Для амплификации методом Сенгера геномную ДНК выделяли с использованием стандартного протокола солевой экстракции (**Miller 1999**). Выделение ДНК проводили в специально оборудованной лаборатории эволюционной геномики и палеогеномики ЗИН РАН.

Для получения коротких ридов методом NGS (next generation sequencing) геномную ДНК экстрагировали с помощью Diatom DNA Prep 200 (Isogen, Россия). Ультразвуковая фрагментация проводилась с использованием сфокусированного ультразвукового прибора Covaris S220 (Covaris). Полученную фрагментированную ДНК очищали и концентрировали с использованием парамагнитной химии на основе гранул AMPure XP (Beckman-Coulter), применяя стандартные протоколы. Концентрацию оценивали флуориметром Qubit (Thermo Fisher). Выделение ДНК проводили в центре коллективного пользования в области геномики Сколтеха (<https://www.skoltech.ru/research/en/shared-resources/gcf-2/>).

Выделение РНК. Образцы смешанных тканей для получения транскриптомов хранили в фиксаторе intactRNA (Евроген, Россия) в коллекции тканей и ДНК лаборатории эволюционной геномики и палеогеномики ЗИН РАН.

Выделение РНК производилось с использованием набора RNeasy mini kit (Qiagen) по протоколу для выделения из клеток животных (animal cells/spin) со следующими модификациями: 1) на шаге 4 добавляли 0.5 объема 96 % EtOH; 2) после добавления спирта помещали пробирку в термостат на 37 °C на 2 минуты; 3) элюция проводилась 30 мкл RNase-free water. Гомогенизацию проводили растиранием пестиком в ступке с жидким азотом. Целостность РНК (RIN) определяли с помощью капиллярного электрофореза на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent). Для дальнейшей работы использовали образцы с RIN не менее 7. Выделение РНК проводили в центре коллективного пользования в области геномики Сколтеха (<https://www.skoltech.ru/research/en/shared-resources/gcf-2/>).

Амплификация отдельных генов. В первой части работы для лучшего разрешения филогенетического дерева Arvicolinae, необходимого для анализа изменчивости гена *CYTB*, наряду с самим геном были использованы и семь ядерных: ген рака груди 1 (*BRCA1*), экзон 11; ген рецептора гормона роста (*GHR*), экзон 10; фрагмент гена лецитин-холестерин-ацилтрансферазы (*LCAT*), экзоны 2-5 и интроны 2-4; ген белка-супрессора опухолей (*PT53*), экзоны 5-7 и интроны 5-6; ген интерфоторецепторного ретиноид-связывающего белка (*IRBP*); ген фактора фон Виллебранда (*vWF*), экзон 28; и ген кислой фосфатазы типа V (*Acp5*), экзоны 2 и 3. Условия амплификации использовали без изменений согласно опубликованным в источниках (Lebedev2007; Ohdachi2001; Bannikova2013; Abramson2009; Petrova2016; Pouix2006). ПЦР-очистку проводили с использованием набора Omnis («Омникс», Россия). ПЦР-продукты секвенировали в обоих направлениях с использованием ABI BigDye версии 3.1. на автоматическом капиллярном секвенаторе Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) в компании Евроген (<https://evrogen.ru/>).

Получение ридов для сборки митохондриальных геномов. При подготовке библиотек ДНК для NGS секвенирования был использован набор NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs). Приготовление библиотек производилось по протоколу со следующими изменениями: 1) очистка на магнитных частицах после лигирования проводилась по пункту 3В (without size selection) в соотношении объем образца к объему магнитных частиц – 1:0,9; 2) число циклов в ПЦР – 10. Полученные в результате ПЦР продукты были очищены и концентрированы при помощи магнитных частиц в соотношении объем образца к объему магнитных частиц – 1:0,9. Элюция проводилась в 20 мкл бидистиллированной воды. Концентрация образцов измерялась на флуориметре Qubit. Проверка качества полученных библиотек проводилась при помощи Bioanalyzer 2100 Agilent с помощью набора DNA High Sensitivity kit.

Секвенирование проводили на приборе HiSeq4000 (Illumina) со следующими параметрами: длина чтения 75, парные чтения. Демультиплексирование и перевод данных в формат fastq проводили с помощью программы bcl2fastq2. Секвенирование проводили в центре коллективного пользования в области геномики Сколтеха (<https://www.skoltech.ru/research/en/shared-resources/gcf-2/>).

Получение ридов для сборки транскриптомов. Для выделения полиА-РНК из общей фракции РНК и дальнейшей подготовки ДНК-библиотек использовался совмещенный протокол наборов NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module и NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (<https://international.neb.com/protocols/>). Подготовка проводилась со следующими модификациями: 1) фрагментация образцов проводилась на 94°C 10 минут; 2) синтез первой цепи проводился, используя программу со следующими параметрами: 25°C – 10 минут, 42°C – 30 минут, 70°C – 15 минут; 3) очистка и концентрирование ДНК проводилось по протоколу при помощи магнитных частиц Ampure XP. Элюция проводилась бидистиллированной водой; 4) число циклов в ПЦР – 10 или 15, в зависимости от исходной концентрации РНК. Концентрация образцов измерялась на флуориметре Qubit. Проверка качества полученных библиотек проводилась при помощи Bioanalyzer 2100 Agilent с помощью набора DNA High Sensitivity kit.

Секвенирование проводили на приборе HiSeq4000 (Illumina) со следующими параметрами: длина чтения 75, парные чтения. Демультиплексирование и перевод данных в формат fastq проводили с помощью программы bcl2fastq2. Секвенирование проводили в центре коллективного пользования в области геномики Сколтеха (<https://www.skoltech.ru/research/en/shared-resources/gcf-2/>).

Сборка и аннотация митохондриальных геномов и транскриптомов. Качество сырых чтений оценивалось с помощью FastQC (**Andrews2010**). Очистка от адаптеров или фрагментов с низким качеством проводилось с помощью программы Trimmomatic (**Bolger2014**). В работу брали только риды качеством выше 28-29.

Поскольку выделение митохондриальной ДНК *Hyperacrius fertilis* True, 1894 производилось из коллекционных образцов прошлого века, это могло сказать на качестве отсеквенированных последовательностей. Для оценки качества ридов для этого вида дополнительно использовали программу tarDamage 2.0 (**Jonsson2013**), отображающую паттерны неправильного включения нуклеотидов и процессов деазминирования.

Сборка *de novo* митохондриальных геномов осуществлялась программой plasmid SPAdes (**Bankovich2012**) с настройками по умолчанию. Полученные контиги были отфильтрованы по длине. Для дальнейшей аннотации отбирали контиг с наибольшим сходством размера с митохондриальной ДНК для млекопитающих (примерно 16 т.п.н.). Контиги аннотировали в веб-сервере MITOS (**Bernt2013**) с настройками по умолчанию и с учетом митохондриального генетического кода позвоночных. Границы генов были проверены и уточнены при сравнении с 21 опубликованной последовательностью митогенома Arvicolinae. Все позиции с низким качеством и покрытием, а также фрагменты, сильно отличающиеся от ранее опубликованных митохондриальных геномов Arvicolinae, были заменены на N вручную. Последовательности белок-кодирующих генов проверяли на содержание преждевременных стоп-кодонов вручную.

Транскриптомы собирали пакетом Trinity (**Grabherr2011**) с настройками по умолчанию. Поиск кодирующих участков собранных транскриптов проводили программой

Transdecoder (<https://github.com/TransDecoder/>). Полученные последовательности очищали от химерных генов программой DIAMOND (**Buchfink2015**), беря для сравнения белковую базу NCBI (nr). Ортологичные гены определяли с помощью Proteinortho (**Lechner2011**). Полученные ортологи фильтровали в среде R 3.4.4 (**RCoreTeam2017**), оставляя только те гены, которые встречаются в одной копии у всех взятых в анализ видов.

Оценка нуклеотидного состава митохондриальных геномов. Базовый нуклеотидный состав (процентное содержание каждого из нуклеотидов) рассчитывали в Geneious Prime 2019.1 (<https://www.geneious.com>). Смещение в нуклеотидном составе (GC-skew) оценивали как $CG_{skew} = \frac{C-G}{C+G}$ (**Arabi2010; Hassanin2005**) с помощью пакета BioSeqUtils в BioPython (**Cock2009**) в Python 3.

Выравнивание. Последовательности гена *CYTB* и полных митохондриальных геномов были выравнены с помощью программы Mauve 1.1.1 (**Darling2004**), реализованной как плагин Geneious Prime 2019.1 (<https://www.geneious.com>). Конкатенированная последовательность 13 белок-кодирующих митохондриальных генов была отдельно выравнена с использованием MAFFT 7.222 (**Katoh2014**). Ядерные ортологичные гены по отдельности были выравнены программой prank (<http://wasabiapp.org/software/prank/>) с учетом триплетности кодирующей последовательности. Общие для всех фрагменты выравнивания редактировали вручную. Выравнивания конкатенировали в единую последовательность скриптом на языке программирования Python 3.

Филогенетическая реконструкция. Для анализа изменчивости *CYTB* было построено филогенетическое дерево на основе конкатенированных гена *CYTB* и семи ядерных генов (*BRCA1, GHR, LCAT, PT53, IRBP, vWF, Acp5*). Наилучшее соответствие моделей замены для каждого гена оценивали с помощью Treefinder (**Jobb2004**) в соответствии со скорректированным информационным критерием Акаике (AICc). Байесовский анализ на основе конкатенированного выравнивания был проведен в MrBayes 3.2.6 (**Ronquist2012**). Для оценки отбора на митохондриальные гены была создана филогенетическая реконструкция, включавшая 57 видов подсемейства полевочных и 6 видов в качестве внешней группы. Реконструкция проводилась в программе MrBayes 3.2.2, используя 13 белок-кодирующих генов (11 417 п.н.). Были заданы следующие параметры анализа: nst=mixed и гамма-распределение скоростей замен между сайтами, использовалось деление на партиции по генам.

Каждый анализ начинался со случайных деревьев, и два независимых прогона с 4 Марковскими цепями Монте-Карло (МСМС) выполнялись для 5 миллионов поколений, с выборкой каждого 1000-го поколения. Стандартные отклонения разделенных частот были ниже 0.01, потенциальные коэффициенты уменьшения масштаба были равны 1.0, а сходимость оценивали с помощью статистики ESS в Tracer v1.6 (**Rambaut2014**). Консенсусное дерево было построено на основе деревьев, отобранных после 25% отжига. Дерево визуализировали в программе FigTree v1.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Конкатенированное выравнивание ядерных ортологичных генов было очищено от неинформативных сайтов программой Gblocks (**Castresana2000**). Деревья построены

по полному и очищенному выравниванию в программе RAxML (**Stamatakis2014**) с 500 репликами бутстрепа и конкатенированием методом Majority Rule .

Оценка аминокислотных замен и их распределения. Достоверные физико-химические аминокислотные изменения между остатками в белке *Cytb* были обнаружены с использованием модифицированной модели MM01, реализованной в TreeSAAP v3.2 (**Woolley2003**). Восемь категорий (1–8) использовались для представления величины радикальных замен, из которых категории от 6 до 8 указывают на наиболее радикальные замены (**McClellan2001**). Достоверные значения (категории 6–8, $P < 0,001$) были приняты как признак сильного изменения функции белка.

Распределение синонимичных и несинонимичных замен было рассчитано между подземными и наземными видами на каждом участке гена *CYTb* отдельно и объединены по координатам доменов. Достоверность частоты замен оценивали с помощью точного критерия Фишера и поправки на множественное сравнение методом Холма. Все расчеты проводились в статистической среде R. Координаты доменов были получены на сайте UniProt по координатам *CYTb Mus musculus Linnaeus, 1758*: <https://www.uniprot.org/uniprot/P00158>. Частоты использования аминокислот для каждой позиции гена *CYTb* определяли с использованием всех последовательностей для выбранных видов, чтобы учесть внутривидовые вариации. Этот набор данных включал все имеющиеся в базе данных GenBank по всем взятым в анализ видам на август 2020 года. Аминокислотные паттерны были рассчитаны с использованием скрипта на Python 3. Тест Фишера для сравнения частот проводили с учетом неравных размеров выборки, поправку на множественное сравнение проводили методом Холма в статистической среде R.

Оценку замен в митохондриальных геномах и транскриптомах проводили программой ProtParCon (github.com/iBiology/ProtParCon) с дальнейшим поиском аминокислот, характерных только для подземных грызунов. Поиск осуществлялся с помощью рукописного скрипта на языке программирования Python 3. Оценку достоверности обнаруженных замен делали функцией ProtParCon с дальнейшей поправкой Холма на множественное сравнение вручную в статистической среде R.

Оценка уровня и направления отбора. Количество несинонимичных (dN) и синонимичных (dS) замен, а также ω (их соотношение) были рассчитаны несколькими способами. В каждом случае уровень и направление отбора были оценены независимо для подземного вида (или рода) и его филогенетически близких наземных видов (рис. 1). Оценку проводили:

- С использованием codeml, реализованного в ete-toolkit (**Huerta-Cepas2016**). Для каждого подземного вида было проведено несколько анализов: с использованием модели со свободными ветвями (b_free , где ω_{frg} и ω_{bkg} свободны), нейтральной модели (b_neut , где ω_{frg} фиксированно равно единице) и модели M0, где все ветви изменяются с одинаковой скоростью. Значения 999 и 0,001 были расценены как ошибки. Для сравнения различных моделей рассчитаны likelihood-ratio test (LRT). Сравнение

моделей b_free и M0 показывает, отличаются ли по уровню замен выделенные ветви (подземные полевочки) от остальной части дерева (наземные полевочки).

- Программой RELAX. Эта система проверки гипотез анализирует, ослаблен или усилен отбор на выделенных ветвях. Достоверное значение $K > 1$ указывает на то, что уровень отбора увеличен, в то время как $K < 1$ – что наблюдается ослабление (**Wertheim2015**).
- Алгоритмом aBSREL, который позволяет определить оптимальное число ω и выявить отдельные ветви, которые находятся под отбором (**Smith2015**).

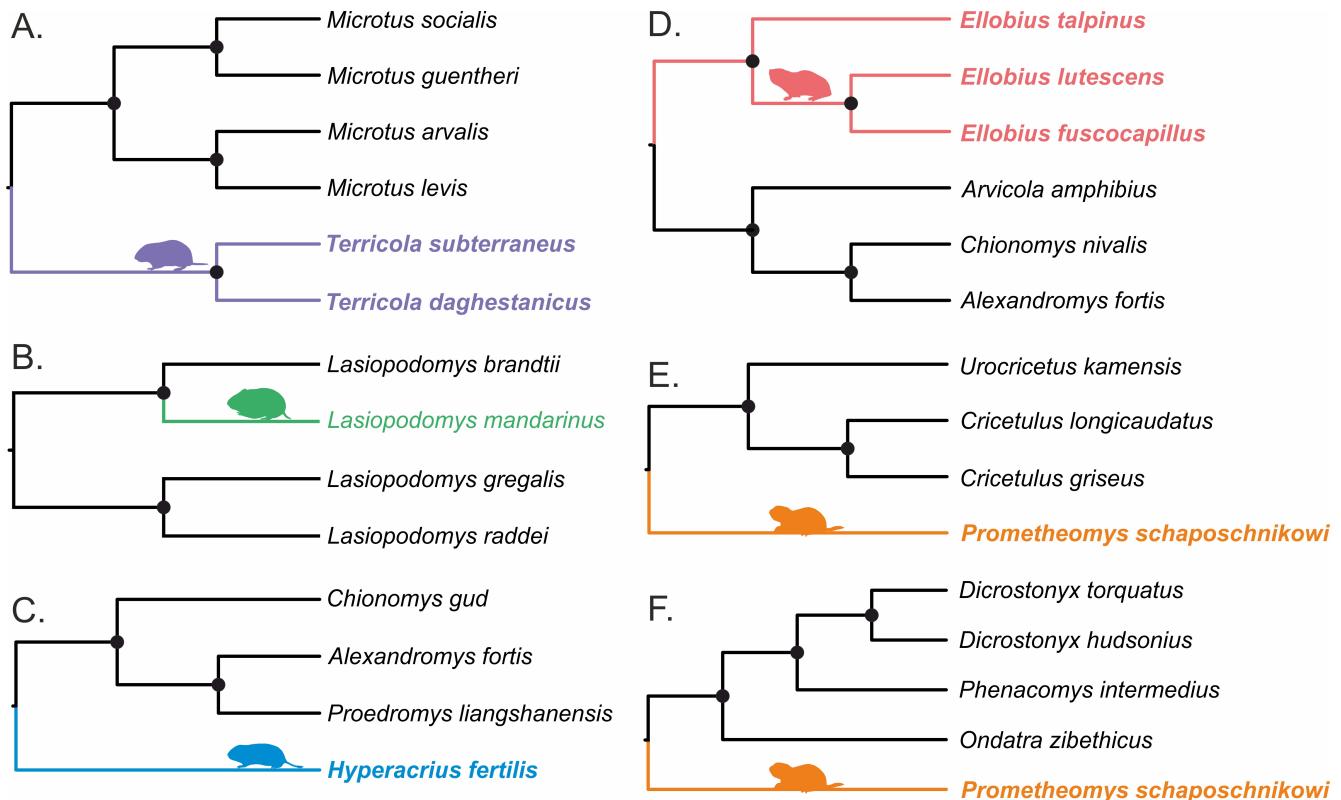


Рис. 1. Филогенетические деревья, использованные для оценки отбора отдельных таксонов. Подземные виды обозначены цветом.

Моделирование и визуализация третичной структуры белка *cytb*.

Моделирование основано на гомологии структуры *Lemmus sibiricus* Kerr, 1792 и *Ellobius lutescens* Thomas, 1897. За основу брали модель кристаллической структуры *Bos taurus* Linnaeus, 1758 с разрешением 2,4 Å (1NTM (**Gao2003**)). Программа modeller 9.22 (**Webb2016**) использовалась для создания структур комплекса протоколом автомоделирования с настройками по умолчанию. Замены были проанализированы визуально в PyMOL v.2.0 (Schrödinger, LLC). Трансмембранные участки комплекса оценивали с помощью веб-сервера OPM (**Lomize2012**).

Предсказание сайтов фосфорилирования. NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) (**Blom2004**) и GPS 5.0 (<http://gps.biocuckoo.cn/online.php>) (**Xue2011**) были использованы для предсказания изменения статуса фосфорилирования замен в гене *CYTB*.

Глава 3. Характеристика собранных митохондриальных геномов и транскриптомов

Всего в лаборатории эволюционной геномики и палеогеномики ЗИН РАН было собрано 34 новых митохондриальных генома представителей Arvicolinae. Анализ повреждений ДНК с помощью mapDamage для древнего образца *Hyperacrius fertilis* показал низкое значение дезаминирования (рис. 2). Неправильное включение от С до Т (красный) варьировалось от 12.09 % до 17.94 %, от G до A (синий) – от 12.84 % до 17.49 %. Уровни ошибочного включения сравнимы со всеми другими вариантами замен, окрашенными в серый цвет, а также аналогичными значениями из статей (Molto 2017). Нами не было обнаружено каких-либо структурных изменений в порядке митохондриальных генов или их количестве, которые отличали бы подземных грызунов от наземных сестринских видов. Результаты сравнения базовых нуклеотидных составов показали увеличение среднего значения % GC и уменьшение GC-skew у подземных полевочных, но разница в обоих случаях оказалась недостоверная.

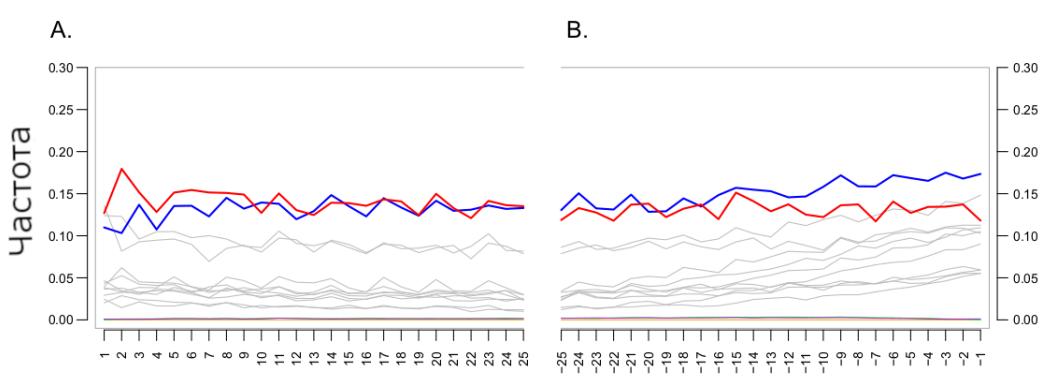


Рис. 2. Дезаминирование нуклеотидов на 5' (А) и 3' конце (Б), рассчитанные с использованием MapDamage. Все варианты замен отмечены серым, кроме замены гуанина на аденин (G>A, голубой цвет) и цитозина на тимин (С>Т, красный цвет)

В ходе работы нами собрано 17 транскриптомов: сырые риды для 10 видов были полученных нами лично в рамках проекта РНФ и 7 взяты из открытой базы данных SRA, также мы использовали уже собранные транскриптомы для *Microtus ochrogaster* Wagner, 1842 и *Cricetulus griseus* Milne-Edwards, 1867. Статистика собранных транскриптомов показала, что все из них можно использовать в дальнейшем анализе. В них мы нашли 112 универсальных однокопийных ортологов.

Глава 4. Оценка уровня и направления отбора

Ген CYTB. На первом этапе мы использовали 62 последовательности гена *CYTB* представителей всех основных родов и триб Arvicolinae. Среди них были почти все филогенетически неродственные виды, перешедшие к существованию в подземной среде: представители рода *Ellobius* Fischer, 1814, *Prometheomys schaposchnikowi* Satunin, 1901, *Lasiodipodomys mandarinus*, *Terricola subterraneus* de Selys-Longchamps, 1836 и *Mystromys pinetorum* Le Conte, 1830. Сравнение проводилось с наземными видами из 22 родов. Оценка значений ω (отношение dN/dS) у взятых в анализ видов показала общую

тенденцию к ослаблению уровня отбора у подземных грызунов при сравнении их с филогенетически близкими наземными видами. Достоверные различия в значениях ω получены с использованием программы codeml для видов рода *Ellobius*, *L. mandarinus* и *T. subterraneus*. Почти у всех подземных видов наблюдаются более высокие значения ω по сравнению наземными, за исключением *T. subterraneus*. Эта разница варьирует от одного (для *Microtus pinetorum*) до пяти раз для *Lasiopodomys mandarinus*. Тесты сравнения с нейтральной моделью (*b_neut*) показали, что нуклеотидные последовательности гена *CYT B* эволюционно не нейтральны у всех подземных грызунов.

Анализ отбора алгоритмом aBSREL не показал свидетельств эпизодического отбора в анализируемой филогении. Результаты программы RELAX подтвердили изменения в уровне естественного отбора у подземных грызунов. Так, коэффициент отбора K для трех подземных представителей (*Ellobius sp.*, *L. mandarinus* и *P. schaposchnikowi*) показал значения < 1 , что может указывать на процесс ослабления отбора.

Анализ распределения несинонимичных замен по сайтам показал три позиции с достоверно более высокими значениями частот замен у подземных видов: 4, 237 и 241. Кроме того, в позиции 236 достоверно повышена частота синонимичных замен. Сравнение распределение замен по целым доменам (рис. 3) выявило достоверные различия в мембранных доменах 1, 2, 5 и 9 и трансмембранных доменах 5 и 7 для несинонимичных замен; мембранном домене 6 и трансмембранный домен 5 для синонимичных замен.

Митохондриальные белок-кодирующие гены. Доля несинонимичных замен в митохондриальных геномах подземных грызунов оказалось почти в два выше, чем у наземных. Отдельно в каждом гене эта тенденция повторяется с достоверной разницей.

При анализе программой codeml у представителей рода *Ellobius* разница в уровне отбора наблюдается во всех митохондриальных генах, кроме *ND2,3,5,6* и *COX3* при сравнении с наземными сестринскими видами. Несколько генов с достоверно отличающимся уровнем обнаружено также у *L. mandarinus*: *COX3* и *CYT B*. Один ген найден для *P. schaposchnikowi* – *COX3*. У оставшихся представителей подземных грызунов не обнаружено генов с достоверным отличием от наземных видов. Хотя значения ω существенно различались в зависимости от генов и анализируемых видов, они не превышали единицы. Однако, все достоверно различающиеся значения ω были выше для подземных видов, чем для наземных. Используя алгоритм aBSREL мы обнаружили следы эпизодического положительного отбора в гене *COX2* для *E. lutescens* и в двух генах *P. schaposchnikowi*: *ATP8* при сравнении с видами Arvicolinae и *ND5* при сравнении с хомяками.

Анализ RELAX подтвердил изменения в уровне отбора подземных грызунов по сравнению с наземными. Семь генов для *Ellobius* оказалось с K-значениями < 1 : *ATP6*, *COX1*, *COX3*, *CYT B*, *ND1*, *ND2* и *ND4* и столько же для *P. schaposchnikowi* при сравнении с «первой радиацией» Arvicolinae: *COX1*, *COX3*, *ND2*, *ND4* и *ND5*. Ген *COX3* *P. schaposchnikowi* также достоверно отличается от видов рода *Cricetulus*. Список генов *L. mandarinus* с достоверными различиями включает всего три: *COX1*, *COX3*

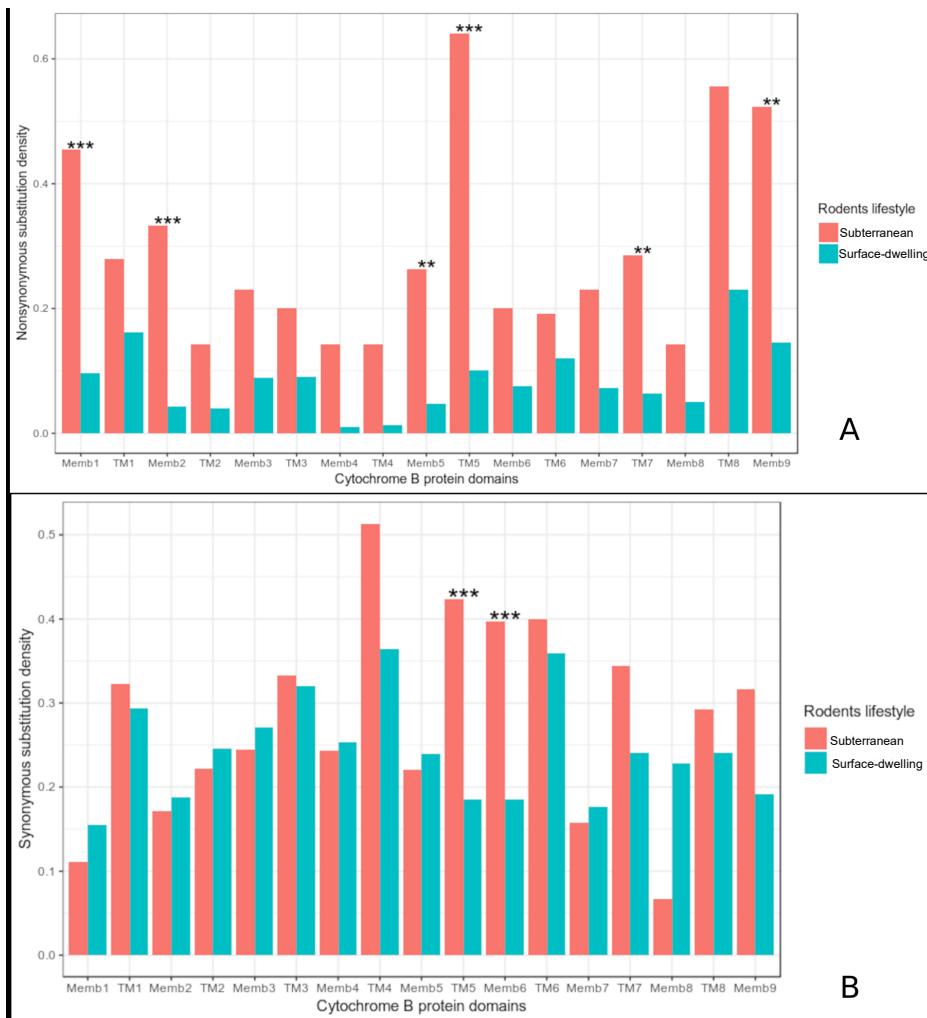


Рис. 3. Частоты распределения несинонимичных (А) и синонимичных (В) замен по доменам гена *CYTB* у подземных и наземных грызунов. Достоверные различия между частотами обозначены звездочками (*): * – p.value < 0.05, ** – p.value < 0.01, *** – p.value < 0.001

и *CYTB*. У оставшихся подземных грызунов: *H.fertilis* и двух видов рода *Terricola* гены с достоверным ослаблением или усилением отбора не обнаружены.

Многие гены с измененным уровнем отбора выявлены у нескольких подземных полевоцых одновременно. Так, для генов *COX3* и *COX1* наблюдается ослабление отбора у видов рода *Ellobius*, *P. schaposchnikowi* и *L. mandarinus*. Некоторые гены были обнаружены при анализе дважды для видов *Ellobius* и *P. schaposchnikowi* (например, *ND2* и *ND4*) или представителей *Ellobius* и *L. mandarinus* (*CYTB*).

Ядерные белок-кодирующие гены. Сравнение частот несинонимичны замен между подземными и наземными видами не показало достоверных различий. Также нами не было обнаружено отдельных генов или позиций, в которых частоты будут достоверно различаться. Мы провели поиск следов отбора в найденных нами ортологичных генах независимо для каждой линии подземных грызунов, однако, генов с достоверными отличиями обнаружено не было.

Глава 5. Поиск параллельных аминокислотных замен и изучение их влияния на структуру белка

Мы нашли три замены в гене *CYTB*: Ser57Pro, Asp214Asn и Ile338Val (рис. 4). Замена Asp214Asn была обнаружена также и у специализированных подземных грызунов из других семейств.

Замена серина на пролин в остатке 57 у подземных грызунов потенциально удаляет сайт фосфорилирования. Сервер NetPhos 3.1 предсказал фосфорилирование киназой *CDC2* с оценкой 0,518. GPS 5.0 выявил киназы *AGC*, *PKN* и *PKN1* с оценкой 65,363. Предсказания типа киназы не согласуются друг с другом, однако все прогнозы указывают на высокую вероятность фосфорилирования этого сайта. Те же методы не предсказывали фосфорилирование для Asp214Asn, и, насколько нам известно, ни Ile, ни Val в позиции 338 не могут быть фосфорилированы.

Нуклеотидная замена в кодоне 338 (ATT > GTT), приводящая к замене Ile338Val, был обнаружена как вероятный патоген в базе данных ClinVar и связана с раковыми процессами: www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/143898/.

Согласно третичной структуре белка цитохрома (рис. 5 А), Ser57 обращен к межмембранныму пространству митохондрий. Он расположен на неструктурированном сегменте петли, охватывающем остатки 54–60. Эта петля контактирует с той же петлей на втором мономере цитохрома *bc1* в комплексе (рис. 5 В). В отличие от Ser57Pro, замещение Asp214Asn находится на петле, обращенной к матрице митохондрии. Он контактирует с N-концом субъединицы VII комплекса убихинол-цитохром с редуктазы III (UQCRQ) (рис. 5 С). Замена Ile338Val находится на границе раздела α -спиралей в трансмембранный области комплекса (рис. 5 Д). Смоделированная структура показывает, что эта замена благоприятствует другому ротамеру Ile350, который соседствует с остатком 58 UQCRQ.

При анализе белок-кодирующих митохондриальных генов были выявлены параллельные замены *COX1* Met73Ile, *COX3* Ile121Val, *ND5* Phe446Leu, *CYTB* Thr56Ser, *CYTB* Ile338Val, *CYTB* Ala357Thr. При дальнейшей статистической проверке все обнаруженные замены оказались недостоверными.

Нами были обнаружены достоверные замены в ядерных генах *Rad23b* – Thr121Ala и *Pycr2* – Ala314Thr.

Глава 6. Обсуждение результатов

В нашей работе получены данные по изменению уровня отбора в митохондриальных генах подземных грызунов, а также обнаружены параллельные замены в ядерных генах. Помимо этого, мы сравнивали базовые характеристики митохондриальных геномов: GC-состав, его смещение, количество и порядок генов.

Изменение нуклеотинового состава митохондриальных геномов

Оценка GC-состава показывает повышение количества этих нуклеотидов у подземных грызунов. Уровень смещения (GC-skew) у подземных грызунов сильнее, чем у наземных грызунов. Несмотря на то, что разница в обоих случаях недостоверна,

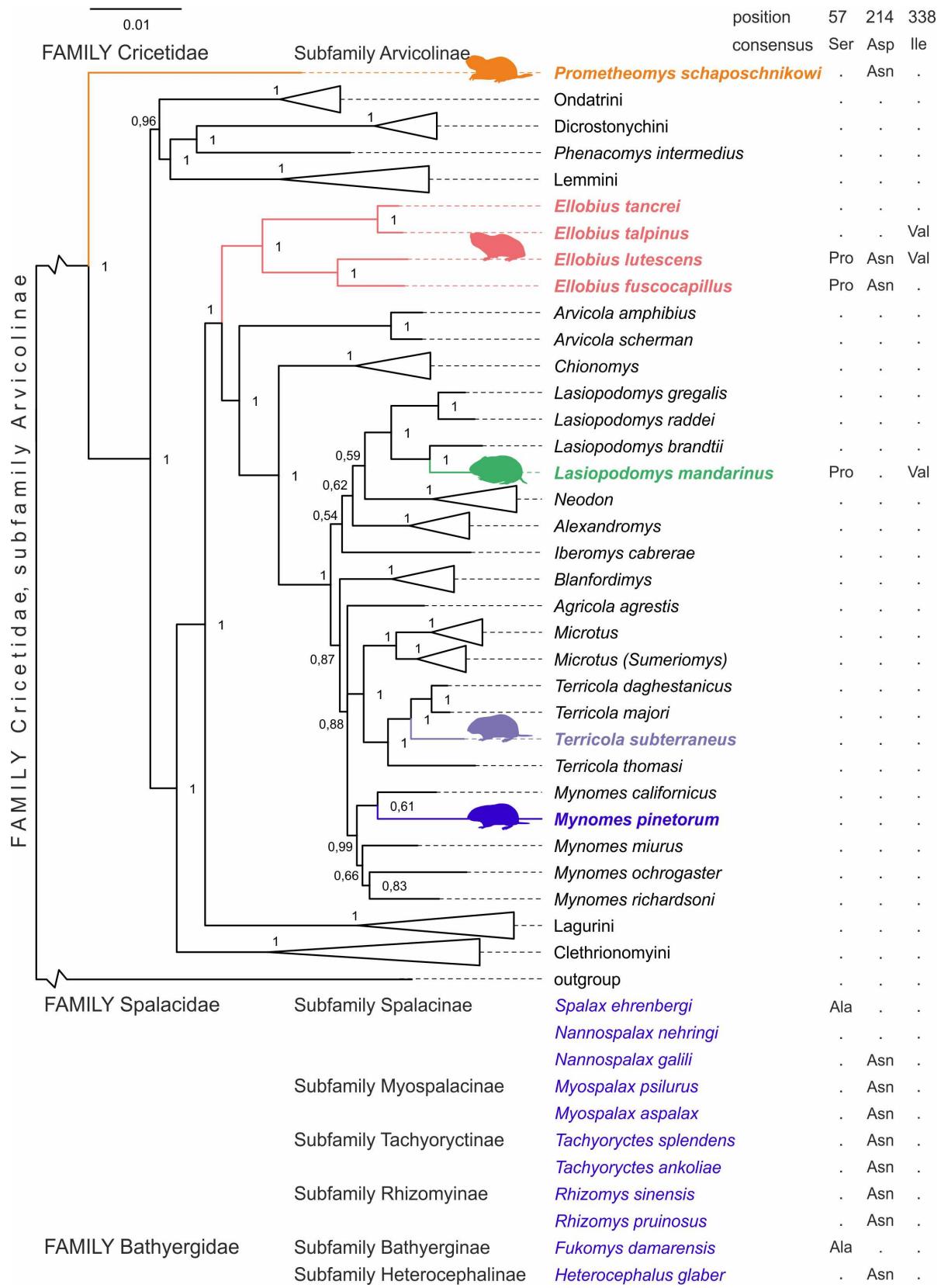


Рис. 4. Филогенетическое дерево взятых в анализ видов. Указаны аминокислотные замены, характерные для подземных видов в гене *CYTB*. Подземные виды отмечены цветом.

ЭТО может указывать на адаптивные следы в митохондриальном геноме. Генный состав митохондрий среди всех изученных видов остается стабильным и неизменным. Переход

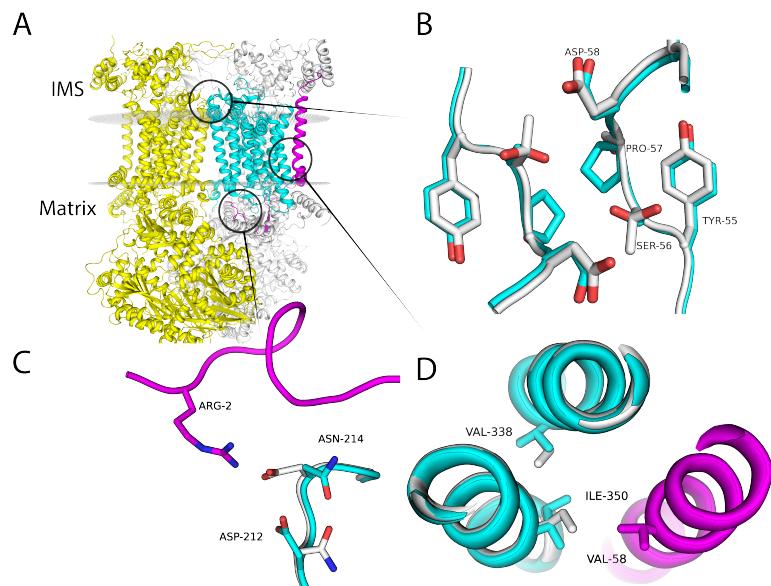


Рис. 5. Структурная модель замен в комплексе цитохрома *bc1*. **A.** Обзор гомодимера цитохрома *bc1*. Цитохром Б — голубой, UQCRRQ - пурпурный. Второй мономер окрашен в желтый цвет. Места замены выделены кружками. IMS — межмембранные пространство. **B.** Увеличенные структуры *E. lutescens* и *L. sibiricus*, показывающие замену Ser57Pro. Модель *E. lutescens* голубая, *L. sibiricus* — белая. **C.** Замена Asp214Asn и его взаимодействие с N-концом UQCRRQ (пурпурный) **D.** Замена Ile338Val и соседняя цепочка UQCRRQ (пурпурный)

к подземному образу жизни не повлек за собой изменение в порядке генов или удвоению каких-то конкретных блоков.

Ослабление уровня отбора

Исторически, изучение адаптивности митохондриальных генов началось с гена *CYTB*. Начатые с трудов Andrews (Andrews1998), и в последующем повторенные целым рядом исследователей (Tomasco2014; DaSilva2009; DiRocco2006; Shao2015), работы свидетельствовали о наличии признаков положительного отбора при эволюции гена *CYTB*. Дальнейшие исследования показали, что, несмотря на сильные функциональные ограничения, митохондриальная ДНК в целом может подвергаться положительному направленному отбору, например, в случаях, когда требуется энергоемкий образ жизни и/или есть ограничения в доступности кислорода (Tomasco2011; Shen2010; Blier2001).

Da Silva с коллегами (DaSilva2009) обнаружили достоверную разницу в соотношении dN/dS в независимых линиях подземных грызунов по сравнению с их наземными сестринскими видами. Это предполагает связь между эволюцией гена *CYTB* и колонизация гипоксической среды. Позднее это наблюдение было подтверждено для всех митохондриальных белок-кодирующих генов *Octodontidae* (Tomasco2011).

В нашем исследовании гена *CYTB* мы также обнаружили ослабление отбора у некоторых подземных грызунов. Применяя стандартные подходы, мы показали, что

в последовательности гена *CYTB* повышен соотношение между несионимичными и синонимичными заменами (ω) у подземных грызунов по сравнению с наземными и восемь белковых доменов обладают повышенной частотой замен у подземных видов, тоже наблюдается в нескольких нуклеотидных позициях. Эти результаты согласуются с гипотезой о том, что колонизация подземной ниши способствует положительному отбору в генах митохондриальной ДНК.

Признаки усиления положительного отбора были выявлены как при сравнении четырех видов *Ellobius* с *Arvicola* Lacepede, 1799, *Eothenomys* Miller, 1896 и *Chionomys* Miller, 1908, так и у *L. mandarinus* при сравнении с другими видами *Lasiopodomys* и *Neodon* Horsfield, 1841. Мы обнаружили достоверную разницу в значениях ω , анализируя *T. subterraneus* с другими видами *Terricola* и *Microtus* Schrank, 1798, но в этом случае соотношение dN/dS , наоборот, было меньше для *T. subterraneus*. Данные анализа RELAX согласуются с результатами codeml и показывают, что ген *CYTB* у подземных грызунов подвержен ослаблению уровня отбора.

Независимые исследования различных подземных грызунов показали адаптации в митохондриальных генах. Da Silva с коллегами (**DaSilva2009**) обнаружили достоверную разницу в значениях ω в последовательностях *CYTB* независимых линий подземных грызунов (*Ctenomys* Blainville, 1826, *Spalacopus* Wagler, 1832, семейства Geomyidae и Bathyergidae) по сравнению с их наземными близкородственными видами (**Tomasco2014**). Результаты Zhang предполагали, что эволюция гена *CYTB* цокора *Eospalax canus* G. M. Allen, 1938 также может определяться изменением уровня отбора. Более того, распределение несионимичных мутаций указывало на значительные изменения в последовательности *CYTB* у животных, которые столкнулись с более тяжелой гипоксией из-за большей высоты и более холодного и сухого климата, чем другие митохондриальные линии (**Zhang2013a**). Наконец, Tomasco и Lessa (**Tomasco2011**) обнаружили повышенные значения ω в гене *COX2* подземных восьмизубов (почти в 30x) и туко-туко (в 11x) по сравнению с наземными родственными видами.

Позже указанные наблюдения были подтверждены для всех митохондриальных белок-кодирующих генов. Подземные виды южноамериканских туко-туко (*Ctenomys*) и родственные восьмизубы (*Spalacopus*) в работе Tomasco и Lessa (**Tomasco2011**) показали достоверно более высокие значения ω по сравнению наземными видами в 11 из 13 митохондриальных генов. Конвергентные изменения были также обнаружены между изученными подземными видами и другими млекопитающими, адаптированными к гипоксии. Tavares и коллеги выявили достоверное ослабление отбора в большинстве митохондриальных генов подземных африканских землекопов, туко-туко и восьмизубов (**Tavares2018**).

Результаты, полученные нами при исследовании всех белок-кодирующих митохондриальных генов, говорят о вовлеченности всего митохондриального генома в адаптивный процесс. Метод оценки отбора по отдельным ветвям (branch model codeml) показал повышение уровня отбора у подземных грызунов. Однако, мы наблюдаем различие в количестве генов с достоверным отличием у разных видов. Больше всего различий обнаружено у представи-

телей рода *Ellobius*: разница в отборе наблюдается во всех митохондриальных генах, кроме *ND2,3,5,6* и *COX3*. Два гена под отбором обнаружено у *L. mandarinus*: *COX3* и *CYTB* и один ген у *Prometheomys* – *COX3*. Так, у представителей рода *Ellobius* ослабление отбора наблюдается в 8 генах, у *Prometheomys* – в пяти (при сравнении с первой радиацией) и одном при сравнении с хомяками. Для *L. mandarinus* разница обнаружена в трех генах.

Проводя поиск следов изменения отбора в генах подземных Arvicolinae мы обнаружили гены, которые показывают достоверные различия для более чем одного проанализированного подземного вида и гены, обнаруженные в более чем в одном анализе. Так, гены *CYTB* и *COX3* продемонстрировали более высокие значения ω одновременно у видов *P. schaposchnikowi* и *L. mandarinus* (*COX3*) и *L. mandarinus* и *Ellobius* (*CYTB*) при оценке уровня отбора методом codeml. Гены *COX3*, *COX1*, *ND2* и *ND4* демонстрируют ослабление отбора согласно программе RELAX по крайней мере для двух видов. Гены *COX1* и *COX3* были обнаружены как наиболее изменчивые при сравнении результатов нескольких программ.

Набор генов с разницей в уровне отбора у подземных и наземных грызунов частично коррелирует со скоростью их эволюции. Скорости изменчивости среди семейств митохондриальных генов распределяются следующим образом: *ATP*>*ND*>*CYTB*>*COX* согласно Lopez (**Lopez1997**). По нашим результатам, оба гена *ATP* показывают достоверную разницу в уровне отбора для представителей рода *Ellobius* по сравнению с наземными видами. Кроме того, они выявляются в других анализах: RELAX (*ATP6* для рода *Ellobius*) и aBSREL (*ATP8* для *P. schaposchnikowi*). Гены семейства *ND* показывают неоднородность в результатах. Среди всех генов этого семейства для генов *ND2*, *ND4* и *ND5* обнаружены достоверные различия для трех из пяти проанализированных подземных видов. Ген *CYTB* показывает достоверную разницу в уровне ω между подземными и наземными видами и подтверждает ослабление отбора для видов *Ellobius* и *L. mandarinus*. Эти результаты повторяют полученные при анализе отдельно гена *CYTB* (**Bondareva2021**). Неожиданный результат получен для генов семейства *COX*: несмотря на свой консерватизм, они показывают достоверные изменения в уровне отбора во всех анализах на том же уровне, что и более вариабельные гены *ND*.

С одной стороны, наши данные согласуются с опубликованным ранее работами и показывают, что митохондриальный геном подземных полевочных потенциально вовлечен в процесс адаптации к подземному образу жизни. Но с другой, мы видим различие в уровне отбора между разными видами. Потенциально, это может быть связано с уровнем специализации к подземному образу жизни и его стилем.

К сожалению, обнаруженная на митохондриальных геномах тенденция к ослаблению отбора не подтвердилась на ядерных данных, и нам не удалось найти гены, уровень отбора в которых достоверно бы различался у подземных и наземных грызунов. Это может быть связано как с более медленными темпами эволюции (**Lin2004**) по сравнению с митохондриальными генами, так и с недостаточным количеством генов, взятых в анализ. В работе Kalina Davies (**Davies2018**), например, по исследованию адаптаций подземных

млекопитающих только в 10% от всех проанализированных генов (которых было около 8 тыс) обнаружена достоверная разница в отборе между подземными и наземными видами.

Возникновение параллельных аминокислотных замен

Поиск параллельных замен показал себя как действенный способ обнаружить гены, которые могут быть вовлечены в адаптивные процессы и при этом не меняют уровень или направление отбора (**Davies2018, Zhou2015, Sackman2017**).

При анализе отдельно гена *CYTB* нами было обнаружено три замены, характерные для подземных грызунов: Ser57Pro, Asp214Asn, и Ile338Val. Замены в сайте 57 также обнаружены у африканских слепышей (семейство Bathyergidae) и в 214 – у африканских слепышей и тuco-tuco (род *Ctenomys*). Аналогичные замены в сайте 214 были обнаружены у высокогорных подземных цокоров *Eospalax fontanieri* (**Cooper1993**).

Выполняя изначальный поиск на одиночных последовательностях (т.е. имея только одну для одного вида), у нас была возможность проверить найденные замены на популяционном уровне в гене *CYTB*. Использование его как основного филогенетического маркера позволило включить в полномасштабный анализ более 6 тыс сиквенсов. Из трех позиций, обнаруженных при анализе, две подтвердились: Thr56Ser и Ile338Val. В них мы видим достоверное смещение использования аминокислот у подземных грызунов.

При анализе митохондриальных генов нами было обнаружено шесть позиций с характерных для подземных грызунов заменами: *COX1* Met73Ile, *COX3* Ile121Val, *ND5* Phe446Leu, *CYTB* Thr56Ser, *CYTB* Ile338Val, *CYTB* Ala357Thr. Все выявленные замены оказались недостоверными при статистической проверке.

Нам удалось найти гены с параллельным аминокислотными заменами, которые есть только у подземных грызунов, в ядерных генах: *Erp29*, *Rad23b*, *Hikeshi*, *Zadh2*, *Mrps14*, *Pycr2*, *Ccdc86*, *GTPBP2*, *Snapc2* и *Tll12*. Последующая проверка показала достоверность замен в *Rad23b* и *Pycr2*.

Согласно литературе, обнаруженное нами небольшое число генов (11% от общего проанализированного числа) с уникальными заменами является нормальным и ожидаемым. Так, в работе Kalina Davies (**Davies2018**) было обнаружено всего 35 генов с параллельными заменами у всех проанализируемых видов (от общего количества проанализированных генов это меньше 1%), а большее количество составляли гены с уникальными заменами (в нашей работе мы не рассматривали эти варианты) и парными среди разных родов.

Найденные нами ядерные гены не выявлялись ранее при изучении молекулярных адаптаций подземных грызунов. Однако, биохимические пути и процессы, в которые они вовлечены, можно связать с этими процессами. Активная работа митохондрий, которая может быть усиlena в условиях сниженной концентрации кислорода, потенциально вызывает образование активных форм кислорода, являющихся опасным для клетки разрушающим фактором (**Turrens2003**). Гены *Rad23b* и *Pycr2* (pyrroline-5-carboxylate reductase 2) связаны с процессами репарации ДНК (**Pohjoismaki2012**) и реакцией на окислительный стресс (**Kuo2015**), соответственно. Гомолог гена *Rad23* обнаружен при изучении адаптаций к засухе у растений, его уровень отбора сильно изменялся в

сторону положительного (Zhang2013b). Изменение его экспрессии также выявлен при анализе устойчивости к холоду пырея *Thinopyrum intermedium* (Jaikumar2020).

Конвергентные адаптации грызунов к подземному образу жизни

Мы наблюдаем у подземных полевоцых тенденцию проявления молекулярных адаптаций, описанную ранее в литературе, не смотря на ограниченную выборку полученных и проанализированных генов. В первую очередь, у них независимо ослабляется отбор на митохондриальных генах и увеличивается частота несинонимичных замен в целом. Как в митохондриальных, так и в ядерных геновых происходят параллельные аминокислотные замены в физиологически важных генах.

По некоторым предположениям, повышение уровня отбора в митохондриальных генах могло быть следствием низкой эффективной численности популяции подземных грызунов (Lacey2000). Однако, факты, что мы видим этот тренд 1) не во всех генах у одного рода и 2) не у всех видов подземных грызунов, скорее противоречит выдвинутой гипотезе.

Анализ митохондриальных геномов и транскриптомов показал общие характеристики для подземных грызунов: увеличение уровня отбора и повышение частоты несинонимичных замен в митохондриальных генах, наличие параллельных аминокислотных замен как в митохондриальных, так и в ядерных генах. Однако, если анализировать каждую подземную линию независимо, видна неоднородность проявления этих признаков. Так, больше всего изменений затронуло род *Ellobius*, а меньше всего – *Hyperacrius* (рис. 6). Наблюдаемое количество изменений не коррелирует со временем дивергенции вида. Переход к подземному образу жизни у *P.schaposchnikowi* произошел, согласно молекулярным данным, 7 млн лет назад. Но при этом вид не демонстрирует самое большое количество обнаруженных молекулярных изменений. Переход же к подземному образу жизни у представителей рода *Ellobius* был совершен в плиоцене. Не смотря на это, морфологические изменения представителей этого рода наиболее близки к тем, что наблюдаются у «модельных» подземных грызунов семейств Bathyergidae и Spalacidae: выступающие резцы, очень маленькие глаза и изолирование ротового отдела губами (Gromov1977).

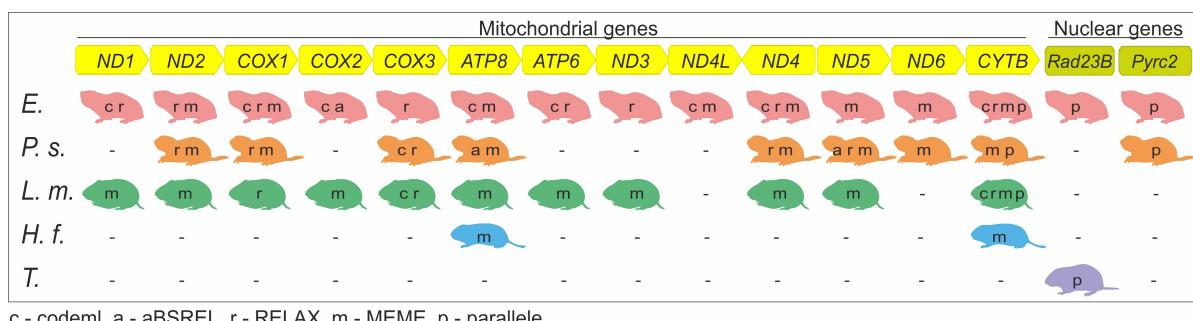


Рис. 6. Общие тренды к изменению уровня отбора и возникновению параллельных замен у подземных грызунов подсемейства Arvicolinae

Самыми стрессовыми проблемами, с которыми сталкиваются подземные грызуны, являются гипоксические / гиперкапнические условия и перегрев в закрытой системе нор

(**Lacey2000**). Хотя и слепушонки, и *P.schaposchnikowi* являются высокоспециализированными подземными грызунами, они занимают разные среды обитания, и характеристики их нор, а также методы добычи пищи весьма различны. Типичные места обитания *Ellobius* — засушливые или полузасушливые ландшафты, такие как степи, пустыни и луга. Эти грызуны населяют различные типы почв, в том числе плотные почвы глинистых пустынь, и создают довольно устойчивые системы узких туннелей для кормления под землей (**Ognev1950; Gromov1977; Shubin1978**). Таким образом, слепушонки должны справляться с проблемами, с которыми сталкиваются другие действительно подземные млекопитающие (**Lacey2000**). Последнее, в свою очередь, может привести к наблюдаемым нами изменениям в белок-кодирующих генах. Напротив, *P.schaposchnikowi* встречается на кавказских субальпийских высокотравных лугах на высоте 1500-2500 м (**Vereshchagin1959; Vorontsov1966; Krystufek2005**). Его норы вырыты в рыхлой влажной почве, заполненной камнями, что должно увеличить диффузию газа. Важно отметить, что поверхностные кормовые тунNELИ этих полевок необычны тем, что они кажутся слишком большими и почти вдвое шире, чем можно было бы ожидать от грызунов такого размера (**Vorontsov1966**; личные наблюдения ABC). Это дополнительное пространство может предотвратить перегрев, гипоксию и гиперкалию. Кроме того, *P.schaposchnikowi* строго травояден, по крайней мере, летом. Во время кормления полевка высовывается из норы, подбирает растения и затаскивает их в нору для безопасного кормления (**Gambaryan1957; Zimina1977**; личные наблюдения ABC). Таким образом, даже будучи ограниченными в поисках пищи вблизи отверстий для нор, они на самом деле проводят много времени вне туннелей. Благодаря холодному климату, архитектуре нор и особенностям кормления, *P.schaposchnikowi* может избежать некоторых физиологических проблем, с которыми приходится сталкиваться большинству подземных видов.

У *L. mandarinus*, не смотря на обнаруженные ранее изменения в циркадных ритмах и адаптации к гипоксии (**Sun2018; Dong2020**), мы наблюдаем не такие сильные изменения: всего три гена с изменением уровня отбора — *COX1*, *COX3* и *CYTB*. Тем не менее, мы обнаружили существенные различия у *L. mandarinus* и *Terricola*, несмотря на схожий эволюционный возраст этих таксонов. Это различие также может отражать неравные уровни энергетического и гипоксического стресса, возникающие из-за специфических характеристик стратегии поиска пищи и архитектуры норы. *L. mandarinus* питаются либо под землей, либо зелеными частями растений в непосредственной близости от входа в нору. Кормовые ходы этого вида расположены на глубине 10-30 см (**Smorkatcheva1990; Hong2019**), а прямые измерения концентрации газов, температуры и влажности подтвердили, что животные в норе должны столкнуться с гипоксией и гиперкалием. *Terricola* населяют различные растительные сообщества от широколиственных лесов (*T. subterraneus*) до альпийских лугов (*T. daghestanicus*) (**Aulagnier2018**). Они используют сложную сеть подземных тоннелей и демонстрируют некоторые внешние черты, связанные с подземным образом жизни (например, **Aulagnier2018; Mironov2020**). Однако телосложение и повадки *T. subterraneus* (Абрамсон и Сморкачева, неопубликовано), а также характеристи-

стки его туннельной системы отличают эту полевку от специализированных подземных грызунов. Пищевые пути этого вида располагаются в самом поверхностном слое почвы (в пределах 5-10 см) или даже непосредственно под опадой листьев (**Mironov2020**). Туннели обеспечивают защиту полевок от неблагоприятных погодных условий и хищников, что объясняет тенденцию видов *Terricola* к снижению скорости базовых метаболических процессов (**Caroli2000; Jemioło1983; Schropfer1977**), но их глубина, вероятно, слишком мала, чтобы существенно предотвратить диффузию газа, приводящую к гипоксическим / гиперкальческим условиям внутри. К сожалению, об экологии *T. daghestanicus*, населяющего кавказские альпийские степи и луга, почти ничего не известно. Тот факт, что полевки этого вида находят убежище среди скал (**Krystufek2005**), предполагает, что они не так строго подземные. Наши результаты подтверждают этот факт, поэтому мы не обнаружили никаких изменений уровня отбора в митохондриальных генах этого вида.

Подземные полевочки повторяют адаптационный путь других подземных грызунов, показывая схожие признаки. Так, во время многочисленных исследований представителей семейств Bathyergidae и Spalacidae были обнаружены параллельные замены в абсолютно разных генах. Также во многих генах видно ослабление отбора по сравнению с наземными видами. Этот эволюционный тренд подтверждается не только на подземных грызунах, но и на других подземных млекопитающих – Talpidae и Chrysochloridae. Обнаруженные адаптации митохондриального генома (увеличение уровня отбора, наличие параллельных замен) совпадают с исследованиями на Octodontidae и Ctenomyidae. Таким образом, полученные нами результаты согласуются с гипотезой о том, что переход к подземному образу жизни стимулирует ослабление уровня отбора. Причем выраженность скорее связана с уровнем специализации вида, нежели с возрастом его появления.

Заключение

В заключении кратко сформулированы основные результаты исследования.

Выводы

1. В гене *CYTB* и митохондриальных генах обнаружено ослабление отбора у подземных полевочьих.
2. Параллельные замены у подземных форм полевочных обнаружены в генах *CYTB*, *Rad23b* и *Pyrc2*.
3. Все гены с обнаруженными заменами вовлечены в процесс клеточного дыхания и репарацию.
4. Количество генов, в которых обнаружены ослабление отбора и параллельные замены, отличается у подземных полевочьих. Наибольшее количество генов с ослаблением отбора обнаружено у *Ellobius*, *Lasiopodomys* и *Prometheomys*. Предположительно, это связано с уровнем специализации.
5. Тенденции, выявленные у полевочных в связи с переходом к подземному образу жизни на молекулярном уровне сходны с известными ранее у других древних специализированных подземных грызунов семейств Spalacidae, Ctenomyidae, Bathergidae.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

В изданиях из перечня ВАК:

- **Bondareva O. V.**, Abramson N. I. The complete mitochondrial genome of the common pine vole *Terricola subterraneus* (Arvicolinae, Rodentia) // Mitochondrial DNA Part B. – 2019. – V. 4. – №. 2. – P. 3925-3926;
- Abramson N. I., Golenishchev, F. N., Bodrov, S. Y., **Bondareva, O. V.**, Genelt-Yanovskiy, E. A., & Petrova, T. V. Phylogenetic relationships and taxonomic position of genus *Hyperacrius* (Rodentia: Arvicolinae) from Kashmir based on evidences from analysis of mitochondrial genome and study of skull morphology // PeerJ. – 2020. – V. 8. – P. e10364;
- **Bondareva O. V.**, Mahmoudi, A., Bodrov, S. Y., Genelt-Yanovskiy, E. A., Petrova, T. V., & Abramson, N. I. The complete mitochondrial genomes of three *Ellobius* mole vole species (Rodentia: Arvicolinae) // Mitochondrial DNA Part B. – 2020. – V. 5. – №. 3. – P. 2485-2487;
- **Bondareva O. V.**, Potapova, N. A., Konovalov, K. A., Petrova, T. V., & Abramson, N. I. Searching for signatures of positive selection in cytochrome b gene associated with subterranean lifestyle in fast-evolving arvicolines (Arvicolinae, Cricetidae, Rodentia) // BMC Ecology and Evolution. – 2021. – V. 21. – №. 1. – P. 1-12;
- **Bondareva O.**, Bodrov S., Genelt-Yanovskiy E., Petrova T., Abramson N. Signatures of selection and adaptation to subterranean lifestyle across the transcriptomes of Arvicolinae (Rodentia, Cricetidae) // FEBS Open Bio. - 2021. - 11:P-01.3-17. doi:10.1002/2211-5463.13205;
- Abramson N. I., Bodrov, S. Y., **Bondareva, O. V.**, Genelt-Yanovskiy, E. A., & Petrova, T. V. Mitochondrial genome phylogeny of voles and lemmings (Rodentia: Arvicolinae): evolutionary and taxonomic implications // Plos One. – 2021. - 16(11): e0248198;
- **Bondareva O.**, Genelt-Yanovskiy, E., Petrova, T., Bodrov, S., Smorkatcheva, A., & Abramson, N. Signatures of Adaptation in Mitochondrial Genomes of Palearctic Subterranean Voles (Arvicolinae, Rodentia) // MDPI Genes. – 2021. – V. 12. – №. 12. – P. 1945.

В сборниках конференций:

- **Бондарева О.В.**, Петрова Т.В., Бодров С.Ю., Генельт-Яновский Е.А., Абрамсон Н.И. Следы отбора в митохондриальном геноме при адаптации к подземному образу жизни на примере представителей подсемейства полевоцых (Arvicolinae, Cricetidae, Rodentia) // материалы отчётной научной сессии ЗИН РАН по итогам работ 2019 г. (26–28 октября 2020, Санкт-Петербург). Издательство ЗИН РАН — С. 11-13;
- **Olga Bondareva**, Semyon Bodrov, Natalia Abramson. Signatures of natural selection in mitochondrial genome of underground rodents. // Abstracts of the international conference on computer biology MCCMB'19 (July 27-30, 2019, Moscow) <http://mccmb.belozersky.msu.ru/2019/index.html>;
- **Bondareva O.**, Potapova N., Abramson N. Can substitutions in mitochondrial protein sequence have adaptive signal? Case study of voles and lemmings, subfamily Arvicolinae, Rodentia // VII International Congress and Associate Symposiums of Vavilov Society of Geneticists and Breeders on the 100th anniversary of the department of genetics of Saint Petersburg State University (June 18-22, 2019, Saint Petersburg, Russia). Book of abstracts. - P. 140.;
- **Olga V. Bondareva**, Artem Kasianov, Nataliya Abramson. Family-specified direction of selection in underground rodents // 6th International Conference of Rodent Biology and Management and 16th Rodens et Spatium (Potsdam, Germany, 3-7 September 2018), Book of Abstracts - P. 184 / 10.5073/jka.2018.459.000;
- Kristina V. Kuprina, **Olga V. Bondareva**, Antonina V. Smorkatcheva, Nataliya Abramson, Svetlana A. Galkina. Multiple mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome in two species of mole voles (*Ellobius*, Cricetidae) // 6th International Conference of Rodent Biology and Management and 16th Rodens et Spatium (Potsdam, Germany, 3-7 September 2018), Book of Abstracts - P. 148 / 10.5073/jka.2018.459.000/;

- **Bondareva O.**, Kasianov A., Abramson N. Do rodent species adopt to underground lifestyle by different ways? // The Eleventh International Conference (20–25 Aug. 2018, Novosibirsk, Russia); Abstracts. Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences; Novosibirsk State University. – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2018. - P. 200 / DOI 10.18699/BGRSSB-2018-170;
- **Bondareva O.**, Chetverikova R., Rayko M., Abramson N. I. /Molecular adaptations of subterranean rodents to underground lifestyle. // Abstracts of the international conference on computer biology MCCMB'17 (July 27-30, 2017, Moscow) <http://mccmb.belozersky.msu.ru/2017/index.html>.