

УДК 576.316.34

В-ХРОМОСОМЫ: ДНК, ПРОИСХОЖДЕНИЕ, ЭВОЛЮЦИЯ

© 2005 г. Н. Б. Рубцов^{1,3}, Т. В. Карамышева¹, И. В. Картавецца², О. В. Андреевкова¹,
М. Н. Бочкарев¹, Г. В. Рослик², Д. Н. Рубцов³, Е. А. Перепелов¹, А. Г. Бугров^{3,4}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090 Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 10;
электронная почта: rubt@bionet.nsc.ru;

² Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток

³ Новосибирский государственный университет, Новосибирск

⁴ Институт систематики и экологии животных, Новосибирск

Поступила в редакцию 24.12.2004 г.

В-хромосомы до настоящего времени остаются одними из самых загадочных элементов геномов эукариот. Длительное время исследования В-хромосом были ограничены изучением их морфологии, частоты встречаемости, влияния на фенотип носителя, поведением в митозе и мейозе. Разработка новых методов молекулярно-цитогенетического анализа позволила приступить к изучению организации и сравнению различных В-хромосом на уровне входящих в их состав нуклеотидных последовательностей. В настоящей работе представлены результаты изучения молекулярной организации В-хромосом восточноазиатской лесной мыши (*Apodemus peninsulae*) и двух видов саранчовых (*Podisma sapporensis* и *P. kanoi*), полученные с помощью создания микродиссекционных ДНК-библиотек и флуоресцентной *in situ* гибридизации с митотическими и мейотическими хромосомами этих видов. Проведен анализ распределения гомологичных нуклеотидных последовательностей в В-хромосомах различных морфотипов, а также в А-хромосомах исходных и близкородственных видов. Полученные данные позволили на новом уровне рассмотреть вопрос о возможной роли В-хромосом в эволюции генома эукариот и предложить новый механизм их формирования. В работе также обсуждаются общие вопросы о происхождении и эволюции В-хромосом эукариот.

Кариотип часто рассматривают как некую постоянную характеристику вида. Однако размеры, число и морфология хромосом основного набора (А-хромосомы) могут значительно варьировать не только на уровне надвидовых таксонов, но и внутри одного вида. В ряде случаев внутривидовой полиморфизм хромосом связан с добавочными (сверхчисленными, или В) хромосомами. В-хромосомы, дополняющие основной набор, представляют собой один из наиболее загадочных элементов генома. В-хромосомы разных видов отличаются по происхождению, структурной организации, а также по механизмам поддержания в популяциях вида [1]. Обычно В-хромосомы насыщены повторными последовательностями, представленными либо в виде кластеров, либо присутствующими в В-хромосомах в высокой концентрации. К настоящему времени В-хромосомы выявлены более чем у 1300 видов растений и 500 видов животных [1, 2]. Возможно, они распространены значительно шире, но при анализе небольших выборок из популяций того или иного вида с низкой частотой их встречаемости В-хромосомы могли остаться незамеченными. Оценка распределения В-хромосом в различных таксонах представляет отдельную проблему, которая недавно рассмотрена Палестис и соавт. [2]. Отметим лишь, что на выявление В-хромосом влияет не только интенсивность цитологических исследований (число изученных особей) и

частота встречаемости в природных популяциях, но и структура кариотипа вида (общее число хромосом, полиморфизм А-хромосом, наличие микрохромосом и т.д.).

Длительное время изучение В-хромосом ограничивалось использованием набора классических цитологических методов хромосомного анализа, включающего главным образом анализ метафазных и мейотических хромосом с помощью различных методов дифференциального окрашивания. В последние годы все большее распространение получают такие методы молекулярного анализа В-хромосом, как создание ДНК-библиотек и ДНК-проб, флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), клонирование и секвенирование ДНК. Результаты этих исследований представлены на Второй конференции по В-хромосомам, состоявшейся в Бубионе (Испания, июнь 2004 г.).

В ходе изучения молекулярной организации В-хромосом восточноазиатской лесной мыши (*Apodemus peninsulae*) и двух видов саранчовых (*Podisma sapporensis* и *P. kanoi*) нами получены данные, указывающие на то, что механизм формирования В-хромосом в разных случаях может принципиально отличаться. Основной подход в проведенных нами исследованиях состоял в получении ДНК-библиотек интересующих хромосом и хромосомных районов, создание на их основе ДНК-проб для FISH и

анализ распределения гомологичных нуклеотидных последовательностей в А- и В-хромосомах различных морфотипов и близкородственных видов. Полученные данные позволили на новом уровне вернуться к рассмотрению вопроса о происхождении и эволюции В-хромосом эукариот.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Восточноазиатская лесная мышь (*A. peninsulae*). Животных отлавливали из природных популяций Западной Сибири (Новосибирская область), Алтая (Алтайский край, Республика Алтай) (подвид *A.p. nigritalus*), Центральной Сибири (Красноярский край, Республика Бурятия) (подвид *A.p. major*) и Дальнего Востока (Хабаровский край, Приморский край) (подвид *A.p. praetor*).

Кобылка Кано (*P. kanoi*). Саранчовых этого вида собирали в природных популяциях острова Хонсю, Япония.

Саппорская кобылка (*P. sapporensis*). В работе исследовали представителей двух подвидов этого политипического вида. Особи *P. sapporensis sapporensis* Shir. собраны более чем в 25 популяциях о. Хоккайдо (Япония). Особи *P. sapporensis krylonensis* Storozh. отловлены в южной части острова Сахалин (полуостров Крильон).

Метафазные хромосомы восточноазиатской лесной мыши. Хромосомы для рутинного цитогенетического анализа и FISH готовили как прямым методом, так и из кратковременных культур клеток костного мозга согласно общепринятым методикам. Окраску красителями Гимза, DAPI и азотнокислым серебром (Ag-окрашивание) проводили согласно стандартным протоколам [3]. Очень мелкие точкоподобные В-хромосомы, в составе которых не удавалось выявить плечи даже в метафазных пластинках с хорошим распластыванием, отюсили к микро В-хромосомам. В-хромосомы, в составе которых выявлено хотя бы одно плечо, были отнесены к макро В-хромосомам. При обозначении В-хромосом использовали следующую номенклатуру: номер зоологического образца, символ "В", номер В-хромосомы данного образца (номера присваивались всем макро В-хромосомам в порядке уменьшения их размера, затем произвольно микро В-хромосомам). Таким образом, 9В3 – это третья по размеру В-хромосома образца № 9. Препараты для проведения микродиссекции готовили на покровных стеклах размером 60 × 24 мм.

Хромосомы саранчовых. Давленные препараты цитогенетических хромосом из семенников самцов саранчовых готовили стандартным способом. Митотические хромосомные препараты готовили из суспензии эмбриональных клеток [4].

Получение район- и хромосомоспецифичных ДНК-проб. Сбор В-хромосом и хромосомных районов проводили на инвертированном микроскопе

Axiovert 10 (объектив 100x, окуляр x10, "Zeiss", ФРГ), используя оттянутую стеклянную иглу, контролируемую микроманипулятором MR ("Zeiss", ФРГ). Выделение, амплификацию и мечение ДНК собранных хромосом и хромосомных районов проводили согласно стандартному протоколу [5]. В работе использовали как полученные ранее ДНК-пробы [4, 6], так и полученные в ходе выполнения настоящей работы.

ДНК-пробы, использованные для изучения организации В-хромосом восточноазиатской лесной мыши. Микродиссекционные ДНК-пробы получали из ДНК целых В-хромосом: 9В8, 9В9, 11В1, 11В2, 11В3, 11В4, 11В5 (В-хромосомы животных из популяций Сибири), 1505В1, 1505В2, 1507В1, 1508В1, 1508В2 (В-хромосомы животных из популяций Дальнего Востока).

Микродиссекционную ДНК-пробу 11В2р_q получали диссекцией хромосомы 11В2 и амплификацией ДНК ее плеч.

Микродиссекционную ДНК-пробу АРОС получали из С-гетерохроматиновых прицентромерных районов аутосом восточноазиатской лесной мыши.

Введение биотинилированного dUTP (biotin-11-dUTP) и дигоксигенин-11-dUTP проводили в дополнительных 15 циклах полимеразной цепной реакции с частично вырожденным праймером [5].

ДНК-проба для выявления кластеров 18S рДНК (рДНК-проба) представляет фрагмент 18S рДНК человека размером 3200 п.н., клонированный в рHr13 [7]. Введение биотинилированного dUTP проводили с помощью стандартной никотинилации.

ДНК-пробу (TTAGGG)_n (тел-ДНК-проба) использовали для выявления кластеров теломерных повторов [8].

ДНК-пробы, использованные для изучения организации В-хромосом бескрылых кобылок рода *Podisma*. Микродиссекционные ДНК-пробы получали из ДНК целой В-хромосомы *P. s. sapporensis* морфотипа В1 (В1-проба), плеча В-хромосомы *P. kanoi* (PkanВ-проба), а также эухроматинового района одной из мелких аутосом *P. s. sapporensis* (EUR1-проба).

FISH и микроскопия хромосомных препаратов. Гибридизацию *in situ* район- и хромосомоспецифичных ДНК-проб с метафазными хромосомами, детекцию сигнала (авидин-FITC/биотинилированный антиавидин/авидин-FITC и антидигоксигенин-Cy3) проводили по стандартным методикам [9]. Для окрашивания хромосом после гибридизации *in situ* использовали краситель DAPI.

Результаты дифференциального окрашивания и FISH анализировали с помощью микроскопа AXIOSKOP 2 Plus ("Zeiss"), для регистрации и обработки микроизображений использовали CCD-камеру, соответствующие комплекты фильтров

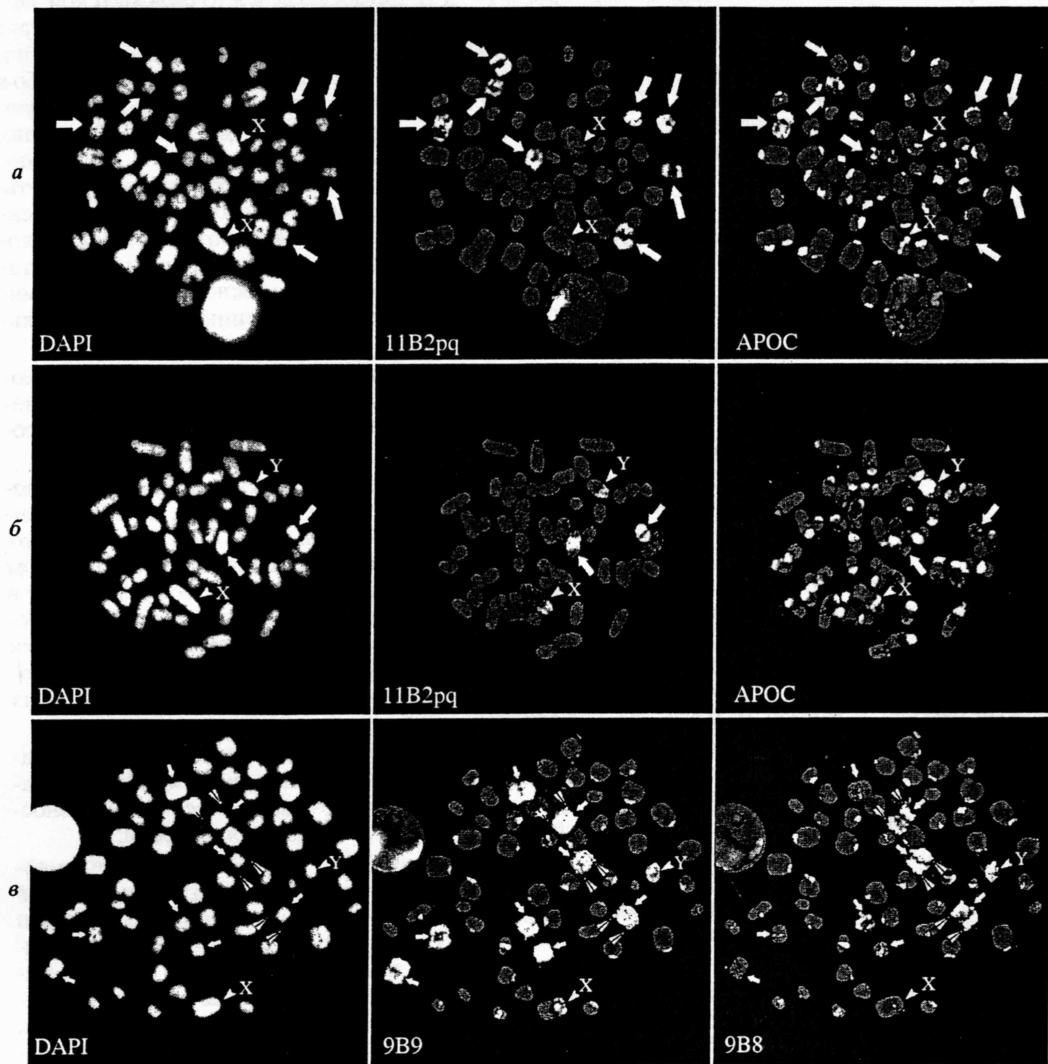


Рис. 1. FISH микродиссекционных ДНК-проб с метафазными хромосомами восточноазиатской мыши. FISH ДНК-проб из прицентромерного С-гетерохроматинового района аутосом (ДНК-проба АРОС) и плеч макро В-хромосомы (11В2рq) с метафазными хромосомами мыши из Западной Сибири (ряд а) и с Дальнего Востока (ряд б); FISH ДНК-проб микро В-хромосомы (9В8) и маленькой макро В-хромосомы (9В9) (ряд в).

В каждом ряду слева представлена метафазная пластинка, окрашенная DAPI, далее сигналы FISH соответствующих ДНК-проб с хромосомами метафазной пластинки (серым показана локализация ДНК хромосом). Стрелки указывают на В-хромосомы, головки стрелок на половые хромосомы, расщепленные головки стрелок – на слабо конденсированные районы В-хромосом.

фирмы "Chroma", программное обеспечение Axio Vision ("Zeiss") и программное обеспечение ISIS3 (METASystems "GmbH", ФРГ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

FISH микродиссекционных ДНК-проб с метафазными хромосомами восточноазиатской лесной мыши. Используемые в работе микродис-

секционные ДНК-пробы восточноазиатской лесной мыши давали пять вариантов окрашивания А- и В-хромосом при проведении FISH с хромосомами восточноазиатской лесной мыши:

1. ДНК-проба прицентромерных районов аутосом (ДНК-проба АРОС). FISH с этой пробой привела к окрашиванию прицентромерных районов аутосом, интеркалярного С-блока X-хромосомы, теломерного С-блока Y-хромосомы, прицентромер-

ых районов В-хромосом животных из природных популяций Западной Сибири и некоторых В-хромосом животных из природных популяций Центральной Сибири, отдельных районов плеч некоторых В-хромосом. В то же время FISH этой ДНК-пробы не дала сигнала ни в прицентромерных районах половых хромосом, ни в прицентромерных районах В-хромосом животных из природных популяций Дальнего Востока России (рис. 1а, б).

2. ДНК-пробы из плеч В-хромосомы 11В2 животного (11В2р, 11В2q, 11В2рq), отловленного Западной Сибири, интенсивно окрашивают большинство районов в плечах макро В-хромосом всех исследованных животных. Они также дают табулы рассеянный сигнал в эухроматиновых районах А-хромосом. У животных из дальневосточных популяций и части животных из популяций центральной Сибири сигнал в проксимальном эухроматиновом районе Х-хромосомы и эухроматиновом районе Y-хромосомы был интенсивнее, чем остальных эухроматиновых районах А-хромосом (рис. 1а, б).

3. ДНК-пробы из четырех крупных и одной маленькой В-хромосомы животных из дальневосточных популяций (ДНК-пробы 1505В1, 1505В2, 107В1, 1508В1, 1508В2) окрашивают те же районы - и В-хромосом, что и ДНК-проба 11В2рq, а также и центромерные районы В-хромосом дальневосточных популяций и прицентромерные районы В-хромосом животных из популяций Центральной Сибири, которые не окрашивались ДНК-пробой из прицентромерных районов аутосом.

4. ДНК-проба из маленькой макро В-хромосомы животного, отловленного в Западной Сибири (В9), окрашивает те же районы А- и В-хромосом, как и совместный FISH ДНК-проб АРОС и 11В2рq (рис. 1в).

5. ДНК-проба из микро В-хромосомы животного, отловленного в Западной Сибири, выявляет не только районы, окрашенные FISH ДНК-пробой АРОС, но и слабо конденсированные районы в составе некоторых В-хромосом животных из популяций Западной и Центральной Сибири (рис. 1в, г). Результаты FISH ДНК-проб с метафазными хромосомами восточноазиатской лесной мыши приведены в таблице.

Организация В-хромосом в восточноазиатской лесной мыши. Основной набор хромосом восточноазиатской лесной мыши представлен 48 акроцентрическими хромосомами (48,XX и 48,XY), две из которых несут районы ядрышкового организатора (ЯО-районы). Число В-хромосом варьирует от 0 до 24, а их размер – от микрохромосом крупных акроцентрических и двуплечих, преобладающих по размеру хромосомы первой пары |.

С помощью FISH микродиссекционных ДНК-проб интенсивно окрашивались различные районы

в А- и В-хромосомах восточноазиатской лесной мыши, что указывает на присутствие в составе этих ДНК-проб последовательностей, гомологичных различным повторам, организованным либо в кластеры, либо представленным в соответствующих районах в высокой концентрации. Вероятно, каждая из ДНК-проб включала набор разных повторенных последовательностей, но для простоты обсуждения мы объединили их в типы повторенных последовательностей в соответствии с их локализацией в хромосомах. На основании результатов FISH в В-хромосомах можно выделить как минимум семь типов повторенных последовательностей:

1) повторенные последовательности В-хромосом, гомологичные ДНК прицентромерных районов аутосом, интеркалярного С-блока Х-хромосомы и теломерного С-блока Y-хромосомы;

2) повторенные последовательности плеч В-хромосом, выявляемые ДНК-пробой, приготовленной из плеч хромосомы 11В2. Они представляют собой основной материал плеч макро В-хромосом восточноазиатской лесной мыши, но отсутствуют в слабо конденсированных районах В-хромосом. Гомологичные им повторенные последовательности присутствуют в эухроматиновых районах хромосом основного набора в виде диспергированных повторов;

3) повторенные последовательности слабо конденсированных районов В-хромосом. Нам не удалось выявить гомологичные им последовательности в составе хромосом основного набора;

4) рибосомная ДНК (рДНК). Помимо теломерных районов двух пар аутосом рДНК выявлена в теломерных и интеркалярных районах одного или обоих плеч 17 В-хромосом 24 исследованных животных Сибири и Дальнего Востока. ЯО-окрашивание показало, что В-хромосомы содержат функционально активные кластеры рибосомных генов. По данным FISH и ЯО-окрашивания размеры кластеров рДНК в В-хромосомах существенно меньше, чем в аутосомах (рис. 2а-г);

5) повторенные последовательности прицентромерных районов В-хромосом мышей из популяций Дальнего Востока и Бурятии, не имеющие гомологии с ДНК прицентромерных районов аутосом. Вопрос об их происхождении остается открытым. Возможно, что они гомологичны ДНК прицентромерных повторов половых хромосом;

6) кластеры теломерных повторов (TTAGGG)_n (рис. 3);

7) повторенные последовательности районов плеч В-хромосом, которые не окрашивались ни одной из полученных нами ДНК-проб.

Распределение повторенных последовательностей в районах В-хромосом восточноазиатской лесной мыши. Для более эффективного анализа распределения повторенных последователь-

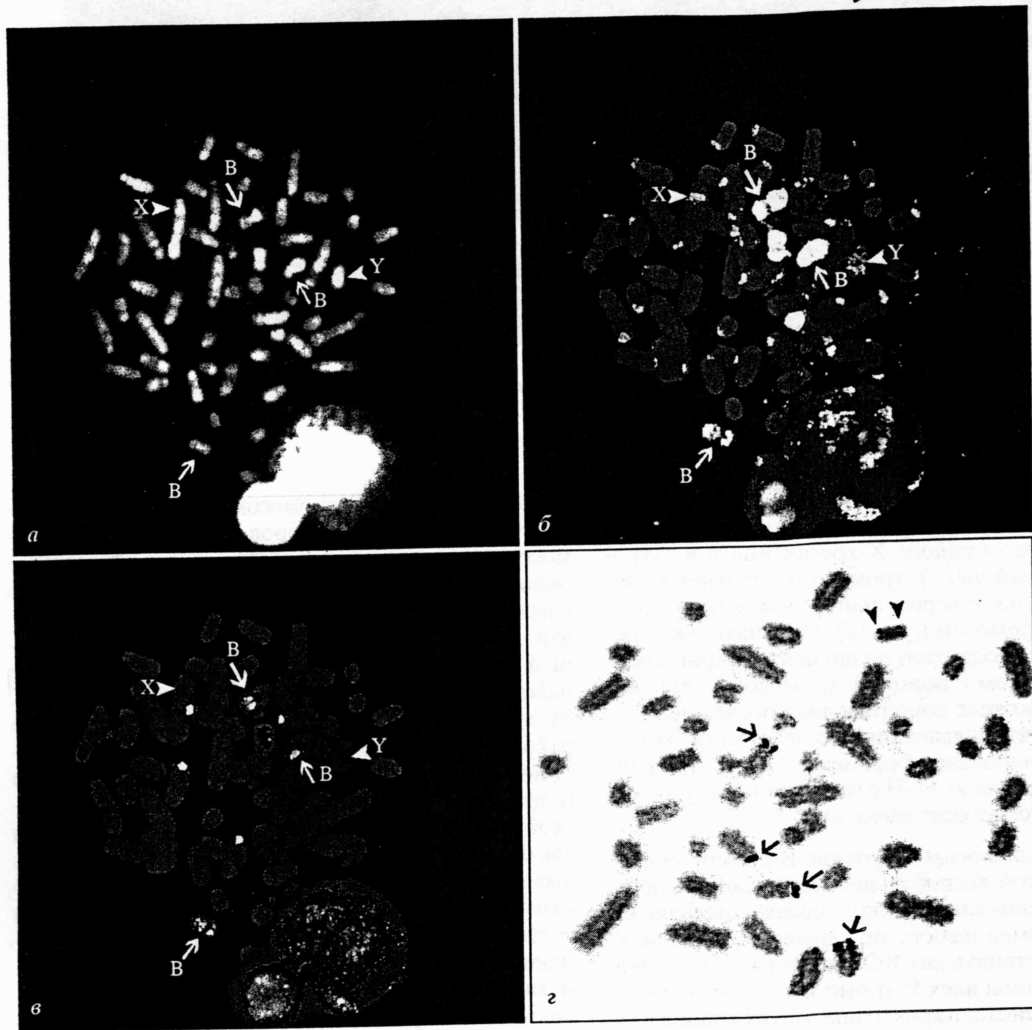


Рис. 2. ЯО-районы в В-хромосомах восточноазиатской мыши. Метафазная пластинка, окрашенная DAPI (а), сигнал FISH микродиссекционной ДНК-пробы из макро В-хромосомы (б) и рДНК-пробы (в) (серым показана локализация ДНК-пробы). Стрелки указывают на В-хромосомы, несущие ЯО-районы, головки стрелок – на половые хромосомы; Ag-окрашивание метафазных хромосом восточноазиатской мыши (г). Стрелки указывают на активные ЯО-районы аутосом, головки стрелок – на активные ЯО-районы В-хромосом.

ностей в районах А- и В-хромосом восточноазиатской лесной мыши рассмотрим состав ДНК прицентромерных районов, плеч В-хромосом, ЯО-районов А- и В-хромосом.

Прицентромерные районы В-хромосом. Прицентромерные районы В-хромосом восточноазиатской лесной мыши Западной Сибири и некоторых В-хромосом особей этого вида из Центральной Сибири содержат последовательности, гомологичные ДНК прицентромерных районов аутосом. Число копий этих последовательностей в прицентромерных районах разных В-хромосом сильно варьирует, на что указывают результаты FISH различных ДНК-проб. ДНК прицентромерных районов В-хро-

мосом дальневосточных мышей (за исключением одной В-хромосомы) и части В-хромосом мышей из Бурятии оказалась негомологична ДНК прицентромерных районов В-хромосом особей из западносибирских популяций. Сравнение состава ДНК прицентромерных районов В-хромосом и половых хромосом оказалось затруднено. Возможно, это обусловлено малым размером кластеров повторенных последовательностей в прицентромерных районах половых хромосом. Это может объяснять невысокий уровень сигнала FISH ДНК-проб В-хромосом дальневосточных животных в прицентромерных районах половых хромосом даже в случае сходного состава их ДНК. Следует от-

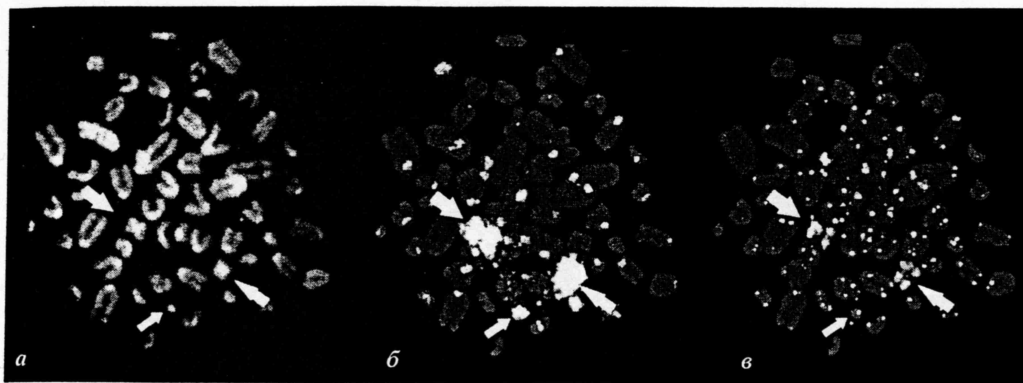


Рис. 3. Двухцветная FISH ДНК-пробы микро В-хромосомы и ДНК-пробы (TTAGGG)_n. Метафазная пластинка, окрашенная DAPI (а), сигнал FISH микродиссекционной ДНК-пробы (9В8) (б) и ДНК-пробы (TTAGGG)_n (в) (серым показана локализация ДНК хромосом).

ить, что концентрация повторенных последовательностей плеч В-хромосом в проксимальном хроматиновом районе Х-хромосомы и в эухроматиновых районах Y-хромосомы дальневосточных мышей достоверно выше, чем в остальных айнах А-хромосом (рис. 1б). Окончательное решение вопроса, содержат ли прицентромерные районы В-хромосом и половых хромосом дальневосточных животных гомологичные последовательности, требует дальнейших исследований, включающих клонирование фрагментов ДНК этих районов и проведение их FISH с метафазными хромосомами соответствующих животных.

Плечи В-хромосом. Изучение В-хромосом восточноазиатской лесной мыши методами рутинного и дифференциального окрашивания выявило их ромную изменчивость по размерам, локализации и присутствию в них ЯО-районов [10, 18]. Кроме этого, районы плеч В-хромосом отличаются по овню конденсации хроматина и по входящей в их состав ДНК. По типу конденсации хроматина в мизе в плечах В-хромосом можно выделить два типа районов. Если хроматин одного из них подвернется в митозе нормальной конденсации, что приводит к формированию обычных районов плеч метафазной хромосомы, то хроматин районов другого типа остается слабо конденсированным и при изготовлении хромосомных препаратов расплывается на стекле тонким слоем. На стандартных препаратах хромосом эти районы не только не имеют четкой морфологии, но даже не выявляются при окраске такими стандартными красителями, как Гимза и DAPI. Эти районы обнаружены и исаны только благодаря высокой чувствительности FISH соответствующих ДНК-проб [6, 8], або конденсированные районы обнаружены только в В-хромосомах Сибири. Они являлись неъемлемой частью микро В-хромосом. Кроме того они локализовались в прителомерных районах

некоторых макро В-хромосом. Локализация кластеров теломерных повторов (TTAGGG)_n в В-хромосомах, включающих слабо конденсированные районы, позволяет предположить, что наряду со слабой связью материала 30 нм петель хроматина, эти районы содержат нормально сформированный скэфолд (рис. 3). Слабо конденсированные районы В-хромосом отличаются по составу ДНК от других районов А- и В-хромосом. Открытие районов со слабой конденсацией хроматина заставляет пересмотреть вопрос о размерах микро В-хромосом. Микро В-хромосомы восточноазиатской лесной мыши ранее обычно характеризовали как очень маленькие точкоподобные хромосомы с отсутствием оформленных морфологических признаков. FISH-анализ ДНК-проб микро В-хромосом показал, что в действительности их размер несколько больше, чем считалось ранее, так как плечи микро В-хромосом, состоящие из слабо конденсированного хроматина, не выявляются при окрашивании обычными красителями. Слабая конденсация хроматина плеч микро В-хромосом объясняет причину отсутствия у них ясной морфологии при изучении с использованием традиционной световой микроскопии.

В нормально конденсированных районах плеч В-хромосом выявлены участки, обогащенные различными повторенными последовательностями, гомологичными либо ДНК плеч хромосомы 11В2, либо ДНК прицентромерных районов аутосом, либо нуклеотидными последовательностями, которые не входят в состав ни одной из полученных нами к настоящему времени ДНК-проб. Следует отметить, что у восточноазиатской лесной мыши среди двуплечих В-хромосом часто встречаются хромосомы, плечи которых идентичны по локализации и размеру районов, содержащих определенные типы повторенных последовательностей. Это

указывает на широкое распространение изохромосом среди двуплечих В-хромосом данного вида.

ЯО-районы. Кластеры рДНК и активные ЯО-районы в хромосомах восточноазиатской мыши из различных популяций Сибири и Дальнего Востока у всех исследованных животных локализованы в теломерных районах двух пар аутосом среднего размера. Не выявлено ни одного случая локализации ЯО-района в прицентромерном районе А-хромосомы, как можно было ожидать на основании ранее опубликованных данных [10]. Кроме того, ЯО-районы найдены в 17 из 108 В-хромосом 24 животных. Они имели проксимальную, интеркалярную или терминальную локализацию. Так как хроматин ЯО-районов сохраняет низкий уровень конденсации в митотических клетках млекопитающих, можно было предположить, что слабо конденсированные районы В-хромосом представляют собой активные ЯО-районы. Однако проверка этой гипотезы с помощью двухцветной FISH рДНК-пробы и различных микродиссекционных ДНК-проб показала, что ЯО-районы в В-хромосомах находятся либо внутри нормально конденсированных районов, либо на их границе (теломерные районы, районы, пограничные с районами слабо конденсированного хроматина). Ни в одном из слабо конденсированных районов плеч В-хромосом не найдено последовательностей, гомологичных рДНК (рис. 2а, б). Также не выявлено ни одного случая локализации ЯО-районов в микро В-хромосомах.

Распределение нуклеотидных последовательностей, гомологичных ДНК В-хромосом в аутосомах и половых хромосомах восточноазиатской лесной мыши. Прицентромерные районы аутосом, интеркалярный С-блок Х-хромосомы и теломерный С-блок Y-хромосомы содержат ДНК, гомологичную ДНК прицентромерных районов части В-хромосом западносибирских особей. Гомологичной ДНК обогащены также некоторые районы В-хромосомных плеч. ДНК, гомологичная наиболее распространенному повтору В-хромосомных плеч, представлена в эухроматиновых районах А-хромосом в виде диспергированных повторов. У мышей Дальнего Востока и Центральной Сибири этими повторами обогащены проксимальный район Х-хромосомы, эухроматиновая часть Y-хромосомы и теломерный район одной из аутосом (рис. 1б).

Вопрос о присутствии и распределении в А-хромосомах ДНК, гомологичной ДНК слабо конденсированных районов В-хромосом, остается открытым. В настоящем исследовании такая ДНК не найдена в А-хромосомах, но использованные нами методы не позволяют выявлять нуклеотидные последовательности, представленные небольшим числом копий. Сигнал FISH ДНК-пробы микро В-хромосомы в эухроматиновых районах А-хромо-

сом близок к фоновому уровню, что, вероятно, обусловлено присутствием в ДНК-пробе последовательностей, гомологичных ДНК прицентромерных районов аутосом. Возможно, что прицентромерные районы А-хромосом содержат некоторое количество последовательностей, гомологичных диспергированным повторам эухроматиновых районов, подобно L1-повтору в хромосомах человека [11]. Результаты секвенирования генома человека указывают на локализацию около 40% L1-повторов в прицентромерных С-гетерохроматиновых районах хромосом.

Происхождение и эволюция В-хромосом восточноазиатской лесной мыши. Гомология ДНК А- и В-хромосом восточноазиатской лесной мыши указывает на происхождение основной части материнского В-хромосом из хромосом основного набора. В-хромосомы мышей западносибирских популяций произошли, вероятно, из аутосом, на что указывает гомология ДНК их прицентромерных районов и прицентромерных районов аутосом. В-хромосомы дальневосточных материковых популяций, возможно, являются производными половых хромосом. Их прицентромерные районы не содержат повторов последовательностей, характерных для прицентромерных районов аутосом, в то же время, проксимальные эухроматиновые районы половых хромосом обогащены повторами, гомологичными ДНК плеч В-хромосом. Исходя из полученных данных о составе ДНК В-хромосом восточноазиатской лесной мыши, наиболее вероятным сценарием их возникновения и дальнейшей эволюции представляются хромосомные перестройки, принципиально сходные с перестройками, приводящими к формированию сверхчисленных маркерных хромосом человека (МХ) [12], с последующей амплификацией ДНК сверхчисленной хромосомы. В 80% случаев МХ человека происходят из акроцентрических хромосом. Большинство из них (около 60%) – производные хромосомы 15 [13]. Изучение районов хромосомных перестроек, вовлеченных в формирование МХ человека, выявило в их составе различные типы повторов последовательностей, которые способны значительно увеличивать частоту хромосомных перестроек [14, 15]. Следует заметить, что для формирования МХ человека из акроцентриков в большинстве случаев достаточно одного разрыва. В этом случае возникает МХ, представляющая собой инвертированную дубликацию короткого плеча и небольшого проксимального района длинного плеча исходной хромосомы. Такой тип хромосомных перестроек сопровождается инактивацией одной из центромер перестроенной хромосомы. Различное происхождение В-хромосом в популяциях лесных мышей Западной Сибири и Дальнего Востока, возможно, связано с локализацией горячих точек хромосомных перестроек в разных хромосомах.

Однако возникновения сверхчисленных хромосом, напоминающих МХ человека, вероятно, недостаточно для формирования полноценных В-хромосом мышей. Одно из принципиальных отличий большинства исследованных В-хромосом мышей от МХ человека заключается в их способности сохраняться и накапливаться в ряду поколений. Механизм такого накопления В-хромосом у восточноазиатской мыши не ясен. Полученные к настоящему времени данные показывают, что вслед за появлением сверхчисленной хромосомы происходит интенсивная амплификация различных нуклеотидных последовательностей, приводящая к значительному увеличению размеров В-хромосомы. Возможно, имеет место амплификация последовательностей, которые уже находились в составе малой сверхчисленной хромосомы в небольшом числе копий. Нельзя исключить и инсерции в сверхчисленную хромосому новых фрагментов ДНК с последующей их амплификацией. В любом из этих вариантов следует ожидать относительно независимой эволюции плеч В-хромосом. Однако значительное число изученных В-хромосом составляют изохромосомы. Вероятно, они представляют собой результат повторных хромосомных перестроек с точками разрыва в прицентромерных районах, что согласуется с предположением о существовании горячих точек хромосомных перестроек в прицентромерных районах исходной хромосомы основного набора и с рассмотренным выше механизмом возникновения предшественников В-хромосом.

Как уже упоминалось выше, формирование плеч В-хромосом происходит в результате амплификации нуклеотидных последовательностей, которые либо уже находились в небольшом числе копий в сверхчисленной хромосоме, либо были интегрированы в нее несколько позже. Мы полагаем, что возможны оба варианта. Результатом эволюции, в основе которой лежат описанные выше механизмы, могут быть В-хромосомы, отличающиеся по размеру, центромерному индексу и составу ДНК различных районов. В процесс формирования В-хромосом восточноазиатской лесной мыши, вероятно, могут быть вовлечены различные нуклеотидные последовательности, включая фрагменты и даже целые копии генов. Учитывая данные о составе кластеров дубликонов хромосом человека [16], можно предположить, что полные копии генов могут оказаться в составе В-хромосомы в результате уже первой хромосомной перестройки. Вероятность такого события достаточно велика, так как на границе прицентромерного гетерохроматина и эухроматиновых районов достаточно часто находятся кластеры дублицированных последовательностей. В хромосомах человека их размер может достигать 1 млн п.н. и включать копии последовательностей из разных районов разных хромосом [16]. Вероятно, районы на границе прицент-

ромерного гетерохроматина и эухроматина особенно благоприятны для инсерции в них различных последовательностей, в том числе превращающих этот район в горячую точку хромосомных перестроек. В этом случае дубликоны, расположенные проксимальнее “горячей точки”, окажутся в составе В-хромосомы. Вполне возможно, что копии генов могут попасть в В-хромосому и позже, в результате инсерции фрагментов ДНК на более поздних стадиях ее эволюции.

Восточноазиатская мышь – вид, уникальный по частоте встречаемости В-хромосом. В большинстве материковых популяций доля животных, у которых нет В-хромосом, не превышает нескольких процентов. К настоящему времени В-хромосомы не найдены только у животных, обитающих на двух островах: на острове Сахалин и острове Стенина [17, 18]. Следует отметить, что число относительно крупных В-хромосом обычно не более 10, а микро В-хромосомы, как правило, сопровождаются более крупными В-хромосомами и характерны практически только для сибирских популяций, обеспечивая высокие числа В-хромосом у отдельных особей. Если по числу макро В-хромосом сибирские и дальневосточные популяции не имеют достоверных различий, то по числу микро В-хромосом они достоверно различаются [10, 18]. В то время как в сибирских популяциях числа микро В-хромосом варьируют от 0 до 20, в дальневосточных материковых популяциях частота В-хромосом, которые по своим размерам могли бы быть отнесены к микро В-хромосомам, близка к нулю. Как редкий вариант микро В-хромосомы описаны и в приморских популяциях, однако признавалось, что их размер несколько больше, чем размер микро В-хромосом животных из сибирских популяций. Более того, на препаратах прометафазных хромосом в составе “микро В-хромосом Дальнего Востока” можно выделить небольшие плечи, т.е. по морфологическим признакам они занимают промежуточное положение между микро и мелкими макро В-хромосомами. Сравнение состава ДНК микро В-хромосом мышей Сибири и самых маленьких В-хромосом мышей Дальнего Востока указывает на их принадлежность к разным типам В-хромосом. При перекрестной гибридизации ДНК-проб из микро В-хромосом мышей Сибири и самых маленьких В-хромосом мышей Дальнего Востока не выявлено какой-либо гомологии их ДНК (таблица). В то же время показан достаточно высокий консерватизм состава ДНК В-хромосом внутри каждой из этих групп.

Вероятно, самые мелкие В-хромосомы мышей из дальневосточных популяций могут представлять собой маленькие макро В-хромосомы. В настоящее время невозможно с полной уверенностью утверждать, что в популяциях Дальнего Востока полностью отсутствуют микро В-хромосомы, гомологичные микро В-хромосомам мышей Сиби-

Крашивание А- и В-хромосом FISH микродиссекционных ДНК-проб с хромосомами восточноазиатской лесной мыши

Район микродиссекции	А-хромосомы		Макро В-хромосомы					Микро В-хромосомы	
			В-хромосомы Сибири			В-хромосомы Дальнего Востока			
	Блоки С-гетерохроматина	Эухроматиновые районы	Прицентромерные районы	Плечи хромосом	Слабо конденсированные районы	Прицентромерные районы	Плечи хромосом	Прицентромерные районы	Слабо конденсированные районы
Прицентромерные районы аутосом	+++	-	+	+	-	-	-	++	-
Плечи макро В-хромосомы	-	+	-	+++	-	-	+++	-	-
Макро В-хромосомы Сибири	++	+	+	+++	-	-	+++	++	-
Микро В-хромосома	++	-	++	+	+++	-	-	++	+++
В-хромосомы Дальнего Востока	-	+	+	+++	-	+	+++	-	-

Примечание. (+++) интенсивный сигнал; (++) сигнал средней интенсивности; (+) небольшое превышение интенсивности сигнала над фоном; (-) интенсивность сигнала на уровне фона; (+-) сигнал выявлен в районах части исследованных хромосом.

ри. На данный момент нами исследованы только 20 особей из дальневосточных популяций, из которых лишь две несли В-хромосомы, по своим размерам немного превосходящие микро В-хромосомы сибирских животных. Однако необходимо напомнить, что в составе В-хромосом дальневосточных популяций мышей не обнаружено районов, обогащенных нуклеотидными последовательностями, типичными для микро В-хромосом мышей сибирских популяций. Мы полагаем, что эволюция отдельных В-хромосом во многом определяется составом ДНК хромосом основного набора и других В-хромосом, наличием элементов, способных к транспозициям и амплификации. Практическое отсутствие в дальневосточных популяциях микро В-хромосом обусловлено, возможно, отсутствием в геноме животных этих популяций нуклеотидных последовательностей, амплификация которых приводит к формированию слабо конденсированных районов хромосом. В сибирских популяциях мышей В-хромосомы могут служить основным резервуаром этих последовательностей, так как их амплификация в А-хромосомах приводит, вероятно, к нарушению нормального функционирования значительного числа генов.

Высокая частота встречаемости В-хромосом у восточноазиатской лесной мыши предполагает существование механизма их поддержания и накопления. Данные по молекулярной организации В-хромосом не дают каких-либо аргументов в пользу позитивного естественного отбора их носителей. Более того, существуют значительные различия между В-хромосомами по составу ДНК их прицентромерных районов и хромосомных плеч.

К сожалению, в настоящее время опубликованы лишь отрывочные данные о поведении В-хромосом восточноазиатской лесной мыши в мейозе [19–23]. Тем не менее гипотеза о наличии мейотического драйва В-хромосом выглядит достаточно правдоподобной, если принять во внимание результаты изучения В-хромосом других видов животных [1]. В этом случае фантастический полиморфизм В-хромосом может рассматриваться как указание на то, что механизм такого хромосомного драйва базируется скорее на структурно-морфологических особенностях В-хромосомы, чем на составе ее ДНК. Вместе с тем В-хромосомы этого вида характеризуются не менее впечатляющим полиморфизмом по размеру, центромерному индексу и конденсации хроматина в митозе. Для выяснения механизмов поддержания их высокой частоты в природных популяциях необходимы дальнейшие исследования, которые, возможно, помогут также найти объяснение некоторым закономерностям наследования МХ человека.

Результаты изучения молекулярно-генетической организации В-хромосом восточноазиатской мыши из различных географических районов ее ареала позволили нам сделать ряд предположений.

1. В-хромосомы мышей из Западной Сибири и Дальнего Востока произошли из разных А-хромосом. В-хромосомы мышей дальневосточных популяций происходят, вероятно, из X- или/и Y-хромосомы, в то время как В-хромосомы мышей западносибирских популяций возникли, вероятно, из одной или нескольких аутосом. В-хромосомы мышей популяций Центральной Сибири представлены обоими типами В-хромосом и, возможно, хро-

и мосомами, возникшими в результате их взаимодействий.

2. Высокая частота возникновения малых сверхчисленных хромосом, представляющих собой предшественников В-хромосом, обусловлена присутствием горячих точек хромосомных перестроек в прицентромерных районах одной или нескольких А-хромосом. Хромосомы мышей из популяций Западной Сибири и Дальнего Востока отличаются по локализации горячих точек хромосомных перестроек в прицентромерных районах А-хромосом.

3. Способность малых сверхчисленных хромосом трансформироваться в В-хромосомы связана с содержанием в геноме мышей последовательностей, способных к транспозициям и амплификации.

4. В ряду поколений наследуются не только В-хромосомы, но и способность к их генерации.

5. В-хромосомы могут содержать полные копии различных генов, которые при формировании соответствующего окружения могут проявлять транскрипционную активность.

6. При определенных условиях возможна транспозиция последовательностей В-хромосом в А-хромосомы, и наоборот.

7. Слабый уровень конденсации в митозе некоторых районов В-хромосом мышей западносибирских популяций может быть связан либо с локализацией в них кластеров активно транскрибирующихся генов, либо с отсутствием в этих районах повторенных последовательностей, необходимых для нормальной конденсации хроматина в митозе. Отсутствие видимого влияния на фенотип носителя В-хромосом, включающих такие районы, делает более предпочтительным второе предположение.

8. Положительный драйв В-хромосом, вероятно, обусловлен не содержанием в них конкретных нуклеотидных последовательностей, а их общей структурно-морфологической организацией.

Организация А- и В-хромосом у саранчовых рода *Podisma*. Хромосомы некоторых видов саранчовых рода *Podisma* характеризуются фантастическим внутри- и межвидовым полиморфизмом, который включает В-хромосомы различных морфотипов, дополнительные С-гетерохроматиновые плечи и перичентрические инверсии [4, 24, 25]. В настоящей работе сделана попытка выяснения молекулярных основ формирования такого необычного для саранчовых внутри- и межвидового полиморфизма хромосом.

Саппорская кобылка (*Podisma sapporensis*). Хромосомные наборы *P. s. sapporensis* (различные природные популяции островов Хоккайдо и Кунашир), а также хромосомный полиморфизм в этих популяциях детально описаны ранее [24]. Стандартный хромосомный набор саппорской кобылки (*P. s. krylonensis* и популяций *P. s. sapporensis* запад-

ной части о. Хоккайдо) включает 22 акроцентрические аутосомы и одну (у самца $2n = 23, X0$), либо две (у самки $2n = 24, XX$) половые хромосомы. При этом подвид *P. s. krylonensis* отличается от *P. s. sapporensis* наличием перичентрической инверсии в X-хромосоме, приведшей к образованию субметацентрической X. Популяции *P. s. sapporensis* восточной части о. Хоккайдо и о. Кунашир принадлежат к XY хромосомной расе, возникшей в результате робертсоновской транслокации между первичной акроцентрической X и аутосомой пятой пары (самец $2n = 20 + \text{нео-X} + \text{нео-Y}$ /самка $2n = 20 + \text{нео-XX}$) [24]. Хромосомы *P. sapporensis* отличаются от хромосом большинства видов саранчовых дополнительным полиморфизмом по присутствию дополнительных С-гетерохроматиновых плеч.

К настоящему времени обнаружено семь морфотипов В-хромосом у *P. s. sapporensis*, встречающихся в популяциях, принадлежащих как к X0, так и к XY хромосомным расам [25]. У подвида *P. s. krylonensis* обнаружен единственный морфотип В-хромосом [4]. Различия морфотипов В-хромосом обоих подвидов заключались в числе, размере и вариантах чередования С-позитивных и С-негативных районов. В этом отношении они напоминали В-хромосомы плавающей кобылки *Euprepocnemis plorans* – наиболее интенсивно изучаемых В-хромосом саранчовых [26]. Однако FISH микродиссекционных ДНК-проб с В-хромосомами различных морфотипов у *P. sapporensis* показала принципиальные различия в организации В-хромосом этих видов. Микродиссекционная ДНК-проба одной из В-хромосом (PsapV1) с разной интенсивностью окрашивала районы исходной хромосомы (рис. 4). Уровень сигнала FISH в С-позитивных и С-негативных районах отличался в несколько раз. Такой вариант окрашивания хромосомы напоминал результаты FISH с хромосомами, в состав которых наряду с эухроматиновыми районами входят крупные С-гетерохроматиновые блоки, содержащие большое количество повторенных последовательностей. С целью проверки гипотезы о присутствии в составе В-хромосом *P. sapporensis* эухроматиновых районов использовали микродиссекционную ДНК-пробу, полученную из эухроматинового района мелкой аутосомы (EUR1) (рис. 4). Проведение FISH без супрессии гибридизации диспергированных повторенных последовательностей определило окрашивание всех эухроматиновых районов А-хромосом при отсутствии сигнала в их С-гетерохроматиновых районах. В В-хромосомах FISH этой ДНК-пробы окрасила большинство С-негативных районов. Исключение составили районы двух морфотипов В-хромосом. В-хромосомы одного из них были практически полностью С-негативными, но лишь относительно небольшой теломерный район показал сигнал, характерный для эухроматиновых районов А-хромосом, в то время как большая часть остальной хромосомы остава-

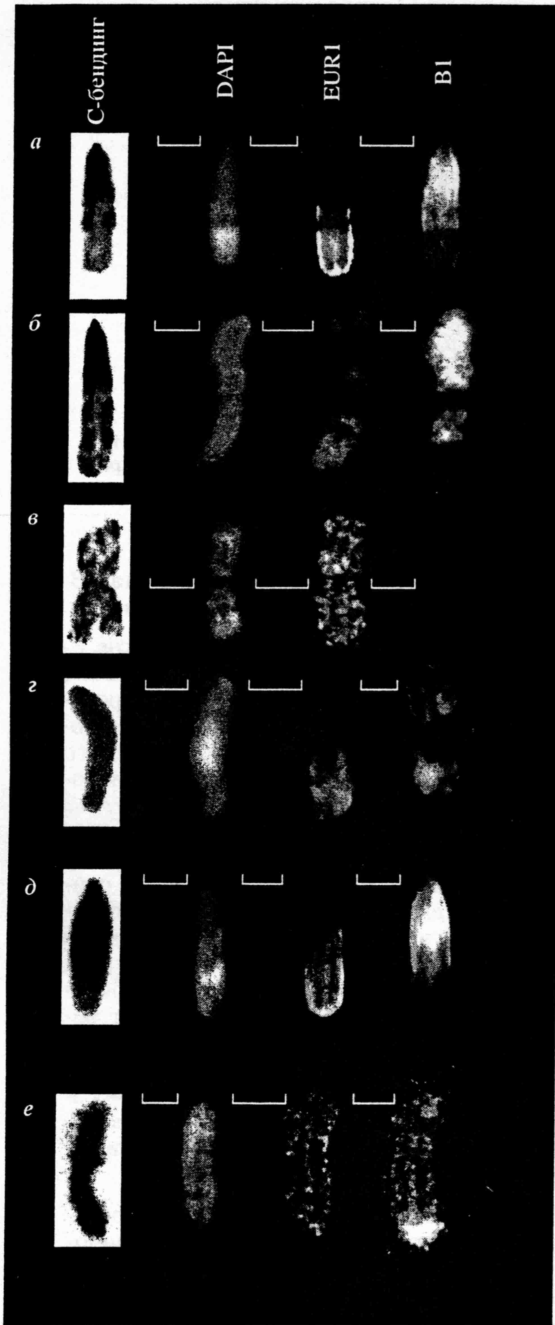


Рис. 4. Локализация повторенных последовательностей в В-хромосомах *P. sapporensis*. Приведены результаты С-бэндинга, окраски DAPI, FISH ДНК-пробы эухроматинового района (EUR1) и ДНК-пробы В-хромосомы *P. sapporensis* (BI) с В-хромосомами разных морфотипов *P. s. sapporensis* (а – морфотип В1; б – В2; в – В5iso; г – В7), В-хромосом *P. s. krylonensis* (д) и *P. kanoi* (е).

лась неокрашенной при использовании любой из имевшихся в нашем распоряжении ДНК-проб. Такой же тип окрашивания обнаружен для небольшого С-негативного района В-хромосом еще одного морфотипа (рис. 4). Для окончательного решения вопроса о происхождении “эухроматиновых” районов В-хромосом необходимо проведение супрессионной гибридизации *in situ* с хромосомспецифичными ДНК-пробами. К сожалению, мы не могли использовать этот подход из-за отсутствия достаточного количества ДНК саппорской кобылки. Завершение этих исследований требует сбора необходимого количества образцов, выделения ДНК и получения фракции повторяющихся последовательностей для проведения супрессионной гибридизации *in situ* с соответствующими ДНК-пробами.

Кобылка Кано (*P. kanoi*). Этот вид обладает типичным для рода *Podisma* хромосомным набором, включающим 22 акроцентрические аутосомы и одну (у самца $2n > = 23, X0$) либо две (у самки $2n = 24, XX$) половые хромосомы. К настоящему времени у кобылки Кано нами обнаружен только один морфотип В-хромосомы, акроцентрической с полностью С-позитивным плечом. FISH с использованием микродиссекционной ДНК-пробы В-хромосомы *P. kanoi* (PkanB1) интенсивно окрашивала саму В-хромосому. Кроме того, она давала точечные сигналы в прицентромерных районах А-хромосом, которые не распространялись на С-позитивные районы. Сигналы выявлены также в теломерных районах, по крайней мере, двух небольших аутосом (рис. 5).

Происхождение и эволюция В-хромосом в роде *Podisma*. Для сравнительного анализа В-хромосом двух видов рода *Podisma* проведена гетерологичная кросс-гибридизация ДНК-проб В-хромосом *P. kanoi* и *P. sapporensis* с хромосомами этих видов. FISH ДНК-пробы В-хромосомы *P. sapporensis* дала точечные сигналы в центромерном и теломерном районах В-хромосомы *P. kanoi*. Кроме этого, ДНК-проба интенсивно окрашивала прицентромерные С-блоки большинства А-хромосом (за исключением пары L1 и одной из мелких аутосом, где выявлены лишь точечные сигналы). Интенсивные сигналы FISH при использовании ДНК-пробы В-хромосомы *P. sapporensis* выявлены и в центромерном, и в теломерном районах Х-хромосомы, и в аутосоме M5. EUR1-проба, как и ожидалось, окрашивала только эухроматиновые районы хромосом. Сигнала FISH от EUR1-пробы на В-хромосоме *P. kanoi* не выявлено. В связи с этим особенно актуален анализ результатов гибридизации ДНК-пробы В-хромосомы *P. kanoi* с хромосомами *P. sapporensis*. Слабый, близкий к фоновому сигнал выявлен в большинстве районов А-хромосом *P. sapporensis*. В двух-трех небольших районах наблюдали незначительное усиление сигнала. Полученные данные позволяют заключить, что кластеры по-

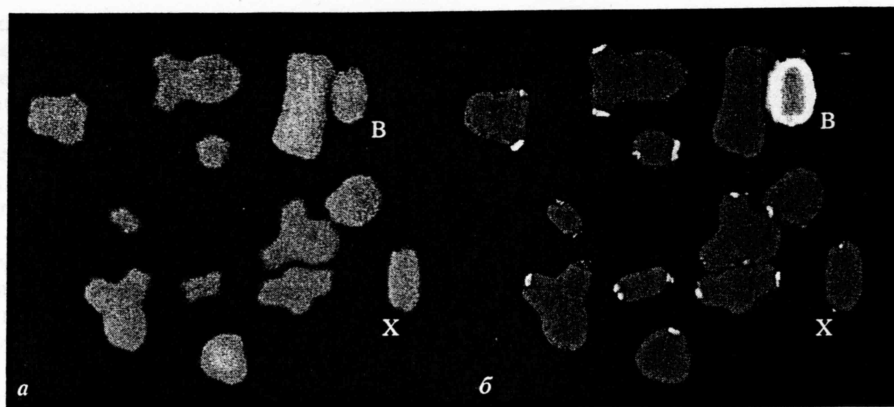


Рис. 5. Локализация повторенных последовательностей, гомологичных ДНК В-хромосомы *P. kanoi* в А-хромосомах этого вида. FISH ДНК-пробы В-хромосомы *P. kanoi* с мейотическими хромосомами *P. kanoi*. Метафазная пластинка, окрашенная DAPI (а), сигнал FISH микродиссекционной ДНК-пробы В-хромосомы *P. kanoi* (б) (серым показана локализация ДНК хромосом).

торенных последовательностей, обнаруженные в В-хромосоме *P. kanoi* с помощью FISH ДНК-пробы В-хромосомы *P. sapporensis*, не гомологичны основной массе повторов С-гетерохроматиновых районов А- и В-хромосом *P. sapporensis*. Вероятно, повторенные последовательности, выявляемые в хромосомах *P. kanoi* с помощью гибридизации ДНК-пробы В-хромосомы *P. sapporensis*, гомологичны одному или нескольким типам повторенных последовательностей, которые в виде диспергированных повторов присутствовали в хромосомах общего предка *P. sapporensis* и *P. kanoi*. После дивергенции, приведшей к формированию этих видов, повтор(ы) остался в диспергированном виде в хромосомах *P. sapporensis*, в то время как в некоторых районах хромосом *P. kanoi* произошла его амплификация. Вероятно, это достаточно распространенный сценарий эволюции повторенных последовательностей в хромосомах животных. Аналогичную картину мы наблюдали ранее, анализируя распределение гомологичных повторенных последовательностей в хромосомах двух видов мышей рода *Apodemus* [8].

Заметим, что гибридизация ДНК-пробы В-хромосомы *P. kanoi* дает точечные сигналы невысокой интенсивности в части прицентромерных и рителомерных районов А-хромосом этого вида. Если механизм возникновения этой В-хромосомы аналогичен механизму, предложенному для В-хромосом восточноазиатской лесной мыши, то следует признать, что исходная прото-В-хромосома была очень маленькой или потеряла большую часть своей ДНК в ходе дальнейшей эволюции. Основная же часть материала современной В-хромосомы возникла в результате амплификации единичных копий ДНК, присутствующих в прото-В-хро-

мосоме, или ДНК, интегрированных в состав В-хромосомы на более поздних этапах ее эволюции.

В отличие от В-хромосомы *P. kanoi* многие В-хромосомы *P. sapporensis* содержат протяженные С-негативные районы, которые, возможно, происходят из эухроматиновых районов одной из А-хромосом. К сожалению, строгие доказательства этого утверждения отсутствуют. Однако нельзя исключать, что выявление в В-хромосомах *P. sapporensis* С-негативных районов, содержащих диспергированные гомологичные повторенные последовательности, характерные для эухроматиновых районов в типичной для них концентрации, обусловлено расселением этих повторов в гетерохроматиновых районах В-хромосом, что привело к их позитивному окрашиванию FISH с EUR1-пробой и негативному С-окрашиванию. Ответ на этот вопрос можно получить, проведя супрессионную гибридизацию ДНК-пробы В-хромосомы *P. sapporensis* с А-хромосомами или ДНК-пробы хромосомы, содержащей районы, гомологичные "эухроматиновым" районам В-хромосомы, с соответствующей В-хромосомой.

Отличия распространения повторенных последовательностей в хромосомах этих видов саранчовых не ограничены В-хромосомами. Амплификация повторенных последовательностей, формирующих основные С-гетерохроматиновые районы В-хромосом *P. s. sapporensis*, имела место и в прицентромерных районах А-хромосом этого вида, что привело к возникновению дополнительных С-гетерохроматиновых плеч. Эта особенность А-хромосом *P. s. sapporensis* вместе с вероятным присутствием в В-хромосомах протяженных эухроматиновых районов заставляет нас рассмотреть другие механизмы возникновения В-хромосом у этого вида, которое невозможно удовлетворительно объ-

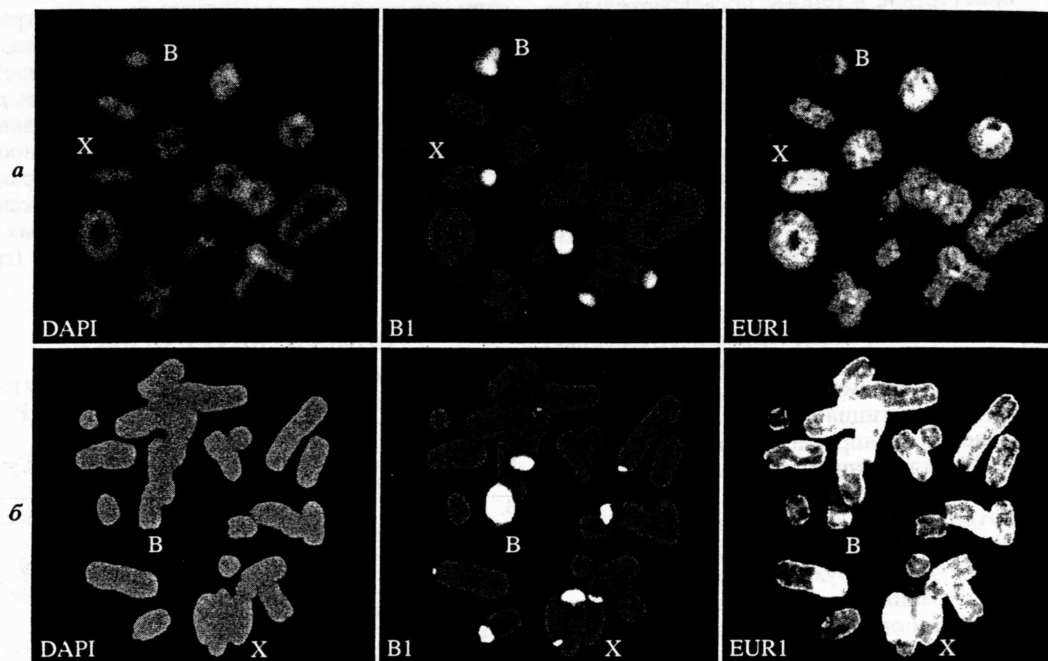


Рис. 6. Локализация повторенных последовательностей в А- и В-хромосомах *P. s. sapporensis* (ряд *a*) и *P. s. krylonensis* (ряд *б*). В каждом ряду слева представлена метафазная пластинка, окрашенная DAPI, далее сигналы FISH соответствующих ДНК-проб. FISH ДНК-пробы В-хромосомы *P. s. sapporensis* (B1) и ДНК-пробы эухроматинового района (EUR1) с мейотическими хромосомами *P. s. sapporensis* (*a*) и митотическими хромосомами *P. s. krylonensis* (*б*).

яснить с помощью гипотетического механизма, предложенного для возникновения В-хромосом восточноазиатской лесной мыши и кобылки Канно.

При сравнении состава А- и В-хромосом *P. sapporensis* бросается в глаза гомология нуклеотидных последовательностей С-позитивных областей большинства В-хромосом с районами С-гетерохроматина прицентромерных районов и дополнительных плеч аутосом. Это может быть обусловлено сходными механизмами их формирования в результате амплификации ДНК прицентромерных районов. Следует отметить некоторые различия хромосом *P. s. sapporensis* и *P. s. krylonensis*. FISH ДНК-пробы В-хромосомы *P. s. sapporensis* у этого подвида окрашивала все дополнительные С-гетерохроматиновые плечи аутосом и прицентромерный район Х-хромосомы, но не давала сигналов в прицентромерных С-позитивных блоках длинных плеч аутосом (рис. 6а). У *P. s. krylonensis* в А-хромосомах отсутствуют дополнительные С-гетерохроматиновые плечи, а прицентромерные С-позитивные блоки аутосом можно разделить на три группы. С-блоки аутосом первой группы не окрашиваются FISH ДНК-пробами В-хромосомы; вторая группа аутосом (пара L1 и одна из мелких пар аутосом) демонстрирует точечные сигналы в небольшой части С-блоков); третья группа вклю-

чает крупные С-позитивные блоки на двух парах аутосом среднего размера. Эти блоки, в отличие от аутосом второй группы, интенсивно окрашиваются FISH ДНК-пробой В-хромосомы. В субметацентрической Х-хромосоме зонд B1 окрашивает прицентромерный С-блок (рис. 6б). Таким образом, в хромосомах саппорской кобылки возможен разный характер распространения гомологичных повторенных последовательностей, и у разных подвидов реализованы его разные варианты.

Учитывая сказанное, мы предположили существование у этого вида иного, отличного от предложенного выше, механизма формирования В-хромосом: амплификация повторенных последовательностей в одной из Х хромосом привела к формированию прицентромерного С-гетерохроматинового блока, затем в результате внутривидовых транспозиций или инверсий кластеры повторенных последовательностей этого блока распространились по эухроматиновому плечу Х-хромосомы, что привело к инактивации некоторых генов и/или потери части эухроматиновых районов Х-хромосомы, оказавшихся между крупными кластерами повторенных последовательностей. Такие перестройки Х-хромосомы могли привести к трансформации кариотипа 24, XX, соответствующего самке, в кариотип 23, X0, + В, соответствующий самцу.

приводить к возникновению В-хромосом. Другая необходимая предпосылка формирования В-хромосом – присутствие в геноме последовательностей, способных к транспозициям и амплификации. Эти последовательности, вероятно, определяют не только возможность формирования В-хромосом, но и направление их дальнейшего развития.

Рассмотренный механизм формирования В-хромосом, по-видимому, один из наиболее распространенных. Однако следует признать, что он не может быть единственным. Некоторые из морфотипов В-хромосом саппорской кобылки, вероятно, содержат эухроматиновые районы и не образовались в результате хромосомных перестроек, прошедших по описанному выше сценарию. Большинство В-хромосом этого вида – акроцентрики с эухроматиновыми районами: крупным дистальным и небольшими интерстициальными, размер которых уменьшается в направлении от теломеры к центромере. Предложенный нами механизм формирования В-хромосом саппорской кобылки, возможно, работает лишь у ограниченного числа видов, так как в этом случае происходит поэтапная потеря или инактивация эухроматиновых районов Х-хромосомы. Возникающая анеуплоидия по ряду хромосомных районов в большинстве случаев, несомненно, должна сказаться на фенотипе носителя. Однако такие В-хромосомы могут играть в эволюции вида более значительную роль. Возможно, их эволюция может приводить к формированию у вида Y-хромосомы [33].

Вполне вероятно, что В-хромосомы разных видов – это сборная группа, в которую входят хромосомы различного происхождения и состава, по-разному проявляющие себя в геноме и имеющие различное значение для эволюции вида. Изучение В-хромосом, помимо самостоятельного значения как феномена формирования нового элемента кариотипа, может оказаться полезным в качестве модельной системы для изучения возникновения МХ человека, гомогенно окрашенных районов хромосом в малигнизированных клетках, а также создания векторных систем для генотерапии.

В последние годы в истории изучения В-хромосом начался новый этап, связанный с интенсивным изучением их молекулярной организации, включающий получение ДНК-библиотек и клонирование фрагментов ДНК В-хромосом. Результаты этих исследований позволят перейти от описания феноменологии к анализу конкретных молекулярных механизмов формирования и эволюции В-хромосом и, несомненно, внесут значимый вклад в развитие наших представлений о механизмах эволюции геномов эукариот.

Авторы выражают благодарность профессору А.В. Зеленину за проявленный интерес и плодотворное обсуждение.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (05-04-48221-а), Интеграционным проектом СО РАН № 48, Программой фундаментальных исследований Президиума РАН “Динамика генофондов растений, животных и человека” и “Исследование устойчивости, динамики биоразнообразия прошлого, оценка валидности палеонтологических расчетов биоразнообразия”, а также Научно-технической программой Минобразования РФ “Фундаментальные исследования высшей школы в области естественных и гуманитарных наук. Университеты России” (грант ур.07.01.210).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Camacho J.P., Sharbel T.F., Beukeboom L.W. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2000. V. 355. P. 163–178.
2. Palestis B.G., Trivers R., Burt A., Jones R.N. // *Cytogenet. Genome Res.* 2004. V. 106. P. 151–158.
3. Verma R.S., Babu A. *Human Chromosomes. Principles and Techniques.* N.Y.: McGraw-Hill, 1995.
4. Bugrov A.G., Karamysheva T.V., Rubtsov D.N., Andreenkova O.V., Rubtsov N.B. // *Cytogenet. Genome Res.* 2004. V. 106. P. 284–288.
5. Rubtsov N., Karamysheva T., Astakhova N., Liehr T., Claussen U., Zhdanova N. // *Cytogenet. Cell Genet.* 2000. V. 90. P. 268–270.
6. Rubtsov N.B., Karamysheva T.V., Andreenkova O.V., Bochkaev M.N., Kartavtseva I.V., Roslik G.V., Borisov Y.M. // *Cytogenet. Genome Res.* 2004. V. 106. P. 289–294.
7. Малыгин А.А., Грайффер Д.М., Зенкова М.А., Мамаев С.В., Карпова Г.Г. // *Молекуляр. биология.* 1992. Т. 26, № 2. С. 369–377.
8. Karamysheva T.V., Andreenkova O.V., Bochkaev M.N., Borisov Y.M., Bogdanchikova N., Borodin P.M., Rubtsov N.B. // *Cytogenet. Genome Res.* 2002. V. 96. P. 154–160.
9. Lichter P., Cremer T., Tang C.J., Watkins P.C., Manuelidis L., Ward D.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. P. 9664–9668.
10. Кармавцева И.В. *Кариосистематика лесных и полевых мышей (Rodentia: Muridae).* Владивосток: Дальнаука, 2002. 141 с.
11. Wright F.A., Lemon W.J., Zhao W.D., Sears R., Zhuo D., Wang J.P., Yang H.Y., Baer T., Stredney D., Spitzner J., Stutz A., Krahe R., Yuan B. // *Genome Biol.* 2001. V. 2. № 7. P. 1–18.
12. Рубцов Н.Б., Карамышева Т.В., Гайнер Т.А. // *Медицинская генетика.* 2003. Т. 2. № 6. С. 248–258.
13. Blennow E., Bui T.H., Kristoffersson U., Vujic M., Anneren G., Holmberg E., Nordenskjold M. // *Prenat. Diagn.* 1994. V. 14. № 11. P. 1019–1028.
14. Huang B., Crolla J.A., Christian S.L., Wolf-Ledbetter M.E., Macha M.E., Papenhausen P.N., Ledbetter D.H. // *Hum. Genet.* 1997. V. 99. № 1. P. 11–17.
15. Robinson W.P., Dutly F., Nicholls R.D., Bernasconi F., Penaherrera M., Michaelis R.C., Abeliovich D., Schinzel A.A. // *J. Med. Genet.* 1998. V. 35. P. 130–136.