

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

МАЛИНОВСКАЯ ЛЮБОВЬ ПЕТРОВНА

**ХРОМОСОМА, СПЕЦИФИЧНАЯ ДЛЯ КЛЕТОК
ЗАРОДЫШЕВОГО ПУТИ, У ПЕВЧИХ ВОРОБЬИНЫХ ПТИЦ**

1.5.7. Генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
к. б. н. А.А.Торгашева

НОВОСИБИРСК – 2021

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ	5
Актуальность исследования	5
Цель и задачи исследования	7
Научная новизна	7
Научно-практическая ценность.....	7
Основные положения, выносимые на защиту	8
Личный вклад автора.....	8
Апробация работы	8
Публикации	9
Структура и объём работы.....	9
Благодарности	9
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1 Запрограммированная элиминация ДНК у многоклеточных животных	10
1.1 Филогенетическое распространение запрограммированной элиминации ДНК.....	10
1.2 Состав последовательностей ДНК, подвергающихся элиминации, и возможная роль этого процесса в развитии у различных организмов	20
1.3 Хромосомная элиминация у птиц.....	21
2 Особенности женской репродуктивной системы птиц.....	27
2.1 Основные события женского мейоза у птиц	28
3 Обоснование модели и методов исследования GRC у птиц	30
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
Экспериментальные животные	33
Приготовление препаратов распластанных хромосом и иммуноокрашивание	35

Приготовление препаратов митотических метафазных хромосом	35
Получение Cot-1 ДНК	36
Приготовление GRC-специфичных гибридизационных проб и флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i>	36
Микроскопический анализ и обработка изображения.....	37
Измерения и статистический анализ	37
РЕЗУЛЬТАТЫ.....	38
1 Анализ распространенности GRC среди птиц.....	38
1.1 Анализ распространенности GRC среди представителей отряда Воробьинообразные	38
1.2 Анализ распространенности GRC за пределами отряда Воробьинообразные	46
2 Сравнительный анализ генетического содержания GRC с помощью межвидовой FISH с GRC-специфичными пробами	49
3 GRC у ласточки-береговушки, бледной ласточки и большой синицы: синапсис, рекомбинация и вариация числа копий	52
3.1 Вариация числа копий GRC у самок ласточки-береговушки, бледной ласточки и большой синицы	53
3.2 Вариация числа копий GRC у самцов бледной ласточки,	57
ОБСУЖДЕНИЕ.....	61
1 Происхождение и филогения GRC у певчих птиц.....	61
2 Сценарии наследования GRC у бледной ласточки, большой синицы и зебровой амадины	64
ВЫВОДЫ.....	72
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	73

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДНР – двунитевой разрыв

КЗП – клетки зародышевого пути

МІ – первое деление мейоза

МІІ – второе деление мейоза

ПЗК – примордиальные зародышевые клетки

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РХР – район хромосомного разрыва

СК – синаптонемный комплекс

АМСА – aminomethylcoumarin acetate (ацетат аминометилкумарина)

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole (4,6-диамидино-2-фенилиндол)

FISH – fluorescence *in situ* hybridization (флуоресцентная гибридизация *in situ*)

FITC – fluorescein isothiocyanate (флуоресцеинизотиоционат)

GRC – germ-line-restricted chromosome (хромосома, специфичная для клеток зародышевого пути)

PBS – phosphate buffered saline (фосфатно-солевой буфер)

TRD – transmission ratio distortion (нарушение менделевское соотношения передач)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Явление запрограммированной элиминации ДНК было впервые открыто у паразитических аскарид около 130 лет назад и с тех пор было описано у более 100 видов организмов, принадлежащих к различным таксономическим группам, таким как нематоды, веслоногие рачки, миноги, миксины и другие (Goday, Esteban, 2001; Wang, Davis, 2014; Streit, Davis, 2016). У этих видов происходит запрограммированная потеря целых хромосом или их фрагментов на разных стадиях клеточного цикла.

Среди птиц впервые явление запрограммированной элиминации было описано для двух видов семейства Астрильдовые (Estrildidae) подотряда певчие птицы отряда Воробьинообразные. Из соматических клеток и сперматоцитов II порядка зебровой амадины (*Taeniopygia guttata*) и японской амадины (*Lonchura striata domestica*) (время дивергенции около 8-10 млн. лет (Hooper, Price, 2015)) элиминировалась самая крупная акроцентрическая хромосома. Она была названа хромосомой, специфичной для клеток зародышевого пути (germline-restricted chromosome, GRC) (Pigozzi, Solari, 1998; del Priore, Pigozzi, 2014). Эта хромосома присутствовала в одной копии в пахитенных сперматоцитах, в двух копиях в пахитенных ооцитах и передавалась по материнской линии. Долгое время оставалось неясным, насколько распространено это явление среди птиц, каковы свойства, функции и генетический состав GRC. Какую степень гомологии сохраняют GRC зебровой и японской амадины и как быстро происходит дивергенция генетического содержания этой хромосомы. Неизвестны механизмы элиминации GRC и особенности ее передачи в ряду поколений.

В 2015 году в нашей лаборатории GRC была обнаружена у ласточки-береговушки (*Riparia riparia*) и бледной ласточки (*Riparia diluta*) (время дивергенции около 2 млн. лет (Pavlova et al., 2008)). По морфологии и поведению в мейозе она была схожа с GRC зебровой и японской амадины. Однако оставалось неясным, является ли происхождение GRC у ласточки и амадины независимым, или эта хромосома существовала у общего предка Воробьинообразных. Для ответа на

этот вопрос, было необходимо выяснить, насколько широко распространена GRC у представителей разных таксонов птиц, и оценить степень гомологии между GRC разных видов.

Чтобы оценить распространенность GRC и определить приблизительное время возникновения этой хромосомы, мы провели анализ соматических и пахитенных кариотипов широкого спектра видов воробьинообразных птиц и видов за пределами этого отряда и обнаружили, что GRC характерна для всех изученных певчих птиц и не встречается за пределами отряда Воробьинообразные.

Для того, чтобы оценить степень гомологии между GRC разных видов и проследить динамику эволюции этой хромосомы в разных линиях птиц, была проведена серия экспериментов по внутри- и межвидовой флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с GRC-специфичными микродиссекционными пробами.

Важной нерешенной задачей является определение механизмов передачи GRC в ряду поколений. В пахитенных сперматоцитах зебровой амадины GRC присутствует в одной копии и формирует унивалент, который элиминируется после первого мейотического деления. Наследственная передача GRC осуществляется по материнской линии, где GRC, как правило, присутствует в двух копиях. На основании этих данных Pigozzi и Solari (2005) предложили модель наследования GRC, согласно которой все зиготы получают одну копию GRC. Две копии GRC у самок образуются в результате нерасхождения хроматид во время дифференцировки зародышевой и соматической линии клеток. Однако в рамках этой модели ряд проблем передачи GRC в мейозе и митозе зародышевой линии остается нерешенным.

Прямое исследование механизмов передачи GRC затруднено из-за недоступности ооцитов I и II порядка на стадии метафазы мейоза. Для того, чтобы косвенно оценить особенности наследственной передачи GRC, мы провели детальный анализ копийности и поведения GRC на разных стадиях гаметогенеза у самок и самцов ласточки-береговушки и бледной ласточки из семейства Ласточковые (Hirundinidae) и у большой синицы из семейства Синицевые (Paridae) подотряда певчие птицы. В результате анализа были получены уникальные данные о полиморфизме и мозаицизме GRC у самок и самцов, на основе которых предложен альтернативный сценарий трансмиссии GRC.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы является исследование поведения в мейозе и наследственной передачи хромосомы, специфичной для клеток зародышевого пути (GRC), и оценка распространенности этой хромосомы среди птиц.

Задачи:

1. Определить степень распространенности GRC у птиц, и оценить эволюционное время ее возникновения;
2. Определить степень гомологии между GRC различных видов птиц;
3. Исследовать копийность и поведение GRC в мейозе у ласточки-береговушки, бледной ласточки и большой синицы и предложить модель наследования GRC в ряду поколений.

Научная новизна

Впервые GRC обнаружена у всех рассмотренных 14 представителей подотряда певчие птицы отряда Воробьинообразные. Ранее считалось, что эта хромосома содержится в клетках зародышевой линии только у зебровой и японской амадины. Проанализированные виды из отрядов Попугаеобразные, Соколообразные, Стрижеобразные, Ржанкообразные, Голубеобразные, Гусеобразные и Курообразные не имели этой хромосомы. Впервые выявлена значительная вариация в размере синаптонемного комплекса GRC: у восьми видов GRC была одной из макрохромосом (макро-GRC), у шести видов GRC была одной из микрохромосом (микро-GRC). Впервые с использованием GRC-специфичных проб показана гомология между GRC разных видов. Впервые выявлен мозаицизм по числу копий GRC у самцов бледной ласточки и самок ласточки-береговушки и большой синицы. Предложен сценарий наследования GRC у бледной ласточки, большой синицы и зебровой амадины.

Научно-практическая ценность

Результаты данной работы расширяют представления о распространенности феномена запрограммированной элиминации ДНК среди птиц. Полученные данные проливают свет на эволюцию генетического содержания и поведения в мейозе хромосомы, специфичной для клеток зародышевого пути, в линии певчих

воробьиных птиц. Результаты работы могут быть использованы для преподавания курсов цитогенетики и эволюционной биологии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Виды подотряда певчие птицы содержат специфичную для клеток зародышевого пути дополнительную хромосому (GRC), размер которой варьирует у разных видов от микро- до макрохромосомы.

2. Последовательности, входящие в состав GRC, у разных видов певчих птиц гомологичны разным районам хромосом основного набора.

3. В популяциях ласточки-береговушки, бледной ласточки и большой синицы поддерживается полиморфизм и мозаицизм по числу копий GRC.

Личный вклад автора

Автор участвовал в отлове взрослых особей бледной ласточки и сборе птенцов ласточек-береговушек, бледных ласточек, большой синицы и мухоловки-пеструшки. Автором были приготовлены препараты распластанных синаптонемных комплексов (СК) большинства видов, кроме черной крачки, черного стрижа, чижа, обыкновенного снегиря и амадины Гульда. Также автор самостоятельно проводил иммуноокрашивание большинства препаратов, получение $C_{\alpha}t-1$ ДНК бледной ласточки, выделение костного мозга и приготовление препаратов митотических метафазных пластинок. Автором выполнено фотографирование и анализ изображений на флуоресцентном микроскопе, а также обработка и анализ полученных экспериментальных данных.

Апробация работы

Результаты данной работы были представлены и обсуждены на: 11й Международной мультikonференции по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (Новосибирск, 2018), 22й Международной хромосомной конференции (Прага, Чешская республика, 2018), Международном симпозиуме «Экология и эволюция: новые горизонты» (Екатеринбург, 2019), VII Съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Санкт-Петербург, 2019), семинаре по мейозу ЕМВО (Ла-Рошель, Франция, 2019).

Публикации

Материал диссертации представлен в 12 публикациях, в том числе в 6 статьях в зарубежных (5) и отечественных (1) реферируемых журналах, входящих в международные базы цитирования (WoS, Scopus).

Структура и объём работы

Работа включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, список использованной литературы (133 источника). Общий объём составляет 83 страницы. Представлено 18 рисунков и 5 таблиц.

Благодарности

Автор искренне признателен научному руководителю А.А. Торгашевой и профессору кафедры цитологии и генетики НГУ П.М. Бородину за руководство и всестороннюю помощь; И.Г. Коробицыну, Е.П. Шнайдер, А.А. Маслову за помощь в отлове животных; М.И. Родионовой за приготовление препаратов распластанных СК шести представителей подоотряда певчие птицы; Н.Б. Рубцову за приготовление микродиссекционных ДНК библиотек GRC четырех видов птиц; Т.В. Карамышевой и К.С. Задесенец за выполнение флуоресцентной гибридизации *in situ*; Центру реабилитации диких птиц г. Новосибирска за предоставление семенников черного стрижа, сокола-чеглока и грача; Федеральному исследовательскому центру животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста за предоставление семенников петухов; ЦКП микроскопического анализа биологических объектов за предоставление доступа к микроскопическому оборудованию, а также всем сотрудникам лаборатории рекомбинационного и сегрегационного анализа за помощь в проведении экспериментов.

Работа проводилась на базе лаборатории рекомбинационного и сегрегационного анализа Института цитологии и генетики СО РАН.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1 Запрограммированная элиминация ДНК у многоклеточных животных

На поддержание целостности и стабильности генома направлен целый ряд клеточных механизмов. В то же время, у некоторых организмов сформировались процессы, приводящие к регулируемым изменениям в геноме. К ним относятся геномные перестройки, создающие необходимое разнообразие антител и Т-клеточных рецепторов в линии лимфоидных клеток у позвоночных (Bassing, Swat, Alt, 2002). Другим примером является запрограммированная элиминация ДНК. Это явление имеет широкое филогенетическое распространение и встречается у одноклеточных инфузорий и многих многоклеточных организмов, таких как нематоды, миноги, миксины, хрящевые рыбы и другие позвоночные (Wang, Davis 2014; Smith et al., 2021).

Wang с соавторами (2017) выделяют две основные формы запрограммированной элиминации ДНК у многоклеточных: (1) потеря целых хромосом или фрагментов хромосом, связанная с определением пола; (2) хромосомные разрывы и потеря некоторых фрагментов в предшественниках соматических тканей во время раннего эмбрионального развития с сохранением целого генома в зародышевой линии клеток. Тем не менее, у разных организмов способы узнавания элиминируемых последовательностей, молекулярные механизмы выбрасывания, состав и количество элиминируемой ДНК существенно различаются (Close, 1984; Sánchez, 2014; Smith et al., 2018; Wang et al., 2020).

1.1 Филогенетическое распространение запрограммированной элиминации ДНК

1.1.1 Запрограммированная элиминация ДНК у беспозвоночных животных

Среди нематод явление элиминации ДНК характерно для двух отрядов: отряд *Ascaridida*, суперсемейства *Ascaridoidea* и *Cosmocercoidea*; и отряд *Rhabditida*, семейство *Strongyloididae* (Streit et al., 2016). По-видимому, элиминация ДНК в этих двух отрядах возникла независимо. Среди представителей семейства *Ascarididae*

процесс элиминации на цитологическом и молекулярном уровне хорошо изучен у лошадиной аскариды *Parascaris univalens* и свиной аскариды *Ascaris suum* (Müller, Tobler, 2000). У обоих видов элиминация ДНК происходит во время раннего эмбриогенеза в бластомерах.

Зигота *P. univalens* содержит две большие голоцентрические хромосомы ($2n=2$). Центромерные районы, кинетохоры и сайты прикрепления микротрубочек распределены по всей длине хромосом (Pimpinelli, Goday, 1989). Первое деление дробления происходит нормально, и образуются две дочерние клетки (P_1 и S_1) с одинаковым набором хромосом. Во время второго деления дробления примордиальная зародышевая клетка P_1 делится нормально и хромосомный набор остаётся без изменений. В пресоматической клетке S_1 центральный эухроматиновый район обеих хромосом фрагментируется. Фрагменты сохраняются в геноме и в дальнейшем функционируют как отдельные хромосомы. Они сегрегируют в две дочерние клетки, в то время как большие гетерохроматиновые концы элиминируются. Во время следующих клеточных делений элиминация хроматина повторяется четыре раза, т.е. в пресоматических клетках S_2 - S_5 . Таким образом, клетки, претерпевающие элиминацию и содержащие меньше хроматина, становятся соматическими, а клетки, сохраняющие первоначальный состав хромосом, становятся зародышевыми.

Процесс элиминации ДНК близкого вида *A. suum* отличается от описанного выше для *P. univalens*. Во-первых, элиминация хроматина у *A. suum* происходит в третьем делении дробления (Рис. 1). Во-вторых, этот процесс ограничен пресоматическими клетками S_2 - S_4 (Рис. 1). Клетки S_5 исследователям не удалось визуализировать. В-третьих, диплоидный геном зародышевой линии *A. suum* содержит 38 аутосом, 5 X-хромосом у самцов и 10 X-хромосом у самок (Tobler 1986; Seidl, Moritz, 1998). Все хромосомы – голоцентрические. Неизвестно, сколько и какие хромосомы вовлечены в процесс элиминации. Фрагментация множества мелких хромосом приводит к потере терминально локализованного хроматина из пресоматических клеток. Таким образом, несмотря на различную геномную организацию *P. univalens* и *A. suum*, элиминация ДНК у обоих видов приводит к потере всего детектируемого гетерохроматина из пресоматических клеток (Goday, Pimpinelli, 1984; 1986). В результате фрагментации и избирательного сохранения

отдельных участков хроматина число хромосом в соматических клетках возрастает до $2n=70$ у *P. univalens* и $2n=72$ у *A. suum* (Niedermaier, Moritz, 2000).

Про молекулярные механизмы элиминации почти ничего неизвестно. Недавние исследования показали, что центромерный вариант гистона H3, CENP-A, неравномерно располагается на митотических хромосомах в клетках зародышевого пути *A. suum* (Kang et al., 2016; Moreno-Moreno, Torras-Llort, Azorín, 2017). После фрагментации хромосом, перед элиминацией, доля CENP-A значительно уменьшается в участках хромосом, которые будут исключены из генома. Следствием этого является отсутствие сборки кинетохоров и прикрепления микротрубочек, необходимых для сегрегации хромосомных фрагментов, что приводит к потере этих областей при делении клетки (Goday et al., 1992).

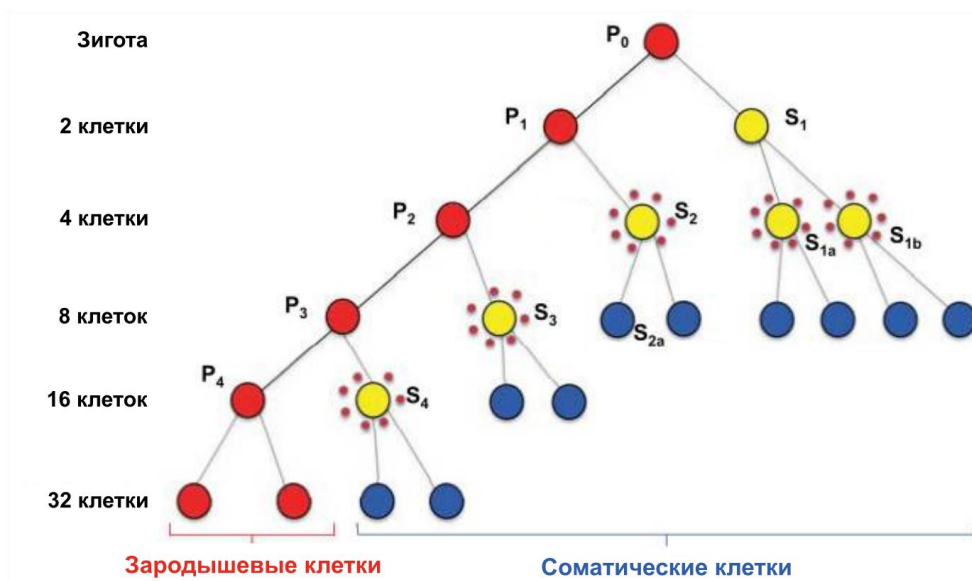


Рисунок 1. Схема раннего эмбрионального развития *Ascaris suum* (по Streit et al. 2016). Красные круги – примордиальные зародышевые клетки (P), желтые круги, окруженные точками – клетки, претерпевающие элиминацию ДНК, синие круги – предшественники соматических тканей (S).

Недавно были точно локализованы районы хромосомных разрывов (РХР) длиной в 3-6 кб во всех пяти пресоматических клетках (S_1 - S_5), претерпевающих элиминацию (Wang et al., 2017). Добавление теломерных повторов происходит случайно, как по концам разрывов, так и во внутреннюю часть района. Уникальные мотивы или другие особенности, маркирующие РХР, обнаружены не были (Müller, Tobler, 2000). Предполагается, что их узнавание происходит с помощью специфичных модификаций гистонов или других эпигенетических маркеров (Streit et al. 2016). Сравнительный анализ данных секвенирования *A. suum* и *P. univalens* показал, что у этих видов позиции более половины РХР консервативны (26 из 46) (Wang et al., 2017).

Элиминация ДНК у представителей рода *Strongyloides* отличается от таковой у аскарид и является механизмом определения пола (Nemetschke et al., 2010; Streit et al., 2016). У этих нематод жизненный цикл включает смену паразитического и свободноживущего поколений (Streit, 2008). Паразитическими являются только взрослые самки, которые с помощью митотического партеногенеза продуцируют свободноживущих самок и самцов. Для нематод рода *Strongyloides* характерны два типа элиминации ДНК, определяющие пол: 1) элиминация целой хромосомы, 2) элиминация части хромосомы (Рис. 2).

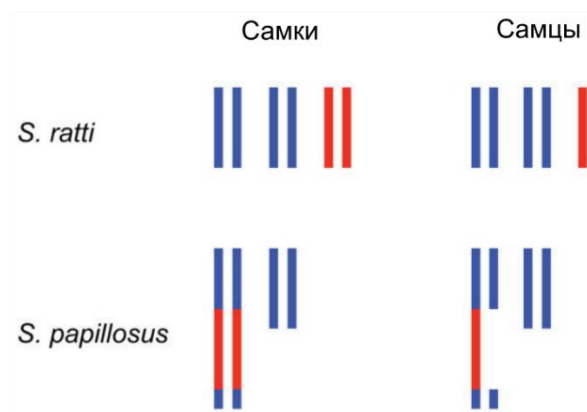


Рисунок 2. Элиминация ДНК у самок и самцов нематод *Strongyloides ratti* и *S. papillosus* (по Streit et al., 2016). Синий – хромосомы и хромосомные районы, представленные в двух копиях у обоих полов; красный - хромосомы и хромосомные районы, представленные в двух копиях у самок и в одной копии у самцов.

Самцы близких видов нематод *S. ratti* и *S. stercoralis* наследуют от матери только одну из двух X-хромосом ($2n=6$ у самок и $2n=5$ у самцов) (Рис. 2) (Kulkarni et al., 2013). Вероятно, потеря X-хромосомы происходит во время единственного митотического деления на стадии созревания ооцита. У других близких видов *S. papillosus* и *S. vituli* X-хромосома оказалась транслоцирована на хромосому 1 и фланкирована с обоих концов аутосомным хроматином (Рис. 2) (Nemetschke et al., 2010). Таким образом, самки несут только две пары хромосом ($2n=4$). У самцов происходит потеря всего района, соответствующего X-хромосоме, с одного из гомологов хромосомы 1 (Triantaphyllou, Moncol, 1977). Оба разделенных аутосомных участка этого гомолога сохраняются как отдельные хромосомы, приводя к $2n=5$ у самцов. Выбор одного из двух гомологов, который будет претерпевать элиминацию, по-видимому, является случайным (Nemetschke et al., 2010).

Среди насекомых пример элиминации целых хромосом в качестве механизма определения пола был описан у некоторых видов из семейства Sciaridae (Crouse, 1960; Goday, Esteban, 2001; Sánchez, 2014). Подобное явление также наблюдается у некоторых представителей других семейств отряда Двукрылые: Cecidomyiidae и Chironomidae, а также суперсемейства Coccoidea (отряд Полужесткокрылые) (Sánchez, 2014).

У большинства видов из семейства Sciaridae элиминация хромосом и процесс определения пола тесно связаны с явлением геномного импринтинга – эпигенетическим механизмом регуляции экспрессии аллелей в зависимости от их родительского происхождения (Goday, Esteban, 2001). У этих видов одновременно происходит несколько вариантов элиминации: 1) элиминация одной или двух отцовских X-хромосом из соматических клеток; 2) элиминация одной из двух отцовских X-хромосом из зародышевых клеток; 3) элиминация целого набора отцовских хромосом после первого деления сперматогенеза (Sánchez, 2014).

Элиминация отцовских X-хромосом из соматических клеток

После оплодотворения яйцеклетки с одной X-хромосомой сперматозоидом с двумя X-хромосомами зигота содержит три X-хромосомы (Рис. 3). Во время делений дробления одна или обе отцовские X-хромосомы элиминируются из соматических

клеток, что приводит к развитию женского (XX) или мужского (X0) эмбриона, соответственно.

Было показано, что элиминируемые отцовские X-хромосомы никогда не достигают полного расхождения во время анафазы (Du Bois, 1933). Du Bois предположил, что элиминация является следствием нарушения активности центромера X-хромосом. Позже de Saint-Phalle и Sullivan (1996), анализируя элиминацию X-хромосом, заключили, что их центромеры остаются функционально активными. Вероятно, элиминация является следствием нерасхождения X-хромосом. Молекулярные механизмы этих процессов остаются неизвестны.

Элиминация одной отцовской X-хромосомы из зародышевых клеток

Элиминация одной отцовской X-хромосомы из зародышевых клеток (XXX) по неизвестному механизму происходит до вступления в мейоз (Рис. 3) (Goday, Esteban, 2001). В клетках при этом остается одна отцовская и одна материнская X-хромосомы. Было показано, что в зародышевых клетках *Sciara ocellaris* и *S. coprophila* до вступления в мейоз наблюдаются различия в уровне гистоновых модификаций между хромосомами. Одна из отцовских X-хромосом, предназначенная для элиминации, имеет более низкий уровень ацетилирования гистонов H3 и H4 по сравнению с другими хромосомами (Goday, Ruiz, 2002).

Элиминация целого набора отцовских хромосом во время сперматогенеза

У *Sciara ocellaris* и *S. coprophila* во время первого деления сперматогенеза все отцовские хромосомы элиминируются (включая отцовскую X-хромосому) и сохраняются только материнские хромосомы (Рис. 3).

Цитологический анализ *S. coprophila* показал, что во время мейоза наборы материнских и отцовских хромосом располагаются отдельно друг от друга. Предполагается, что такое пространственное разделение облегчает дифференциальную сегрегацию хромосом, что приводит к элиминации отцовского набора во время первого мейотического деления. У видов из семейства Sciaridae отсутствуют гомологичное спаривание и выстраивание хромосом в метафазной пластинке в сперматогенезе. После метафазы I наступает анафаза I с монополярным веретеном деления. Микротрубочки прикрепляются только к материнским хромосомам (аутосомам и X-хромосоме), которые ближе расположены к полюсу с

центриолями, чем отцовские хромосомы (Kubai, 1987). После деления все отцовские хромосомы оказываются за пределами ядра и позже дегенерируют в цитоплазме.

Все элиминируемые во время сперматогенеза отцовские хромосомы были гиперацетилированы по девятому и четырнадцатому остаткам лизина гистона H3 и восьмому и двенадцатому остаткам лизина гистона H4 (Goday, Ruiz, 2002). Ацетилирование гистонов регулируется двумя классами ферментов: ацетилтрансферазами и деацетилазами. Kruhlak с коллегами (2001) показали, что эти ферменты в ядре пространственно организованы в дискретные компартменты. На основании этих результатов Goday и Ruiz (2002) предположили, что различные уровни ацетилирования между материнскими и отцовскими хромосомами могут являться результатом дифференциального расположения этих наборов хромосом и неравномерной локализации ацетилтрансфераз и деацетилаз в ядре. Таким образом, внутриядерная локализация хромосом может играть ключевую роль в элиминации хромосом у видов из семейства Sciaridae.

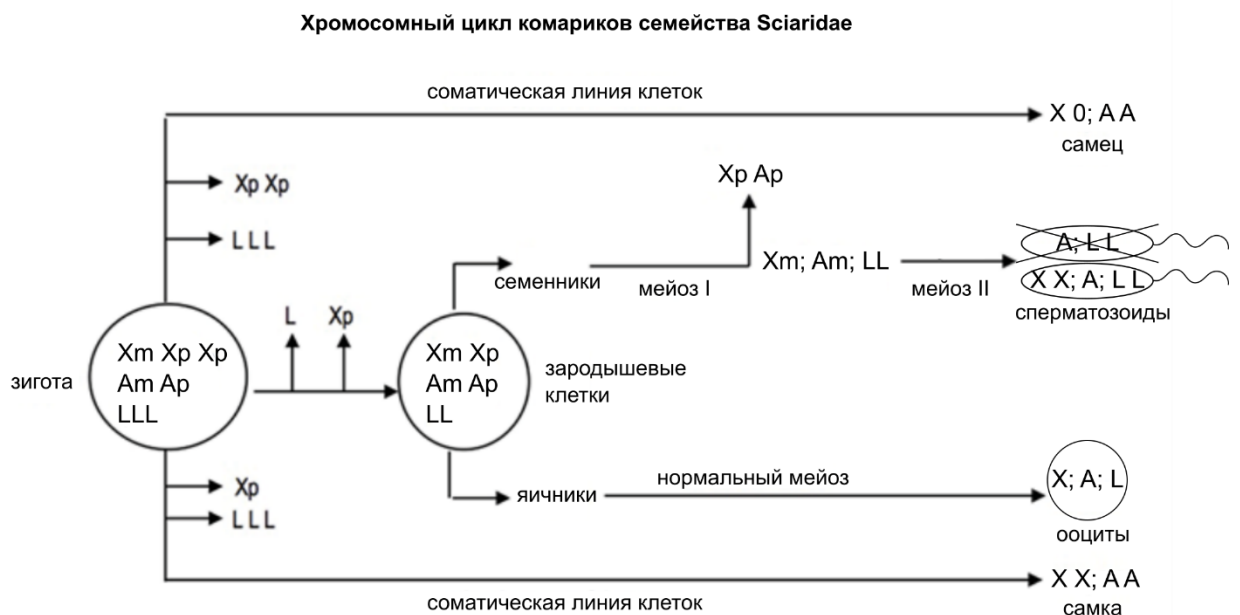


Рисунок 3. Хромосомный цикл некоторых видов листовых комариков из семейства Sciaridae (по Sánchez, 2014). Буквами X и A обозначены половые и аутосомные хромосомы, соответственно. Буквой L обозначены хромосомы, специфичные для клеток зародышевого пути. Материнское или отцовское происхождение хромосом обозначено буквами m и p, соответственно.

Второе деление сперматогенеза протекает нормально, за исключением поведения материнской X-хромосомы, хроматиды которой не расходятся, а остаются сцепленными. Сцепленные X-хроматиды остаются прикрепленными к митротрубочкам монополярного веретена деления, которое сохраняется в клетке на протяжении всего мейоза, и не участвуют в формировании метафазной пластинки (Goday, Esteban, 2001). Во время анафазы II к X-хромосоме не прикрепляются микротрубочки биполярного веретена деления и обе хроматиды X-хромосомы остаются на одном из полюсов клетки, тогда как хроматиды остальных материнских хромосом нормально сегрегируют. В результате образуются сперматозоиды XX и 0 (Рис. 3). Последние (0) деградируют. Таким образом, из одного сперматоцита образуется один сперматозоид (XX) вместо четырёх.

Некоторые представители семейства Sciaridae несут дополнительные хромосомы (как правило, три), названные L-хромосомами (Рис. 3). Во время эмбрионального развития они элиминируются из предшественников соматических тканей. Из предшественников клеток зародышевого пути (КЗП) элиминируется одна L-хромосома одновременно с отцовской X-хромосомой. Оогенез проходит нормально и образуются ооциты с одной L-хромосомой. После первого деления сперматогенеза в сперматоците II сохраняются обе L-хромосомы. Во время второго деления хроматиды каждой из L-хромосом расходятся нормально. Образующиеся сперматозоиды содержат две L-хромосомы.

У веслоногих рачков из подкласса Соперода элиминация ДНК происходит в предшественниках соматических тканей во время первых делений дробления. Как и у аскарид, хромосомы фрагментируются. Однако, после исключения гетерохроматиновых участков, оставшиеся фрагменты объединяются, при этом восстанавливается исходное число хромосом (Grishanin, 2014). Веретено деления не прикрепляется к элиминирующимся фрагментам, и они остаются в метафазной пластинке (Wyngaard, Gregory, 2001). Clower с коллегами обнаружили (2016), что у одного из видов веслоногих рачков *Mesocyclops edax* элиминировавшийся материал сохраняется в цитоплазме в течение длительного времени. Вероятно, он может сохранять свои функции и после элиминации из ядра.

1.1.2 Запрограммированная элиминация ДНК у позвоночных животных

У миног *Petromyzon marinus*, *Entosphenus tridentatus* и *Lampetra morii* из семейства Petromyzontidae элиминация ДНК осуществляется в раннем развитии и завершается на этапе перехода к гастрюляции (Smith et al., 2009; Yan et al., 2016; Timoshevskiy et al., 2016; Timoshevskiy et al., 2017). Анафазы с отстающим хроматином начинают выявляться с 6-го деления дробления и достигают максимального количества примерно на вторые сутки после вылупления личинки из яйца. Позже вокруг него образуются микроядра, которые затем разрушаются в цитоплазме. Элиминация ДНК приводит к уменьшению числа хромосом с $n=99$ до $n=86$ в клетках соматической линии у *P. marinus* (Covelo-Soto et al., 2014; Smith et al., 2010). Идентификация сайтов хромосомных разрывов (Smith et al., 2012) и данные цитологических исследований (Covelo-Soto et al., 2014; Timoshevskiy et al., 2016) позволяют предположить, что элиминируются не только целые хромосомы, но и отдельные внутренние районы хромосом. Однако, анализ цитологических препаратов затруднен из-за большого количества относительно маленьких хромосом. Неизвестно, все ли хромосомы претерпевают перестройки во время элиминации. Снижение числа хромосом также может быть обусловлено хромосомными слияниями (Covelo-Soto et al., 2014; Smith et al., 2010).

Все восемь изученных видов миксин из двух семейств Eptatretidae и Muxinidae претерпевают элиминацию ДНК во время дифференцировки зародышевой и соматической линий (Kojima et al., 2010). У представителей семейства Eptatretidae отсутствует весь видимый гетерохроматин, который большими блоками выявляется в зародышевых клетках. Было показано, что элиминации ДНК подвергаются как целые гетерохроматиновые хромосомы, так и отдельные терминальные гетерохроматиновые участки (Goto, Kubota, Kohno, 1998; Kojima et al., 2010). Удаление последних не приводит к отсутствию теломер на сохраняющихся хромосомах. Неизвестно, каким способом происходит сохранение и (или) добавление теломерных повторов по концам разрывов.

Элиминация ДНК была описана у американского гидролага (*Hydrolagus colliei*) (отр. Химернообразные, класс Хрящевые рыбы). Выкидывание части хроматина из сперматоцитов происходит после первого деления мужского мейоза.

Неизвестно, затрагивает элиминация целые хромосомы или их фрагменты (Stanley et al., 1984).

Среди млекопитающих элиминация ДНК, связанная с механизмом дозовой компенсации, была описана у восьми видов сумчатых бандикутов из родов *Perameles*, *Isoodon*, *Peroryctes* и *Echymipera* из семейства Peramelidae отряда Бандикуты (Murray, Mc Kay, Sharman, 1979; Hayman, Martin, 1965). У этих видов самки имеют генотип XX, а самцы – XY. Во время раннего развития из некоторых соматических тканей у женских эмбрионов элиминируется X, а у мужских – Y-хромосома. Неизвестно, является ли выбор X-хромосомы для элиминации у женских эмбрионов случайным или он определяется генетическим импринтингом, как описано у листовых комариков семейства Sciaridae (Hayman, Martin, 1965). У трех видов *Isoodon obesulus*, *Isoodon macrourus*, и *Perameles nasuta* элиминация половых хромосом происходит с разной эффективностью у разных особей в разных органах и тканях, при этом обе половые хромосомы сохраняются не только в гонадах, но и в фибробластах кожи у самок и самцов (Hayman, Martin, 1965). Предполагается, что потеря половых хромосом является случайным следствием действия механизма дозовой компенсации и вызывается ошибками в митотической сегрегации половых хромосом (Close, 1984). На частоту возникновения этих ошибок могут влиять митотический индекс и/или степень дифференцировки. Разные линии клеток в разных тканях у одной и той же особи отличаются по этим параметрам, что может приводить к мозаицизму по числу копий половых хромосом (Close, 1984).

Таким образом, запрограммированная элиминация ДНК встречается у представителей разнообразных таксонов хордовых животных. В большинстве случаев элиминации подвергаются либо половые хромосомы, что связано с определением пола, либо гетерохроматиновые участки хромосом основного набора, что может быть связано с дифференцировкой соматических клеток. В последнем случае поиск и расшифровка элиминируемых последовательностей ДНК является одним из ключевых шагов на пути к пониманию роли процесса элиминации ДНК в раннем развитии у многоклеточных организмов.

1.2 Состав последовательностей ДНК, подвергающихся элиминации, и возможная роль этого процесса в развитии у различных организмов

Сравнение элиминируемых последовательностей четырех видов паразитических нематод, *A. suum*, *A. lumbricoides*, *P. univalens* и *Toxocara canis* показало, что большая часть из них является тандемными повторами (Wang et al., 2017). У *P. univalens* теряется 89% всех тандемных повторов, содержащихся в зародышевом геноме, у остальных видов – около 9%. Наряду с повторами, элиминация у нематод затрагивает уникальные последовательности. Около 2000 генов у *T. canis* и 1000 – у остальных трех видов элиминируется из соматического генома (Wang et al., 2017). Большинство элиминируемых генов располагается в кластерах. Такие генные кластеры чередуются с кластерами повторенных элиминируемых последовательностей. Более 50% генов являются консервативными для представителей родов *Ascaris* и *Parascaris*, и около 35% - для всех четырех видов (Wang et al., 2017). Было показано, что все теряющиеся гены экспрессируются преимущественно во время гаметогенеза и(или) раннего эмбрионального развития (Wang et al., 2012; Wang et al. 2017).

У *A. suum* более 300 элиминирующихся генов имеют паралоги в соматическом геноме. Это находится в соответствии с выдвинутой ранее гипотезой, согласно которой у общего предка аскарид произошла частичная геномная дупликация (Wang et al., 2012). Предполагается, что элиминация ДНК возникла как механизм регуляции экспрессии дублированных генов в соматических клетках. Потеря большого числа зародышевых генов, с одной стороны, является механизмом их сайленсинга в соматических клетках. С другой стороны, потеря части генома приводит к изменению организации хроматина оставшихся областей. Последнее может способствовать избирательной активации или супрессии соматических генов (Wang et al., 2012).

У веслоногого рачка *Mesocyclops edax* из соматической линии выбрасывается 80% генома (Sun et al., 2014). Элиминации, в основном, подвергаются эволюционно более молодые транспозонные элементы или подобные им повторенные последовательности. Предполагается, что элиминация у *M. edax* является механизмом защиты от пролиферации повторенных элементов (Sun et al., 2014). У другого веслоногого рачка *Cyclops kolensis* элиминация ДНК приводит к резкому

снижению числа копий рибосомной ДНК (рДНК) в геноме соматических клеток по сравнению с зародышевой линией (Zagoskin et al., 2010). Доля элиминируемого генетического материала при этом может достигать 90-94%. Элиминация копий рДНК была также описана у хирономиды *Acricotopus lucens* (отряд Двукрылые, Diptera) (Staiber, 2004).

У миксин из семейств Eptatretidae и Muxinidae элиминации подвергается от 20.9% до 74.5% зародышевого генома (Goto, Kubota, Kohno, 1998). Большая часть элиминирующейся ДНК – это высоко повторенные тандемные последовательности.

У морской миноги *P. marinus* около 20% генома выбрасывается из соматической линии (Smith et al., 2012). Сравнительный анализ данных секвенирования зародышевого и соматического геномов выявил большое количество повторенных последовательностей (около 102 Мб), элиминируемых из соматического генома. Помимо этого, было обнаружено больше трехсот генов (около 13 Мб), подвергающихся элиминации. Неизвестно, имеют ли эти гены паралоги в соматическом геноме или они являются специфичными для КЗП (Smith et al., 2018). Поиск их ортологов у человека и мыши показал, что многие из этих генов являются белок-кодирующими и преимущественно экспрессируются в КЗП. Ортологи многих генов, элиминируемых из соматического генома морской миноги, являются мишенью для репрессорного белкового комплекса Polycomb (polycomb-repressive complex, PRC) в эмбриональных стволовых клетках мыши. PRC является высоко консервативным белковым комплексом, который играет роль в сайленсинге генов плюрипотентности, онкогенов, инактивации X-хромосомы и других процессах у млекопитающих. Перекрытие генов-мишеней для PRC в эмбриональных стволовых клетках у мышей и генов, подверженных элиминации у миног, подтверждает идею о том, что запрограммированная элиминация ДНК имеет регуляторные функции (Smith et al., 2018).

1.3 Хромосомная элиминация у птиц

Хромосомная элиминация у птиц была впервые описана у зебровой (*Taeniopygia guttata*) (Pigozzi, Solari, 1998), а позже у японской амадины (*Lonchura striata domestica*) (del Priore, Pigozzi, 2014), которые принадлежат к подотряду певчие

птицы отряда Воробьинообразные. В обоих случаях GRC элиминируется из предшественников соматических тканей и сохраняется только в КЗП (Goday, Pigozzi, 2010).

В зародышевых клетках на стадии пахитены профазы I мейоза GRC зетровой амадины формирует один из самых длинных синаптонемных комплексов (СК) среди хромосом основного набора (Pigozzi, Solari, 2005). В ооцитах у большинства особей GRC присутствует в двух копиях и образует нормальный рекомбинирующий бивалент. Рекомбинационный паттерн GRC обычно представлен двумя терминально расположенными пиками рекомбинации, так что большая часть хромосомы не участвует в рекомбинации. Редко встречаются GRC с тремя сайтами рекомбинации.

Около 15% самок содержит одну копию этой хромосомы (del Priore, Pigozzi, 2014). Она формирует унивалент и отличается от бивалентов хромосом основного набора отсутствием связывания антителами к белку MLH1, входящему в состав рекомбинационных узелков и маркирующему сайты рекомбинации. Помимо этого, унивалент GRC слабее, чем биваленты, красится антителами к белку SYCP3, формирующему боковой элемент СК.

В сперматоцитах у всех особей обоих видов GRC присутствует в одной копии. Окрашивание по Романовскому-Гимзе показало, что на ранних стадиях профазы I мейоза в сперматоцитах хроматин GRC конденсирован, ее СК представляет собой спирально закрученную нить (Pigozzi, Solari, 1998). В метафазе I мейоза GRC выявляется на периферии хромосомной пластинки. В метафазе II мейоза крупный акроцентрический элемент отсутствует. Вместо этого, рядом с некоторыми метафазными пластинками выявляется округлое плотное DAPI-позитивное тело (del Priore, Pigozzi, 2014). Схожее хроматиновое тело детектируется на гистологических срезах семенных канальцев в цитоплазме некоторых сперматоцитов и молодых сперматид (Pigozzi, Solari, 2005). Это округлое тело отличается от рибонуклеопротеиновых хроматоидных тел, выявляемых в цитоплазме сперматоцитов у некоторых видов (Parvinen, 2005), тем, что окрашивается DAPI (Pigozzi, Solari, 1998). С помощью электронной микроскопии было показано, что эти округлые тела окружены двойной мембраной. Считается, что такие тела содержат GRC, элиминируемую после первого мейотического деления.

С помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с GRC-специфичными зондами и конфокальной микроскопии недавно было показано, что у зебровой амадины от 1 до 19% сперматозоидов содержат GRC (Pei et al., 2021). Такие сперматозоиды не имели видимых морфологических отличий от GRC-свободных сперматозоидов.

Для проверки гипотезы о возможной передаче GRC по отцовской линии, авторы сначала выявили полиморфные маркеры, которые позволяют надежно различать гаплотипы GRC. Затем они идентифицировали 12 гаплотипов GRC у представителей подвида зебровой амадины *T.g. castanotis*. Затем они скрестили самку *T.g. castanotis* с самцом другого подвида *T.g. guttata*, сделали пять последовательных возвратных скрещиваний гибридных самок с самцами *T.g. guttata* и генотипировали одного потомка F6 (Рис. 4). В соответствии с гипотезой об исключительно материнском наследовании GRC ожидалось, что гибрид F6 будет нести гаплотип GRC, схожий с выявленными ранее 12 гаплотипами для *T.g. castanotis*. Однако, оказалось, что он имел уникальный гаплотип GRC, сильно дивергировавший от 12 гаплотипов *T.g. castanotis*. Pei с соавторами (2021) предположили, что этот уникальный гаплотип может быть либо унаследован от самца *T.g. guttata* в одном из возвратных скрещиваний, либо являться рекомбинантным продуктом GRC *T.g. castanotis* и *T.g. guttata*. Эти результаты показывают, что у зебровой амадины GRC может передаваться не только через самок, но и через самцов.

Клеточные механизмы, лежащие в основе элиминации GRC в сперматогенезе, остаются неизвестными. Предполагается, что роль в этом процессе играют модификации гистонов. Начиная с ранней профазы I мейоза GRC обоих видов интенсивно метится H3K9me2/3, в отличие от хромосом основного набора (Schoenmakers et al., 2010; del Priore, Pigozzi, 2014) (Табл. 1). Эта гистоновая модификация связана с гетерохроматинизацией и подавлением транскрипционной активности. Мечение H3K9me3 на GRC сохраняется и после её элиминации. Интересно, что del Priore и Pigozzi (2014) обнаружили, что ядра пяти из нескольких сотен рассмотренных сперматоцитов II порядка, демонстрировали сигнал H3K9me3, схожий с аналогичным сигналом на GRC. По-видимому, эти сперматоциты не элиминировали GRC. Это подтверждает выводы Pei с соавторами (2021) о том, что

GRC у самцов зебровой амадины может успешно проходить мейоз и попадать в сперматозоиды.

Другая гистоновая модификация, фосфорилирование гистона H3 по десятому остатку серина, H3S10P, связана с правильной конденсацией, выстраиванием и расхождением хромосом в митозе и мейозе (Johansen, Johansen, 2006; Ribeiro-Mason et al., 2012). Во время метафазы I сигнал H3S10P на GRC отсутствует, тогда как хромосомы основного набора показывают интенсивное и равномерное мечение (del Priore, Pigozzi, 2014) (Табл. 1).

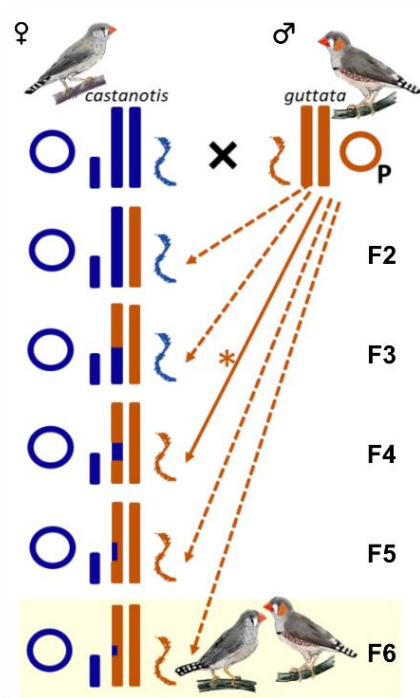


Рисунок 4. Схема скрещиваний двух подвидов зебровой амадины (синий – *T.g. castanotis*, оранжевый – *T.g. guttata*) и возможный сценарий наследования GRC от самца (По Pei et al., 2021). Круг – мтДНК, короткий прямоугольник – W хромосома, длинные прямоугольники – хромосомы основного набора, сигмовидный символ – GRC. Полученных гибридных самок от скрещивания родительских особей (P) на протяжении пяти поколений скрещивали с самцами *T.g. guttata* (F2-F6). Схема составлена по результатам генотипирования одного гибридного самца F6 (выделен желтым).

Таблица 1 – Гистоновые модификации, наблюдаемые на GRC и хромосомах основного набора у зебровой и японской амадины во время мужского мейоза.

Стадия мужского мейоза	GRC	Хромосомы основного набора
Профаза I	^{a,б} H3K9me _{2/3}	
Метафаза I	^a H3K9me ₃	^a H3S10P – по всей длине
Метафаза II	^a H3K9me ₃ ^a H3S10P - по всей длине	^a H3S10P - в перицентромерных районах
Сперматиды	^{a,б} H3K9me ₃ ^б H3S10P	-

Примечание: а – по del Priore, Pigozzi 2014, б – по Schoenmakers et al. 2010.

С дефосфорилированием H3S10 на GRC во время метафазы I может быть связано с aberrantным поведением этой хромосомы во время первого мейотического деления, которое, в итоге, приводит к её элиминации. Фосфорилирование гистона H3 по десятому остатку серина осуществляется киназой Aurora B. Эта киназа наряду с белками сурвивином, бореалином и внутренним белком центромеры (INCENP) входит в состав высоко консервативного хромосомного пассажирского комплекса (CPC, chromosome passenger complex). Этот комплекс обеспечивает надлежащее функционирование центромер для правильного выравнивания и расхождения хромосом, а также требуется для стабилизации микротрубочек и сборки веретена деления (SamPATH et al., 2004). Нарушение функционирования киназы Aurora B может приводить к ошибкам взаимодействия GRC и веретена деления во время метафазы мейоза I, и, вероятно, способствовать ее элиминации (del Priore, Pigozzi, 2014).

Первыми идентифицированными у зебровой амадины GRC-специфичными последовательностями стали нетандемные повторы, распределенные по большей части этой хромосомы. Они оказались высоко гомологичны последовательностям на коротком плече хромосомы 3 этого вида (Itoh et al., 2009). Сравнение результатов геномного секвенирования клеток соматической и зародышевой линии выявило более 115 амплифицированных генов, локализованных на GRC зебровой амадины (Biederman et al., 2018; Kinsella et al., 2019). Все найденные гены имеют паралоги в

соматическом геноме. Результаты транскриптомного анализа показали наличие экспрессии по меньшей мере для шести GRC-специфичных генов (*loc105760874*, *pim1*, *rnf20*, *sphk1*, *srvt* и *vegfa*) в семенниках и 32 генов в яичниках. С помощью масс-спектрометрического анализа была подтверждена трансляция мРНК некоторых из этих генов в гонадах у обоих полов. На основании этих результатов Kinsella с соавторами (2019) предположили, что GRC выполняет важную роль в развитии КЗП у самок и самцов зебровой амадины. Это подтверждается результатами анализа обогащения группы GRC-специфичных генов по функциональной принадлежности (gene ontology enrichment analysis). В наборе GRC-специфичных генов были чрезмерно представлены категории генов, относящиеся к формированию гонад у самок (female gonad development) и процессам развития, связанным с размножением (developmental process involved in reproduction). Интересно, что ортологи многих GRC-специфичных генов зебровой амадины преимущественно экспрессируются в гонадах обоих полов у курицы (Kinsella et al., 2019).

Kinsella с соавторами (2019) по результатам филогенетического анализа разделили GRC-специфичные гены на пять эволюционных страт по степени их дивергенции с соматическими паралогами и ортологами (Рис. 5). Страта 1 возникла во время ранней адаптивной радиации певчих птиц, страта 2 – до адаптивной радиации семейства Астрильдовые (Estrildidae), страта 3 – во время адаптивной радиации этого семейства. Из этих результатов следует, что возраст GRC насчитывает несколько десятков миллионов лет и, вероятно, эта хромосома возникла у общего предка Воробьинообразных птиц. Страта 4 специфична для зебровой амадины, а страта 5 – для отдельных её подвигов.

Было показано, что на некоторые из GRC-специфичных генов, в том числе *bicc1* и *trim71* из страты 1, действует стабилизирующий отбор. Продукты их ортологов у человека играют важную роль в дифференцировке эмбриональных клеток (Uhlén et al., 2015). Также были обнаружены следы движущего отбора на ген *ruf60*, который кодирует транскрипционный фактор (Kinsella et al., 2019).

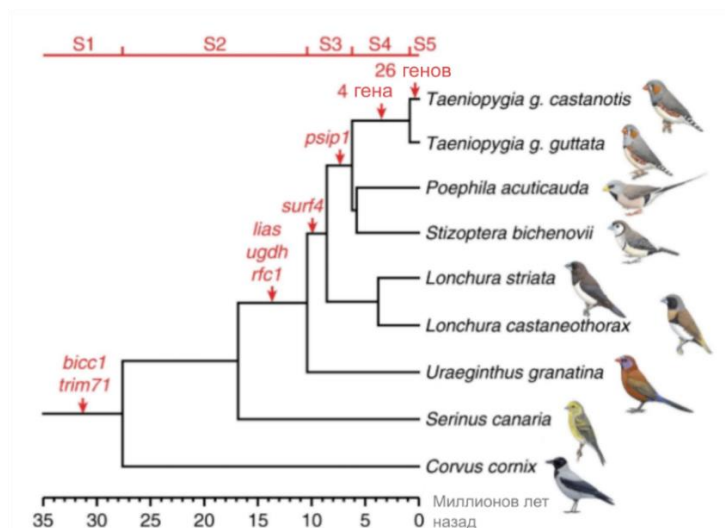


Рисунок 5. Филогенетическое древо певчих птиц, показывающее возникновение эволюционных страт (S1-S5) на GRC (по Kinsella et al. 2018).

Роль GRC в КЗП до сих пор не установлена. Наличие этой хромосомы у всех особей и её передача в ряду поколений позволяет считать, что она может иметь функциональную роль в зародышевых клетках, и что эта предполагаемая функция является необязательной в соматических клетках. Размер генома у птиц является наиболее консервативным среди позвоночных (Tiersch, Wachtel, 1991), поэтому наличие крупной дополнительной хромосомы, полностью лишенной функций или адаптивного значения, представляется маловероятным. Результаты геномного анализа позволяют предполагать, что у зебровой амадины GRC является важным функциональным элементом, участвующим в формировании и развитии КЗП у обоих полов. Несмотря на то, что GRC была описана только у зебровой и японской амадины, результаты филогенетического анализа, проведенного Kinsella с соавторами (2019), показывают, что эта хромосома может быть широко распространена среди представителей отряда Воробьинообразные.

2 Особенности женской репродуктивной системы птиц

У птиц женская репродуктивная система состоит из левого яичника и отходящего от него яйцевода. Правые яичник и яйцевод, как правило, редуцированы (Johnson, 2014). У домашней курицы *Gallus gallus* в развивающемся яичнике число ооцитов на 9-й день после оплодотворения составляет около 28 000 и увеличивается

до 680 000 на 17-й день. К моменту вылупления, когда наступает первый блок мейоза, это число снижается до 480 000 (Hughes, 1963). Особенности созревания фолликулов (т.е. прохождение ооцитом двух последовательных делений мейоза) лучше всего изучены на домашней курице.

2.1 Основные события женского мейоза у птиц

После репликации в премейотической S-фазе, гомологичные хромосомы состоят из двух сестринских хроматид, содержащих по одной молекуле ДНК. В лептотене гомологичные хромосомы сближаются и выравниваются. В это время образуются боковые элементы СК – лентовидного белкового комплекса, образующегося только в мейозе между гомологичными хромосомами по всей их длине. СК состоит из двух параллельных боковых элементов, одного центрального элемента и множественных поперечных филаментов.

Структура СК и его функции в мейозе сходны у филогенетически далеких видов. Однако, не все компоненты СК консервативны на уровне аминокислотной последовательности (Fraune et al., 2016). О консервативности некоторых белковых компонент между птицами и млекопитающими говорят результаты иммуноцитологических исследований. Антитела против белков центрального (SYCP1) и латерального (SYCP3) элементов СК млекопитающих взаимодействуют с гомологичными белками птиц, как было показано при иммуноокрашивании мейотических хромосом курицы, перепела и других видов (Pigozzi, 2001; Calderón, Pigozzi, 2006; Torgasheva, Borodin, 2017). Анализ выравнивания последовательностей показал, что основные белки СК: SYCP1, SYCP2 и SYCP3 имеют общие структурные особенности у птиц и млекопитающих (Ying et al., 2009).

Большая часть ДНК расположена вне СК и организована в хроматиновые петли, которые отходят от боковых элементов. Считается, что размеры петель и плотность их распределения вдоль СК сильно различаются между филогенетически далекими организмами, но остаются консервативными в пределах вида (Zickler, Kleckner, 1999; Kleckner, 2006). Показано, что у птиц формируются более короткие хроматиновые петли, чем у других позвоночных (Peterson et al., 1994). Отношение длины СК к размеру генома у птиц примерно в два раза выше, чем у рептилий и

млекопитающих (Peterson et al., 1994). Из этого следует, что у птиц формируется более длинный СК, чем это можно было бы ожидать только на основании размера генома. Следовательно, у птиц большая доля ДНК контактирует с СК, что может объяснять более высокую плотность рекомбинации по сравнению с млекопитающими (Peterson et al., 1994).

Мейотическая рекомбинация является следствием репарации двунитевых разрывов (ДНР), создаваемых белком SPO11. Формирование ДНР приводит к фосфорилированию гистона H2AX по серину 139 с образованием γ H2AX. γ H2AX выявляется на неспаренных осях СК в лептотене и зиготене, исчезая после завершения синапсиса в пахитене (Schoenmakers et al., 2009). Репарация мейотических ДНР может проходить по кроссоверному или некроссоверному пути (Börner, Kleckner, Hunter, 2004). В пахитенных мейоцитах птиц сайты рекомбинации могут быть выявлены двумя цитологическими методами: 1) визуализация рекомбинационных узелков методом электронной микроскопии; 2) иммуноокрашивание антителами к белкам, вовлеченным в репарацию ДНР по кроссоверному пути. Вторым методом является наиболее распространенным. Для иммуноокрашивания используют антитела к белку мисматч репарации MLH1. Он входит в состав зрелых рекомбинационных узелков позвоночных и используется как цитологический маркер сайтов рекомбинации.

В диплотене, когда наступает первый блок мейоза, СК диссоциирует и гомологичные хромосомы начинают разъединяться. Контакт между хромосомами сохраняется только в районе хиазм. Хромосомы имеют характерную хромомерно-петлевую морфологию из-за чего они были названы хромосомами типа ламповых щеток (ХЛЩ) (Callan, 1963). Формирование примордиальных фолликулов происходит к моменту вылупления птенца из яйца. На этой стадии оогонии покрыты перивителлиновой мембраной и окружены слоем эпителиальных гранулезных клеток. Первый блок мейоза продолжается вплоть до полового созревания (около 5 месяцев для курицы) или сезона размножения и снимается за 6 часов до овуляции. Для функционально активного яичника характерна иерархичная организация фолликулов. Как и у млекопитающих, рост и созревание фолликулов инициируются действиями тиреоидных и гонадотропных гормонов в сезон размножения (Nakao, Ono, Yoshimura, 2008). Рост фолликулов является энергетически затратным

процессом и увеличивает интенсивность метаболизма на 27% у большой синицы (*Parus major*) (Nilsson, Råberg, 2001) и на 22% у обыкновенного скворца (*Sturnis vulgaris*) (Vezina, Williams, 2002).

3 Обоснование модели и методов исследования GRC у птиц

Распространенность GRC среди птиц

Из литературных данных следует, что явление запрограммированной элиминации ДНК, как правило, встречается у всех исследованных представителей какого-либо таксона. Учитывая наличие GRC у четырех видов из двух семейств подотряда певчие птицы, можно предположить о существовании других видов певчих птиц с этой хромосомой. Для проверки этой гипотезы мы выбрали 12 представителей из девяти семейств данного подотряда и по одному представителю из отрядов Стрижеобразные, Крачкообразные, Соколообразные и Попугаеобразные. Такая выборка позволит нам охарактеризовать распространенность GRC среди птиц и оценить время возникновения этой хромосомы.

Поведение в мейозе и вариация числа копий GRC

В качестве экспериментальной модели для изучения мейотического поведения и вариации числа копий GRC мы выбрали два филогенетически близких вида – бледную ласточку и ласточку-береговушку из семейства Ласточковые и большую синицу из семейства Синицевые. Ранее эти аспекты биологии GRC были подробно исследованы у близких видов зебровой и японской амадины. Ласточки, амадины и синица принадлежат к трем филогенетически далеким семействам певчих птиц. Несмотря на это, особенности морфологии и поведения GRC у бледной ласточки, ласточки-береговушки и большой синицы схожи с описанными для GRC амадины. У этих видов GRC является единственным крупным акроцентриком, что облегчает её идентификацию среди хромосом основного набора. Неизвестно, связано ли это с адаптивным преимуществом для наследственной передачи GRC. Сравнение поведения в мейозе GRC между филогенетически близкими и далекими видами позволит оценить динамику и направление эволюции этой уникальной хромосомы. Другим преимуществом ласточек является то, что оба вида обладают

широким географическим ареалом и формируют большие размножающиеся колонии. Использование птиц из природных популяций позволит оценить вариацию по числу копий и по морфологии GRC между клетками одного организма, между полами одного вида и между близкими и далекими видами. Результаты такого анализа позволят приблизиться к пониманию функционального значения GRC, к механизмам её наследственной передачи и элиминации в сперматогенезе.

Методы и подходы

Для идентификации GRC мы готовили препараты мейотических хромосом из клеток семенника и/или яичника и препараты метафазных хромосом из клеток костного мозга для каждого из выбранных видов птиц. Наличие или отсутствие GRC мы определяли путем сравнения пахитенного и соматического кариотипа. В случае полного совпадения кариотипов мы регистрировали отсутствие GRC. В случае обнаружения дополнительного элемента в составе пахитенного кариотипа мы регистрировали наличие GRC. С помощью данного подхода GRC была впервые обнаружена у зебровой и японской амадины (Pigozzi, Solari, 1998; del Priore, Pigozzi, 2014). Для тех видов, у которых нам были доступны и самки, и самцы, мы дополнительно сравнивали пахитенные кариотипы между полами. Известно, что у самцов зебровой и японской амадин GRC формирует унивалент, тогда как у самок, как правило, GRC представлена в виде бивалента. В случае обнаружения аналогичной разницы в синаптической конфигурации одного из элементов пахитенного кариотипа мы регистрировали наличие GRC.

Для визуализации мейотических хромосом на стадии первой профазы мейоза мы использовали метод иммунолокализации мейотических белков. Для анализа синапсиса мы использовали антитела к белку SYCP3, одному из структурных компонентов бокового элемента СК. Ранее данный подход успешно применялся для исследований синаптических нарушений (Bikchurina et al., 2018), в том числе – для детекции унивалентных хромосом (del Priore, Pigozzi, 2014). Известно, что у самцов GRC в первой профазе мейоза содержится в одной копии, что делает выбранный подход наиболее оправданным в данной работе.

Для визуализации сайтов рекомбинации мы использовали антитела к белку мис-матч репарации MLH1. На стадии пахитены MLH1 выявляется вдоль СК в виде

дискретных точечных сигналов. Было показано, что количество и распределение сигналов MLH1 соответствует количеству и распределению хиазм у мыши и человека (Barlow, Hultén, 1998; Anderson et al., 1999). Успешное применение антител к MLH1 для анализа рекомбинации было продемонстрировано в исследованиях на различных видах птиц (Calderón, Pigozzi, 2006; Torgasheva, Borodin, 2017), в том числе – для выявления сайтов рекомбинации на биваленте GRC (Pigozzi, Solari, 2005).

Для анализа генетического содержания GRC различных видов птиц нашими коллегами из лаборатории морфологии и функции клеточных структур ИЦиГ СО РАН были приготовлены микродиссекционные GRC-специфичные пробы для четырех видов птиц и проведены эксперименты по внутри- и межвидовой FISH. Метод FISH с полнохромосомными пробами широко используется в исследованиях по сравнительной цитогенетике птиц для выявления гомологичных районов хромосом между разными видами (Degrandi et al., 2020). Ранее FISH с хромосом-специфичными зондами успешно применялся в исследованиях, посвященных изучению запрограммированной элиминации ДНК, для визуализации элиминируемого генетического материала (Timoshevskiy et al., 2016; Timoshevskiy et al., 2017). Мы использовали данный метод для выявления гомологичных участков между GRC и хромосомами основного набора, оценки степень гомологии между GRC разных видов птиц, а также для детекции GRC в мейотических клетках на разных стадиях гаметогенеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные

В таблице 2 представлен список видов птиц с указанием числа самок и самцов, проанализированных в данной работе. Самцы бледной ласточки были отловлены сетями в 2016 г. Самки ласточки-береговушки, бледной ласточки, деревенской ласточки, большой синицы и мухоловки-пеструшки в возрасте 3-6 дней были собраны из гнезд в 2015-2019 гг. Взрослые самцы большой синицы, зебровой амадины, мухоловки-пеструшки, волнистого попугая, садовой камышовки, полевого жаворонка, японской амадины, амадины Гульды, чижа, щегла, обыкновенной канарейки, снегиря и белошапочной овсянки были куплены у коммерческих заводчиков птиц. Семенники от самца черного стрижа, сокола-чеглока и грача были получены в Центре реабилитации диких птиц в г. Новосибирске. Семенники самцов черной крачки и деревенской ласточки получены от сотрудников Института систематики и экологии животных СО РАН. Семенники от петухов шести разных пород получены в Федеральном исследовательском центре живодноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста.

Отлов, содержание и эвтаназия животных осуществлялась по протоколам №35 от 26.10.2016 и №45/2 от 10.01.2019, утвержденным комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук.

Таблица 2 – Экспериментальные животные

Вид	Число самок	Число самцов	Источник литературы
Серый гусь <i>Anser anser</i>	3	1	Torgasheva, Borodin, 2017
Японский перепел <i>Coturnix japonica</i>	не указано	не указано	Calderón, Pigozzi 2006
Домашняя курица <i>Gallus gallus</i>	не указано	-	Pigozzi 2001;
	-	16	Наши данные
Домашний голубь <i>Columba livia</i>	не указано	не указано	Pigozzi, Solari 1999a; Pigozzi, Solari 1999b
Черный стриж <i>Apus apus</i>	-	1	Наши данные
Черная крачка <i>Chlidonias niger</i>	1	1	Наши данные

Таблица 2 (продолжение)

Сокол-чеглок <i>Falco subbuteo</i>	-	1	Наши данные
Волнистый попугай <i>Melopsittacus undulatus</i>	-	2	Наши данные
Грач <i>Corvus frugilegus</i>	-	1	Наши данные
Ласточка-береговушка <i>Riparia riparia</i>	24	-	Наши данные
Бледная ласточка <i>Riparia diluta</i>	3	9	Наши данные
Деревенская ласточка <i>Hirundo rustica</i>	3	1	Наши данные
Садовая камышовка <i>Acrocephalus dumetorum</i>	-	1	Наши данные
Полевой жаворонок <i>Alauda arvensis</i>	-	1	Наши данные
Большая синица <i>Parus major</i>	7	7	Наши данные
Мухоловка-пеструшка <i>Ficedula hypoleuca</i>	2	2	Наши данные
Зебровая амадина <i>Taeniopygia guttata</i>	4	4	Pigozzi, Solari 1998
	не указано	не указано	Calderón, Pigozzi 2006
	-	4	Наши данные
Японская амадина <i>Lonchura striata domestica</i>	3	5	del Priore, Pigozzi 2014
Амадина Гульда <i>Erythrura gouldiae</i>	-	2	Наши данные
Чиж <i>Spinus spinus</i>	-	1	Наши данные
Обыкновенный щегол <i>Carduelis carduelis</i>	-	2	Наши данные
Домашняя канарейка <i>Serinus canaria</i>	-	1	Наши данные
Обыкновенный снегирь <i>Pyrrhula pyrrhula</i>	-	1	Наши данные
Белошапочная овсянка <i>Emberiza leucocephala</i>	-	1	Наши данные

Приготовление препаратов распластанных хромосом и иммуноокрашивание

Препараты СК распластанных хромосом ооцитов и сперматоцитов готовили по методике Peters с соавторами (1997). Иммуноокрашивание проводили в соответствии с протоколом, описанным Anderson с соавторами (1999). Были использованы следующие первичные антитела: кроличьи поликлональные к SYCP3 (1:1000; ab 15093, Abcam, Великобритания), мышинные моноклональные к MLH1 (1:50; ab14206, Abcam, Великобритания), поликлональные антитела к центромерным белкам человека (1:100; 15-234-0001, Antibodies Inc., США). В качестве вторичных антител были использованы антитела козы к иммуноглобулинам кролика, конъюгированные с флуоресцентной меткой Cy3 (1:500; 111-165-144, Jackson Laboratories, США), антитела козы к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с флуоресцентной меткой FITC (1:50; 15-095-003, Jackson ImmunoResearch, США) и антитела осла к иммуноглобулинам человека, конъюгированные с флуоресцентной меткой AMCA (1:100; 709-155-098, Jackson ImmunoResearch, США). Все антитела разводили в РВТ (3% бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США); 0.1% Tween 20 в фосфатно-солевом буфере). Раствор 10% РВТ использовался для блокирования неспецифического связывания антител. Инкубация с первичными антителами проводилась во влажной камере в течение 12 часов при 37°C. Инкубация со вторичными антителами проводилась в течение одного часа при 37°C. На препараты наносили раствор антифэйда (Vectashield; Vector Laboratories, США) для предотвращения выгорания флуоресцентной метки и накрывали покровным стеклом.

Приготовление препаратов митотических метафазных хромосом

Для приготовления препаратов митотических метафазных хромосом клетки костного мозга культивировали в течение 2 часов при 37°C в среде DMEM (ПанЭко) с добавлением колхицина до концентрации 10 мкг/мл. Гипотонию проводили в 0.56% растворе KCl в течение 15 минут при 37°C с последующим центрифугированием в течение 5 минут при 1000 об/мин. Свежеприготовленный холодный раствор фиксатора (смесь метанола и ледяной уксусной кислоты в объемном соотношении 3:1) меняли три раза. Клеточную суспензию раскапывали на

холодные влажные предметные стекла. Препараты высушивали на воздухе и наносили среду, замедляющую выцветание флуоресценции, с DAPI (Vectashield; Vector Laboratories, США).

Получение Cot-1 ДНК

Получение Cot-1 ДНК проводили в соответствии с описанным протоколом (Liehr, 2009). ДНК фрагментировали с помощью ультразвукового дезинтегратора в течение 2 мин при частоте 22 кГц. Концентрацию озвученной ДНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000. Денатурацию проводили в течение 10 минут при 95°C и помещали в лед для предотвращения ренатурации.

Реассоциацию ДНК проводили в течение 16 минут при 60°C с добавлением 0.2M раствора NaCl. Оставшиеся в растворе одноцепочечные последовательности удаляли с помощью S1 эндонуклеазы при 42°C в течение 10-60 минут в зависимости от концентрации ДНК. Осаждение проводили 0.8 объемами изопропанола в течение 12 часов при -20°C, центрифугировали 10 минут при 12000 об/мин и растворяли в TE буфере.

Приготовление GRC-специфичных гибридизационных проб и флуоресцентная гибридизация *in situ*

Гибридизационные пробы для GRC зебровой амадины (TGU), бледной ласточки (RDI), чижа (SSP) и японской амадины (LST) были получены Н.Б. Рубцовым. Клетки семенников гипотонировали в 0.88% растворе KCl при 37°C в течение трех часов. В качестве фиксатора использовали смесь метанола и ледяной уксусной кислоты в объемном соотношении 3:1. Клеточную суспензию раскапывали на холодные и влажные предметные стекла, высушивали и окрашивали 0.1% красителем Гимза в течение 3-5 минут при комнатной температуре. GRC идентифицировали как окрашенные округлые тела, локализованные рядом со сперматоцитами. Микродиссекция хромосом проводилась описанным ранее способом (Rubtsov et al., 2002). Первоначальная амплификация ДНК 15 собранных копий GRC для каждого вида выполнялась с использованием GenomePlex Single Cell Whole Genome Amplification Kit (WGA4) (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с установленным изготовителем протоколом. Мечение продуктов полимеразной

цепной реакции (ПЦР) проводили с использованием аналогов нуклеотида TAMRA-dUTP или Flu-dUTP (Genetyx, Новосибирск) при дополнительных циклах ПЦР или с помощью биотин-11-dUTP (Zadesenets et al., 2016).

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) проводилась Т.В. Карамышевой и К.С. Задесенец описанным ранее способом (Zadesenets et al., 2012) в присутствии ДНК спермы лосося (Ambion, США). Для супрессии гибридизации зонда с повторенными последовательностями использовали Cot-1 ДНК. Хромосомы были окрашены DAPI в растворе антифэйда (Vectashield; Vector Laboratories, США).

Микроскопический анализ и обработка изображения

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). Флуоресцентные сигналы фиксировались как черно-белые изображения и объединялись автоматически с помощью программного обеспечения ISIS4. Яркость и контрастность изображений редактировали с использованием пакета PaintShopPro 7.0 (Corel, Канада).

Измерения и статистический анализ

Измерение размеров бивалентов, регистрацию положения центромеры, числа и позиции рекомбинационных обменов на хромосоме проводили с помощью программы MicroMeasure3.3 (Reeves, 2001).

Статистический анализ проводили с использованием пакета STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). Данные в тексте и таблице представлены в виде $M \pm m$, где M – это средняя арифметическая, m – стандартное отклонение. Различия между полами и видами по среднему числу сигналов MLH1 и длине СК были оценены с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни (MacFarland et al., 2016). Достоверным считался уровень значимости $p < 0.01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1 Анализ распространенности GRC среди птиц

Для того, чтобы определить, насколько широко среди птиц встречается GRC, мы исследовали представителей девяти семейств подотряда певчие птицы отряда Воробьинообразные и по одному представителю из отрядов Попугаеобразные, Соколообразные, Ржанкообразные и Стрижеобразные (Рис. 6) (Torgasheva et al., 2019).

1.1 Анализ распространенности GRC среди представителей отряда Воробьинообразные

Согласно литературным данным, GRC у зебровой и японской амадины является единственной большой акроцентрической хромосомой. Описанная нами ранее GRC ласточки-береговушки (*Riparia riparia*) и бледной ласточки (*Riparia diluta*) имела такую же морфологию и размер. Однако после того, как мы расширили выборку исследованных видов, мы выявили значительную вариацию по длине СК между GRC разных видов. На основе этих результатов, мы предложили классифицировать эту хромосому по размеру на макро- и микро-GRC по аналогии с макро- и микрохромосомами птиц.

1.1.1 Детекция макро-GRC у представителей отряда Воробьинообразные

Дополнительно к выявленным ранее макро-GRC у зебровой и японской амадины из семейства Астрильдовые (Pigozzi, Solari, 1998; del Priore, Pigozzi, 2014) мы обнаружили макро-GRC у восьми видов птиц из отряда певчие воробьиные: ласточки-береговушки и бледной ласточки из семейства Ласточковые (Hirundinidae) (Рис. 7а, д), большой синицы (*Parus major*) из семейства Синицевые (Paridae) (Рис. 7б, е), садовой камышовки (*Acrocephalus dumetorum*) из семейства Камышовковые (Acrocephalidae) (Рис. 8а), полевого жаворонка *Alauda arvensis* из семейства Жаворонковые (Alaudidae) (Рис. 8б), амадины Гульда *Erythrura gouldiae* из семейства Астрильдовые (Рис. 8в), обыкновенного снегиря *Pyrrhula pyrrhula* и чижа *Spinus spinus* из семейства Вьюрковые (Fringillidae) (Рис. 8г, д).

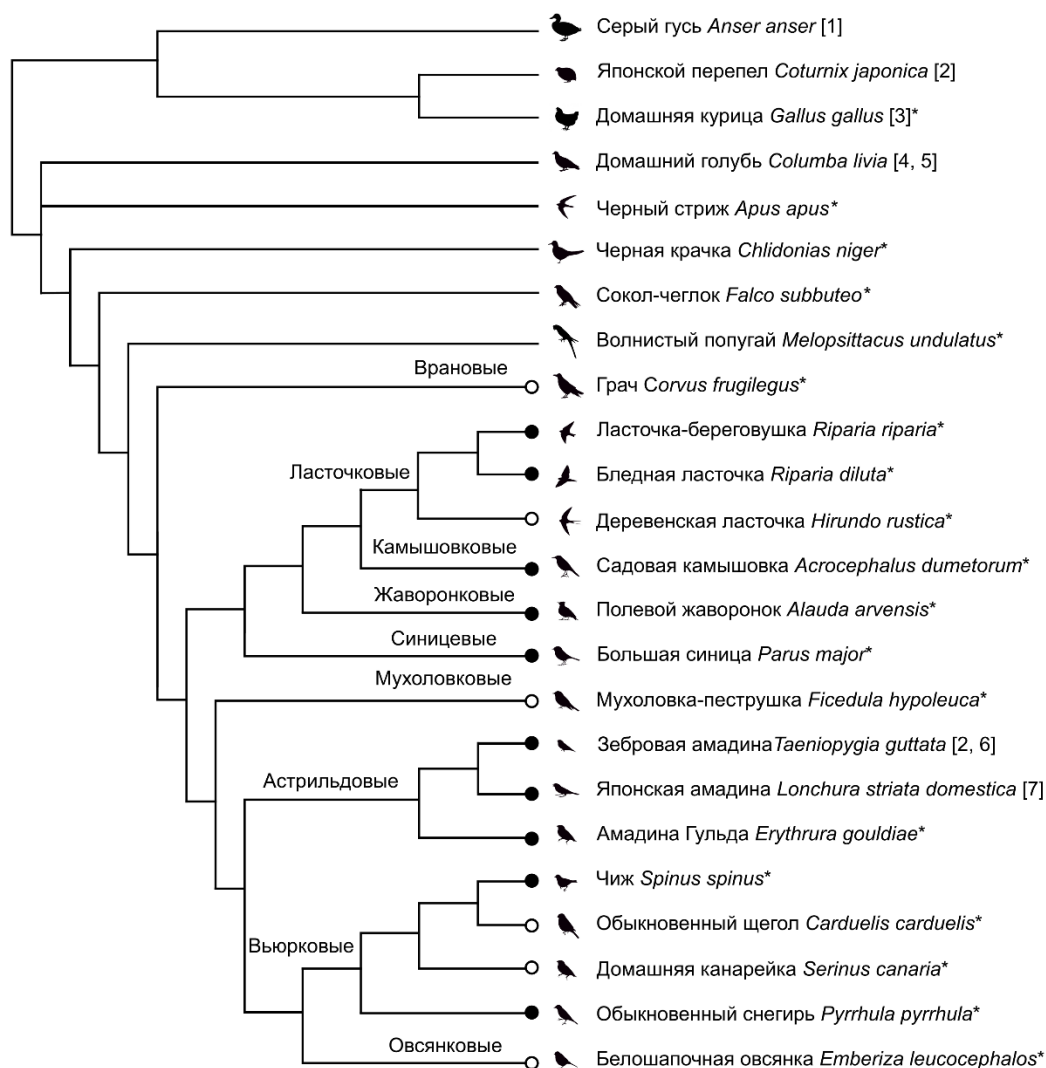


Рисунок 6. Филогенетическое древо птиц, для которых исследованы пахитенные кариотипы. Черные круги указывают на виды с макро-GRC, белые круги указывают на виды с микро-GRC, отсутствие кругов означает отсутствие GRC. Звездочками отмечены виды, исследованные в данной работе. Древо построено на основе кладограммы Reddy с соавторами (2017). Положение черного стрижа определено согласно работе Prum с соавторами (2015). Положение семейств певчих птиц определено согласно работе Roquet с соавторами (2014). Положение видов внутри семейства Астрильдовые определено согласно работе Hooper и Price (2015). ¹(Torgasheva, Borodin, 2017), ²(Calderón, Pigozzi, 2006), ³(Pigozzi, 2001), ⁴(Pigozzi, Solari, 1999a), ⁵(Pigozzi, Solari, 1999b), ⁶(Pigozzi, Solari, 1998), ⁷(del Priore, Pigozzi, 2014).

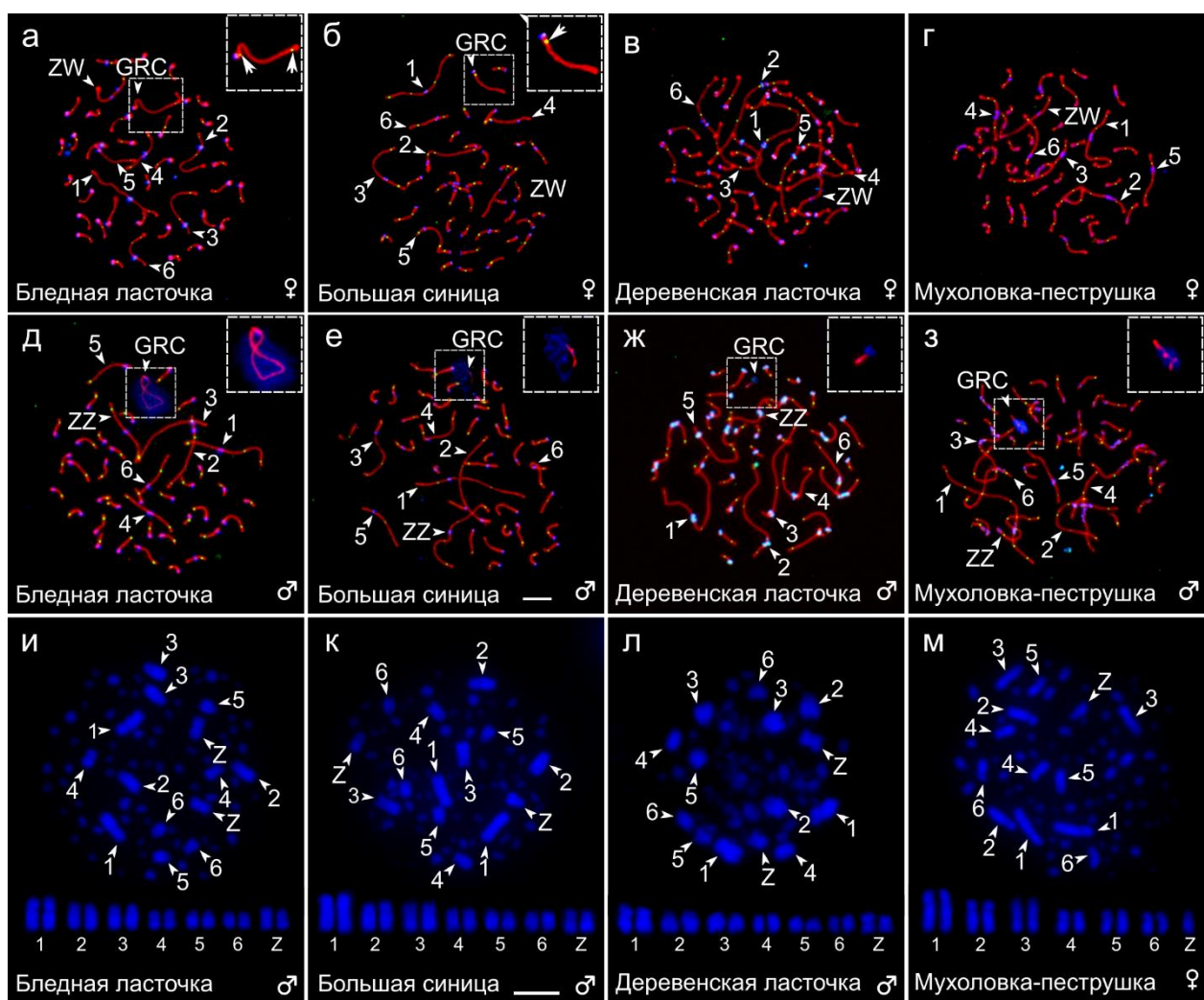


Рисунок 7. Наличие GRC у певчих птиц. (а-з) Пахитенные клетки четырех видов птиц, иммуноокрашенные антителами к белку SYCP3 (красный), центромерным белкам (синий) и белку MLH1 (зеленый). (и-м) Метафазные хромосомы клеток костного мозга, окрашенные DAPI. Головками стрелок обозначены самые большие биваленты в порядке уменьшения их размера, ZZ (идентифицируемый по размеру и центромерному индексу), ZW (идентифицируемый по гетероморфному СК и невыровненным центромерам) и GRC. На врезках показаны GRC. Биваленты микро-GRC у самок деревенской ласточки (в) и мухоловки-пеструшки (г) неотличимы от микрохромосом основного набора. Масштаб – 5 мкм

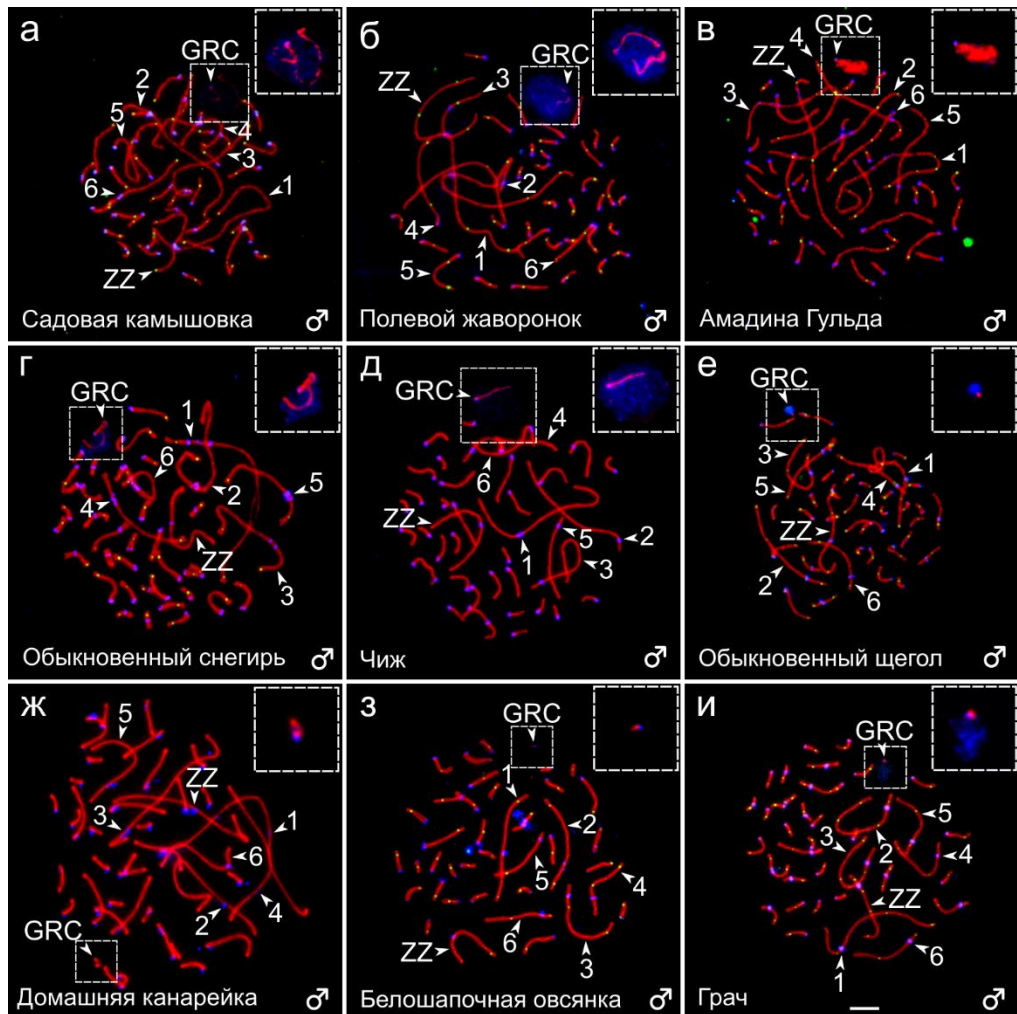


Рисунок 8. Наличие GRC у певчих птиц. Пахитенные сперматоциты девяти видов птиц, иммуноокрашенные антителами к белку SYCP3 (красный), центромерным белкам (синий) и белку MLH1 (зеленый). Головками стрелок обозначены самые большие биваленты в порядке уменьшения их размера, ZZ (идентифицируемый по размеру и центромерному индексу) и GRC. На врезках показаны GRC. Масштаб – 5 мкм

Макро-GRC легко отличалась по морфологии и размеру от хромосом основного набора в пахитенных кариотипах как самок, так и самцов. У всех исследованных видов она была крупной акроцентрической хромосомой. В пахитенных сперматоцитах GRC формировала унивалент, хорошо отличимый от бивалентов хромосом основного набора по отсутствию сигналов MLH1 и более бледному окрашиванию антителами к SYCP3 (Рис. 7 д, е). В большинстве случаев вокруг унивалента GRC в сперматоцитах на стадии пахитены мы выявляли неспецифичное окрашивание антицентромерными антителами, что являлось одной

из диагностических особенностей GRC (Рис. 7д-з, Рис. 8). Вероятно, это связано с гетерохроматинизацией этой хромосомы в сперматоцитах на стадии пахитены. Это также подтверждалось более интенсивным окрашиванием DAPI.

В пахитенных ооцитах GRC, как правило, была представлена в виде полностью спаренного бивалента. (Рис. 7 а-г). Этот бивалент отличался от бивалентов хромосом основного набора по размеру и морфологии (крупный акроцентрик) и по специфическому паттерну рекомбинации (см. ниже).

Сравнительный анализ кариотипов пахитенных сперматоцитов и/или ооцитов и соматических кариотипов клеток костного мозга надежно подтвердил наличие макро-GRC у перечисленных видов (Рис. 7). В соматическом кариотипе у этих видов крупные акроцентрические хромосомы отсутствовали (Рис. 7 и-м). Размер и морфология остальных макробивалентов в пахитенных кариотипах полностью соответствовали размеру и морфологии макрохромосом в клетках костного мозга.

Полученные нами соматические кариотипы клеток костного мозга ласточки-береговушки ($2n=80$), большой синицы ($2n=80$, Рис. 7к) и чижа ($2n=80$) соответствовали описанным ранее по морфологии первых шести макрохромосом и по числу хромосом (Li, Bian, 1988; Udagawa, 1952; Ohno et al., 1964). Они не содержали крупной акроцентрической макрохромосомы. Пахитенные ооциты ласточки-береговушки и большой синицы (Рис. 7б) содержали 41 бивалент, включая GRC. Пахитенные сперматоциты большой синицы (Рис. 7е) и чижа (Рис. 8д) содержали 40 бивалентов и дополнительный унивалент GRC.

Соматический кариотип бледной ласточки (Рис. 7и) не отличался от описанного ранее соматического кариотипа ласточки-береговушки ($2n=80$) (Li, Bian, 1988). Он состоял из 39 пар аутом и пары половых хромосом. Макрохромосомы 1 и 4 были метацентриками, 2 и 3 – субacroцентриками, 5 и 6 – субметацентриками (Рис. 7а). Макрохромосомы 7, 9, 10 и все микрохромосомы, за исключением двух метацентриков, были акроцентрическими. Пахитенный кариотип самки включал в себя 41 бивалент, включая GRC (Рис. 7а), пахитенный кариотип самца состоял из 40 бивалентов и одного макроунивалента (Рис. 7д).

Пахитенный кариотип жаворонка, полученный нами (Рис. 8б), хорошо соответствовал описанному соматическому кариотипу ($2n=78$) (Hammar, 1970) по морфологии макрохромосом, но содержал 40 бивалентов и имел акроцентрический

макроунивалент макро-GRC. Мы предполагаем, что различие в числе хромосом между нашими и литературными данными может быть следствием технической сложности в подсчете отдельных микрохромосом на препаратах метафазных хромосомных пластинок.

Кариотип клеток костного мозга амадины Гульда ранее описан не был. Хромосома 1 была метацентриком; 2 и 3 – субметацентриками; 4 и 5 – субacroцентриками. Морфология макрохромосом соматического кариотипа была известна только для близкого вида, трехцветной попугайной амадины (*Erythrura trichroa*) и совпадала с описанной нами для амадины Гульда (Christidis, 1990). Исключение составляла хромосома 3, которая у амадины Гульда была субметацентрической, а у трехцветной попугайной амадины – метацентрической. Число хромосом в соматическом кариотипе трехцветной попугайной амадины не было подсчитано, возможно, из-за технической сложности в визуализации отдельных микрохромосом в метафазной пластинке. Соматический кариотип амадины Гульда состоял из 80 хромосом.

Соматические кариотипы клеток костного мозга садовой камышовки и обыкновенного снегиря не были описаны ранее. У садовой камышовки ($2n=80$) хромосомы 1, 2, 3 и 6 были субacroцентрическими; 4 –acroцентрической; 5 – субметацентрической. У обыкновенного снегиря ($2n=80$) хромосомы 1, 3, 4 и 6 были субметацентриками, 2 и 5 – субacroцентриками. Пахитенные сперматоциты обоих видов содержали 40 бивалентов и один макроунивалент GRC.

В рамках данной работы мы не проводили полного детального описания кариотипов перечисленных видов из-за ограниченной доступности материала некоторых из них. Учитывая характеристики макро-GRC, сравнительный анализ размера и морфологии макрохромосом в пахитенных и соматических кариотипах надежно доказывал наличие этой хромосомы в клетках зародышевого пути.

1.1.2 Детекция микро-GRC у представителей отряда Воробьинообразные

В ходе работы мы обнаружили, что у некоторых видов GRC представлена микрохромосомой. Детекция микро-GRC была более сложной. Мы не обнаруживали в пахитенных кариотипах этих видов крупногоacroцентрического бивалента или унивалента. Сравнение пахитенного и соматического кариотипов таких видов также не могло дать надежного результата из-за сложности в подсчете отдельных

микрохромосом на препаратах метафазных пластинок. У самок эта хромосома присутствовала в двух копиях и в пахитенных клетках формировала микробивалент, неотличимый от микробивалентов основного набора хромосом. Тем не менее, особенности мейотического поведения этой хромосомы у самцов позволили нам выявить микро-GRC у шести видов: деревенской ласточки (*Hirundo rustica*) из семейства Ласточковые (Рис. 7ж), мухоловки-пеструшки (*Ficedula hypoleuca*) из семейства Мухоловковые (Muscicapidae) (Рис. 7з), обыкновенного щегла (*Carduelis carduelis*) и домашней канарейки (*Serinus canaria*) из семейства Вьюрковые (Рис. 8е, ж), белошапочной овсянки (*Emberiza leucocephalos*) из семейства Овсянковые (Emberizidae) (Рис. 8з) и грача (*Corvus frugilegus*) из семейства Врановые (Corvidae) (Рис. 8и).

Детекцию микро-GRC у перечисленных видов мы проводили, используя комплекс диагностических признаков: 1) присутствие во всех пахитенных сперматоцитах микроунивалента; 2) окрашивание микроунивалента антицентромерными антителами; 3) в случае доступности материала - наличие дополнительного микробивалента в пахитенных ооцитах (проверено для деревенской ласточки и мухоловки-пеструшки, Рис. 7); 4) несоответствие соматического и пахитенного кариотипов по числу хромосом; 5) наличие на микроуниваленте интенсивного сигнала при гибридизации с GRC-специфичной пробой близкого вида (проверено для деревенской ласточки, мухоловки-пеструшки и обыкновенного щегла; см. раздел 2);

Во всех пахитенных сперматоцитах шести перечисленных видов мы обнаружили дополнительный микроунивалент, окрашиваемый антицентромерными антителами. У большинства видов этот микроунивалент был акроцентриком. У единственного вида – мухоловки-пеструшки – он был метацентриком.

Для деревенской ласточки и мухоловки-пеструшки мы описали пахитенные кариотипы самок и самцов (Malinovskaya et al., 2020a). У обоих видов ооциты содержали 41 бивалент, тогда как сперматоциты содержали 40 бивалентов и дополнительный микроунивалент. Соматические кариотипы для этих видов ранее описаны не были. Соматический кариотип деревенской ласточки ($2n=80$, Рис. 7л) не отличался от известного соматического кариотипа ласточки-береговушки (Li, Bian, 1988). Кариотип клеток костного мозга мухоловки-пеструшки состоял из 39 пар

аутосом и пары половых хромосом (Рис. 7м). Ранее он не был описан. Макрохромосома 1 была субметацентрической, 2, 3, 5 и 6 – субacroцентрическими, 4 – метацентрической.

Кариотипы клеток костного мозга обыкновенного щегла ($2n=82$) и домашней канарейки ($2n=80$) не отличались от описанных ранее соматических кариотипов по числу хромосом и морфологии макрохромосом (Christidis, 1986; Takagi, Sasaki, 1974). Известный соматический кариотип белошапочной овсянки ($2n=80$) (Radjabli et al., 1970) соответствовал пахитенному кариотипу этого вида ($n=40$), полученному нами, за исключением дополнительного микроунивалента, детектируемого в пахитенных сперматоцитах.

Соматический кариотип грача неизвестен. По морфологии макрохромосом полученный нами пахитенный кариотип грача (Рис. 8и) соответствовал описанию соматического кариотипа близкого вида черная ворона (*Corvus corone*) (Belterman, De Boer, 1984), но отличался по числу хромосом. Сперматоциты грача содержали 40 бивалентов и один унивалент, тогда как соматический кариотип черной вороны состоял из 72 хромосом. Различие в числе хромосом могло возникнуть за 5 млн лет независимой эволюции этих видов (Roquet, Lavergne, Thuiller, 2014).

1.1.3 Доказательство элиминации макро-GRC в сперматогенезе у представителей отряда Воробьинообразные

Из литературных данных известно, что GRC у зебровой и японской амадины элиминируется после первого мейотического деления в сперматогенезе и предположительно визуализируется в виде округлого плотного тела хроматина (Pigozzi, Solari, 1998; del Priore, Pigozzi, 2014). Анализируя препараты клеток семенников, мы обнаружили похожие тела у всех рассмотренных видов с предполагаемой макро-GRC. Для детекции GRC в клетках и доказательства её элиминации Н.Б. Рубцовым были приготовлены макро-GRC-специфичные пробы для четырех видов: зебровой амадины (TGU), бледной ласточки (RDU), японской амадины (LST) и чижа (SSP). Для этого были микродиссектированы округлые плотные тела хроматина, предположительно, содержащие элиминируемую GRC. Результаты экспериментов FISH с этими пробами, проведенных нашими коллегами, показали сильный специфический сигнал на GRC в пахитенных сперматоцитах (Рис. 9а). Это указывает на то, что такие хроматиновые тела действительно содержат

элиминируемую GRC (Рис. 9б). Нам не удалось детектировать аналогичные тела у видов с микро-GRC, вероятно, из-за малых размеров этой хромосомы.

1.2 Анализ распространенности GRC за пределами отряда Воробьинообразные

Мы не выявили различий в морфологии первых шести макрохромосом между пахитенными кариотипами сперматоцитов (Рис. 10а, б) и описанными ранее соматическими кариотипами клеток костного мозга у волнистого попугая (*Melopsittacus undulates*) из отряда Попугаеобразные (Ansari, Takagi, Sasaki, 1986) и сокола-чеглока (*Falco subbuteo*) из отряда Соколообразные (Christidis, 1990). У обоих видов мы также не обнаружили дополнительных микроунивалентов в составе пахитенных кариотипов самцов.

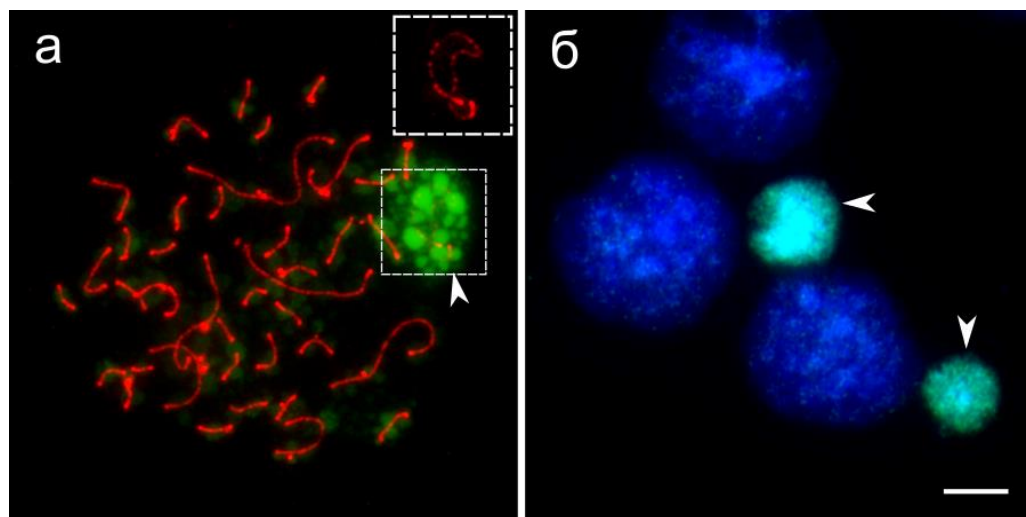


Рисунок 9. Визуализация GRC на препаратах распластанных ядер клеток семенника бледной ласточки после FISH с зондом GRC бледной ласточки (зеленый). (а) Пахитенный сперматоцит, иммуноокрашенный антителами к SYCP3 (красный), с унивалентом GRC на врезке. (б) Постмейотические клетки, окрашенные DAPI (синий), с элиминированной GRC в виде округлых хроматиновых тел. Такие тела использовались для микродиссекции и приготовления ДНК библиотек. Головками стрелок обозначена GRC. FISH проводили Задесенец К.С. и Карамышева Т.И. Масштаб – 5 мкм.

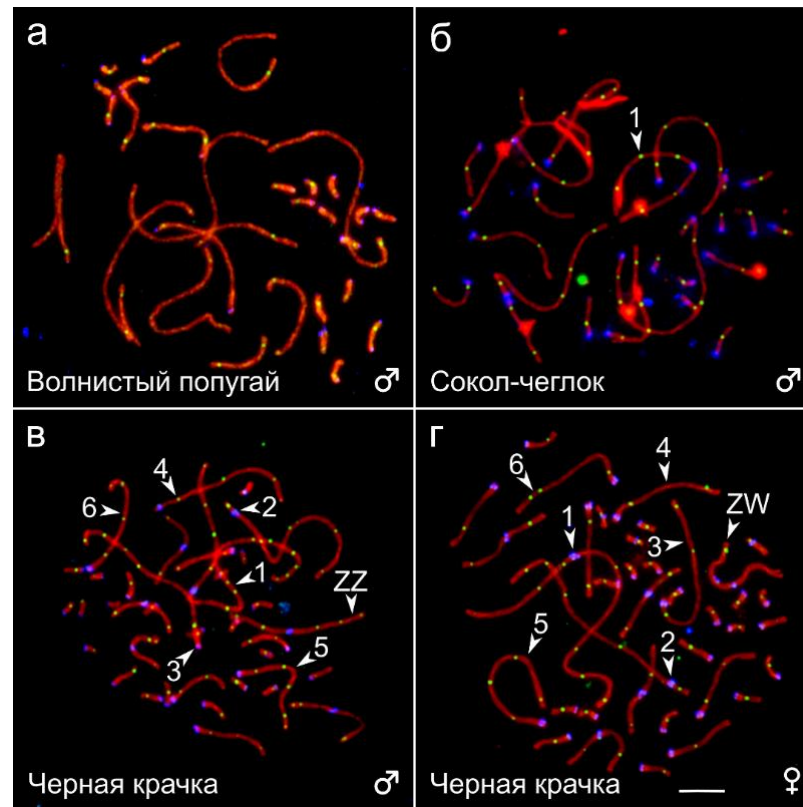


Рисунок 10. Пахитенные мейозиты самцов волнистого попугая (а) и сокола-чеглока (б), самца (в) и самки (г) черной крачки, иммуноокрашенные антителами к белкам SYCP3 (красный), MLH1 (зеленый) и центромерным белкам (синий). Головками стрелок указаны шесть первых хромосом, идентифицированных по размеру и центромерному индексу. У волнистого попугая (а) использование антител к центромерным белкам не дало специфического окрашивания, поэтому надежно идентифицировать отдельные биваленты нам не удалось. У сокола-чеглока (б) все биваленты, кроме первого, являются акроцентриками и неотличимы друг от друга. Масштаб – 5 мкм.

Пахитенные кариотипы сперматоцитов и ооцитов черной крачки (*Chlidonias niger*) из отряда Ржанкообразные (Рис. 10в, г) совпадали, за исключением полового бивалента (Lisachov et al., 2017). Бивалент 1 был субметацентрическим, 2 и 4 – субacroцентрическими, 3, 5 и 6 – акроцентрическими, остальные биваленты, кроме трех метацентриков, были акроцентрическими.

Мы впервые описали соматический и пахитенный каротипы самца черного стрижа (*Apus apus*) из отряда Стрижеобразные (Рис. 11) (Malinovskaya et al., 2018). Оба кариотипа совпадали как по числу хромосом ($2n=78$), так и по морфологии

макрохромосом. Макрохромосомы 1, 3 и 5 были метацентриками; 2, 4 и 6 – субметацентриками. Дополнительных элементов в пахитенном кариотипе черного стрижа мы не обнаружили. Без анализа кариотипа самки нам не удалось надежно идентифицировать половой бивалент ZZ.

Мы сравнили описанные ранее пахитенные кариотипы самок и самцов домашнего голубя (*Columba livia*) (отр. Голубеобразные) (Pigozzi, Solari, 1999a,b), гуся (*Anser anser*) (отр. Гусеобразные) (Torgasheva, Borodin, 2017), японского перепела (*Coturnix japonica*) (Calderón, Pigozzi, 2006) и домашней курицы (*Gallus gallus*) (отр. Курообразные) (Pigozzi, 2001) и сделали вывод, что у этих видов GRC нет. Для домашней курицы мы приготовили и проанализировали препараты мейотических хромосом самцов и также не обнаружили среди них дополнительных унивалентов (Malinovskaya et al., 2019).

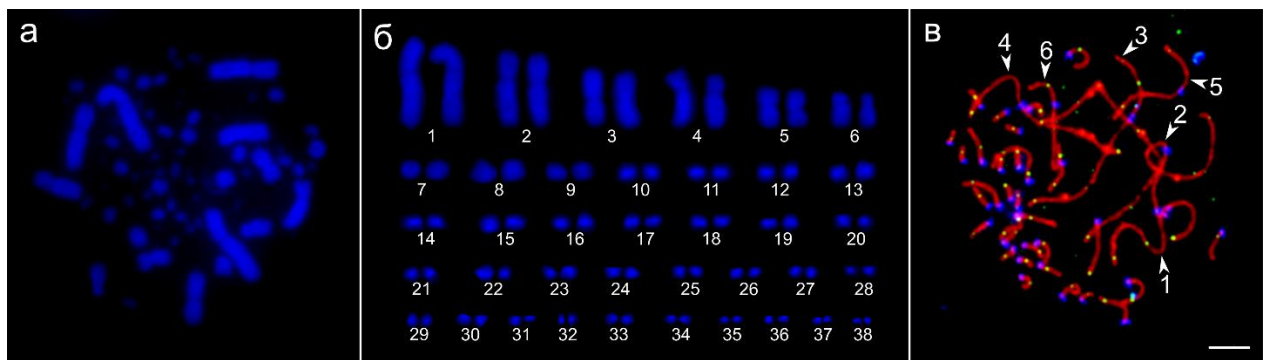


Рисунок 11. Метафазная пластинка клетки костного мозга (**а**), кариотип (**б**) и пахитенный сперматоцит (**в**) черного стрижа. Метафазные хромосомы (**а**, **б**) окрашены DAPI (синий), пахитенные хромосомные биваленты (**в**) иммуноокрашены антителами к белкам SYCP3 (красный), MLH1 (зеленый) и центромерным белкам (синий). Головками стрелок указаны шесть первых хромосом, идентифицированных по размеру и центромерному индексу. Масштаб – 5 мкм.

Таким образом, мы обнаружили GRC у всех рассмотренных представителей 14 видов из подоотряда певчие птицы отряда Воробьинообразные. За пределами данного отряда видов с GRC обнаружено не было. Ранее GRC была описана у зебровой и японской амадины. С учетом этих видов на сегодняшний день известно, что GRC есть у всех рассмотренных 16 видов певчих птиц. Мы выявили вариацию по длине СК между GRC разных видов и предложили классифицировать эту хромосому на макро- и микро-GRC. Макро-GRC была описана у 10 видов, микро-GRC – у 6 видов. Филогенетической кластеризации по размеру GRC мы не выявили. Среди представителей семейств Вьюрковые и Ласточковые были виды с обоими типами GRC. С помощью GRC-специфичных проб мы доказали элиминацию этой хромосомы у видов с макро-GRC.

2 Сравнительный анализ генетического содержания GRC с помощью межвидовой FISH с GRC-специфичными пробами

Для анализа генетического содержания GRC и оценки степени гомологии между GRC разных видов мы использовали полученные ранее пробы GRC зебровой амадины (TGU), бледной ласточки (RDU), японской амадины (LST) и чижика (SSP) в качестве зондов для проведения FISH.

Для подтверждения специфичности зондов нами совместно с коллегами из лаборатории морфологии и функции клеточных структур ИЦиГ СО РАН была проведена серия внутривидовых FISH. Все зонды давали сильный специфичный сигнал на GRC соответствующих видов (Рис. 12а-г). Мы наблюдали сигнал по всей длине хромосомы за исключением обоих концов – районов, в которых происходит рекомбинация на стадии пахитены. Помимо сильного сигнала на GRC, мы обнаружили сигналы на хромосомах основного набора. Зонд GRC зебровой амадины специфично гибридизовался с участком на коротком плече СК3 и давал слабый сигнал на некоторых других бивалентах (Рис.12а). Зонд GRC японской амадины слабо окрашивал некоторые участки на отдельных макро- и микрохромосомах (Рис. 12б). Зонд GRC бледной ласточки показывал локализацию в перицентромерных районах всех хромосом основного набора (Рис. 12в). При гибридизации с супрессией повторяющихся последовательностей эти сигналы не выявлялись. Зонд GRC чижика

специфично метил участок на длинном плече СК3, некоторые перицентромерные и другие районы (Рис. 12г).

Для оценки степени гомологии между GRC разных видов нами совместно с коллегами из лаборатории морфологии и функции клеточных структур ИЦиГ СО РАН была проведена серия межвидовых FISH. Мы обнаружили, что разные зонды окрашивают GRC других видов с разной степенью специфичности. При использовании зонда GRC зебровой амадины мы не смогли обнаружить гибридизационный сигнал на GRC амадины Гульда, чижа, обыкновенного снегиря, и белошапочной овсянки (Рис. 12д-з). Слабый сигнал выявлялся на макро-GRC японской амадины, полевого жаворонка, большой синицы, бледной ласточки, садовой камышовки и на микро-GRC мухоловки-пеструшки (Рис. 12и-о). У всех видов, кроме большой синицы, зонд GRC зебровой амадины специфично гибридизовался с небольшим участком на коротком плече СК3. У большой синицы гибридизационный сигнал выявлялся на длинном плече СК2.

Зонд GRC бледной ласточки слабо окрашивал макро-GRC зебровой амадины и садовой камышовки и микро-GRC мухоловки-пеструшки и деревенской ласточки (Рис. 12р-у). Более интенсивный сигнал наблюдался на GRC большой синицы, у которой проба также окрашивала ZW бивалент (Рис. 12п). У всех видов зонд, содежащий GRC бледной ласточки, показывал сигнал на СК4 или СК5. Зонд GRC чижа окрашивал микро-GRC обыкновенного щегла, участок на длинном плече СК3 и некоторые перицентромерные районы (Рис. 12ф).

Зонды, содержащие макро-GRC, давали яркие сигналы на микро-GRC близких видов, что также является дополнительным подтверждением того, что обнаруженные микроуниваленты в пахитенных сперматоцитах являются GRC.

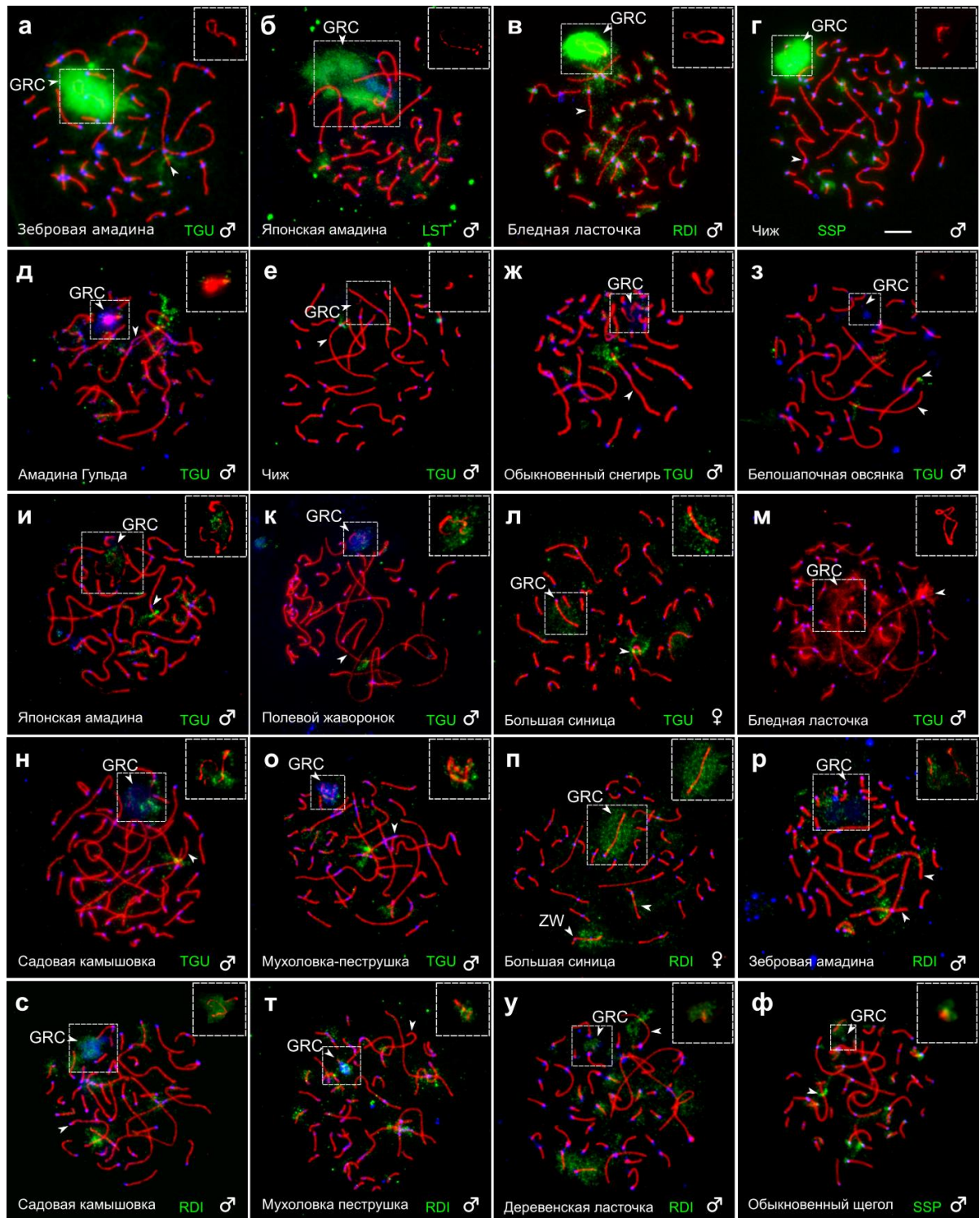


Рисунок 12. FISH с GRC-специфичными зондами. Внутривидовая FISH (а-г) и межвидовая FISH (д-ф) с ДНК зондами (зеленый), полученными из GRC зебровой амадины (TGU), японской амадины (LST), бледной ласточки (RDI) и чижа (SSP) на пахитенные клетки, иммуноокрашенные антителами к белку SYCP3 (красный) и центромерными антителами (синий). Головками стрелок обозначены

гибридизационные сигналы на хромосомах основного набора. На врезках показаны GRC. FISH проводили Задесенец К.С. и Карамышева Т.И. Масштаб – 5 мкм.

Таким образом, мы показали, что GRC некоторых видов имеют гомологичные последовательности, однако основная доля генетического содержания GRC существенно различается у разных видов. Во всех экспериментах по FISH зонды GRC разных видов специфично локализовались на разных участках хромосом основного набора. При межвидовой гибридизации сигнал на GRC, как правило, был слабым или отсутствовал. Эти результаты свидетельствуют о быстрой эволюции генетического содержания GRC.

Чтобы выяснить, характерны ли для макро-GRC разных видов общие особенности поведения, мы детально проанализировали поведение макро-GRC ласточки-береговушки, бледной ласточки и большой синицы на разных стадиях гаметогенеза.

3 GRC у ласточки-береговушки, бледной ласточки и большой синицы: синапсис, рекомбинация и вариация числа копий

Анализ поведения GRC в мейозе и вариацию числа копий мы проводили на клетках самок ласточки-береговушки и большой синицы и самок и самцов бледной ласточки (Malinovskaya et al., 2020b). У этих видов GRC является единственной акроцентрической макрохромосомой, что облегчает её идентификацию среди хромосом основного набора. GRC обычно содержится в двух копиях у самок и в одной – у самцов. У самок две копии GRC, как правило, полностью спарены и рекомбинируют.

Для визуализации пахитенных хромосом мы использовали метод иммуноокрашивания антителами к белку бокового элемента синаптонемного комплекса SYCP3 и белку-маркеру зрелых рекомбинационных узлов MLH1. Данный подход позволил нам детектировать разные синаптические конфигурации, которые формировала GRC в пахитенных мейоцитах, и оценивать количество копий этой хромосомы. Полностью спаренный бивалент GRC не отличался от бивалентов хромосом основного набора. В случае унивалента GRC из-за отсутствия второй копии мы наблюдали слабое мечение антителами к SYCP3 и отсутствие сигналов

MLH1. В сперматоцитах унивалент GRC, как правило, неспецифично метился антицентромерными антителами вдоль всей длины за исключением прителомерных районов.

3.1 Вариация числа копий GRC у самок ласточки-береговушки, бледной ласточки и большой синицы

Всего нами было проанализировано 24 самки ласточки-береговушки, три самки бледной ласточки и семь самок большой синицы (Табл. 3 и 4). GRC была представлена в двух копиях у 20 самок ласточки-береговушки, всех самок бледной ласточки и трех самок большой синицы. В одной копии GRC содержалась у четырех самок ласточки-береговушки (Табл. 3). Четыре самки большой синицы были мозаиками по числу копий GRC и содержали клетки как с двумя, так и с одной копией GRC. У самок-мозаиков доля клеток с одной GRC варьировала от 2 до 10% (Табл. 4). Ранее мозаицизм по числу копий GRC у самок описан не был, и большая синица является первым видом, у которого мы зарегистрировали этот феномен. Ооцитов без GRC обнаружено не было.

Таблица 3 – Полиморфизм по числу копий GRC в ооцитах ласточки-береговушки и бледной ласточки

Вид	№ гнезда	Число птенцов в гнезде	Число исследованных самок	Число особей с одной GRC	Число особей с двумя GRC
Ласточка-береговушка	1	9	4	0	4
	2	5	3	0	3
	3	3	2	0	2
	4	4	2	0	2
	5	3	2	0	2
	6	4	1	0	1
	7	3	1	0	1
	8	4	1	0	1
	9	3	1	0	1
	10	3	1	1	0
	11	5	2	2	0
	12	6	4	1	3
Бледная ласточка	13	3	2	0	2
	14	3	1	0	1
Всего	18	58	27	4	23

Таблица 4 – Мозаицизм по числу копий GRC в ооцитах большой синицы

№ особи	Число проанализированных клеток	Число клеток с	
		одной GRC	двумя GRC
1	65	0	65
2	88	0	88
3	89	0	89
4	12	1	11
5	50	1	49
6	27	2	25
7	93	9	84
Всего	424	13	411

Униваленты GRC у ласточки-береговушки были значительно длиннее бивалентов GRC (19.3 ± 7.0 мкм и 12.9 ± 4.3 мкм, соответственно; U-критерий Манна-Уитни: $p < 0.001$) (Рис. 13а, в). У большой синицы униваленты и биваленты GRC не отличались по длине (16.6 ± 5.6 и 14.1 ± 5.4 , соответственно; U-критерий Манна-Уитни: $p = 0.074$) (Рис. 13б, г). Известно, что в процессе синапсиса гомологичных хромосом происходит уменьшение длины латеральных элементов СК (Goetz, Chandley, Speed, 1984). Отсутствие достоверной разницы между длинами унивалентом и бивалентом GRC у большой синицы может быть следствием небольшого числа проанализированных клеток с одной копией GRC (15 из 224).

У большинства самок ооциты содержали две копии GRC, которые на стадии пахитены формировали нормальный рекомбинирующий бивалент (Рис. 13а, б). В большинстве ооцитов биваленты GRC были полностью спарены. Те ооциты, которые содержали неспаренные или частично спаренные копии GRC, имели неспаренные хромосомы Z и W.

У самок ласточки-береговушки и бледной ласточки большинство бивалентов GRC содержало два сигнала MLH1 (Рис. 13а). Биваленты с одним и тремя сигналами MLH1 встречались редко (10.9% и 4.8% у ласточки-береговушки и 6.9% и 1.6% у бледной ласточки). У самок большой синицы чаще встречались биваленты GRC с одним сигналом MLH1 (Рис. 13б). Доли клеток с двумя и тремя сигналами MLH1 на биваленте GRC большой синицы составили 4.0% и 0.4%. Среднее число сигналов MLH1 на бивалент GRC не различалось между ласточкой-береговушкой и бледной

ласточкой (1.9 ± 0.3 и 1.9 ± 0.4 , соответственно; U-критерий Манна-Уитни: $p = 0.731$) (Рис. 14а, б). У большой синицы оно было значительно снижено (1.1 ± 0.2 , U-критерий Манна-Уитни: $p < 0.001$) (Рис. 14в). У ласточки-береговушки и бледной ласточки среднее число сигналов MLH1 на бивалент GRC не отличалось от аутомсомных бивалентов схожего размера: SC2 и SC3 (U-критерий Манна-Уитни, $p > 0.05$) (Рис. 14а, б). У большой синицы бивалент GRC содержал в среднем в два раза меньше сигналов MLH1, чем аутомсомные SC2 и SC3 (U-критерий Манна-Уитни: $p < 0.001$) (Рис. 14в).

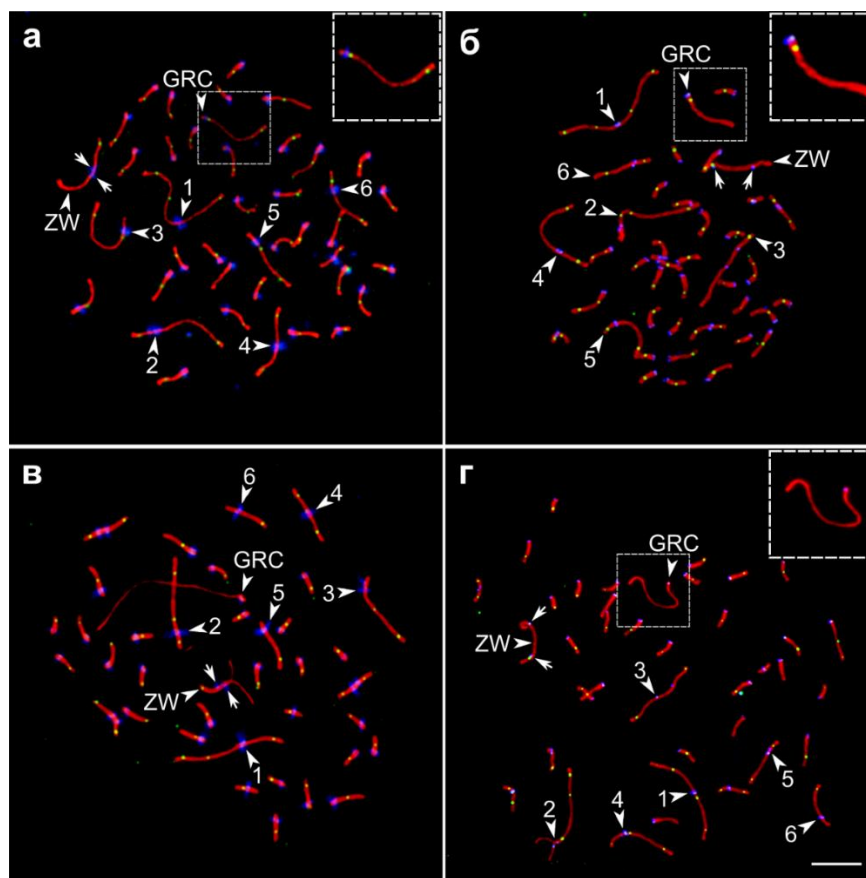


Рисунок 13. Биваленты (а, б) и униваленты (в, г) GRC в пахитенных ооцитах ласточки-береговушки (а, в) и большой синицы (б, г). Хромосомные биваленты окрашены антителами к белкам SYCP3 (красный), MLH1 (зеленый) и центромерным белкам (синий). Головками стрелок указаны шесть первых хромосом, идентифицированных по размеру и центромерному индексу. Стрелками обозначены невыровненные центромеры бивалента ZW. Масштаб – 5 мкм.

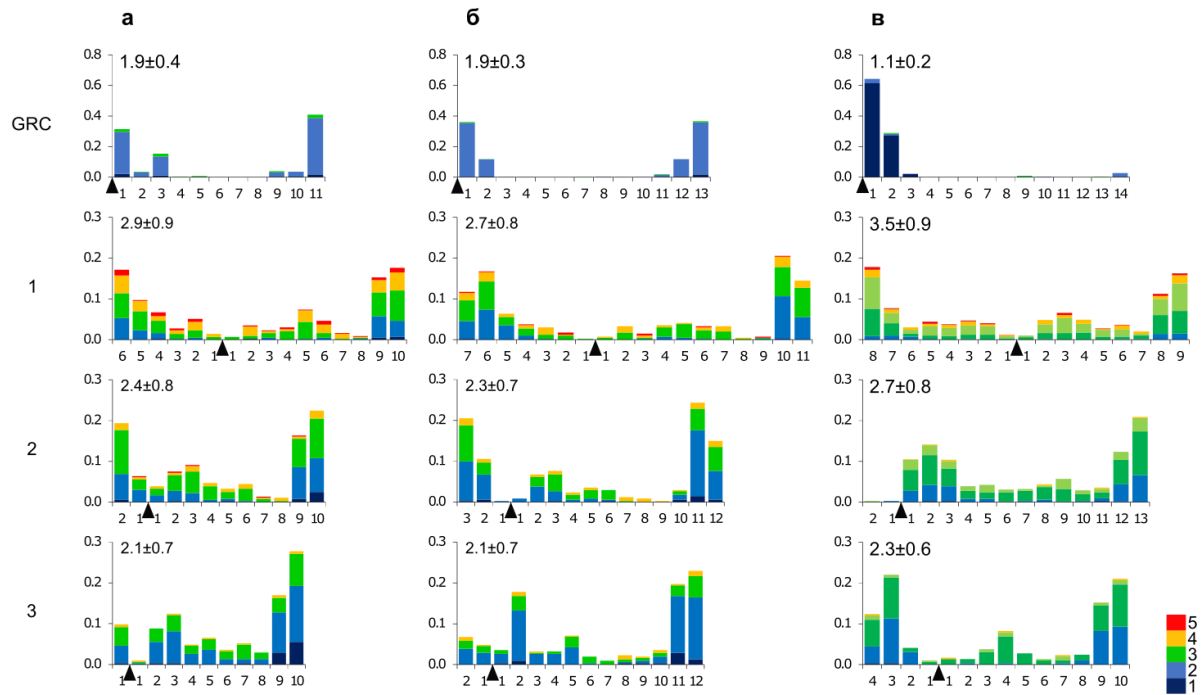


Рисунок 14. Распределение сигналов MLH1 вдоль отдельных бивалентов в пахитенных ооцитах бледной ласточки (а), ласточки-береговушки (б) и большой синицы (в). Ось X отражает позицию сайта MLH1 на трех самых крупных аутосомных бивалентах и на биваленте GRC относительно центromеры (обозначена треугольником). Каждый интервал эквивалентен примерно 1 мкм длины СК. Ось Y отражает долю сигналов MLH1 в каждом интервале. Цвета отражают долю бивалентов с 1-5 сигналами MLH1 на бивалент. Цифры слева от оси Y обозначают номера бивалентов; цифры над каждым графиком показывают среднее число сигналов MLH1 на конкретный бивалент у конкретного вида.

Распределение сигналов MLH1 вдоль бивалента GRC у ласточки-береговушки, бледной ласточки и большой синицы отличалось от распределения вдоль аутосомных бивалентов (Рис. 14). У всех трех видов вдоль бивалента GRC наблюдалась сильная поляризация сигналов MLH1. У ласточки-береговушки и бледной ласточки большинство сигналов MLH1 располагались по концам бивалента GRC. У большой синицы распределение сигналов MLH1 в основном ограничивалось одним пиком около центromеры и почти полным отсутствием сигналов в остальной части бивалента. Вдоль аутосомных бивалентов у всех трех видов сигналы MLH1 распределялись более равномерно.

3.2 Вариация числа копий GRC у самцов бледной ласточки

Всего нами было проанализировано девять самцов бледной ласточки (Табл. 5). У двух из них во всех рассмотренных сперматоцитах содержалась одна копия GRC (Рис. 15а). Семь самцов бледной ласточки были мозаиками по числу копий GRC и имели сперматоциты с одной, двумя и тремя копиями этой хромосомы. У самцов-мозаиков доля клеток с двумя копиями GRC варьировала от 2% до 61% (Рис. 15б). Использование GRC-специфичной пробы бледной ласточки позволило нам детектировать три копии GRC у одного из самцов-мозаиков в пяти из 85 проанализированных клеток (Рис. 15в, е).

Униваленты GRC у самцов бледной ласточки отличались от унивалентных GRC у самок. У самцов униваленты GRC слабее метились антителами к белку SYCP3 и имели большую длину СК, чем у самок (24.5 ± 8.5 мкм и 19.3 ± 7.0 мкм, соответственно; U-критерий Манна-Уитни: $p < 0.001$). В большинстве сперматоцитов вокруг GRC наблюдался дисперсный сигнал антицентромерных антител (Рис. 15а, б). Дистальный и проксимальный концы унивалента GRC, как правило, были сближены (Рис. 15а, в). Аутокиназа мы не детектировали. Униваленты GRC не содержали сигналов MLH1.

Таблица 5 – Мозаицизм по числу копий GRC в сперматогониях (СПГ) и пахитенных сперматоцитах (П) бледной ласточки

№ особи	Число проанализированных клеток		Одна GRC, доля клеток в %		Две GRC, доля клеток в %		Три GRC, доля клеток в %	
	СПГ	П	СПГ	П	СПГ	П	СПГ	П
	1	5	77	100	88	0	12	0
2	205	62	93	39	7	61	0	0
3	-	66	-	100	-	0	-	0
4	8	58	100	95	0	5	0	0
5	-	55	-	98	-	2	-	0
6	74	85	95	69	5	25	0	6
7	19	111	100	91	0	9	0	0
8	-	26	-	100	-	0	-	0
9	102	52	74	87	26	13	0	0
Всего	413	592	89	84	11	10	0	6

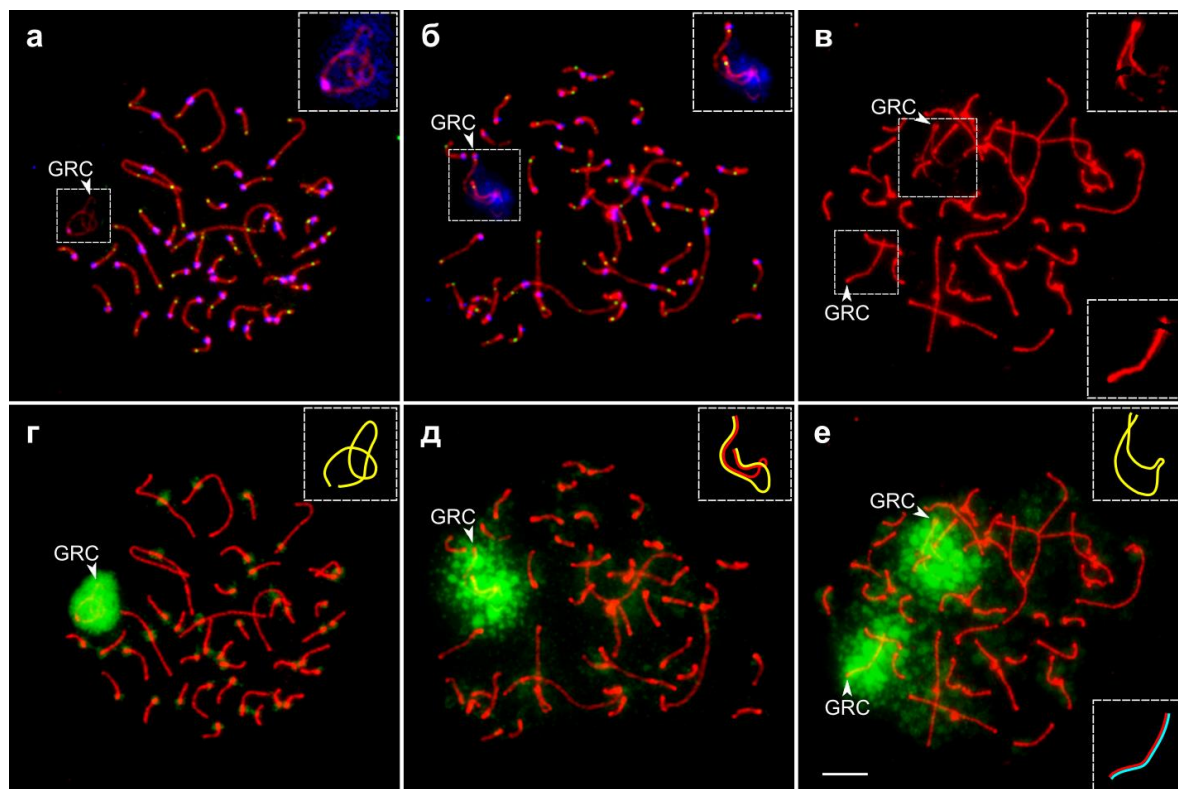


Рисунок 15. Сперматоциты бледной ласточки с одной (а, г), двумя полностью спаренными (б, д) и тремя (в, е) копиями GRC, из которых две копии формируют бивалент и одна копия - унивалент. (а-в) Клетки, иммуноокрашенные антителами к SYCP3 (красный), центромерным белкам (а, б) и MLH1 (а, б). (г-е) Те же самые клетки после FISH с зондом GRC бледной ласточки (зеленый). Головки стрелок указывают на GRC. На врезке показаны GRC (а-в) и схематичные изображения СК GRC (г-е). FISH проводили Задесенец К.С. и Карамышева Т.И. Масштаб – 5 мкм.

В сперматоцитах с двумя копиями GRC, последние обычно были частично спарены, но никогда не формировали полностью спаренный бивалент (Рис. 15б, д). У самцов бледной ласточки, как и у самок ласточки-береговушки, GRC биваленты были короче, чем GRC униваленты (17.4 ± 3.8 мкм и 24.5 ± 8.5 мкм; U-критерий Манна-Уитни: $p < 0.001$). Сигналы MLH1 на биваленте GRC мы наблюдали только у одного самца в 50% всех рассмотренных клеток. Как правило, мы детектировали один сигнал MLH1, в нескольких клетках таких сигналов было. В случае одного сигнала MLH1, он всегда располагался на проксимальном конце, в то время как два сигнала MLH1 располагались по обоим концам бивалента (Рис. 16б).

Для анализа числа копий GRC на разных стадиях сперматогенеза мы использовали GRC-специфичную пробу бледной ласточки. Все рассмотренные сперматогонии (идентифицированы по размеру, диаметр их ядер составил примерно 13-15 мкм) содержали по меньшей мере один гибридационный сигнал (Рис. 16а). Около 11% этих клеток имели два сигнала зонда GRC (Рис. 16б). В некоторых из этих клеток один сигнал зонда визуализировался внутри ядра, в то время как второй сигнал находился на периферии (Рис. 16в).

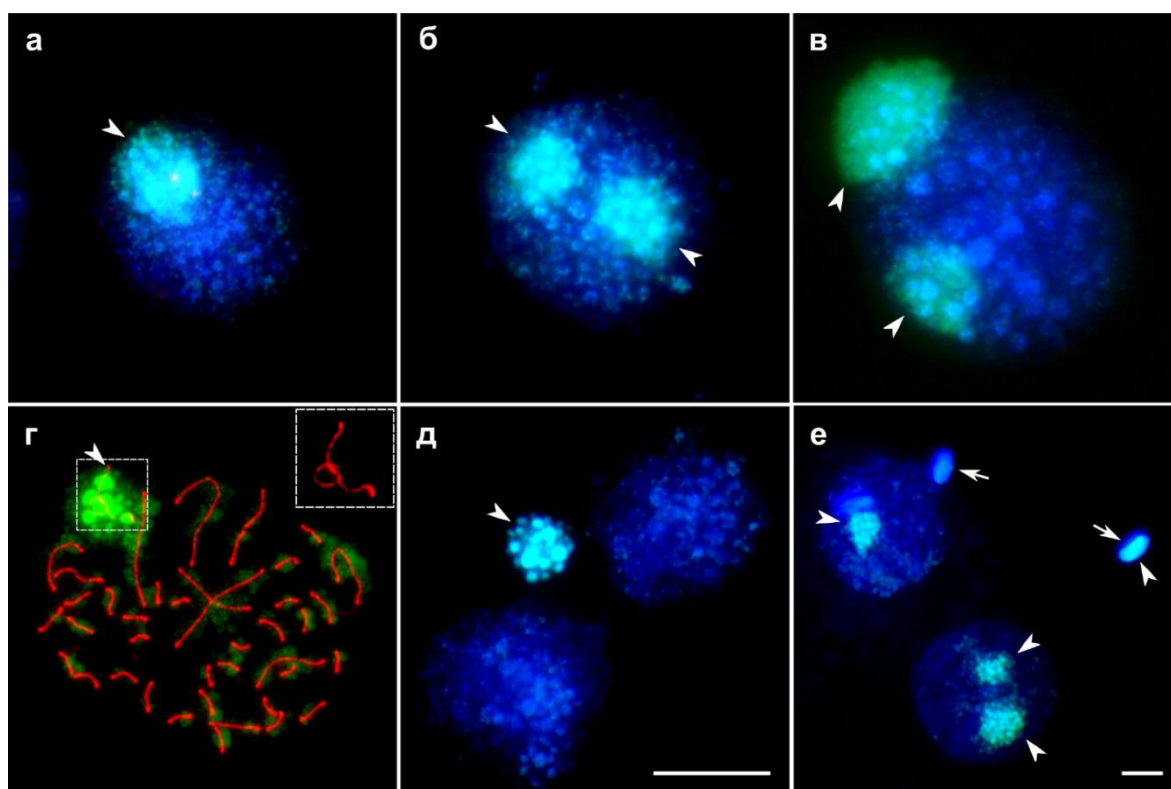


Рисунок 16. Визуализация GRC на препаратах распластанных ядер клеток семенника бледной ласточки после FISH с зондом GRC бледной ласточки (зеленый), окрашенные DAPI (синий). (а-в) Сперматогонии с одной (а) и двумя (б, в) копиями GRC. (г) Пахитенный сперматоцит, иммуноокрашенный антителами к SYCP3 (красный), с одной копией GRC. На врезке показана GRC. (д) Постмейотические клетки с элиминированной GRC в виде округлого хроматинового тела. (е) Сперматозоиды (обозначены стрелками) без и с GRC. Головками стрелок обозначена GRC. FISH проводили Задесенец К.С. и Карамышева Т.И. Масштаб – 10 мкм.

Все рассмотренные пахитенные сперматоциты содержали один гибридизационный сигнал на одной или двух копиях GRC (Рис. 15г, д и 16г). В сперматоцитах с тремя копиями наблюдалась два сигнала: на униваленте и биваленте (Рис. 15е). Рядом с ядрами некоторых клеток располагались тела плотно упакованного хроматина, специфично меченного зондом GRC (Рис. 16д). Большинство сперматид и сперматозоидов не содержали сигнала зонда GRC. В некоторых сперматозоидах мы обнаружили специфичное мечение (Рис. 16е). Это указывает на то, что у бледной ласточки возможна передача GRC от обоих родителей подобно зебровой амадине (Pei et al. 2021).

Таким образом, мы показали вариацию в числе копий GRC у самцов бледной ласточки и у самок ласточки-береговушки и большой синицы. У самок ласточки-береговушки был обнаружен полиморфизм: около 15% самок содержали одну копию GRC, остальные – две копии. Среди самок большой синицы и самцов бледной ласточки были обнаружены мозаики. Число копий GRC варьировало от одной до трех. Мы показали наличие GRC в некоторых сперматозоидах бледной ласточки, что указывает на возможность наследственной передачи GRC от обоих родителей.

ОБСУЖДЕНИЕ

1 Происхождение и филогения GRC у певчих птиц

У птиц GRC была впервые обнаружена более двадцати лет назад (Pigozzi, Solari, 1998). Описанные тогда полиморфизм по числу копий GRC, наблюдаемый между самками зебровой амадины, и элиминация из мужских половых и соматических клеток делали GRC схожей с В-хромосомами. Однако, последующие работы по изучению GRC выявили ряд уникальных особенностей этой хромосомы, на основании чего было решено выделить GRC в отдельный класс хромосом (Pigozzi, Solari, 2005; Torgasheva et al., 2019).

Во-первых, GRC присутствует во всех рассмотренных пахитенных клетках у всех особей, что поднимает вопрос о её функциональной значимости как для клеток зародышевого пути, так и для жизнеспособности всей особи. В противоположность GRC В-хромосомы являются дополнительными «необязательными» элементами кариотипа, которые могут отсутствовать в отдельных клетках и у отдельных особей в популяции (Houben et al., 2014).

Во-вторых, оценки эволюционного времени существования GRC и В-хромосом сильно разнятся. В этой работе мы описали GRC у всех рассмотренных 14 видов из девяти семейств подоотряда певчие птицы отряда Воробьинообразные. Наряду с GRC у зебровой и японской амадин, описанных до нас, на сегодняшний день GRC известна у 16 проанализированных представителей певчих птиц. За пределами отряда Воробьинообразные видов с GRC обнаружено не было. Отряд Воробьинообразные включает в себя около половины от всех существующих видов птиц. Он имеет два подоотряда: певчие воробьиные и кричащие воробьиные (Payevsky, 2014). Наличие GRC у всех рассмотренных представителей певчих воробьиных указывает на монофилетическое происхождение этой хромосомы около 35-42 млн. лет назад (Prum et al., 2015). Kinsella с соавторами (2019) путем филогенетического анализа последовательностей генов на GRC зебровой амадины показали, что эта хромосома, вероятно, впервые возникла у общего предка всех воробьинообразных птиц около 50 млн лет назад. Эволюционный возраст В-хромосом не превышает 5 млн. лет (Silva et al., 2021). Случайно возникнув, В-

хромосомы могут либо также случайно потеряться, либо приобрести способность к мейотическому драйву и распространиться в популяции (Camacho, Sharbel, Veukeboom, 2000). После того, как число В-хромосом становится избыточным, что неизменно оказывает негативный эффект на приспособленность особей-носителей, начинает работать механизм естественного отбора. В результате его действия способность к мейотическому драйву у В-хромосом снижается либо утрачивается. В-хромосомы, не способные к мейотическому драйву и не оказывающее значимого положительного эффекта на приспособленность своего носителя, обречены на случайную элиминацию из популяции (Camacho, Sharbel, Veukeboom, 2000). Маловероятно, что GRC у птиц смогла просуществовать несколько десятков миллионов лет, не имея адаптивного значения.

Эксперименты по межвидовой FISH с использованием GRC-специфичных зондов показали, что GRC близких видов имеют определенную степень гомологии. Зонд GRC зебровой амадины гибридизовался с частью GRC близкого вида – японской амадины (время дивергенции – 8-10 млн. лет) (Рис. 12и) и почти не гибридизовался с GRC амадины Гульда (время дивергенции – около 10 млн. лет) (Рис. 12д) (Hooper, Price, 2015). Интенсивный гибридизационный сигнал мы наблюдали при использовании зонда GRC бледной ласточки на GRC ласточки-береговушки (время дивергенции – около 2 млн. лет) (Pavlova et al., 2008). Более слабое мечение наблюдалось на GRC деревенской ласточки (время дивергенции – около 25 млн лет) (Рис. 12у) (Roquet, Lavergne, Thuiller, 2014). Эти результаты говорят о том, что эволюция генетического содержания GRC в разных линиях проходила с разной скоростью и в разных направлениях.

Интересно, что GRC-специфичные зонды разных видов давали сигналы при гибридизации на хромосомах основного набора. Зонд GRC зебровой амадины метил участок на коротком плече СК3. Существование гомологии между GRC и этим районом у зебровой амадины ранее было показано в работе Itoh с соавторами (2009). Зонд GRC чижа окрашивал участок на длинном плече СК3, а при использовании зонда GRC бледной ласточки сигнал выявлялся на СК4 или 5. Эти результаты говорят о быстрой эволюции генетического содержания GRC. Большая вариация GRC в размере среди разных видов и отсутствие филогенетической кластеризации видов с макро- и микро-GRC также подтверждает это предположение.

Специфичность GRC только для КЗП частично освобождает эту хромосому от действия естественного отбора. Наследование преимущественно по материнской линии и отсутствие рекомбинации на большей части этой хромосомы может приводить к деградации её генетического содержания за счет накопления мутаций. Увеличение числа копий повторенных последовательностей, экспансия транспозонных элементов и делеции, в свою очередь, могут приводить к быстрым изменениям в размере и дивергенции GRC в разных линиях птиц.

В этой работе мы проанализировали только представителей подотряда певчие воробьиные. Согласно нашим результатам, GRC возникла как минимум 35-42 млн лет назад у общего предка певчих птиц. Kinsella с коллегами (2019) в своем исследовании сделали вывод, что GRC могла возникнуть у общего предка всех воробьинообразных птиц, что согласуется с нашими данными. Представители другого подотряда Воробьинообразных – кричащие воробьиные, населяют Южную и Северную Америку, Африку и Австралию и не были доступны для цитогенетического анализа в данной работе.

Мы предполагаем, что GRC образовалась путем случайной дупликации одной из микрохромосом (Рис. 17). Такая прото-GRC могла быть первоначально схожей с паразитическими В-хромосомами. Путем накопления и амплификации генов, играющих роль в формировании и развитии КЗП, эта хромосома, вероятно, из паразитической стала важным элементом кариотипа, который стабильно передается в ряду поколений. Детальный сравнительный анализ генетического содержания макро- и микро-GRC у разных видов и популяционный анализ полиморфизма этой хромосомы могут пролить свет на происхождение GRC и позволят изучить макро- и микроэволюцию этой хромосомы.

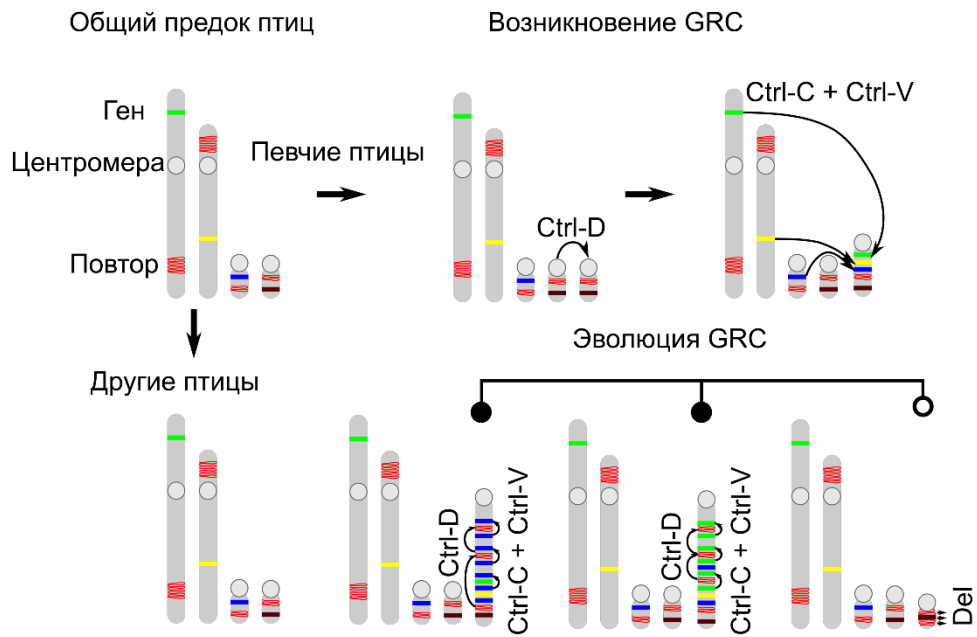


Рисунок 17. Предполагаемый сценарий происхождения и эволюции GRC. Прото-GRC возникла путем случайной дупликации (Ctrl-D) одной из микрохромосом. Копии уникальных и повторенных последовательностей из соматического генома транслоцировались на GRC (Ctrl-C+Ctrl-V). Дивергенция GRC в различных линиях певчих птиц произошла из-за амплификации и делеции (Del) этих последовательностей и привела к появлению макро-GRC (черные круги) и микро-GRC (белый круг).

2 Сценарии наследования GRC у бледной ласточки, большой синицы и зебровой амадины

Бледная ласточка, большая синица и зебровая амадина являются представителями трех разных семейств певчих птиц. Несмотря на это, у всех трех видов GRC является акроцентрической макрохромосомой и имеет сходное поведение в мейозе. Элиминация GRC в сперматогенезе приводит к преимущественному наследованию этой хромосомы только по материнской линии. Однако механизм наследования и поддержания соотношения числа копий этой хромосомы между полами до сих пор неизвестен.

Pigozzi и Solari (2005) предложили следующий сценарий наследования GRC у зебровой амадины. Все зиготы получают одну материнскую копию GRC. Во время дифференцировки соматической и зародышевой линий происходит нерасхождение сестринских хроматид GRC, что приводит к образованию соматических клеток без GRC и КЗП с двумя копиями этой хромосомы. У самцов зебровой амадины одна из этих копий теряется во время митотических делений сперматогониев, вторая – после первого мейотического деления.

Этот сценарий был основан на двух неподтвержденных допущениях. Во-первых, в раннем эмбриогенезе у птиц при делении эмбриональных клеток не существует четкого разделения дочерних клеток на соматические и КЗП. Формирование примордиальных зародышевых клеток у них происходит по смешанной модели предетерминации и индукции (см. Обзор литературы, раздел 3.2) (Bertocchini, Chuva de Sousa Lopes, 2016). Во-вторых, существование хромосомного драйва во время митотических делений остается неизвестным.

Мы обнаружили самцов-мозаиков бледной ласточки, КЗП которых содержали одну, две и три копии GRC и самок-мозаиков большой синицы. Основываясь на этих данных, мы предложили альтернативный сценарий наследования GRC (Рис. 18). Согласно нашему сценарию, в первом делении женского мейоза происходит мейотический драйв: копии GRC преимущественно остаются в ооците и не попадают в полярное тельце.

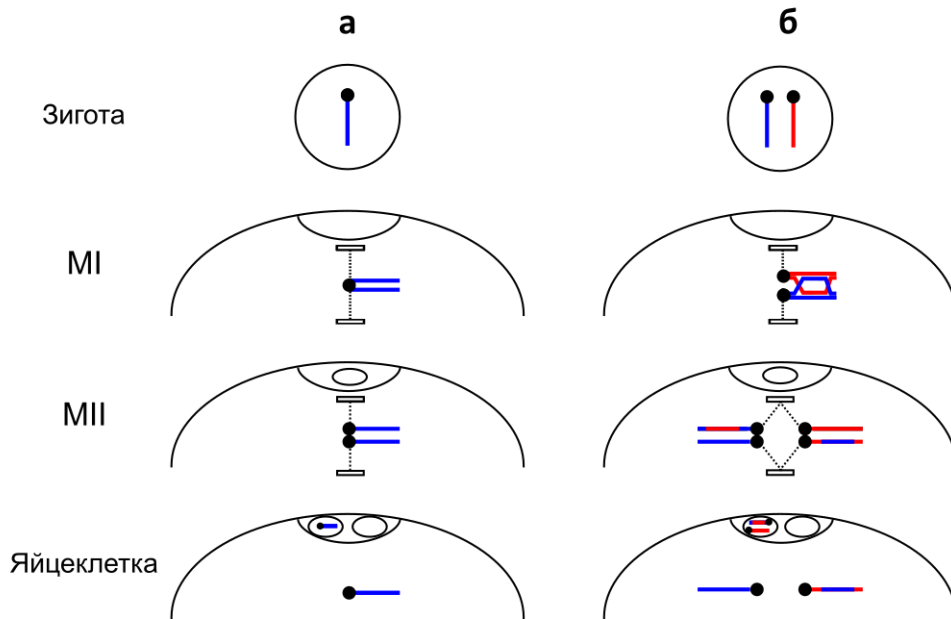


Рисунок 18. Сценарий наследования GRC. (а) Одна копия GRC, содержащая большое количество перичентромерных повторов, остается в ооците во время первого мейотического деления (MI). Во время второго мейотического деления (MII) сестринские GRC расходятся нормально, образуя яйцеклетки с одной копией GRC. (б) Две копии GRC синаптируют и рекомбинируют. Бивалент GRC остается в ооците во время MI. Во время MII две пары сестринских GRC расходятся нормально, образуя яйцеклетки с двумя копиями GRC.

В случае одной копии GRC в первом делении мейоза она остается в ооците (Рис. 18а). Во время второго деления сестринские GRC расходятся нормально и образуются яйцеклетки с одной копией. В случае двух копий GRC они обе остаются в ооците после первого мейотического деления (Рис. 18б). Во втором делении происходит нормальная сегрегация сестринских GRC: одна хроматида остается в ооците, а вторая – уходит в полярное тельце. Зрелые яйцеклетки оплодотворяются сперматозоидами, не несущими GRC.

Соматические клетки пассивно теряют или активно выбрасывают GRC. КЗП самцов с двумя GRC последовательно теряют их: одна копия GRC может быть элиминирована во время пролиферации сперматогониев, другая – во время первого мейотического деления. Три копии GRC в пахитенных сперматоцитах могут быть результатом нерасхождения GRC во время митотических делений сперматогониев.

У самок первая стадия элиминации встречается редко. У зебровой амадины и бледной ласточки только около 15% самок несут одну копию GRC. Самки-мозаики были обнаружены только у большой синицы. Большинство ооцитов содержало две копии GRC, и только небольшая часть клеток имела одну копию. Это указывает на то, что у самок число копий GRC стабильно наследуется от зиготы до яйцеклетки.

Проверка предложенного сценария цитологическими методами существенно затруднена из-за невозможности предсказать время делений мейоза у самок, которые происходят за 1-2 часа до овуляции. Предложенный нами сценарий наследования GRC основан на допущении о существовании мейотического драйва в первом делении женского мейоза. Давайте рассмотрим особенности генетического содержания и поведения GRC в мейозе, которые косвенно могут подтвердить это допущение.

Результаты FISH с пробой GRC бледной ласточки в качестве зонда выявили гибридизационные сигналы в перицентромерных областях хромосом основного набора, которые исчезли после супрессии повторяющихся последовательностей. Избыток перицентромерных повторов на GRC может приводить к увеличению размера кинетохора и, следовательно, к увеличению количества прикрепленных микротрубочек. Это может способствовать «центромерному драйву»: преимущественной сегрегации GRC в ооцит, а не в полярное тельце (Kursel, Malik, 2018). Давайте рассмотрим особенности женского мейоза, которые могут способствовать возникновению центромерного драйва.

Центромерный драйв в первом делении женского мейоза возможен благодаря асимметрии веретена деления. В отличие от митотического веретена, в ооцитах отсутствуют центриоли. Их роль играют мейотические хромосомы, при этом веретено деления формируется от центра ооцита к его периферии. Было показано, что в первом делении мейоза микротрубочки веретена деления более стабильны на стороне ооцита, а не на стороне полярного тельца (Akeru et al., 2017). Вблизи полюсов мейотического веретена микротрубочки открепляются от центромер, при этом они раньше и с большой вероятностью открепляются от «сильных» центромер, чем от «слабых» при движении в сторону полярного тельца (Chmátal et al., 2015). По-видимому, это связано с низкой стабильностью микротрубочек на этой стороне и приводит к тому, что хромосомы с «сильными» центромерами имеют больший шанс

остаться в ооците (Akeru et al., 2017). Мы предполагаем, что избыток перицентромерных повторов на GRC может делать её центромеру «сильнее» по сравнению с центромерами хромосом основного набора. В этом случае даже если GRC начинает сегрегировать в сторону полярного тельца, благодаря «сильной» центромере, она с большей вероятностью, чем остальные хромосомы, открепится от веретена до достижения полярного тельца.

Сильно поляризованное распределение событий рекомбинации вдоль GRC бивалента у бледной ласточки, большой синицы и зебровой амадины может приводить к нерасхождению в первом делении мейоза. Было показано, что проксимальное или дистальное расположение хиазм связано с увеличением вероятности нерасхождения в мейозе у человека (Hassold, Hunt, 2001; Oliver et al., 2008). К такому неразошедшему биваленту с увеличенным количеством центромерных и перицентромерных повторов, вероятно, будет прикрепляться большее количество микротрубочек, что увеличит вероятность мейотического драйва. У зебровой амадины поляризованное распределение сигналов MLH1, белка-маркера событий рекомбинации, наблюдается не только на GRC, но и на аутосомных бивалентах (Calderón, Pigozzi, 2006). Если бы паттерн рекомбинации оказывал большое влияние на расхождение хромосом в мейозе, то ожидалось бы, что зебровая амадина имела повышенную смертность эмбрионов, вызванную геномными мутациями. Тем не менее, было показано, что у зебровой амадины только 3.6% от всех погибших эмбрионов были триплоидами или трисомиками (Forstmeier, Ellegren, 2010), тогда как у курицы доля таких эмбрионов составила 5.2% (Fechheimer, 1981). Мы предполагаем, что один только поляризованный паттерн рекомбинации не может привести к нерасхождению хромосом, но, наряду с избытком центромерных и перицентромерных повторов, его можно рассматривать как адаптацию к нерасхождению в первом мейотическом делении и наследственной передачи обеих копий GRC по материнской линии.

Наш сценарий наследования GRC оставляет несколько нерешенных вопросов. Во-первых, большинство самок несет и передает потомству две копии GRC, следовательно, у большинства самцов вторая копия GRC теряется во время митотических делений сперматогониев. Этот процесс, по-видимому, не является строго детерминированным, так как у бледной ласточки большинство из

рассмотренных самцов были мозаиками. Однако, до сих пор мозаичные самцы не были найдены у других видов, включая зебровую амадину.

Во-вторых, в первом делении мейоза может произойти нормальное расхождение GRC. В случае бивалента это приведет к яйцеклеткам с одной копией GRC. В случае унивалента половина яйцеклеток будет содержать одну копию GRC, другая половина будет без GRC. Мы не обнаружили ни одного пахитенного мейоцита без GRC, что указывает на нежизнеспособность таких клеток. Появление самок с одной копией GRC и их сниженная фертильность, по-видимому, обеспечивают основу для поддержания стабильного полиморфизма по числу копий GRC (у одних самок содержится две копии GRC, у других = одна копия). Кроме того, полиморфизм может поддерживаться благодаря нарушениям элиминации GRC в сперматогенезе и попаданию этой хромосомы в сперматозоиды.

Мейотический драйв у самок, лежащий в основе нашего сценария наследственной передачи GRC, является частным случаем более общего феномена – нарушения менделевского соотношения передачи (transmission ratio distortion, далее - TRD). У самцов результатом сперматогенеза является продукция большого количества сперматозоидов, из которых только один сперматозоид будет участвовать в оплодотворении яйцеклетки. Возникающая конкуренция между мужскими гаметами является источником для возникновения TRD, к которым относятся гаметные киллеры (gamete killers) (Fishman, McIntosh, 2019).

В случае гаметных киллеров сперматозоиды с нормальным гаплотипом погибают, тогда как сперматозоиды, содержащие «эгоистичный» локус, остаются функциональными. Система гаметного киллера всегда состоит из нескольких генов, которые локализованы в пределах инвертированного района. Инверсия предотвращает рекомбинацию между этими генами, и они наследуются сцепленно (Bravo Núñez, Nuckolls, Zanders, 2018).

Классическим примером гаметного киллера является t-комплекс у домового мыши, локализованный на хромосоме 17 (Lyon, 2003). t-комплекс состоит из мутантных аллелей генов-нарушителей и гена-ответчика *Smok1*. Гетерозиготные самки фертильны и не показывают TRD. У гетерозиготных самцов в равных долях образуются нормальные гаметы и гаметы, имеющие t-гаплотип. Однако, нормальные сперматозоиды лишены функциональной способности из-за

дисфункции жгутика (Lyon, 2003). Во время сперматогенеза мужские клетки формируют синцитий – многоклеточную структуру, в которой клетки не полностью отделены друг друга клеточной оболочкой. Было показано, что белковые продукты генов-нарушителей транс-активны и действуют в соседних клетках (Véron et al., 2009). Белковый продукт гена-ответчика цис-активен и компенсирует вредное действие генов-нарушителей только в клетках с t-гаплотипом. Один из генов-нарушителей – это *Nme3*, который кодирует нуклеозиддифосфат киназу и является локусом количественного признака (Bauer et al., 2012). К генам-нарушителям также относится ген *Tagap1*, кодирующий ингибитор активности SMOK1 (Bauer et al., 2005); и ген *Fgd2*, предположительно, ответственный за сверхактивацию SMOK1 (Bauer et al., 2007). Ген-ответчик *Smok1* в t-гаплотипе представлен в двух копиях: нормальный и мутантный t-аллель (Herrmann et al., 1999). Этот ген кодирует киназу, участвующую в сигнальном каскаде, который, предположительно, контролирует подвижность сперматозоида (Herrmann et al., 1999). Совместное действие мутантных белков генов-нарушителей вызывает гиперактивацию нормального белка SMOK, что приводит к дисфункции жгутика сперматозоида (Bauer et al., 2012). Мутантный SMOK^{Ter} избегает этого воздействия и его присутствие восстанавливает подвижность жгутика (Bauer et al., 2012). В сперматозоидах с нормальным гаплотипом вредное транс-воздействие генов-нарушителей ничем не компенсируется.

У певчих птиц GRC может нести похожий гаметный киллер. Наличие GRC может оказывать вредное воздействие на сперматозоиды, приводящее к их гибели или дисфункции. Рекомбинация на GRC ограничена только прителомерными концами. Большая часть хромосомы не рекомбинирует, что делает эту область кандидатной для возникновения системы гаметного киллера. В результате действия гаметного киллера примерно половина образующихся сперматозоидов нефункциональна, что оказывает сильное негативное воздействие на приспособленность особи-носителя.

Элиминация GRC после первого мейотического деления у самцов может являться защитным механизмом против действия возможного гаметного киллера. У самок элиминации GRC не происходит, возможно, потому, что по аналогии с t-комплексом у мышей, в систему гаметного киллера вовлечены гены,

экспрессирующиеся только в мужских половых клетках. В соответствии с нашей гипотезой, сперматозоиды с GRC у бледной ласточки могут быть либо нефункциональны, либо вредное воздействие от предполагаемого гаметного киллера не является исключительным. Проверка этой гипотезы с помощью системы скрещиваний, как это было сделано на мыши, невозможна, так как особи без GRC обнаружено не было. Косвенное подтверждение можно получить с помощью подробного биоинформатического анализа генетического содержания GRC и идентификации на ней полиморфных вариантов генов, ассоциированных с мужским бесплодием.

Таким образом, в данной работе мы впервые показали, что GRC есть у всех рассмотренных 14 представителей певчих птиц. На основе обнаруженной значительной вариации в размере синаптонемного комплекса GRC мы предложили классифицировать эту хромосому на макро- и микро-GRC. Сравнительный анализ генетического содержания GRC разных видов выявил гомологию между разными GRC, а также между GRC и хромосомами основного набора. На основе данных о полиморфизме и мозаицизме GRC у бледной ласточки, большой синицы и зебровой амадины мы предложили альтернативный сценарий трансмиссии GRC в ряду поколений. Однако остается ряд нерешенных вопросов. Почему GRC стабильно передается из поколения в поколение, но элиминируется из соматических клеток? Как GRC метится для элиминации и по какому механизму осуществляется этот процесс? Есть ли связь между наличием GRC и видовым многообразием певчих птиц и если да, то какая?

ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что в клетках зародышевого пути у всех рассмотренных 14 представителей подотряда певчие птицы: грача, ласточки-береговушки, бледной ласточки, деревенской ласточки, садовой камышовки, полевого жаворонка, большой синицы, мухоловки-пеструшки, амадины Гульда, чижа, обыкновенного щегла, домашней канарейки, обыкновенного снегиря и белошапочной овсянки содержится дополнительная хромосома, специфичная для клеток зародышевого пути (GRC), которая отсутствует в соматических клетках. Согласно нашим данным, GRC возникла в 35-42 млн лет назад у общего предка певчих птиц.

2. Впервые показаны межвидовые различия в морфологии GRC. Филогенетической кластеризации видов с макро- и микро-GRC обнаружено не было, что может свидетельствовать о быстрой эволюции данной хромосомы.

3. Сравнительный анализ генетического содержания GRC с помощью межвидовой FISH с GRC-специфичными зондами показал наличие гомологии между GRC разных видов. Было обнаружено, что в составе разных GRC содержатся последовательности, гомологичные разным районам хромосом основного набора. Был предложен сценарий возникновения GRC у общего предка певчих птиц путем случайной дупликации одной из микрохромосом.

4. Впервые обнаружена вариация в числе копий GRC у самцов бледной ласточки и у самок ласточки-береговушки и большой синицы. У самок ласточки-береговушки был обнаружен полиморфизм: около 15% самок содержали одну копию GRC, остальные – две копии. Среди самок большой синицы были обнаружены мозаики, которые имели клетки как с одной, так и с двумя копиями GRC. Мозаицизм был обнаружен и среди самцов бледной ласточки. Число копий GRC варьировало от одной до трех. Для бледной ласточки, большой синицы и зебровой амадины была предложена модель наследственной передачи GRC, основанная на предположении о мейотическом драйве в первом делении женского мейоза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Akera T., Chmátal L., Trimm E. et al. Spindle asymmetry drives non-Mendelian chromosome segregation // *Science*. 2017. V. 358 I. 6363. P. 668–672.

Anderson L. K., Reeves A., Webb L. M., Ashley T. Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein // *Genetics*. 1999. T. 151. I. 4. P. 1569–1579.

Ansari H. A., Takagi N., Sasaki M. Interordinal conservatism of chromosome banding patterns in *Gallus domesticus* (Galliformes) and *Melopsittacus undulatus* (Psittaciformes) // *Cytogenet. Genome Res.* 1986. V. 43 I. 1-2. P. 6–9.

Barlow A. L., Hultén M. A. Crossing over analysis at pachytene in man. // *Eur. J. Hum. Genet.* 1998. T. 6. I. 4. P. 350–358.

Bassing C. H., Swat W., Alt F. W. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination // *Cell*. 2002. V. 160 I. 3. P. 233–247.

Bauer H., Schindler S., Charron Y. et al. The nucleoside diphosphate kinase gene *nme3* acts as quantitative trait locus promoting non-mendelian inheritance // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. I. 3. P. e1002567.

Bauer H., Véron N., Willert J., Herrmann B. G. The t-complex-encoded guanine nucleotide exchange factor *Fgd2* reveals that two opposing signaling pathways promote transmission ratio distortion in the mouse // *Genes Dev.* 2007. V. 21. I. 2. P. 143–147

Bauer H., Willert J., Koschorz B., Herrmann B. G. The t complex-encoded GTPase-activating protein *Tagap1* acts as a transmission ratio distorter in mice // *Nat. Genet.* 2005. V. 37. I. 9. P. 969–973.

Belterman P. H. R., De Boer L. E. M. A karyological study of 55 species of birds, including karyotypes of 39 species new to cytology // *Genetica*. 1984. T. 65. P. 39–82.

Bertocchini F., Chuva de Sousa Lopes S. M. Germline development in amniotes: A paradigm shift in primordial germ cell specification // *BioEssays*. 2016. T. 38. I. 8. P. 791–800.

Biederman M. K., Nelson M. M., Asalone K. C. et al. Discovery of the First Germline-Restricted Gene by Subtractive Transcriptomic Analysis in the Zebra Finch, *Taeniopygia guttata* // *Curr. Biol.* 2018. T. 28. I. 10. P. 1620–1627.e5.

Bikchurina T. I., Tishakova K. V., Kizilova E. A. et al. Chromosome synapsis and

recombination in male-sterile and female-fertile interspecies hybrids of the dwarf hamsters (*Phodopus, cricetidae*) // *Genes (Basel)*. 2018. V. 9. I. 5. P. 227.

Börner G. V., Kleckner N., Hunter N. Crossover/Noncrossover Differentiation, Synaptonemal Complex Formation, and Regulatory Surveillance at the Leptotene/Zygotene Transition of Meiosis // *Cell*. 2004. V. 117. I. 1. P. 29–45.

Bravo Núñez M. A., Nuckolls N. L., Zanders S. E. Genetic Villains: Killer Meiotic Drivers // *Trends Genet.* 2018. V. 34. I. 6. P. 424–433.

Calderón P. L., Pigozzi M. I. MLH1-focus mapping in birds shows equal recombination between sexes and diversity of crossover patterns. // *Chromosome Res.* 2006. V. 14. I. 6. C. 605–12.

Callan H. G. The Nature of Lampbrush Chromosomes // *Int. Rev. Cytol.* 1963. V. 15. P. 1–34.

Camacho J. P. M., Sharbel T. F., Beukeboom L. W. B-chromosome evolution // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2000. V. 355. I. 1394. P. 163–178.

Chmátal L. et al. Spatial Regulation of Kinetochore Microtubule Attachments by Destabilization at Spindle Poles in Meiosis // *Curr. Biol.* 2015. V. 25. I. 14. P. 1835–1841

Christidis L. Chromosomal evolution in finches and their allies (families: Ploceidae, Fringillidae, and Emberizidae) // 1986. V. 28. P. 762–769.

Christidis L. *Animal cytogenetics 4: Chordata 3; B, Aves. Animal Cytogenetics.* : Gebruder Borntraeger, 1990.

Close R. L. Rates of Sex Chromosome Loss during Development in Different Tissues of the Bandicoots *Perameles nasuta* and *Isoodon macrourus* (Marsupialia : Peramelidae) * // 1984. V. 37. P. 53–61.

Clover M., Holub A., Smith R., Wyngaard G. Embryonic development and a quantitative model of programmed DNA elimination in *Mesocyclops edax* // *J. Crustac. Biol.* 2016. V. 116. I. 8. P. 1477–1490.

Covelo-Soto L., Morán P., Pasantes J. J., Pérez-García C. Cytogenetic evidences of genome rearrangement and differential epigenetic chromatin modification in the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) // *Genetica*. 2014. V. 142. I. 6. P. 545–554.

Crouse H. V. The Controlling Element in Sex Chromosome Behavior in *Sciara*. // *Genetics*. 1960. V. 45. I. 10. P. 1429–1443.

de Saint Phalle B., Sullivan W. Incomplete sister chromatid separation is the

mechanism of programmed chromosome elimination during early *Sciara coprophila* embryogenesis // *Development*. 1996. V. 122. I. 12. P. 3775–3784.

Degrandi T. M., Barcellos S. A., Costa A. L. et al. Introducing the Bird Chromosome Database: An Overview of Cytogenetic Studies in Birds // *Cytogenet. Genome Res.* 2020. V. 160. I. 4. P. 199–205.

del Priore L., Pigozzi M. I. Histone modifications related to chromosome silencing and elimination during male meiosis in Bengalese finch // *Chromosoma*. 2014. V. 123. I. 3. P. 293–302.

Du Bois A. M. Chromosome behavior during cleavage in the eggs of *Sciara coprophila* (Diptera) in the relation to the problem of sex determination // *Zeitschrift für Zellforsch. und Mikroskopische Anat.* 1933. V. 19. P. 595–614.

Fechheimer N. S. Origins of heteroploidy in chicken embryos. // *Poult. Sci.* 1981. V. 60. I. 7. P. 136501372.

Fishman L., Mcintosh M. Standard Deviations: The Biological Bases of Transmission Ratio Distortion // *Annu. Rev. Genet.* 2019. V. 35. P. 347–372.

Forstmeier W., Ellegren H. Trisomy and triploidy are sources of embryo mortality in the zebra finch // *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2010. V. 277. I. 1694. P. 2655–2660.

Fraune J., Brochier-Armanet C., Alsheimer M. et al. Evolutionary history of the mammalian synaptonemal complex // *Chromosoma*. 2016. V. 125. I. 3. P. 355–360.

Goday C., Esteban M. R. Chromosome elimination in sciarid flies // *BioEssays*. 2001. V. 23. I. 3. P. 242–250.

Goday C., Gonzalez-Garcia J. M., Esteban M. R. et al. Kinetochores and chromatin diminution in early embryos of *Parascaris univalens* // *J. Cell Biol.* 1992. V. 118. I. 1. P. 23–32.

Goday C., Pigozzi M. I. Heterochromatin and histone modifications in the germline-restricted chromosome of the zebra finch undergoing elimination during spermatogenesis // *Chromosoma*. 2010. V. 119. I. 3. P. 325–336.

Goday C., Pimpinelli S. Chromosome organization and heterochromatin elimination in *Parascaris* // *Science*. 1984. V. 224. I. 4647. P. 411–413.

Goday C., Pimpinelli S. Cytological analysis of chromosomes in the two species *Parascaris univalens* and *P. equorum* // *Chromosoma*. 1986. V. 94. P. 1–10.

Goday C., Ruiz M. F. Differential acetylation of histones H3 and H4 in paternal and

maternal germline chromosomes during development of sciarid flies // *J. Cell Sci.* 2002. V. 115. I. Pt 24. P. 4765–4775.

Goetz P., Chandley A. C., Speed R. M. Morphological and temporal sequence of meiotic prophase development at puberty in the male mouse // *J. Cell Sci.* 1984. V. 65. P. 249–263.

Goto Y., Kubota S., Kohno S. Highly repetitive DNA sequences that are restricted to the germ line in the hagfish *Eptatretus cirrhatus*: a mosaic of eliminated elements. // *Chromosoma.* 1998. V. 107. I. 1. P. 17–32.

Grishanin A. Chromatin diminution in copepoda (Crustacea): Pattern, biological role and evolutionary aspects // *Comp. Cytogenet.* 2014. V. 8. I. 1. P. 1–10.

Hammar B. The karyotypes of thirty-one birds // *Hereditas.* 1970. V. 65. I. 1. P. 29–58.

Hassold T., Hunt P. To err (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy // *Nat. Rev. Genet.* 2001. V. 2. P. 280–291.

Hayman D. L., Martin P. G. Sex chromosome mosaicism in the marsupial genera *Isoodon* and *Perameles*. // *Genetics.* 1965. V. 52. I. 6. P. 1201–1206.

Herrmann B. G., Koschorz B., Wertz K. et al. A protein kinase encoded by the t complex responder gene causes non-mendelian inheritance // *Nature.* 1999. V. 402. I. 6758. P. 141–146.

Hooper D. M., Price T. D. Rates of karyotypic evolution in Estrildid finches differ between island and continental clades // *Evolution (N. Y).* 2015. V. 69. I. 4. P. 890–903.

Houben A., Banaei-Moghaddam A. M., Klemme S., Timmis J. N. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes // *Cell. Mol. Life Sci.* 2014. V. 71 I. 3. P. 467–478.

Hughes G. C. The population of germ cells in the developing female chick. // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1963. V. 11. P. 513–536.

Itoh Y., Kampf K., Pigozzi M. I., Arnold A. P. Molecular cloning and characterization of the germline-restricted chromosome sequence in the zebra finch // *Chromosoma.* 2009. V. 118. I. 4. P. 527–536.

Johansen K. M., Johansen J. Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation // *Chromosom. Res.* 2006. V. 14. I. 4. P. 393–404.

Johnson A. L. *Reproduction in the Female.* : Elsevier, 2014. Sixth Edit. P. 635-665.

Kang Y., Wang J., Neff A. et al. Differential Chromosomal Localization of Centromeric Histone CENP-A Contributes to Nematode Programmed DNA Elimination. 2016. V. 16. I. 9. P. 2308–2316.

Kinsella C. M., Ruiz-Ruano F. J., Dion-Côté A. M. et al. Programmed DNA elimination of germline development genes in songbirds // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. I. 1. P. 5468.

Kleckner N. Chiasma formation: Chromatin/axis interplay and the role(s) of the synaptonemal complex // *Chromosoma*. 2006. V. 115. I. 3. P. 175–194.

Kojima N. F., Kojima K. K., Kobayakawa S. et al. Whole chromosome elimination and chromosome terminus elimination both contribute to somatic differentiation in Taiwanese hagfish *Paramyxine sheni* // *Chromosom. Res.* 2010. V. 18. I. 3. P. 383–400.

Kruhlak M. J., Hendzel M. J., Fischle W. et al. Regulation of Global Acetylation in Mitosis through Loss of Histone Acetyltransferases and Deacetylases from Chromatin // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. I. 41. P. 38307–38319.

Kubai D. F. Nonrandom chromosome arrangements in germ line nuclei of *Sciara coprophila* males: The basis for nonrandom chromosome segregation on the meiosis I spindle // *J. Cell Biol.* 1987. V. 105. I. 6 Pt 1. P. 2433–2446.

Kulkarni A., Dyka A., Nemetschke L. et al. *Parastrongyloides trichosuri* suggests that XX/XO sex determination is ancestral in Strongyloididae (Nematoda). // *Parasitology*. 2013. V. 140. I. 14. P. 1822–1830.

Kursel L. E., Malik H. S. The cellular mechanisms and consequences of centromere drive // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2018. V. 52. P. 58–65.

Li Q.-W., Bian X.-Z. Studies on the Karyotypes of Birds II. The 19 Species of 12 Families of Passerine Birds (Passeriformes, Aves) // *Zool. Res.* 1988. V. 9. I. 4. P. 321–326.

Lisachov A., Malinovskaya L., Druzyaka A. et al. Synapsis and recombination of autosomes and sex chromosomes in two terns (Sternidae, Charadriiformes, Aves). // *Vavilovskii Zhurnal Genet. Seleksii*. 2017. V. 21. I. 2. P. 259–268.

Lyon M. F. Transmission Ratio Distortion in Mice // *Annu. Rev. Genet.* 2003. V. 37. P. 393–408.

MacFarland T. W., Yates J. M. Mann–Whitney U Test // *Introd. to Nonparametric Stat. Biol. Sci. Using R*. 2016. P. 103–132.

Malinovskaya L., Shnaider E., Borodin P. et al. Karyotypes and recombination patterns of the Common Swift (*Apus apus* Linnaeus, 1758) and Eurasian Hobby (*Falco subbuteo* Linnaeus, 1758). // *Avian Res.* 2018. V. 9. I. 4. P. 1–10

Malinovskaya L. P., Tishakova K., Shnaider E. P., Borodin P. M., Torgasheva A. A. Heterochiasmy and Sexual Dimorphism: The Case of the Barn Swallow (*Hirundo rustica*, Hirundinidae, Aves). // *Genes.* 2020b. V. 11. I. 10. P. 1119.

Malinovskaya L. P., Tishakova K. V., Volkova N. A. et al. Interbreed variation in meiotic recombination rate and distribution in the domestic chicken *Gallus gallus*. // *Arch. Anim. Breed.* 2019. V. 62. I. 2. P. 403–411.

Malinovskaya L. P., Zadesenets K. S., Karamysheva T. V. et al. Germline-restricted chromosome (GRC) in the sand martin and the pale martin (Hirundinidae, Aves): synapsis, recombination and copy number variation. // *Sci Rep.* 2020a. V. 10. I. 1058. P. 1058.

Moreno-Moreno O., Torras-Llort M., Azorín F. Variations on a nucleosome theme: The structural basis of centromere function // *BioEssays.* 2017. V. 39. I. 4. P. 1600241.

Müller F., Tobler H. Chromatin diminution in the parasitic nematodes *Ascaris suum* and *Parascaris univalens* // *Int. J. Parasitol.* 2000. V. 30. I. 4. P. 391–399.

Murray J. D., Mc Kay G. M., Sharman G. B. Studies on Metatherian Sex Chromosomes. IX. Sex Chromosomes of the Greater Glider (Marsupialia: Petauridae) // *Aust. J. Biol. Sci.* 1979. V. 32. I. 3. P. 371–374.

Nakao N., Ono H., Yoshimura T. Thyroid hormones and seasonal reproductive neuroendocrine interactions // *Reproduction.* 2008. V. 136. I. 1. P. 1–8.

Nemetschke L., Eberhardt A. G., Hertzberg H., Streit A. Genetics, chromatin diminution, and sex chromosome evolution in the parasitic nematode genus *strongyloides* // *Curr. Biol.* 2010. V. 20. I. 19. P. 1687–1696.

Niedermaier J., Moritz K. B. Organization and dynamics of satellite and telomere DNAs in *Ascaris*: Implications for formation and programmed breakdown of compound chromosomes // *Chromosoma.* 2000. V. 109. I. 7. P. 439–452.

Nilsson J. Å., Råberg L. The resting metabolic cost of egg laying and nestling feeding in great tits // *Oecologia.* 2001. V. 128. I. 2. P. 187–192.

Ohno S., Stenius C., Christian L. C. et al Chromosomal uniformity in the avian subclass Carinatae // *Chromosoma.* 1964. V. 15. I. 3. P. 280–288.

Oliver T. R., Feingold E., Yu K. et al. New insights into human nondisjunction of

chromosome 21 in oocytes // *PLoS Genet.* 2008. V. 4. I. 3. P. e1000033.

Parvinen M. The chromatoid body in spermatogenesis // *Int. J. Androl.* 2005. V. 28. I. 4. P. 189–201.

Pavlova A., Zink R. M., Drovetski S. V., Rohwer S. Molecular Phylogenetics and Evolution Pleistocene evolution of closely related sand martins *Riparia riparia* and *R. diluta* // 2008. V. 48. I. 1. P. 61–73.

Payevsky V. A. Phylogeny and classification of passerine birds, passeriformes // *Biol. Bull. Rev.* 2014. V. 4. P. 143–156.

Pei Y., Forstmeier W., Ruiz-Ruano F. J. et al. Occasional paternal inheritance of the germline-restricted chromosome in songbirds // *bioRxiv.* 2021. P. 2021.01.28.428604.

Peters A.H., Plug A.W., van Vugt M. J. et al. A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline // *Chromosome Res.* 1997. V. 5. I. 1. P. 66–68.

Peterson D. G., Stack S. M., Healy J. L. et al. The relationship between synaptonemal complex length and genome size in four vertebrate classes (Osteichthyes, Reptilia, Aves, Mammalia) // *Chromosom. Res.* 1994. V. 2. I. 2. P. 153–162.

Pigozzi M. I. Distribution of MLH1 foci on the synaptonemal complexes of chicken oocytes // *Cytogenet. Cell Genet.* 2001. V. 95. I. 3–4. P. 129–133.

Pigozzi M. I., Solari A. J. Germ cell restriction and regular transmission of an accessory chromosome that mimics a sex body in the zebra finch, *Taeniopygia guttata* // *Chromosom. Res.* 1998. V. 6. I. 1121. P. 105–113.

Pigozzi M. I., Solari A. J. Equal frequencies of recombination nodules in both sexes of the pigeon suggest a basic difference with eutherian mammals. // *Genome.* 1999a. V. 42. I. 2. P. 315–321.

Pigozzi M. I., Solari A. J. Recombination nodule mapping and chiasma distribution in spermatocytes of the pigeon, *Columba livia* // *Genome.* 1999b. V. 42. I. 2. P. 308–314.

Pigozzi M. I., Solari A. J. The germ-line-restricted chromosome in the zebra finch: recombination in females and elimination in males // *Chromosoma.* 2005. V. 114. I. 6. P. 403–409.

Pimpinelli S., Goday C. Unusual kinetochores and chromatin diminution in *Parascaris* // *Trends Genet.* 1989. V. 5. I. 9. P. 310–315.

Prum R. O., Berv J. S., Dornburg A. et al. A comprehensive phylogeny of birds

(Aves) using targeted next-generation DNA sequencing // *Nature*. 2015. V. 526. I. 7574. P. 569–573.

Radjabli S. I., Panov E. N., Bulatova N. S. Comparative studies of the two karyotypes of two closely related species of buntings (*Emberiza citrinella* L. and *E. leucocephalos* Gm.) hybridised in areas of overlap // *Zool. Zhurnal*. 1970. V. 49. P. 1857–1863.

Reddy S., Kimball R. T., Pandey A. et al. Why do phylogenomic data sets yield conflicting trees? Data type influences the avian tree of life more than taxon sampling // *Syst. Biol.* 2017. V. 66. I. 5. P. 857–879.

Ribeiro-Mason K., Boulesteix C., Fleurot R. et al. H3S10 Phosphorylation Marks Constitutive Heterochromatin During Interphase in Early Mouse Embryos Until the 4-Cell Stage // *J. Reprod. Dev.* 2012. V. 58. I. 4. P. 467–475.

Roquet C., Lavergne S., Thuiller W. One tree to link them all: a phylogenetic dataset for the European tetrapoda // *PLOS Curr. Tree Life*. 2014. V. 6. P. 1–16.

Rubtsov N. B., Rubtsova N. V., Anopriyenko O. V. et al. Reorganization of the X chromosome in voles of the genus *Microtus* // *Cytogenet. Genome Res.* 2002. V. 99. I. 1–4. P. 323–329.

Sampath S. C., Ohi R., Leismann O. et al. The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly // *Cell*. 2004. V. 118. I. 2. P. 187–202.

Sánchez L. Sex-determining mechanisms in insects based on imprinting and elimination of chromosomes // *Sex. Dev.* 2014. V. 8. I. 1–3. P. 83–103.

Schoenmakers S., Wassenaar E., Hoogerbrugge J. W. et al. Female meiotic sex chromosome inactivation in chicken // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. I. 5. P. e1000466.

Schoenmakers S., Wassenaar E., Laven J. S. E. et al. Meiotic silencing and fragmentation of the male germline restricted chromosome in zebra finch // *Chromosoma*. 2010. V. 119. I. 3. P. 311–324.

Seidl C., Moritz K. B. A novel UV-damaged DNA binding protein emerges during the chromatin-eliminating cleavage period in *Ascaris suum* // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. I. 3. P. 768–777.

Silva D. M., Ruiz-Ruano F. J., Utsunomia R. et al. Long-term persistence of supernumerary B chromosomes in multiple species of *Astyanax* fish // *BMC Biol.* 2021.

V. 19. I. 1. P. 52.

Smith J. J., Antonacci F., Eichler E. E., Amemiya C. T. Programmed loss of millions of base pairs from a vertebrate genome. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009. V. 106. I. 27. P. 11212–11217.

Smith J. J., Baker C., Eichler E. E., Amemiya C. T. Genetic consequences of programmed genome rearrangement // *Curr. Biol.* 2012. V. 22. I. 16. P. 1524–1529.

Smith J. J., Stuart A. B., Sauka-Spengler T. et al Development and analysis of a germline BAC resource for the sea lamprey, a vertebrate that undergoes substantial chromatin diminution // *Chromosoma.* 2010. V. 119. I. 4. P. 381–389.

Smith J. J., Timoshevskaya N., Ye C. et al. The sea lamprey germline genome provides insights into programmed genome rearrangement and vertebrate evolution // *Nat. Genet.* 2018. V. 50. I. 2. P. 270–277.

Smith J. J., Timoshevskiy V. A., Saraceno C. Programmed DNA Elimination in Vertebrates // *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2021. V. 9. I. 1. P. 173–201.

Staiber W. Molecular evolution of homologous gene sequences in germline-limited and somatic chromosomes of *Acricotopus* // *Genome.* 2004. V. 47. I. 4. P. 732–741.

Stanley H. P., Kaslinsky H. E., Bolss N. C., Chondrichthyes H. C. Diminution in a the Holocephalan // *Nucleus.* 1984. V. 16. I. 2. P. 203–215.

Streit A. Reproduction in *Strongyloides* (Nematoda): A life between sex and parthenogenesis // *Parasitology.* 2008. V. 135. I. 5. P. 285-294.

Streit A., Davis E. R. Chromatin Diminution // 2016. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

Streit A., Wang J., Kang Y., Davis R. E. Gene silencing and sex determination by programmed DNA elimination in parasitic nematodes // *Curr. Opin. Microbiol.* 2016. V. 32. P. 120–127.

Sun C., Wyngaard G., Walton D. B. et al. Billions of basepairs of recently expanded, repetitive sequences are eliminated from the somatic genome during copepod development. // *BMC Genomics.* 2014. V. 15. P. 186.

Takagi N., Sasaki M. A phylogenetic study of bird karyotypes // *Chromosoma.* 1974. V. 46. P. 91–120.

Tiersch T. R., Wachtel S. S. On the evolution of genome size of birds // *J. Hered.* 1991. V. 82. P. 363–368.

Timoshevskiy V. A., Herdy J. R., Keinath M. C., Smith J. J. Cellular and Molecular Features of Developmentally Programmed Genome Rearrangement in a Vertebrate (Sea Lamprey: *Petromyzon marinus*) // *PLoS Genet.* 2016. V. 12. I. 6. P. 1–20.

Timoshevskiy V. A., Lampman R. T., Hess J. E. et al. Deep ancestry of programmed genome rearrangement in lampreys // *Dev. Biol.* 2017. V. 429. I. 1. P. 31–34.

Tobler H. The differentiation of germ and somatic cell lines in nematodes. // *Results Probl Cell Differ.* 1986. V. 31. P. 1–69.

Torgasheva A. A., Malinovskaya L. P., Zadesenets K. S. et al. Germline-restricted chromosome (GRC) is widespread among songbirds // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2019. V. 116. I. 24. P. 11845–11850.

Torgasheva A. A., Borodin P. M. Immunocytological Analysis of Meiotic Recombination in the Gray Goose (*Anser anser*) // *Cytogenet. Genome Res.* 2017. V. 151. I. 1. P. 27–35.

Triantaphyllou, Moncol D. Cytology, Reproduction and Sex Determination of *Strongyloides ransomi* and *S. papillosus* // *J. Parasitol.* 1977. V. 63. I. 6. P. 961–973.

117. Udagawa T. Karyogram Studies in Birds, I // *Cytologia (Tokyo).* 1952. V. 17. P. 311–316.

Uhlén M. et al. Tissue-based map of the human proteome // *Science.* 2015. V. 347. I. 6220. P. 1260419.

Véron N., Bauer H., Weiße A. Y. et al. Retention of gene products in syncytial spermatids promotes non-Mendelian inheritance as revealed by the t complex responder // *Genes Dev.* 2009. V. 23. I. 23. P. 2705–2710.

Vezina F., Williams T. D. Metabolic Costs of Egg Production in the European Starling (*Sturnus vulgaris*) // *Physiol. Biochem. Zool.* 2002. V. 75. I. 4. P. 377–385.

Wang J., Davis R. E. Programmed DNA elimination in multicellular organisms // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2014. V. 27. P. 26–34.

Wang J., Gao S., Mostovoy Y. et al. Comparative genome analysis of programmed DNA elimination in nematodes // *Genome Res.* 2017. V. 27. I. 12. P. 2001–2014.

Wang J., Mitreva M., Berriman M. et al. Silencing of Germline-Expressed Genes by DNA Elimination in Somatic Cells // *Dev. Cell.* 2012. V. 23. I. 5. P. 1072–1080.

Wang J., Veronezi G. M. B., Kang Y. et al. Comprehensive Chromosome End Remodeling during Programmed DNA Elimination // *Curr. Biol.* 2020. V. 30. I. 17. P.

3397–3413.

Yan X., Meng W., Wu F. et al The nuclear DNA content and genetic diversity of *Lampetra morii* // PLoS One. 2016. V. 11. I. 7. P. e0157494.

Ying H. Z., Rengaraj D., Jin W. C., et al Expression pattern of meiosis associated SYCP family members during germline development in chickens // Reproduction. 2009. V. 138. I. 3. P. 483–492.

Zadesenets K. S., Katokhin A. V., Mordvinov V. A., Rubtsov N. B. Telomeric DNA in chromosomes of five opisthorchid species // Parasitol. Int. 2012. V. 61. I. 1. P. 81–83.

Zadesenets K. S., Vizoso D. B., Schlatter A. et al. Evidence for karyotype polymorphism in the free-living flatworm, *macrostomum lignano*, a model organism for evolutionary and developmental biology // PLoS One. 2016. V. 11. I 10. P. e0164915.

Zagoskin M. V., Marshak T. L., Mukha D. V., Grishanin A. K. Chromatin Diminution Process Regulates rRNA Gene Copy Number in Freshwater Copepods. // Acta Naturae. 2010. V. 2. I. 4. P. 52–57.

Zickler D., Kleckner N. Meiotic chromosomes: integrating structure and function. // Annu. Rev. Genet. 1999. V. 33. I. 603–754.