

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ГЕНЕТИКА

(ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК)

МОСКВА · 1993

УДК 575.3:575.116.12

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕКОМБИНАЦИОННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

© 1993 г. ГОРЛОВ И.П., ГУСАЧЕНКО А.М., ВЫСОЦКАЯ Л.В.

У трех филогенетически далеких видов: домашней мыши, изменчивого конька и непарного зеленчука, исследованы сила и характер хиазменной интерференции между разными районами хромосом. Интенсивность хиазменной интерференции оценивали по степени отличия реальной частоты двойных хиазм от ожидаемой, предполагая, что хиазмы возникают независимо.

Показано, что хиазма полностью подавляет кроссинговер в соседних участках хромосомного плеча. Уровень и характер интерференции при удалении от хиазмы меняется нелинейно. В некоторых случаях обмены, локализованные в более удаленных участках хромосом, взаимодействуют сильнее, чем в менее удаленных. Довольно типично, когда в непосредственной близости от хиазмы кроссинговер полностью подавлен, при удалении от хиазмы интерференция ослабевает (при этом наблюдается определенный пороговый эффект), а затем интерференция может стать отрицательной.

Рекомбинационные взаимодействия распределены в хромосомном плече полярно, а именно интерстициально локализованная хиазма сильнее подавляет кроссинговер в проксимальном, чем в дистальном направлении.

Центромера блокирует интерференцию не абсолютно. Обмены, локализованные в некоторых районах метацентрической хромосомы, способны к рекомбинационным взаимодействиям через центромеру.

У филогенетически далеких видов, таких, как домашняя мышь, изменчивый конек и непарный зеленчук, интерференционные структуры хромосом являются сходными.

Несмотря на неослабевающий интерес к изучению мейотической рекомбинации, наши знания об этом фундаментальном биологическом явлении пополняются очень медленно. В частности, мы мало знаем об интерференции, определяющей неслучайное распределение обменов по длине хромосомы.

Отсутствие глубоких знаний об интерференции можно в значительной степени объяснить недостатком удобных моделей для ее изучения. Для исследования интерференции пользуются, главным образом, классическим рекомбинационным анализом. Однако рекомбинационный анализ невозможно использовать для изучения интерференции как физического феномена. Действительно, для того чтобы правильно оценивать силу и характер рекомбинационных взаимодействий, необходимо работать в реальном физическом масштабе. Между тем рекомбинационные расстояния условны, поскольку зависят не только от физического расстояния между маркерами, но и от плотности кроссоверных обменов. Интерференция проявляется на надмолекулярном уровне, и очевидно, что для ее изучения необходимо иметь интегральную рекомбинационную характеристику хромосомы. Это требует наличия большого числа генетических маркеров с известной цитологической локализацией, что трудно достижимо практически.

Между тем существует прекрасная возможность изучать интерференцию, используя распределения обменов, выявляемых цитологически как хиазмы. Правомочность использования хиазм при изучении рекомбинации доказана многочисленными работами,

в которых убедительно показано отсутствие «терминализации» хиазм и совпадение точек локализации хиазм с сайтами кроссинговера [1—6].

Анализ хиазм обеспечивает исследователю определенные преимущества, а именно, во-первых, легко учесть все кроссоверные обмены, во-вторых, можно оценить плотность обменов в любом участке мейотического бивалента и, в-третьих, можно одновременно оценить рекомбинационные и физические расстояния между любыми участками бивалента.

В настоящей работе предпринята попытка использовать цитогенетический анализ для исследования процесса взаимодействия рекомбинационных обменов, другими словами, для изучения интерференционной структуры мейотического бивалента.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использованы результаты анализа распределения обменов в хромосомах домово́й мышцы *Mus musculus* L: линия СВА/Лас и линия 3, гомозиготная по робертсоновской транслокации — Rb(2,6)4Iem, и двух видов саранчовых: изменчивого конька *Chorthippus biguttulus* (L.) и непарного зеленчука *Chrysochraon dispar* (Germ.). В анализ взяты как акроцентрические, так и метацентрические хромосомы с разной рекомбинационной и физической длиной.

Плечо каждой хромосомы условно разбивали на пять участков одинаковой длины (нумерация участков — от центромеры к теломере). Для каждого участка определяли частоту хиазм. Поскольку на препаратах саранчовых не всегда удавалось идентифицировать 1—2 и 4—5 биваленты, то данные для них объединяли. Правомочность такого объединения подтверждена предварительным анализом.

Для оценки рекомбинационных взаимодействий в каждом из 5 участков хромосомного плеча считали вероятность рекомбинационного обмена p_i , где $i = 1, 2, \dots, 5$. Затем определяли теоретическую вероятность того, что обмены одновременно произойдут в двух каких-либо участках. Например, теоретическая вероятность того, что обмены одновременно произойдут в участке 1 и 2 будет равна: $p_{(1,2)} = p_{(1)} \times p_{(2)}$. Если определенная в эксперименте вероятность двойных обменов $p_{(1,2)}$ отличается от теоретической вероятности, можно утверждать, что кроссоверные обмены в участках 1 и 2 рекомбинационно связаны.

По аналогии с классическим рекомбинационным анализом для количественных оценок связи между обменами мы использовали коэффициент совпадения реализованных обменов с теоретически ожидаемыми — коэффициент коинциденции.

$$C = \frac{p_{(1,2)\text{практич}}}{p_{(1)} \times p_{(2)}}$$

Если $C < 1$, один обмен препятствует возникновению другого, а если $C > 1$, наоборот, стимулирует. Для оценки достоверности отклонения C от единицы использовали t -критерий [7].

Для количественных оценок полярности рекомбинационных взаимодействий мы определяли симметричность распределения коэффициента совпадения. Коэффициент асимметрии K_a находили по формуле

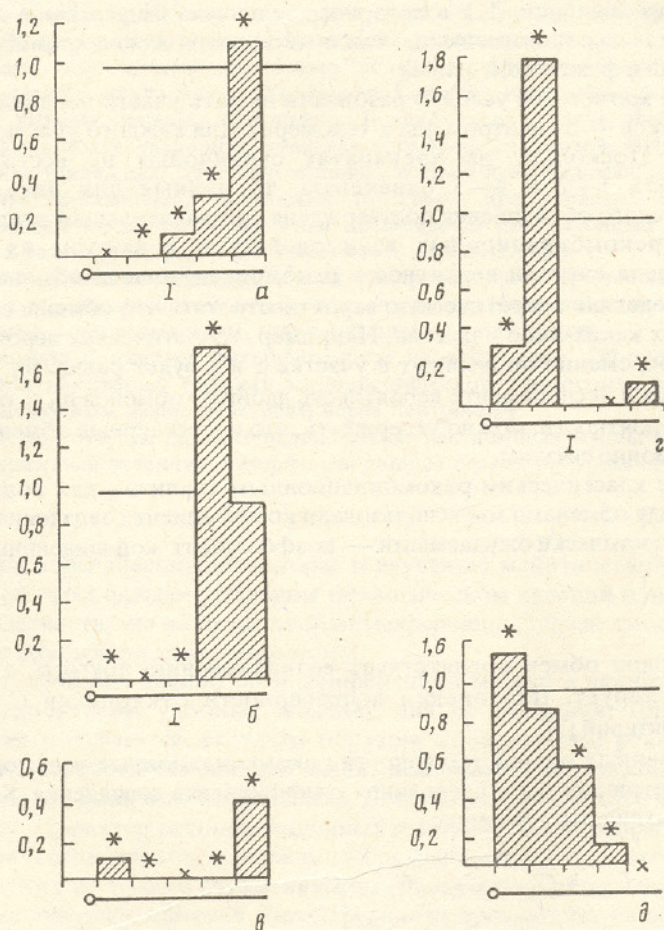
$$K_a = C_{1,2} + C_{1,3} + C_{1,4} + C_{1,5} - C_{5,4} - C_{5,3} - C_{5,2} - C_{5,1}$$

Достоверные отличия коэффициента асимметрии от 0 указывают на полярность рекомбинационных взаимодействий. При этом, если $K_a > 0$, взаимодействие между обменами выше в дистальной части хромосомного плеча, а если $K_a < 0$, — в проксимальной части. Достоверность отличий коэффициента асимметрии от нуля оценивали при помощи t -критерия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1. приведены частоты хиазм в разных участках исследованных хромосом. На основе этих данных, а также данных о частоте и распределении множественных обменов были определены для разных участков хромосом коэффициенты совпадения C (табл. 2). Видно, что C может принимать самые разные значения: от нуля — сильная положительная интерференция до значений больше единицы — отрицательная интерференция.

На рисунке показано, как изменяется частота кроссинговера в хромосоме 1 вблизи хиазмы. В соседних участках кроссинговер практически полностью подавлен. С увеличением расстояния ингибирующее действие хиазмы уменьшается и обмены могут стать независимыми ($C = 1$). Эффективность интерференции нелинейно зависит от физического расстояния между обменами. Например, хиазма в участке 2 (см. рисунок, б) подавляет кроссинговер в участках 1 и 3, повышает частоту обменов в



Относительные изменения частоты кроссинговера в хромосоме 1 *M. musculus* вблизи хиазмы. а—д — разная локализация хиазмы (×) на хромосоме. Звездочками обозначены достоверные отличия частоты кроссинговера от средней частоты хиазм в данном районе хромосомы. Центромерный район отмечен кружком

Chiasma distribution in the chromosome 1 *M. musculus* dependent on one fixed chiasma position. а—д — various fixed chiasma position (×) in the chromosome. * — the significant differences between given frequency and general chiasma frequency in this chromosome region. Circle means centromere

Распределение обменов по длине хромосом трех видов
Chiasma distribution in three species

Вид	Хромосома или хромосомное плечо	Среднее число обменов	Частота обменов в различных участках				
			1	2	3	4	5
<i>Mus musculus</i>	1 линии CBA/Lac	1,63±0,03	0,53±0,02	0,16±0,02	0,12±0,01	0,19±0,01	0,63±0,02
	14 линии CBA/Lac	1,06±0,02	0,20±0,02	0,13±0,02	0,12±0,02	0,17±0,02	0,44±0,03
	2 в Rb(2, 6)4Iem	1,49±0,02	0,20±0,01	0,35±0,02	0,22±0,01	0,26±0,02	0,46±0,02
	6 в Rb(2, 6)4Iem	1,18±0,02	0,13±0,02	0,14±0,02	0,16±0,02	0,22±0,02	0,51±0,02
<i>Chorti ppus biguttulus</i>	1—2, короткое плечо	1,13±0,02	0,12±0,02	0,08±0,01	0,13±0,02	0,14±0,02	0,69±0,02
	1—2, длинное плечо	1,78±0,02	0,19±0,02	0,35±0,02	0,32±0,02	0,33±0,02	0,56±0,02
	3, короткое плечо	1,02±0,01	0,06±0,02	0,12±0,02	0,12±0,02	0,06±0,02	0,65±0,03
	3, длинное плечо	1,30±0,03	0,14±0,02	0,15±0,02	0,31±0,03	0,22±0,03	0,49±0,03
	4—5	1,24±0,02	0,35±0,02	0,11±0,01	0,15±0,02	0,11±0,01	0,52±0,02
<i>Chrysochraon dispar</i>	4—5	1,71±0,03	0,65±0,03	0,10±0,02	0,03±0,01	0,02±0,003	0,91±0,02

Значения коэффициентов совпадения практических и теоретических частот для разных участков хромосом

Coincidence coefficients of observed and expected frequencies in different chromosome regions

Сравни- ваемые участки хромосом	Mus musculus				Chorthippus biguttulus					Chrys. dispar
	Хромосома									
	1	14	2	6	1—2	1—2	3	3	4—5	4—5
1—2	0,00	0,00	0,09±0,05	0,00	0,00	0,06±0,04	0,00	0,00	0,00	0,00
1—3	0,06±0,03	0,00	0,16±0,11	0,00	0,13±0,13	0,50±0,14	0,00	0,49±0,23	0,00	0,22±0,10
1—4	0,39±0,09	0,00	0,60±0,13	0,27±0,11	0,25±0,18	0,94±0,20	0,00	1,12±0,45	0,06±0,06	0,00
1—5	1,21±0,09	0,60±0,14	1,60±0,18	1,77±0,25	0,88±0,19	0,98±0,16	0,31±0,19	1,18±0,33	1,05±0,10	0,86±0,06
2—3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15±0,05	0,00	0,00	0,00	0,00
2—4	1,84±0,38	0,00	0,39±0,08	0,14±0,07	0,39±0,29	1,04±0,16	0,58±0,60	0,39±0,24	0,18±0,18	1,00±1,10
2—5	0,87±0,13	0,16±0,10	1,85±0,14	1,19±0,18	0,67±0,31	0,94±0,11	0,38±0,16	1,30±0,34	0,61±0,17	0,91±0,22
3—4	0,00	0,00	0,11±0,06	0,05±0,05	0,23±0,17	0,41±0,09	0,00	0,13±0,09	0,00	0,00
3—5	0,52±0,13	0,00	1,20±0,14	0,25±0,07	0,15±0,03	0,97±0,14	0,00	0,33±0,10	0,13±0,06	0,88±0,42
4—5	0,03±0,02	0,00	0,20±0,04	0,05±0,03	0,02±0,02	0,18±0,05	0,00	0,00	0,00	1,11±1,12
K_a	-0,97±0,31***	-0,16±0,10***	-2,40±0,43***	-1,22±0,30***	-0,46±0,48	-0,59±0,31	-0,38±0,16	-0,02±0,81	-0,68±0,19**	-2,68±1,22*
Проана- лизиро- вано хромосом	347	347	830	830	478	478	239	239	478	508

Коэффициенты совпадения для обменов, локализованных в разных плечах субметацентриков
Coincidence coefficients of the exchanges localized in opposite chromosome arms

		Mus musculus Хромосома 2				
		1	2	3	4	5
6-я хромосома	1	0,88—0,24	0,64—0,16***	1,24—0,28	1,04—0,25	1,05—0,16
	2	0,41—0,15***	1,13—0,20	0,81—0,18	1,12—0,25	1,08—0,16
	3	0,73—0,18	1,28—0,20	1,32—0,24	1,32—0,24	0,98—0,12
	4	1,00—0,18	1,05—0,15	0,71—0,16	1,23—0,21	0,96—0,11
	5	1,30—0,17	0,95—0,09	1,00—0,11	0,77—0,09	1,00—0,06
		Chorthippus biguttulus Короткое плечо хромосомы 3 (short arm)				
		1	2	3	4	5
Длинное плечо (long arm)	1	0,48—0,51	0,52—0,17**	0,00***	0,98—0,37	1,13—0,29
	2	0,46—0,48	0,25—0,25**	0,74—0,22	1,37—0,47	1,15—0,28
	3	1,10—0,57	0,70—0,31	1,28—0,46	0,43—0,15***	1,00—0,17
	4	0,62—0,22	1,65—0,62	1,15—0,50	1,85—1,04	0,92—0,20
	5	0,83—0,40	0,82—0,29	1,04—0,33	0,83—0,40	1,07—0,13

Примечание. Вверху — субметацентрик, образовавшийся в результате слияния 2-й и 6-й хромосомы домово́й мыши. Внизу — 3-я субметацентрическая хромосома изменчивого конька. Цифрами от 1 до 5 обозначены районы хромосомных плеч, начиная с центромеры. Звездочками помечены коэффициенты совпадения, достоверно отличающиеся от 1.

1—5 — the chromosome arm regions beginning with the centromere.

* — the coincidence coefficients significantly different from 1.

участке 4 и не меняет частоту хиазм в участке 5. Хиазма в участке 4 практически полностью подавляет кроссинговер в участках 3 и 5, увеличивает частоту обменов в участке 2 и уменьшает частоту хиазм в участке 1.

Используя данные, приведенные в табл. 2, можно легко найти много других примеров, показывающих сложные нелинейные изменения интенсивности интерференции при изменении физических расстояний. Сложная картина интерференционных взаимодействий наблюдается у всех изученных видов (см. табл. 2).

Таким образом, картина рекомбинационных взаимодействий в пределах хромосомного плеча может быть очень сложной. Сила и характер взаимодействия зависят не только от расстояния между участками хромосомы, но и от положения обменов на хромосоме.

Другой интересной особенностью рекомбинационных взаимодействий является полярность — разная сила интерференции в дистальной и проксимальной частях хромосомного плеча. У мыши, конька и зеленчука хиазменная интерференция полярна, а именно обмены, локализованные в середине хромосомы, сильнее взаимодействуют с проксимальными, чем с дистальными участками хромосомы (см. табл. 2).

Мы оценивали также интерференцию между обменами, локализованными в разделенных центромерой участках субметацентрических хромосом. Были изучены: субметацентрик, образовавшийся в результате робертсоновской транслокации Rb (2.6) 4em мыши, а также субметацентрическая 3-я хромосома изменчивого конька. Каждое плечо было условно разделено на 5 равных по физической длине частей. Оценивали коэффициенты совпадения для обменов, локализованных в участках, разделенных центромерой, — всего 25 пар. Значения коэффициентов совпадения между разделенными центромерой участками субметацентриков приведены в табл. 3. Для большинства изученных пар рекомбинационные взаимодействия не обнаруживаются — коэффициент совпадения не отличается от единицы. Однако для некоторых участков, расположенных вблизи центромеры, коэффициент совпадения достоверно меньше единицы (см. табл. 3). Это означает, что существуют сайтспецифические рекомбина-

ционные взаимодействия между участками субметацентриков, разделенными центромерой.

До сих пор в подавляющем числе экспериментов хиазменная интерференция через центромеру не была обнаружена [8, 9]. Возможно, что это связано с низкой чувствительностью использованных подходов. Обычно используется либо чисто генетический метод — оценка коэффициента коинцидентности между маркерами, расположенными в разных плечах метацентрика, либо анализ хиазм, однако в последнем случае изучали влияние хиазмы в одном плече на вероятность образования хиазмы в другом плече. При первом подходе выбор районов хромосом, между которыми оценивается интерференция, достаточно произволен, а при втором подходе интерференция оценивается интегрально между целыми плечами субметацентрика.

Вероятно, что для реализации рекомбинационных взаимодействий через центромеру необходимо, чтобы взаимодействующие участки были физически сближены. В самом деле, хиазменная интерференция обнаруживается между районами, локализованными вблизи центромеры (см. табл. 3). Кроме того, оценивая взаимодействие между дискретными районами несцепленных акроцентриков (хромосома 1 и хромосома 14), ни в одном из 25 случаев мы не обнаружили достоверных отличий коэффициентов совпадения между пятью участками хромосомы 14 и пятью участками хромосомы 1.

Основной целью нашей работы было детальное описание феномена внутривнутрихромосомных рекомбинационных взаимодействий. Что касается их механизмов, мы считаем возможным высказать следующие соображения. Вероятно, что сложные интерференционные взаимодействия в пределах хромосомного плеча реализуются благодаря действию не одного, а как минимум двух факторов: хиазменной интерференции и клеточного механизма, который обеспечивает хотя бы один обмен на хромосому независимо от размеров хромосомы [8, 9]. Хиазменная интерференция подавляет кроссинговер в некоторой окрестности обмена. На достаточно большом удалении от кроссоверного обмена работает второй механизм: рекомбинационная система клетки воспринимает хроматин как принадлежащий другой хромосоме и стремится реализовать обязательный кроссоверный обмен. Это приводит к тому, что частота обменов в этом участке хромосомы начинает превышать теоретически ожидаемую. В свою очередь эти сверхчисленные обмены приводят к вторичному подавлению кроссинговера в соседних районах. Таким образом, взаимодействие двух факторов будет приводить к волнообразному распределению рекомбинационных взаимодействий по хромосоме: подавлению кроссинговера вблизи реализованного кроссоверного обмена, затем усилению рекомбинации и далее, вторично индуцированному подавлению кроссинговера. Очевидно, что экспериментальная проверка этого предсказания возможна на достаточно больших хромосомах с числом хиазм равным 4–5.

Поскольку основной целью работы было детальное описание интерференции, мы считаем необходимым повторить основные результаты, полученные в данном исследовании:

1. Хиазма практически полностью подавляет кроссинговер в соседних участках хромосомного плеча.

2. Уровень и характер интерференции при удалении от хиазмы меняется нелинейно. В некоторых случаях обмены, локализованные в более удаленных участках хромосом, взаимодействуют сильнее, чем в менее удаленных. Довольно типично, когда в непосредственной близости от хиазмы кроссинговер полностью подавлен, а при удалении от хиазмы интерференция ослабевает (при этом наблюдается определенный пороговый эффект), затем интерференция может стать отрицательной.

3. Рекомбинационные взаимодействия распределены в хромосомном плече полярно, а именно интерстициально локализованная хиазма сильнее подавляет кроссинговер в проксимальном, чем в дистальном направлении.

4. Центромера блокирует интерференцию не абсолютно. Обмены, локализованные в некоторых районах метацентрической хромосомы, способны к рекомбинационным взаимодействиям через центромеру. В то же время рядом расположенные участки (в

том числе и более близко расположенные участки) не взаимодействуют, т.е. интерференция является сайтспецифической.

5. У филогенетически далеких видов, таких, как домовая мышь, изменчивый конек и непарный зеленчук, интерференционные структуры хромосом являются сходными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Henderson S.A.* Chiasma distribution at diplotene in a locust // *Heredity*. 1963. V. 18. P. 173—190.
2. *Henderson S.A.* Chiasma localisation and incomplete pairing // *Chromosomes Today*. 1969. V. 2. P. 56—60.
3. *Fox D.P.* The control of chiasma distribution in the locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål) // *Chromosoma*. 1973. V. 43. P. 289—328.
4. *Hulien M.* Chiasma distribution at diplotene in the normal human male // *Hereditas*. 1974. V. 76. P. 55—78.
5. *Tease C., Jones G.H.* Analysis of exchanges in differential stained meiotic chromosomes of *Locusta migratoria* after BrdU substitution and FPG staining // *Chromosoma*. 1978. V. 69. P. 163—178.
6. *Kanda N., Kato H.* Analysis of crossing-over in mouse meiotic cells by BrdU labeling technique // *Chromosoma*. 1980. V. 78. P. 113—121.
7. *Плохинский Н.А.* Биометрия. М.: Изд-во МГУ, 1970. 368 с.
8. *Stadler D.P.* Double crossing-over in *Neurospora* // *Genetics*. 1956. V. 41. P. 623—630.
9. *Maudlin J., Evans E.* Chiasma distribution in mouse oocyte during diakinesis // *Chromosoma*. 1980. V. 80. p. 49.
10. *Горлов И.П., Бородин П.М.* Хромосомный контроль кроссинговера у мышей // *Генетика*. 1991. Т. 27. № 2. С. 247—251.

Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск;
Новосибирский государственный университет,
кафедра цитологии и генетики

Поступила в редакцию
16.1.1992

CYTOGENETICAL ANALYSIS OF RECOMBINATION INTERACTIONS

GORLOV I.P., GUSACHENKO A.M., VYSOTSKAYA L.V.

*Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian Division, Novosibirsk;
Novosibirsk State University, Department of Cytology and Genetics*

S u m m a r y

Chiasma interference between separate regions of chromosomes was studied in three phylogenetically distant species. All these species displayed the similar patterns of chiasma interference. Chiasma completely suppressed recombination in the regions next to chiasma within a chromosome's arm. The level of crossing-over suppression decreased non-linearly with increase in a distance between the chiasma and the region under analysis. Some kind of the threshold effect was observed. In some cases, negative interference between the regions rather remoted from each other was noted. Polarity of interference was revealed: interstitial chiasma suppressed recombination in the proximal (in relation to the centromere) direction more effectively than in the distal direction. Some regions belonging to the different arms of the same chromosome were shown to be able to interfere.