

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ МЕЙОТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ И ИНТЕРФЕРЕНЦИИ У ДОМАШНЕЙ КОШКИ

© П. М. Бородин,^{1,2,*} Т. В. Карамышева,¹ Н. Б. Рубцов^{1,2}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, и

² Кафедра цитологии и генетики Новосибирского государственного университета;

* электронный адрес: borodin@bionet.nsc.ru

Целью данной работы был анализ частоты, плотности и распределения точек кроссинговера в мейозе у самцов домашней кошки (*Felis silvestris catus*). Исследование проведено с использованием иммунофлуоресцентного окрашивания на цитологических препаратах белков синаптонемных комплексов (СК), центромерных районов и белка мисматч-репарации MLN1, надежно маркирующего точки кроссинговера. Были картированы 2633 точки кроссинговера на 1098 индивидуальных аутосомах. На основании полученных данных общая длина генетической карты домашней кошки была определена как 2176 сантиморганов (сМ). Была обнаружена типичная для всех исследованных млекопитающих положительная корреляция между длиной СК и количеством точек рекомбинации. В отличие от других млекопитающих у домашней кошки наблюдаются очень высокая плотность кроссоверных обменов на единицу длины СК и низкая интерференция обменов.

Ключевые слова: мейоз, рекомбинация, кроссинговер, интерференция, синаптонемный комплекс, MLN1.

Принятые сокращения: СК — синаптонемный комплекс, SCP 3 — белок боковых элементов СК, MLN1 — эукариотический гомолог бактериального белка мисматч-репарации, сМ — сантиморган.

Мейотическая рекомбинация (кроссинговер) происходит в профазе мейоза за счет образования множественных двухнитевых разрывов ДНК и объединения разрывов между гомологичными хромосомами. Рекомбинация играет очень важную роль в эволюции эукариот: она создает новые сочетания аллелей и обеспечивает генетическое единство видов (Жученко, Король, 1985; Король и др., 1990; Otto, Lenormand, 2002). Кроссинговер, создавая физическую связь между гомологичными хромосомами, гарантирует их правильную ориентацию в метафазе первого деления мейоза и последующее расхождение с образованием сбалансированных гамет (Zickler, Kleckner, 1999; Богданов, 2003; Page, Hawley, 2003). Для выполнения последней функции достаточно образования единственного кроссинговера в каждой паре гомологов (в каждом биваленте). В тех случаях, когда в биваленте происходят множественные кроссоверные обмены, они, как правило, интерферируют друг с другом, т. е. кроссинговер в одном районе бивалента снижает вероятность образования другого в соседнем районе. Сила интерференции уменьшается по мере увеличения дистанции между обменами. Таким образом, интерференция задает верхний предел частоты кроссинговеров на бивалент и обеспечивает их неравномерное распределение (Roeder, 1997; Zickler, Kleckner, 1999).

Молекулярные механизмы интерференции до сих пор неизвестны. Предполагается, что только небольшая часть двухнитевых разрывов ДНК, возникающих в самом начале профазы мейоза, репарируется по кроссоверному пути,

тогда как большинство разрывов репарируется безобменно по пути генной конверсии. Выбор пути репарации каждого конкретного разрыва происходит случайно (Jones, Franklin, 2006).

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 MLN1, эукариотическому гомологу бактериального белка мисматч-репарации. Показано, что MLN1 входит в состав зрелых рекомбинационных узелков. Число и распределение точек локализации MLN1 в пахитенных клетках точно соответствуют числу и распределению хиазм в диакинезе мейоза (Barlow, Hultén, 1998; Anderson et al., 1999; Baker et al., 1999; Lynn et al., 2002; Sun et al., 2004, 2006). Установлено, что частота рекомбинации между двумя сцепленными генами, оцененная на основе частоты точек локализации MLN1 между FISH-пробами к этим генам, совпадает с оценкой частоты кроссинговера между ними, полученной в генетическом эксперименте (Froenicke et al., 2002).

С использованием данного подхода был проведен анализ частоты и распределения точек кроссинговера всего у трех видов млекопитающих: человека (Lynn et al., 2002; Sun et al., 2004, 2006), мыши (Anderson et al., 1999; Froenicke et al., 2002; Koehler et al., 2002) и обыкновенной бурундуки (Borodin et al., 2006). Целью данной работы было определение частоты, плотности и распределения точек

кроссинговера и их интерференции в мейозе у самцов домашней кошки (*Felis silvestris catus*). Этот вид в настоящее время интенсивно используется в сравнительно-генетических исследованиях (O'Brien et al., 2002). На основе результатов реципрокного пэйнтинга хромосом кошки и человека был обнаружен очень высокий уровень синтении между хромосомами данных видов (Wienberg et al., 1997). Достигнут значительный прогресс в генетическом картировании хромосом кошки. Составлены физическая и генетическая карты (Menotti-Raymond et al., 2003). Цитологический анализ кроссинговера у кошки и сравнение его результатов с данными, полученными на других видах млекопитающих, позволит расширить наши представления о регуляции рекомбинационного процесса.

Материал и методика

Распластанные препараты сперматоцитов были приготовлены из семенников, полученных при кастрации 3 котов в возрасте 3 мес. Препараты готовили по методике Петерса с соавторами (Peters et al., 1997). Иммуноокрашивание проводили по методике Андерсон с соавторами (Anderson et al., 1999). Препараты инкубировали 2 ч при 37 °С с поликлональными антителами кролика против белка боковых элементов СК SCP3 (дар К. Хейтинг, Сельскохозяйственный университет Вагенингена, Голландия) при разведении 1 : 1000, моноклональными антителами мыши против белка MLH1 человека (Pharming, США) при разведении 1 : 50 и антителами человека против центромерных белков человека ANA-C (Sigma-Aldrich, США) при разведении 1 : 100 в фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащем 3 % бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США). Препараты отмывали 3 раза по 5 мин в PBS и инкубировали 40 мин при 37 °С с антителами осли против иммуноглобулинов кролика, конъюгированными с флуоресцентной меткой Cy3 (Jackson, Laboratories, США), в разведении 1 : 200, антителами козы против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с флуоресцентной меткой FITC (Jackson Laboratories, США), в разведении 1 : 400 и антителами козы против иммуноглобулинов человека, конъюгированными с флуоресцентной меткой FITC (Vector Laboratories, США), в разведении 1 : 100 согласно стандартному протоколу. Препараты отмывали в PBS, затем в дистиллированной воде, высушивали и наносили 15 мкл раствора антифэйда с красителем (Vectashield with DAPI; Vector Laboratories) для окрашивания ДНК и предотвращения гашения флуоресценции.

Микроскопический анализ проводили в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Препараты анализировали на микроскопе AxioPlan 2 (Zeiss, Германия) снабженном CCD-видеокамерой (CV M300, JAI Corporation, Япония), набором комплектов фильтров CHROMA и программным обеспечением для обработки изображений ISIS4 (MetaSystems GmbH, Германия). Яркость и контраст изображений редактировали с использованием пакета PaintShopPro 7.0.

Был проанализирован 61 сперматоцит, содержащий полный набор из 18 аусосомных бивалентов и XY-бивалента, и зарегистрированы 2633 точки кроссинговера на 1098 аусосомах. Позицию центромеры в каждом биваленте определяли по положению флуоресцентного сигнала ANA-C. Хотя мы использовали один и тот же флуоро-

хром (FITC) для детекции антител против ANA-C и MLH1, центромеры давали значительно более сильный, крупный и диффузный сигнал, чем точки локализации MLH1 (см. рисунок). Длину СК каждого бивалента измеряли в микрометрах, используя программу MicroMeasure 3.3 (Reeves, 2001). Мы регистрировали расстояния между точками локализации MLH1 и центромерами, а также между соседними точками MLH1 в пределах плеча бивалента и через центромеру. Все данные в тексте и таблице представлены в виде средних значений и стандартных ошибок ($\bar{x} \pm s/\bar{x}$). Интенсивность интерференции мы оценивали по методу, предложенному Де Бур с соавторами (De Boer et al., 2006). Согласно этому методу, наблюдаемые распределения межточковых дистанций аппроксимируются гамма-распределением, параметры которого оцениваются методом максимального правдоподобия. Величина параметра формы распределения (v) используется как мера интерференции. Эти и другие статистические расчеты производили с использованием пакета программ STATISTICA.

Результаты и обсуждение

Общее число точек локализации MLH1 и общая длина СК на клетку и не различались достоверно у 3 животных, использованных в настоящей работе ($F = 1.8$, $df = 2$, $p = 0.18$ и $F = 1.9$, $df = 2$, $p = 0.16$ соответственно). Поэтому мы объединили данные, полученные по всем животным.

Среднее число точек локализации MLH1 в аусосомных бивалентах составляло 42.5 ± 0.8 и варьировало от 27 до 55. Исходя из предположения о том, что каждая точка MLH1 маркирует один кроссинговер, а каждый кроссинговер соответствует 50 сантиморганам (сМ), мы оценили общий размер генетической карты аусосомы домашней кошки как 2126 сМ. Учитывая, что в псевдоаусосомном районе XY-бивалента всегда происходит один кроссинговер (50 сМ), общая рекомбинационная длина генома самцов составляет 2176 сМ.

Полученная нами цитологическая оценка рекомбинационной длины генома самцов домашней кошки меньше, чем усредненная по полу оценка в 3300 сМ, полученная при анализе сегрегации по 328 маркерам в потомстве от скрещивания домашней и азиатской леопардовой кошки *Prionailurus bengalensis* (Menotti-Raymond et al., 2003). Можно указать по крайней мере три причины такого несогласования в оценках. Во-первых, длина генетических карт, оцененных по частоте кроссинговера между отдельными маркерами, оказывается, как правило, завышенной за счет суммирования коротких интервалов по сравнению с картами, построенными на основе учета цитологических данных. Во-вторых, хорошо известно, что частота рекомбинации в мейозе у самцов млекопитающих значительно ниже, чем у самок (Burt et al., 1991), и поэтому усредненная по самцам и самкам длина генетической карты всегда больше, чем оцененная на самцах. В-третьих, было показано, что межвидовые гибриды кошек характеризуются более высокой частотой рекомбинации, чем внутривидовые гетерозиготы (Grahn et al., 2005).

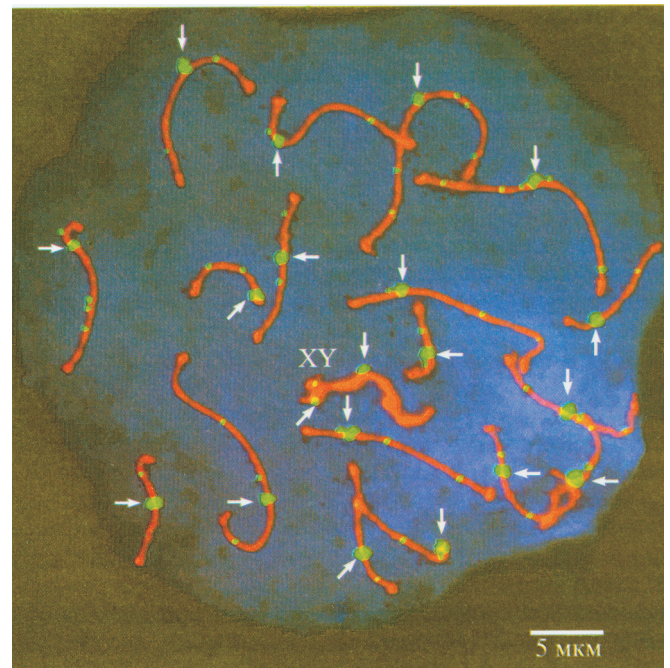
Интересно сравнить цитологические оценки плотности рекомбинации на физический размер генома у разных видов млекопитающих. Поскольку размер генома домашней кошки составляет 2800 млн пар нуклеотидов (Vinogradov, 1998), 1 сМ рекомбинационной карты со-

ответствует 1.3 млн пар нуклеотидов. Эта оценка идентична значению, полученному для человека (Sun et al., 2004, 2006), и вдвое выше оценок, полученных для мыши (2.8 млн пар нуклеотидов; Anderson et al., 1999) и обыкновенной землеройки (2.5 млн пар нуклеотидов; Borodin et al., 2006).

Средняя общая длина СК аутосомных бивалентов у котиков была равна 195.3 ± 4.0 мкм и варьировала от 141 до 293 мкм. Это хорошо согласуется с данными, полученными ранее при электронно-микроскопических исследованиях: 193 ± 29 мкм (Peterson et al., 1994) и 208 ± 3 мкм (Gillies, Cowan, 1985). Мы обнаружили положительную корреляцию между длиной СК индивидуальных хромосом и числом точек локализации MLH1 ($R^2 = 0.446$; $P < 0.001$; уравнение линейной регрессии: $y = 0.157x + 0.691$). Аналогичная зависимость также была обнаружена при исследованиях на хромосомах человека (Lynn et al., 2002; Sun et al., 2004, 2006), мыши (Anderson et al., 1999; Froenicke et al., 2002) и обыкновенной бурозубки (Borodin et al., 2006).

По плотности обменов на единицу длины СК кошка занимает первое место среди всех исследованных млекопитающих. У кошки один кроссинговер приходится в среднем на 4.68 ± 0.05 мкм СК, у мыши — на 7.13 (Anderson et al., 1999), у бурозубки — на 6.36 (Borodin et al., 2006) и у человека на — 5.98 мкм (Sun et al., 2004). Среднее расстояние между двумя соседними точками MLH1 в пределах плеча хромосомы у кошки равно 3.68 ± 0.05 мкм, а нижний предел этого расстояния составляет всего 0.3 мкм и находится на грани разрешающей способности микроскопа. Интересно, что у кошки в отличие от остальных видов млекопитающих среднее расстояние между соседними точками локализации MLH1 мало зависит от количества обменов на хромосоме (см. таблицу). Расстояние между соседними точками, разделенными центромерой, достоверно больше, чем между точками в пределах плеча хромосомы. Однако в целом супрессирующий эффект центромеры на рекомбинацию у кошки выражен гораздо слабее, чем, например, у человека и мыши (Anderson et al., 1999; Sun et al., 2004). Мы наблюдали точки локализации MLH1, отстоящие от центромеры менее чем на 0.5 мкм (см. рисунок).

Все это указывает на то, что для хромосом кошки характерна крайне слабая интерференция обменов. В ряде



Распластанный препарат СК сперматоцита кошки, окрашенный DAPI (синий сигнал) и меченными флуорохромом антителами к SCP3 (красный), MLH1 и кинетохорам (зеленый).

Центромерные районы (отмечены стрелками) отличаются от точек локализации MLH1 более крупными размерами и ярким окрашиванием. XY — половой бивалент.

работ было показано, что распределение дистанций между кроссоверными обменами лучше всего аппроксимируется гамма-распределением (McPeck, Speed, 1995; Bromann et al., 2002; De Boer et al., 2006). Данное распределение описывает вероятность дистанций, которые должны быть между точками кроссинговера, если двухнитевые разрывы распределены по биваленту случайно и каждый n -ый разрыв репарируется по кроссоверному пути. Если каждый разрыв дает кроссинговер ($n = 1$), то интерференция отсутствует. Чем больше значение n , тем меньшая доля разрывов трансформируется в кроссоверы и тем сильнее интерференция. Значение n может быть оценено через параметр формы (v) гамма-распределения. Исследования рекомбинации у мыши и бурозубки дали близкие значения этого параметра — около 14—18 (De Boer et al., 2006; Borodin et al., 2006), следовательно, у данных видов лишь 5—7 % двухнитевых разрывов ДНК репарируется по кроссоверному пути.

Для кошки мы получили втрое более низкие значения параметров v (см. таблицу), т. е. мы можем предполагать, что к кроссинговеру приводит примерно 25 % всех двухнитевых разрывов ДНК. При этом кошка по плотности рекомбинации на единицу физического размера генома практически не отличается от человека и лишь вдвое превышает мышь и бурозубку. На пекарских дрожжах с использованием серии мутаций в гене *spo11*, белковый продукт которого вызывает образование двухнитевых разрывов ДНК в профазе мейоза, было показано, что снижение числа разрывов в 3—5 раз не приводило к достоверному снижению выхода кроссоверов (Martini et al., 2006). Принимая во внимание эти данные, мы можем допустить, что процесс рекомбинации у кошки организован более экономично, чем у других изученных видов млекопитающих.

Дистанции между двумя соседними точками локализации MLH1 на пахитенных хромосомах домашней кошки

Точки	Число обменов на хромосоме	Число исследованных хромосом	Средняя дистанция, мкм, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	v -Параметр гамма-распределения
Внутри плеча	4	26	3.07 ± 0.33	3.77
	3	195	3.56 ± 0.13	3.39
	2	580	3.70 ± 0.07	5.02
	2—4	801	3.64 ± 0.06	4.42
Разделенные центромерой	5	32	4.80 ± 0.35	5.66
	4	116	4.69 ± 0.19	5.26
	3	326	4.81 ± 0.13	4.25
	2	419	4.18 ± 0.12	3.08
	2—5	1075	4.23 ± 0.07	3.41
Все точки	2—5	1876	3.98 ± 0.05	3.71

ших: при меньшем числе двухнитевых разрывов ДНК он обеспечивает достаточно высокий уровень кроссинговера.

Таким образом, мы установили, что отличительными особенностями рекомбинации у домашней кошки являются очень высокая плотность обменов на единицу длины СК и низкая интерференция обменов. К сожалению, число видов млекопитающих, у которых процесс рекомбинации изучен достаточно подробно, слишком мало. Поэтому остается неясным, являются ли обнаруженные нами особенности кроссинговера характеристикой всего отряда хищных млекопитающих, семейства кошачьих, отдельного вида домашней кошки или домашних животных. Ранее было показано, что домашние животные и растения характеризуются более высокой частотой рекомбинации, чем их дикие сородичи (Burt, Bell, 1987; Ross-Ibarra, 2004).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, программ РАН «Происхождение и эволюция биосферы» и «Биоразнообразии и динамика генофондов человека, животных и растений».

Список литературы

- Богданов Ю. Ф. 2003. Изменчивость и эволюция мейоза. Генетика. 39 (4) : 453—473.
- Жученко А. А., Король А. Б. 1985. Рекомбинация в эволюции и селекции. М.: Наука. 400 с.
- Король А. Б., Прейгель И. А., Прейгель С. И. 1990. Изменчивость кроссинговера у высших организмов. Кишинев: Штиинца. 404 с.
- Anderson L. K., Reeves A., Webb L. M., Ashley 1999. Distribution of crossovers on mouse chromosomes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. Genetics. 151 : 1569—1579.
- Baker S. M., Plug A. W., Prolla T. A., Bronner C. E., Harris A. C., Yao X., Christie D. M., Monell C., Arnheim N., Bradley A., Ashley T., Liskay R. M. 1996. Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. Nat. Genet. 13 : 336—342.
- Borodin P. M., Belonogova N. M., Karamysheva T. V., Rubtsov N. B., Polyakov A. V., Searle J. B. 2006. Male shrew recombination maps for each chromosome identified by DAPI-banding. Eur. J. Hum. Genet. 14 (Supplement 1) : 181—182.
- Broman K. W., Rowe L. B., Churchill G. A., Paigen K. 2002. Crossover interference in the mouse. Genetics. 160 : 1123—1131.
- Burt A., Bell G. 1987. Mammalian chiasma frequencies as a test of two theories of recombination. Nature. 326 : 803—805.
- Burt A., Bell G., Harvey P. H. 1991. Sex differences in recombination. J. Evol. Biol. 4 : 259—277.
- De Boer E., Stam P., Dietrich A. J. J., Pastink A., Heyting C. 2006. Two levels of interference in mouse meiotic recombination. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 103 : 9607—9612.
- Froenicke L., Anderson L. K., Wienberg J., Ashley T. 2002. Male mouse recombination maps for each autosome identified by chromosome painting. Amer. J. Hum. Genet. 71 : 1353—1368.
- Gillies C. B., Cowan S. K. 1985. The pachytene synaptonemal complex complement of the cat. Genetica. 67 : 99—107.
- Grahn R. A., Lemesch B. M., Millon L. V., Matisse T., Rogers Q. R., Morris J. G., Fretwell N., Bailey S. J., Batt R. M., Lyons L. A. 2005. Localizing the X-linked orange colour phenotype using feline resource families. Animal Genetics. 36 : 67—70.
- Jones G. H., Franklin F. C. 2006. Meiotic crossing over: obligation and interference. Cell. 126 : 246—248.
- Koehler K. E., Cherry J. P., Lynn A., Hunt P. A., Hassold T. J. 2002. Genetic control of mammalian meiotic recombination. I. Variation in exchange frequencies among males from inbred mouse strains. Genetics. 162 : 297—306.
- Lynn A., Koehler K. E., Judis L., Chan E. R., Cherry J. P., Schwartz S., Seftel A., Hunt P. A., Hassold T. J. 2002. Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. Science. 296 : 2222—2225.
- Martin E., Diaz R. L., Hunter N., Keeney S. 2006. Crossover homeostasis in yeast meiosis. Cell. 126 : 285—295.
- McPeck M. S., Speed T. P. 1995. Modeling interference in genetic recombination. Genetics. 139 : 1031—1044.
- Menotti-Raymond M., David V. A., Roelke M. E., Chen Z. Q., Menotti K. A., Sun S., Schaffer A. A., Tomlin J. F., Agarwala R., O'Brien S. J., Murphy W. J. 2003. Second-generation integrated genetic linkage/radiation hybrid maps of the domestic cat (*Felis catus*). J. Hered. 94 : 95—106.
- Otto S. P., Lenormand T. 2002. Resolving the paradox of sex and recombination. Nat. Rev. Genet. 3 : 252—361.
- Page S. L., Hawley R. S. 2003. Chromosome choreography — the meiotic ballet. Science. 301 : 785—789.
- Peters A. H. F. M., Plug A. W., van Vugt M. J., de Boer P. 1997. A drying-down technique for spreading of mammalian spermatocytes from the male and female germline. Chrom. Res. 5 : 66—71.
- Peterson D. G., Stack S. M., Healy J. L., Donohoe B. S., Anderson L. K. 1994. The relationship between synaptonemal complex length and genome size four vertebrate classes (Osteichthyes, Reptilia, Aves, Mammalia). Chrom. Res. 2 : 153—162.
- Reeves A. 2001. Micromeasure: a new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. Genome. 44 : 439—443.
- Roeder G. S. 1997. Meiotic chromosomes: it takes two to tango. Genes and Development. 11 : 2600—2621.
- Ross-Ibarra J. 2004. The evolution of recombination under domestication: a test of two hypotheses. Amer. Nat. 163 : 105—112.
- Sun F., Oliver-Bonet M., Liehr T., Starke H., Ko E., Rademaker A., Navarro J., Benet J., Martin R. H. 2004. Human male recombination maps for individual chromosomes. Amer. J. Hum. Genet. 74 : 521—531.
- Sun F., Oliver-Bonet M., Liehr T., Starke H., Turek P., Ko E., Rademaker A., Martin R. H. 2006. Variation in MLH1 distribution in recombination maps for individual chromosomes from human males. Hum. Mol. Genet. 15 : 2376—2391.
- Vinogradov A. E. 1998. Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: the triangular relationship. Cytometry. 31 : 100—109.
- Zickler D., Kleckner N. 1999. Meiotic chromosomes: integrating structure and function. Annu. Rev. Genet. 33 : 603—754.

IMMUNOFLUORESCENT ANALYSIS OF MEIOTIC RECOMBINATION
AND INTERFERENCE IN THE DOMESTIC CAT*P. M. Borodin,^{1,2,*} T. V. Karamysheva,¹ N. B. Rubtsov^{1,2}*¹ Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch of RAS, Novosibirsk, and² Chair of Cytology and Genetics of Novosibirsk State University;

* e-mail: borodin@bionet.nsc.ru

The aim of this work was an analysis of frequency, density and distribution of recombination sites in male meiosis of the domestic cat. The study was carried out using immunofluorescent staining of synaptonemal complex (SC) proteins, centromeric proteins and mismatch repair protein MLH1, a reliable marker of the sites of crossing over. We mapped 2633 sites of crossing over at 1098 individual autosomes. On the basis of these data the total length of the domestic cat genetic map was estimated as 2176 centimorgans. We found a typical for all mammals studied positive correlation between the length of SC and the number of recombination sites. The domestic cat demonstrated the highest among mammals density of recombination and the lowest interference.

Key words: meiosis, recombination, crossing over, interference, synaptonemal complex, MLH1.
