

П. М. Бородин^{1,2}, Е. А. Башева², А. А. Торгашева²,
Ф. Н. Голенищев³, И. В. Картавецва⁴

¹ Новосибирский государственный университет
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия

² Институт цитологии и генетики СО РАН
пр. Акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090, Россия

³ Зоологический институт РАН
Университетская набережная, 1, Санкт-Петербург, 199034, Россия

⁴ Биолого-почвенный институт ДВО РАН
пр. 100-летия Владивостоку, 159, Владивосток, 690022, Россия

E-mail: borodin@bionet.nsc.ru

СИНАПСИС И РЕКОМБИНАЦИЯ ХРОМОСОМ У МУЙСКОЙ ПОЛЕВКИ (*MICROTUS MUJANENSIS*) *

Цель работы – анализ спаривания и рекомбинации хромосом в мейозе у самцов муйской полевки (*Microtus mujanensis*), а также анализ природы полиморфизма по числу плеч аутосом в природных популяциях данного вида. Исследование проведено на цитологических препаратах с использованием электронной и флуоресцентной микроскопии, после иммуноокрашивания белков синаптонемных комплексов (SCP3), мисс-матч репарации (MLH1), который надежно маркирует точки кроссинговера. Среднее число сигналов MLH1 в аутосомных бивалентах составило $21,9 \pm 0,1$ на клетку. У *M. mujanensis* X- и Y-хромосомы синаптировали и рекомбинировали в коротком псевдоаутосомном районе. На основе анализа синаптических конфигураций в зиготене и пахитене установлено, что полиморфизм по числу плеч аутосом у данного вида обусловлен полно-плечевыми инверсиями.

Ключевые слова: рекомбинация хромосом, инверсии, кроссинговер, хромосомные перестройки, хромосомный полиморфизм, мейоз, *Microtus mujanensis*.

По числу видов род серые полевки *Microtus* Schrank (1798) является одним из самых многочисленных среди млекопитающих. Он включает около 65 видов, населяющих различные биотопы Палеарктической и Неарктической зоны [1]. Процесс видообразования в пределах данного рода происходил, по-видимому, очень быстро – в течение последних 500–700 тыс. лет [2]. Он сопровождался значительной экологической, морфологической, кариотипической и молекулярно-генетической дивергенцией [3]. В природных популяциях многих видов

полевков обнаружен высокий уровень полиморфизма по хромосомным перестройкам: инверсиям, транслокациям, инсерциям гетерохроматиновых блоков. Благодаря этим особенностям род *Microtus* представляет собой крайне интересную модель для изучения эволюции синапсиса и рекомбинации хромосом в мейозе.

Цель работы – анализ спаривания и рекомбинации хромосом в мейозе у самцов муйской полевки (*Microtus mujanensis*), а также анализ механизмов возникновения и поддержания полиморфизма по числу плеч

* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», программы интеграционных исследований СО РАН и ДВО РАН, программы РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов человека, животных, растений и микроорганизмов».

Авторы признательны Центру коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН за предоставление доступа к микроскопическому оборудованию.

аутосом в природных популяциях данного вида.

Муйская полевка принадлежит к азиатской филогенетической линии рода *Microtus*. Этот вид населяет очень ограниченную территорию (около 5 000 км²) в Муйской долине (Республика Бурятия, бассейн Витима).

Оценка общей частоты рекомбинации у данного узкоареального специализированного вида и ее сравнение с оценками, полученными на близкородственных широко распространенных видах, представляет несомненный интерес в контексте современных дискуссий об эволюционной роли рекомбинации [4]. Для оценки частоты рекомбинации мы использовали иммуноокрашивание белка мисматч репарации (MLH1), который надежно маркирует точки кроссинговера. Данный подход был успешно применен для анализа частоты и распределения точек кроссинговера у ряда видов млекопитающих: человека [5; 6], мыши [7; 8], собаки [9], кошки [10], норки [11] и обыкновенной бурозубки [12].

У большинства представителей рода серых полевок X- и Y-хромосомы не синаптируют в профазе мейоза у самцов (асинаптические хромосомы). Исключение составляют полевки азиатской филогенетической линии, к которой относится и муйская полевка. Поэтому изучение спаривания половых хромосом в мейозе у самцов данного вида представляет особый интерес.

В природных популяциях данного вида обнаружен полиморфизм по числу аутосомных плеч (Fn), которое варьирует от 48 до 50, в то время как диплоидное число хромосом (2n) остается постоянным – 38 [13; 14]. Природа полиморфизма по числу аутосомных плеч у данного вида остается неясной. Он может быть обусловлен как перичентрическими инверсиями, так и смещением центромер. Различить эти механизмы на рутинноокрашенных препаратах невозможно, а на дифференциально окрашенных препаратах крайне сложно. В то же время анализ синаптических конфигураций у гетерозигот по хромосомным перестройкам позволяет точно определить природу полиморфизма. У гетерозигот по перичентрической инверсии должны наблюдаться либо биваленты с инверсионными петлями со сменой партнера спаривания в точке разрыва инверсии, либо прямые биваленты с отсутствием ре-

комбинации в инвертированном районе. У гетерозигот по смещению центромер должны наблюдаться только прямые биваленты с кроссинговером между центромерами.

Материал и методы

В работе исследованы 4 самца *M. tujanensis*, отловленные из природной популяции, обитающей в окрестностях с. Токсимо (Республика Бурятия, 56° 20' с. ш., 114° 53' в. д.). Препараты готовили по методике Петерса с соавт. [15]. Иммуноокрашивание проводили по методике Андерсон и соавт. [7]. Препараты инкубировали 2 ч при 37 °С с поликлональными антителами кролика против белка боковых элементов СК SCP3 (Abcam, Великобритания) при разведении 1 : 1 000, моноклональными антителами мыши против белка MLH1 человека (Pharmingen, США) при разведении 1 : 50 и антителами человека против центромерных белков человека ANA-C (Sigma-Aldrich, США) при разведении 1 : 100 в фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащем 3 % бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США). Препараты отмывали три раза по 5 мин в PBS и инкубировали 40 мин при 37 °С с антителами осла против иммуноглобулинов кролика, конъюгированными с флуоресцентной меткой Cy3, (Jackson Laboratories, США) в разведении 1 : 200, антителами козы против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с флуоресцентной меткой FITC, (Jackson Laboratories, США) в разведении 1 : 400 и антителами козы против иммуноглобулинов человека, конъюгированными с флуоресцентной меткой FITC, (Vector Laboratories, США) в разведении 1 : 100 согласно стандартному протоколу. Препараты отмывали в PBS, затем в дистиллированной воде, высушивали и наносили 15 мкл раствора антифэйда с красителем (Vectashield with DAPI; Vector Laboratories) для окрашивания ДНК и предотвращения гашения флуоресценции. Микроскопический анализ проводили в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Препараты анализировали на микроскопе Axioplan 2 (Zeiss, Германия), снабженном CCD-видеокамерой (CV M300, JAI Corporation, Япония), набором комплектов фильтров CHROMA и программным обес-

печением для обработки изображений ISIS4 (MetaSystems GmbH, Германия). Яркость и контраст изображений редактировали с использованием пакета PaintShopPro 7.0.

Позицию центромеры в каждом биваленте определяли по положению флуоресцентного сигнала ANA-C. Поскольку мы использовали один и тот же флуорохром (FITC) для детекции антител против ANA-C и MLH1, препараты окрашивали последовательно: сначала антителами к MLH1, затем, после фотографирования, антителами ANA-C. Мы регистрировали расстояния между точками локализации MLH1 и центромерами.

Для анализа отбирали ядра сперматоцитов на стадии пахитены, содержащих полные наборы полностью синаптированных аутомных бивалентов и XY-бивалент. Учитывали количество сигналов MLH1 на каждом биваленте. Нами было проанализировано 229 сперматоцитов, содержащих полный набор аутомных бивалентов и XY-бивалент, и зарегистрировано 4 791 точек кроссинговера на 4 122 аутомных. Статистические расчеты производили с использованием пакета программ STATISTICA. Все данные в тексте представлены в виде средних значений и стандартных ошибок ($M \pm SE$).

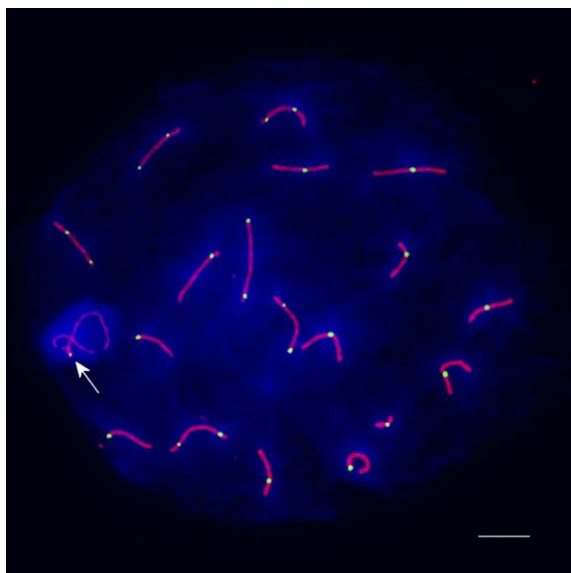


Рис. 1. Синаптомемный комплекс в сперматоцитах муйской полевки на стадии пахитены после иммуноокрашивания с использованием антител к белкам SCP3 (красный сигнал) и MLH1 (зеленый сигнал). Стрелкой показаны точка связывания MLH1 в районе спаривания полового бивалента

Результаты исследования и обсуждение

Общий уровень рекомбинации. Среднее число сайтов локализации MLH1 в аутомных на клетку у самцов муйской полевки составляло $23,4 \pm 0,1$ (рис. 1). Таким образом, общее число кроссоверов *M. tuijanensis* лишь незначительно превышало гаплоидное число аутомом (18) и было несколько ниже гаплоидного числа аутомных плеч (24). Еще более низкий уровень рекомбинации ($21,9 \pm 0,1$) обнаружен у близкородственного вида *M. taximowiczii* [16]. Этот вид занимает гораздо более широкий ареал, чем муйская полевка, и тем не менее при более высоком числе аутомом (20) и гаплоидном числе плеч аутомом (27) характеризуется более низкой частотой кроссинговера. Это показывает, что корреляция между разнообразием условий существования и генетическим разнообразием не столь прямая и очевидная, как это следует из теоретических моделей [4].

Спаривание и рекомбинация половых хромосом. У самцов муйской полевки, как и у других родственных видов, принадлежащих к азиатской филогенетической линии [17–20], мы наблюдали нормальный синапсис половых хромосом (см. рис. 1). Они сближались в зиготене, образовывали синаптомемный комплекс между дистальным прителомерным районом X-хромосомы и всем коротким плечом Y-хромосомы. Сайты связывания MLH1 в районе спаривания X- и Y-хромосом возникали в ранней пахитене и исчезали в течение средней пахитены, в то время как на аутомных бивалентах сигналы обнаруживались до наступления диплотены. Сходная асинхронность между аутомными и половыми бивалентами в связывании MLH1 была обнаружена на мыши [21]. По этой причине мы наблюдали сигналы MLH1 в районе спаривания половых хромосом не во всех исследованных клетках, а только в 81 %.

Обнаружение нормального синапсиса и рекомбинации половых хромосом у самцов муйской полевки свидетельствует о том, что данный вид, как и остальные изученные виды азиатской филогенетической линии серых полевок, сохранил предковый псевдоаутомный район, который был делетирован, перестроен или инактивирован у большинства палеарктических полевок.

Природа полиморфизма по хромосомным перестройкам. У трех из четырех исследованных самцов муйской полевки мы обнаружили в пахитенных клетках один гетероморфный аутосомный бивалент. Одна из хромосом, входящих в состав этого бивалента, была акроцентрической с явным центромерным сигналом на конце бивалента. Другая хромосома была метацентрической и давала центромерный сигнал в середине бивалента. Все гетероморфные биваленты были линейными и не содержали инверсионных петель. Это можно было бы интерпретировать как свидетельство в пользу гипотезы о том, что полиморфизм в природных популяциях муйской полевки обусловлен смещением центромера. Однако такой интерпретации противоречил тот факт, что ни в одном случае мы не наблюдали сигналов MLH1 в плече между центромерами, в то время как другое плечо этого бивалента всегда содержало сигнал MLH1 (рис. 2).

Такое распределение сайтов кроссинговера может быть только при гетерозиготности перичентрической инверсии, когда инвертированное плечо хромосомы негомологично спарено с неинвертированным. В этой ситуации кроссингер в пределах данного плеча оказывается невозможным.

Исследование синаптических конфигураций на более ранней стадии мейоза, на стадии зиготены позволило нам подтвердить инверсионную природу полиморфизма и локализовать точки разрыва инверсий. На этой стадии в небольшом проценте клеток мы наблюдали биваленты с типичными инверсионными петлями. При этом петля, как правило, включала в себя часть одного плеча гетероморфного бивалента, а центромеры акроцентрического и метацентрического гомолога оставались неспаренными (рис. 3). При этом другое плечо бивалента было полностью спарено. Это показывает, что точки разрыва инверсий точно совпадают с концами плеч, т. е. охватывают целые плечи хромосом и не затрагивают соседние с ними плечи.

Все инверсионные петли, которые мы наблюдали у гетерозигот на стадии зиготены, были незавершенными, и кроссингер в них, по-видимому, не происходил. После завершения синапсиса на стадии пахитены мы не обнаруживали инверсионных петель. Линейные гетероморфные биваленты, которые мы наблюдали на стадии пахитены,

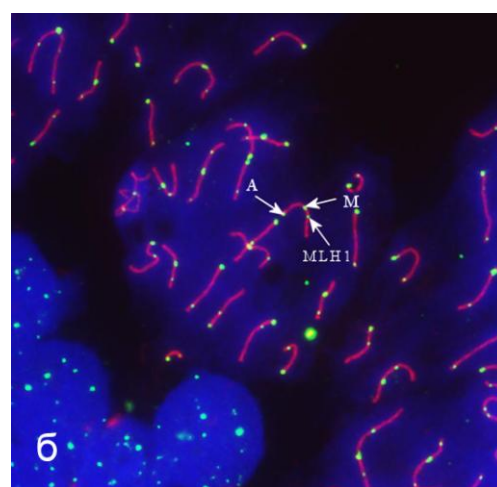
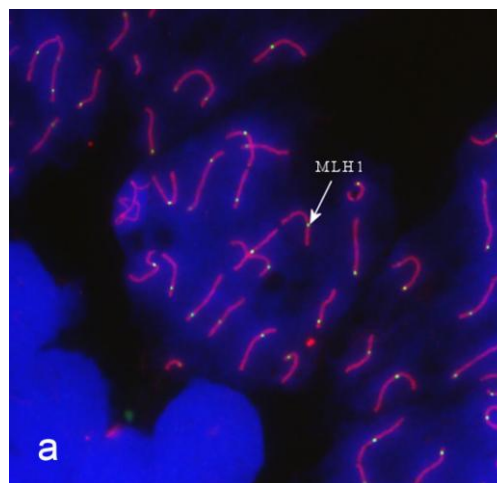


Рис. 2. Сперматоцит муйской полевки на стадии пахитены, последовательно окрашенный мечеными FITC антителами к MLH1 (а) и центромерам ANA-C (б) (зеленый сигнал): *A* – центромера акроцентрической хромосомы, *M* – центромера метацентрической хромосомы; MLH1 – сайт рекомбинации

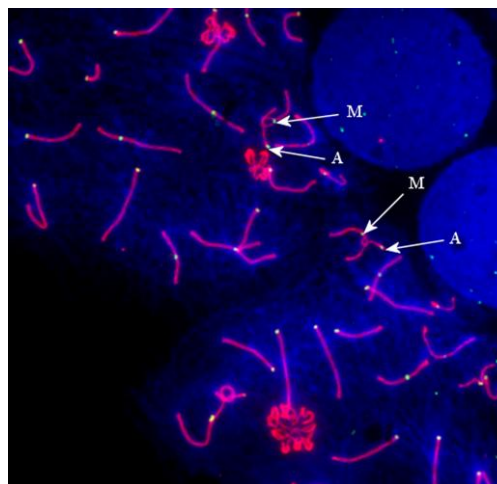


Рис. 3. Сперматоциты муйской полевки на стадии зиготены: DAPI (синий), SCP3 (красный), ANA-C (зеленый). *A* – центромеры акроцентрических хромосом; *M* – метацентрических

могли возникать двумя путями: 1) за счет изначально негомологичного синапсиса на стадии зиготены; 2) за счет синаптической подгонки – замены гомологичного синапсиса в инверсионной петле на негомологичный и линейаризации бивалентов [22]. Первый путь, по-видимому, является доминирующим, поскольку инверсионные петли наблюдались только в малой доле клеток на стадии зиготены.

Локализация точек разрыва инверсий, характерных для муйской полевки, точно в центромерах проливает свет на их происхождение. Исследованные нами инверсии, строго говоря, не подпадают под определения ни парацентрических, ни перичентрических и должны быть определены как полно-плечевые инверсии (*whole-arm inversions*). Можно предположить два сценария их возникновения. Первый сценарий предполагает, что инвертированные (acrocentric) и нормальные (metacentric) гомологи возникли одновременно за счет разных вариантов слияния одних и тех же предковых акроцентрических хромосом. При этом центрические (robertsonian) слияния дали начало метацентрическим вариантам хромосом, а тандемные – акроцентрическим вариантам. Именно этот сценарий был предложен Мейер с соавт. [13]. Согласно второму сценарию этот процесс мог идти последовательно. Первоначально могли образоваться метацентрические хромосомы за счет robertsonian слияний. При этом типе перестроек в перичентромерных районах хромосом нередко сохраняются фрагменты теломерных повторов. Эктопическая рекомбинация этих повторов могла затем приводить к полно-плечевым инверсиям с образованием акроцентрических хромосом.

Заключение

Муйская полевка характеризуется довольно низким уровнем рекомбинации. В этом отношении она сходна с другими видами серых полевок, мышью и крысой. У всех видов грызунов, исследованных с использованием иммунолокализации сайтов кроссинговера, обнаруживается общее чис-

ло кроссоверов, лишь незначительно превышающее гаплоидное число хромосом. Близкое совпадение числа рекомбинационных событий на геном и гаплоидного числа хромосом показывает, что функция рекомбинации у грызунов сводится к образованию в среднем одной хиазмы на бивалент, необходимой и достаточной для нормальной сегрегации гомологов. Можно полагать, что рекомбинационный процесс у данной группы видов не вносит существенного вклада в генерацию генетического разнообразия.

По-видимому, отбор на снижение общего уровня рекомбинации привел к накоплению в природных популяциях муйской полевки хромосомных перестроек, запирающих кроссинговер. Подавление кроссинговера в инвертированных плечах хромосом за счет негомологичного синапсиса у гетерозигот предотвращает образование дефектных хромосом. Благодаря этому у гетерозигот не снижается плодовитость, и, следовательно, инвертированные хромосомы не подвергаются элиминации естественным отбором.

Этого достаточно для поддержания инверсионного полиморфизма в природных популяциях муйской полевки. Однако этого недостаточно для поддержания такого высокого уровня гетерозиготности по инверсиям. Из четырех исследованных нами животных три были гетерозиготами. Полевые наблюдения также указывают на крайне высокий уровень гетерозиготности, который демонстрирует то, что гетерозиготы обладают селективным преимуществом. Одним из таких селективных преимуществ может быть подавление рекомбинации в определенных районах генома и стабильное поддержание цис- и трансгетерозиготности по определенным комбинациям аллелей.

Список литературы

1. Wilson D. E., Reeder D. M. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. 3rd ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005. Vol. 2. P. xxxv + 2142.
2. Chaline J., Brunet-Lecomte P., Montuir S., Viriot L., Courant F. Anatomy of the arvico-

- line radiation (Rodentia): palaeogeographical, palaeoecological history and evolutionary data // *Ann. Zool. Fenn.* 1999. Vol. 36. P. 239–267.
3. Jaarola M., Martinkova N., Gunduz I., Brunhoff C., Zima J., Nadachowski A., Amori G., Bulatova N. S., Chondropoulos B., Fraguedakis-Tsolis S., Gonzalez-Esteban J., Jose Lopez-Fuster M., Kandaurov A. S., Kefelioglu H., da Luz Mathias M., Villate I., Searle J. B. Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2004. Vol. 33. P. 647–663.
4. Lenormand T., Otto S. P. The evolution of recombination in a heterogeneous environment // *Genetics*. 2000. Vol. 156. P. 423–438.
5. Oliver-Bonet M., Turek P. J., Sun F., Ko E., Martin R. H. Temporal progression of recombination in human males // *Mol. Hum. Reprod.* 2005. Vol. 11. P. 517–522.
6. Sun F., Trpkov K., Rademaker A., Ko E., Martin R. H. Variation in meiotic recombination frequencies among human males. // *Hum. Genet.* 2005. Vol. 116. P. 172–178.
7. 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. Vol. 151. P. 1569–1579.
8. Froenicke L., Anderson L. K., Wienberg J., Ashley T. Male mouse recombination maps for each autosome identified by chromosome painting // *Am. J. Hum. Genet.* 2002. Vol. 71. P. 1353–1368.
9. Basheva E. A., Bidau C. J., Borodin P. M. General pattern of meiotic recombination in male dogs estimated by MLH1 and RAD51 immunolocalization // *Chromosome Res.* 2008. Vol. 16. P. 709–719.
10. Borodin P. M., Karamysheva T. V., Rubtsov N. B. Immunofluorescent analysis of meiotic recombination and interference in the domestic cat // *Cell and Tissue Biology*. 2007. Vol. 1. P. 503–507.
11. Borodin P. M., Basheva E. A., Zhelezova A. I. Immunocytological analysis of meiotic recombination in the American mink (*Mustela vison*) // *Anim. Genet.* 2009. Vol. 40. P. 235–238.
12. Borodin P. M., Karamysheva T. V., Belonogova N. M., Torgasheva A. A., Rubtsov N. B., Searle J. B. Recombination map of the common shrew, *Sorex araneus* (Eulipotyphla, Mammalia) // *Genetics*. 2008. Vol. 178. P. 621–632.
13. Мейер М. Н., Голенищев Ф. Н., Раджабли С. И., Саблина О. В. Серые полевки (подрод *Microtus*) фауны России и сопредельных территорий / Зоологический институт РАН. СПб., 1996. 320 с. (Тр. Зоолог. инт. РАН. Т. 232)
14. Орлов В. Н., Козловская Ю. М. *Microtus tujanensis* sp. n. (Rodentia, Cricetidae) из бассейна реки Вити // *Зоол. журн.* 1978. Т. 57, вып. 8. С. 1224–1232.
15. Peters A. H., Plug A. W., van Vugt M. J., de Boer P. A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline // *Chromosome Res.* 1997. Vol. 5. P. 66–68.
16. Бородин П. М., Башева Е. А., Голенищев Ф. Н., Дашкевич О. А., Картавцева И. Н., Потапов М. А., Сакаева Г. Р., Торгашева А. А., Фрисман Л. В. Иммунофлуоресцентный и электронно-микроскопический анализ спаривания и рекомбинации хромосом в мейозе четырех видов полевок рода *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) // *Вестн. ВОГиС.* 2010. Vol. 14. P. 89–95.
17. Ashley T., Fredga K. The curious normality of the synaptic association between the sex chromosomes of two arvicoline rodents: *Microtus oeconomus* and *Clethrionomys glareolus* // *Hereditas*. 1994. Vol. 120. P. 105–111.
18. Borodin P. M., Rogatcheva M. B., Koyasu K., Fukuta K., Mekada K., Oda S. I. Pattern of X–Y-chromosome pairing in the Japanese field vole, *Microtus montebelli* // *Genome*. 1997. Vol. 40. P. 829–833.
19. Borodin P. M., Sablina O. V., Rodionova M. I. Pattern of X–Y chromosome pairing in microtine rodents // *Hereditas*. 1995. Vol. 123. P. 17–23.
20. Mekada K., Harada M., Lin L. K., Koyasu K., Borodin P. M., Oda S. I. Pattern of X–Y chromosome pairing in the Taiwan vole, *Microtus kikuchii* // *Genome*. 2001. Vol. 44. P. 27–31.
21. Anderson L. K., Reeves A., Webb L. M., Ashley T. Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immu-

nofluorescent localization of MLH1 protein // Genetics. 1999. Vol. 151. P. 1569–1579.

22. Moses M. J., Poorman P. A., Roderick T. H., Davisson M. T. Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal rear-

rangements. IV. Synapsis and synaptic adjustment in two paracentric inversions // Chromosoma. 1982. Vol. 84. P. 457–474.

Материал поступил в редколлегию 29.05.2010

P. M. Borodin, E. A. Basheva, A. A. Torgasheva, F. N. Golenischev, I. V. Kartavtseva

**CHROMOSOME SYNAPSIS AND RECOMBINATION IN MUJA VOLE
(*MICROTUS MUJANENSIS*)**

The aim of this study was analysis of chromosome pairing and recombination in male meiosis of Muja vole (*Microtus mujanensis*) and investigation of the nature of polymorphism in the number of autosome arms in natural populations of this species. The study was carried out at cytological preparation with the use of electron and fluorescent microscopy after immunostaining of the protein of synaptonemal complex SCP3 and mismatch repair protein MLH1, reliably marking the sites of crossingover. Mean number of MLH1 signals at autosomes per cell was $21,9 \pm 0,1$. X and Y chromosomes of *M. mujanensis* paired and recombined in short pseudoautosomal region. Analysis of synaptic configurations at zygotene and pachytene indicated that the polymorphism in the number of autosome arms in natural populations of this species was determined by whole-arm inversions.

Keywords: chromosome recombination, inversions, crossingover, chromosome rearrangements, chromosome polymorphism, meiosis, *Microtus mujanensis*.