

На правах рукописи

МАЛИНОВСКАЯ ЛЮБОВЬ ПЕТРОВНА

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

1.5.7. – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в лаборатории рекомбинационного и сегрегационного анализа ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН», г. Новосибирск

Научный руководитель:

Торгашева Анна Александровна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории рекомбинационного и сегрегационного анализа, ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Официальные оппоненты:

Коломиец Оксана Леонидовна

доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией цитогенетики Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

Проскурякова Анастасия Андреевна

кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории цитогенетики животных, Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Ведущее учреждение:

Зоологический институт РАН,
г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «__» _____ 20__ г. на утреннем заседании Диссертационного совета 24.1.239.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН» в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, 10, т. (383)363-49-06, факс (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института <http://www.bionet.nsc.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. 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 and Esteban, 2001; Wang and Davis, 2014; Streit and 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 and Price 2015)) элиминировалась самая крупная акроцентрическая хромосома. Она была названа хромосомой, специфичной для клеток зародышевого пути (germline-restricted chromosome, GRC) (Pigozzi and Solari, 1998; del Priore and 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 и бледной ласточки (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 Hirundinidae и у большой синицы из семейства 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.

Были поставлены следующие 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.

Практическая ценность работы. Результаты данной работы расширяют представления о распространенности феномена запрограммированной элиминации ДНК. Полученные данные проливают новый 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.

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.

Апробация работы. Результаты данной работы были представлены и обсуждены на: 11й Международной мультиконференции 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), 13й Европейской цитогенетической онлайн конференции (2021).

Публикации. Материал диссертации представлен в 14 публикациях, в том числе в 6 статьях в зарубежных (5) и отечественных (1) реферируемых журналах и в 2 научно-популярных статьях.

Структура и объем работы диссертации. Диссертация включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, список литературы (133 источника). Общий объем составляет 83 страницы. Представлено 18 рисунков и 5 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В работе были использованы 16 петухов, по 1 самцу черного стрижа, сокола-чеглока, грача, садовой камышовки, полевого жаворонка, чижа, домашней канарейки, обыкновенного снегиря и белошاپочной овсянки, 1 самка и 1 самец черной крачки, 24 самки ласточки-береговушки, 3 самки и 9 самцов бледной ласточки, 3 самки и 1 самец деревенской ласточки, 7 самок и 7 самцов большой синицы, 2 самки и 2 самца мухоловки-пеструшки, 4 самца зебровой амадины, 2 самца амадины Гульда и 2 самца обыкновенного щегла.

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). После иммуноокрашивания на препараты наносили раствор антифэйда (Vectashield; Vector Laboratories, США) для предотвращения выгорания флуоресцентной метки и накрывали покровным стеклом.

Приготовление препаратов митотических метафазных хромосом. Препараты метафазных хромосом готовили из костного мозга. В качестве фиксатора использовали смесь метанола и ледяной уксусной кислоты в объемном соотношении 3:1. Фиксатор меняли три раза. Клеточную суспензию раскапывали на холодные влажные предметные стекла. Препараты высушивали на воздухе.

Получение Cot-1 ДНК. Получение Cot-1 ДНК проводили в соответствии с описанным протоколом (Liehr, 2009). Гибридизацию с GRC-специфичной пробы проводили на хромосомных препаратах по стандартной методике.

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 с помощью микродиссекции. 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).

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).

Измерение 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).

РЕЗУЛЬТАТЫ

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. 1). У всех исследованных представителей певчих птиц была обнаружена GRC.

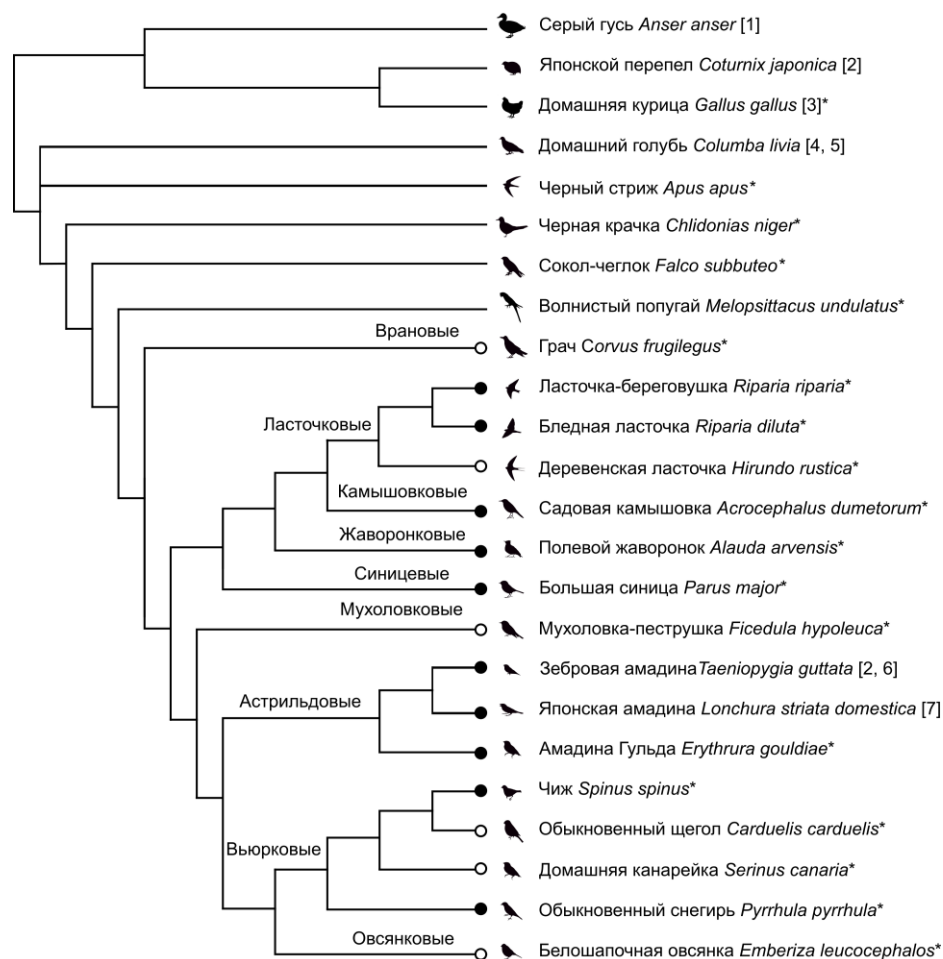


Рисунок 1. Филогенетическое древо птиц, для которых исследованы пахитенные кариотипы. Черные круги указывают на виды с макро-GRC, белые круги указывают на виды с микро-GRC, отсутствие кругов означает отсутствие GRC. Звездочками отмечены виды, исследованные в данной работе. Древо построено на основе кладограммы Reddy с соавторами (2017). Положение черного стрижа определено согласно работе Pium с соавторами (2015). Положение семейств воробьиных 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 and Pigozzi 2006), ³(Pigozzi 2001), ⁴(Pigozzi and Solari 1999b), ⁵(Pigozzi and Solari 1999a), ⁶(Pigozzi and Solari 1998), ⁷(del Priore and Pigozzi 2014).

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.

Дополнительно к выявленным ранее макро-GRC у зебровой и японской амадины из семейства Астрильдовые (Pigozzi and Solari 1998; del Priore and Pigozzi 2014) мы обнаружили макро-GRC у восьми видов птиц из отряда певчие воробьиные: ласточки-береговушки и бледной ласточки из семейства Ласточковые (Hirundinidae), большой синицы (*Parus major*) из семейства Синицевые (Paridae) (Рис. 2а, б), садовой камышовки (*Acrocephalus dumetorum*) из семейства Камышовковые (Acrocephalidae), полевого жаворонка (*Alauda arvensis*) из семейства Жаворонковые (Alaudidae), амадины Гульда *Erythrura gouldiae* из семейства Астрильдовые, обыкновенного снегиря *Pyrrhula pyrrhula* и чижа *Spinus spinus* из семейства Вьюрковые (Fringillidae).

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. 2б). 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. 2б). В пахитенных ооцитах GRC, как правило, была представлена в виде полностью спаренного бивалента. (Рис. 2а).

Сравнительный анализ кариотипов пахитенных сперматоцитов и/или ооцитов и соматических кариотипов клеток костного мозга надежно подтвердил наличие макро-GRC у перечисленных видов (Рис. 2в). В соматическом кариотипе у этих видов крупные акроцентрические хромосомы отсутствовали (Рис. 2в). Размер и морфология остальных макробивалентов в пахитенных кариотипах полностью соответствовали размеру и морфологии макрохромосом в клетках костного мозга.

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.

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 крупного акроцентрического 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, мухоловки-пеструшки (*Ficedula hypoleuca*) из семейства Мухоловковые (Muscicapidae) (Рис. 2б, д), обыкновенного щегла (*Carduelis carduelis*) и домашней канарейки (*Serinus canaria*) из семейства Вьюрковые, белошапочной овсянки (*Emberiza leucocephalos*) из семейства Овсянковые (Emberizidae) и грача (*Corvus frugilegus*) из семейства Врановые (Corvidae).

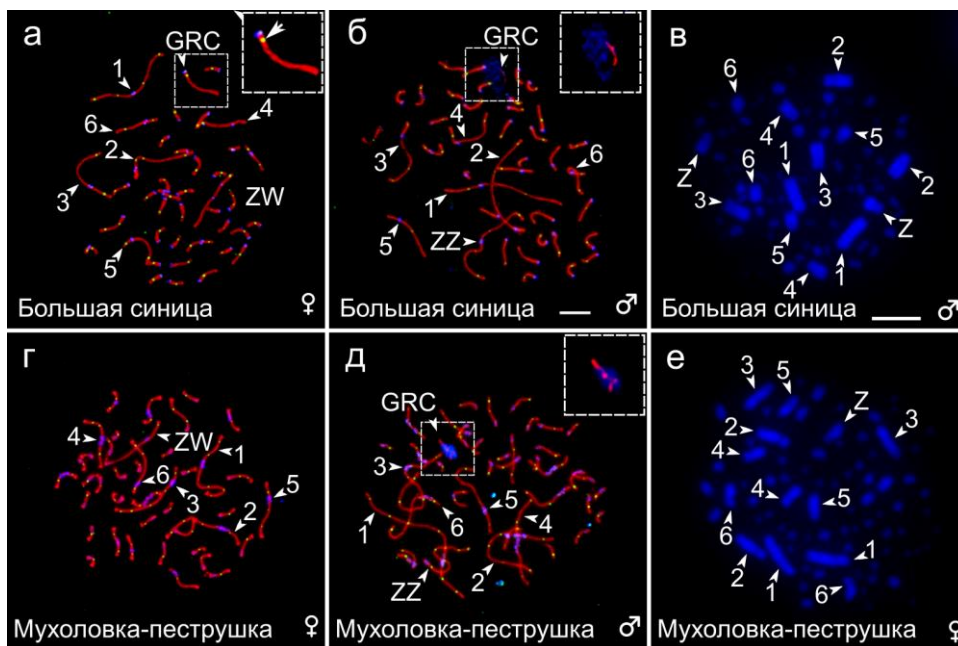


Рисунок 2. Наличие GRC у певчих птиц. (а, б, г, д) Пахитенные клетки двух видов птиц, иммуноокрашенные антителами к белку SYCP3 (красный), центромерным белкам (синий) и белку MLH1 (зеленый). (в, е) Метафазные хромосомы клеток костного мозга, окрашенные DAPI. Головками стрелок обозначены самые большие 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 мухоловки-пеструшки (г) неотличимы от микрохромосом основного набора. Масштаб – 5 мкм.

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 (Рис. 2г, д); 4) несоответствие соматического и пахитенного кариотипов по числу хромосом; 5) наличие на микроуниваленте интенсивного сигнала при гибридизации с GRC-специфичной пробой близкого вида.

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.

Анализ распространенности GRC за пределами отряда Воробьинообразные. Мы не выявили различий в морфологии первых шести макрохромосом между пахитенными кариотипами сперматоцитов и соматическими кариотипами клеток костного мозга (описанными ранее или приготовленными нами) у волнистого попугая (*Melopsittacus undulatus*) из отряда Попугаеобразные (Ansari et al. 1986), сокола-чеглока (*Falco subbuteo*) из отряда Соколообразные (Christidis 1990) и черного стрижа (*Apus apus*) из отряда Стрижеобразные. У этих видов мы также не обнаружили дополнительных микроунивалентов в составе пахитенных кариотипов самцов. Пахитенные кариотипы сперматоцитов и ооцитов черной крачки (*Chlidonias niger*) из отряда Ржанкообразные совпадали, за исключением полового бивалента (Lisachov et al. 2017).

Мы сравнили описанные ранее пахитенные кариотипы самок и самцов домашнего голубя (*Columba livia*) (отр. Голубеобразные) (Pigozzi and Solari 1999b), гуся (*Anser anser*) (отр. Гусеобразные) (Torgasheva and Borodin 2017), японского перепела (*Coturnix japonica*) (Calderón and 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.

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 Н.Б. Рубцовым были приготовлены микродиссекционные пробы GRC зебровой амадины (TGU), бледной ласточки (RDU), японской амадины (LST) и чижа (SSP).

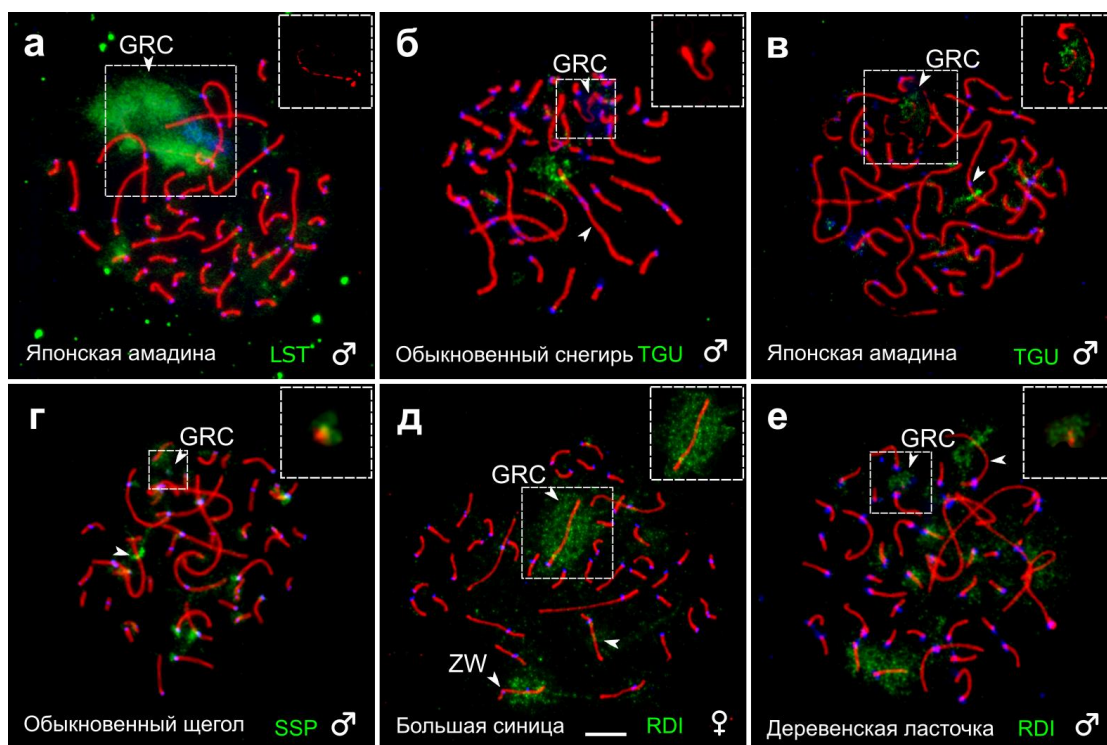


Рисунок 3. FISH с GRC-специфичными зондами. Внутривидовая FISH (а) и межвидовая FISH (б-е) с ДНК зондами (зеленый), полученными из GRC японской амадины (LST), зебровой амадины (TGU), чижа (SSP) и бледной ласточки (RDI) на пахитенные клетки, иммуноокрашенные антителами к белку SYCP3 (красный) и центромерными 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.

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 специфический сигнал на GRC соответствующих видов (Рис. 3а).

Анализируя серию 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 (Рис. 3б) и белошапочной овсянки. При использовании этого зонда на других видах выявлялся слабый сигнал на GRC (Рис. 3в). У всех видов зонд GRC зебровой амадины специфично гибридизовался с небольшим участком на коротком плече CK2 или CK3.

Зонд GRC чижа окрашивал микро-GRC обыкновенного щегла, участок на длинном плече CK3 и некоторые перицентромерные районы (Рис. 3г). Зонд GRC

интенсивно окрашивал GRC большой синицы, у которой проба также окрашивала ZW бивалент (Рис. 3д). Более слабый сигнал зонда наблюдался на макро-GRC зебровой амадины и садовой камышовки и микро-GRC мухоловки-пеструшки и деревенской ласточки (Рис. 3е). У всех видов зонд GRC бледной ласточки показывала сигнал на СК4 или СК5.

Зонды макро-GRC окрашивают микро-GRC близких видов (Рис. 3г, е), что также является дополнительным подтверждением того, что обнаруженные микроуниваленты в пахитенных сперматоцитах являются GRC.

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

Анализ поведения в мейозе и вариацию числа копий GRC мы проводили на клетках самок ласточки-береговушки и большой синицы и самок и самцов бледной ласточки. 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.

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. 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. 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. 1). 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.

У большинства самок ооциты содержали две копии GRC, которые на стадии пахитены формировали нормальный рекомбинирующий бивалент (Рис. 4а). Распределение сигналов MLH1 вдоль бивалента GRC у ласточки-береговушки, бледной ласточки и большой синицы отличалось от распределения вдоль аутомсомных бивалентов. У всех трех видов вдоль бивалента GRC наблюдалась сильная поляризация сигналов MLH1. Вдоль аутомсомных бивалентов у всех трех видов сигналы MLH1 распределялись более равномерно.

Таблица 1 – 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 |

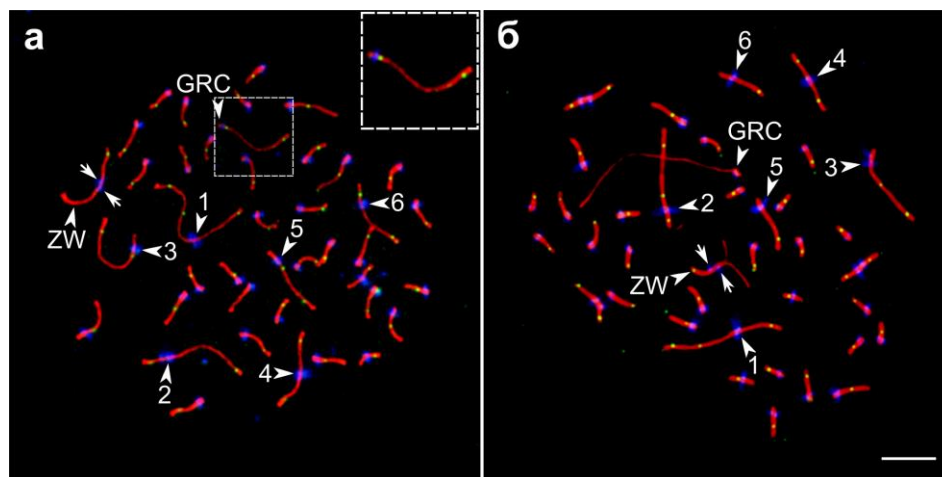


Рисунок 4. Бивалент (а) и унивалент (б) GRC в пахитенных ооцитах ласточки-береговушки. Хромосомные биваленты окрашены антителами к белкам SYCP3 (красный), MLH1 (зеленый) и центромерным белкам (синий). Головками стрелок указаны шесть первых хромосом, идентифицированных по размеру и центромерному индексу. Стрелками обозначены невыровненные центромеры бивалента ZW. Масштаб – 5 мкм.

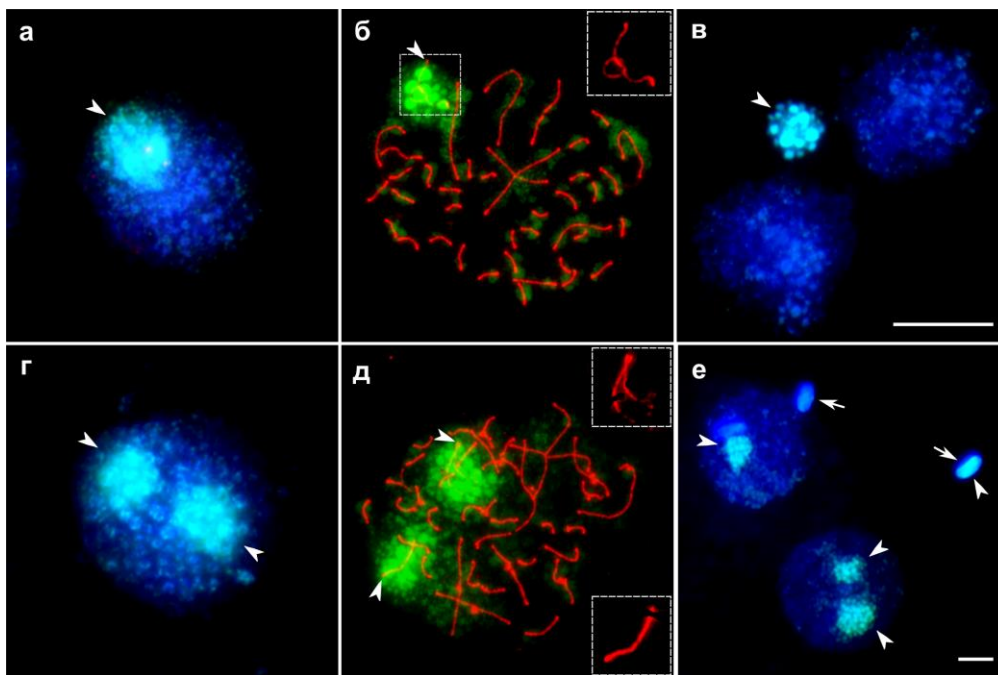


Рисунок 5. Визуализация GRC на препаратах распластанных ядер клеток семенника бледной ласточки после FISH с зондом GRC бледной ласточки (зеленый), окрашенные DAPI (синий). (а, г) Сперматогонии с одной (а) и двумя (г) копиями GRC. (б, д) Пахитенные сперматоциты, иммуноокрашенные антителами к SYCP3 (красный), с одной (б) и двумя (д) копиями GRC. На врезке показана GRC. (в) 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.

Вариация числа копий GRC у самцов бледной ласточки. Всего нами было проанализировано девять самцов бледной ласточки. У двух из них во всех рассмотренных сперматоцитах содержалась одна копия GRC (Рис. 5б). Семь самцов бледной ласточки были мозаиками по числу копий GRC и имели сперматоциты с одной, двумя и тремя копиями этой хромосомы (Рис. 5д). У самцов-мозаиков доля клеток с двумя копиями GRC варьировала от 2% до 61%.

Для анализа числа копий GRC на разных стадиях сперматогенеза мы использовали GRC-специфичную пробу бледной ласточки. Все рассмотренные сперматогонии содержали по меньшей мере один гибридационный сигнал (Рис. 5а). Около 11% этих клеток имели два сигнала зонда GRC (Рис. 5в). Все рассмотренные пахитенные сперматоциты имели один или два гибридационных сигнала (б, г). Рядом с ядрами некоторых клеток располагались тела плотно упакованного хроматина, показывающий специфичный сигнал зонда GRC (Рис. 5в).

Большинство сперматид и сперматозоидов не содержали сигнала зонда GRC. В некоторых сперматозоидах мы обнаружили сигналы гибридизации с зондом, содержащим GRC (Рис. 5e). Это указывает на то, что у бледной ласточки возможна передача GRC от обоих родителей подобно зебровой амадине (Pei et al. 2021).

ОБСУЖДЕНИЕ

Происхождение и филогения GRC у певчих птиц

Наряду с GRC у зебровой и японской амадин, описанных до нас, на сегодняшний день GRC обнаружена у всех рассмотренных 16 видов из девяти семейств подоотряда певчие птицы отряда Воробьинообразные. Этот отряд 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).

Эксперименты по межвидовой FISH с использованием GRC-специфичных зондов 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 метили разные участки хромосом основного набора. При межвидовой гибридизации сигнал на GRC, как правило, был слабым или отсутствовал. Эти результаты свидетельствуют о быстрой эволюции генетического содержания GRC, которая в разных линиях происходит в разных направлениях. 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 клеток зародышевого пути (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 подоотряда 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. 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.

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

У бледной ласточки, большой синицы и зебровой амадины GRC является акроцентрической макрохромосомой и имеет сходное поведение в мейозе. Элиминация GRC в сперматогенезе приводит к преимущественному наследованию этой хромосомы по материнской линии. Однако механизм наследования и поддержания соотношения числа копий этой хромосомы между полами до сих пор неизвестен.

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. Согласно нашему сценарию, в первом делении женского мейоза происходит мейотический драйв: копии GRC преимущественно остаются в ооците и не попадают в полярное тельце.

В случае одной копии GRC в первом делении мейоза она остается в ооците. 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. 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. У самок первая стадия элиминации встречается редко. 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.

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 основных работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Лисачев А.П., **Малиновская Л.П.**, Друзяка А.В., Бородин П.М., Торгашева А.А.: Синапсис и рекомбинация аутосом и половых хромосом у двух видов крачек (Sternidae, Charadriiformes, Aves), Вавиловский журнал генетики и селекции 2017;21(2):259-268, РИНЦ, WoS, Scopus, IF=0.19.

2. **Malinovskaya L.P.**, Shnayder E.P., Borodin P.M., Torgahseva A.A.: Karyotypes and recombination patterns of the common swift *Apus apus* (Linnaeus, 1758) and Eurasian hobby *Falco subbuteo* (Linnaeus, 1758). *Avian Research* 2017, WoS, Scopus, IF=1.652;

3. Torgasheva A.A., **Malinovskaya L.P.**, Zadesenets K.S., Karamysheva T.V., Kizilova E.A., Akberdina E.A., Pristyazhnyuk I.E., Shnaider E.P., Volodkina V.A., Saifitdinova A.F., Galkina S.A., Larkin D.M., Rubtsov N.B. and Borodin P.M.: Germline-restricted chromosome (GRC) is widespread among songbirds, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2019, 24(116):11845–1185, WoS, Scopus, IF= 9.566;

4. **Malinovskaya L.P.**, Tishakova K.V., Volkova N.A., Torgasheva A.A., Tsepilov Y.A., Borodin P.M.. Interbreed variation in meiotic recombination rate and distribution in the domestic chicken *Gallus gallus*. *Arch Anim Breed.* 2019;62(2):403-411, WoS, Scopus, IF=1.540;

5. **Malinovskaya L.P.**, Zadesenets K.S., Karamysheva T.V., Akberdina E.A., Kizilova E.A., Romanenko M.V., Shnaider E.P., Scherbakova M.M., Korobitsyn I.G., Rubtsov N.B., Borodin P.M. and Torgasheva A.A.: Germline-restricted chromosome (GRC) in the sand martin and the pale martin (Hirundinidae, Aves): synapsis, recombination and copy number variation, *Sci Rep* 2020, 10: 1-10, WoS, Scopus, IF= 4.130;

6. **Malinovskaya L.P.**, Tishakova K.V., Shnaider E.P., Borodin P.M. and Torgasheva A.A.: Heterochiasmy and Sexual Dimorphism: The Case of the Barn Swallow (*Hirundo rustica*, Hirundinidae, Aves), *Genes* 2020; 11(10): 1-11, WoS, Scopus, IF= 3.886;

Научно-популярные статьи:

7. Бородин П., Торгашева А., **Малиновская Л.**, Рубцов Н., Галкина С., Ларкин Д.: История «певчей» хромосомы, *Наука из первых рук* 2019; 3(83):24-43;

8. Бородин П.М., **Малиновская Л.П.**, Шнайдер Е.П., Торгашева А.А.: Рекомбинация и половой отбор, *Природа* 2020; 12:3-10.