

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ И ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СПАРИВАНИЯ И РЕКОМБИНАЦИИ ХРОМОСОМ В МЕЙОЗЕ ЧЕТЫРЕХ ВИДОВ ПОЛЕВОК РОДА *MICROTUS* (ARVICOLINAE, RODENTIA)

П.М. Бородин^{1,2}, Е.А. Башева¹, Ф.Н. Голенищев³, О.А. Дашкевич²,
И.Н. Картавцева⁴, М.А. Потапов⁵, Г.Р. Сакаева², А.А. Торгашева¹, Л.В. Фрисман^{4,6}

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: borodin@bionet.nsc.ru;

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

³ Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия;

⁴ Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток, Россия;

⁵ Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия;

⁶ Институт комплексного анализа региональных проблем ДВО РАН, Биробиджан, Россия

Целью данной работы был анализ спаривания и рекомбинации хромосом в мейозе у самцов 4 видов полевок рода *Microtus* (*M. tujanensis*, *M. maximowiczii*, *M. rossiaemeridionalis* и *M. gregalis*). Исследование было проведено на цитологических препаратах с использованием электронной и флуоресцентной микроскопии после иммуноокрашивания белка мисматч репарации MLH1, который надежно маркирует точки кроссинговера. Были обнаружены существенные межвидовые различия в частоте рекомбинации. Наиболее низкая частота кроссинговера обнаружена у *M. gregalis* ($17,7 \pm 0,2$ точек рекомбинации на клетку), наиболее высокая – у *M. rossiaemeridionalis* ($27,8 \pm 0,2$); *M. tujanensis* и *M. maximowiczii* продемонстрировали промежуточные значения ($21,9 \pm 0,1$ и $23,4 \pm 0,1$ соответственно). Исследованные виды также различались по характеру спаривания половых хромосом в мейозе. У *M. tujanensis* и *M. maximowiczii* X- и Y-хромосомы синаптировали и рекомбинировали в коротком псевдоаутосомном районе. У *M. rossiaemeridionalis* и *M. gregalis* половые хромосомы сближались на стадии зиготены, совместно перемещались на периферию, образуя половое тельце, но не вступали ни в синапсис, ни в рекомбинацию.

Ключевые слова: мейоз, хромосомы, синапсис, рекомбинация, *Microtus*.

Статья посвящается Ие Ивановне Кикнадзе, которая открыла для нас – ее студентов – удивительный мир живой клетки

Введение

По числу видов род серые полёвки *Microtus* Schrank (1798) является одним из самых многочисленных среди млекопитающих. Он включает около 65 видов, населяющих различные биотопы палеарктической и неарктической зоны (Wilson, Reeder, 2005). Процесс видообразования в пределах данного рода происходил,

по-видимому, очень быстро – в течение последних 500–700 тысяч лет (Chaline *et al.*, 1999). Он сопровождался значительной экологической, морфологической, кариотипической и молекулярно-генетической дивергенцией (Jaarola *et al.*, 2004). Благодаря этим особенностям род *Microtus* представляет собой крайне интересную модель для исследования процесса микро- и макроэволюции.

В данной работе мы попытались использовать эту модель для изучения эволюции синапсиса и рекомбинации хромосом в мейозе.

Возникновение, поддержание и эволюционная роль рекомбинации являются предметами жаркой дискуссии (Lenormand, Otto, 2000; Cooper, Przeworski, 2007). Особый интерес вызывают сравнительный анализ рекомбинационных характеристик геномов млекопитающих и выявление эволюционных факторов и молекулярных и клеточных механизмов, обеспечивающих эти различия. Одни авторы видят в этих различиях адаптивный смысл (Otto, Barton, 1997), другие считают их нейтральными (Dumont, Payseur, 2008). Однако качество данных, на которых базируются эти дискуссии, вызывает ряд сомнений.

1. Сравнительно-эволюционный анализ рекомбинации в основном базируется на данных, полученных при генетическом картировании. Такой подход часто дает смещенные оценки частоты рекомбинации. Длины генетических карт, оцененные по частоте кроссинговера между отдельными маркерами, могут быть как завышенными за счет суммирования коротких интервалов, так и заниженными за счет недостатка информативных маркеров.

2. Довольно большой объем данных для сравнительного анализа частот рекомбинации был накоплен при подсчете общего числа хиазм на стадии диакинеза–метафазы I мейоза. Эти данные, однако, базируются, как правило, на очень малом числе клеток и особей и часто ошибочны.

3. При анализе эволюции рекомбинации, как правило, используется случайный набор видов, не сбалансированный ни по происхождению, ни по экологии.

В настоящее время разработаны цитологические методы, которые позволяют надежно локализовать точки кроссинговера на пахитенных хромосомах млекопитающих. Эти методы базируются на использовании меченных флуорохромами антител к SCP3, белку боковых элементов синаптонемного комплекса, и MLH1, эукариотическому гомологу бактериального белка мисматч репарации. Было показано, что MLH1 входит в состав зрелых рекомбинационных узлов. Число и распределение точек локализации MLH1 в пахитенных клетках точно соответствуют числу и распределению хиазм в диакинезе

мейоза (Anderson *et al.*, 1999; Lynn *et al.*, 2002; Codina-Pascual *et al.*, 2006). Установлено, что частота рекомбинации между двумя сцепленными генами, оцененная на основе частоты точек локализации MLH1 между FISH-пробами к этим генам, совпадает с оценкой частоты кроссинговера между ними, полученной в генетическом эксперименте (Froenicke *et al.*, 2002).

Данный подход был успешно применен для анализа частоты и распределения точек кроссинговера у ряда видов млекопитающих: человека (Oliver-Bonet *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2005), мыши (Anderson *et al.*, 1999; Froenicke *et al.*, 2002), собаки (Basheva *et al.*, 2008), кошки (Borodin *et al.*, 2007), норки (Borodin *et al.*, 2009) и обыкновенной бурозубки (Borodin *et al.*, 2008).

Целью данной работы был анализ спаривания и рекомбинации хромосом в мейозе у самцов 4 видов полевок рода *Microtus* Schrank, 1798 (*M. mujanensis* Orlov et Kovalskaja, 1975, *M. maximowiczii* Schrenk, 1893, *M. rossiaemerdionalis* Ognev, 1924 (= *M. epiroticus* Ongrias, 1966; = *M. subarvalis* Mejer, Orlov, Skholl, 1972) и *M. gregalis* Pallas, 1778) с использованием иммунофлуоресцентной и электронной микроскопии. Данные виды относятся к разным филогенетическим линиям рода *Microtus*. Виды *M. mujanensis* и *M. maximowiczii* являются близкородственными видами подрода *Alexandromys* и принадлежат к азиатской филогенетической линии. *M. rossiaemerdionalis* является представителем большой группы видов-двойников, входящей в состав подрода *Microtus*. *M. gregalis* – единственный ныне живущий представитель подрода *Stenocranius*, азиатского по происхождению, и занимает базальное положение в роде *Microtus* (Wilson, Reeder, 2005).

Материалы и методы

В работе использованы следующие половозрелые животные: 4 самца *M. mujanensis* (рождены в виварии Зоологического института РАН от родителей, отловленных в Республике Бурятия в точке с координатами 56 °20'N, 114 °53'E), 1 самец *M. maximowiczii* (рожден в виварии Зоологического института РАН от родителей, отловленных в Забайкальском крае в точке с координатами 51 °40'N, 116 °47'E), 3 самца *M. rossiaemerdionalis* и 4 самца *M. gregalis*, от-

ловленных в Новосибирской области в точке с координатами 53 °44'N, 77 °52'E. Распластанные препараты сперматоцитов были приготовлены из семенников по методике Петерса с соавт. (Peters *et al.*, 1997). Препараты для электронно-микроскопического анализа окрашивали азотнокислым серебром (Howell, Black, 1980) и анализировали на микроскопе JEM100 (Jeol, Япония) при 80 кВ.

Окрашивание для иммунофлуоресцентного анализа проводили по методике Андерсон с соавт. (Anderson *et al.*, 1999). Препараты инкубировали 2 ч при 37 °С с поликлональными антителами кролика против белка боковых элементов СК SCP3 (Abcam, Великобритания) – при разведении 1 : 500, моноклональными антителами мыши против белка MLH1 (Abcam, Великобритания) – при разведении 1 : 50 и антителами человека против центромерных белков ACA (Antibodies Incorporated, 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 Vectashield с красителем DAPI (Vector Laboratories, США) 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 обеспечением для обработки изображений ISIS4 (MetaSystems GmbH, Германия).

Яркость и контраст изображений редактировали с использованием пакета PaintShopPro 7.0.

Для анализа отбирали ядра сперматоцитов на стадии пахитены, содержащие полные наборы полностью синаптированных аутосомных бивалентов и XY-бивалент. Учитывали количество сигналов MLH1 на каждом биваленте. Статистические расчеты производили с использованием пакета программ STATISTICA. Все данные в тексте и таблице представлены в виде средних значений и стандартных ошибок ($M \pm SE$).

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены микрофотографии распластанных препаратов сперматоцитов исследованных видов после иммуноокрашивания.

В табл. 1 приведены цитогенетические, рекомбинационные и синаптические характеристики исследованных видов. Оценки частоты рекомбинации получены на очень малых выборках. Однако ранее на других видах млекопитающих было показано, что индивидуальная вариация (Sun *et al.*, 2005) и межпопуляционные различия (Borodin *et al.*, 2008) по частоте кроссинговера пренебрежимо малы по сравнению с межвидовыми различиями (Dumont, Payseur, 2008).

Исследованные нами виды полевок различаются по частоте рекомбинации. Наиболее низкая частота кроссинговера обнаружена у *M. gregalis* ($17,7 \pm 0,2$ точек рекомбинации на клетку), наиболее высокая у *M. rossiaemeridionalis* ($27,8 \pm 0,2$). Два близкородственных вида, *M. mujanensis* и *M. maximowiczii*, продемонстрировали промежуточные значения ($21,9 \pm 0,1$ и $23,4 \pm 0,1$ соответственно). В целом среднее число рекомбинационных событий на геном у исследованных видов было пропорционально гаплоидному числу хромосом. У *M. gregalis* и *M. rossiaemeridionalis* эти два значения практически совпадали, а у *M. mujanensis* и *M. maximowiczii* число кроссоверов лишь незначительно превышало гаплоидное число хромосом. Примечательно, что у всех видов число рекомбинационных событий на геном было несколько ниже гаплоидного числа плеч аутосом. Это еще раз показывает, что распространенное мнение о необходимости наличия хотя бы одной хиазмы на плечо не подтверждается фактами, по крайней мере на млекопитающих. Довольно высокий про-

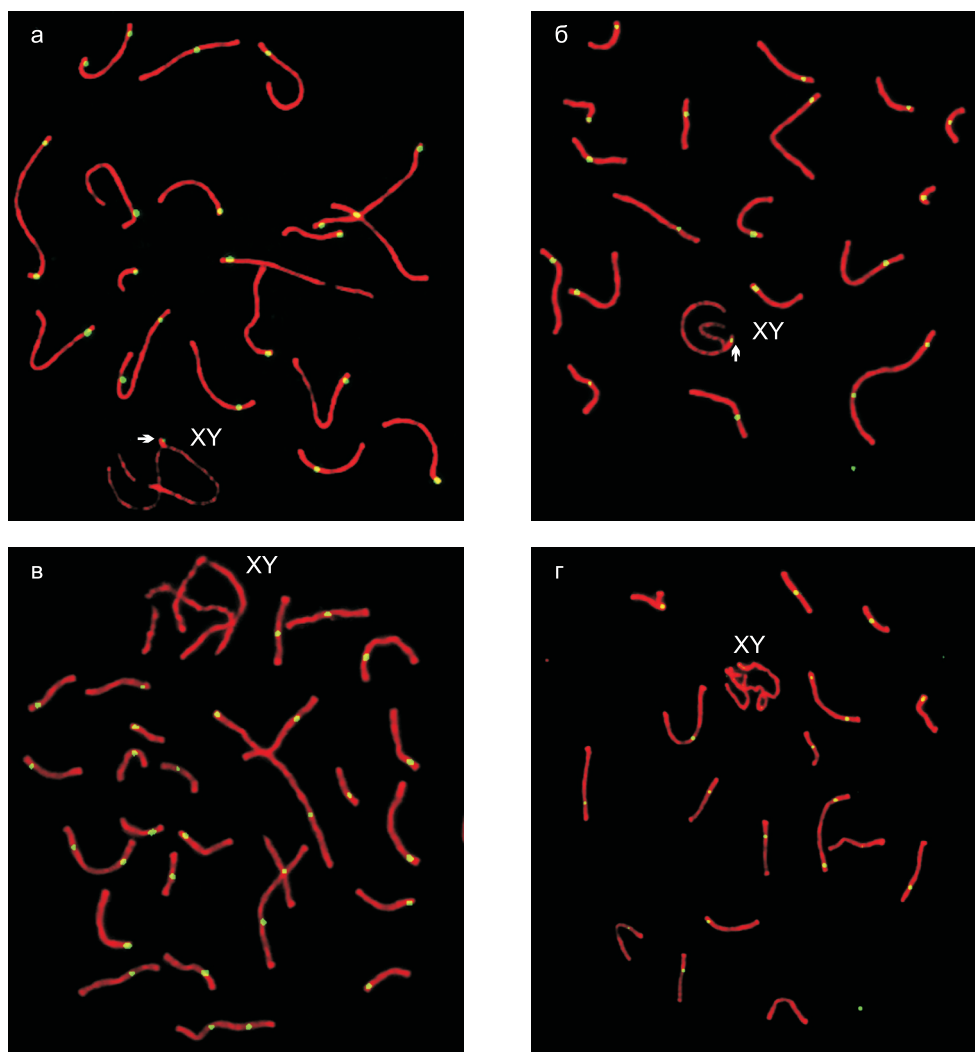


Рис. 1. Микрофотографии распластанных препаратов сперматоцитов исследованных видов после иммуноокрашивания с использованием антител к белкам SCP3 (красный сигнал) и MLH1 (зеленый сигнал).

Стрелками показаны точки связывания MLH1 в районе спаривания полового бивалента. а – *M. mujanensis*; б – *M. maximowiczii*; в – *M. rossiaemeridionalis*; г – *M. gregalis*.

цент безобменных плеч был обнаружен при анализе рекомбинации у обыкновенной бурозубки и человека (Sun *et al.*, 2006; Borodin *et al.*, 2008).

Близкое совпадение числа рекомбинационных событий на геном и гаплоидного числа хромосом у исследованных видов показывает, что функция рекомбинации у полевок 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 полному прекращению кроссинговера в псевдоаутосомном районе половых хромосом у ряда видов рода *Microtus*.

У *M. mujanensis* и *M. maximowiczii* мы наблюдали нормальный синапсис X- и Y-хромосом (рис. 2, а). Они сближались в зиготене, образовывали синаптонемный комплекс между дистальным прителомерным районом X-хромосомы и всем коротким плечом Y-хромосомы. Хотя размер района спаривания был очень мал у обоих видов ($0,70 \pm 0,01$ мкм и $0,53 \pm 0,01$ мкм у *M. mujanensis* и *M. maximowiczii* соответствен-

Таблица 1

Цитогенетические, рекомбинационные и синаптические характеристики
4 видов рода *Microtus*

Вид	№ животных	№ клеток		Гаплоидное число хромосом	Гаплоидное число плеч аутосом	Среднее (M ± SE) число сайтов связывания MLH1 на ядро	Доля клеток, содержащих синаптированные X- и Y-хромосомы
		ЭМ ¹	ИМ ²				
<i>M. gregalis</i>	4	70	45	18	25	17,7 ± 0,2	0
<i>M. rossiaemeridionalis</i>	3	70	65	27	27	27,8 ± 0,2	0
<i>M. maximowiczii</i>	1	50	204	21	27	21,9 ± 0,1	0,94
<i>M. mujanensis</i>	4	100	229	19	24	23,4 ± 0,1	0,96

¹ ЭМ – электронная микроскопия; ² ИМ – иммунофлуоресцентная микроскопия.



Рис. 2. Электронные микрофотографии половых хромосом в пахитенных ядрах.

M. mujanensis (а) и *M. gregalis* (б). Окрашивание азотно-кислым серебром.

но), в нем в 70–80 % клеток мы наблюдали одиночные сигналы MLH1 (рис. 1, а, б). У обоих видов точки связывания MLH1 в районе спаривания X- и Y-хромосом возникали в ранней пахитене и исчезали в течение средней пахитены, в то время как на аутосомных бивалентах сигналы обнаруживались до наступления диплотены. Сходная асинхронность между аутосомными и половыми бивалентами в связывании MLH1 была обнаружена на мыши (Anderson *et al.*, 1999). По этой причине мы наблюдали сигналы MLH1 в районе спаривания половых хромосом не во всех исследованных клетках.

У *M. gregalis* и *M. rossiaemeridionalis* половые хромосомы сближались на стадии зиготены, сов-

местно перемещались на периферию, образуя половое тельце, но не вступали ни в синапсис, ни в рекомбинацию (рис. 1, в, г, рис. 2, б).

Ранее регулярный асинапсис половых хромосом в профазе мужского мейоза был обнаружен у многих других видов рода *Microtus*: у всех исследованных представителей подродов *Microtus sensu stricto* (включая *M. rossiaemeridionalis* и родственные виды), *Agricola* и *Terricola* (Ashley *et al.*, 1989; Carnero *et al.*, 1991; Jimenez *et al.*, 1991; Ashley, Fredga, 1994; Borodin *et al.*, 1995; Megias-Nogales *et al.*, 2003). Было показано, что у данных видов существует ахиазматический механизм сегрегации половых хромосом у самцов (Fuente *et al.*, 2007). Некоторое время считалось, что это свойство всего рода *Microtus*. Однако затем было показано, что у самцов *M. oeconomus* и двух родственных видов, принадлежащих к азиатской филогенетической линии, наблюдается нормальный синапсис половых хромосом (Ashley, Fredga, 1994; Borodin *et al.*, 1995; Borodin *et al.*, 1997; Mekada *et al.*, 2001), хотя оставалось неизвестным, происходит ли при этом рекомбинация. Исследованные нами *M. mujanensis* и *M. maximowiczii* также принадлежат к данной линии (Jaarola *et al.*, 2004), и поэтому неудивительно, что мы обнаружили у них нормальное спаривание X- и Y-хромосом. Более того, мы показали, что у данных видов половые хромосомы рекомбинируют в районе спаривания.

Этот факт можно было бы рассматривать как подтверждение высказанной нами ранее гипотезы о том, что нормальный синапсис, присущий полевкам азиатской филогенетической линии,

является предковым свойством, а утрата этого свойства произошла у общего предка всех остальных представителей рода *Microtus* (Borodin *et al.*, 1995; Borodin *et al.*, 1997).

Однако обнаружение асинопсиса у *M. gregalis* ставит эту гипотезу под сомнение. Большинство специалистов полагают, что данный вид занимает базальное положение в роде *Microtus* (Jaarola *et al.*, 2004). Более того, среди неарктических представителей рода *Microtus* нами недавно были обнаружены как «синаптические», так и «асинаптические» виды. Это заставляет нас отказаться от гипотезы об однократном, монофилетическом возникновении асинопсиса половых хромосом у «асинаптических» видов рода *Microtus*. По-видимому, механизм нерекombинационного сближения и ахиазматического расхождения X- и Y-хромосом возник у общего предка целой группы родов подсемейства Arvicolinae. Это создало предпосылки для дальнейшей утраты синапсиса половых хромосом у отдельных представителей данного подсемейства.

Благодарности

Авторы признательны Центру коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН за предоставление доступа к микроскопическому оборудованию. Работа выполнена при финансовой поддержке программы интеграционных исследований СО РАН и ДВО РАН, Российского фонда фундаментальных исследований, программ РАН «Происхождение и эволюция биосферы» и «Биоразнообразие и динамика генофондов человека, животных, растений и микроорганизмов» и федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России».

Литература

- Anderson L.K., Reeves A., Webb L.M. *et al.* Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein // *Genetics*. 1999. V. 151. P. 1569–1579.
- 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. V. 120. P. 105–111.
- Ashley T., Jaarola M., Fredga K. Absence of synapsis during pachynema of the normal sized sex chromosomes of *Microtus arvalis* // *Hereditas*. 1989. V. 111. P. 295–304.
- 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. V. 16. P. 709–719.
- Borodin P.M., Basheva E.A., Zhelezova A.I. Immunocytological analysis of meiotic recombination in the American mink (*Mustela vison*) // *Anim. Genet.* 2009. V. 40. P. 235–238.
- Borodin P.M., Karamysheva T.V., Belonogova N.M. *et al.* Recombination map of the common shrew, *Sorex araneus* (Eulipotyphla, Mammalia) // *Genetics*. 2008. V. 178. P. 621–632.
- Borodin P.M., Karamysheva T.V., Rubtsov N.B. Immunofluorescent analysis of meiotic recombination and interference in the domestic cat // *Cell and Tissue Biol.* 2007. V. 1. P. 503–507.
- Borodin P.M., Rogatcheva M.B., Koyasu K. *et al.* Pattern of X-Y chromosome pairing in the Japanese field vole, *Microtus montebelli* // *Genome*. 1997. V. 40. P. 829–833.
- Borodin P.M., Sablina O.V., Rodionova M.I. Pattern of X-Y chromosome pairing in microtine rodents // *Hereditas*. 1995. V. 123. P. 17–23.
- Carnero A., Jimenez R., Burgos M. *et al.* Achiasmatic sex chromosomes in *Pitymys duodecimcostatus*: mechanisms of association and segregation // *Cytogenet. Cell Genet.* 1991. V. 56. P. 78–81.
- Chaline J., Brunet-Lecomte P., Montuire S. *et al.* Anatomy of the arvicoline radiation (Rodentia): palaeogeographical, palaeoecological history and evolutionary data // *Ann. Zool. Fenn.* 1999. V. 36. P. 239–267.
- Codina-Pascual M., Campillo M., Kraus J. *et al.* Crossover frequency and synaptonemal complex length: their variability and effects on human male meiosis // *Mol. Hum. Reprod.* 2006. V. 12. P. 123–133.
- Coop G., Przeworski M. An evolutionary view of human recombination // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 8. P. 23–34.
- Dumont B.L., Payseur B.A. Evolution of the genomic rate of recombination in mammals // *Evolution*. 2008. V. 62. P. 276–294.
- Fuente R. de la, Parra M.T., Viera A. *et al.* Meiotic pairing and segregation of achiasmate sex chromosomes in eutherian mammals: the role of SYCP3 protein // *PLoS Genet.* 2007. V. 3. P. e198.
- Froenicke L., Anderson L.K., Wienberg J. *et al.* Male mouse recombination maps for each autosome identified by chromosome painting // *Amer. J. Hum. Genet.* 2002. V. 71. P. 1353–1368.
- Howell W.M., Black D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method // *Experientia*. 1980. V. 36. P. 1014–1015.

- Jaarola M., Martinkova N., Gunduz I. *et al.* Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2004. V. 33. P. 647–663.
- Jimenez R., Carnero A., Burgos M. *et al.* Achiasmatic giant sex chromosomes in the vole *Microtus cabreriae* (Rodentia, Microtidae) // *Cytogenet. Cell Genet.* 1991. V. 57. P. 56–58.
- Lenormand T., Otto S.P. The evolution of recombination in a heterogeneous environment // *Genetics.* 2000. V. 156. P. 423–438.
- Lynn A., Koehler K.E., Judis L. *et al.* Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates // *Science.* 2002. V. 296. P. 2222–2225.
- Megias-Nogales B., Marchal J.A., Acosta M.J. *et al.* Sex chromosomes pairing in two Arvicolidae species: *Microtus nivalis* and *Arvicola sapidus* // *Hereditas.* 2003. V. 138. P. 114–121.
- Mekada K., Harada M., Lin L.K. *et al.* Pattern of X-Y chromosome pairing in the Taiwan vole, *Microtus kikuchii* // *Genome.* 2001. V. 44. P. 27–31.
- Oliver-Bonet M., Turek P.J., Sun F. *et al.* Temporal progression of recombination in human males // *Mol. Hum. Reprod.* 2005. V. 11. P. 517–522.
- Otto S.P., Barton N.H. The evolution of recombination: removing the limits to natural selection // *Genetics.* 1997. V. 147. P. 879–906.
- Peters A.H., Plug A.W., van Vugt M.J. *et al.* A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline // *Chromosome Res.* 1997. V. 5. P. 66–68.
- Sun F., Oliver-Bonet M., Liehr T. *et al.* Variation in MLH1 distribution in recombination maps for individual chromosomes from human males // *Hum. Mol. Genet.* 2006. V. 15. P. 2376–2391.
- Sun F., Trpkov K., Rademaker A. *et al.* Variation in meiotic recombination frequencies among human males // *Hum. Genet.* 2005. V. 116. P. 172–178.
- Wilson D.E., Reeder D.M. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. Baltimore: Johns Hopkins Univ. Press, 2005. In 2 vol. (XXXV, 2142 p.).

IMMUNOFLUORESCENCE AND ELECTRON MICROSCOPIC ANALYSIS OF MEIOTIC CHROMOSOME PAIRING AND RECOMBINATION IN FOUR SPECIES OF VOLES (GENUS *MICROTUS*; ARVICOLINAE, RODENTIA)

P.M. Borodin^{1,2}, E.A. Basheva¹, F.N. Golenishev³, O.A. Dashkevich², I.N. Kartavtseva⁴, M.A. Potapov⁵, G.R. Sakaeva², A.A. Torgasheva¹, L.V. Frisman^{4,6}

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: borodin@bionet.nsc.ru;

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;

³ Zoological Institute RAS, Sankt-Petersburg, Russia;

⁴ Institute of Biology and Soil Science FEB RAS, Vladivostok, Russia;

⁵ Institute of Systematics and Ecology of Animals, SB RAS, Novosibirsk, Russia;

⁶ Institute of Complex Analysis of Regional Problems FEB RAS, Birobidzhan, Russia

Summary

Chromosome pairing and recombination in male meiosis were analyzed by immunofluorescence and electron microscopy in four species of voles of the genus *Microtus* (*M. mujanensis*, *M. maximowiczii*, *M. rossiaemeridionalis* и *M. gregalis*). The study was carried out in cytological smears using immunofluorescence staining of the mismatch repair protein (MLH1), which reliably marks recombination sites. Significant interspecies differences in recombination rate were observed. The lowest recombination frequency was detected in *M. gregalis* (17,7 ± 0,2 recombination sites per cell) and the highest, in *M. rossiaemeridionalis* (27,8 ± 0,2), *Microtus mujanensis* and *M. maximowiczii* showed intermediate values: 21,9 ± 0,1 and 23,4 ± 0,1, respectively. The species studied also differed in the pattern of sex chromosome pairing in meiosis. The X and Y chromosomes of *M. mujanensis* и *M. maximowiczii* paired and recombined in a short pseudo-autosomal region. The sex chromosomes of *M. rossiaemeridionalis* and *M. gregalis* aligned at zygotene; moved together at the nuclear periphery, forming a sex vesicle; but neither paired nor recombined.

Key words: meiosis, chromosomes, synapsis, recombination, *Microtus*.

АНАЛИЗ *IN SILICO* СТРУКТУРНОЙ ОСНОВЫ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ РАЗЛИЧИЙ СОМАТИЧЕСКИХ И МЕЙОТИЧЕСКИХ ФОРМ КОГЕЗИНОВ SCC3/SA/STAG

Т.М. Гришаева, С.Я. Дадашев, Ю.Ф. Богданов

Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
Москва, Россия, e-mail: tmgrishaeva@rambler.ru

Методами биоинформатики проведено сравнительное исследование белков когезинового комплекса 10 видов организмов, используемых в качестве модельных для изучения молекулярных механизмов митоза и мейоза. Эти белки скрепляют сестринские хроматиды после репликации ДНК, они частично различаются в соматических (SCC3, SA1/2, STAG1/2) и генеративных (REC11, STAG3) клетках, делящихся путем митоза и мейоза, и играют существенную роль в различиях механизмов этих типов клеточного деления.

Обе соматические формы стромалинов млекопитающих – STAG1 и STAG2 – отличаются друг от друга и от мейотического паралога STAG3 по всем изученным параметрам, особенно по вторичной структуре. Для выполнения добавочных функций в мейозе когезиновые белки STAG3 приобретают структурные особенности в N- и C-концевых участках молекулы, что отличает их от ранее изученных нами мейотических когезинов REC8.

Ключевые слова: эукариоты, мейоз, когезиновые белки SCC3/SA/STAG, консервативные мотивы, анализ *in silico*.

Введение

Важным процессом, предшествующим любому клеточному делению (митозу или мейозу), является возникновение тесной связи (когезии) между сестринскими хроматидами. Когезия необходима для удержания сестринских хроматид на экваторе веретена во время метафазы и для правильной ориентации и расхождения хромосом (Samara *et al.*, 2000; Haering *et al.*, 2002; Revenkova, Jessberger, 2005, 2006; Valdeolmillos *et al.*, 2007). Когезия сестринских хроматид формируется с участием мультипротеиновых комплексов – когезинов. В функции когезинов входят также поддержание рекомбинационной репарации и обеспечение целостности хромосом при облучении ионизирующей радиацией (Valdeolmillos *et al.*, 2007).

В установлении когезии участвует 14 разных белков (Jones, Sgouros, 2001). Ядро когезинового комплекса составляют четыре белка: SMC1, SMC3, SCC1 (называемый также RAD21) и SCC3. Ортологи SCC3 называются стромали-

нами (Stromalin antigen protein SA или STAG) (Pezzi *et al.*, 2000). У всех изученных позвоночных и у дрозофилы имеется по два и более представителя стромалинов.

В профазе I мейоза белки когезинового сердечника («кора») хромосом служат каркасом для «монтажа» на них белков рекомбинации и специфичных для мейоза белков синаптонемного комплекса (Pelttari *et al.*, 2001; Eijpe *et al.*, 2003). Часть когезиновых белков является общей для митоза и мейоза. Другая часть заменяется в мейозе сходными, но не идентичными белками-паралогами (Revenkova, Jessberger, 2005, 2006). У дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* вместо SCC3 в мейозе появляется REC11, у млекопитающих вместо STAG1 и STAG2 появляется STAG3. Белки SCC3/STAG охарактеризованы не так подробно, как, например, SMC. Изучена сравнительная локализация SA/STAG на хромосомах (Prieto *et al.*, 2001; Kitajima *et al.*, 2003; Chelysheva *et al.*, 2005; Revenkova, Jessberger, 2005, 2006; Valdeolmillos *et al.*, 2007). Результаты молекулярного анализа описаны в очень

немногих работах (Pezzi *et al.*, 2000; Lara-Pezzi *et al.*, 2004). Отмечены сходство первичной структуры белков STAG в области N- и C-концевых доменов и наличие двух сигналов ядерной локализации (NLS_BP) (Losada *et al.*, 2000; Jones, Sgouros, 2001; Haering *et al.*, 2002). Лишь немногие исследователи уделили должное внимание весьма интересному факту – наличию двух соматических форм стромалинов у позвоночных и немногих беспозвоночных животных (Losada *et al.*, 2000; Samara *et al.*, 2000), однако до сих пор не было ясно, в чем различие их структуры и функции, а также в чем отличие этих форм от мейотического паралога.

Мы ранее сравнили *in silico* другие компоненты когезинового комплекса – RAD21 и REC8 (паралоги SCC1) (Гришаева и др., 2007). В ходе этого исследования мы выявили, что мейотический белок REC8 у всех изученных нами объектов, от дрожжей до человека, отличается от своего соматического паралога большим разнообразием мотивов даже внутри функционального когезинового домена. По-видимому, белок REC8 является эволюционно более молодым.

В настоящем исследовании мы поставили задачу найти структурную основу функциональных различий мейотической и двух соматических форм когезинового белка STAG у млекопитающих. Но прежде чем сравнивать мейотические формы STAG с соматическими, необходимо понять, насколько сильно отличаются друг от друга сами соматические когезины. Мейотические формы выявлены только у млекопитающих, а соматические (SSC3/SA – ортологи STAG1/2) известны у широкого круга объектов. Для сравнительного анализа соматических когезинов мы выбрали 10 модельных объектов, от дрожжей до человека, представляющих разные таксоны эукариот. С помощью трех методов биоинформатики мы сначала исследовали консервативность когезиновых белков SSC3/SA/STAG, а затем, основываясь на полученной информации, сравнивали соматические и мейотические формы STAG у млекопитающих.

Материалы и методы

В работе были использованы база данных и программное обеспечение NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): NCBI BLAST – для поиска

гомологичных аминокислотных последовательностей в протеомах изучаемых организмов и NCBI CDART (Conserved Domain Architecture Tool) – для выявления функциональных доменов белков. Для того чтобы определить набор и последовательность консервативных мотивов в белковых молекулах, использовали программу MEME (Multiple Em for Motif Elicitation, <http://meme.sdsc.edu/meme/website/intro.html>). Рисунок, суммирующий результаты работы программы MEME, схематичен, поскольку длина мотивов на рисунке лишь приблизительно отражает их истинные размеры (в условных единицах). На рис. 1 и 2 одни и те же мотивы обозначены разными цифрами, поскольку получены в ответ на запросы в разное время.

Для изучения распределения статического электрического заряда вдоль молекул когезиновых белков была привлечена программа «Mobile portal – charge» из пакета Mobile Pasteur (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/MobylePortal/portal.py?form=charge/>). Параметры: ширина окна – 25, остальные – по умолчанию. Вероятность формирования α -спиральной вторичной структуры (coiled coil) аминокислотными последовательностями изучаемых белков оценивали с помощью программы «COILS – Prediction of Coiled Coil Regions in Proteins» (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html). Параметры: ширина окна – 28, остальные – по умолчанию.

Нами были исследованы компоненты мейотического когезинового комплекса млекопитающих – STAG3 (табл.). Для каждого вида в базе данных содержались сведения лишь об одном белке. Был также исследован их аналог у дрожжей *S. pombe* – Rec11 Sp. Для сравнения были изучены белки соматического когезинового комплекса тех же видов, являющиеся ортологами STAG3 – SA1 и SA2, STAG1 и STAG2, а также Psc3 (далее SCC3 Sp) дрожжей *S. pombe*.

Для позвоночных в базе данных аннотировано от 2 до 11 изоформ каждого белка. Из них мы отобрали для дальнейшего анализа полноразмерные копии. У быка *Bos taurus* не была аннотирована полноразмерная форма SA1. Наш поиск ортологов человеческого стромалина в протеоме *Bos taurus* также не дал результата, поэтому в дальнейшем исследовании была ис-

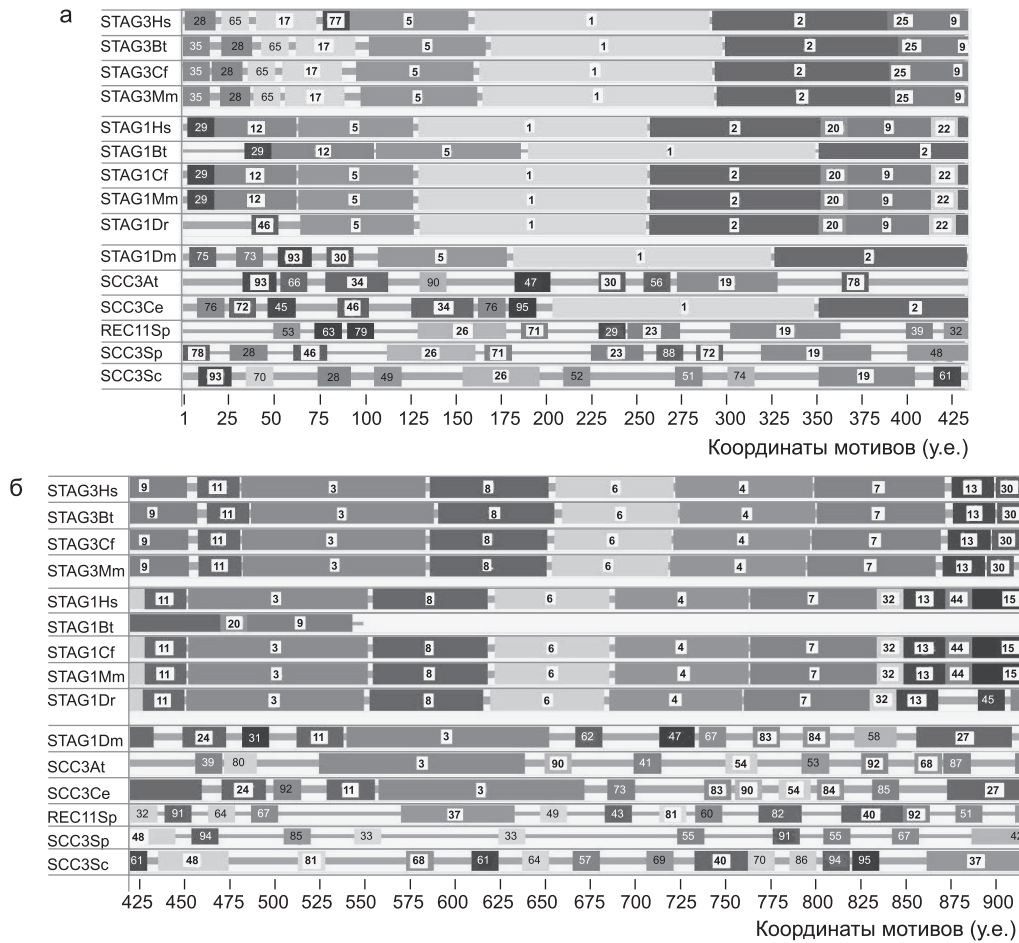


Рис. 1. Консервативные мотивы в N- и C-половинах (а и б соответственно) молекул когезиновых белков эукариот: дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* (Sp), дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), нематоды *Caenorhabditis elegans* (Ce), растения *Arabidopsis thaliana* (At), насекомого *Drosophila melanogaster* (Dm), рыбы *Danio rerio* (Dr) и млекопитающих – мыши *Mus musculus* (Mm), собаки *Canis lupus familiaris* (Cf), быка *Bos taurus* (Bt), человека *Homo sapiens* (Hs).

У.е. – условные единицы длины, использованные программой MEME. Выделены номера повторяющихся мотивов.

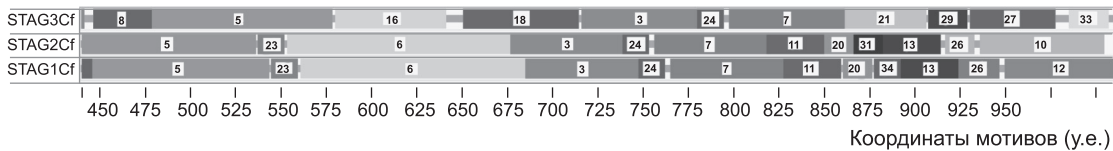


Рис. 2. Консервативные мотивы в C-концевых фрагментах когезинов млекопитающих – соматических STAG1/2 и мейотического STAG3 – на примере собаки *C. lupus familiaris* (Cf).

пользована укороченная изоформа STAG1-1 Bt. Мы исследовали также белки SCC3 ряда модельных объектов: *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* (STAG1 Dm) и рыбы

Danio rerio (STAG1 Dr). Кроме того, в протеомах дрозофилы и рыбы мы обнаружили изоформы SA, отличные от соматических (см. табл.), и предположили, что они могут быть ортологами STAG3 млекопитающих.

Таблица

Исследованные компоненты когезинового комплекса:
соматические SCC3/STAG1/STAG2 и мейотические REC11 и STAG3

Объект	Обозначение белка	ID белка (NCBI)	Аннотация NCBI	Размер (аминокислотные остатки)
<i>S. cerevisiae</i>	SCC3 Sc	EDN61467	Субъединица когезинового комплекса	1150
<i>S. pombe</i>	SCC3 Sp	o13816	Субъединица когезина psc3 (гомолог SCC3)	962
<i>S. pombe</i>	REC11 Sp	AAC49663	Rec11	923
<i>C. elegans</i>	SCC3 Ce	NP_506193	SCC дрожжей (субъединица митотического конденсина), член семейства гомологов (scc-3)	1096
<i>A. thaliana</i>	SCC3 At	NP_566119	SCC3 (белок 3 когезии сестринских хроматид)	1098
<i>D. melanogaster</i>	STAG1 Dm	CAA74654	Ядерный белок SA	1116
<i>D. melanogaster</i>	STAG2 Dm	NP_001097473	Стромалин-2 CG13916-PB, изоформа B	949
<i>D. melanogaster</i>	STAG3 Dm	NP_477268	Стромалин CG3423-PA	1127
<i>D. rerio</i>	STAG1 Dr	XP_692120	Предсказанный: похожий на стромальный антиген 1	1266
<i>D. rerio</i>	STAG2 Dr	XP_686812	Предсказанный: похожий на стромальный антиген 2, изоформа 2	1269
<i>D. rerio</i>	STAG3 Dr	CAQ13493	Новый белок, похожий на стромальный антиген 1 позвоночных (STAG1)	1251
<i>M. musculus</i>	STAG1 Mm	NP_033308	Стромальный антиген 1	1258
<i>M. musculus</i>	STAG2 Mm	CAM20006	Стромальный антиген 2	1268
<i>M. musculus</i>	STAG3 Mm	CAA06669	stag3	1240
<i>C. lupus familiaris</i>	STAG1 Cf	XP_542794	Предсказанный: похожий на стромальный антиген 1, изоформа 1	1258
<i>C. lupus familiaris</i>	STAG2 Cf	XP_549232	Предсказанный: похожий на стромальный антиген 2, изоформа 2	1268
<i>C. lupus familiaris</i>	STAG3 Cf	XP_546960	Предсказанный: похожий на стромальный антиген 3	1234
<i>B. taurus</i>	STAG1 Bt	XP_612779	Предсказанный: похожий на ядерный белок SA-1, неполный	546
<i>B. taurus</i>	STAG2 Bt	XP_001249706	Предсказанный: похожий на стромальный антиген 2, изоформа 1	1268
<i>B. taurus</i>	STAG3 Bt	XP_593416	Предсказанный: похожий на стромальный антиген 3	1240
<i>H. sapiens</i>	STAG1 Hs	NP_005853	Стромальный антиген 1	1258
<i>H. sapiens</i>	STAG2 Hs	CAI40991	Стромальный антиген 2	1268
<i>H. sapiens</i>	STAG3 Hs	CAB59367	Стромальный антиген 3 (STAG3)	1225

Результаты

Различие мейотической и двух соматических форм когезинов STAG по набору и последовательности консервативных мотивов

Прежде чем сравнивать мейотические и соматические формы стромалинов, мы должны были понять, насколько консервативны эти белки в ряду модельных объектов от дрожжей до человека. Для всесторонней оценки когезинов SCC3/SA/STAG мы использовали три параметра (см. раздел «Материалы и методы»).

У всех изученных нами когезиновых белков присутствовал когезиновый функциональный домен (у низших эукариот – IRR1, у других организмов – как этот домен, так и меньший по размеру домен STAG). При исследовании набора и последовательности консервативных мотивов внутри домена IRR1 с помощью программы MEME мы обнаружили, что у дрожжей, арабидопсиса и нематоды нет никакого сходства по набору консервативных мотивов с другими объектами. У дрозофилы и позвоночных выявлен одинаковый набор мотивов. Он одинаков для всех белков STAG, в том числе мейотических, что важно для ответа на вопрос, поставленный в данной работе (см. Введение). Таким образом, по набору консервативных мотивов внутри домена IRR1 соматические и мейотические формы когезиновых белков не отличаются. Далее мы сравнили по этому параметру целые молекулы SCC3/STAG у всех 10 объектов (рис. 1).

Обнаружено, что у дрожжей *S. pombe* белки REC11 и SCC3 имеют мало общих (консервативных) мотивов и отличаются от белка SCC3 другого вида дрожжей – *S. cerevisiae*. В белках арабидопсиса, нематоды и дрозофилы имеются отдельные мотивы, характерные для позвоночных животных. У высших эукариот начиная с рыбы (Dr) и кончая человеком (Hs) прослеживается общий блок консервативных мотивов разной величины (от 15 до 165 условных единиц) в составе всех белков STAG. Этот блок намного превышает по размеру когезиновый домен.

При сравнении мейотической и соматических форм когезинов млекопитающих выявлен ряд отличий внутри консервативного блока –

замена и вставки мотивов в средней части молекулы (рис. 1, а, правая часть). Вне этого консервативного блока также выявлены структурные особенности для мейотической и двух соматических форм стромалинов. С-концевые фрагменты были различными у всех трех форм (рис. 2), и на этом уровне исследования это единственное отличие двух соматических стромалинов млекопитающих друг от друга. Исключением является рыба *D. rerio*, у которой N-концевые фрагменты STAG2 и STAG1 значительно отличаются друг от друга (данные не приведены). N-концевые отрезки всех исследованных соматических форм стромалинов млекопитающих были сходны между собой и отличались от мейотических STAG3 как по величине, так и по набору консервативных мотивов (рис. 1).

Аминокислотные последовательности всех мотивов приведены в двух дополнительных html-файлах (Supplement по адресу http://www.vigg.ru/?cat_id=190), полученных нами как результат работы программы MEME. В файле MAST-STAG1,3, SCC3 содержится информация о наборе и последовательности консервативных мотивов во всех изученных белках SCC3/SA, а также STAG1 и STAG3. Во втором файле (MAST-STAG1,2,3) приведена аналогичная информация обо всех изученных белках STAG и нескольких SCC3.

Распределение электростатического заряда вдоль молекул стромалина выявляет сходство соматических форм и отличие их от мейотической

Найденные нами различия между соматическими и мейотическими формами когезиновых белков STAG по набору консервативных мотивов сами по себе не позволяют объяснить довольно серьезную смену функции мейотических когезинов по сравнению с соматическими (см. Введение). С целью поиска структурной основы функциональных различий мы исследовали распределение зарядов вдоль молекул белков-стромалинов.

Как и в первой части работы, мы сначала выявили, насколько консервативны когезины SCC3/STAG по распределению зарядов при переходе от низших эукариот к высшим. Все белки SCC3 дрожжей и STAG1 дрозофилы име-

ли свою уникальную картину распределения заряда. В то же время белки STAG1 и кандидаты в STAG3 дрозофилы и рыбы *D. rerio* (см. табл.) были очень схожи, что может свидетельствовать об отсутствии мейотической формы STAG у этих объектов.

У всех изученных представителей млекопитающих распределение заряда оказалось практически идентичным внутри каждой группы белков: STAG1, STAG2 и STAG3. При этом обе соматические формы стромалина были сходными по этому показателю (рис. 3). Мейотическая форма отличалась наличием двух пиков положительного заряда вместо одного в N-концевом фрагменте белка, а также менее выраженными пиками отрицательного заряда в средней части молекулы.

Три формы стромалинов млекопитающих различаются по вторичной структуре

Мы также проанализировали вторичную структуру всех изученных белков (вероятность формирования α -спирали аминокислотными последовательностями, рис. 4, 5). Характерной особенностью когезинов SCC3/SA/STAG (за исключением белков арабидопсиса) было наличие ярко выраженного α -спирального участка в начальном фрагменте молекулы между 200 и 400 аминокислотными остатками (у арабидопсиса этот пик смещен к центру молекулы). У млекопитающих все белки STAG четко разделились по вторичной структуре на три группы – STAG1, STAG2 и STAG3 (рис. 5) – с очень высоким сходством в пределах групп. Можно сделать вывод о том, что вторичная структура стромалинов является надежным диагностическим параметром для идентификации мейотических форм STAG.

Обсуждение

Первым этапом нашей работы было изучение консерватизма когезиновых белков SCC3/SA/STAG. Ранее на основе исследования первичной структуры белка было показано, что у человека, мыши, дрозофилы и арабидопсиса сходство ортологов SCC3/STAG составляет лишь 25 % (Jones, Sgouros, 2001), в то время как STAG1 и 2 у человека и мыши совпадают на 99 % (Pezzi

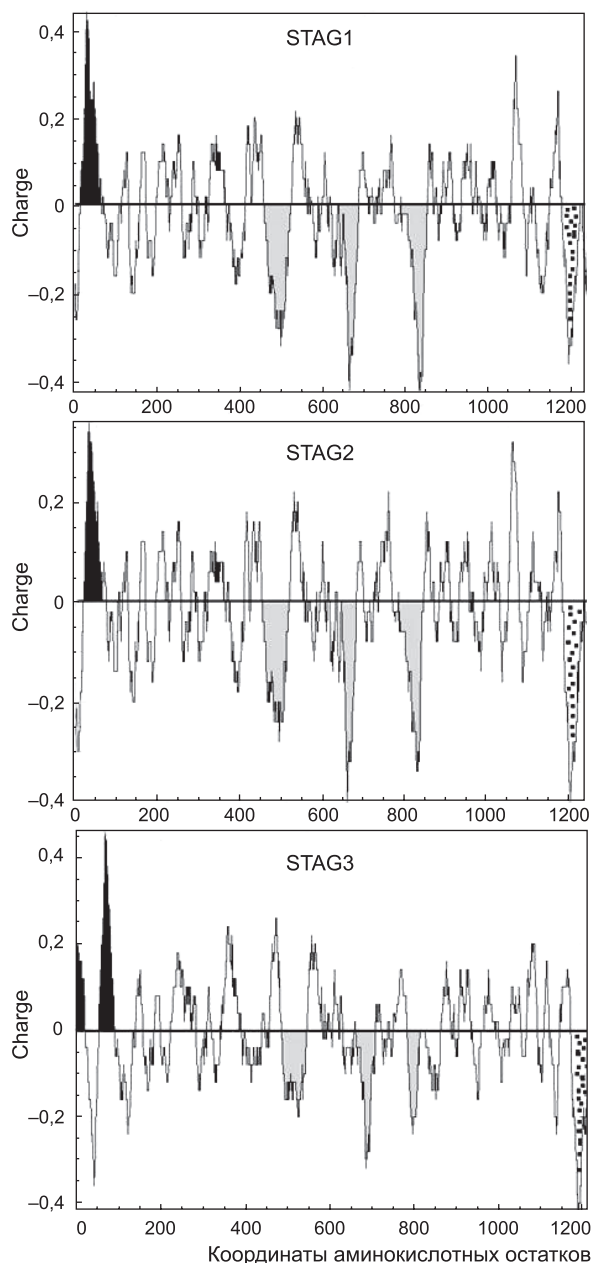


Рис. 3. Распределение электростатического заряда (Charge) вдоль молекул когезиновых белков на примере STAG1, STAG2 и STAG3 собаки *C. lupus familiaris*.

Черным цветом выделены характеристические пики положительного заряда, серым – отрицательного, точками – C-концевые пики.

et al., 2000). Одни исследователи говорили о консерватизме компонентов когезиновых комплексов – от дрожжей до человека (Losada *et al.*, 2000), другие отмечали сходство N- и C-концевых фрагментов белков SCC3/STAG (Haering *et al.*, 2002), третьи – консерватизм

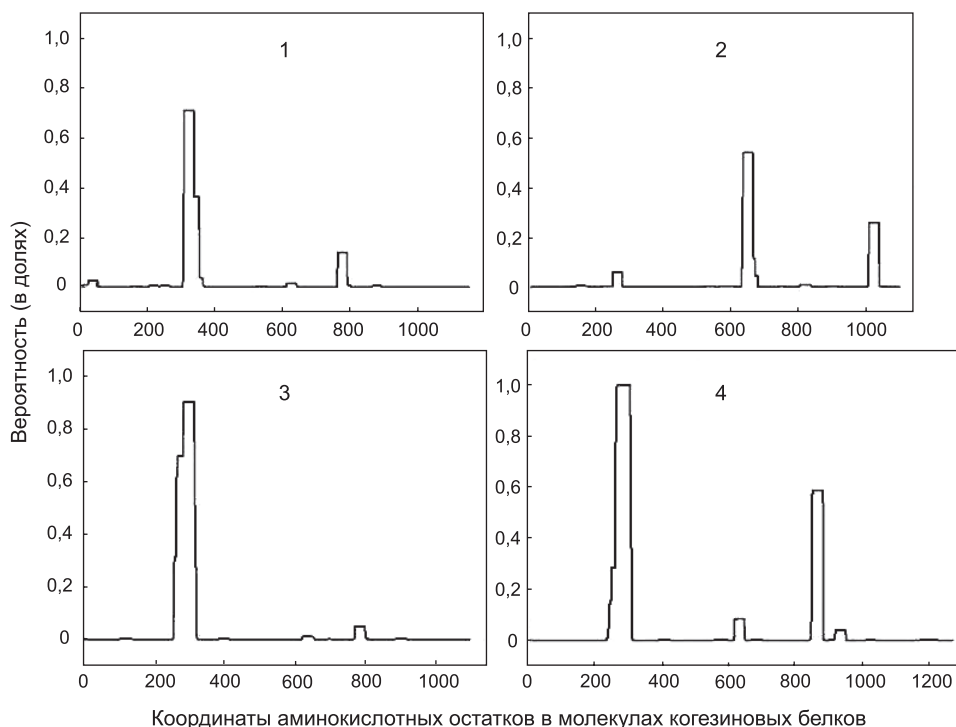


Рис. 4. Вероятность формирования вторичной (α -спиральной) структуры в молекулах белков SCC3 *S. cerevisiae* (1), SCC3 *A. thaliana* (2), SCC3 *C. elegans* (3) и STAG1 *D. rerio* (4).

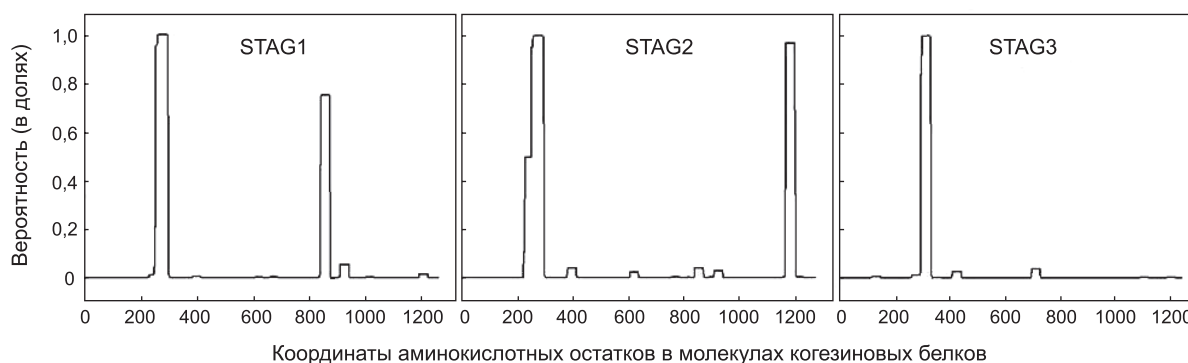


Рис. 5. Вероятность формирования вторичной (α -спиральной) структуры в молекулах белков STAG1, STAG2 и STAG3 млекопитающих на примере собаки (*C. lupus familiaris*).

только N-концевого участка (Losada *et al.*, 2000; Pezzi *et al.*, 2000). В то же время отмечалось и наибольшее расхождение аминокислотных последовательностей именно в N- и C-концевых фрагментах (Pezzi *et al.*, 2000).

Наши данные свидетельствуют о том, что у дрожжей и высших эукариот наблюдается весьма малое сходство консервативных мотивов даже внутри функционального домена. Эта черта отличает когезины SCC3/STAG от другой пары компонентов когезинового комплекса

RAD21/REC8 (Гришаева и др., 2007). У дрозофилы, нематоды и арабидопсиса присутствуют некоторые мотивы, характерные для позвоночных. Что касается последних, то у них обнаружен общий блок консервативных мотивов, превосходящий по размерам функциональный домен IRR1, в составе всех белков STAG.

При сравнении мейотической и соматических форм STAG нами обнаружены некоторые незначительные различия внутри блока. Что касается N- и C-концевых фрагментов исследованных

белков STAG, то соматические формы отличаются от мейотической как по величине, так и по набору консервативных мотивов. В литературе подобных сведений практически нет, кроме количественной оценки сходства двух форм когезинов у человека – 45 % (Pezzi *et al.*, 2000). Однако информации о мотивах недостаточно для понимания того, как структура когезинов может определять их функции, поэтому мы предприняли два дополнительных исследования.

Дополнительные исследования по распределению заряда вдоль молекул когезиновых белков подтвердили данные, полученные нами при анализе консервативных мотивов, о малом сходстве SCC3 между собой и с белками STAG и о различии N-концевых фрагментов мейотической и соматической форм белков STAG у млекопитающих (рис. 3). Кроме того, необходимо отметить, что в центральной части молекулы размеры и профиль пиков отрицательного заряда также различны для белков STAG1/2 и STAG3, что может отражать небольшие вставки и замены мотивов внутри консервативного блока.

Наиболее интересными, на наш взгляд, являются результаты, полученные нами при оценке вторичной структуры сравниваемых белков. Короткий, но ярко выраженный фрагмент α -спирали присутствует в начальном участке всех изученных когезинов – от SCC3 до STAG, включая мейотические STAG3 (рис. 4, 5). Этот α -спиральный участок входит в функциональный домен STAG, который, видимо, является высококонсервативным. Так, при сравнении трех форм STAG у человека и мыши (Pezzi *et al.*, 2000) был обнаружен консервативный домен между 296 и 381-м аминокислотными остатками, т. е. непосредственно за выявленным нами α -спиральным участком. Исключением является лишь арабидопсис, у которого α -спиральный участок расположен в центральной части молекулы.

Нам удалось выявить структурную основу функциональных различий двух соматических форм STAG позвоночных. Из литературы известно, что в соматических тканях у млекопитающих и лягушки *Xenopus laevis* доминирует SA2 – ортолог STAG2 (его количество в клетках в три раза больше, чем белка SA1), тогда как в яйцах лягушки обнаружено десятикратное преобладание SA1 (ортолога STAG1) (Losada

et al., 2000). У кузнечика и дрозофилы исследования проводили на SA1, что может косвенно свидетельствовать о его преобладании у этих объектов (Valdeolmillos *et al.*, 2007). Известно также, что два вида соматических когезинов никогда не выделяются в составе одного комплекса (Samara *et al.*, 2000). Именно когезиновый белок SA2 у высших эукариот служит объектом фосфорилирования, что обеспечивает первый этап диссоциации когезинов из хромосомы в раннем мейозе (Hauf *et al.*, 2005). Отмечено также, что STAG2 у человека может являться транскрипционным активатором, связываясь с факторами транскрипции и с гетерохроматиновым белком Swi6, паралогом HP1 (Lara-Pezzi *et al.*, 2004). Изучение вторичной структуры белков STAG млекопитающих позволило нам выявить четкие отличия двух соматических форм друг от друга (рис. 5).

Вторичная структура мейотических когезинов STAG3 отличает их от обеих соматических форм. α -спиральная конфигурация необходима как раз для белок-белкового взаимодействия (Shoeman, Traub, 1993). Молекулы SCC3/SA/STAG совместно с SCC3/RAD21 замыкают когезиновое кольцо, состоящее из SMC1 и SMC3 (Haering *et al.*, 2002). Именно SCC3/SA/STAG играет ключевую роль в ряде процессов, проходящих с участием когезинового комплекса. Прежде всего, это раннее освобождение когезинов из хромосомных плеч в профазе митоза (по поводу мейоза пока не все понятно). Кроме того, это активация транскрипции, взаимодействие с некоторыми инсуляторами и другие явления (Barbero, 2009). Есть данные о том, что после S-фазы клеточного цикла каждая хроматида может быть окружена своими когезиновыми кольцами, которые при установлении когезии сестринских хроматид соединяются попарно через молекулы SCC3/SA/STAG. Стабилизация «димера» из двух колец может осуществляться дополнительными белками WARL/Rad61 и Pds5, также взаимодействующими с SCC3 (Zhang, 2008; Skibbens, 2009).

Мейотический когезиновый белок STAG3, локализующийся на плечах мейотических хромосом (Kitajima *et al.*, 2003), взаимодействует с REC8 и SMC1 α (Revenkova, Jessberger, 2006), причем REC8 является мейотическим паралогом SCC1/RAD21 и основой формиро-

вания мейотических хромосомных осей (Eijpe *et al.*, 2003). Вероятно, появление в мейозе белка REC8, замыкающего когезиновое кольцо, требует адекватной замены «вспомогательного» партнера. Кроме того, возможно, STAG3 играет решающую роль в организации мейоз-специфичной оси хромосомы в прелептотене (Prieto *et al.*, 2002). Такой оси нет в хромосомах соматических клеток. В мейозе замена RAD21 на REC8 и появление новых партнеров – белков синаптонемного комплекса – неминуемо должны были привести к изменениям в структуре белков STAG3 по сравнению с соматическими ортологами STAG1/2. Мы надеемся, что нам удалось выявить эти отличия.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Биоразнообразии», подпрограмма «Генофонды и генетическое разнообразие».

Литература

- Гришаева Т.М., Дадашев С.Я., Богданов Ю.Ф. Мейотические когезины Rec8 и их митотические ортологи Rad21: сравнение *in silico* // Молекуляр. биология. 2007. Т. 41. С. 743–745. (Grishaeva T.M., Dadashev S.Ja., Bogdanov Ju.F. Meiotic Rec8 cohesins and their mitotic Rad21 orthologs: *in silico* comparison // Mol. Biol. 2007. (Mosk). V. 41. P. 743–745).
- Barbero J.L. Cohesins: chromatin architects in chromosome segregation, control of gene expression and much more // Cell. Mol. Life Sci. 2009. V. 66. P. 2025–2035.
- Chelysheva L., Diallo S., Vezon D. *et al.* AtREC8 and AtSCC3 are essential to the monopolar orientation of the kinetochores during meiosis // J. Cell Sci. 2005. V. 118. P. 4621–4632.
- Eijpe M., Offenbergh H., Jessberger R. *et al.* Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1 and SMC3 // J. Cell Biol. 2003. V. 160. P. 657–670.
- Haering C.H., Lowe J., Hochwagen A., Nasmyth K. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex // Mol. Cell. 2002. V. 9. P. 773–788.
- Hauf S., Roitinger E., Koch B. *et al.* Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2 // PLoS Biol. 2005. V. 3. P. e69.
- Jones S., Sgouros J. The cohesin complex: sequence homologies, interaction networks and shared motifs // Genome Biol. 2001. V. 2. P. Research0009.1–0009.12.
- Kitajima T.S., Yokobayashi S., Yamamoto M., Watanabe Y. Distinct cohesin complexes organize meiotic chromosome domains // Science. 2003. V. 300. P. 1152–1155.
- Lara-Pezzi E., Pezzi N., Prieto I. *et al.* Evidence of a transcriptional co-activator function of cohesin STAG/SA/ScC3 // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 6553–6559.
- Losada A., Yokochi T., Kobayashi R., Hirano T. Identification and Characterization of SA/ScC3p subunits in the *Xenopus* and human cohesin complexes // J. Cell Biol. 2000. V. 150. P. 405–416.
- Pelttari J., Hoja M-R., Yuan L. *et al.* A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells // Mol. Cell. Biol. 2001. V. 21. P. 5667–5677.
- Pezzi N., Prieto I., Kremer L. *et al.* STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion // FASEB J. 2000. V. 14. P. 581–592.
- Prieto I., Suja J.A., Pezzi N. *et al.* Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I // Nat. Cell Biol. 2001. V. 3. P. 761–766.
- Prieto I., Pezzi N., Buesa J.M. *et al.* STAG2 and Rad21 mammalian mitotic cohesins are implicated in meiosis // EMBO reports. 2002. V. 3. P. 543–550.
- Revenkova E., Jessberger R. Keeping sister chromatids together: cohesins in meiosis // Reproduction. 2005. V. 130. P. 783–790.
- Revenkova E., Jessberger R. Shaping meiotic prophase chromosomes: cohesins and synaptonemal complex proteins // Chromosoma. 2006. V. 115. P. 235–240.
- Samara I., Vorlaufer E., Gieffers C. *et al.* Characterization of vertebrate cohesion complexes and their regulation in prophase // J. Cell Biol. 2000. V. 151. P. 749–761.
- Shoeman R.L., Traub P. Assembly of intermediate filaments // BioEssays. 1993. V. 15. P. 605–611.
- Skibbens R.V. Establishment of sister chromatid cohesion // Curr. Biol. 2009. V. 19. P. R1126–R1132.
- Supplement: http://www.vigg.ru/?cat_id=190 или сразу по адресам http://www.vigg.ru/get_file.php?id=589 и http://www.vigg.ru/get_file.php?id=590.
- Valdeolmillos A.M., Viera A., Page J. *et al.* Sequential loading of cohesin subunits during the first meiotic prophase of grasshoppers // PLoS Genet. 2007. V. 3. P. e28.
- Zhang N., Kuznetsov S.G., Sharan S.K. *et al.* A handcuff model for the cohesin complex // J. Cell Biol. 2008. V. 183. P. 1019–1031.

**IN SILICO ANALYSIS OF THE STRUCTURAL BASE OF FUNCTIONAL
DIFFERENCES BETWEEN SOMATIC AND MEIOTIC FORMS
OF COHESINS SCC3/SA/STAG**

T.M. Grishaeva, S.Ya. Dadashev, Yu.F. Bogdanov

Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia,
e-mail: tmgrishaeva@rambler.ru

Summary

We performed the first bioinformatical comparison of components of the cohesin complex in 10 eukaryotic species conventionally used as model organisms for studying the molecular bases of mitosis and meiosis. Cohesin proteins connect sister chromatids after DNA replication. They are partially different in somatic cells (SCC3, SA1/2, STAG1/2) and generative cells (REC11, STAG3), which undergo mitosis and meiosis, respectively. Cohesins play a significant role in the difference between these division types.

Both somatic forms of mammalian stromalins, STAG1 and STAG2, differ from one another and from their meiotic paralog, STAG3, in all parameters studied, particularly, in secondary structure. To be able to perform additional functions in meiosis, cohesin STAG3 proteins acquire specific structural features at their N- and C-ends, and this is their difference from meiotic REC8 cohesins formerly studied by us.

Key words: eukaryotes, meiosis, SCC3/SA/STAG cohesin proteins, conserved motifs, *in silico* study.