

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕЛОМЕРНОЙ ДНК В ХРОМОСОМАХ ОБЫКНОВЕННОЙ БУРОЗУБКИ *SOREX ARANEUS*, EULIROTYPHLA

© Н. С. Жданова,¹ Ю. И. Rogozина, Ю. М. Минина, П. М. Бородин, Н. Б. Рубцов

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск;

¹ электронный адрес: zhdanova@bionet.nsc.ru

Показано, что хромосомы бурозубки иберийской *Sorex granarius* имеют необычную для млекопитающих структуру теломер: теломеры на коротких плечах акроцентриков содержат в среднем 213 т. п. н. теломерного повтора, тогда как на остальных концах хромосом — только 3.8 т. п. н. Оставалось неясным, характерны такие теломеры для хромосом всех видов бурозубок или только для *S. granarius*. Обыкновенная бурозубка *Sorex araneus* и *S. granarius* являются видами-близнецами. В данном исследовании с использованием модифицированного метода Q-FISH было продемонстрировано, что теломеры на хромосомах *S. araneus* разных хромосомных рас, различающихся числом и составом метацентриков, содержат 6.8—15.2 т. п. н. теломерной ДНК. Таким образом, размер теломер у *S. araneus* укладывается в рамки, характерные для подавляющего большинства видов млекопитающих, а *S. granarius* имеет теломеры уникальной или редко встречающейся структуры. Используя высокоспецифичные к теломерным последовательностям ДНК и РНК модифицированные пробы (PNA и LNA), мы установили, что интерстициальные сайты теломерной ДНК в хромосомах *S. araneus* содержат в основном теломерную ДНК, а их локализация совпадает с локализацией районов эволюционных перестроек. В хромосомах *S. granarius* интерстициальной теломерной ДНК выявлено не было. Таким образом, распределение теломерной ДНК может существенно различаться в хромосомах даже близкородственных видов, кариотипы которых составлены практически из идентичных хромосомных плеч.

Ключевые слова: теломера, модифицированный метод Q-FISH, обыкновенная бурозубка, иберийская бурозубка, интерстициальные теломерные последовательности (ITS), PNA- и LNA-пробы к теломерным последовательностям.

Принятые сокращения: т. п. н. — тысячи пар нуклеотидов, ITS — интерстициальные теломерные последовательности в хромосомах, LNA (locked nucleic acid) — модифицированные РНК-олигонуклеотиды, PNA (peptide nucleic acid) — модифицированные ДНК-олигонуклеотиды, Q-FISH — количественная флуоресцентная гибридизация *in situ*, STELA-анализ — определение длины теломер на отдельных хромосомах с помощью праймеров к аллелям, локализованным в субтеломерных районах отдельных хромосом.

Теломеры играют важную роль в сохранении целостности хромосом. Показано, что изменение количества теломерной ДНК и дисфункция теломер приводят к нарушению стабильности генома, репликативному старению, апоптозу и онкотрансформации (Bolzan, Bianchi, 2006). Длина теломер хромосом человека в среднем составляет 15 т. п. н. в клетках зародышевого пути и может уменьшаться до 2 т. п. н. в стареющих соматических клетках (Riethman, 2008). Обнаружена вариация в размерах теломер между отдельными хромосомами человека (Levy et al., 1992; Lansdorf et al., 1996; Riethman, 2008). У диких млекопитающих длина теломер варьирует от 5 до нескольких десятков т. п. н. (Bolzan, Bianchi, 2006).

Ранее мы показали, что один из видов бурозубок, бурозубка иберийская *Sorex granarius*, имеет необычные для млекопитающих длину, локализацию и структуру теломер. Короткие плечи 32 акроцентриков *S. granarius* заканчиваются гигантскими теломерами, содержащими до 300 т. п. н. (в среднем 213) теломерного повтора, тогда как дистальные концы акроцентриков и концы 4 метацен-

триков содержат в среднем 3.8 т. п. н. (Zhdanova et al., 2005, 2007a, 2007b). Вопрос о том, характерны ли такие необычные теломеры для других видов бурозубок либо они сформировались только у *S. granarius*, оставался открытым.

У многих видов млекопитающих теломерная ДНК выявлена в интерстициальных хромосомных сайтах (ITS), которые по локализации часто совпадают с районами конститутивного гетерохроматина и ядрышковых организаторов. Иногда эти сайты представляют собой районы эволюционных преобразований хромосом. Описаны как виды, содержащие крупные блоки интерстициальной теломерной ДНК, так и виды, у которых ITS не выявляются вообще (Meune et al., 1990; Forsyth et al., 2002; Жданова и др., 2007).

Задача данной работы заключалась в том, чтобы проанализировать размеры теломер и локализации теломерных повторов у представителей разных хромосомных рас обыкновенной бурозубки *Sorex araneus*. Данный вид принадлежит к тому же роду, что и иберийская бурозубка. Их

Т а б л и ц а 1

**Описание кариотипов *Sorex granarius* и *S. araneus*
(по Wojcik et al., 2003)**

Вид, раса	Кариотип самки	2n самки/самца ^a
<i>S. granarius</i>	<i>de, tu, a, b, c, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r</i>	36/37
<i>S. araneus</i> , Cordon	<i>de, tu, af, bc, jl, g, h, i, k, m, n, o, p, q, r</i>	30/31
<i>S. araneus</i> , Томская	<i>de, tu, af, bc, jl, gk, hi, mn, o, p, q, r</i>	24/25
<i>S. araneus</i> , Новосибирская	<i>de, tu, af, bc, jl, ik, go, hn, mp, qr</i>	20/21

^a Бурозубки характеризуются определением пола XX/XY1Y2. Гомеологом X-хромосомы млекопитающих является плечо *e* хромосомы *de*, Y1 — истинной Y-хромосомой, а Y2 — плечом *d* хромосомы *de*. По принятой классификации хромосомные плечи и акроцентрики обозначаются в порядке убывания их размера латинскими буквами от *a* до *u*, а метацентрики — сочетанием букв (Searle et al., 1991).

кариотипы составлены практически из одинаковых хромосомных плеч. Для вида *S. araneus* характерен исключительный хромосомный полиморфизм, выражающийся в основном в Робертсоновских перестройках (Volobouev, Dutrillaux, 1991; Wojcik et al., 2003). Сравнение этих видов позволит установить, насколько уникальной является необычная структура теломер, обнаруженная у *S. granarius*.

Материал и методика

Для исследований были использованы следующие реактивы: антифейд (Vectashield, Vector, США), антитела козы к авидину, конъюгированные с ФИТЦ (Vector, США), бычий сывороточный альбумин, декстрансульфат, ДНК спермы лосося, колхицин (Sigma, Германия), культуральная среда Игла и F10 (Sigma, Германия), метанол (Реахим, Россия), меченная биотином PNA-теломерная проба (СССААТ)₃, меченная Су3 PNA-теломерная проба (СССААТ)₃ и меченная ФИТЦ LNA-теломерная проба (GGGTТА)₇ (Applied Biosystems, США), панкреатическая РНКазы А (Sigma, Германия), сыворотка крови эмбрионов крупного рогатого скота (HyClone, США), трипсин, Трипон Х-100 (Sigma, Германия), уксусная кислота, этанол (Реахим, Россия), формальдегид, формамид, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), DAPI (4',6-диамино-2-фенилиндо), Tris-основание и Tris-HCl (Sigma, Германия), PBS в таблетках (Helicon, Россия), SDS (додецилсульфат натрия), Tween 20 (Sigma, Германия).

В работе использовали полученные из межреберных мышц фибробласты клеточных культур *S. granarius* и *S. araneus* рас Новосибирская, Томская и Cordon на 2—10-м пассажах культивирования.

Препараты метафазных хромосом готовили по общепринятой методике, используя гипотоническую обработку 0.56%-ным KCl в течение 20 мин при 37 °С. FISH с PNA- и LNA-теломерными пробами проводили согласно описанным методам (Zijlmans et al., 1997). После FISH хромосомы окрашивали DAPI, заключая препарат в антифейд, содержащий краситель.

Для определения размеров теломер в хромосомах *S. araneus* был использован модифицированный метод количественной флуоресцентной гибридизации in situ (Q-FISH) с меченной Су3 PNA-пробой к теломерным последовательностям (Wong, Slijpersevic, 2004). В качестве стандарта использовали теломеры *S. granarius*. Ранее дли-

на этих теломер была определена с помощью стандартной Q-FISH (Zhdanova et al., 2005). Чтобы провести сравнение длины разных теломер максимально корректно, были использованы препараты с метафазными пластинками из смешанной культуры, содержащей фибробласты *S. granarius* и *S. araneus* рас Томская и Cordon. Особенности кариотипов использованных видов и рас (табл. 1) позволяли без труда определять видовую и расовую принадлежность метафаз. Было проанализировано 10 метафазных пластинок от каждого животного. Анализ препаратов проводили с помощью микроскопа AxioPlan2 Imaging (Zeiss, Германия), оснащенного CCD-камерой (CV M300, JAI Corporation, Япония) и набором фильтров Chroma, в Центре анализа микроскопических объектов Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Чтобы избежать проблем, связанных с изменением со временем интенсивности свечения УФ-лампы, съемку всех имиджей проводили в течение одной фотосессии при одной и той же выдержке. Условия съемки были подобраны так, чтобы на метафазах *S. granarius* можно было измерить интенсивность сигнала FISH на всех коротких теломерах. Интенсивность сигнала и площадь сигнала в пикселях определяли с помощью пакета программ ISIS5 MetaSystems GmbH. Уровень фона измеряли в непосредственной близости от анализируемых теломерных районов. Интенсивность сигнала теломерного района рассчитывали как разность интенсивности свечения сигнала, определенной в теломерном районе, и фонового сигнала на равной площади.

Сравнение интенсивностей сигналов в теломерных районах в разных группах теломер проводили с помощью пакета программ STATISTICA 6 (StatSoft Inc., США), используя критерий Манна—Уитни.

Для выявления ITS использовали меченную биотином PNA-пробу и меченную ФИТЦ LNA-пробу. Пробу, меченную биотином, визуализировали с помощью авидин-ФИТЦ согласно стандартному протоколу. В каждом случае анализировали не менее 100 метафаз. Идентификацию хромосом *S. araneus* проводили после FISH согласно номенклатуре хромосом этого вида (Minina et al., 2007). Хромосомные плечи и акроцентрики бурозубок согласно современной номенклатуре обозначаются буквами латинского алфавита, а дуплетные хромосомы — сочетанием букв (табл. 1). Такой тип обозначения хромосом отражает тот факт, что, согласно современным представлениям, предковый кариотип землероек состоял из акроцентриков, а Робертсоновские перестройки играли определяющую роль в их эволюции.

Результаты и обсуждение

Теломерные повторы на концах хромосом *Sorex araneus*. Одним из способов определения количества теломерной ДНК в хромосомах является процедура Q-FISH, сочетающая FISH с PNA-пробой и цифровую микроскопию. PNA представляет собой модифицированные ДНК-олигонуклеотиды (Nielsen et al., 1991). В них фосфатный скелет заменен псевдопептидной цепью, гомоморфной форме ДНК, к которой карбоксильными связями присоединяются пурины и пиримидины. В отличие от ДНК модифицированные ДНК-олигонуклеотиды не заряжены. В результате при гибридизации с субстратом не происходит электростатического отталкивания пробы и субстрата. В силу этого связь PNA—ДНК или PNA—РНК гораздо стабильнее, чем связь ДНК—ДНК или ДНК—РНК. Особенностью гибридизации PNA с ДНК или РНК является высокая специфичность и стабильность образовавшихся дуплексов и триплексов. Замена хотя бы одного нуклеотида в матрице приводит к резкому снижению эффективности гибридизации PNA-проб (Ray, Norden, 2000; Demidov, 2003). Такие свойства PNA позволили использовать их в FISH для определения размеров теломер.

Q-FISH основана на соотношении интенсивности измеряемого сигнала с интенсивностью сигнала от стандарта, содержащего известное количество теломерного гексамера (Lansdorp et al., 1996; Zhdanova et al., 2005). Недавно для упрощения процедуры был предложен модифицированный количественный метод, когда в качестве стандарта при определении теломерной ДНК в каком-либо районе хромосомы могут быть использованы теломеры, для которых размер ранее был определен с помощью Q-FISH. Предложенный способ дал хорошие результаты (Wong, Slijepcevic, 2004). Мы использовали данный подход для определения размера теломер в хромосомах *S. araneus* из двух хромосомных рас, различающихся числом и составом метацентрических хромосом (табл. 1). В качестве стандарта были использованы длинные и короткие теломеры хромосом *S. granarius*, размер которых был ранее определен с помощью Q-FISH (Zhdanova et al., 2005).

Данные по измерению интенсивности свечения теломер приведены в табл. 2. В нашем эксперименте отношение средней интенсивности свечения сигналов в длинных теломерах *S. granarius*, т. е. теломерах, локализованных на коротких плечах акроцентриков, к средней интенсивности свечения сигналов в остальных теломерах составляло 74 ($P < 0.001$), а значение этой величины, определенное с помощью стандартной Q-FISH, составляет 56 ($P < 0.001$) (Zhdanova et al., 2005). Такие оценки вполне соответствуют точности измерений, получаемых в повторных экспериментах с использованием Q-FISH (Wong, Slijepcevic, 2004), и свидетельствуют о том, что используемые нами протокол и техника пригодны для использования их в модифицированной Q-FISH.

Отношение средней интенсивности свечения сигнала в длинных теломерах *S. granarius* к средней интенсивности свечения сигнала в теломерах *S. araneus* расы Cordon оказалось равным 31.3 ($P < 0.001$). Отношение средней интенсивности свечения сигналов в теломерах *S. araneus* расы Cordon к средней интенсивности свечения сигналов в коротких теломерах *S. granarius* составило 2.36 ($P < 0.001$). Учитывая данные по длине теломер у *S. granarius* (213 т. п. н. на коротких плечах акроцентриков и 3.8 на

Таблица 2

Средние интенсивности свечения теломерных сигналов на концах хромосом *Sorex granarius* и *S. araneus* (расы Томская и Cordon)

Параметр	<i>Sorex araneus</i> , хромосомная раса			
	<i>Sorex granarius</i>		Томская	
Локализация теломер	на коротких плечах акроцентриков	на метацентриках и длинных плечах акроцентриков	на коротких плечах акроцентриков	на коротких плечах акроцентриков
	на длинных плечах акроцентриков	на коротких плечах акроцентриков	на длинных плечах акроцентриков	на длинных плечах акроцентриков
Средняя интенсивность теломерного сигнала за вычетом фона, $\bar{x} \pm S_x$	344 551 ± 5895	4657 ± 140	11 006 ± 282	12 066 ± 668
			10 799 ± 435	13 416 ± 675
			18 583 ± 489	
			9706 ± 355	

Примечание. Использовали препараты с метафазными пластинками из смешанной культуры, содержащей фибробласты *S. granarius* и *S. araneus* рас Томская и Cordon. Проанализировано 10 метафазных пластинок каждого вида или расы. Уровень фона измеряли в непосредственной близости от анализируемых теломерных районов. Интенсивность сигнала теломерного района рассчитывали как разность сигнала, определенного в теломерном районе, и фонового сигнала на равной площади.

Таблица 3

**Частота выявления интерстициальных теломерных последовательностей
в хромосомах *Sorex araneus* при использовании FISH с PNA- и LNA-пробами**

Хромосома	Частоты, выявляемые с помощью PNA-пробы, %		
	Томская раса	Новосибирская раса	раса Cordon
<i>tu</i>	54 (cen) ^a	48.5 (cen)	53.5 (cen)
<i>de</i>	29 (cen)	35 (cen)	25 (cen)
<i>Y2</i>	8	3	—
<i>af</i>	1.5 (cen), 41.5 (<i>a1.5</i>) ^b	51 (<i>a1.5</i>)	0.5 (cen), 48 (<i>a1.5</i>)
<i>bc</i>	4.5 (cen), 75.5 (<i>c1.2</i>)	2 (cen), 69.5 (<i>c1.2</i>)	1 (cen), 75 (<i>c1.2</i>)
<i>jl</i>	74 (cen), 14.5 (<i>l1.5</i>), 10 (<i>j2.2</i>), 4 (<i>j1.3</i>)	64 (cen), 13.5 (<i>l1.5</i>), 9.5 (<i>j2.2</i>), 1 (<i>j1.3</i>)	66 (cen), 23.5 (<i>l1.5</i>), 13.5 (<i>j2.2</i>), 4 (<i>j1.3</i>)
<i>gk</i>	79.5 (cen)	— ^b	—
<i>hi</i>	89 (cen)	—	—
<i>mn</i>	87.5 (cen)	—	—
<i>ik</i>	—	76 (cen)	—
<i>go</i>	—	67.5 (cen)	—
<i>hn</i>	—	73.5 (cen)	—
<i>mp</i>	—	83.5 (cen)	—
<i>qr</i>	—	86 (cen)	—
Частоты, выявляемые с помощью LNA-пробы, %			
<i>tu</i>	17 (cen)	22 (cen)	36.5 (cen)
<i>de</i>	3 (<i>d</i>), 32 (cen)	1 (<i>e</i>), 22 (cen)	2 (<i>d</i>), 0.5 (<i>e</i>), 26.5 (cen)
<i>af</i>	42.5 (<i>a1.5</i>), 0.5 (cen)	42.5 (<i>a1.5</i>)	47.5 (<i>a1.5</i>), 4.5 (cen)
<i>bc</i>	93.5 (<i>c1.2</i>), 0.5 (cen)	97.5 (<i>c1.2</i>)	94 (<i>c1.2</i>), 9.5 (<i>c</i>), 0.5 (cen)
<i>jl</i>	5.5 (<i>j1.3</i>), 4.5 (<i>j2.2</i>), 20.5 (<i>l1.5</i>), 80 (cen)	2 (<i>j1.3</i>), 1.5 (<i>j2.2</i>), 10 (<i>l1.5</i>), 75 (cen)	7 (<i>j1.3</i>), 14 (<i>j2.2</i>), 31.5 (<i>l1.5</i>), 91.5 (cen)
<i>gk</i>	96 (cen)	—	—
<i>hi</i>	100 (cen)	—	—
<i>mn</i>	97.5 (cen)	—	—
<i>ik</i>	—	96 (cen)	—
<i>go</i>	—	88 (cen)	—
<i>hn</i>	—	94.5 (cen)	—
<i>mp</i>	—	98.5 (cen)	—
<i>qr</i>	—	99.5 (cen)	—

Примечание. ^acen — прицентромерный район. ^bРайон соответствующего плеча хромосомы согласно принятой для этого вида международной классификации хромосом (Minina et al., 2007). ^вПрочерк указывает на отсутствие в данной расе соответствующей хромосомы (см. табл. 1). Хромосомы, не представленные в изученных расах (см. табл. 1), или хромосомы, в которых не было выявлено ITS, в таблице не приведены.

остальных концах хромосом: Zhdanova et al., 2005), можно подсчитать размер теломер у *S. araneus* расы Cordon. Он составил 6.8—9.0 т. п. н. Аналогичный подсчет показал, что размер теломер в хромосомах *S. araneus* Томской расы составляет 11.5—15.2 т. п. н. Причем как для расы Cordon, так и для Томской расы количество теломерного повтора на коротких и длинных плечах акроцентриков не различалось (табл. 2).

Таким образом, согласно нашим данным, размер теломер в хромосомах изученных рас *S. araneus* составляет 6.8—15.2 т. п. н., что укладывается в рамки, характерные для теломер ранее изученных диких видов млекопитающих, но существенно отличается от его количества на концах хромосом *S. granarius*. В отличие от вида *S. granarius*, для которого характерны выраженные различия по

количеству теломерной ДНК на разных концах хромосом, теломеры на коротких и длинных плечах акроцентриков рас Cordon и Томской *S. araneus* не различались по количеству теломерного повтора.

Как мы указывали ранее, для вида *S. araneus* характерен внутривидовой полиморфизм, обусловленный главным образом Робертсоновскими транслокациями. Раса Cordon среди других хромосомных рас *S. araneus* выделяется тем, что содержит наименьшее число метацентриков. Считается, что в этой расе сохранился примитивный карิโอтип вида (табл. 1) и, как мы показали, размер теломер, характерный для хромосом подавляющего большинства видов млекопитающих. Формирование в хромосомах *S. granarius* необычных по размеру, структуре и локализации теломер мы связываем с совместной амплификацией

теломерной и рибосомной ДНК, которая была, по-видимому спровоцирована распадом нескольких метацентриков при формировании кариотипа вида (Taberlet et al., 1994; Zhdanova et al., 2007a). Таким образом, *S. granarius* обладает действительно уникальной или редко встречающейся как среди бурозубок, так и среди других млекопитающих структурой теломер.

Теломерная ДНК в интерстициальных сайтах хромосом *S. araneus*. Ранее, используя полученную методом ПЦР теломерную пробу, мы показали, что в прицентромерных районах метацентриков *S. granarius* Новосибирской расы ITS встречаются тем реже, чем раньше они сформировались в ходе кариотипической эволюции вида. Складывалось впечатление, что формирование метацентриков проходило с сохранением части теломерной ДНК, которая со временем модифицировалась или терялась (Zhdanova et al., 2005). Однако использованная нами проба не обладала высокой специфичностью к теломерным повторам и наряду с теломерной выявляла теломероподобную ДНК. В результате осталось неясным, действительно ли выявленные ITS содержат теломерную ДНК или только теломероподобную. Чтобы ответить на этот вопрос и оценить межрасовую изменчивость в локализации ITS в хромосомах обыкновенной бурозубки, мы изучили у представителей трех хромосомных рас (Новосибирской, Томской и Cordon), различающихся числом и составом метацентриков (табл. 1), частоту ITS с помощью высокочувствительных PNA- и LNA-проб. Полученные данные приведены в табл. 3. Наблюдались схожие закономерности в распределении ITS в хромосомах рас Новосибирская, Томская и Cordon после проведения FISH как с PNA-, так и LNA-пробами. Несмотря на то что детекция PNA-пробы проводилась после усиления сигналов, тогда как LNA-проба была прямо меченной, частота выявления ITS была в основном выше при использовании LNA-пробы, чем PNA.

Особенности структуры PNA были рассмотрены нами выше, поэтому здесь мы остановимся лишь на описании LNA-проб. LNA-олигонуклеотиды представляют собой бициклические синтетические аналоги РНК, характеризующиеся наряду с высокой аффинностью к ДНК и РНК еще и беспрецедентной термостабильностью образующихся комплексов (Elayadi, Corey, 2001). Сравнения чувствительности PNA- и LNA-проб в экспериментах с FISH не проводилось. Однако данные об особенностях структуры LNA и успешное использование LNA в экспериментах по идентификации однонуклеотидного полиморфизма (Kennedy et al., 2006) позволяют думать, что LNA-проба может более надежно выявлять интактные теломерные последовательности, чем проба PNA. Тем не менее в прицентромерном районе хромосомы *tu* ITS выявлялись с более высокой частотой, когда в FISH использовались не LNA-, а PNA-проба (табл. 3). По-видимому, наряду с теломерной этот интерстициальный сайт содержит значительное количество теломероподобной ДНК, которая лучше выявляется PNA-, чем LNA-пробой.

Наиболее часто ITS выявлялись в прицентромерных районах хромосом *S. araneus*. Во всех трех расах высокая частота встречаемости ITS была характерна для прицентромерного района хромосом *jl* (64.0/91.5%), а также для хромосом *ik*, *go*, *hn*, *mp* и *qr* в Новосибирской расе (67.5/99.5%) и хромосомы *gk*, *hi* и *mn* в Томской расе (79.5/100.0%). Здесь и далее в скобках через косую черту приведены минимальные и максимальные значения частот ITS в определенном районе в трех изученных расах,

полученные с помощью FISH с использованием теломерных PNA- и LNA-проб. В хромосоме *tu* ITS прицентромерной локализации встречались несколько реже (17/54%), а в хромосоме *de* — еще реже (22/35%). В хромосомах *af* и *bc* ITS практически выявлено не было.

Подробное изучение эволюции кариотипов у бурозубок группы видов *Sorex araneus*, куда входят как *S. araneus*, так и *S. granarius*, показало, что их кариотипы составлены практически из идентичных хромосомных плеч. Было показано, что хромосомы *af*, *bc* и *de* характерны не только для *S. araneus*, но и для других видов группы *Sorex araneus* (Searle et al., 1991; Volobouev, Dutrillaux, 1991). Их можно условно назвать «старыми» метацентриками. В этих хромосомах прицентромерные ITS или не детектировались вовсе (*af*, *bc*), или частота детекции не превышала 35% (*de*).

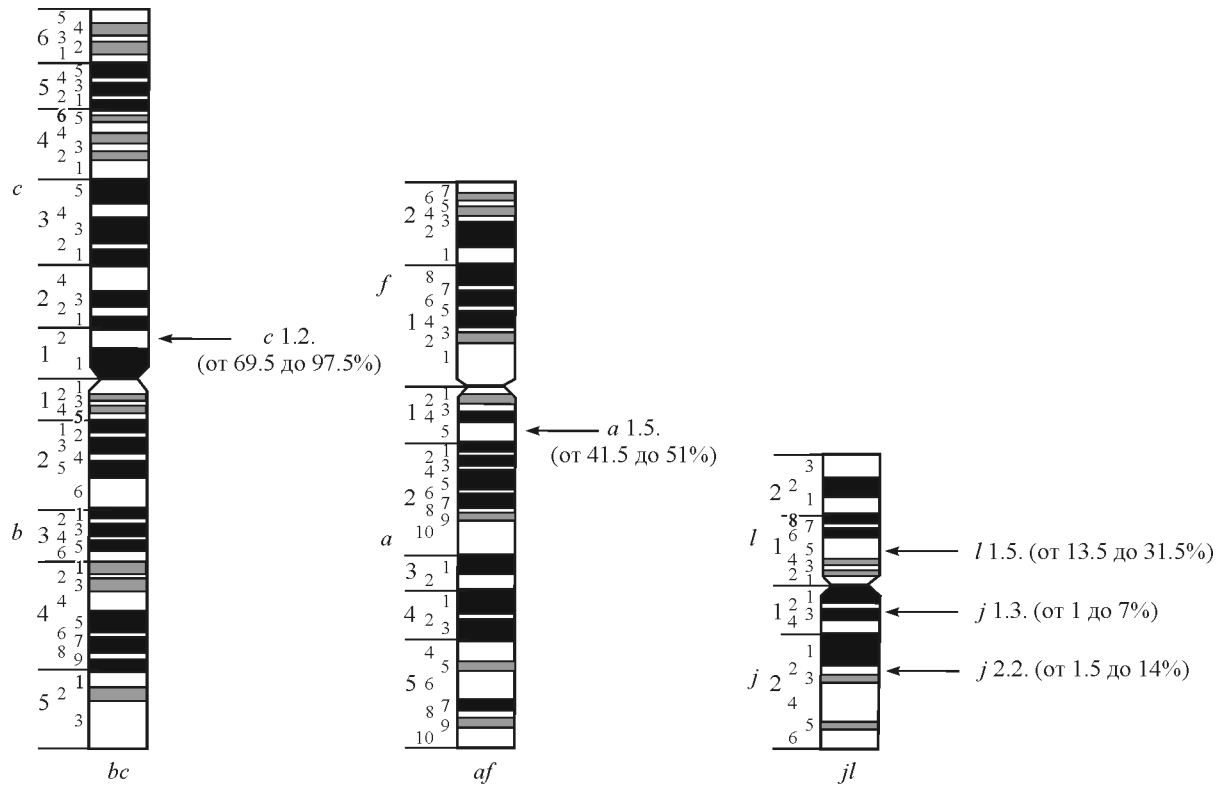
Хромосома *tu* также выявляется у видов группы *Sorex araneus*, т. е. по времени формирования она может быть отнесена к «старым» метацентрикам. Однако согласно нашим данным, частота выявления в ней прицентромерных ITS достаточно высока. Предполагается, что хромосома *tu* образовалась не в результате Робертсоновского слияния, а в результате либо сдвига центромеры, либо инверсии в предковой акроцентрической хромосоме (Wojcik, Searle, 1988). Если это так, то ITS в прицентромерных районах хромосомы *tu* не являются результатом Робертсоновских слияний, а связаны с другим типом реорганизации хромосом.

Метацентрик *jl* выявляется во всех хромосомных расах *S. araneus* и является характерным для *S. araneus* как для вида. Однако в большинстве исследованных рас обнаруживаются гетерозиготы *jl/jl*. Возникновение таких гетерозигот объясняют высокой частотой разделений хромосомы *jl* в районе центромеры с образованием двух полноценных акроцентриков (Wojcik, Searle, 1988). Можно предположить, что наличие ITS в центромерном районе хромосомы провоцирует такого рода перестройки.

Остальные метацентрики, представленные в изученных расах (*ik*, *go*, *hn*, *mp*, *qr*, *gk*, *hi* и *mn*), сформировались в ходе эволюции *S. araneus* существенно позже, в период расселения вида и формирования хромосомных рас (Wojcik et al., 2003). Частота выявления в них прицентромерных ITS была существенно выше, чем в «старых» метацентриках.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ITS прицентромерной локализации в хромосомах *S. araneus* действительно содержат в основном теломерную ДНК. При этом частота выявления теломерной ДНК в прицентромерных районах метацентриков тем ниже, чем раньше в ходе кариотипической эволюции они образовались в результате Робертсоновских слияний.

Следует отметить, что виды млекопитающих существенно различаются как по частоте выявления прицентромерных ITS, так и по самому факту их наличия (Жданова и др., 2007). Так, например, гигантские блоки теломерной ДНК описаны в прицентромерных районах метацентриков кроликов (Forsyth et al., 2002), а у мускусной землеройки (Rogatcheva et al., 2000) или домовых мышей они не были выявлены вообще. Наиболее подробно механизм формирования Робертсоновских слияний изучен у домовой мыши. Было показано, что эволюционные точки разрывов при формировании метацентриков были локализованы в прилегающей к теломерной сателлитной ДНК (Gagnagna et al., 2001; Kalitsis et al., 2006). В отличие от домовых мышей у землероек группы видов *Sorex araneus*



Локализация на хромосомах *Sorex araneus* интерстициальных теломерных последовательностей (ITS) не прицентромержной локализации.

Стрелки указывают на район локализации. В скобках приведены минимальная и максимальная частоты встречаемости ITS в данном хромосомном районе (в %) по данным табл. 3. Идеограмма хромосом по: Minina et al., 2007.

эволюционные точки разрывов при Робертсоновских слияниях локализованы, по-видимому, в теломерной ДНК. Полученные нами данные свидетельствуют в пользу этого предположения. Такой тип слияний конец в конец предлагают называть слиянием, подобным Робертсоновскому, и отличать от истинно Робертсоновского (Bolzan, Bianchi, 2006). Однако не исключено, что эволюционные точки разрывов у землероек, так же как и у мышей, были локализованы в субтеломерных районах, но «залечивание» двухнитевых разрывов при этом проходило с участием теломеразы (Nergadze et al., 2004). В любом случае способы формирования метацентриков в результате Робертсоновских (подобных Робертсоновским) слияний у разных видов млекопитающих могут быть разными, по крайней мере они, очевидно, разнятся у домовых мышей и землероек.

Кроме прицентромержных районов ITS были выявлены и в других районах хромосом *S. araneus*. ITS встречались: в районе *a1.5* с частотой 41.5/51.0 %; в *c1.2* с частотой 69.5/97.5 %; в *l1.5* с частотой 10.0/31.5 %; в *j1.3* с частотой 1/7 %; в *j2.2* с частотой 1.5/14.0 % (табл. 3; см. рисунок).

По-видимому, районы неприцентромержной локализации ITS маркируют точки разрывов более древних эволюционных перестроек.

В ходе сравнительного анализа кариотипов обыкновенной землеройки и человека было показано, что район *a1.5* хромосомы *af* *S. araneus* гомеологичен части хромосомы 22 человека (HSA22). С одной стороны к этому району прилегает район из HSA12, а с другой — район из HSA21 (Ye et al., 2006). Следовательно, данный район содержит по

меньшей мере две точки разрыва эволюционных перестроек.

Район *c1.2* представляет собой, по-видимому, район слияния фрагментов хромосом HSA2 и HSA5. На рутинно окрашенных хромосомах этот район выглядит как ломкий сайт.

Район *l1.5* представляет собой сайт слияния предковых консервативных районов, гомеологичных районам из HSA4 и HSA20. Предполагается, что ассоциация 4/20 является отличительным признаком отряда Насекомоядных (Eulipotyphla) и произошла у основателя отряда (Ye et al., 2006).

Плечо *j* у *S. araneus* полностью гомеологично большей части HSA1. В HSA1 выявлено 9 ITS, имеющих разное происхождение. Среди них выделяется ITS в районе HSA1q41, маркирующий, очевидно, сайт слияния предковых хромосом теломерными районами, поскольку содержащиеся в нем теломерные последовательности ориентированы голова к голове (Azzalin et al., 2001). Возможно, что ITS в плече *S. araneus* гомеологичны каким-либо ITS в HSA1.

Ни с помощью LNA-, ни с помощью PNA-проб к теломерным последовательностям ITS в хромосомах *S. granarius* выявлено не было, что, возможно, может отражать особенности эволюции геномов *S. granarius* и *S. araneus*.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований и программы «Биологическое разнообразие».

Мы выражаем нашу глубокую признательность В. Т. Волобуеву (Париж, Франция) за некоторые первич-

ные культуры фибробластов, а также Жозе-Артуро Лондо-Валеджо (Париж, Франция) за PNA- и LNA-пробы и ценные замечания при обсуждении результатов.

Список литературы

- Жданова Н. С., Рубцов Н. Б., Минина Ю. М. 2007. Терминальные районы хромосом млекопитающих: пластичность и роль в эволюции. *Генетика*. 43 (7) : 873—886.
- Azzalin C. M., Nergadze S. G., Giolotto E. 2001. Human intrachromosomal telomeric-like repeats: sequence organization and mechanisms of origin. *Chromosoma*. 110 : 75—82.
- Bolzan A. D., Bianchi M. S. 2006. Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 612 : 189—214.
- Demidov V. V. 2003. RNA and LNA throw light on DNA. *Trends Biotechnol.* 21 : 4—7.
- Elayadi A. N., Corey D. R. 2001. Application of PNA and LNA oligomers to chemotherapy. *Curr. Opin. Investig. Drugs*. 2 : 558—561.
- Forsyth N. R., Wright W. E., Shay J. W. 2002. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation*. 69 : 188—197.
- Garagna S., Marziliano N., Zuccotti M., Searle J. B., Capanna E., Redi C. A. 2001. Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2 : 171—175.
- Kalitsis P., Griffiths B., Choo K. H. A. 2006. Mouse telocentric sequences reveal a high rate of homogenization and possible role in Robertsonian translocation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 103 : 8786—8791.
- Kennedy B., Arar K., Reja V., Henry R. J. 2006. Locked nucleic acids for optimizing displacement probes for quantitative real-time PCR. *Anal. Biochem.* 348 : 294—299.
- Lansdorp P. M., Verwoerd N. P., van de Rijke F. M., Dragowska V., Little M. T., Dirks R. W., Raap A. K., Tanke H. J. 1996. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum. Mol. Genet.* 5 : 685—691.
- Levy M. Z., Allsopp R. C., Futcher A. B., Greider C. W., Harley C. B. 1992. Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* 225 : 951—960.
- Meyne J., Baker R. J., Hobart H. H., Hsu T. C., Ryder O. A., Ward O. G., Wiley J. E., Wurster-Hill D. H., Yates T. L., Moyzis R. K. 1990. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequences in vertebrate chromosomes. *Chromosoma*. 99 : 3—10.
- Minina J. M., Borodin P. M., Searle J. B., Volobouev V. T., Zhdanova N. S. 2007. Standard DAPI karyotype of the common shrew *Sorex araneus* L. (Soricidae, Eulipotyphla). *Russian J. of Teriology*. 6 : 1—6.
- Nergadze C. G., Rocchi M., Azzalin C. M., Mondello C., Giolotto E. 2004. Insertion of telomeric repeats at telomeric repeats at intrachromosomal sites during primate evolution. *Genome Res.* 14 : 1704—1710.
- Nielsen P. E., Egholm M., Berg R. H., Buchardt O. 1991. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*. 254 : 1497—1500.
- Ray A., Norden B. 2000. Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *FASEB J.* 14 : 1041—1060.
- Riethman H. 2008. Human telomere structure and biology. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9 : 1—19.
- Rogatcheva M. B., Ono T., Sonta S., Oda S., Borodin P. M. 2000. Robertsonian metacentrics of the house musk shrew (*Suncus murinus*, Insectivora, Soricidae) lose the telomeric sequences in the centromeric area. *Genes Genet. Syst.* 75 : 155—158.
- Searle J. B., Fedyk S., Fredga K., Hausser J., Volobouev V. T. 1991. Nomenclature for the chromosomes of the common shrew (*Sorex araneus*). *Mém. Soc. Vaud. Sc. Nat.* 19 : 13—22.
- Taberlet P., Fumagalli L., Hausser J. 1994. Chromosomal versus mitochondrial DNA evolution: tracking the evolutionary history of the southwestern European populations of the *Sorex araneus* group (Mammalia, Insectivora). *Evolution*. 48 : 623—636.
- Volobouev V. T., Dutrillaux B. 1991. Chromosomal evolution and phylogenetic relationships of the *Sorex araneus-arcticus* species group. *Mém. Soc. Vaud. Sc. Nat.* 19 : 131—139.
- Wojcik J. M., Borodin P. M., Fedyk S., Fredga K., Hausser J., Mishta A., Orlov V. N., Searle J. B., Volobouev V. T., Zima J. 2003. The list of the chromosome races of the common shrew *Sorex araneus*. *Mammalia*. 68 : 169—178.
- Wojcik J. M., Searle J. B. 1988. The chromosome complement of *Sorex granarius* — the ancestral karyotype of the common shrew (*Sorex araneus*)? *Heredity*. 61 : 225—229.
- Wong H. P., Slijepcevic P. 2004. Telomere length measurement in mouse chromosomes by a modified Q-FISH method. *Cytogenet. Genome Res.* 105 : 464—470.
- Ye J., Biltueva L., Huang L., Nie W., Wang J., Jing M., Su W., Vorobieva N. V., Jiang X., Graphodatsky A. S., Yang F. 2006. Cross-species chromosome painting unveils cytogenetic signatures for the Eulipotyphla and evidence for the polyphyly of Insectivora. *Chromosome Res.* 14 : 151—159.
- Zhdanova N., Karamisheva T. V., Minina J., Astakhova N. M., Lansdorp P., Kammori M., Rubtsov N. B., Searle J. B. 2005. Unusual distribution pattern of telomeric repeats in the shrews *Sorex granarius*. *Chromosome Res.* 13 : 617—625.
- Zhdanova N. S., Minina J. M., Karamisheva T. V., Draskovic I., Rubtsov N. B., Londoño-Vallejo J. A. 2007a. The very long telomeres in *Sorex granarius* (Soricidae, Eulipotyphla) contain ribosomal DNA. *Chromosome Res.* 15 : 881—890.
- Zhdanova N. S., Minina Y., Karamisheva T. V., Rubtsov N. B. 2007b. The distribution of telomeric and ribosomal DNA on the chromosomes of two closely related species, *Sorex araneus* and *Sorex granarius* (Soricidae, Eulipotyphla). *Russian J. of Teriology*. 6 : 7—13.
- Zijlmans J. M., Martens U. M., Poon S. S., Raap A. K., Tanke H. J., Ward R. K., Lansdorp P. M. 1997. Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 94 : 7423—7428.

Поступила 6 XI 2008

TELOMERIC DNA ALLOCATION IN CHROMOSOMES OF COMMON SHREW *SOX ARANEUS*, EULIPOTYPHILA

N. S. Zhdanova,¹ Yu. I. Rogozina, Yu. M. Minina, P. M. Borodin, N. B. Rubtsov

Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch of RAS, Novosibirsk;
¹ e-mail: zhdanova@bionet.nsc.ru

Recently we have displayed shrew species, Iberian shrew *S. granarius*, with telomeres of unusual for mammals structure, including long telomeres on the short acrocentric arms containing 213 kb on average and short telomeres (3.8 kb) on the other chromosomal ends (Zhdanova et al., 2005, 2007). However, it is not clear if such

telomeres are characteristic of all shrew species or only of *S. granarius*. *S. granarius* and common shrew *Sorex araneus* are the sibling species. In this investigation by using modified Q-FISH, we demonstrated that telomeres in *S. araneus* from different chromosomal races differing in the numbers of metacentrics contain 6.8—15.2 kb of telomeric tracts. Thus, the *S. araneus* telomere lengths appeared to correspond with telomere lengths both in shrews and majority wild mammalian species, and *S. granarius* has telomeres with unique or scarce structure. Furthermore, using DNA and RNA modified with probe high specificity to telomeric repeats (PNA and LNA) we showed that interstitial telomeric sites in *S. araneus* chromosomes contained mainly telomeric DNA and their localization coincided with some evolutionary breakpoints. Interstitial telomeric DNA in *S. granarius* chromosomes was not revealed. Thus, distribution of telomeric DNA can greatly differ even in closely related species whose chromosomes are composed from almost identical chromosomal arms.

Key words: telomere, modified Q-FISH, common shrew, Iberian shrew, interstitial telomeric sequences (ITS), PNA and LNA probe to telomeric sequences.
