

Сведения о выполненных работах в 2022 году  
по проекту «Механизмы хромосомной пластичности малярийных комаров»,  
поддержанному Российским научным фондом

Соглашение № 21-14-00182

Руководитель: Шарахов Игорь Валентинович, д-р биол. наук  
Коханенко Алина Андреевна, канд. биол. наук

Проект направлен на изучение механизмов возникновения и функционирования хромосомных перестроек у малярийных комаров. Для выполнения проекта были разработаны привязанные к хромосомам геномные сборки малярийных комаров *An. messeae*, *An. beklemishevi* и *An. freeborni* используя такие инновационные технологии как секвенирование Oxford Nanopore, скэффолдинг Hi-C и физическое картирование геномов. За отчетный период получены следующие результаты.

1. Геномная сборка хромосомного уровня для *An. freeborni* и пространственная организации хроматина малярийных комаров.

С помощью секвенирования Oxford Nanopore, Illumina и создания сверхдлинных скэффолдов, используя Hi-C, мы получили геномную сборку хромосомного уровня для *An. freeborni*. Для описания пространственной организации хроматина у *An. freeborni* и *An. quadrimaculatus* с помощью ПО juicertools были сгенерированы карты Hi-C, на основе которых проводилось выделение A/B-компартов и доменов. Использование алгоритма ABCF позволило систематически выделить A/B компартменты для всех хромосом, что подтверждается достаточным коэффициентом корреляции между значением компартмента и плотностью генов. Нами было проведено сравнение силы компарментализации контактов, разделенных расстоянием менее 10 млн п.о. Т.к. ориентация хромосом по Раблю даёт наибольший вклад для контактов между удалёнными регионами, ожидалось, что для контактов на расстоянии менее 10 млн. п.о. сила компарментализации будет выше. Результаты подтвердили это предположение. Мы показали, что границы доменов значимо обогащены A-компартом и генами. Данное сочетание является ожидаемым, так как величина компартмента коррелирует с плотностью генов. Более детальное исследование, проведённое на доменах длиной более 100 тысяч п.о., показывает сильные колебания значения компартмента в окрестностях границы домена. Это указывает на существование двух фракций доменов: более коротких, расположенных преимущественно в A-компарменте, и более длинных, в B-компарменте. Изучение распределения повторов разных классов относительно границ доменов позволило выявить обогащение границ доменов простыми повторами.

2. Эволюционное сравнение геномов *An. quadrimaculatus*, *An. freeborni* и *An. atroparvus*.

В результате взаимного выравнивания исследуемых геномов удалось выявить 13 точек разрыва хромосом уникальных для *An. quadrimaculatus*, 7 точек разрыва хромосом уникальных для *An. freeborni* и 5 точек разрыва хромосом уникальных для

*An. atroparvus*. Кроме этого для каждого вида было выявлено несколько десятков точек разрывов, встречающихся повторно и у иных видов комаров.

3. Физическая геномная карта X хромосомы и характеристика точек разрыва полиморфных инверсий XL1, XL2 у *An. messeae*.

Мы провели физическое картирование X хромосомы *An. messeae* методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). Это позволило картировать точки разрывов полиморфной инверсий X1 *An. messeae*. Кроме того, мы провели геномное картирование на сборке AatrE3 референсного генома *An. atroparvus*. Было обнаружено, что в окрестности дистальной точки разрыва инверсии X1 у *An. atroparvus* располагаются гены белков, задействованных в процессах автофагии и везикулярного транспорта AATE012020 (vacuolar protein sorting), AATE006100 (vesicle transport protein SEC20) и белка секрета слюнных желез AATE010388 (salivary gland protein 1-like). Также в окрестности этой точки разрыва расположены гены, содержащие у *An. messeae* и *An. daciae* функционально значимые замены нуклеотидов: AATE013372, AATE017957, AATE015468. Мобильные элементы, обнаруженные вблизи дистальной точки разрыва инверсии X1 принадлежали классам Gypsy, Bell, Ag-Jock.

4. Определение координат точек разрывов перестроек в X хромосоме и перестройки 2R1 у *Anopheles messeae*.

В результате физического картирования удалось определить примерные координаты (диапазон до 15 тысяч п.о.) точек разрывов 2 вложенных инверсий в X хромосоме *Anopheles messeae* (4 точки разрыва). Методы физического картирования опирались на данные по сборке референсного генома *Anopheles atroparvus* (AatrE3). Для уточнения координат точек разрывов были использованы длинные прочтения, полученные с помощью секвенатора MinION. Инструмент *blastn* из *command-line blast+* использовался для выравнивания участков генома *Anopheles atroparvus* (AatrE3) на библиотеку прочтений. Подбирались наиболее близкие гены к точкам разрывов. Так, удалось обнаружить, что в библиотеки длинных прочтений присутствуют прочтения, которые целиком содержат точку разрыва 2 (картированные гены *Anopheles atroparvus* AATE002183, AATE020848): в результате анализа выяснилось, что ген, фланкирующий точку разрыва слева не ортолог AATE002183 *Anopheles atroparvus*, а соседний ортолог AATE020008, расстояние между генами, сократили расстояния точки разрыва до 1400 нуклеотидов. Для точки разрыва 3 (картированные гены *Anopheles atroparvus* AATE000407, AATE016478) перенесена левая граница на ортолог гена AATE001433. Для точки разрыва 4 (картированные гены *Anopheles atroparvus* AATE016042, AATE009858) граница слева перенесена на ортолог гена AATE011784. Методами физического картирования ранее было установлено, что точка разрыва 2R1 *Anopheles messeae* располагается в окрестностях 12.5 Мб и 36.5 Мб на координатах 2R *Anopheles atroparvus* (AatrE3). Однако определенные координаты точки разрыва были не известны. С помощью библиотеки длинных прочтений *Anopheles messeae*, секвенирование на MinION, удалось обнаружить прочтения, описывающие окрестности точки разрыва *Anopheles messeae*. Удалось определить ортологи генов *Anopheles atroparvus*, которые содержат точку разрыва, также удалось

найти прочтения, которые бы детально описывали точку разрыва. Так, координаты левой точки разрыва (на геноме *Anopheles atroparvus* AatrE3) находятся в окрестностях 12.603.160 внутри гена AATE009822 (разорванный инверсией ген), а справа – 36.840.600 – внутри гена AATE010343 (разорванный инверсией ген).

5. Анализ частоты генотипов инверсии X1 и X2 в природных популяциях *An. beklemishevi*.

Частоты гомозигот по инверсиям в X хромосомы в природных популяциях *An. beklemishevi* определялись с помощью метода FISH. С помощью микродиссекции и ПЦР был разработан флуоресцентный ДНК-зонд, маркирующий район 1a-3a X стандартной хромосомы *An. beklemishevi*. Район включает только по одной, дистальной, точки разрывов полиморфных инверсий X1 и X2. После проведения FISH со стандартной X хромосомой сигнал непрерывный, однако у инвертированных вариантов хромосомы X1 и X2 меченный район разделяется на две части, специфичным образом для каждой инверсии, что позволяет легко определить генотип гомозигот X11, X22 или гемизигот. Материалом для исследования послужили выборки личинок малярийных комаров рода *Anopheles*, отловленных в естественных водоёмах на территории Сибири (Ямало-Ненецкого автономный округ (ЯНАО), Ханты-Мансийского автономный округ (ХМАО), Красноярский край (КК), Томская область (ТО) и Республика Алтай) в период с 2019 по 2021 годы. Была определена видовая принадлежность 685 личинок малярийных комаров из 8 природных популяций. Расстояние между самой северной (с. Шурышкары) и самой южной (с. Озерное) составляло почти 2000 километров. Обычно личинки *An. beklemishevi* обитают с *An. messeae* и *An. daciae* совместно, но на севере и в высокогорьях, как и в раннелетний период, можно встретить в основном особей только этого вида. Стандартный гомозиготный цитотип был найден во всех популяциях с явным преобладанием по сравнению с инвертированными гомозиготами. Инверсия X1 в гемизиготном состоянии была обнаружена с частотами 3,6–3,9 % всего лишь в двух популяциях (с. Чоя и г. Стрежевой, респ. Алтай), тогда как гомозиготные особи с генотипом X2 были найдены в семи популяциях с частотами 7,2–33,33 % в предгорьях Алтая, средних (ТО и КК) и северных широтах (ХМАО) Сибири. Инверсии встречались также в гетерозиготном состоянии в тех же популяциях. Полученные с помощью примененного методического подхода результаты показали значительную долю гомо и гемизиготных особей по инверсиям, которые раньше описывали в основном в гетерозиготном состоянии.