

## **ANALIZA KODUJĄCEJ SEKWENCJI NUKLEOTYDOWEJ GENU $\alpha^A$ -GLOBINY GOŁĘBIA DOMOWEGO (*COLUMBA LIVIA* VAR. *DOMESTICA*) ORAZ SIERPÓWKI (*STREPTOPELIA DECAOCTO*)**

Henryk Dolecki, Andrzej Dybus

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

**Streszczenie.** W przeprowadzonych badaniach porównywano sekwencję nukleotydową regionu kodującego genu  $\alpha^A$ -globiny gołębia domowego i sierpówki. Do badań wykorzystano trzy (wyróżniające się w lotach konkursowych) gołębie pocztowe, trzy gołębie ras niepocztowych (king, strasser i pawik) oraz jedną sierpówkę (*Streptopelia decaocto*). Materiał do izolacji RNA stanowiła pełna krew obwodowa. Amplifikowano region kodujący genu  $\alpha^A$ -globiny z wykorzystaniem techniki RT-PCR. Produkty PCR zsekwencjonowano, uzyskane sekwencje nukleotydowe porównywano za pomocą programu BLAST<sup>®</sup>2. Nie wykazano różnic w sekwencji kodującej genu  $\alpha^A$ -globiny pomiędzy gołębiami pocztowymi i niepocztowymi. Zaobserwowano istnienie substytucji nukleotydowych (w 11 pozycjach) pomiędzy gołębem domowym a sierpówką, co w przypadku gatunków nieodległych filogenetycznie jest dość zaskakujące.

**Słowa kluczowe:**  $\alpha^A$ -globina, *Columba livia*, DNA, RT-PCR, *Streptopelia decaocto*

### **WSTĘP**

Głównym etapem ewolucji, pozwalającym na wykorzystanie nowych zasobów energii, było przejście z beztlenowej do tlenowej formy życia. U kręgowców wykształciły się mechanizmy zapewniające komórkom odpowiedni dopływ tlenu. Pierwszy z nich to układ krążenia, drugi – wykorzystanie cząsteczek przenoszących tlen. Ewolucję umożliwiają zmiany w sekwencjach genów, zachodzące na skutek mutacji, rekombinacji genetycznej bądź błędów w procesie replikacji. Ze względu na to, że geny ewoluują, gromadząc stopniowo zachodzące zmiany, liczba różnic między sekwencjami nukleotydowymi genów dwóch gatunków powinna wskazać, jak dawno temu istniał ich wspólny przodek. W celu ustalenia ewolucyjnego powinowactwa między organizmami można porównywać sekwencje nukleotydowe pojedynczych genów lub całych genomów, co jest możliwe dzięki upowszechnieniu sekwencjonowania DNA [Brown 2001].

---

Adres do korespondencji – Corresponding author: dr Andrzej Dybus, Zakład Cytogenetyki Molekularnej, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Doktora Judyma 10, 71-460 Szczecin, e-mail: andrzej.dybus@zut.edu.pl

Odpowiednie zaopatrzenie organizmu w tlen wpływa na zwiększenie jego możliwości poddania go dużemu wysiłkowi fizycznemu, co ma szczególne znaczenie dla zwierząt o bardzo aktywnym trybie życia i szybkim metabolizmie [Sultana i in. 1989]. Geny  $\alpha$ - i  $\beta$ -globiny ssaków i ptaków, zmapowane na różnych chromosomach, zorganizowane są w tandemy poszczególnych genów strukturalnych, które oskrzydłają regiony niekodujące, zawierające elementy regulatorowe [Higgs i in. 1990, Sjakste i Sjakste 2002]. W przypadku niektórych domen utworzenie i utrzymanie otwartej domeny funkcjonalnej jest zadaniem spełnianym przez sekwencję DNA zwaną regionem kontrolującym *locus* (LCR) [Brown 2001]. Wykazano, że LCR  $\beta$ -globinowy składa się z przynajmniej trzech sekwencji (długości 200–300 pz) rozpoznawanych przez białka wiążące DNA [Engel i Tanimoto 2000].

Rodzinę genów  $\alpha$ -globin ptaków tworzą trzy ściśle ze sobą sprzężone geny. Dwa z nich,  $\alpha^A$  i  $\alpha^D$  ulegają ekspresji w pierwotnych (2–5-dniowe zarodki) i ostatecznych (od 6. dnia) liniach komórkowych. Trzeci gen,  $\pi$ -globiny (embrionalny), ulega ekspresji tylko w pierwotnych liniach komórek. Geny globin ułożone są zgodnie z kolejnością ich ekspresji 5'- $\pi$ - $\alpha^D$ - $\alpha^A$ -3' [Ikehara i in. 1997]. Większość gatunków ptaków posiada dwa typu  $\alpha$ -globiny (A i D). W przypadku gołębi, dorosłe osobniki nie posiadają białka  $\alpha^D$ -globiny, zaś ekspresja genu  $\alpha^D$ -globiny zachodzi tylko w późnym stadium rozwoju embrionalnego [Sultana i in. 1989].

Gen  $\alpha^A$ -globiny gołębia (*Columba livia*) koduje białko składające się ze 142 aminokwasów. Zbudowany jest z trzech eksonów, przedzielonych intronami o długości 156 i 104 pz (GenBank AB001981) – Ikehara i in. 1997. W przypadku sierpówki (*Streptopelia decaocto*) brak szczegółowych informacji o sekwencji oraz organizacji genu  $\alpha^A$ -globiny.

Celem niniejszego opracowania było ustalenie sekwencji nukleotydowej genu  $\alpha^A$ -globiny sierpówki (regionu kodującego), porównanie jej z sekwencją genu  $\alpha^A$ -globiny gołębia domowego oraz analiza zaobserwowanych różnic.

## MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto trzy gołębie pocztowe (wyróżniające się w lotach konkursowych), utrzymywane w gołębniku Zakładu Cytogenetyki Molekularnej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, trzy gołębie ras niepocztowych (po jednym osobniku z rasy king, strasser i pawik) pochodzące z prywatnej hodowli położonej w okolicach Pyrzyce oraz jedną sierpówkę (*Streptopelia decaocto*).

Materiałem biologicznym do izolacji RNA była pełna krew obwodowa (5  $\mu$ l), pobrana z jednej z żył skoku. Izolację całkowitego RNA przeprowadzano z wykorzystaniem zestawu MasterPure™ (Epicentre® Biotechnologies). Po izolacji RNA przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji (RT-PCR), do której wykorzystano zestaw odczynników Two-step RT-PCR-&GO™ (Qbiogene). Syntezę cDNA wykonano w mieszaninie reakcyjnej o objętości 20  $\mu$ l, która zawierała: 8  $\mu$ l RT-&GO™ Master mix (zawierający odwrotną transkryptazę M-MuLV, bufor RT, inhibitor RNazy, DTT, dNTPs), 1  $\mu$ l startera (dT)<sub>25</sub>V (40  $\mu$ M), 2  $\mu$ l DTT (100 mM), 4  $\mu$ l wody z dodatkiem DEPC oraz 5  $\mu$ l preparatu RNA. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 42°C przez jedną godzinę, a następnie

w temperaturze 70°C przez 15 minut (inaktywacja odwrotnej transkryptazy). Po ostudzeniu próbek, do każdej z nich dodawano 80  $\mu$ l wody dejonizowanej.

Amplifikację regionu kodującego genu  $\alpha^A$ -globiny (RT-PCR) przeprowadzono z wykorzystaniem sekwencji starterowych zaprojektowanych (Primer3) na bazie sekwencji nukleotydowej numer AB001981 (GenBank):

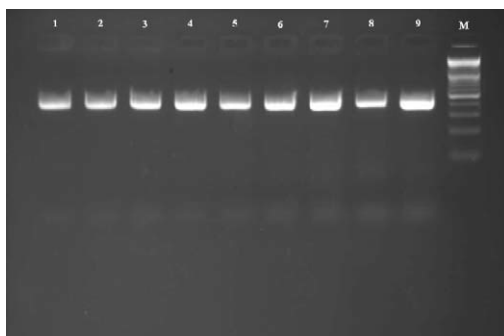


Mieszanka reakcyjna PCR (20  $\mu$ l) zawierała bufor dla polimerazy *Taq*, 0,2 mM mieszaninę nukleotydów, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, po 20 pmol każdego ze starterów, 0,6 jednostki polimerazy (Fermentas), 5  $\mu$ l cDNA oraz wodę dejonizowaną (uzupełnienie do 20  $\mu$ l). Zastosowano następujący profil termiczny reakcji: denaturacja wstępna matrycy cDNA 95°C przez 2 minuty, następnie 35 cykli: denaturacja właściwa 95°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów 59°C przez 30 sekund, synteza DNA 72°C przez 60 sekund oraz synteza końcowa DNA – 72°C przez 5 minut.

Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym (1 x TBE, 90 volt przez 45 minut), a następnie wybarwiano bromkiem etydyny. Wyniki odczytywano w świetle UV. Matryce do sekwencjonowania (produkty PCR) izolowano z żelu agarozowego za pomocą zestawu DNA Gel-Out (A&A Biotechnology). DNA sekwencjonowano w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Wyniki odczytywano z wykorzystaniem programu Chromas<sup>®</sup> (v. 2.31). Uzyskane sekwencje nukleotydowe genu  $\alpha^A$ -globiny porównywano między sobą z wykorzystaniem programu BLAST<sup>®</sup>2.

## WYNIKI I DYSKUSJA

Wykonanie reakcji PCR na matrycy cDNA umożliwiło specyficzną i wydajną amplifikację fragmentu genu  $\alpha^A$ -globiny długości 421 par zasad (rys. 1).



Rys. 1. Produkty amplifikacji genu  $\alpha^A$ -globiny gołębia domowego oraz sierpówki  
Fig. 1. Amplification products of alpha A-globin gene of Domestic Pigeon and Eurasian Collared-Dove  
M – DNA Ladder Plus (Fermentas).

Sekwencjonowanie produktów PCR umożliwiło bezbłędne ustalenie sekwencji kodującej genu  $\alpha^A$ -globiny badanych gołębi. Porównanie sekwencji nukleotydowej gołębi pocztowych i niepocztowych nie wykazało między nimi żadnych różnic. W przypadku analizy regionu kodującego genu  $\alpha^A$ -globiny gołębia domowego oraz sierpówki (BLAST<sup>®</sup>2) wykazano istnienie różnic w 11 pozycjach nukleotydowych (rys. 2).

```

Query 1   CTGTCTGCCAACGACAAGAGCAACGTGAAGGCCGTCTTCGGCAAATCGGC GGCCAGGCC 60
          |||
Sbjct 1   CTGTCTGCCAACGACAAGAGCAACGTGAAGGCCGCCTTCGGCAAATCGGC GGCCAGGCC 60

Query 61  GGTGACTTTGGTGGTGAAGCCCTGGAGAGGTTGTTTCATCACCTACCCCAAGACCAAGACC 120
          |||
Sbjct 61  GGTGATTTGGTGGTGAAGCCCTGGAGAGATTGTTTCATCACCTACCCCAAGACCAAGACC 120

Query 121 TACTTCCCCCACTTCGACCTGTCACATGGCTCCGCTCAGATCAAGGGCACGGCAAGAAG 180
          |||
Sbjct 121 TACTTCCCCCACTTCGACCTGTCACATGGCTCCGCTCAGATCAAGGCACGGCAAGAAG 180

Query 181 GTGGCGGAGGGCACTGGTTGAGGCTGCCAACACATCGATGACATCGCTGGTGCCCTCTCC 240
          |||
Sbjct 181 GTGGCGGATGCCTGGTTGAGGCTGCCAACACGTCGATGACATCGCTGGTGCCCTCTCC 240

Query 241 AAGCTGAGCGACCTCCACGCCAAAAGCTCCGTGTGGACCCCGTCAACTTCAAACTGCTG 300
          |||
Sbjct 241 AAGCTGAGCGACCTCCACGCCAAAAGCTCCGTGTGGACCCCGTCAACTTCAAACTGCTG 300

Query 301 GGTCACTGCTTCCTGGTGGTCGTGGCCGTCCACTTCCCTCTCTCCTGACCCCGGAGGTC 360
          |||
Sbjct 301 GGTCACTGCTTCCTGGTGGTGGTGGCCACCCACTTCCCTCTCTCCTGACCCCGGAGGTC 360

Query 361 CATGCTTCCCTGGACAAGTTCGTGTGTGCCGTGGGCACCGTCCTTACTGCCAAGTACCGT 420
          |||
Sbjct 361 CATGCTTCCCTGGACAAGTTCGTGTGTGCCGTGGGCACCGTCCTTACTGCCAAGTACCGT 420

Query 421 T 421
          |
Sbjct 421 T 421

```

Rys. 2. Porównanie sekwencji kodującej genów  $\alpha^A$ -globiny: Query – gołąb domowy, Sbjct – sierpówka

Fig. 2. Comparison of coding sequence of alpha A-globin gene: Query – Domestic Pigeon, Sbjct – Eurasian Collared-Dove

W przypadku sześciu pozycji nukleotydowych występowały różnice, które przekładały się na kodowany aminokwas. Lokalizację substytucji nukleotydowych oraz ich wpływ na kodowane białko przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1. Lokalizacja substytucji nukleotydowych oraz wpływ na kodowane białko  
 Table 1. Localization of nucleotide substitutions and influence on coded protein

Pozycja nukleotydu Position of nucleotide (GenBank AB001981)	Numer kodonu Number of codon	<i>Columba livia</i>	<i>Streptopelia decaocto</i>
4955	14	GTC (Ala)	GCC (Val)
4986	24	GAT (Asp)	GAC (Asp)
5166	33	TTG (Leu)	ATG (Met)
5242/5243	58	GGG (Gly)	GCA (Ala)
5264	65	GAG (Glu)	GAT (Asp)
5267	66	GCA (Ala)	GCG (Ala)
5289	74	ATC (Ile)	GTC (Val)
5500	109	GTC (Val)	GTG (Val)
5507/5508	112	GTC (Val)	ACC (Thr)

Hodowlą gołębi pasjonują się miliony ludzi na całym świecie. Selekcja sztuczna doprowadziła do wytworzenia setek ras gołębi, w tym gołębi pocztowych (sportowych), u których nastąpiło utrwalenie takich cech jak: orientacja w przestrzeni, szybkość i wytrzymałość lotu [Nowicki i Pawlina 1997]. Ogromny wpływ na wydolność fizyczną organizmu odgrywa dostępność tlenu, zaś kluczową rolę w jego rozprowadzaniu w organizmie pełni hemoglobina [Kubicz 1999]. Badania hemoglobiny kusacza wykazało istnienie delecji aminokwasów w pozycjach 18–20  $\alpha^A$ -globiny, w regionie łączenia helisy I i II [Eguchi i Eguchi 2001]. Fascynującym gatunkiem są gęsi tybetańskie, które potrafią przelatywać nad Himalajami. Wykazano, że krew tych ptaków ma wyższą zdolność wiązania tlenu niż gęsi szarej, blisko z nimi spokrewnionej. Odpowiedzialna za tę zdolność jest subtelną substytucją zaledwie jednego aminokwasu, którego nie mają inne gatunki ptaków (ProH2 $\alpha$ ↔Ala) – Perutz 1983, Weber 2007.

Przeprowadzona w niniejszej pracy analiza sekwencji nukleotydowej regionu kodującego genu  $\alpha^A$ -globiny gołębi pocztowych i niepocztowych nie wykazała różnic pomiędzy nimi, co sugeruje, że doskonałą wydolność fizyczną gołębie pocztowe nie zawdzięczają dzięki hemoglobinie o lepszych właściwościach wiązania i oddawania tlenu. Badania częstości substytucji aminokwasów zachodzące w białkach w czasie ewolucji dały podstawy koncepcji „zegara molekularnego”, która zakłada, że zmiany molekularne zachodzą w stałym tempie, które jest odmienne dla różnych białek i wynika z pełnionej przez nie funkcji [Zuckerlandl i Pauling 1965]. W przypadku hemoglobiny, szacowany czas wymagany do podstawienia jednego aminokwasu wynosi średnio 5,8 milionów lat [Bajaj i Blundell 1984].

Analiza substytucji aminokwasowych w łańcuchu  $\alpha^A$ -globiny pomiędzy gołębiem a sierpówką pozwoliła na wskazanie podstawień nukleotydowych będących wynikiem ewolucji. Stwierdzono, że w pozycji 14. sekwencji aminokwasowej  $\alpha^A$ -globiny gołębia domowego występuje walina (aminokwas hydrofobowy), podobnie jak u kaczki domowej, gęsi gęgawej, łabędzia niemego czy orla przedniego. U innych gatunków ptaków (kura domowa, bażant, struś) we wskazanej pozycji występuje izoleucyna. Co ciekawe, jedynie u sierpówki w pozycji tej znajduje się alanina, która jest jednym z najmniejszych

aminokwasów o charakterze hydrofobowym. W pozycji 33. sekwencji aminokwasowej  $\alpha^A$ -globiny u większości badanych ptaków (w tym także sierpówki), a także człowieka, występuje metionina, będąca dużym aminokwasem siarkowym (hydrofobowym), zaś u gołębia – leucyna (duży, hydrofobowy aminokwas).

Kolejne różnice pomiędzy łańcuchami  $\alpha^A$ -globiny gołębia i sierpówki dotyczą aminokwasów 58. 74. i 112. U większości gatunków ptaków (w tym sierpówki) w 58. pozycji występuje alanina, u badanych gołębi – glicyna. W przypadku 74. pozycji aminokwasowej powszechnie występuje izoleucyna (obecna u gołębi oraz większości gatunków ptaków); u sierpówki wykazano obecność waliny w tym regionie białka. W 112. pozycji łańcucha  $\alpha^A$ -globiny gołębia domowego występuje walina, u sierpówki treonina, natomiast u zdecydowanej większości gatunków ptaków – izoleucyna.

W opublikowanych wcześniej badaniach z tego zakresu [Sultana i in. 1989] wykazano istnienie substytucji aminokwasowych w  $\alpha^A$ -globinie gołębia domowego w pozycjach: 5. (A  $\rightarrow$  N), 8. (T  $\rightarrow$  S), 12. (G  $\rightarrow$  A) i 15. (S  $\rightarrow$  A). Pozycje te nie wydają się jednak zaangażowane w kontakty między łańcuchami  $\alpha$  i  $\beta$ . Dość istotne substytucje wystąpiły natomiast w pozycjach 34.: treonina – hydrofilowa na izoleucynę – hydrofobową, 35. – seryna  $\rightarrow$  treonina, 36. – fenyloalanina  $\rightarrow$  tyrozyna, 115. – alanina  $\rightarrow$  seryna i 117. – fenyloalanina  $\rightarrow$  leucyna. Regiony te odpowiedzialne są za kontakt łańcuchów  $\alpha\beta$ 1.

W zakresie podobieństwa sekwencji aminokwasowej gołąb domowy (*Columba livia*) jest filogenetycznie najbliższy rzędowi *Anserioformes*, zaś posiadanie pojedynczego komponentu hemoglobiny przybliża go do *Psitaciformes*. Porównanie łańcucha  $\alpha^A$ -globiny gołębia domowego z białkiem człowieka i aligatora wykazało mniej różnic pomiędzy gołębiem a aligatorem (35) niż gołębiem a człowiekiem (42), co jest zgodne z dowodami paleontologicznymi [Sultana i in. 1989].

## PODSUMOWANIE

W niniejszym opracowaniu zaobserwowano dość duże różnice w sekwencji nukleotydowej regionu kodującego genu  $\alpha^A$ -globiny pomiędzy gołębiem domowym a sierpówką (gatunkami nieodległymi filogenetycznie), co może być potwierdzeniem, iż różnice w sekwencji aminokwasowej białka, nawet tak istotnego dla procesów życiowych jak hemoglobina, nie zawsze muszą przekładać się na zasadniczą zmianę jego właściwości.

## PIŚMIENNICTWO

- Bajaj M, Blundell T., 1984. Evolution and the tertiary structure of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 13, 453–492.
- Brown T.A., 2001. *Genomy*. PWN, Warszawa.
- Eguchi Y., Eguchi T., 2001. Amino acid sequence of Kalinowaski's Tinamou (*Nothoprocta kalinowskii*) hemoglobin and the rate of evolution of bird alphaD-globin. *J. Protein Chem.* 20 (7), 543–549.

- Engel J.D., Tanimoto K., 2000. Looping, linking, and chromatin activity: new insights into beta-globin locus regulation. *Cell* 100 (5), 499–502.
- Higgs D.R., Wood W.G., Jarman A.P., Sharpe J., Lida J., Pretorius I.M., Ayyub H., 1990. A major positive regulatory region located far upstream of the human alpha-globin gene locus. *Genes Dev.* 4 (9), 1588–601.
- Ikehara T., Eguchi Y., Kayo S., Takei H., 1997. Isolation and sequencing of two alpha-globin genes alpha(A) and alpha(D) in pigeon and evidence for embryo-specific expression of the alpha(D)-globin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234 (2), 450–453.
- Kubicz A., 1999. Tajemnice ewolucji molekularnej. PWN, Warszawa.
- Nowicki B., Pawlina E., 1997. Gołębie pocztowe. Podstawy chowu i hodowli. PWRiL, Warszawa.
- Perutz M.F., 1983. Species adaptation in a protein molecule. *Mol. Biol. Evol.* 1 (1), 1–28.
- Sjakste N.I., Sjakste T.G., 2002. Structure of genomic domains of mammalian and avian globin genes. *Genetika* 38 (12), 1589–1606.
- Sultana C., Abbasi A., Zaidi Z.H., 1989. Primary structure of hemoglobin alpha-chain of *Columba livia* (Gray Wild Pigeon). *J. Protein Chem.* 8 (5), 629–646.
- Weber R.E., 2007. High-altitude adaptations in vertebrate hemoglobins. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 158 (2–3), 132–142.
- Zuckerkandl E., Pauling L., 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* 8 (2), 357–366.

#### **ANALYSIS OF CODING REGION SEQUENCES OF $\alpha^A$ -GLOBIN GENE OF DOMESTIC PIGEON (*COLUMBA LIVIA* VAR. *DOMESTICA*) AND EURASIAN COLLARED-DOVE (*STREPTOPELIA DECAOCTO*)**

**Abstract.** In this study, the nucleotide sequence of coding region of alpha A-globin gene of domestic pigeon (*Columba livia*) and Eurasian Collared-Dove (*Streptopelia decaocto*) was compared. Three homing pigeons (with good racing performance), three non-homing pigeons (King, Strasser and Fantail) and one Eurasian Collared-Dove were included in this study. Total RNA was isolated from whole blood samples. The coding region of alpha A-globin gene was amplified using RT-PCR method. PCR products were sequenced and compared using BLAST<sup>®</sup>2. No differences in nucleotide sequences between homing and non-homing pigeons were observed. Some nucleotide substitutions (in eleven positions) between Domestic Pigeon and Eurasian Collared-Dove were observed, which is quite surprising when filogenetically close species are considered.

**Key words:**  $\alpha^A$ -globin, *Columba livia*, DNA, RT-PCR, *Streptopelia decaocto*

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 3.12.2009