

**на правах рукописи**

**ЛИСАЧЕВ АРТЕМ ПАВЛОВИЧ**

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ, СИНАПСИСА И  
РЕКОМБИНАЦИИ ПОЛОВЫХ ХРОМОСОМ РАЗНОГО  
ЭВОЛЮЦИОННОГО ВОЗРАСТА У ПОЗВОНОЧНЫХ**

**03.03.04 – Клеточная биология, цитология и гистология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата биологических наук**

**Новосибирск – 2017**

Работа выполнена в лаборатории рекомбинационного и сегрегационного анализа Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Бородин Павел Михайлович**  
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Бугров Александр Геннадьевич**  
доктор биологических наук, профессор  
в. н. с. лаборатории филогении и фауногенеза  
Института систематики и экологии животных  
СО РАН, г. Новосибирск

**Галкина Светлана Анатольевна**  
кандидат биологических наук, н. с. кафедры  
генетики и биотехнологии биологического  
факультета СПбГУ, г. Санкт-Петербург

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт общей генетики  
им. Н.И. Вавилова АН, г. Москва

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 года на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), в конференц-зале Института по адресу: пр. Лаврентьева, 10, г. Новосибирск, 630090. Тел.: (383)363-49-06, факс: (383)333-12-78, e-mail: [dissov@bionet.nsc.ru](mailto:dissov@bionet.nsc.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: [www.bionet.nsc.ru](http://www.bionet.nsc.ru).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Т. М. Хлебодарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Поведение половых хромосом в мейозе у представителей гетерогаметного пола сильно отличается от поведения аутосом. Из-за отсутствия гомологии в определенных их участках спаривание половых хромосом происходит с затруднениями, и у многих видов не доходит до конца (Turner, 2007; Traut, Winking, 2001; Pigozzi, 2011). Рекомбинация между дифференцированными половыми хромосомами на негомологичных участках также подавлена. Известно, что для нормального прохождения мейоза необходимо полное спаривание всех бивалентов и наличие в каждом из них хотя бы одного кроссовера (Pardo-Manuel de Villena, Sapienza, 2001). У млекопитающих существуют механизмы, обеспечивающие нормальный мейоз у гетерогаметного пола, несмотря на особенности поведения гетероморфных половых хромосом (Turner, 2005).

Однако млекопитающие, цитогенетика которых наиболее хорошо изучена, демонстрируют лишь поздние этапы эволюции половых хромосом. Остается неизвестным, как на ранних этапах дифференцировки половых хромосом (гоносом) возникают характерные особенности их спаривания и рекомбинации и механизмы, их компенсирующие. По этой причине является актуальным изучение систем половых хромосом у других позвоночных, в частности у костистых рыб, рептилий и птиц.

Иммунофлуоресцентная и электронная микроскопия синаптонемных комплексов (СК) являются многообещающими подходами для анализа половых хромосом (Pigozzi, 2011; Borodin et al., 2012). Во-первых, спаривание хромосом в мейозе выявляет гетероморфизмы, незаметные на митотических хромосомах. Во-вторых, прямая визуализация точек кроссинговера за счет специфичного окрашивания белков рекомбинации позволяет точно локализовать районы гомологии и хромосома-специфичные районы. В третьих, в пахитене степень компактизации хроматина ниже, чем в метафазе, что позволяет исследовать микрохромосомы. Известно, что у многих рептилий половые хромосомы находятся именно среди микрохромосом (Ezaz et al., 2005).

В качестве моделей для исследования были выбраны представители таксонов, имеющих половые хромосомы разного эволюционного возраста – рыбы гуппи (подрод *Acanthophaselus*, род *Poecilia*, сем. Poeciliidae, Osteichthyes); рептилии – анолисы (рода *Anolis* и *Deiroptyx*, сем. Dactyloidae, Reptilia); и птицы – крачки (роды *Sterna* и *Chlidonias*, сем. Sternidae, Charadriiformes, Aves). В первых двух таксонах предположительный возраст систем половых хромосом меньше, чем у млекопитающих и птиц, причем гуппи и анолисы демонстрируют различные стадии процесса их дифференцировки: XY-хромосомы гуппи имеют возраст 10-15 млн лет (Meredith et al., 2011), а XY-хромосомы анолисов – 73-123 млн лет (Rovatsos et al., 2014). Для сравнения таксонов с молодыми половыми хромосомами с таксонами со старыми половыми хромосомами были исследованы два вида крачек – речная, *Sterna hirundo*, и черная, *Chlidonias niger* (сем. Sternidae, Charadriiformes, Aves). Эволюционный возраст ZW-системы половых хромосом птиц оценивают в 100-170 млн лет.

### Цель и задачи исследования

Целью работы является выяснение особенностей спаривания и рекомбинации половых хромосом у представителей таксонов, имеющих половые

хромосомы относительно молодого, среднего и древнего эволюционного возраста на примере гуппи (*Poecilia (Acanthophascelus)*, Osteichthyes), анолисов (Dactyloidae, Reptilia) и крачек (Sternidae, Aves) и сравнение их с особенностями спаривания и рекомбинации половых хромосом млекопитающих, известными из литературы.

В работе были поставлены следующие задачи.

1) Исследовать особенности спаривания половых хромосом и выяснить особенности распределения кроссоверных обменов по половому биваленту у представителей таксонов, имеющих половые хромосомы разного эволюционного возраста.

2) По особенностям спаривания и рекомбинации определить локализацию гомологичных и гетерологичных районов половых хромосом и реконструировать возможные пути их происхождения.

3) Сравнить рекомбинационные характеристики половых хромосом и аутосом в пределах каждого таксона.

### **Научная новизна**

Впервые показано, что увеличение степени дивергенции между гетероморфными половыми хромосомами приводит к прогрессирующим нарушениям в синапсисе полового бивалента, которые все менее эффективно компенсируются синаптической подгонкой, и усилению отличий параметров его синапсиса от параметров синапсиса аутосом того же вида. Впервые показано, что при уменьшении относительной длины псевдоаутосомных районов с увеличением эволюционного возраста половых хромосом распределение кроссоверов на них становится более равномерным, и граница между ними и нерекombинирующим районом становится более четкой.

Впервые идентифицирован второй, терминальный, псевдоаутосомный район на половых хромосомах гуппи, и уточнена временная последовательность их синапсиса. Впервые установлен гетероморфизм между половыми хромосомами анолисов, установлено расположение дифференцированного и псевдоаутосомного районов. Построены сравнительные рекомбинационные карты аутосом двух видов анолисов. Впервые описан кариотип черной крачки, описаны перестройки, отличающие его от кариотипа речной крачки, изучено строение половых хромосом черной и речной крачек. Построены сравнительные рекомбинационные карты аутосом исследованных видов крачек.

### **Научно-практическая ценность**

Данная работа описывает характерные черты мейотического поведения и строения половых хромосом, находящихся на разных этапах дивергенции. Результаты работы способствуют лучшему пониманию особенностей эволюции половых хромосом в целом и могут быть использованы для преподавания курсов генетики, клеточной и эволюционной биологии. Полученные данные по синапсису и рекомбинации половых хромосом и аутосом у пецилиевых, анолисов и крачек, модельных групп видов, которые достаточно широко используются в эволюционных исследованиях, могут быть использованы при изучении их биоразнообразия и видообразования. Автор разработал и применил новый метод идентификации С-гетерохроматина на пластинках синаптонемных комплексов при помощи DAPI, который может быть использован также в медицинской цитогенетике и цитогенетике сельскохозяйственных животных.

### **Личный вклад автора**

Автор самостоятельно приготовил препараты распластанных СК всех исследованных видов холоднокровных позвоночных, провел иммуноокрашивание препаратов, провел синтез, мечение полногеномной пробы ДНК гуппи и флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH), выполнил фотографирование препаратов и обработку результатов. Автор отловил экземпляры обоих видов крачек и выполнил обработку микроскопических данных по ним.

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

1. Дивергенция между половыми хромосомами сопровождается уменьшением точности синаптической подгонки в мейозе у гетерогаметного пола, изменением структуры и границ псевдоаутосомных районов и увеличением удельной частоты рекомбинации в их пределах.

2. На половых хромосомах гуппи (*Poecilia*) дифференцированный район располагается между проксимальным и дистальным псевдоаутосомными районами, частота рекомбинации к его краям увеличивается постепенно.

3. Половые хромосомы анолисов родов *Anolis* и *Deiropyx* являются гетероморфными, их структура видоспецифична, граница негомологичного района (боковой петли) фиксирована, однако псевдоаутосомные районы сохраняют значительную протяженность.

4. На половых хромосомах крачек родов *Chlidonias* и *Sterna* наблюдается сокращение псевдоаутосомного района до одного короткого сегмента с четко выраженной границей и более высокой удельной частотой рекомбинации, чем на аутосомах.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 11 работ, включая 7 статей в журналах, входящих в список, рекомендованный ВАК «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата наук».

### **Апробация работы**

Результаты данной работы были представлены и обсуждены на отчетной сессии ИЦиГ СО РАН в 2015 году, на 51-й Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2013), международной конференции «16<sup>th</sup> Evolutionary Biology Meeting» (Марсель, Франция, 2012), международной конференции «19<sup>th</sup> Chromosome Conference» (Болонья, Италия, 2013), международной конференции «22<sup>nd</sup> International Colloquium of Animal Cytogenetics and Gene Mapping» (Тулуза, Франция, 2016).

### **Структура и объем работы**

Работа включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, список литературы (206 источников). Общий объем составляет 113 страниц. Представлено 25 рисунков и 4 таблицы.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ**

В качестве материала для исследования половых хромосом гуппи были использованы обыкновенные гуппи *Poecilia reticulata* (декоративная линия Red) и гуппи Эндлера *Poecilia wingei*, полученные из зоомагазинов. Для приготовления препаратов отбирались молодые половозрелые самцы в возрасте от 3-х месяцев.

В качестве материала для исследования половых хромосом анолисов были использованы образцы, полученные из зоомагазинов. Сортировочные пробы микрохромосом *Anolis carolinensis* были предоставлены В. А. Трифоновым. Были использованы 2 пробы: “L” (X-хромосома и хромосома 14) и “J” (X-хромосома и хромосома 12).

В качестве материала для исследования половых хромосом крачек были использованы птенцы женского пола в возрасте 1-3 суток, отловленные на Карасукской биостанции Института систематики и экологии животных СО РАН (окрестности г. Карасук, Новосибирская область) совместно с А. В. Друзякой и А. Ю. Зотовым. Отлов, содержание и эвтаназия всех животных осуществлялись в соответствии с протоколом, утвержденным Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

Препараты СК готовили из суспензии клеток семенников по методикам Моэнса (Moens, 2006) (группы) и Петерса с соавторами (Peters et al. 1997) (анолисы и крачки). Для приготовления препаратов метафазных мейотических хромосом группы использовали семенники взрослых самцов, выдержанных в течение 6 часов в 0,05% растворе колхицина. Приготовление суспензии и препаратов осуществляли по стандартным методикам.

Иммуноокрашивание проводили по методике Андерсон с соавторами (Anderson et al., 1999) с небольшими модификациями. Для иммунолокализации белков SYCP3, MLH1, белков центромеры использовали поликлональные антитела кролика к SYCP3 человека (Abscam, Великобритания) при разведении 1:1000, моноклональные антитела мыши к белку MLH1 человека (Pharmingen, США) при разведении 1:50, антитела человека к белкам центромеры человека (Sigma-Aldrich) при разведении 1:100 или 1:20 в РВТ. В качестве вторичных антител использовали антитела осли к иммуноглобулинам кролика, конъюгированные с флуоресцентной меткой Cy3 (Jackson Laboratories, США) в разведении 1:200, антитела козы к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с флуоресцентной меткой FITC (Jackson Laboratories, США) в разведении 1:400, антитела козы к иммуноглобулинам человека, конъюгированные с флуоресцентными метками AMCA или FITC (Vector Laboratories) в разведении 1:100 или 1:20 согласно стандартному протоколу. У группы после фиксации результатов иммуноокрашивания проводилось С-подобное окрашивание при помощи DAPI по методу, разработанному автором данной работы (Lisachov, 2013).

Образцы ДНК для получения полногеномной FISH-пробы группы были выделены из цельных тушек самцов обыкновенной группы и группы Эндлера с предварительно удаленными внутренними органами при помощи стандартного набора для выделения ДНК (Ахуген). Амплификация полногеномной пробы была проведена при помощи набора Sigma WGA-4 по протоколу производителя. Включение меченых нуклеотидов (Flu12-dUTP) проводилось при помощи ПЦР. После этого пробу растворяли в гибридизационной смеси. FISH проводили по стандартным протоколам. Окрашивание нитратом серебра проводили по стандартному методу (Howell, Black, 1980). Затем препараты покрывали пластиковой пленкой, и переносили фрагменты на сеточки для электронной микроскопии. Электронно-микроскопический анализ проводили на микроскопе JEM-100 (JEOL, Япония) при напряжении в 80 кВ.

Микроскопический анализ проводили в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Препараты анализировали на микроскопе AxioPlan 2 (ZEISS, Германия) снабженным CCD-

видеокамерой (CV M300, JAI Corporation, Япония), набором комплектов фильтров CHROMA и программным обеспечением для обработки изображений ISIS4 (MetaSystems GmbH, Германия). Яркость и контраст изображений редактировали с использованием пакета PaintShopPro 7.0.

Измерение длин хромосом и относительного положения точек рекомбинации производили при помощи программы MicroMeasure 3.3. Обработку полученных данных проводили в MS Office Excel 2010. Измерение кроссоверной интерференции проводили в программе CODA (Gauthier et al., 2011). Статистические тесты осуществляли в программе STATISTICA. Для построения рекомбинационных карт хромосомы или их плечи разделяли на определенное число равных интервалов, и для каждого интервала подсчитывали относительное число бивалентов, в которых на данном интервале встречаются сигналы MLN1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Начальные этапы дифференциации половых хромосом на примере гуппи (*Poecilia reticulata*, *Poecilia wingei*)

Для гуппи характерна система половых хромосом XY-типа. Исходя из времени дивергенции гуппи и их ближайших родственников в роде *Poecilia*, она возникла 10-15 млн лет назад. Y-хромосома больше, чем X-хромосома, за счет более крупного блока C-гетерохроматина, обогащенного повторенными последовательностями. С Y-хромосомой сцеплено несколько генов, отвечающих за окраску самца.

#### 1.1 Кариотипы. Идентификация XY-бивалента

Практически во всех исследованных клетках у обоих видов гуппи присутствовали 23 акроцентрических бивалента, что соответствует литературным данным о кариотипе гуппи ( $2n=46$ ) (Рис. 1). Полная длина СК составила  $139,9 \pm 20,4$  мкм. Известно, что на половых хромосомах гуппи есть крупный дистальный район полового гетерохроматина, обогащенный повторенными последовательностями (Nanda et al., 1990; Traut, Winking, 2001). Для его визуализации и идентификации полового бивалента были использованы два подхода.

Первый подход, разработанный автором данной работы и показавший свою эффективность на ряде видов животных (Lisachov, 2013), заключался в окрашивании препаратов, обработанных гидроокисью бария по стандартному протоколу предобработки перед C-окрашиванием, флуоресцентным красителем DAPI. Это позволяет визуализировать яркие сегменты, соответствующие сегментам конститутивного гетерохроматина. На аутосомах DAPI-позитивные области выявляются в районе центромеры, остальная часть хромосомы окрашивается значительно бледнее. На половом биваленте помимо центромеры выделяется большой блок гетерохроматина в дистальном районе.

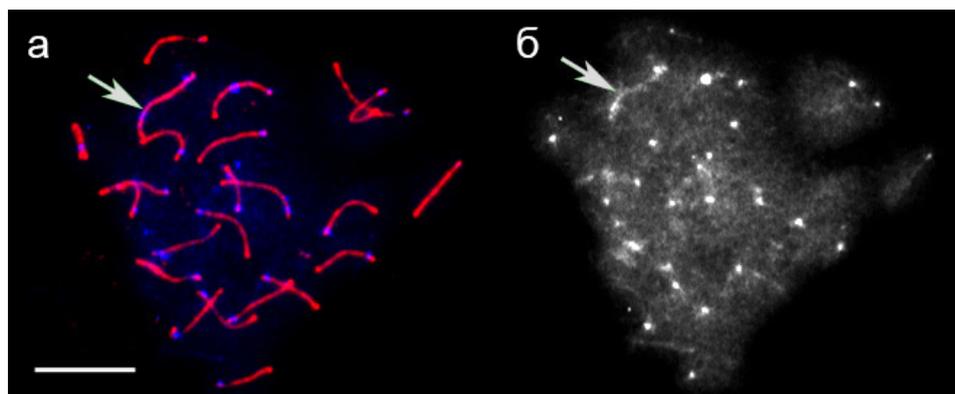


Рисунок 1. С-подобное окрашивание пахитенных хромосом *P. reticulata* по DAPI. Стрелкой выделен половой бивалент с гетерохроматиновым блоком. *a*: SYCP3 (красный), DAPI (синий). *б*: синий канал того же изображения. Масштаб: 5 мкм.

Второй подход заключался в проведении *in situ*-гибридизации с полногеномной пробой, полученной от самца гуппи (геномная *in situ*-гибридизация, GISH). При *in situ*-гибридизации с полногеномными пробами повторенные последовательности гибридизуются активнее, чем уникальные. Так как обе половые хромосомы гуппи содержат большой кластер повторов (на Y-хромосоме он крупнее), на пластинках СК дистальная часть полового бивалента демонстрировала яркий сигнал. (Рис. 2).

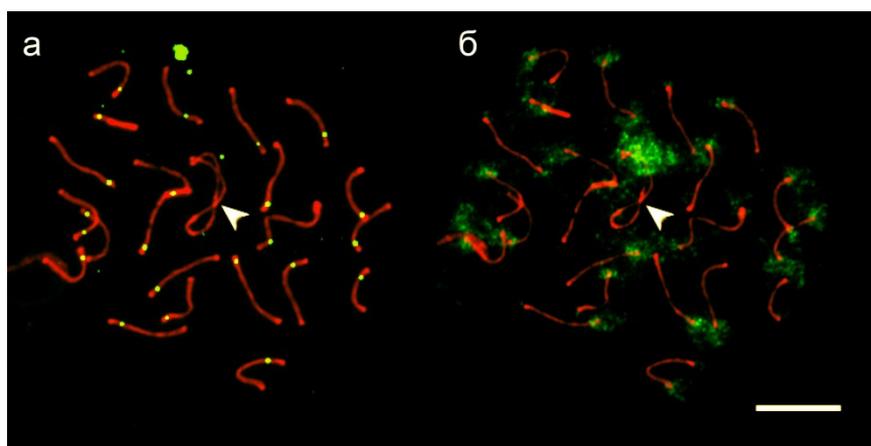


Рисунок 2. Пахитенный сперматоцит *P. reticulata*. *a*: иммуноокрашивание. Красный: SYCP3, зеленый: MLH1. *б*: GISH после иммуноокрашивания. Красный: SYCP3, зеленый: полногеномная проба. Стрелки: половой бивалент. Масштаб: 5 мкм.

## 1.2 Синапсис и рекомбинация половых хромосом и аутосом

Спаривание половых хромосом было задержано, и обычно половой бивалент демонстрировал более раннюю стадию синапсиса, чем аутосомные (Рис. 2). Спаривание половых хромосом всегда начиналось в дистальном сегменте, отмеченном DAPI или полногеномной пробой. Затем следовало негомологичное спаривание дифференцированного сегмента, потом – спаривание гомологичного проксимального сегмента (Рис. 3).

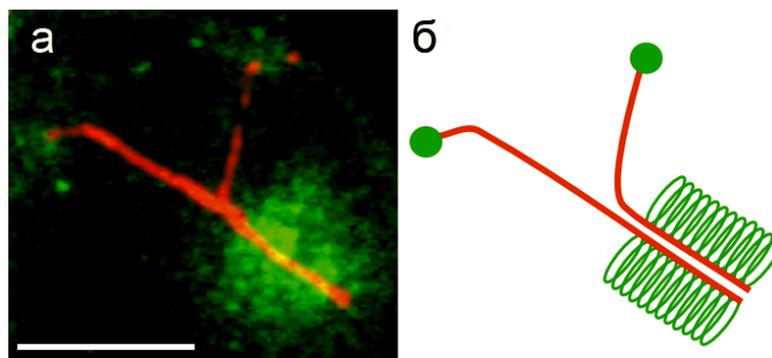


Рисунок 3. Спаривание половых хромосом у *P. reticulata*. *a*: GISH после иммуноокрашивания. Красный: SYCP3, зеленый: GISH-проба. *б*: схема. Красный: SYCP3, зеленый: половой и центромерный хроматин. Масштаб: 2 мкм.

Распределение сигналов MLH1, маркирующих сайты кроссинговера, было проанализировано на 682 аутосомных бивалентах, на которых были достоверно визуализованы центромерные кластеры повторов. Большинство обменов наблюдались в дистальной части хромосомы, с четко выраженным прителомерным пиком (коэффициент асимметрии  $\gamma_1 = -2,1 \pm 0,1$ ; коэффициент эксцесса  $\gamma_2 = 6,2 \pm 0,2$ ) (Рис. 4а).

Распределение сигналов MLH1 на половых хромосомах *P. reticulata* было исследовано на 92 клетках, в которых XY-бивалент был надежно идентифицирован одним из способов, указанных выше. Сигналы MLH1 присутствовали на 80 бивалентах (87%), причем на всех присутствовал лишь один сигнал. Из них 76 (95%) были расположены в терминальной части бивалента, и 4 (5%) – в середине, проксимальнее гетерохроматинового сегмента (Рис. 5). Прителомерный пик на половых хромосомах был сильнее сдвинут к концу хромосомы и имел более кругую форму (коэффициент асимметрии  $\gamma_1 = -3,0 \pm 0,3$ ; коэффициент эксцесса  $\gamma_2 = 9,6 \pm 0,5$ ) (Рис. 4б). Тест Колмогорова-Смирнова показал достоверную разницу в распределении сигналов MLH1 между аутосомами и половыми хромосомами ( $p < 0,001$ ).

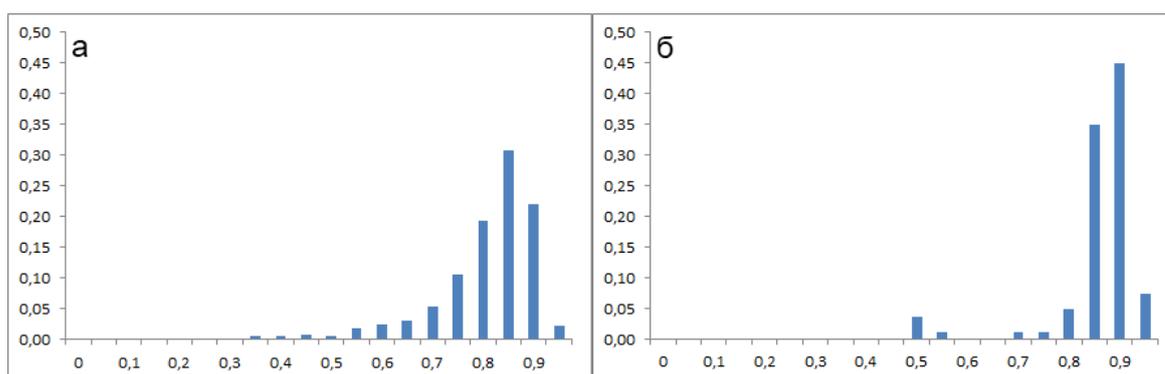


Рисунок 4. Распределение кроссоверов на хромосомах *P. reticulata*. *a*: аутосомы (n=682), *б*: XY-бивалент (n=80). Ось X: относительное расстояние от центромеры. Ось Y: доля бивалентов, несущих сигнал MLH1 в данном сегменте.

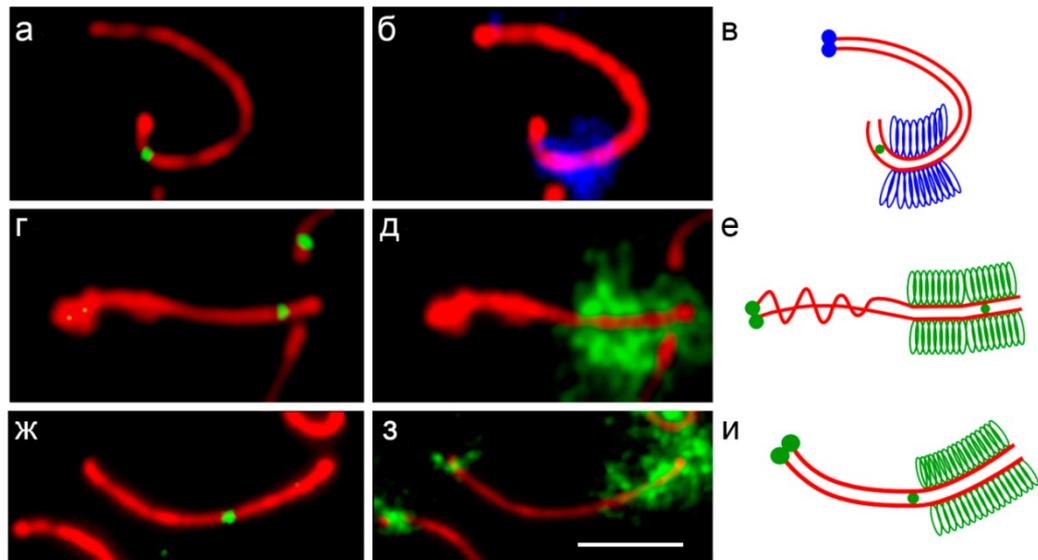


Рисунок 5. Локализация кроссоверов на половых бивалентах *P. reticulata*. а, б, г, д, ж, з: микрофотографии. в, е, и: схемы. а, г, ж: после иммуноокрашивания SYCP3 (красный) и MLH1 (зеленые точки) и С-подобного окрашивания DAPI (синий) (б, в) либо GISH с пробой ДНК самца (зеленый) (д, е, з, и). Масштаб: 2 мкм.

Таким образом, мы установили, что X- и Y-хромосомы гуппи синаптируют позднее аутосом. Эквивализацию длинного сегмента Y-хромосомы в пахитене ранее связывали с дистальным Y-специфичным сегментом, предполагая, что гомологичное объединение проксимальных районов ему предшествует (Traut, Winking, 2001). Эта гипотеза была предложена на основании представления об отсутствии гомологии в дистальной части половых хромосом гуппи. Нам удалось показать ошибочность такой точки зрения. Как следует из наших результатов, спаривание половых хромосом гуппи начинается с дистального участка, а эквивализации подвергается как раз проксимальный гомологичный район.

Большинство кроссоверов на половых хромосомах происходят в дистальном сегменте, а также в середине бивалента. Нерекombинирующий Y-специфичный сегмент находится между этими рекомбинирующими участками. На биваленте он выглядит непропорционально коротко из-за синаптической подгонки более длинной Y-хромосомы к более короткой X-хромосоме. Согласно традиционному представлению о структуре половых хромосом гуппи (Nanda et al., 1993, Traut, Winking, 2001), Y-специфичный нерекombинирующий сегмент, содержащий ген-детерминатор пола, занимает наиболее дистальное положение на хромосоме. Нам удалось установить, что специфичный сегмент не является наиболее дистальным участком на Y-хромосоме гуппи. К принятой схеме мы можем добавить еще один, прителомерный гомологичный район свободной рекомбинации (Рис. 6).

Данные секвенирования и картирования генома гуппи (Wright et al., 2017) подтверждают наши результаты. Согласно им, проксимально на X-хромосоме гуппи расположен первый псевдоаутосомный район (15 Мб), затем следует дифференцированный район (с 15-ой по 25-ую Мб, из которых с 22-ой по 25-ую Мб уровень дифференциации максимальный). Полная длина составляет 26,4 Мб (Künstner et al., 2016), то есть 1,4 Мб приходится на терминальный псевдоаутосомный район. В пределах дифференцированного района существует определенная дивергенция последовательностей между X-хромосомой и Y-хромосомой, однако в целом находящиеся в нем на X-хромосоме

последовательности находят свои гомологи и на Y-хромосоме. Такой небольшой уровень дивергенции дополнительно свидетельствует об эволюционной молодости системы половых хромосом у гуппи. Отдельно из секвенированных геномов самцов выделено 2,3 Мб последовательностей, которые не находят гомологии в геноме самок и которые не были картированы. Обилие повторов в гетерохроматизированном Y-специфичном участке затрудняет его секвенирование и исследование тех его фрагментов, которые не имеют гомологии с X-хромосомой.

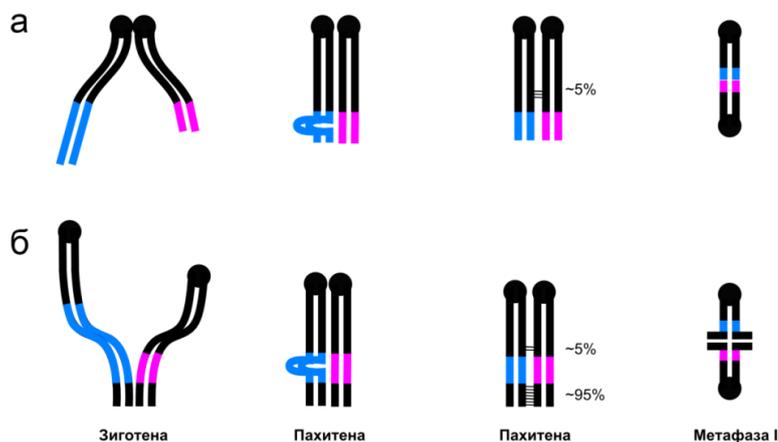


Рисунок 6. Две схемы строения половых хромосом гуппи. *а*: ранее принятая схема по Traut, Winking, 2001; Tripathi et al., 2009; *б*: схема, основанная на наших данных.

## 2. Промежуточные этапы дифференциации половых хромосом на примере анолисов (*Anolis carolinensis*, *Deiroptyx coelestinus*)

Анолисы – представители игуановых ящериц (Pleurodonta), которые дивергировали от ближайших родственников (агам и хамелеонов) 70-120 млн лет назад. У всех игуановых присутствует система XY-хромосом общего происхождения. У видов, сохранивших предковый для игуанообразных кариотип, в том числе у зеленых анолисов (род *Anolis* в узком смысле) и кубинских анолисов (род *Deiroptyx*), они представлены микрохромосомами. Половые хромосомы данных видов анолисов считаются гомоморфными, однако это может быть обусловлено слабой разрешающей способностью традиционного цитогенетического анализа, работающего с конденсированными метафазными хромосомами, в применении к микрохромосомам. Тем не менее, известно несколько генов, утраченных Y-хромосомой.

### 2.1 Кариотипы. Идентификация и синапсис XY-бивалента

Кариотипы анолисов соответствовали описанным для данных видов ранее (Рис. 7) (Gorman, Atkins, 1968). На пахитенных пластинках мы наблюдали 6 макрохромосомных метацентрических бивалентов и 12 микрохромосомных бивалентов ( $2n=36$ ). Полная длина СК составила в среднем  $154,5 \pm 18,0$  мкм у *A. carolinensis* и  $142,6 \pm 23,0$  мкм у *D. coelestinus*.

На пластинках СК обоих видов анолисов был обнаружен гетероморфный микрохромосомный бивалент, состоящий из осевых элементов разного размера (Рис. 8). На ранних стадиях более длинный элемент формировал боковую петлю, которая затем подвергалась синаптической подгонке. На поздних стадиях все биваленты были полностью спарены. Гетеробиваленты были единственными микрохромосомными бивалентами, несущими DAPI-позитивные участки. Мы

соотнесли эти биваленты с описанными ранее для анолисов половыми хромосомами XY-типа (Gamble et al., 2013). Для подтверждения идентификации мы провели FISH с двумя сортированными пробами, включающими X-хромосому. Обе пробы гибридизовались с гетеробивалентом на *A. carolinensis* (Рис. 7). На *D. coelestinus* не удалось получить специфический сигнал. Однако сходство морфологии и DAPI-окрашивания говорит о том, что гетеробивалент *D. coelestinus*, также представляет собой половые хромосомы.

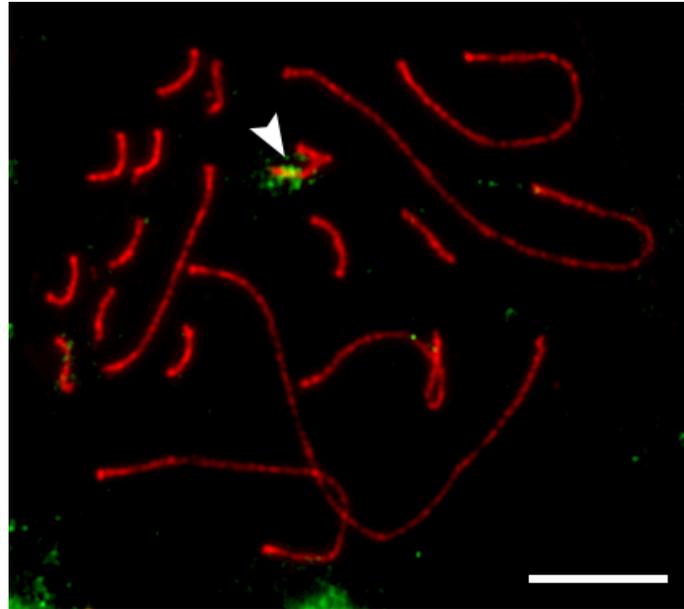


Рисунок 7. Пластинка СК *A. carolinensis*. Красный: SYCP3, зеленый: проба “L”. Стрелка указывает на половой бивалент. Масштаб: 5 мкм.

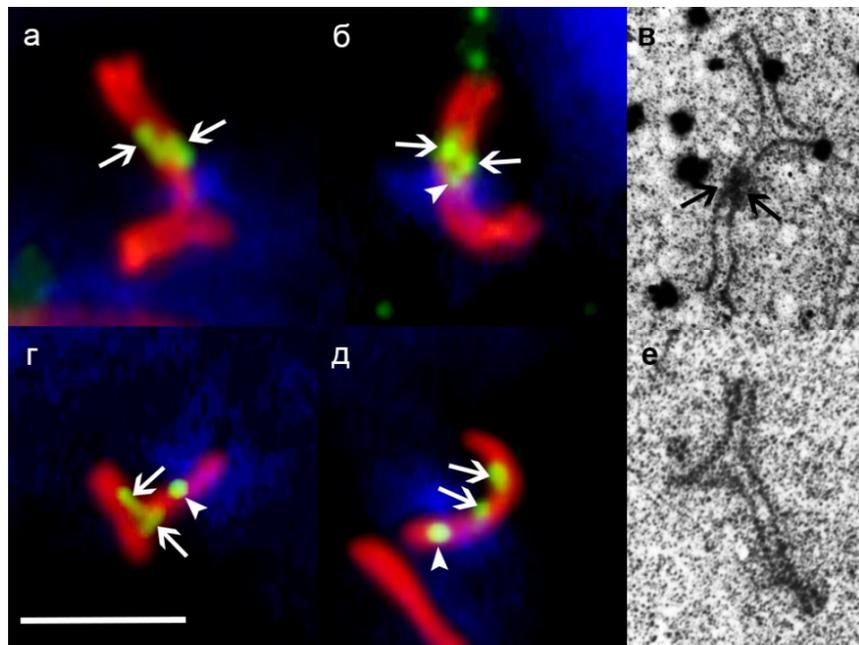


Рисунок 8. Половой бивалент *A. carolinensis* и *D. coelestinus*. Красный: SYCP3, зеленый: центромера (большие стрелки) и MLH1 (малые стрелки), синий: DAPI. *a, c*: иммуноокрашивание, ранняя стадия синапсиса. *б, д*: иммуноокрашивание, поздняя стадия синапсиса. *в, е*: ранняя стадия синапсиса, электронная микроскопия. Масштаб: 3 мкм.

## 2.2 Рекомбинация половых хромосом и аутосом

Распределение сигналов MLH1 по длине макрохромосом было очень неравномерно. Более 90% сигналов оказались сосредоточены в терминальных 10-20% длин хромосомных плеч (Рис. 9). Однако интерференция, измеренная при помощи программы CODA, оказалась небольшой. У *A. carolinensis* значение  $v$  составило 5,6 (95% доверительный интервал 5,0-6,7), а у *D. coelestinus* оно составило 5,0 (95% доверительный интервал 4,5-5,5). Это значит, что дистализация кроссоверов не связана у анолисов с их взаимодействием друг с другом, и объясняется скорее сильным центромерным эффектом. На микрохромосомах, кроме половых, кроссоверные обмены из-за их маленького размера были распределены равномерно.



Рисунок 9. Распределение сигналов MLH1 на макрохромосомных СК анолисов на примере СК1 *A. carolinensis*. Зеленый цвет: 3 сигнала, красный цвет: 2 сигнала, синий цвет: 1 сигнал. Черная отметка: центромера. Ось X: расстояние от центромеры (1 интервал – 1 мкм средней длины СК). Ось Y: относительное число бивалентов, содержащих сигнал в указанном интервале.

Большинство сигналов MLH1 на половых хромосомах обоих видов анолисов находились на плече, отмеченном DAPI-позитивным фрагментом (Рис. 8). У обоих видов это плечо было q-плечом короткого гомолога, у *A. carolinensis* в редких случаях сигнал MLH1 располагался на p-плече. При этом у рассмотренных видов отличалось положение боковой петли относительно DAPI-позитивного плеча. У *D. coelestinus* петля располагалась на другом плече (p-плечо короткого гомолога). У *A. carolinensis* петля располагалась на том же плече, проксимальнее гомологичного сегмента. У *A. carolinensis* сайты MLH1 также присутствовали на p-плече и в терминальной части q-плеча за петлей.

Таким образом, мы показали, что между X- и Y-микрохромосомами анолисов существуют морфологические отличия. Более длинная хромосома при синапсисе формирует боковую петлю. Кроссоверы находятся в любом месте вне петли, следовательно, она включает хромосома-специфичные последовательности, которых нет на другом гомологе. Так как при дифференциации Y-хромосома может и терять, и приобретать ДНК, мы не знаем, какой из гомологов является X-хромосомой, а какой – Y-хромосомой.

Так как терминальная зона короткого плеча половых хромосом *D. coelestinus* (предположительно гомологичная терминальной зоне длинного плеча половых хромосом *A. carolinensis*) демонстрирует ровное спаривание, мы предполагаем, что гомология может существовать и там. В противном случае, вероятно, наблюдалась бы не петля, а укорачивание свободного длинного конца, как у птиц и гуппи. Разница в расположении петли у двух видов анолисов отражает изменения в

структуре половых хромосом, произошедшие с момента дивергенции *A. carolinensis* и *D. coelestinus*. На основании карт гомологичных и дифференцированных районов на половых хромосомах анолисов можно реконструировать их происхождение.

Мы предполагаем, что половые хромосомы “carolinensis-типа” являются более архаичными, а хромосомы “coelestinus-типа” могли возникнуть из них путем инверсии. Вначале инверсия переместила центромеру ближе к дифференцированному сегменту, но между ней и этим сегментом остался гомологичный участок. Затем рекомбинация в этом участке перенесла инверсию на гомологичную хромосому, и впоследствии он поглотился дифференцированным сегментом. Также проксимальный гомологичный участок длинного плеча мог поглотиться дифференцировкой и без инверсий. Так как у *D. coelestinus* петля непосредственно прилегает к центромере, обратный процесс маловероятен (Рис. 10).

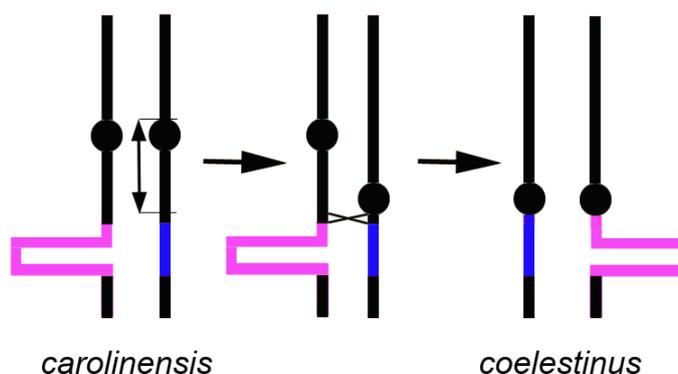


Рисунок 10. Схемы строения половых хромосом *A. carolinensis* и *D. coelestinus* и предположительная схема их эволюции путем инверсии.

### 3. Поздние этапы дифференциации половых хромосом на примере крачек (*Sterna hirundo*, *Chlidonias niger*)

ZW-хромосомы птиц, по сравнению с половыми хромосомами рыб и рептилий, достаточно хорошо исследованы. Считается, что они возникли 100-150 млн лет назад. Для новонёбных птиц (Neognathae) характерны почти полностью дивергировавшие половые хромосомы, сохраняющие лишь небольшой псевдоаутосомный район. Однако у многих видов птиц как структура половых хромосом, так и кариотип в целом еще не описаны. Среди таких видов – крачки (Sternidae), одно из самых широко распространенных семейств птиц.

#### 3.1 Кариотипы

На распластаных пластинках СК *Ch. niger* присутствовало 37 бивалентов ( $2n=74$ ), 36 аутосомных и ZW-бивалент. Из аутосомных 14 бивалентов были макрохромосомными и 22 бивалента микрохромосомными. Общая длина СК составила  $288,3 \pm 47,5$  мкм. Размеры, морфология и обозначения макробивалентов *Ch. niger* приведены в Таблице 1. Z-хромосома до синаптической подгонки имела ЦИ= $0,45 \pm 0,04$ . В 7 клетках с наиболее ранними стадиями синапсиса ее длина составила  $28,3 \pm 5,3$  мкм (максимум – 32,4 мкм). W-хромосома на ранних стадиях синапсиса имела длину  $15,4 \pm 2,8$  мкм и ЦИ= $0,35 \pm 0,04$ . Среди микро-бивалентов присутствовали 19 акроцентриков и 3 метацентрика.

На распластанных пластинках СК *S. hirundo* присутствовало 34 бивалента ( $2n=68$ ), 33 аутомсомных и ZW-бивалент. Из аутомсомных 11 бивалентов были макрохромосомными и 22 бивалента микрохромосомными. Общая длина СК составила  $237,9 \pm 38,9$  мкм. Размеры, морфология и обозначения макробивалентов *S. hirundo* приведены в Таблице 1. Z-хромосома до синаптической подгонки имела длину  $23,2 \pm 4,3$  мкм и ЦИ= $0,44 \pm 0,05$ . W-хромосома имела длину  $10,3 \pm 2,6$  мкм и ЦИ= $0,36 \pm 0,04$ . Среди микро-бивалентов присутствовали 22 акроцентрика и 1 метацентрик. Пластинки СК и идиограммы карิโอотипов крачек показаны на Рис. 11.

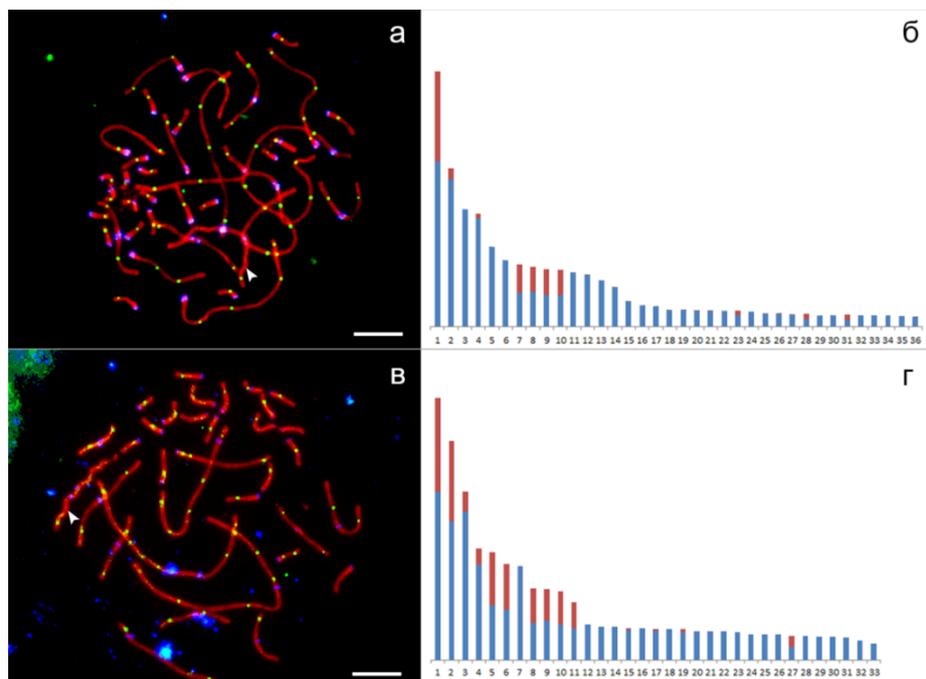


Рисунок 11. Хромосомные наборы черной (а,б) и речной (в,з) крачек.  
 а,в: пластинки СК ооцитов. Красный цвет: SYCP3, зеленый цвет: MLH1, синий цвет: центромера. Стрелка указывает половой бивалент. Масштаб: 5 мкм. б,з: идиограммы аутомсом. Красным обозначено короткое плечо, синим - длинное плечо.

### 3.2 Синапсис и рекомбинация Z- и W-хромосом

Идентификация полового бивалента у крачек была возможна по морфологии и не требовала дополнительных методик. Спаривание Z- и W-хромосом у крачек частично рассинхронизовано со спариванием аутомсом: неспаренные или не полностью спаренные половые хромосомы часто наблюдались при полностью спаренных аутомсомах. Инициация спаривания происходит в коротком плече W-хромосомы, затем продолжается до ее конца. Затем более длинная Z-хромосома начинает оборачиваться вокруг W-хромосомы, одновременно укорачиваясь (Рис. 12).

Для картирования псевдоаутомсомного района мы определили локализацию сайтов MLH1 на половых хромосомах. Псевдоаутомсомный район был расположен в терминальной части короткого плеча W-хромосомы и одного из плеч Z-хромосомы. У *Ch. niger* его длина составляет примерно 30% от длины короткого плеча W-хромосомы, наиболее проксимальная координата сайта MLH1 составила 71,2%. Однако 85% сайтов MLH1 находились на терминальных 20% плеча. У *S. hirundo* его длина также составляет примерно 30% от длины короткого плеча, наиболее проксимальная координата сайта MLH1 составила 69,5%. Большинство

сайтов MLH1, однако, приходится на последние 20% длины короткого плеча. Максимально удаленные от теломеры в абсолютном отношении сайты MLH1 располагались у черной крачки на расстоянии 1,8 мкм от конца бивалента, а у речной крачки на расстоянии 1,2 мкм. Ближайшие к теломере сайты находились у черной крачки на расстоянии 0,3 мкм, у речной на расстоянии 0,2 мкм. Средняя удаленность сайтов MLH1 от теломеры составила  $0,8 \pm 0,3$  мкм у черной крачки и  $0,6 \pm 0,2$  мкм у речной крачки.

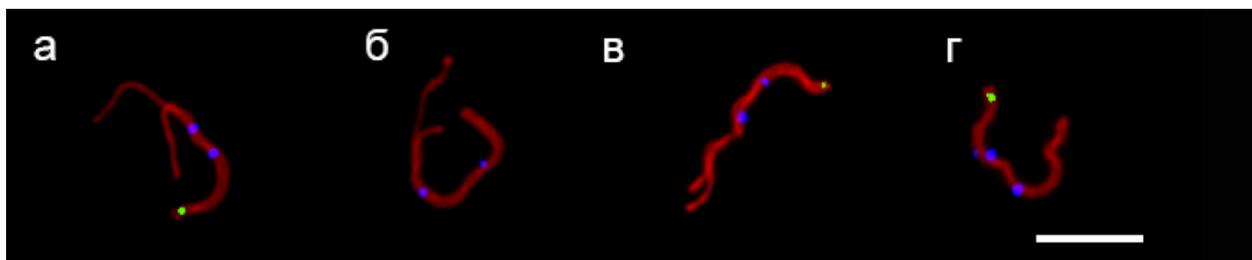


Рисунок 12. Спаривание полового бивалента у речной крачки (*Sterna hirundo*). а-г: последовательные стадии синапсиса. Красный: SYCP3, зеленый: MLH1, синий: центромера. Масштаб: 5 мкм.

### 3.3 Рекомбинация аутосом

Среднее число сайтов MLH1 на аутосомных СК на клетку составило  $53,0 \pm 4,2$  у *Ch. niger* и  $44,1 \pm 5,0$  у *S. hirundo*. Для получения длины рекомбинационной карты мы умножили это число на 50 (один кроссовер – 50 сМ) и добавили 50 сМ для полового бивалента. Таким образом, длина рекомбинационной карты для *Ch. niger* составила 2700 сМ, а для *S. hirundo* – 2254 сМ.

Для визуализации распределения кроссоверов вдоль аутосом все плечи были разделены на равные интервалы, в каждом интервале подсчитано относительное число сигналов MLH1. Каждой аутосоме или группе неразличимых аутосом было присвоено обозначение из аббревиатуры латинского названия вида (SH1 для *S. hirundo* и CNI для *Ch. niger*). Распределение сайтов MLH1 у *Ch. niger* и *S. hirundo* на примере хромосомы 1 показано на Рис. 13. Сайты MLH1 на аутосомах у крачек распределены равномернее, чем у группы и тем более у анолисов.

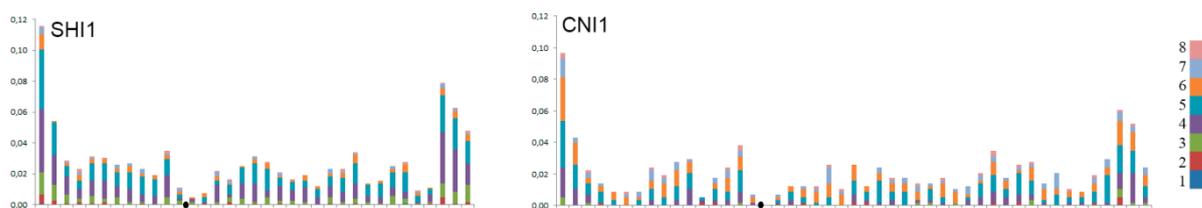


Рисунок 13. Распределение сайтов MLH1 на первой хромосоме *Ch. niger* (справа) и *S. hirundo* (слева). Цветовая шкала показана сверху справа. Черная отметка: центромера. Ось X: расстояние от центромеры (1 интервал – 1 мкм средней длины СК). Ось Y: относительное число бивалентов, содержащих сайты MLH1 в указанном интервале.

Мы впервые описали кариотип черной крачки ( $2n=74$ ) и уточнили описание кариотипа речной крачки ( $2n=68$ ). Так как хромосомный набор *S. hirundo* похож на кариотип, описанный для отдаленно родственного вида, чайки *Larus fuscus*, можно предположить, что он является предковым, а кариотип *Ch. niger* – модифицированным (Намтар, 1970).

Крачки характеризуются высоким уровнем рекомбинации, до 8 кроссоверов на ауtosомный бивалент, и более равномерным распределением кроссоверов, чем гуппи и анолисы. В этом они подобны большинству других птиц.

Половые хромосомы крачек синаптируют позднее ауtosом, в ходе синапсиса происходит подгонка более длинной Z-хромосомы к более короткой W-хромосоме. Мы не обнаружили никаких различий в морфологии, спаривании и рекомбинации половых хромосом у двух видов крачек. Это соответствует данным о большой консервативности как половых хромосом, так и в целом кариотипов у птиц (Ellegren, 2010).

#### 4. Заключение

При сравнении мейотического поведения половых хромосом гуппи, анолисов и птиц видно, что дивергенция между гетероморфными хромосомами в этом ряду нарастает. Это отражается в морфологии бивалента: по мере увеличения эволюционного возраста и степени дивергенции увеличивается степень его отличия от ауtosомных бивалентов. У всех трех таксонов в процессе синаптической подгонки ослабевают морфологические отличия между половым бивалентом и ауtosомными.

У гуппи он демонстрирует задержанное спаривание и при незавершенной эквивализации выглядит утолщенным, но на поздних стадиях морфологически неотличим от ауtosомных. У анолисов присутствует боковая петля, которая выравнивается лишь на наиболее поздних стадиях, что часто приводит к смещению центромера. Тем не менее, на многих пластинках смещение центромера не наблюдается и половой бивалент после подгонки не отличается от ауtosомных. Причина формирования боковой петли состоит в том, что значительно различные по размеру гомологи начинают синаптировать с двух концов, и синапсис распространяется к середине. У гуппи подобная петля не формируется, так как синапсис и половых хромосом, и ауtosом у них инициируется на одном конце, а не с обоих концов хромосомы. У птиц на ранних стадиях пахитены не спарены значительные участки более длинной Z-хромосомы, на любой стадии не выравнены центромеры и в большинстве клеток даже после синаптической подгонки видна Z-хромосома, оборачивающаяся вокруг W-хромосомы.

Наращение различий с возрастом половых хромосом проявляется и в рекомбинации. Основным направлением эволюции является увеличение относительно размера участков хромосом, запертых для рекомбинации, и, соответственно, сокращение размеров псевдоауtosомного района. У гуппи, судя по распределению кроссоверов, между рекомбинирующим и нерекомбинирующим районами не четкой грани: число кроссоверов на границах района подавленной рекомбинации падает постепенно. О том же свидетельствует слабая дивергенция между гомологичными X- и Y-последовательностями в пределах дифференцированного района половых хромосом гуппи (Wright et al., 2017). На половых хромосомах *A. carolinensis* в состав петли входит около трети длины длинного гомолога, у *D. coelestinus* около половины. В отличие от гуппи, у которых нерекомбинирующие сегменты гетероморфных хромосом сохраняют большую степень гомологии, у анолисов на X-хромосоме картировано много генов, которых на Y-хромосоме нет (Rupp et al., 2016). Поэтому их псевдоауtosомный район имеет более четкую границу, проявляющуюся и в морфологии бивалента. У крачек не рекомбинирует всё длинное плечо и 80% короткого плеча W-хромосомы.

Сокращение допустимой зоны для рекомбинации, при сохранении необходимости кроссинговера в половом биваленте для успешной сегрегации половых хромосом, постепенно усиливает удельную интенсивность рекомбинации в пределах псевдоаутосомного района и делает ее выше, чем в аутосомах.

У высших млекопитающих (сумчатых и плацентарных) поведение половых хромосом в мейозе резко отличается от поведения аутосом. Они, как правило, спариваются не полностью, а также подвергаются транскрипционной инактивации (Turner et al., 2005; Turner, 2007). У птиц половые хромосомы в пахитене также инактивируются, несмотря на полный синапсис и отсутствие «полового пузырька» (Schoenmakers et al., 2009). Неизвестно, есть ли инактивация у рептилий, рыб и других позвоночных с более молодыми половыми хромосомами. Исследования анеуплоидных мутантов млекопитающих (например, ХУУ) показывают, что данный эффект не зависит от природы хромосом: две Y-хромосомы формируют нормальный рекомбинирующий бивалент и инактивации не подвергаются (Turner, 2007). Следовательно, все особенности поведения XY-хромосом млекопитающих в мейозе являются проявлением неспецифичного мейотического сайленсинга неспаренного хроматина, MSUC. Вопрос о причинах такого резкого отличия в мейотическом поведении гоносом млекопитающих от гоносом других позвоночных сводится, таким образом, к вопросу о причинах отсутствия у млекопитающих полного синапсиса между X- и Y-хромосомами.

Как показывают половые хромосомы птиц, для полного синапсиса не обязательно наличие протяженных районов гомологии. Следовательно, неспособность половых хромосом млекопитающих полностью синаптировать связана, вероятно, с большой разницей в длине.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые с использованием иммунофлуоресцентной локализации белков, вовлеченных в синапсис и рекомбинацию хромосом (SYCP3, MLH1) и белков центромеры, а также FISH с хромосом-специфичными и геномными пробами выявлены закономерности синапсиса и рекомбинации половых хромосом и аутосом у носителей половых хромосом разного эволюционного возраста (10-15 млн лет у гуппи, 70-80 млн лет у анолисов, и более 120 млн лет у крачек). Установлено, что по мере увеличения степени дивергенции половых хромосом затрудняется синаптическая подгонка и уменьшается ее итоговая точность; граница региона подавленной рекомбинации на биваленте становится выражена резче.

2. Впервые показано, что, в противовес ранее принятой модели, синапсис эволюционно молодых половых X- и Y-хромосом гуппи, как и их аутосом, начинается в дистальном районе, где локализуется подавляющее большинство кроссоверов. За терминальным псевдоаутосомным районом следует дифференцированный сегмент половых хромосом, где рекомбинация сильно подавлена, и проксимальный псевдоаутосомный район.

3. Впервые показано, что, в противовес ранее принятой точке зрения, X- и Y-микрохромосомы каролинского и белогубого анолисов различаются по размеру и морфологии. На них определена локализация дифференцированного района. Выявлена инверсия, отличающая друг от друга половые хромосомы изученных видов. Из-за разницы в размерах половых хромосом на ранних стадиях синапсиса на половом биваленте формируется боковая петля, которая в ходе синаптической

подгонки исчезает. Показано, что на промежуточных этапах дифференциации половых хромосом рекомбинационная граница между дифференцированным и псевдоаутосомными районами становится четче, но районы свободной рекомбинации продолжают составлять значительную часть хромосомы.

4. Впервые выявлены кариотипические различия между речной и черной крачками, описаны особенности синапсиса и рекомбинации их Z- и W-хромосом, определены размеры и расположение псевдоаутосомного района. Половые хромосомы крачек синаптируют позднее аутосом, в ходе синапсиса происходит подгонка более длинной Z-хромосомы к более короткой W-хромосоме. Несовершенство подгонки проявляется в невыравнивании центромер. Псевдоаутосомный район занимает короткий дистальный сегмент на р-плече W-хромосомы. Показано, что при сокращении псевдоаутосомного района до минимальных размеров интенсивность рекомбинации на нем становится выше, чем на аутосомах, и граница цитологически идентифицируемого псевдоаутосомного района становится выражена резче.

#### **Список основных статей, опубликованных по теме диссертации**

1. **Lisachov A. P.** New method for visualization of C-heterochromatin in synaptonemal complex spreads // *Comparative Cytogenetics*. 2013. V. 7. I. 2. P. 131-138.
2. Borodin P. M., Basheva E. A., Golenischev F. N., Dashkevich O. A., Kartavtseva I. N., **Lisachov A. P.**, Torgasheva A. A. Parallel occurrence of asynaptic sex chromosomes in gray voles // *Paleontological Journal*. 2013. V. 47. I. 9. P. 1-6.
3. **Lisachov A. P.**, Zadesenets K. S., Rubtsov N. B., Borodin P. M. Sex chromosome synapsis and recombination in male guppies // *Zebrafish*. 2015. V. 12. I. 2. P. 174-180.
4. **Lisachov A. P.**, Trifonov V. A., Giovannotti M., Ferguson-Smith M. A., Borodin P. M. Heteromorphism of “homomorphic” sex chromosomes in two anole species (Squamata, Dactyloidae) revealed by synaptonemal complex analysis // *Cytogenetic and Genome Research*. 2017. doi: 10.1159/000460829
5. **Lisachov A. P.**, Trifonov V. A., Giovannotti M., Ferguson-Smith M. A., Borodin P. M. Immunocytological analysis of meiotic recombination in two anole lizards (Squamata, Dactyloidae) // *Comparative Cytogenetics*. 2017. V. 11. I. 1. P. 129-141.
6. **Лисачев А. П.**, Бородин П. М. Портрет Y-хромосомы в юности // *Природа*. 2014. V. 11. I. 1191. P. 23-31.
7. **Лисачев А. П.**, Малиновская Л. П., Друзьяка А. В., Бородин П. М., Торгашева А. А. Синапсис и рекомбинация аутосом и половых хромосом у двух видов крачек (Sternidae, Charadriiformes, Aves) // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017. V. 21. I. 2. P. 259-268.