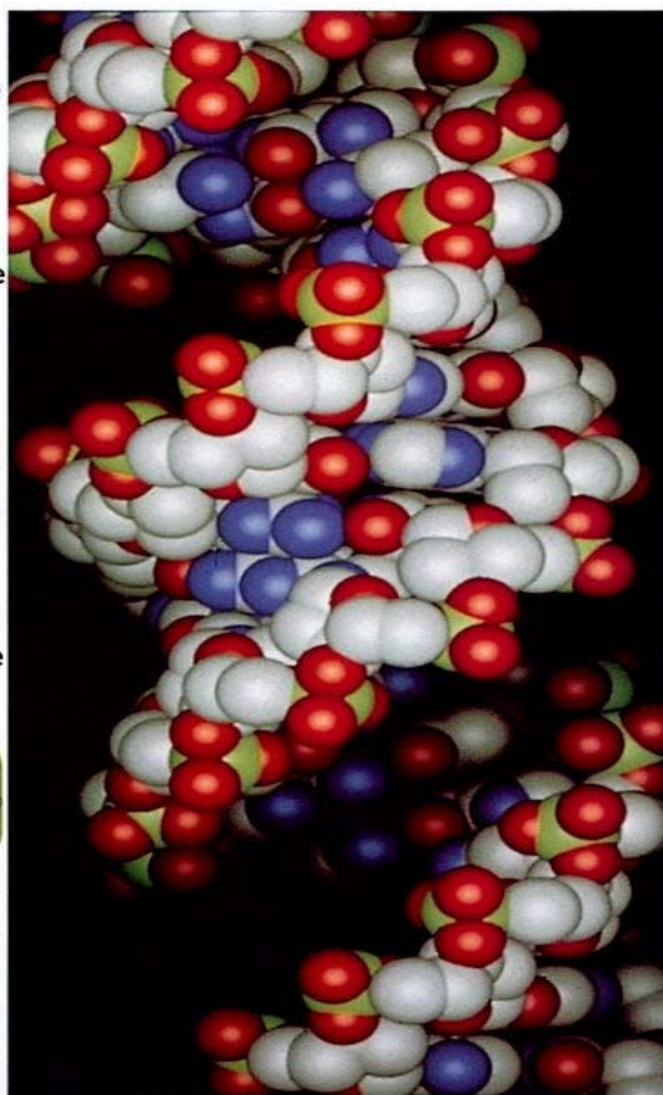
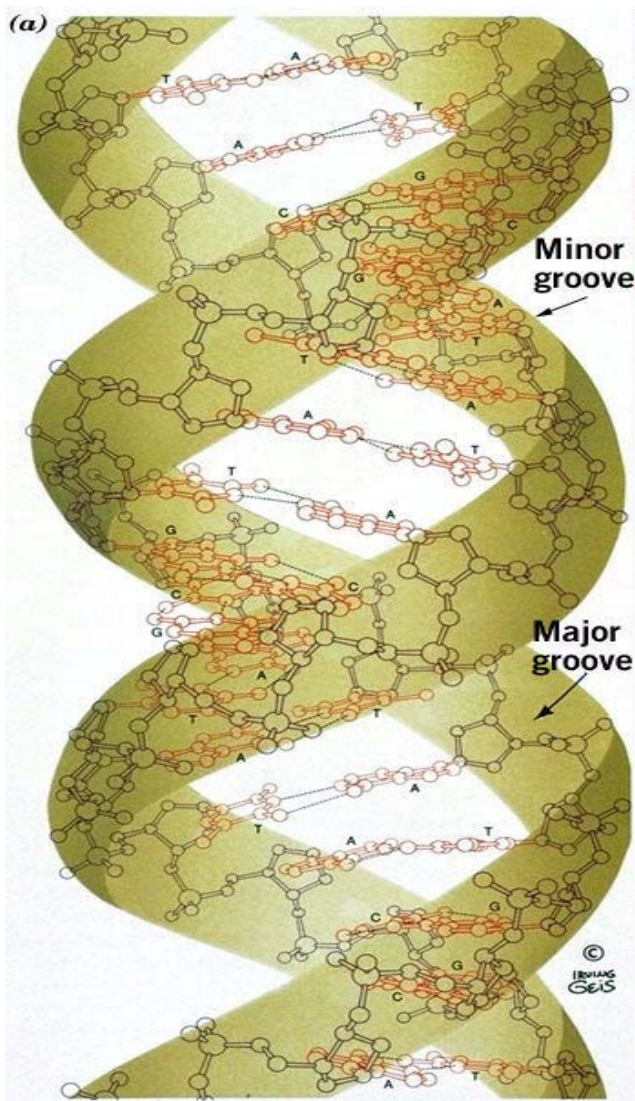




О.І. КАРАТЄЄВА

# ЦИТОГЕНЕТИКА

*Курс лекцій*



МІНІСТЕРСТВО АГРАРНОЇ ПОЛІТИКИ ТА ПРОДОВОЛЬСТВА  
УКРАЇНИ

МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**О. І. Каратєєва**

**Цитогенетика**

*Курс лекцій*

**Миколаїв  
2014**

УДК 575  
ББК 28.041.12  
К21

Автор: О.І. Каратєєва

Рекомендовано до друку рішенням вченої ради Миколаївського національного аграрного університету від 29.04.2014р., протокол № 8.

Рецензенти:

- Дзіцюк В.В. д-р с.-г. наук, старший науковий співробітник, начальник відділу біотехнології і відтворення Інституту розведення та генетики тварин НААН України;
- Баркарь Є.В. канд. с.-г. наук, доцент, доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний університет.

**Каратєєва О.І.**

Цитогенетика : курс лекцій / О.І. Каратєєва. – Миколаїв : МНАУ, 2014. – 119 с.

У курсі лекцій викладено зміст цитогенетики науки про матеріальні основи спадковості у взаємозв'язку з будовою і функціями різних внутрішньоклітинних структур. Надано конкретні рекомендації студентам, майбутнім інженерам-технологам по використанню знань з курсу «Цитогенетика» на практиці.

УДК 575  
ББК 28.041.12

© Миколаївський національний аграрний  
університет, 2014  
© Каратєєва О.І. , 2014

## ЗМІСТ

1. Морфологічна структура хромосом	5
2. Молекулярна структура хромосом	16
3. Мейотичний кросинговер	33
4. Вплив факторів на кросинговер	47
5. Уявлення про механізми кросинговеру	57
6. Генетичний контроль сегрегації хромосом	69
7. Цитогенетика хромосомних перебудов	85
8. Інверсії та подвоєння хромосом	97
9. Дуплікації та нестачі	104
10. Ефект положення генів	112
Література	118

## Лекція 1

### Морфологічна структура хромосом

1. Вступ
2. Типи організації генетичного апарату
3. Морфологія хромосом
4. Хромосомний набір
5. Еухроматин та гетерохроматин

**1. Цитогенетика** – наука, яка вивчає структурні одиниці клітини, які детермінують ознаки та властивості організмів, їх передачу при вегетативному та статевому розмноженні. На цитогенетичних дослідженнях базуються уявлення про матеріальні основи спадковості та мінливості – структурах ядра (хромосомах) та цитоплазмі (пластидах, мітохондріях, кінетосомах), які містять в своїй ДНК гени, що контролюють ознаки та властивості організму [9].

*Цитогенетика* для вивчення всіх цих структур клітини використовує різноманітні методи дослідження, а саме:

- цитологічні (цитохімія, цитофотометрія, авторадіографія, електронна мікроскопія);
- біохімічні (денатурація ДНК та поновлення двохниткової структури, гібридизація ДНК – ДНК та ДНК – РНК, визначення послідовності нуклеотидів в ДНК та РНК, послідовності амінокислот в білках);
- біофізичні (цинтрифугування в градієнті щільності, електрофорез, вискозиметрія);

Також для дослідження, алелей які містять певні зміни в спадкових структурах дослідного організму, використовується поєднання методів генетики та молекулярної біології. З'явилась можливість планомірного створення самовідтворювальних, стійко успадковуємих в декількох поколіннях та під час мейозу міні-хромосом які містять певний набір генів [8].

Таким чином, під *цитогенетикою* розуміють науку яка вивчає особливості відтворення, рекомбінації, зміну та функціонування генетично важливих структур клітини, їх розподілення в мітозі, мейозі та при заплідненні в залежності від їх кількості та генетичної будови.

Як відомо, важлива роль під час генетичного контролю ознак організмів які мають клітинну будову, належить ядерним структурам – хромосомам. Саме з цих позицій, дуже важливим є вміння характеризувати хромосомний набір організму (каріотип): морфологію (кількість хромосом, їх розміри, співвідношення довжини плечей, наявність перетинок, наявність гомологів), розподілення еухроматинових та гетерохроматинових ділянок на хромосомах, унікальності ДНК або ДНК з різним ступенем повторюваності [6].

Основу цитогенетики складає хромосомна теорія спадковості, яка на початку ХХ століття була у вигляді гіпотези Е. Сеттона. Співставлення характеру розподілення парних гомологічних хромосом отриманих від материнської та батьківської форм під час мейозу та при заплідненні з характерним розподіленням

менделевських елементарних спадкових факторів (генів) у гібридів та у їх нащадків дозволило передбачити, що гени знаходяться в хромосомах. Що було вдало підтверджено багатьма вченими, що гени розміщені в хромосомах, а конкретні локуси містять певні гени.

Хромосоми виконують цілий ряд вкрай важливих функцій:

*Інформаційна функція* – ДНК яка в них міститься зосереджує в собі переважну більшість якісно різних генів, які складають геном клітини.

*Транскрипційна функція* – при зчитуванні інформації яка в них міститься, під час експресії генів в онтогенезі.

*Структурно-організаційна функція* – відмінності в прояві генів при зміні структури хромосом. Саме ця функція хромосом забезпечує виключно «точно» їх самокопіювання при реплікації, та ідентичність дочірніх хромосом які розходяться до різних полюсів в мітозі. Характер реплікації хромосом та окремих її ділянок під час синтезу ДНК в інтерфазі визначається їх структурою, тобто, розподіленням різних типів ДНК (унікальною, повторювальною) та характером її розміщення (еухроматин, гетерохроматин) в хромосомах.

*Сегрегаційна функція* – при об'єднанні в одному організмі різних варіантів хромосом які різняться за структурою та алельним станом окремих генів, забезпечує розподілення цих варіантів в різні спори або гамети при мейозі.

*Рекомбінаційна функція* – забезпечує значну частину комбінативної мінливості – рекомбінацію щеплених генів [9].

Термінологія в цитогенетиці дещо відрізняється від термінології генетики.

**Ген** – визначає одиничний, якісно визначений певний набір генів організму. Будь-який геном реалізується у вигляді конкретних **генотипів** – гаплоїдних, диплоїдних або поліплоїдних **наборів визначених алелей** генів, які складають геном. **Плазмон** – сукупність якісно визначеного набору генетичних детермінантів цитоплазматичних органел та плазмотипів як конкретних різних варіанті реалізації плазмону, а конкретні каріотиби розглядаються як варіанти реалізації певного, який характеризує даний вид **каріома**. В поняття каріома слід відносити характерні для виду ознаки хромосомного набору: число і розміри хромосом, їх розподілення згідно Денверовської класифікації (метацентричні, акроцентричні), кількість ДНК в гаплоїдному наборі, характер розміщення гетерохроматинових ділянок (прицентромірні теломірні) [5].

**2. Типи організації генетичного апарату.** Організація генетичного апарату у різних видів тварин та живих істот відрізняється та ускладнюється в процесі еволюції. Наприклад, всі прокаріоти характеризуються відсутністю клітинного ядра, відокремленого мембраною від вмісту клітини. Їх генетичний апарат являє собою одну або декілька кільцевих молекул ДНК, що зосереджений в певній ділянці клітини яка називається нуклеотидом. Цей генетичний апарат самокопіюється як одна



одиниця (один реплікон), а при розподіленні його копій в дочірні клітини при поділі вирішальна роль належить безпосередньому контакту з клітинною мембраною.

Особливістю еукаріот є наявність клітинного ядра в якому і зосереджені структури які несуть більшу частину спадкової інформації клітини – хромосоми. Значно менша частина такої інформації зосереджена в молекулах ДНК які розміщені в органелах цитоплазми – мітохондріях, пластидах, центриолях (кінетосомах). Кожна хромосома еукаріот містить декілька одиниць реплікації, розподілення хромосом в дочірні клітини здійснюється за допомогою веретена поділу при мейозі [8].

Маса ДНК генетичного апарату еукаріотичної клітини на декілька порядків вище ніж у прокаріот. З чим і пов'язана реалізація складної системи укладки, компактизації ДНК в структури. Спіралізація здійснюється у прокаріот і еукаріот не однаково, хоча в обох групах організмів відбувається шляхом утворення комплексів ДНК з різними білками.

Особливу групу становлять віруси з приводу походження яких немає єдиної точки зору. Їх генетичний апарат функціонує тільки в середині прокаріотичної або еукаріотичної клітини, системи якої мобілізуються при ураженні на копіювання генетичного матеріалу та формування нових копій вірусів. Ймовірно з цим пов'язане велике розмаїття в організації генетичного апарату різних вірусів: він може складатися із одноланцюгової або дволанцюгової ДНК або РНК. пов'язаний з РНК або ДНК білок вірусної часточки визначає здатність вірусу проникати в клітину-господара.

Одночасно при дозріванні вірусу контакт з білком визначає і спіралізацію вірусної РНК або ДНК [1].

**3. Морфологія хромосом.** Генетичний матеріал у еукаріот зосереджений здебільшого в ядерних структурах – хромосомах. **Хромосомний набір** – це генетичний, точніше цитогенетичний паспорт виду. Характерні для виду особливості набору хромосом складають вміст каріому. Йому притаманні основні характеристики:

1. Каріом особин виду з нормальною плодючістю містить певне, стале в ряді поколінь число хромосом. Особини різної статі, особливо серед тварин, можуть мати різну кількість хромосом. Різниця найчастіше становить на одну хромосому.

2. Каріом виду зазвичай індивідуальний за розміром та формою хромосом які входять до його складу. Ці особливості також стійко успадковуються у ряді поколінь.

Найчастіше всі дослідження та опис характерних особливостей хромосом які входять до каріому виду здійснюють під час метафази при мітозі. Інколи хромосоми в межах одного каріома розрізняються за розмірами. Так наприклад, у багатьох куриних до складу каріому входить декілька великих хромосом та велика кількість дрібних [3].

Розрізняти хромосоми за формою можливо за місцем розташування первинної перетинки (центроміри), а в деяких і вторинної перетинки. Порівняння хромосом в каріомі за розмірами, співвідношенням величини плечей, за наявністю або відсутністю і розміром супутника дозволяє майже повністю їх

ідентифікувати. При цьому виявляється, що у диплоїдних організмів кожний тип хромосом представлений в каріомі двічі – це парні однакові гомологічні хромосоми, отримані в наслідок запліднення жіночої та чоловічої гамет. В деяких випадках набір хромосом може містити лише по одній хромосомі кожного типу (мох), або кожний тип хромосом може повторюватися три, чотири, п'ять разів (триплоїди, тетраплоїди, пентаплоїди).

Облік хромосом тільки за співвідношенням плечей та наявністю сателітів дозволяє надійно лише характеризувати деякі хромосоми або відокремлювати відмінні один від одного групи хромосом. Окремі хромосоми в межах групи розпізнаються з використанням методів диференціального фарбування. Такі методи дають можливість визначати неоднорідність структури хромосоми по довжині, яка визначається особливостями комплексу основних молекулярних компонентів хромосом – ДНК, основних та кислих білків [6].

**4. Зміни хромосом під час клітинного циклу.** Клітинний цикл включає зазвичай тривалу інтерфазу – період від закінчення телофазних перетворень в кінці попереднього поділу до початку профаз наступного поділу – і сам мітоз (профаза, метафаза, анафаза, телофаза). В складі інтерфазу виділяють пресинтетичний період  $G_1$  та специфічну фазу  $S$  – синтетичний період під час якого здійснюється реплікація хромосом, а також постсинтетичний період  $G_2$ . Таким чином від телофазу до початку фази  $S$  інтерфазу ядра містять властиву виду кількість генетичної інформації яка під час  $S$ -фази вона поступово збільшується, а починаючи з періоду

$G_2$  і до наступної телофази генетичного матеріалу в клітині міститься вдвічі більше. Під час клітинного циклу відбувається і закономірні циклічні зміни морфології хромосом.

По закінченню в анафазі розходження до полюсів хроматид від кожної хромосоми починаються телофазні перетворення, які характеризуються відновленням ядерної оболонки та поступовим подовженням та потоншенням хромосом в телофазних ядрах. По закінченню цієї фази хромосоми стають невидимі в світловий мікроскоп. При переході до наступного поділу після закінчення фаз  $S$  та  $G_2$  в профазі хромосоми знову виявляються у ядрі у вигляді тонких ниток, які поступово потовщуються та скорочуються набуваючи до початку метафази характерну для неї структуру та розміри. При дослідженнях цих перетворень в клітинах деяких видів можна бачити, що телофазні та профазні зміни довжини і товщини хромосомних ниток в значній мірі здійснюється за рахунок процесу їх багатоступеневої деспіралізації та спіралізації [9].

Процес компактизації хромосомних ниток шляхом спіралізації відбувається нерівномірно по довжині та несинхронно за часом для різних ділянок хромосом та для деяких цілих хромосом. В окремих ділянках хромосоми ступінь компактизації виявляється вищим – при фарбуванні ці ділянки темніші та щільніші, в той час інші ділянки хромосом фарбуються значно слабше, а їх структура значно рихла, ступінь компактизації менший. Розподілення в хромосомах таких компактних темнозбарвлених ділянок слугує характеристикою хромосом в каріомі. Саме у вигляді такого

щільно зафарбованого тільця в ядрі представлена гетерохромосома за якою відрізняються особини різних статей. Ці факти слугували основою для виділення в складі хромосом ділянок гетерохроматину та еухроматину. Гетерохроматинові ділянки зазвичай виявляються в хромосомах в зоні первинної перетинки за виключенням жита, у якого гетерохроматинові ділянки знаходяться в зонах теломір. Крім того, гетерохроматинові ділянки виявляються і у середині плечей хромосом так званий інтеркалярний гетерохроматин [1].

**1.5. Еухроматин та гетерохроматин.** Характер розподілення гетерохроматинових ділянок у хромосомах – одне із специфічних властивостей каріому виду. Гетерохроматиновим ділянкам властива інша динаміка під час перебігу клітинного циклу порівняно з еухроматиновими:

1. Гетерохроматнові ділянки значно довше залишаються під час клітинного циклу у вигляді щільних компактних ділянок;

2. Вони значно пізніше диспіралізуються, ніж еухроматинові ділянки або не спіралізуються взагалі, зберігаючи в інтерфазі щільнозафарбовані хромоцентри, які можуть поєднуватися один з одним;

3. Реплікація гетерохроматинових ділянок зазвичай відбувається в другій половині або навіть наприкінці фази *S*.

Гетерохроматинові ділянки які стабільно виявляються в хромосомах різних типів клітин (прицентромірні та тіломірні) мають назву структурного гетерохроматину. Поряд з тим деякі ділянки хромосом і навіть цілі хромосоми виявляються

гетеропектонічними не у всіх клітинах. Такий стан визначається як гетерохроматинізований еухроматин (факультативний гетерохроматин). Так, у самиць ссавців виявляється повністю гетерохроматизована одна із X-хромосом, яка утворює так зване гетеропиктонічне тільце Барра яке можливо виявити і в інтерфазних ядрах.

Ділянки конститутивного гетерохроматину характеризуються тим, що у них як правило, не можливо виявити будь-яких генів з специфічною активністю, тобто в певному розумінні вони є інертні, неактивні. Гетерохроматизовані еухроматинові ділянки також реєструються як генетично інактивовані. Але інколи деякі гени з чітко реєструємою активністю локалізовані в гетерохроматинових ділянках [2].

Серед гетерохроматинових ділянок хромосом відмічається схильність до їх наближення в клітині, до асоціацій їх один з одним. Цю властивість називають ектопичною кон'югацією. Деякі вчені саме з цією властивістю гетерохроматинових ділянок пов'язують у деяких видів підвищену частоту розривів хромосом під дією різноманітних мутагенних факторів саме в цих місцях. Не виключення і те що підвищена частота участі саме гетерохроматинових ділянок в утворенні індукованих хромосомних аберацій пов'язана також з приблизно одночасною реплікацією цих ділянок у клітинному циклі.

За допомогою світового мікроскопу можна дослідити структуру спеціалізованих хромосом так званих гігантських

політенних хромосом. Величезна їх довжина пов'язана з тим, що складові їх хромонемі компактизовані дуже слабо. Диференціація кожної хромонемі на дрібні і більші хромомери відбувається в політенних хромосомах у вигляді дисків різної товщини. При цьому кожний диск є результатом тісної асоціації однієї і тієї ж хромомери в сотнях прилеглих одна до одної хромонем [2, 4].

#### Питання для самоперевірки:

1. Що таке цитогенетика? Які методи цитогенетичних досліджень Вам відомі?
2. Що таке хромосома? Які функції виконують хромосоми?
3. Яким чином відбувається організація генетичного матеріалу у організмів різного рівня?
4. Що таке хромосомний набір?
5. Основні характеристики каріому?
6. З яких фаз складається клітинний цикл? Охарактеризуйте їх.
7. Що таке еу- та гетерохроматин?
8. Охарактеризуйте основні властивості гетерохроматину.
9. Що таке ектопічна кон'югація?

## Лекція 2

### Молекулярна структура хромосом

1. ДНП-комплекс
2. Реплікація хромосом
3. Основні етапи реалізації спадкової інформації
4. Мітотична стабільність

**1. ДНП-комплекс.** Спадкова інформація організмів забезпечується специфічними послідовностями нуклеотидів в їх нуклеїнових нових кислотах. Зазвичай «сховищем інформації» є ДНК, і лише у деяких вірусів цю роль виконує РНК. Таким чином, молекулярна структура хромосом – це головним чином структура ДНП – комплексу між ДНК і білками хромосом [8].

При дослідженні хромосомної ДНК використовують метод реасоціації (відновлення) денатурованої ДНК. При нагріванні розриваються водневі зв'язки між азотистими основами комплементарних ланцюгів, які складають подвійну спіраль нативної ДНК. В процесі денатурації (плавління) ДНК приймає вид одниткових молекул. При поступовому охолодженні розчину плавленої ДНК між комплементарними послідовностями в одинарних нитках можуть знову встановитися водневі зв'язки, і з цих місць далі процес відновлення може продовжитися за принципом застібки «блискавка». Кількісний рівень реасоціації збільшується, по-перше, із зростанням вихідної концентрації денатуруючої ДНК і, по-друге, зі збільшенням часу. Тому частку ДНК, яка відновила дволанцюгову структуру зазвичай оцінюють залежно від співвідношення цих двох величин [9].



Дослідження ДНК еукаріот показало, що вона неоднорідна за швидкістю реасоціації. Повільне відновлення є характерним для унікальної послідовності в ДНК, оскільки концентрація кожної такої послідовності вельми мала. Більш швидким відновленням характеризуються послідовності, які в ядерній ДНК повторюються декілька раз – їх відносна концентрація набагато вища. Швидкість реасоціації деяких фракцій ядерної ДНК вказує, на те що вони містять послідовності, які повторюються сотні тисяч або навіть мільйони разів. Практично миттєво реасоціюють особливого роду послідовності – розташовані в безпосередньому сусідстві (*паліндроми*) або неподалік один від одного інвертовані (звернені) повтори. Найбільший ступінь повторюваності властивий послідовностям різних видів так званої сателітної ДНК. Ці фракції ДНК отримали таку назву тому, що вони при центрифугуванні фрагментованої ДНК в градієнті щільності, утворюють окремі, додаткові (сателітні) піки. Плавлена щільність молекул сателітних ДНК відрізняється від щільності основної маси ДНК [3].

Локалізацію в хромосомах високоповторюваних послідовностей ДНК досліджували шляхом проведення реасоціації («гібридизації») денатурованих молекул ДНК на препаратах. При цьому локалізована ДНК повинна містити радіоактивні атоми. Іноді замість локалізованої ДНК використовують синтезовану на ній, як на матриці, радіоактивну РНК. Таку мічену денатуровану ДНК або РНК додають до препарату, на якому попередньо високотемпературним впливом денатурують ДНК хромосом. Потім в умовах, що сприяють

відновленню, мічені молекули «гібридизуються» з ДНК хромосом на препараті. Місця «гібридизації» проявляються в фотоемульсії, якою покривається препарат. Найшвидше реасоціюють послідовності з найбільшим ступенем повторюваності. Результати показують, що зазвичай такі послідовності виявляються в ділянках розташування структурного (конститутивного) гетерохроматину – у прицентромірних, теломірних ділянках або в місцях розташування інтеркалярного гетерохроматину. Таким чином, в основі структурно-морфологічної неоднорідності по довжині хромосоми лежить розподіл специфічних послідовностей ДНК.

Високоповторювана сателітна ДНК, у різних видів становить від часток відсотка до 25-28% від усієї ядерної ДНК. Дані К.Г. Газарян і В.З. Тарантула показують, що унікальні послідовності у вивчених видів тварин становлять 40-90% від усієї ядерної ДНК (лише у двох видів найпростіших їх частка 37 і 12%), а у вивчених видів вищих рослин – 12-60%. Значну частину ядерної ДНК складають і різні сімейства помірно повторюваних послідовностей [5].

ДНК еукаріот завжди представлена в комплексі з основними і кислими білками. Утворення комплексу з білками забезпечує багатоступеневу укладку, компактизацію нитки ДНК в хромосомі. Перші рівні компактизації забезпечуються комплексом ДНК з основними білками – гістонами, які характеризуються підвищеним вмістом основних амінокислот – лізину і аргініну. Гістон H1 характеризується і найбільшим переважанням основних амінокислот над кислими (аспарагінової та глютамінової кислот), з

усіх гістонів він найбільш збагачений лізином. Гістони H2A і H2B мають у своєму складі лише невелике переважання лізину над аргініном, а гістони H3 і H4, навпаки, містять аргініну більше, ніж лізину.

Первинна структура однойменних гістонів різних видів має неоднакову консервативність їх молекул в еволюції. Найбільш стабільні гістони H3 і H4. Первинна структура гістону H4 гороху із тимуса теляти розрізняється всього за двома, а первинна структура гістона H3 цих двох видів – за 4 амінокислотними залишками. Гістони H2A і H2B менш консервативні. Найбільш мінливий гістон H1, за його структурою спостерігається внутрішньовидовий поліморфізм. Гени, які контролюють структуру гістонів, відносяться до класу помірно повторюваних: вони повторюються в геномі десятки разів. Копії гена H1 не зовсім однорідні за структурою, оскільки навіть з клітин однієї тканини можна виділити кілька фракцій цього білка (наприклад, із клітин тимусу кролика – 8 видів гістону H1). Така ж неоднорідність властива і генам трьох інших гістонів, оскільки описані 3 поліпептидних варіанти гістону H3, 4 варіанти гістону H2A і 2 варіанти гістону H2B [11].

ДНП-комплекс обумовлює найважливішу характеристику нативного хроматину – його нуклеосомну структуру. Нуклеосоми у складі хроматину виявляються як «намистинки» товщиною 10-20 нм, з'єднані нитками товщиною 1,5-2 нм, ця нитка – не що інше, як «лінкерна» (зв'язуюча) ДНК. З урахуванням варіювання розмірів цих зв'язуючих ділянок з однією нуклеосомою може бути

пов'язана ділянка ДНК, яка включає 160-240 п. н. Дослідження структури виявляють схожість ізольованих октамер гістонів з нуклеосомами. Структуру нуклеосом визначає взаємодія між молекулами гістонів в октамері. Найбільш істотну роль у взаємодіях всіх чотирьох типів гістонів в октамері виконують гідрофобні центральні частини цих білків. Саме цим і обумовлена їх висока еволюційна стабільність [2].

Проведені дослідження хімічного «зшивання» ДНК з гістонами показали, що структура октамеру гістонів організована таким чином, що один і той же гістон асоціюється з різними віддаленими один від одного ділянками 146-нуклеотидної послідовності ДНК, що входить до складу нуклеосоми. Можливо, що компонентами системи, що забезпечує формування нуклеосомної структури, можуть бути й інші ядерні білки. Наприклад, в ядрах клітин багатьох організмів виявлений білок, подібний з білком, виділеним з ядер ооцитів *Xenopus* – нуклеоплазмін. *Нуклеоплазмін* – кислий ядерний білок, який не зв'язується ні з ДНК, ні з цілими нуклеосомами, але кожна молекула цього білка (пентамер) здатна зв'язуватися з октамером гістонів.

Отже, ДНП-комплекс з гістонами H2A, H2B, H3, і H4 формує характерну структурну основу хроматину – нуклеосомну нитку. Довжина нитки ДНК на цьому рівні її укладки укорочується приблизно в сім разів.

Гістон H1, що входить до складу нуклеосоми своєю центральною глобулярною частиною взаємодіє з обома кінцями

ДНК. Проте дуже істотний додатковий ефект зв'язування гістону Н1 з нуклеосомною ниткою полягає в тому що в присутності цього гістону вона додатково компактизується, згортаючись в спіраль (соленоїд). Не з'ясоване, які особливості гістону Н1 забезпечують таку компактизацію, але відомо, що для її здійснення необхідна досить висока концентрація катіонів, особливо двовалентних [10].

Подальші рівні компактизації хроматину досягаються за рахунок негістонових білків. Ця група білків хроматину виключно гетерогенна, до її складу входить біля 500 компонентів. У процесах реплікації та репарації ДНК більшість негістонових білків хроматину виконують чітко встановлені функції: транскрипції (РНК-полімераза) – гелікази, топоізомерази, ДНК-полімерази, ДНК-лігази, ендонуклеази, екзонуклеази; модифікації ДНК або пістонів – метилази, ацетилтрансферази, фосфокінази, деацетилази, фосфорилази, протеази. Також важливу структурну роль виконують інші негістонові білки – утворюють так званий ядерний матрикс (ядерну мембрану, губкові комплекси і внутріядерну мережу). Можливо, ці ж білки формують білковий каркас хромосом [11].

**2. Реплікація хромосом.** Процес реплікації ДНК досліджувався найбільш ретельно, оскільки з усіх молекулярних компонентів хромосом, саме ДНК здійснює функцію кодування спадкової інформації клітини та її відтворення при клітинному поділі. Ще у 1953 році Дж. Уотсон і Ф. Крик зробили припущення про те, що така молекула могла б відтворюватися за напівконсервативним механізмом. В результаті розплітання двох

ниток вихідної молекули та добудови до кожної з них другої комплементарної нитки повинні вийти дві молекули, в кожній з яких одна нитка «материнська», а інша – «дочірня». У класичних дослідженнях М. Мезельсоном і Ф. Сталя, було чітко доведено, що реплікація ДНК здійснюється за передбаченим напівконсервативним механізмом [9].

Дослідженнями процесів реплікації ДНК було встановлено, що у ДНК існує специфічна стартова точка – «реплікаційна вилка» (*Origin*), з якої процес починається. Комплекс різних білків забезпечує розплітання комплементарних ниток та стабілізацію протягом деякого часу одноланцюгових ділянок. Фермент ДНК-полімераза в напрямі 5'→3' синтезує нову комплементарну нитку по одиночній матриці. Проте лише одна з нових молекул синтезується від стартової точки як безперервна нитка (її називають ще «лідуючою»). У другій нитці («відстаюча») ДНК-полімераза стартує багаторазово, виробляючи в тому ж напрямку (5'→3') порівняно невеликі (1-2 тис. нуклеотидів) фрагменти Оказакі. Істотно, що ДНК-полімераза насправді не може ініціювати процес реплікації, і він починається з того, що РНК-полімераза синтезує короткий (близько 10 нуклеотидів) комплементарний матриці полінуклеотид – «затравку» (*primer*), і лише до 3'-кінця цього праймеру ДНК-полімераза приєднує перший нуклеотид.

Таким чином починається синтез кожного фрагмента Оказакі. Потім в пустотах, що утворилися внаслідок видалення ендонуклеазою ділянок РНК-праймеру відбувається синтез

комплементарної ділянки ДНК по одноланцюговій матриці. І нарешті, особливий фермент – ДНК-лігаза з'єднує в єдину полінуклеотидну нитку фрагменти Оказакі. Всі ці білки утворюють гігантський мультифункціональний комплекс (*реплісому*), який здійснює всі вказані етапи процесу у так званій «вилці реплікації» [12].

У еукаріотичних клітинах виявлені білки, аналогічні всім білкам, які беруть участь у процесі реплікації ДНК прокаріот, хоча взаємодія і генетичний контроль компонентів які складають реплікативний комплекс у еукаріот вивчено вельми фрагментарно. Напевно, процес реплікації ДНК у еукаріотичних організмів у основних рисах відбувається так само, як і у прокаріотів. У процесі реплікації з ДНК еукаріот видаляються короткі одониткові фрагменти ДНК (1,5 тис. нуклеотидів), аналогічні фрагментам Оказакі.

При дослідженні процесу реплікації ДНК еукаріот в ній виявлені так звані реплікаційні «вічка» – структури, аналогічні реплікації кільцевій ДНК прокаріот. Кожне таке «вічко» є результатом руху в обидві сторони від стартової точки двох «вилок реплікації» [6].

Згідно досліджень Л. Ф. Андрєєва, в хромосомах існує своєрідна ієрархічна система одиниць реплікації. З початком фази *S* в точках, віддалених один від одного в нитці ДНК в середньому не менше ніж на 150-200 мкм реплікація стартує більш-менш одночасно. Протягом порівняно невеликого тимчасового інтервалу по сусідству з цими точками активуються нові групи невеликих

репліконів. Завершення реплікації в такій групі репліконів призводить до утворення більш протяжних мічених фрагментів (15-20 мкм). З часом більш довгі мічені фрагменти не утворюються, що свідчить про те, що закінчив реплікацію район в 15-20 мкм, який обмежений точками термінації і являє собою одиницю реплікації більш високого рівня. При продовженні фази *S* поруч з цими, що закінчили реплікацію ділянками, починають функціонувати кілька асинхронно нових невеликих репліконів – складова сусідньої реплікації.

Так послідовно йде поки не завершиться реплікація всього інтервалу в 150-200 мкм між вихідними точками, з яких вона почалася, процес активації все нових репліконів по сусідству з вже «працюючими» або «закінчившими» роботу. У даній ієрархічній системі ці інтервали являють собою найбільші одиниці реплікації.

Таким чином, в геномі розміром  $10^6$  мкм міститься така ж або в 2-3 рази більша кількість потенційних точок ініціації реплікації. Ймовірно, дозволяє здійснювати реплікацію всього генома в ранньому ембріогенезі в дуже короткі проміжки часу тільки одночасне функціонування переважної більшості або майже всіх цих репліконів [9].

В подальшому в процесі онтогенезу збільшення тривалості синтетичної фази *S* викликається все більш неодноразовим включенням в «роботу» різних репліконів. При цьому іноді виявляється, що реплікація певних частин геному приурочена до певних моментів синтетичної фази. Послідовність активації тих чи інших груп репліконів протягом фази *S* залежить від характерної



для даного типу клітин молекулярної організації різних ділянок хромосом і властивого цим ділянкам способу (і ступеню) компактизації [8]. Ієрархічні рівні в виявленні одиниць реплікації розглядаються як відображення дискретності нуклеопротеїдної нитки щодо тривимірної структури її укладання. На динаміку процесу реплікації в кожний конкретний момент синтетичної фази істотно впливає динаміка молекулярно-структурних взаємодій між ДНК, гістоновими і негістоновими білками, оскільки лише деякі ділянки хромонем доступні для комплексу цих білків, що складають *реплісому*. Також на динаміку реплікації впливає і приурочений до інтерфази процес модифікації гістонів. Поява модифікованих молекул гістонів в певних ділянках хромосом викликає локальні зміни у структурі комплексу ДНП з білками, або полегшує локальні заміни деяких гістонів негістоновими білками (наприклад, заміна гістона H1 білками HMG) [9].

### **3. Основні етапи реалізації спадкової інформації.**

Дослідження з молекулярної генетики та молекулярної біології на прокаріотах дозволили з'ясувати основні етапи реалізації спадкової інформації. Структура різних типів молекул РНК (транспортної РНК, різних видів рибосомних РНК) контролюється рядом генів. В інших генах закодована інформація про первинну структуру різноманітних білкових молекул, з яких одні слугують компонентами тих чи інших клітинних структур, інші володіють специфічними ферментативними активностями, треті виконують різні регуляторні функції. Першим етапом у реалізації спадкової інформації слугує синтез на ДНК-матриці РНК-копії

(*транскрипція*). В еукаріот у більшості випадків ці РНК-копії проходять процес «дозрівання» (*модифікація*) – з них іноді видаляються досить значні ділянки, великі полінуклеотидні ланцюги розрізаються на декілька частин. Потрапивши в цитоплазму деякі види РНК, в процесі білкового синтезу виконують ту чи іншу функцію. Так, матрична РНК (і-РНК) після дозрівання (*сплайсингу*) надходить у цитоплазматичні рибосоми, де на них синтезуються поліпептиди (*трансляція*). Іноді й ці поліпептиди у подальшому піддаються процесу дозрівання. Первинний продукт процесу трансляції у такому випадку являє собою лише молекулу-попередник. Часто внаслідок впливу протеаз, які розрізають молекулу-попередник на частини, або руйнують частину поліпептидного ланцюга відбувається перетворення попередника в активно функціонуючий білок (наприклад, при перетворенні проінсуліну в інсулін, неактивних трипсиногену і хімотрипсиногену в активні трипсин і хімотрипсин) [12].

У еукаріотичних організмів на молекулярному рівні ініціація і термінація процесу транскрипції може регулюватися таким же чином, як і у прокаріотів. Але складність структурної організації хромосом у еукаріот порівняно зі структурою кільцевих ДНК геному прокаріотів, обумовлює існування у еукаріот додаткових можливостей і способів регуляції експресії генетичного матеріалу.

Чим вище ступінь компактизації хромонемі, тим менш доступна їй ДНК для контакту з РНК-полімеразою та іншими білками, необхідними для ініціації транскрипції. Мозаїчний прояв

ознак, контрольованих зчепленими зі статтю генами у самок ссавців, гетерозиготних за цими генам є добрим прикладом того, як активність генетичного матеріалу контролюється рівнем його компактизації. У каріотипі самок одна з X-хромосом навіть у інтерфазних ядрах представлена щільним гетеропікнотичним тільцем Барра, тобто гетерохроматизується. Оскільки протягом декількох клітинних циклів цей процес гетерохроматизації обернений і зачіпає то одну, то іншу X-хромосому, то у кінцевому рахунку ембріон виявляється мозаїчним: у одних клітинах на всі наступні клітинні покоління тільцем Барра виявляється X-хромосома з домінантною алелю, а в інших – X-хромосома з рецесивною алелю. Звідси і мозаїчний прояв ознаки у фенотипі. Такий висновок можливий тільки у тому випадку, якщо прийняти, що X-хромосома, представлена у вигляді тільця Барра, генетично інактивована.

Необхідною умовою експресії будь-якого району хромосоми – його деконденсація. Існує дві моделі які найбільш вдало її демонструють. Одна з моделей – так звані хромосоми типу лампових щіток, найчастіше спостерігаються в ооцитах різних груп тварин. Петлі цих хромосом являють собою деконденсовані ділянки хромонеми, на яких здійснюється інтенсивна транскрипція у наслідок якої у клітині у великих кількостях накопичуються або специфічні білки (у тому числі гістони «про запас» для забезпечення перших поділів після запліднення), або різні м-РНК, які причасні до процесу трансляції відразу після запліднення. Іноді продукти транскрипції з петель хромосом типу

лампових щіток необхідні для нормального гаметогенезу. Транскрипти з цих петель, очевидно, необхідні для забезпечення нормального перетворення сперматид на сперматозоїди [3].

Друга модель – це гігантські політенні хромосоми, що знаходяться у ядрах клітин деяких комах загону двокрилих. Чіткий малюнок дисків характеризує ці хромосоми, а специфічний характер компактизації кожної хромони призводить до утворення хромомери більшого чи меншого розміру. На певних стадіях розвитку личинок у політенних хромосомах у результаті деконденсації відповідної хромомери у кожній з хромонем замість деяких чітких дисків з'являються диффузні зони (puffs – пуффи) які відзначаються специфічною локальною зміною їх структури. В цих пуфф-місцях відбувається інтенсивний синтез РНК.

Отже, обидві описані природні моделі – петлі у хромосомах типу лампових щіток і пуффи у гігантських політенних хромосомах – наочно демонструють, що активно транскрибуємі ділянки хромосом представлені деконденсованими нуклеопротейдними нитками. Навпаки, практично повна інактивація ядерного матеріалу в сперміях асоціюється з високим ступенем його компактизації. Специфічний характер компактизації хромосомного матеріалу складає основу клітинного диференціювання, оскільки призводить до того, що у клітинах різних тканин експресуються різні ділянки хромосом. Також і специфічним набором варіантів різних гістонів у значній мірі забезпечується характер компактизації хромосом.

Зв'язок між процесами реплікації та експресії генетичного матеріалу простежується у кількох цікавих аспектах. Так чи інакше реплікація може сприяти збільшенню дози тих генів, експресія яких потрібна у даному типі клітин у даний час. Це реалізується за рахунок *ендомітозу* (ендополіплоїдії) – здійснення декількох циклів реплікації хромосом у середині ядра без поділу клітини і ядра, тобто збільшення кількості копій необхідного гена. Таке ж завдання може вирішуватися і за рахунок соматичної кон'югації: формування політенних хромосом відбувається при блокуванні багатьох етапів компактизації хромосом після реплікації і збереження реплікованих хромосом тісно притиснутими один до одного [3].

Збільшення дози одних генів у ядрі порівняно з дозою інших досягається за рахунок їх неодноразової реплікації у фазі *S*. Гени, репліковані на початку фази *S*, протягом тривалого часу представлені в ядрі вдвічі більшою дозою порівняно з генами, реплікованими у кінці синтетичної фази. Посилена диференціальна експресія генів у багатьох випадках пов'язана з їх значно більшою дозою порівняно з дозою інших генів.

Отже, диференціальна експресія генетичного матеріалу забезпечується встановленням специфічного порядку реплікації різних генів та різними варіантами модифікації нормального процесу реплікації всього набору хромосом або окремих районів.

Таким чином регуляція транскрипційної функції хромосом у еукаріот нерозривно пов'язана з їх реплікаційною та структурно-організаційною функціями. При цьому дуже істотну роль грають

як чинники, що визначають макрорівень компактизації хромонеми (еухроматин або гетерохроматином), так і чинники, пов'язані з організацією нуклеосомної нитки, стабільністю структури нуклеосом, конкуренцією гістонових і негістонових білків при утворенні комплексів з ДНК в тих чи інших районах [1].

**4. Мітотична стабільність.** Використання в останні 15-20 років методів молекулярної біології та біотехнології дозволило виділяти окремі ділянки ДНК з хромосом еукаріот і клонувати ці ділянки у великих обсягах у клітинах прокаріотів у складі гібридних плазмід – кільцевих молекул ДНК, в які вбудовані досліджувані фрагменти ДНК еукаріот. Таке клонування надалі дозволяє детально вивчати послідовність нуклеотидів у клонованому фрагменті ДНК. Виявилось, що деякі фрагменти ДНК надавали плазмідам, які їх містять, здатність регулярного відтворення у клітинному циклі всередині клітини дріжджів, тобто здатність до незалежної, автономної реплікації в *S*-періоді клітинного циклу. Звідси і назва, дана таким послідовностям нуклеотидів – *ARS* (autonomously replicating sequences). Ймовірно, *ARS* – стартові точки реплікації у репліконах хромосом дріжджів. При цьому реплікація з усіх *ARS* у клітинах здійснюється один раз протягом однієї *S*-фази, що й обумовлює рівномірну реплікацію всього генома. *ARS* з хромосоми дріжджів, включений у гібридну плазмиду забезпечує і для неї не більше ніж одноразову реплікацію протягом одного клітинного циклу.

Високу мітотичну стабільність у клітинах дріжджів мали тільки деякі гібридні плазмиди, які є носіями *ARS*-послідовностей і

деякі додаткові фрагменти ДНК з хромосом дріжджів. У ряді випадків ДНК фрагменти, які забезпечують стабільність плазмід в трансформованих клонах дріжджів, успішно гібридизувались з центромірними ділянками хромосом дріжджів.

Якщо плазміда містить дефектний *CEN*-фрагмент (наприклад, помітно укорочений), то при інтеграції такої плазмиди у хромосому за місцем локалізації центроміри центромірна ділянка хромосоми інактивується. Така хромосома стає мітотично нестабільною і при клітинному поділу часто втрачається. Але вона може бути знову стабілізована при інтеграції у ній по іншому локусу ще однієї плазмиди, яка є носієм активного *CEN*-фрагменту. Цікаво відзначити, що хромосома з інактивованим власним центроміром і вставленим «чужим» тим не менш нормально кон'югує в мейозі зі своїм гомологом. Отже, у детермінації гомологічної кон'югації нецентромірні ділянки грають головну роль [5].

Разом з тим у нижчих еукаріот відомі і лінійні мініхромосоми. Стабільна лінійна міні-хромосома повинна містити фрагменти *ARS* і *CEN*, а також мати на обох кінцях багаторазові повтори теломірної ДНК. Але у роботах по створенню таких міні-хромосом виявилася неможливість близької локалізації фрагмента *CEN* і теломірних послідовностей. Активність, властива фрагменту *CEN* при цьому не проявляється. Послідовність *CEN* функціонує як центроміра, тільки якщо між нею і теломірною ДНК розташовується фрагмент довжиною не менше 15-20 тис. п. н. Таким чином, найменший розмір стабільної лінійної міні-

хромосоми повинен становити близько 40 тис. п. н. [1].

Питання для самоперевірки:

1. Що таке ДНП-комплекс?
2. В чому полягає суть реасоціації, як відбувається реасоціація ДНК?
3. Що забезпечує багатоступеневу укладку, компактизацію нитки ДНК в хромосомі?
4. Що являють собою гістони?
5. Дайте характеристику основних груп гістонів?
6. З чого складається нуклеосомна структура?
7. Дайте характеристику процесу реплікації ДНК?
8. Що таке реплікаційна вилка, фрагменти Оказакі?
9. З чого складаються основні етапи реалізації спадкової інформації?
10. Що таке політенні хромосоми та пуфф-зони?



## Лекція 3

### Мейотичний кросинговер

1. Види генетичної рекомбінації
2. Хроматидна природа кросинговеру
3. Хіазми та кросинговер
4. Хіазменна та хроматидна інтерференція
5. Кросинговер між сестринськими хроматидами
6. Порівняння генетичних та цитологічних карт хромосом

**1. Види генетичної рекомбінації.** *Генетична рекомбінація* – процес у наслідок якого з'являються нащадки з новим поєднанням двох або більшої кількості спадкових факторів за якими розрізнялися їх батьківські форми. У значній мірі таку рекомбінацію в еукаріот отриманих від батьківських форм різних алелів двох або більшої кількості ядерних генів забезпечує процес незалежного розходження у мейозі різних пар гомологічних хромосом. За цим механізмом здійснюється рекомбінація незчеплених генів – генів, локалізованих у різних хромосомах. Можливості такої рекомбінації у забезпеченні комбінативної мінливості досить великі [3].

Оскільки вдається виявити лише один з комплементарних (взаємодоповнюючих) продуктів цього процесу у прокаріот різні види рекомбінації генів, зчеплених у їх кільцевих молекулах ДНК (трансформація, трансдукція, рекомбінація при статевому процесі), позначаються як види нерцепроковної рекомбінації. Рекомбінація зчеплених генів у еукаріот зазвичай дозволяє виявити комплементарні рекомбінантні хромосоми (крім випадків генетичного маркування, при яких один з комплементарних

продуктів рекомбінації за своєю генетичною структурою виявляється нежиттєздатним), тому її називають реципрокною.

Для реципрокної рекомбінації зчеплених генів потрібна точна кон'югація гомологічних хромосом або гомологічних ділянок хромосом. Рекомбінація зчеплених генів здійснюється у вигляді закономірного процесу мейотичного кросинговеру, оскільки такий процес регулярно відбувається у профазі мейозу. Разом з тим накопичується все більше фактів про те, що у різних видів гетерозиготні особини виявляють мозаїчний прояв домінантних і рецесивних алелей. Ці факти пояснюються здійсненням кросинговеру у соматичних клітинах (мітотичний кросинговер) [12].

Основою для загальної рекомбінації слугує кон'югація гомологічних хромосом, яка відбувається у профазі мейозу. Коли до цього процесу залучаються гомологічні ділянки із різних хромосом, то рекомбінація може відбуватися між гомологічними ділянками хроматид, які розміщені у різних хромосомах – *гетерологічна рекомбінація*. *Сайт-специфічна рекомбінація* – контролюєма спеціальними системами генів, приуроченість рекомбінаційних подій до однієї певної ділянки (сайту) або до обмеженого числа подібних ділянок. Слід відмітити, що і у даному випадку для забезпечення рекомбінації характерна кон'югація, чітке взаємне розміщення дуже коротких ідентичних послідовностей ДНК.

У прокаріот відбуваються аналогічні процеси рекомбінації, але відмінні за низкою важливих характеристик. Одна з таких

характеристик – відсутність будь-якого точного взаємного розташування гомологічних послідовностей ДНК. Саме з цієї причини процес, що призводить до впровадження мобільних генетичних елементів, названий *незаконною рекомбінацією* [5].

### **Основні положення мейотичного кросинговеру:**

1. Кросинговер здійснюється на хроматидному рівні, оскільки відбувається при кон'югації гомологічних хромосом і кожна хромосома у біваленті (тетрадї) представлена двома хроматидами (діадами).

2. У кожному конкретному місці до обміну залучаються тільки дві хроматиди з чотирьох.

3. Уздовж по довжині бівалента обмін може відбуватися неодноразово, тобто можливий множинний (подвійний, потрійний) кросинговер.

4. Сутність кросинговеру полягає в якісному матеріальному обміні ділянками між хроматидами.

5. Кросинговер асоціюється з хіазмами, які спостерігаються у бівалентах, починаючи зі стадії диплотени профазі першого поділу мейозу [2].

**2. Хроматидна природа кросинговеру.** Одне з основних положень теорії кросинговеру – твердження про хроматидну природу цього процесу, згідно якої він відбувається на стадії пахітени профазі I мейозу. Так, кожен з кон'югуючих гомологів представлений двома сестринськими хроматидами, тому бівалент, містить 4 хроматиди, його називають тетрадою, а пари сестринських хроматид у ньому – діадами.

Перші докази хроматидної природи кросинговеру були отримані з використанням цитогенетичних моделей.

Першою з них була модель нерозходження статевих хромосом у роботі К. Бріджеса на дрозофілі. При схрещуванні гетерозиготних самок за рецесивним алелями двох генів –  $w^e$  і  $v$ , з самцями *Var*, були отримані поодинокі самки з нормальними очима еозинового забарвлення. Отже, ці самки не отримали батьківську X-хромосому з геном *Var*. Таким чином, обидві X-хромосоми отримані від матері. Це можна очікувати при утворенні яйцеклітин з двома X-хромосомами за рахунок їх нерозходження під час редукційного розподілу. Еозинове забарвлення очей у цих самок свідчить про відсутність у них алелі дикого типу гена  $w$ . Гомозиготність по  $w^e$  у таких самок може бути досягнута завдяки кросинговеру між генами  $w^e$  і  $v$ , при цьому кожна хромосома повинна бути представлена не менш ніж двома хроматидами, а в обміні беруть участь по одній хроматиді від кожного гомолога [9].

Друга модель, на якій була продемонстрована хроматидна природа кросинговеру – це щеплення X-хромосом у дрозофіли. У цих мух самки мають обидві X-хромосоми, з'єднані в ділянці центроміри, так що вони складають практично єдину ізохромосому – хромосому з ідентичним набором генів. У мейозі ці два плеча кон'югують один з одним як гомологи. Оскільки обидві X-хромосоми не розходяться під час редукційного поділу, вони представлені в яйцеклітині. Життєздатні ембріони розвиваються при заплідненні таких яйцеклітин сперміями з Y-хромосомою. Таким чином, у лініях зі зчепленими X-хромосомами не

здійснюється *кріс-крос* успадкування за зчепленими зі статтю ознаками. Самки отримують зчеплені X-хромосоми від матері, а самці – X-хромосому від батька, а Y-хромосому – від матері. У самок зі зчепленими X-хромосомами, гетерозиготних за локалізованим у X-хромосомі геном, у нащадків виявляються доньки як дикого типу, так і гомозиготи за рецесивною алелю. Є. Андерсен для гену *garnet* (рубінові очі) у нащадків гетерозиготних самок виявив 10% дочок з рецесивною ознакою. Їх поява пояснюється здійсненням деяких типів обмінів між геном *g* і центромірою, причому кожна з X-хромосом представлена двома хроматидами, а в обміні беруть участь дві хроматиди з чотирьох.

Отже, результати наведених досліджень цитогенетичних моделей – нерозходження хромосом та зчеплення X-хромосом пояснюються положенням хроматидної природи кросинговеру [1].

**3. Хіазми та кросинговер.** Рекомбінація при мейотичному кросинговері асоціюється з хіазмами – X-подібними перехрещуваннями хроматид, які найкраще спостерігаються у великих хромосомах при сперматогенезі.

Серед продуктів мейозу (спор або гамет), що утворилися з мейоцитів, у яких здійснювався кросинговер, тільки половина несе кросоверні поєднання алелів тих генів, які розташовуються по краях досліджуваного інтервалу у біваленті. Якщо вважати показником кросинговеру появу у біваленті хіазм і навіть якщо у всіх 100% мейоцитів у досліджуваному інтервалі бівалента міститься хіазма, то тільки 50% продуктів мейозу (спор або гамет) несуть хромосоми з кросоверним поєднанням алелів генів,

розташованих по краях даного інтервалу. Якщо у досліджуваному інтервалі хіазми спостерігаються у 40% мейоцитів, то рекомбінантних продуктів мейозу очікується 20%. І навпаки, при виявленні в експерименті 20% рекомбінацій в якомусь інтервалі певного бівалента то слід очікувати хіазми в 40% мейоцитів.

Таким чином, кожній регулярно утвореній хіазмі відповідає інтервал 50 сМ на генетичній карті. Але якою б не була відстань між генами на генетичній карті, виявлений між ними кросинговер не може перевищити 50%. Хроматидна природа кросинговеру обумовлює неможливість виявити більше 50% рекомбінацій між щепленими генами [10].

*Гетероморфний бівалент* – складається із гомологів різного розміру. У гетероморфному біваленті хромосоми у ділянках з різним розміром плечей хіазми не можуть утворюватися. Відповідно в анафазі I не спостерігається випадків екваційного розходження.

Наслідком появи хіазм у результаті кросинговеру є відповідність однієї постійно утворюваної хіазми розміру інтервалу на генетичній карті в 50 сМ. С. Дарлінгтон прийняв припущення про рівномірний розподіл хіазм у хромосомах, тобто їх число у бівалентах повинно бути пропорційно їх довжині. С. Дарлінгтон розрахував, яка кількість хіазм припадає на кожний бівалент. Далі, скориставшись наслідком про відповідність однієї хіазми інтервалу на генетичній карті він теоретично розрахував очікувану довжину генетичної карти кожної хромосоми. С. Дарлінгтон підтвердив, що це може бути надійним показником вихідного положення, що

хіазми є результатом кросинговеру [6].

**4. Хіазменна та хроматидна інтерференція.** Коли в одному біваленті при двох або більше обмінах, кожен з них ніяк не впливає на ймовірність інших обмінів, говорять про відсутність *інтерференції*. Явище зменшення фактичної кількості подвійних перехресть за рахунок пригнічення одного кросинговеру виникненням іншого у тому ж біваленті називається **хромосомною** або **хіазменною інтерференцією**.

Хіазменна інтерференція може бути позитивна (практична), та негативна (теоретична). При практичній хіазменній інтерференції подвійних обмінів з'являється менше, ніж теоретично очікується при незалежному здійсненні кожного з обмінів (англ. to interfere означає «заважати»). У разі негативної хіазменної інтерференції подвійних перехресть мало б бути більше, ніж теоретично очікується [2].

*Хроматидна інтерференція* має дещо інший зміст. Хроматидна інтерференція не робить впливу на частоту множинних обмінів. Це поняття відноситься до розподілу подвійних (чи інших множинних) обмінів за різних типів: як дво-, три- або чотирьоххроматидний. Якщо участь хроматиди в одному обміні знижує ймовірність її участі в інших обмінах, то слід говорити про позитивну хроматидну інтерференцію. Таким чином знижується частка двоохроматидних і зростає частка чотирьоххроматидних обмінів. Негативна хроматидна інтерференція, навпаки, призводить до збільшення частки двоохроматидних і до зниження частки чотирьоххроматидних множинних обмінів через те, що участь

хроматиди в одному обміні сприяє залученню її у повторному обміні.

У хіазменній інтерференції множинних кросоверів виявляється менше, ніж теоретично очікується. За пропозицією Г. Меллера, величину співпадіння фактичної та очікуваної (теоретичної) кількості подвійних перехресть оцінюють за коефіцієнтом коінциденції (від coincide – співпадати):

$$C = \frac{\text{практичні подвійні обміни}}{\text{теоретичні подвійні обміни}} (\%)$$

Знаючи коефіцієнт коінциденції, можна легко визначити величину інтерференції :

$$I = 1 - C;$$

Чим вище показник  $C$ , тим менше позитивна хіазменна інтерференція і тим менше один обмін впливає на ймовірність здійснення іншого. При повній хіазменної інтерференції коли подвійних кросинговерів взагалі не спостерігається –  $C=1$  (відсутність інтерференції) до 0 (повна інтерференція), тобто величина фактичних перехресть менше теоретичних – позитивна інтерференція. При негативній інтерференції навпаки величина фактичних кросинговерів більше очікуваних [5].

Позитивна хіазменна інтерференція залежить від протяжності інтервалу, в якому враховується рекомбінація. Тобто ступінь інтерференції зменшується з віддаленням від місця перехреста, що вже виник. Оскільки позитивна хіазменна інтерференція визначає частоту виникнення подвійних кросинговерів, вона впливає на



успішність виявлення реальних відстаней між генами у дослідях з обліку результатів подвійних перехресть. А знаючи міжгенну відстань можна оцінити частоту множинних рекомбінацій, включаючи подвійні кросинговери між цими генами.

У еукаріот найчастіше зустрічається саме практична інтерференція. Ймовірно, дуже близьке розміщення хіазм є неможливим і обумовлює інтерференцію [3].

**5. Кроинговер між сестринськими хроматидами.** Оскільки результати рекомбінації необхідно шукати між генетично ідентичними хроматидами, питання, чи відбувається обмін між сестринськими хроматидами, на перший погляд не піддається аналізу. Однак і у вирішенні цього питання можна використовувати як цитогенетичний, так і цитологічний підходи, причому цитогенетичний історично був першим. Адекватною цитогенетичною моделлю для вирішення питання про можливість кросинговеру між сестринськими хроматидами виявилися кільцеві хромосоми.

Вперше таке дослідження було проведено Б. Мак Клінток. Автор, вивчала рослини, у яких одна з п'ятої пари хромосом була з помітно укороченим плечем, але додатково мала маленьку кільцеву хромосому. Оскільки лише у присутності кільцевої хромосоми, нащадки несучі дві укорочені хромосоми були життєздатні, Мак Клінток зробила висновок про те, що у кільцевій хромосомі є генетичний матеріал, який компенсує нестачу його в укорочених хромосомах. Між сестринськими хроматидами кільцевої хромосоми при мітотичному кросинговері повинно виникати

подвоєного розміру двуцентромірне кільце, причому орієнтується воно центрами до різних полюсів клітини, а в анафазі очікується розрив цього кільця. Якщо розрив відбувається не точно посередині, то в одну з дочірніх клітин після мітозу потрапляє кільцева хромосома зменшеного розміру, що втратила частину матеріалу, який компенсував нестачу в укороченій хромосомі. Подальше розмноження таких клітин дає смугу тканини, яка у рослин зазвичай буває безхлорофільною (гомозиготні за нестачами). Саме це і було виявлено Мак Клінток у рослин, що несуть пару укорочених хромосом та кільцеву хромосому [8].

Питання про кросинговер між сестринськими хроматидами у мейозі також вирішувалося з використанням моделі кільцевих хромосом. Так, Д. Шварц досліджував мейоз у рослин кукурудзи, що містили з шостої пари одну звичайну хромосому, а другу – кільцеву. При кросинговері в цьому біваленті, а також при подвійному трьооххроматидному кросинговері в анафазі I очікується місток, а при подвійному чотирьоххроматидному кросинговері – подвійний місток. У анафазі II місток в одній клітині з пари очікується тільки у випадку одного з типів трьооххроматидного подвійного кросинговеру. Такі результати можливі коли кросинговер відбувається тільки між несестринськими хроматидами. Дослідження Д. Шварцем поділок мейозу на стадіях анафазі I і II показали, що в 13% клітин на стадії анафазі I виявляються подвійні мости. Вони з'являються тільки у результаті чотирьоххроматидних подвійних обмінів, і якщо прийняти відсутність хроматидної інтерференції, то слід вважати,

що кожен тип трьоххроматидних подвійних обмінів також відбувався з частотою 13%. Таким чином, тільки у 13% пар клітин на стадії анафази II очікувався б місток у одній з клітин. Реально ж містки в анафазі II виявлені набагато частіше – у 35% пар клітин. Крім того, в анафазі II виявлені двоцентромірні кільця, які при поділі розташовуються між полюсами у вигляді подвійних містків. Такі картини в анафазі II не спостерігаються, якщо кросинговер передбачається тільки між несестринськими хроматидами.

Пояснюючи появу таких конфігурацій в анафазі II, Д. Шварц припустив, що крім обмінів між несестринськими хроматидами відбуваються ще обмін між сестринськими. Він вважає, що сестринські обміни не пов'язані з несестринськими і спостерігаються у всіх клітинах. У половині випадків вони виявляються парними, в половині – непарними. Тільки у випадку непарних сестринських обмінів картина очікуваного розходження хромосом може змінитися. Таким чином, у половині клітин, де здійснюється одиничний кросинговер, має місце також непарний обмін між сестринськими хроматидами кільцевої хромосоми (обмін між сестринськими хроматидами нормальної хромосоми шостої пари не змінює очікуваних картин розходження хромосом), що призводить до появи містка в анафазі II. Якщо кожен з трьоххроматидних подвійних обмінів відбувається з частотою 13%, то частота одиничних обмінів:  $59\% - 2 \times 13\% = 33\%$  (всі ці події дають міст у анафазі I). Тоді частота додаткових мостів у анафазі II за рахунок обмінів між сестринськими хроматидами кільцевої хромосоми повинна скласти  $33\% \div 2 = 16,5\%$ . Таким чином, нова

очікувана частота одиничних мостів у анафазі II становить  $13\% + 16,5\% = 29,5\%$ , що значно ближче до реально виявленої (35%) [9].

### **6. Порівняння генетичних та цитологічних карт хромосом.**

Відстань між генами можна визначити у відсотках за рахунок частоти кросинговеру, тобто чим далі знаходяться гени один від одного, тим вищою є частота кросинговеру між ними – збільшується кількість кросоверних особин. Це надає можливість створювати карту хромосом – місце розташування генів на хромосомі.

На генетичних картах розмір хромосом оцінюється частотою рекомбінації між генами і вимірюється у сантиморганах (сМ). Практично повна хіазменна інтерференція на невеликих інтервалах дає підставу рекомендувати складати генетичні карти по можливості невеликими ділянками шляхом підсумовування довжин коротких інтервалів. Така карта найбільш точна [11].

*Цитологічна карта хромосоми* – це схематичне зображення хромосоми з позначенням місць розташування генів, але розмірність цієї карти оцінюється у абсолютних або відносних фізичних одиницях довжини хромосоми на певному ступені клітинного циклу.

*Генетична карта хромосоми* – визначене положення гена по відношенню до двох інших генів, але розмірність такої карти оцінюється у *морганідах* – одиниця відносної відстані між генами і відповідає частоті кросинговеру в 1%. Одиниця відстані між генами – 1% кросинговеру = 1 морганіді. Постійність відсотка кросинговеру між двома генами дозволяє визначити місце їх

локалізації. Чим більше генів відомо у цьому виді, тим точніше результати картування. Цифри на карті вказують відстань між різними генами у морганідах, яка починається від гена, що займає нульове положення на лівому кінці кожної хромосоми. Під час складання генетичних карт додають відстані між двома найближчими генами, що перевищує значення відсотка кросинговеру, отримане експериментально. Ймовірність подвійного кросинговеру (без врахування явища інтерференції) дорівнює добутку ймовірності двох одиничних актів рекомбінацій, наприклад, якщо одиничний перехрест з частотою 0,2, то подвійний  $0,2 \times 0,2 = 0,04$ .

Використовуючи цитологічні карти, а також дані про відстані між генами на генетичних картах, можна знайти разючі приклади нееквівалентності між ними при суворому збереженні послідовності у розміщенні генів на обох типах карт [2].

Співставлення генетичних і цитологічних карт хромосом підтвердило, що при повному збігу порядку розташування генів на обох типах карт відносні відстані між генами виявляються специфічно модифікованими: гени, близько розташовані один до одного на генетичних картах у прицентромірних і теломірних ділянках, опиняються на порівняно великих відстанях один від одного у мітотичних хромосомах або у політенних хромосомах [4].

Питання для самоперевірки:

1. Що таке кросинговер, що дає генетична рекомбінація?
2. Які види генетичної рекомбінації ви знаєте?
3. Дайте характеристику основним положенням кросинговеру.
4. В чому полягає суть хроматидної природи кросинговеру?
5. Хіазменна природа кросинговеру?

6. Що таке гетероморфний бівалент?
7. Що таке хіазменна інтерференція, яка вона буває?
8. Що таке хроматидна інтерференція?
9. Що таке коефіцієнт коінциденції, як він розраховується?
10. Явище кросинговеру між сестринськими хроматидами, дайте пояснення?
11. Які види карт хромосом Вам відомі?
12. Що таке морганіда?

## Лекція 4

### Вплив факторів на кросинговер

1. Вплив генетичних факторів
2. Вплив біологічних факторів
3. Вплив абіотичних факторів

**1. Вплив генетичних факторів.** Процес кросинговеру помітно модифікується крім генетичних і різноманітними внутрішніми та зовнішніми факторами. Виявлені гени які виконують роль активаторів та супресорів кросинговеру. Загальна частота рекомбінації генів може бути різною в овоцитах та сперміях. У людини кросинговер відбувається вдвічі частіше у жінок, ніж у чоловіків. У дрозофіли в третій хромосомі виявлена мутація яка зупиняє кросинговер у всіх парах хромосом. Збільшення частоти кросинговеру на 2-3% у самок дрозофіли забезпечує додаткова Y-хромосома. До генетичних факторів які впливають на кросинговер можна віднести: положення ділянки в хромосомі відносно центроміри, гетерозиготність за хромосомними перебудовами, міжхромосомний ефект, генні мутації [5].

*Положення ділянки в хромосомі відносно центроміри* – як відомо, на неоднорідність частоти кросинговеру у різних ділянках хромосоми впливає їх структура: частота кросинговеру дуже невелика у прицентромірних, а іноді і у теломірних ділянках навіть при значних фізичних відстанях між генами. Вплив розташування досліджуваного інтервалу у хромосомі на кросинговер досліджував Дж. Бідл який використав транслокацію за участю IV хромосоми.

Автор довів, що при наближенні досліджуваної ділянки хромосоми до центроміри при перебудові частота рекомбінації у ній помітно зменшилася, а у ділянці, яка була і залишилася найбільш віддаленою від центроміри, частота її майже залишилась незмінною. Таким чином, на частоту рекомбінацій у будь-якій ділянці хромосоми впливає фізична відстань від центроміри [8].

**Гетерозиготність за хромосомними перебудовами** – у гетерозиготних особин за хромосомними абераціями у хромосомах, порушених аберацією, частота кросинговеру зазвичай пригнічується. Наприклад, у самок дрозофіли, гетерозиготних за інверсією *dl-42* в X-хромосомі, між генами *u* й *ec* виявляється всього 0,56% рекомбінацій. Хоча обидва ці гени не входять до складу інвертованої ділянки ця величина у 10 разів нижче звичайного рівня рекомбінацій між ними (5,5%) за відсутності аберацій. Цитологічне дослідження у гетерозиготних особин за інверсіями (наприклад, у кукурудзи) характеру кон'югації хромосом під час мейозу, виявляє у біваленті значну ділянку де кон'югація гомологів відсутня. Це зазвичай ділянка, де при утворенні інверсії відбулися розриви (крапки, місця), і яка включає прилеглі до цих крапок-розривів інтервали як у інвертованих, так і у неінвертованих ділянках.

Різна ступінь пригнічення кросинговеру була виявлена у самок *D. melanogaster*, гетерозиготних за однією з двох майже рівних за протяжністю інверсій у X-хромосомі. Інверсія *sc*<sup>7</sup> включає відрізок довжиною 15 сМ на генетичній карті, і розташований цей відрізок дистально, ближче до самого кінця довгого плеча X-хромосоми.



Інверсія  $B^{m2}$  включає відрізок довжиною 10 сМ на генетичній карті, розташований у прицентромірній ділянці. Облік довжини генетичної карти Х-хромосоми при множинному маркуванні у гетерозиготних особин за інверсією  $B^{m2}$  дає величину 47 сМ замість звичайних 57 сМ у разі відсутності інверсії, а при гетерозиготності за інверсії  $sc^7$  – всього 22 сМ. Пояснення причин цих відмінностей полягає у тому, що кон'югація хромосом починається з кінцевих, теломірних ділянок, а прицентромірні ділянки кон'югують останніми. При такому припущенні у гетерозигот за інверсією  $B^{m2}$  очікується нормальна кон'югація протягом всієї Х-хромосоми аж до ділянки, де починається ця інверсія. У той час у гетерозиготних особин за інверсією  $sc^7$  порушено самий початок кон'югації, і тому вона виявляється недосконалою (неповноцінною) і далі – вздовж усього плеча. Звідси і більш різке пригнічення кросинговеру у гетерозигот за цією інверсією [3].

Зниження рекомбінації характерно і для гетерозиготних особин за транслокаціями, причому у тому плечі, у якому стався розрив при утворенні цієї транслокації. У іншому плечі цієї хромосоми зазвичай спостерігається деяка стимуляція рекомбінації. Цитологічне дослідження показує, що у мейозі у гетерозигот за транслокаціями (наприклад, у кукурудзи) при утворенні хрестоподібної фігури тетраваленту з двох не транслокованих і двох транслокованих хромосом у центрі спостерігається «віконце» недосконалої кон'югації, що, ймовірно, і служить основною причиною пригнічення кросинговеру.

Також був встановлений вплив на рекомбінацію

гетерозиготності за дуплікаціями та нестачами. Хромосоми, які містять дуплікації – однакові ділянки у різних хромосомах, які утворилися за рахунок переміщення реципрокних транслокацій або не реципрокних вставок – інверсій, несуть дану ділянку у потрібній кількості. Одна з цих ділянок не має партнера для кон'югації і таким чином теж відбувається пригнічення кросинговеру. У той час коли у гетерозиготних особин за нестачами у хромосомах, рекомбінація між генами короткого та довгого плечей цієї хромосоми за рахунок відсутності партнера для кон'югації зменшується майже двічі.

Таким чином, у гетерозиготних особин за різноманітними хромосомними перебудовами кросинговер в хромосомах залежить від цих перебудов та пригнічується за рахунок порушень у кон'югації [4].

**Міжхромосомний ефект** – першим вивченим прикладом міжхромосомного ефекту впливу будь-якої зміни у каріотипі на кросинговер був вплив гетерозиготності за інверсіями. А. Стертевант у 1919 році висловив думку про те, що рекомбінаційна система клітини єдина і посилення кросинговеру у одних ділянках може бути пов'язано з його пригніченням у інших. У 1923 році це припущення отримало підтвердження – було доведено, що домінантні фактори *C* (*crossover suppressors*), у місцях своєї локалізації пригнічують кросинговер, але його посилюють у інших ділянках, у тому числі у інших бівалентах. Після того як було доведено, що роль факторів – «пригнічувачів кросинговеру» – в гетерозиготному стані зазвичай виконують

інверсії, міжхромосомний ефект інверсій досліджували Дж. Шульц і Е. Редфілд, за що він отримав назву «ефекту Шульца-Редфілд». Рекомбінація в біваленті хромосоми II *D. melanogaster* помітно посилюється, якщо в каріотипі спостерігається гетерозиготність за інверсією в X-хромосомі або хромосомі III. При цьому відносний приріст частоти рекомбінації особливо значний у прицентромірних та у теломірних ділянках.

Іншим прикладом впливу міжхромосомного ефекту на кросинговер є дослідження А. Лонглі який довів, що у гетерозиготних особин за інверсіями частота кросинговеру майже не змінюється завдяки наявності незвичних хромосом з великим гетерохроматиновим потовщенням наприкінці довгого плеча. При наявності цієї незвичної хромосоми, навіть у гетерозиготних екземплярів за інверсіями, кросинговер відбувається частіше, а інколи спостерігається і нормальна його частота за рахунок петлеподібної кон'югації, яка здійснюється при наявності цієї незвичної хромосоми. А при наявності тільки нормальних форм хромосом у гетерозиготних бівалентах за інверсіями спостерігається характерна недосконалість, неточність кон'югації [8].

Іншим прикладом міжхромосомного ефекту є вплив додаткових хромосом – В-хромосом на кросинговер у хромосомах стандартного каріотипу даного виду. Такий ефект був виявлений М. Родсом у ділянках, розташованих у середині плеча або ближче до центроміри, кросинговер у присутності В-хромосом посилювався, у той час коли у дистальних ділянках дещо

пригнічувався.

Факти міжхромосомного ефекту переконливо свідчать про те, що хромосоми здійснюють свою рекомбінаційну функцію не незалежно, а у єдиній системі всього каріотипу, тобто пригнічення рекомбінації у одних бівалентах супроводжується її посиленням у інших [9].

**Вплив генних мутацій** – більша частина відомих мейотичних мутацій призводить до супресії кросинговеру. Під впливом генних мутацій змінюється тільки частота кросоверних обмінів, а їх розподіл залишається колишнім. Прикладом такої мутації може слугувати мутація "мей-9". Ця мутація у гомозиготному стані призводить до зниження рівня мейотичного кросинговеру до 8% порівняно з контролем, при цьому характер розподілу кросоверних обмінів в геномі не змінюється. Під дією генних мутацій кросинговер, як правило, сильніше знижується у дистальних ділянках хромосом порівняно з проксимальними.

Як було вже зазначено, що більшість генних мутацій призводить до пригнічення кросинговеру. Один з небагатьох прикладів підсилювача кросинговеру – мутація *Rec1* нематоди – ця мутація у кілька разів збільшує частоту кросинговеру у всіх групах зчеплення. При цьому зростає рівень генетичної конверсії і частота нерозходження статевих хромосом. Автори вважають, що *Rec1* являє собою дефект репресора кросинговеру.

Мабуть, відмінність генотипів за алелями подібних генів, що підвищують або знижують частоту кросинговеру, лежить у основі внутрішньовидових спадкових відмінностей між різними клонами,

лініями, популяціями, сортами за частотою хіазм або за частотою кросинговеру. Успішність селекції на підвищення і зниження частоти кросинговеру також підтверджує властивості генів, їх домінантних або рецесивних алелів модифікувати частоту кросинговеру [5].

Встановлені також випадки впливу мутацій окремих маркерних генів, що проявляються у зміні морфологічних або біохімічних ознак, на частоту кросинговеру у певних інтервалах. Ці факти можуть бути результатом плейотропного ефекту даних мутацій, або результатом тісного зчеплення з цими маркерами рецесивних алелей генів – модифікаторів кросинговеру.

Виявлення генів, мутації яких підвищують або знижують частоту кросинговеру набуває великого значення, оскільки дозволяє виявляти суттєві компоненти тієї системи в клітині, яка забезпечує здійснення мейотичного кросинговеру і найважливіші етапи цього процесу [11].

**2. Вплив біотичних факторів.** Ще Т. Морган виявив, що у самців *D. melanogaster*, а також у самок тутового шовкопряду (в яких гетерогаметна не чоловіча, а жіноча стать) кросинговер не відбувається. В інших груп тварин кросинговер виявляється у потомстві і самок і самців. Таким чином, частота кросинговеру нижче у особин гетерогаметної статі.

Оскільки для тварин характерний хромосомний механізм визначення статі, в якому істотну роль відіграють статеві хромосоми, вплив статі на кросинговер можна було б вважати одним із прикладів міжхромосомного ефекту – ефекту

гетерохромосом (Y-хромосоми при механізмі XY або W-хромосоми при механізмі ZW).

Виявлено, що на частоту кросинговеру впливає вік організму, так К. Бріджес вперше встановив взаємозв'язок між частотою рекомбінації генів та віком особини. Отримані ним дані по декількох інтервалах показали зовсім однаковий характер зміни частоти кросинговеру в залежності від віку самок *D. Melanogaster*. Так, у дрозоділи максимальна частота кросинговеру спостерігається у перші 10 днів життя, у наступні 10 днів спостерігається її зниження, а після трьох тижнів життя – знову підйом частоти рекомбінації. Можна припустити, що функціональний стан організму впливає на перебіг різних стадій мейозу, тому що ступінь спіралізації хромосом, швидкість проходження різних стадій профазі може залежати від фізіологічного стану клітин [12].

**3. Вплив абіотичних факторів.** На частоту рекомбінації можуть впливати різні фактори зовнішнього середовища: температура, іонізуюче випромінювання, концентрація солей, хімічні мутагени, ліки, гормони. При більшості зазначених впливів частота кросинговеру підвищується. За частотою різних типів рекомбінації (мейотичний та мітотичний кросинговер, сестринські хроматидні обміни) можна судити про мутагенну дію лікарських препаратів, канцерогенів, антибіотиків та ін.

Зміну частоти рекомбінації під впливом факторів зовнішнього середовища називають індукованим кросинговером. Г. Плу, а потім К. Штерн та інші показали, що у дрозоділи низькі (9-13°) і високі

(30-32°) температури збільшують відсоток кросинговеру; в оптимальних температурних умовах розвитку виявляється найменший відсоток перехрестів. Так, у дослідженнях Г. Плу враховувався кросинговер між трьома рецесивними генами II групи зчеплення. Самки, гетерозиготні за даними генами, розвиток яких проходив при різних температурах, були схрещені з самцями, гомозиготними за тими ж рецесивним генам. У потомстві враховувалися кросоверні особини, що виникли внаслідок рекомбінації між генами  $b$  і  $pr$  та  $pr$  і  $c$ . Частота кросинговеру значно збільшується при підвищенні і зниженні температури. Ці ж матеріали свідчать про те, що дія температури на перехрест у ділянці між генами  $b$  і  $pr$ , прилеглому до центромери, значно більше (від 6,0 до 15,4% або 13,6%), ніж між генами  $pr$  і  $c$ , де частота перехрещення збільшується всього на 6%. Подальшими дослідженнями було встановлено, що ділянки хромосом поблизу центромери більш чуйні на зовнішні впливи, ніж віддалені від неї. Це явище пов'язують з більш високою реактивністю гетерохроматинових ділянок поблизу центромери [10].

Вивчення дії рентгенових променів ще у роботах Дж. Мевора і К. Свенсона показали, що іонізуюча радіація впливає на кросинговер. Якщо температура впливає головним чином на кросинговер тільки у тих клітинах, які проходять у момент впливу на профазу I мейозу, то рентгенові промені впливають на кросинговер, підвищуючи його частоту у клітинах, що знаходяться як у передмейотичному, так і у мейотичному станах. Частота кросинговеру залежить від дози опромінення. Однак зазначена

залежність є тільки для певної стадії розвитку статевих клітин, відповідної профазі I мейозу, і залежить також від генотипу ліній і певної ділянки хромосоми (гетерохроматинової) [9].

Дослідження дії хімічних агентів також показало, що багато з них подібним чином з рентгеновими променями збільшують частоту кросинговеру. До таких агентів відносяться іприт (гірчичний газ), формальдегід, органічна перекис та ін. Найбільш вивченим з хімічних агентів, який впливає на ефект кросинговеру є етилендіамінтетраоцтова кислота (скорочено ЕДТА). Передбачається, що цей агент видаляє з хромосоми бівалентні іони кальцію і магнію, які мають важливу роль у підтримці структурної цілісності хромосом. Передбачається, що видалення їх призводить до порушення безперервності структури хромосом, що і збільшує частоту хроматидних розривів, частина з яких може призводити до рекомбінації генів [1].

Питання для самоперевірки:

1. Які генетичні фактори регуляції кросинговеру Ви знаєте?
2. Поясніть як впливає на кросинговер положення ділянки в хромосомі відносно центроміри?
3. Поясніть як впливає на кросинговер гетерозиготність за хромосомними перебудовами?
4. Поясніть як впливає на кросинговер міжхромосомний ефект?
5. Поясніть як впливають на кросинговер генні мутації?
6. Дайте пояснення біологічних факторів впливу на кросинговер?
7. Дайте пояснення абіотичних факторів впливу на кросинговер?



## Лекція 5.

### Уявлення про механізми кросинговеру

1. Основні гіпотези кросинговеру
2. Співвідношення у часі між передмейотичною реплікацією хромосом, кон'югацією гомологів та кросинговером
3. Сучасні уявлення про механізм кросинговеру

**1. Основні гіпотези кросинговеру.** Дослідники, які вивчали мейоз у різних видів, багаторазово спостерігали фігури хіазм у бівалентах. При цьому висловлювалися міркування про те, що ці зміни могли б бути пов'язані з обміном ділянками між гомологічними хромосомами при їх кон'югації. У мейозі у деяких об'єктів (прямокрилі, деякі амфібії) хіазми виявляються виключно чітко: ясно видно, що перехрещуються хроматиди від двох гомологів. На ці уявлення про те, що вони можуть бути пов'язані з обміном ділянками між гомологами, особливу увагу звернули генетики групи Т. Моргана. Автори, детально дослідили кросинговер як процес рекомбінації зчеплених генів. Однак у тлумаченні зв'язку між хіазмами які спостерігаються у бівалентах та кросинговером який реєструється у генетичних експериментах існують дві протилежні точки зору, розроблені у вигляді двох гіпотез [8].

Одна з цих гіпотез – гіпотеза хіазмотипії – розроблена головним чином Ф. Янссеном та С. Дарлінгтоном. Відповідно до цієї гіпотези, у процесі синапсису гомологічних хромосом у біваленті створюється динамічне напруження, що виникає у зв'язку зі спіралізацією хромосомних ниток, а також при взаємному

обвиванні гомологів у біваленті. У силу цієї напруги одна з чотирьох хроматид рветься. Розрив, порушуючи рівновагу у біваленті, призводить до компенсуючого розриву у виключно ідентичній точці будь-якої іншої хроматиди цього ж бівалента. Якщо ці розірвані кінці возз'єднуються не відновленням вихідних структур, а рекомбінантним чином, то обов'язковим результатом такої рекомбінації буде виникнення хіазм. Вона стає видимою у диплотені завдяки тому, що фрагменти хроматид зберігають тенденцію найбільш тісної кон'югації зі своїми сестринськими хроматидами, незважаючи на те що структурно «прив'язані» вже до центроміри іншого гомолога. Відповідно до цієї гіпотези хіазми безпосередньо пов'язані з кросинговером.

Таким чином, відповідно до гіпотези хіазмотипії – спостерігається чітке кількісне співвідношення між хіазмами та кросинговером, а хіазма є результатом обміну ділянками між хроматидами, при цьому відсоток клітин з хіазмами у будь-якій ділянці повинен бути вдвічі вище, ніж відсоток хромосом, рекомбінантних за генами у цій ділянці [3].

Інша точка зору на зв'язок між хіазмами і кросинговером висвітлена у так званій класичній гіпотезі, автором якої є К. Сакс. За гіпотезою К. Сакса хіазми не є результатом кросинговеру: спочатку утворюються хіазми, а потім відбувається обмін. При розбіжності хромосом до полюсів внаслідок механічної напруги у місцях хіазм відбуваються розриви і обмін відповідними ділянками. Якщо розірвані кінці возз'єднуються не з відновленням вихідної структури, а рекомбінантним чином, то у цьому місці хіазма

зникає.

Таким чином, згідно з класичної гіпотези, хіазми є можливими причинами появи розривів і рекомбінації, але не кожна хіазма обов'язково призводить до кросинговеру. Отже, за цією гіпотезою суворого кількісного співвідношення між хіазмами та кросинговером не очікується.

Обидві названі гіпотези розрізняються за вихідними припущеннями, внаслідок чого уявлення про зв'язок між хіазмами та кросинговером протилежні. Але у обох випадках приймається реципрокність обмінів між хроматидами [1].

Зміст іншої гіпотези, запропонованої Д.Беллінгом і модернізованої І.Ледербергом, полягає у тому, що процес реплікації ДНК може реципрокно переключатися з однієї нитки на іншу; відтворення, розпочавшись на одній матриці, з якоїсь точки перемикається на матричну нитку ДНК: у зв'язку з кон'югацією гомологів процес відтворення хромосом у мейозі відбувається одночасно. Якщо гомологи при кон'югації перекручуються, то створюється можливість для встановлення ахроматинових сполучних ниток між новими хромомерами – копіями хромомерів різних гомологів.

У 1930 р. була опублікована і гіпотеза Г. Вінклера. Він висловив припущення про можливість перетворення (conversion) у гетерозиготи однієї алелі гена у іншу, яка була у цій гетерозиготі. Результатом цього має бути поява хроматиди з новим поєднанням алелів різних генів – кросоверної хроматини [5].

Сучасники всерйоз сприйняли лише дві перші гіпотези.

Гіпотеза конверсії зазіхала на самі основи генетики – на Менделевську гіпотезу чистоти гамет – постулат про те, що, перебуваючи у одній клітині у гетерозиготі, різні алелі ніяк не змінюють одна іншу.

**Будова хромосом.** У багатьох еукаріот в хромосомному наборі зосереджена велика кількість ДНК. Така велика довжина певним чином упаковується у структури, які мають розміри, оцінювані у нанометрах. Теоретично можливі принаймні два способи такої упаковки:

- паралельне укладання більш коротких ниток у більш товстий пучок (модель багатониткової організації хромонем у хроматиді);
- складання однієї довгої нитки у вигляді численних петель, супроводжуване неодноразовим закручуванням цієї нитки на різних етапах її укладання.

Хроматида по всій своїй довжині містить одну гігантську молекулу ДНК. Ця гігантська молекула товщиною 2 нм зазнає кілька рівнів компактизації. Зв'язок ДНК з октамерами гістонів утворює нуклеосомну структуру хромонем, і її товщина стає 10 нм при 5-7-кратній компактизації. За рахунок зв'язування з гістоном H1 нуклеосомна нитка спіралізується у структуру діаметром 25-30 нм. Подальша компактизація відбувається за рахунок утворення груп петель, які іноді на препаратах нагадують розетки. Передбачається, що на цьому рівні укладання здійснюється за рахунок специфічного зв'язування петель з негістоновими білками хромосомного каркаса або з білками

внутрішньої частини ядерної мембрани або внутрішньоядерної мережі – матриксу. На думку ряду дослідників, така група петель нуклеогістонової нитки морфологічно відповідає хромомери або частині хромомери мейотичної пахітенної хромосоми, а при зближенні таких груп утворюються кластери, які відповідають великим хромомерам. За рахунок цього хромомери товщиною 25-30 нм компактизуються ще у 10-15 разів. Подальша компактизація (ще у 40 разів) пов'язана з тісним зближенням груп хромомерів з додатковою спіралізацією всієї цієї складно упакованої структури. Така компактизація також здійснюється за рахунок негістонових білків. При цьому істотну роль відіграють двовалентні катіони кальцію і магнію і, можливо, утворення дисульфідних містків між ділянками білкових молекул [10].

Таким чином, якщо компактизацію хромомери слід визнати високоорганізованим точним процесом, який призводить до того, що на поверхню компактизованої структури орієнтуються суворочіткі ділянки ДНК, тоді точність кон'югації гомологів забезпечується взаємодією між гомологічними послідовностями ДНК.

*Синаптонемний комплекс.* У переважної більшості вивчених видів еукаріот при електронномікроскопічному дослідженні кон'югующих хромосом виявляється характерна трьохполосна структура синаптичного комплексу (СК). Між двома досить щільними масами хроматину, що представляють нуклеопротеїнові нитки гомологічних хромосом, розміщуються дві стрічки товщиною по 30-60 нм, віддалені один від одного на 60-120 нм, а

між ними – третя стрічка товщиною 10-40 нм. Це латеральний та центральний елементи СК. Часто добре видно поперечна смугастість елементів СК. Крім того, у центральному елементі СК спостерігаються характерні потовщення – рекомбінаційні вузли.

Обробка ДНКазою не руйнує структуру СК, але розчиняє оболонку хроматинових ниток, між якими він розташований. СК стійкий і до дії РНКаз, але розпадається при обробці протеазами (трипсином). Таким чином, СК побудований з білків. Кінці СК закріплені на ядерній мембрані.

Починаючи зі стадії диплотени, СК деградує, фрагменти його довше всього зберігаються у місцях розташування хіазм. Наприкінці профазі структури СК іноді бувають присутні в ядрах у вигляді полікомплексів, які не пов'язані з хромосомами.

Синаптонемний комплекс відображає характер спарювання (синапсису) гомологічних хромосом і може використовуватися для виявлення відхилень у спарюванні хромосом у особин з хромосомними аномаліями (за кількістю або структурі). Статеві хромосоми у ссавців чоловічої статі піддаються лише неповному синапсису, оскільки у парі XY формується тільки короткий СК.

Синаптонемний комплекс у різних еукаріотичних організмів структурно відрізняється дуже мало, хоча між білками є серйозні відмінності. У багатьох організмів СК несе одне або кілька «рекомбінаційних потовщень», приурочених до його центрального простору. Такі потовщення, ймовірно, відповідають рекомбінації яка вже сталася на цій ділянці [10].

## **2. Співвідношення у часі між передмейотичною**

**реплікацією хромосом, кон'югацією гомологів та кросинговером.** Питання про явне неспівпадіння у часі предмейотичного синтезу ДНК хромосом (*S*-фаза предмейотичної інтерфази) і часу кон'югації та формування СК (зиготенна і пахітенна стадії профазі мейозу) було неодноразово досліджено у різних видів і при його обговоренні висловлювалися різні гіпотези .

Відповідно до гіпотези ефективної кон'югації, у предмейотичній інтерфазі, під час реплікації хромосом відбувається кон'югація порівняно коротких гомологічних ділянок. Цитологічно таку кон'югацію спостерігати неможливо, оскільки хромосоми в інтерфазному ядрі порівняно мало компактизовані. Обміни по ділянках ефективної кон'югації можуть призводити до кросинговеру і до конверсії. Таким чином, відповідно до цієї гіпотези зв'язок між двома гомологами виникає ще до початку профазі мейозу. Але такому припущенню суперечать дослідження Х. Стерна та І. Хотта. Перенесення мікроспороцитів на синтетичне середовище відразу після закінчення *S*-фази, тобто, завершення в них предмейотичної реплікації хромосом, призводить до того, що мейоз у цих клітинах відсутній, а їх поділ відбувся мітотично. Мікроспороцити з ядрами діляться мейотично, але без утворення хіазм якщо на синтетичне середовище вони переносяться на стадії  $G_2$  предмейотичної інтерфази. Обидва ці результати абсолютно не узгоджуються з гіпотезою ефективної кон'югації. Тільки при експлуатації мікроспороцитів на синтетичному середовищі під час зиготени стадії профазі спостерігається нормальний мейоз та утворення хіазм. Таким чином, вирішальні для кросинговеру та

утворення хіазм події відбуваються у мейоцитах не раніше зиготени стадії профазі мейозу [11].

Отже, можна вважати, що до часу здійснення кросинговеру предмейотична реплікація хромосом вже в основному завершена.

Використання методу гібридизації між денатуруючою загальною ядерною ДНК і денатуруючою міченою зігДНК показує, що кількісний рівень цієї гібридизації із загальною ДНК, виділеної з ядер мейоцитів після завершення зиготени, вдвічі вище, ніж із загальної ДНК, виділеної з ядер мейоцитів до зиготени. Отже, до зиготени ДНК цієї фракції у хромосомах міститься удвічі менше і протягом зиготени зігДНК подвоюється. Синтез зігДНК пригнічується гідроксісечовиною – інгібітором реплікативного синтезу. Ці факти свідчать про те, що матеріал зігДНК залишається нереплікованим після завершення у предмейотичній *S*-фазі загальної реплікації хромосом, тобто реплікація її виявляється відстроченою до стадії зиготени у профазі.

Оцінка швидкості денатурації денатурованої зігДНК показує, що ця швидкість значно менше, ніж у загальної ядерної ДНК. Реасоціація зігДНК починається тільки тоді, коли у загальній ядерній ДНК реасоційовало вже 50-60% матеріалу. Така кінетика реасоціації свідчить про те, що у зігДНК практично немає повторів, у ній присутні лише унікальні послідовності. Цей факт добре поєднується з переконливими даними про високу видоспецифічність зігДНК.

Синтез пДНК також відбувається інакше, ніж синтез зігДНК – він стійкий до інгібітору реплікативного синтезу. Для пДНК



характерно те, що у ній на стадії пахітени виникають одноланцюгові розриви, слідом за чим, можлива локальна денатурація і деградація цих послідовностей. Потім по неушкодженим одноланцюговим ділянкам здійснюється репаративний синтез пДНК [3].

Отже, встановлено, що реплікація майже всього хромосомного матеріалу відбувається у предмейотичній інтерфазі і у часі відділена від процесу кон'югації хромосом і процесу кросинговеру. Разом з тим у лілії, жита, м'якої пшениці встановлено кількісно слабкий синтез ДНК на зиготенній (дореплікація зігДНК) та пахітенній (репаративний синтез пДНК) стадіях профазі мейозу. Можливо, що відкриття процесу синтезу ДНК у профазі мейозу дає матеріальну основу для розроблюваних у сучасній генетиці моделей механізму кросинговеру [4].

**3. Сучасні уявлення про механізм кросинговеру. Механізм кросинговеру «розрив-возз'єднання»** Відповідно до теорії Янссенс-Дарлінгтона, кросинговер відбувається у профазі мейозу. Гомологічні хромосоми з гаплотипами хроматид АВ і аb утворюють біваленти. В одній з хроматид у першій хромосомі відбувається розрив на ділянці А-В, тоді у прилеглій хроматиді другої хромосоми відбувається розрив на ділянці а-b. Клітина прагне виправити ушкодження за допомогою ферментів репарації-рекомбінації і приєднати фрагменти хроматид. Однак при цьому можливе приєднання хрест-навхрест (кросинговер), і утворюються рекомбінантні гаплотипи (хроматиди) Ab і aB. У анафазі першого поділу мейозу відбувається розбіжність двухроматидних хромосом,

а у другому поділі – розбіжність хроматид (однохроматидних хромосом). Хроматиди, які не брали участь у кросинговері, зберігають вихідні поєднання алелей. Такі хроматиди (однохроматидні хромосоми) називаються некроссоверними; за їх участю розвинуться некроссоверні гамети, зиготи і особини. Рекомбінантні хроматиди, які утворилися у ході кросинговеру, несуть нові поєднання алелів. Такі хроматиди (однохроматидні хромосоми) називаються кроссоверними, з їх участю розвинуться кроссоверні гамети, зиготи і особини. Таким чином, внаслідок кросинговеру відбувається рекомбінація – поява нових поєднань (гаплотипів) спадкових задатків у хромосомах [8].

*Генетичний механізм кросинговеру.* Ще до відкриття перехрещення хромосом генетичними методами цитологи, вивчаючи профазу мейозу, спостерігали явище взаємного обвивання хромосом, утворення ними  $\chi$ -образних фігур – хіазм. У 1909 р. Ф. Янсенс висловив припущення, що хіазми пов'язані з обміном ділянками хромосом. Згодом ці картини послужили додатковим аргументом на користь гіпотези генетичного перехрещення хромосом, висунутої Т. Морганом у 1911 р. Механізм перехрещення хромосом пов'язаний з поведінкою гомологічних хромосом у профазі I мейозу. Кросинговер відбувається на стадії чотирьох хроматид і приурочений до утворення хіазм. Якщо в одному біваленті стався не один обмін, а два і більше, то й цьому випадку утворюється кілька хіазм. Оскільки у біваленті чотири хроматиди, то, очевидно, кожна з них має рівну ймовірність обмінятися ділянками з будь-якої іншої. При

цьому в обміні можуть брати участь дві, три або чотири хроматиди. Обмін всередині сестринських хроматид не може призводити до рекомбінації, оскільки вони генетично ідентичні, і в силу цього такий обмін не має сенсу в якості біологічного механізму комбінативної мінливості [5].

**Біологічне значення кросинговеру.** Завдяки зчепленому успадкуванню вдалі поєднання алелів виявляються відносно стійкими. У результаті утворюються групи генів, кожна з яких функціонує як єдиний суперген, контролюючий кілька ознак. У той же час, у ході кросинговеру виникають рекомбінації – тобто нові комбінації алелів. Таким чином, кросинговер підвищує комбінативну мінливість організмів:

а) у ході природного відбору в одних хромосомах відбувається накопичення «корисних» алелей (і носії таких хромосом отримують перевагу у боротьбі за існування), а в інших хромосомах скупчуються небажані алелі (і носії таких хромосом вибувають – елюмінуються з популяцій)

б) у ході штучного відбору в одних хромосомах накопичуються алелі господарсько-цінних ознак (і носії таких хромосом зберігаються селекціонером), а в інших хромосомах скупчуються небажані алелі (і носії таких хромосом вибраковуються) [2].

**Еволюційне значення кросинговеру.** У результаті кросинговеру несприятливі алелі, спочатку зчеплені з сприятливими, можуть переходити в іншу хромосому. Тоді виникають нові гаплотипи, що не містять несприятливих алелів, і ці несприятливі алелі елімінуються з популяції [4].

## Питання для самоперевірки:

1. Дайте характеристику гіпотези походження кросинговеру Ф. Янссенсона та С. Дарлінгтона?
2. Охарактеризуйте класичну гіпотезу кросинговеру?
3. Суть гіпотези, запропонованої Д.Беллінгом і модернізованої І.Ледербергом?
4. Що таке синаптонемний комплекс?
5. В якій фазі відбувається реплікація хромосомного матеріалу?
6. Механізм кросинговеру «розрив-возз'єднання»?
7. Поясніть генетичний механізм кросинговеру?
8. Охарактеризуйте біологічне значення кросинговеру?
9. Еволюційне значення кросинговеру?

## Лекція 6

### Генетичний контроль сегрегації хромосом

1. Генетичний контроль мітозу
2. Система генів, що контролює здійснення мейозу
3. Цитогенетика В-хромосом
4. Центроміри і неоцентроміри

**1. Генетичний контроль мітозу.** Однією з найважливіших функцій, яку виконують у клітинах хромосоми є сегрегаційна функція, яка контролюється складними генетичними системами та забезпечує регулярний, упорядкований розподіл, сегрегацію генетичного матеріалу при мітотичному поділі, а також при мейозі і гаметогенезі.

Клітинний поділ, істотні моменти якого – розходження до полюсів хроматид від кожної хромосоми (каріокінез) та формування перетинки, що розділяє материнську клітину на дві дочірні (цитокінез), є одним із етапів (зазвичай нетривалим) клітинного циклу – періоду від одного поділу клітини до наступного поділу у дочірніх клітинах. У цьому циклі після завершення попереднього поділу настає інтерфаза, в якій особливо важливим є період підготовки до наступного поділу, коли здійснюється реплікація хромосом (*S*-період). Пресинтетичний період інтерфази називають періодом  $G_1$ , а постсинтетичний – періодом  $G_2$ . Слідом за  $G_2$  настає профаза, а потім сам мітоз (M) – каріокінез і цитокінез [9].

За рівнем оновлення клітин всі тканини організму поділяються на три групи:

- 1. стабільні клітинні популяції – складаються із клітин з повною втратою здатності до поділу (нейрони, кардіоміоцити). Число клітин у такій популяції стабілізується на початку їх диференціювання; у міру старіння організму воно знижується внаслідок природного зменшення клітин;

- 2. зростаючі клітинні популяції – здатні не тільки до оновлення, але також і до зростання, збільшення маси тканини за рахунок наростання числа клітин та їх поліплоїдизації. Їх клітини виконують спеціалізовані функції, але зберігають здатність при стимуляції знову вступати в цикл для того, щоб відновити свою нормальну чисельність. Описані популяції клітин утворюють нирки, печінку, підшлункову і щитовидну залози;

- 3. оновлюємі клітинні популяції – характеризуються постійним оновленням клітин; спаддиференційованих, що виконують спеціалізовані функції і нездатні до поділу клітин внаслідок їх загибелі, врівноважуються утворенням нових внаслідок поділу малодиференційованих камбіальних клітин і їх подальшого диференціювання. До таких популяцій відносять епітелій кишки, епідерміс, а також клітини кісткового мозку і крові.

Регуляція клітинного циклу у різних тканинах організму здійснюється збалансованою складною системою механізмів, стимулюючих або інгібуючих клітинний розподіл. Система регуляції клітинного циклу отримує два види інформації:

- 1 про дію на клітину різних зовнішніх факторів, що сприяють активації або гальмуванню її поділу. Вона обробляє і інтегрує її у вигляді визначальних сигналів, чи буде клітина вступати у

мітотичний цикл або диференціюватися і перебувати у періоді репродуктивного спокою ( $G_0$ );

-2 про інтактність геному, при пошкодженні геному цикл зупиняється і включається система репарації ДНК. Тим самим знижується ймовірність небажаної реплікації пошкодженої ДНК. Численні сигнали, що регулюють діяльність клітини, замикаються на ген p53, який блокує проходження клітинного циклу до усунення виниклого ушкодження. Якщо це пошкодження занадто серйозне, p53 (у сукупності з іншими регуляторами) запускає програму апоптозу – запрограмованої загибелі клітини [11].

Виявлення та збереження у генетичних організмах мутацій, які блокують будь-які з етапів мітозу, можливо лише у тому випадку, якщо це мутація з умовним проявом, бо інакше ці мутації визначали б неможливість клітинного поділу, тобто нежиттєздатність гомозиготної зиготи, за такими мутантним алелями. Можливості отримання мутацій з умовним проявом найчастіше використовується при роботі з мікроорганізмами, у тому числі з нижчими еукаріотичними організмами – грибами, водоростями, найпростішими.

На фіксованих клітинах нервових гангліїв личинок *D. melanogaster* вивчено вплив мутації гена клітинного циклу *ff3* на сегрегацію хромосом. Для цього порівнювали розподілення клітин за розміром діаметра інтерфазного ядра і відстані між сестринськими наборами хроматид у анафазі та телофазі. У контрольній лінії дикого типу *Lausenne* розподілення клітин по відстані між сестринськими хроматидами у анафазі виявилось

схожим з розподілом клітин за розміром ядра, середня відстань між хроматидами, що розійшлися в анафазі ( $I_{cp}$ ) збіглася із середнім діаметром інтерфазних ядер ( $d_{cp}$ ) і склала 8,3 мкм; перехід клітин у телофазу відбувався при розбіжності хроматид на відстань 10 мкм і більше. У мутантної лінії *ff3* порівняно з контрольною лінією *Lausenne* змінювалося розподілення клітин за розміром ядра в інтерфазі і відстані між сестринськими наборами хроматид у анафазі, при цьому середній діаметр ядра і середня відстань між хроматидами збільшилися однаково до 9,3 мкм. Специфічною особливістю мітозу у мутантної лінії *ff3* було передчасний початок телофазної реорганізації хроматину. Внаслідок цього мали місце клітини з аномально коротким – меншим діаметром інтерфазних ядер та відстанню між сестринськими наборами хроматид у телофазі [8].

Умовний характер появи мутацій дозволяв зберігати мутантів у пермісивних умовах, здійснювати генетичний аналіз, отримувати генотипи, що поєднують по кілька мутантних генів. При цьому якщо у подвійного мутанта, що поєднує мутації з різним фенотиповим проявом, при певних умовах виявляються характеристики тільки однієї з мутацій, то робиться висновок про те, що ці мутації блокують послідовні етапи ланцюга подій і при цьому мутація, що виявляється у подвійного мутанта, блокує більш ранній етап. Цей факт приймається як свідчення того, що у клітинному циклі мутантної лінії *ff3* контролює подію  $I_{cp}$ , здійснювану незалежно від подій, які контролюються іншими чотирма генами.



Сукупність фактів, отриманих при вивченні взаємодії мутацій різних генів, дозволила дослідникам зробити ряд висновків про те, які етапи у клітинному циклі можуть контролювати ті або інші гени.

Поки виділено групу генів, функції яких необхідні для здійснення певних етапів клітинного циклу. Це дозволяє сподіватися на те, що надалі можна буде або поділити кожен з описуваних етапів на ланцюг послідовних подій, або виявити взаємодію якихось компонентів єдиної системи, що забезпечує проходження даного етапу клітинного циклу [1].

## **2. Система генів, що контролює здійснення мейозу.**

Генетичними дослідженнями встановлено, біля 32 генів, які контролюють процеси, що забезпечують нормальний мейоз.

Існування специфічної системи генів, які контролюють мейоз і не зачіпають мітоз підкреслює виявлення у багатьох видів рослин, мікроорганізмів та деяких тварин численних мутацій, які значно впливають на будь-який етап мейозу і при цьому не знижують їх життєздатність та зростання за допомогою мітотичних поділів.

Навіть генетичний контроль цитокінезу у мейозі у дріжджів виявився специфічним, оскільки гени, мутації яких блокують цитокінез у мітозі, не впливали на мейоз.

Отже, мейоз контролюється особливою системою генів, які детермінують різноманітні етапи саме цього поділу. Крім того, дослідження мейотичних мутацій (скорочено званих мей-мутаціями) у *D. melanogaster* показує, що генетичний контроль мейозу здійснюється по-різному в ово- і сперматогенезі, оскільки

більшість вивчених мей-мутацій у самців не виявляється [4].

При дослідженні мей-мутацій з'ясовується, що багато з них характеризується цілим спектром аномалій мейозу порівняно з диким типом. Значна частина цього плейотропного ефекту буває наслідком першого, найбільш раннього порушення у ланцюзі подій, що відбуваються у мейозі.

Таким чином, вивчення мей-мутацій дозволило обґрунтовано висунути припущення про те, що генетично контролюється не тільки загальний рівень рекомбінаційного процесу у хромосомах, але і властива виду неоднорідність ймовірних обмінів у різних ділянках хромосом. Мутації деяких генів змінюють саме характер цієї неоднорідності [9].

Підвищення частоти нерозходження хромосом викликається мутаційними змінами, які призводять до передчасного розщеплення центромірів сестринських хроматид або до порушення апарату веретена та до аномалій у центромірних ділянках хромосом і дефектам у їх взаємодії з апаратом веретена.

Разом з тим слід зазначити, що підвищення частоти нерозходження хромосом властиво багатьом мей-мутаціям, що призводить до різкого пригнічення кросинговеру. У таких мутантів пари гомологічних хромосом, у яких не відбувся кросинговер, після пахітенної стадії профазі виявляються не пов'язаними хіазмами і тому представлені унівалентами. Припускають, що у таких умовах проявляється здатність до попарних асоціацій хромосом, включаючи і негомологічні – розподільна кон'югація.

Таким чином, мейоз дійсно являє собою унікальну подію у

життєвому циклі організму, а функції, які могли б бути спільними у мітозі і мейозі, контролюються у мейозі особливими генними системами [5].

Тобто, порівняно з регуляцією мейозу в одногеномних диплоїдних видів організмів з поліплоїдними каріомами, які включають кілька гомологічних або кілька різних, але споріднених геномів, несуть додаткові системи генів, що знижують частоту утворення мультивалентів або повністю їх виключають [8].

**3. Цитогенетика В-хромосом.** Генетично збалансовані системи являють собою каріоми еукаріотичних організмів, що включають подвійний набір хромосом одного або декількох геномів. Нестача однієї з хромосом будь-якої пари (моносомія) або надлишок – зайва хромосома будь-якого типу (трисомія), залежно від того, за якою хромосомою даний каріотип незбалансований змінює цілий комплекс ознак і часто проявляється у фенотипі.

Є, однак, особливий клас хромосом, найбільш характерна і несподівана властивість яких – необов'язковість їх присутності. Зазвичай невелика кількість таких хромосом у каріотипі помітної дії на фенотипі не має. Цих хромосом може зовсім не бути, і організми також не змінюють свої ознаки. Таким чином, цей клас хромосом найкраще характеризував би термін «необов'язкові». Однак така назва для них не прийнятна, а використовуються інші терміни: зверхчисленні (*supernumerary*), додаткові (*accessory*). Іноді їх називають екстрахромосомами. Л. Рандольф для позначення цих хромосом запропонував одне з найбільш вдалих назв – В-хромосоми, назвавши при цьому хромосоми, складові каріому

організму, А-хромосомами [6].

Одним з перших В-хромосоми спостерігав Е. Вільсон у клопа *Matepodius terminalis*. Він висловив припущення про те, що ці хромосоми можуть походити від Y-хромосоми як її короткі фрагменти. Ця ідея Е. Вільсона широко використовується при обговоренні питання про походження В-хромосом. Разом з тим проти цього припущення свідчать багаточисленні факти відсутності кон'югації між В-хромосомами і хоча б з будь-якою з А-хромосом. Цього не спостерігається незважаючи на існуючу у клітині здатність до розподільної кон'югації навіть негомологічних хромосом [11].

На сьогодні В-хромосоми знайдено в усіх основних групах еукаріотів – грибів, рослин і тварин, проте вважається, що кількість видів із додатковими хромосомами є відносно невеликою. Основна складність у дослідженні В-хромосом полягає саме у тому, що їхня наявність є не обов'язковою і у більшості видів вони присутні не у кожного організму і не у всіх популяціях, і навіть не у всіх клітинах одного і того самого організму.

З В-хромосомами пов'язані дві основні проблеми – це їхнє походження і біологічне значення їхньої наявності. Стосовно походження існують три основні гіпотези: В-хромосоми можуть утворюватися із аутосом, із статевих хромосом або внаслідок міжвидової гібридизації. Щодо біологічного значення то існує декілька припущень – від поглядів на В-хромосоми, як на «геномних паразитів», до тверджень про їх адаптивну роль, особливо у не сприятливих умовах існування [5].

Отже, В-хромосоми не містять будь-якого специфічного генетичного матеріалу, який відрізняє одна від одної кожна з хромосом нормального геному і вони не гомологічні жодній з А-хромосом. Цей факт добре відповідає самій «необов'язковості» В-хромосом. У них немає експресуючих генів з істотними для життя організму функціями. Саме тому ні відсутність, ні наявність В-хромосом у невеликій кількості не призводить до будь-якого помітного впливу на фенотип.

Біохімічними дослідженнями не виявлено будь-яких специфічних відмінностей у будові В-хромосом порівняно з А-хромосомами. Таким чином, генетична інертність В-хромосом може бути пов'язана з особливостями їх компактизації у клітинному циклі: у багатьох організмів більша частина їх матеріалу виявляється у вигляді гетеропіктонічних щільних компактних блоків гетерохроматину на тих стадіях мітозу і мейозу, на яких основна маса матеріалу А-хромосом представлена пухкою структурою еухроматину з досить чітким хромомерним малюнком. Реплікація В-хромосом, як і гетерохроматинових ділянок А-хромосом, зрушена до кінця S-фази. Винятки з цієї закономірності вельми рідкісні. Один із прикладів – еухроматинові за морфологією В-хромосоми кларкії (*Clarkia sp.*), у яких спостерігається і кон'югація з А-хромосомами [8].

Таким чином від основного набору В-хромосоми відрізняються за такими параметрами:

- мають менші розміри;
- часто крапкоподібної форми;

- гірше забарвлюються у разі цитологічних досліджень;
- їхні центромери часто дефективні;
- у більшості випадків вони гетерохроматинізовані і містять переважно повторювані послідовності ДНК;
- їхня кількість не стала і є різною у різних організмів однієї популяції, а також може змінюватися від одиниці до кількох десятків у різних клітинах одного і того самого організму;
- розташовуються переважно на переферії метафазної пластинки;
- при мейозі не кон'югують із хромосомами основного набору;
- успадковуються не регулярно;
- показник їх трансмісії часто вищий 0,5, тобто вони здатні накопичуватися до, під час та після мейозу [3].

**4. Центромери і нецентромери.** Центромера – це зазвичай структурно і функціонально визначена ділянка хромосоми. Структурно вона збігається з так званою первинною перетинкою, яка ділить хромосому на два рівних або нерівних плеча. Функціонально вона визначається як ділянка, відповідальна за контакт із мікротрубочками веретена та переміщення хромосом при клітинному поділі. У зв'язку з цим традиційно поряд з терміном «центромера» використовувався і термін «кінетохор» (структура, відповідальна за переміщення хромосом), і довгий час ці терміни вважалися синонімами. В даний час термін «кінетохор» все частіше вживають для структур у вигляді пластин або чаш, розташованих у центромерній ділянці хромосом [9].

Все сказане справедливо для більшості вивчених еукаріотичних

організмів, хромосоми яких мають локалізовану центромеру. Шляхом ретельних спостережень, проведених А. Ліма-де-Фарія була виявлена складна структура центромерної ділянки, що включає кілька дрібних хромомер. У деяких рослин (види род. ситникових), водоростей, мохів та грибів, а також членистоногих (скорпіони, клопи та ін.) хромосоми володіють дифузною центромерою. Це означає, що контакт з мікротрубочками веретена при клітинному поділу здійснюється у таких хромосомах по всій їх довжині. Такі хромосоми називають голоцентричними (від англ. whole – весь цілий). Картини розбіжності хромосом у анафазі у цих організмів виглядають зовсім інакше, ніж у організмів, що мають хромосоми з локалізованою центромерою [1].

Описано і третій своєрідний тип хромосом у деяких видів аскариди. При перших двох поділах у *Ascaris megalocephala* виявляються великі хромосоми з чітко функціонуючою локалізованою центромерою. Але при третьому поділі лише в одному бластомері поділ відбувається так само. У трьох бластомерах хромосоми розпадаються на дрібні фрагменти, кожен з яких веде себе як звичайна хромосома: розщеплюються на хроматиди, закономірно розходяться до полюсів. Частина хромосомного матеріалу руйнується і відсутня у соматичних клітинах організму. Кожна з дрібних хромосом – фрагментів у соматичних клітинах – володіє власною центромерою. Таким чином, вихідні великі хромосоми аскариди, що зберігаються у клітинах зародкового шляху, з яких згодом утворюються гонади і статеві клітини у них – це потенційно поліцентричні хромосоми.

Однак у перших двох мітозах і у клітинах зародкового шляху ці численні центромери не проявляють активності. Невідомо, чи формуються при цьому у хромосомах численні кінетохори або тільки той єдиний, який функціонує як локалізований центромер [11].

На думку різних дослідників, центромера у хромосомі для правильної сегрегації хромосом у мітозі і мейозі здійснює надзвичайно важливі функції. Центромера або активно забезпечує, або слугує додатковою точкою сил, що забезпечують:

- 1) розташування хромосом у екваторіальній площині до стадії метафази;
- 2) орієнтацію хромосом на веретені щодо полюсів ділення;
- 3) переміщення хромосом або хроматид до полюсів поділу.

Суттєвий момент у забезпеченні сегрегаційної функції хромосом у мітозі і мейозі – поздовжній поділ хроматид у центромерній ділянці у чітко визначений момент мітотичного або мейотичного циклу – на початку анафази мітозу і на початку анафази II мейозу. Передчасне розділення центромер сестринських хроматид призводить до різкого порушення у розподіленні хромосом у мейозі [5].

Оскільки саме з центромерною ділянкою пов'язана кінетична функція, що виявляється у певній орієнтації хромосом і їх переміщенні при клітинному поділу, вельми цікавим виявився факт про те, що таку функцію у хромосомі набагато активніше, ніж центромери, можуть виконувати гетерохроматинові вузлики (knobs). Ці дані були виявлені при дослідженні форм кукурудзи, які



містять незвичайну хромосому 10. Було показано, що ця хромосома, містить на кінці довгого плеча незвично великий блок гетерохроматину, саме ця гетерохроматинова ділянка проявляє вельми посилену центромерну активність. М. Родс і Х. Вілкомерсон показали, що така незвичайна поведінка у мейозі властива не тільки хромосомі 10. Якщо ця хромосома є у каріотипі, то у всіх інших хромосом з гетерохроматиновими вузликами ці вузлики виявляють подібну активність, поведуть себе як нові, активніші центромери. Така здатність гетерохроматинових ділянок названа *неоцентромерною активністю*. Слід підкреслити, що неоцентромерну активність ці вузлики виявляють тільки при наявності незвичайної хромосоми 10. Зазвичай вузлики на хромосомах кукурудзи, в якому б місці вони не локалізувалися, подібної активності не проявляють. Таким чином, це чіткий приклад генетичної регуляції центромерної активності у ділянках гетерохроматинових вузликів [9].

Цей факт виявляє деяку схожість з розглянутими потенційно поліцентричними великими хромосомами *Ascaris megalocephala*. Такі потенційно поліцентричні хромосоми можна вважати своєрідним проміжним класом між голоцентричними хромосомами і хромосомами з локалізованою центромерою. Важко вирішити, який з цих трьох типів хромосом можна вважати вихідним, а які – похідними від нього.

Для пояснення того, як неоцентромерна активність, індукована у гетерохроматинових вузликах, може визначити нерівноймовірність попадання різних алелів у базальну мегаспору,

з якої розвивається зародковий мішок, М. Родс зробив додаткове припущення про необхідність кросинговеру між вузликами і центромерою. Кросинговер призводить до утворення гетероморфних діад – пар хроматид, з'єднаних нероздільною центромерою, в яких одна хроматида містить вузлик, а інша не містить. Ймовірно, таке припущення задовільно пояснює бажане попадання у результаті мейозу хромосом з вузликом у крайні мегаспори лінійної тетради. При будь-якій орієнтації тетради базальна мегаспора, що розвивається у зародковому мішку, містить хромосому з вузликом. Чим ближче до вузлика вибраний ген-маркер, тим частіше хромосома з вузликом буде містити вихідну алель цього гена – домінуючу алель С [11].

Такий характер розбіжності хромосом забезпечується нецентромерною активністю у вузликах, які певним чином орієнтують несучі їх хроматиди. М. Родс припускає, що досягнута до кінця першого поділу мейозу орієнтація хроматид зберігається до початку другого поділу. Оскільки при мегаспорогенезі вісь другого поділу збігається з віссю першого, таке збереження орієнтації хроматид зумовлює те, до якого полюсу вони будуть відходити при другому поділі.

Якщо ж виконані всі умови для переважного розщеплення, крім кросинговеру між вузликом і центромерою, та пріоритетного виявлення хромосоми з вузликом і з певною алелю не очікується [2].

Таким чином, у основі пріоритетного розщеплення лежить своєрідна поведінка хроматид з гетерохроматиновими вузликами,

які виявляють неоцентромерну активність, при характерних умовах мейозу у процесі мегаспорогенезу, тобто при збереженні однієї осі в обох поділах.

Ця умова не виконується при мікроспорогенезі, оскільки вісь другого поділу перпендикулярна осі першого. Тому орієнтація хроматид, яка досягається при першому поділі, але не зберігається при здійсненні другого. Крім того, важливо, що у кукурудзи тільки одна і саме базальна мегаспора розвивається у зародковий мішок, тоді як після мікроспорогенезу функціонують всі чотири продукти мейозу. Саме тому пріоритетне розщеплення має місце лише при одному напрямку аналізуючого схрещування.

Необхідно відзначити, що неоцентромерну активність справедливніше було б називати неокінетохорною. Адже у присутності незвичайної хромосоми 10 гетерохроматинові вузлики проявляють лише кінетичну функцію властиву центромерній ділянці, але не з'єднують у цьому місці сестринські хроматиди до анафази II. Якби це з'єднання відбулося, не могли б виникати гетероморфні діади з подальшою незалежною поведінкою хроматид, складових цих діад [1].

#### Питання для самоперевірки:

1. На які групи поділяються клітини за рівнем оновлення?
2. Які два види інформації отримує система регуляції клітинного циклу?
3. Як здійснюється генетичний контроль мітозу?
4. Система генів що здійснює контроль мейозу?
5. Що таке мей-мутації?
6. Що таке В-хромосоми?
7. Чим відрізняються В-хромосоми від звичайних?
8. Що таке центромера і які функції вона виконує?

9. Дайте пояснення неоценромерної активності?

## Лекція 7

### Цитогенетика хромосомних перебудов

1. Механізми виникнення хромосомних перебудов
2. Транслокації: гіпотеза сегментного обміну
3. Методи виявлення та ідентифікації транслокацій
4. Роль транслокацій в еволюційних перетвореннях каріотипів

#### 1. Механізми виникнення хромосомних перебудов.

Хромосомні перебудови – це великий і гетерогенний клас спадкових змін, що включає випадання (втрати), додавання (подвоєння, множення) ділянок хромосом, а також їх переміщення у межах однієї хромосоми або між хромосомами. Провести чітку межу між хромосомними перебудовами і генними мутаціями досить важко, оскільки серед останніх значну частину можуть складати внутрігенні дуплікації або нестачі, а також вставки рухомих генетичних елементів всередину гена, що призводять до його інактивації [8].

Механізм виникнення хромосомних перебудов (мутацій) залишається ще далеко не ясним. На різних фазах мейотичного і мітотичного циклів хромосом існує кілька механізмів, що забезпечують їх виникнення. Відомо, що частота хромосомних перебудов залежить від впливу зовнішніх факторів (фізичного впливу, іонізуючих випромінювань, хімічних речовин) та фізіологічного стану організму. Таким чином виникнення хромосомних мутацій можна уявити насамперед, як наслідок зміни фізичного (колоїдного) і хімічного станів хромосом [7].

Кожна хромосомна перебудова включає два моменти: розрив і з'єднання сегментів. Розриви у хромосомі бувають залежні від контакту хромосом між собою і незалежні – спонтанні. У першому випадку відбувається тертя хромосом між собою, тобто вони контактують один з одним, після чого у точках контакту відбуваються розриви і з'єднання. У другому випадку спочатку відбуваються спонтанні розриви, а потім – випадкове з'єднання відкритими кінцями сегментів, тобто розриви передують контакту та обміну.

Наведемо приклади механізму виникнення делецій та інверсій у телоцентричних і акроцентричних та метацентричних хромосомах. Якщо телоцентрична хромосома випадково утворила петлю і у точці контакту стався розрив, то з'єднання може йти трьома шляхами:

- 1) із збереженням нормальної структури хромосоми,
- 2) з утворенням хромосоми з делецією і ацентричного кільця, яке у метафазі виявиться неорієнтованим у силу відсутності центромери,
- 3) з виникненням інверсії [7].

Таким же чином у акроцентричній хромосомі може відновлюватися нормальна структура хромосоми, або виникати безцентромерний фрагмент і кільцева хромосома з двома делеціями в обох плечах (перичентрична делеція) або при іншому поєднанні – перичентрична інверсія. Крім того, і через центромеру та теломеру можуть проходити подібні розриви хромосом. З метацентричної хромосоми у наслідок таких розривів утворюються двуплечеві

хромосоми, що здаються телоцентричними. Розрив через центромеру і з'єднання гомологічних плечей може призводити до утворення ізохромосом – хромосом з ідентичними плечима.

Викладена схема походження внутріхромосомних змін, що призводять до інверсій і делецій, побудована на припущенні попереднього контакту і розриву хромосом у місцях їхнього зіткнення. Тепер розглянемо виникнення інверсій, делецій і транслокацій виходячи з уявлення про незалежність розриву і обміну на різних стадіях клітинного циклу [12].

В момент, коли хромосома представлена функціонально одиничною ниткою (інтерфаза) або двома хроматидами (профаза I) можуть, також, здійснюватися розриви і обміни. Перебудови, що сталися на стадії інтерфази іменуються хромосомними перебудовами, а які на стадії профази I – хроматидними перебудовами. При цьому розірвані кінці можуть або залишатися відкритими і «загоюватися», або з'єднуватися. У цьому випадку обміни відкритими кінцями можуть бути симетричними і асиметричними. Залежно від моменту розриву, типу обміну або загоєння, виникають перебудови, які обумовлюють різні конфігурації хромосом у метафазі I та у анафазі I, завдяки яким вдається цитологічно встановити момент і характер виниклої перебудови.

Якщо розрив відбувається у двоплечовій хромосомі на стадії одиночної нитки, то обміни бувають симетричними і асиметричними. Пери- та парацентричні інверсії, а також симетричні транслокації виникають внаслідок симетричного

обміну. У разі асиметричного обміну з'являються периферичні парацентричні делеції, а також асиметричні транслокації.

Характерною ознакою симетричних обмінів є те, що при цьому не утворюється безцентромерні фрагменти; до виникнення таких фрагментів призводять асиметричні обміни. Утворені дицентричні сегменти (хромосомні перебудови з двома центромерами) в анафазі I утворюють «містки».

У разі хроматидних перебудов розрив може статися або в одній хроматиді (хроматидний розрив), або одночасно в обох сестринських хроматидах у тотожньому місці, останні називаються ізохроматидними розривами. До симетричних і асиметричних обмінів призводять хроматидні і ізохроматидні розриви. При цьому різні конфігурації хромосом утворюються тільки в анафазі I, у метафазі I вони не виявляються. Цитологічно реєструвати розриви і обміни у тому ж мітотичному циклі, в якому вони відбулися дозволяють метафазні та анафазні конфігурації хромосом [6].

У даний час вважається загальноприйнятим, що будь-які хромосомні перебудови або викликають видимий ефект, або впливають на життєздатність, плодючість і інші фізіологічні властивості організму. Ці явища найкраще пояснюються з точки зору ефекту положення гена. Задовільного пояснення механізмів явища ефекту положення поки не дано. Його вивчення є проблемою майбутнього, оскільки ефект положення дозволяє розглядати ген як функціональну генетичну одиницю, а генотип як цілісну систему, характерну для кожного виду, що дасть можливість детального пояснення у тлумаченні цілого ряду



генетичних явищ.

За допомогою хромосомних перебудов можуть створюватися нові системи генотипів. Так, втручання у групи зчеплення, або розкладання їх у хромосомі змінить перебудову важливих життєздатних форм: так, гомозиготною за транслокаціями, інверсіями або дуплікаціями, вона може виявитися пристосованою до певних умов існування і розмножуватися, а потім відокремитися у новий вигляд [1].

## **2. Транслокації: гіпотеза сегментного обміну.**

*Транслокаціями* називають перенесення генетичного матеріалу з однієї хромосоми на іншу. Якщо розриви виникають одночасно у двох хромосомах і останні обмінюються утвореними вільними сегментами, то такі транслокації називають реципрокними. У цьому випадку каріотип залишається представленим повним набором хромосом (наприклад людина 46), а транслокація може бути виявлена тільки при детальному аналізі хромосом. Реципрокні транслокації зазвичай не супроводжуються фенотипивими проявами. Реципрокні транслокації призводять до утворення незбалансованих гамет при мейозі. Зазвичай реалізуються наступні дві можливості: в одну гамету потрапляють дві нормальні, а в іншу – дві транслоковані хромосоми (такий тип розходження називається альтернативним), і в обидві гамети потрапляють одна нормальна і одна транслокована хромосома. В іншому випадку можливі дві комбінації з нормальної і транслокованої хромосом. Теоретично всі 4 типи розходження повинні реалізуватися з рівною ймовірністю. Особливий вид реципрокних транслокацій

представляють собою так звані робертсонівські транслокації. У цьому випадку розриви у двох акроцентричних хромосомах локалізуються в області центромер або у безпосередній близькості від них. Довгі плечі хромосом зливаються, а короткі губляться. Оскільки короткі плечі акроцентричних хромосом містять гени рРНК, то їх втрата ніяк не виявляється, оскільки множинні копії цих генів містяться також у інших акроцентричних хромосомах. Тому робертсоновські транслокації функціонально є збалансованими. У каріотипі число хромосом зменшується до 45. Як і при реципрокних транслокаціях, ризик утворення незбалансованих гамет пов'язаний з тим, що відбувається мейоз у носіїв робертсонівської транслокації. Можливе утворення 6 типів гамет у результаті різних способів розходження хромосом, залучених до робертсонівської транслокації:

- 1) гамети з нормальними хромосомами;
- 2 ) комплементарні їм гамети з робертсонівською транслокацією (обидва типи гамет збалансовані);
- 3) гамети, що несуть одну нормальну і одну транслоковану хромосому;
- 4) гамети, що несуть другу нормальну і транслоковану хромосому;
- 5) гамети, що несуть тільки одну нормальну хромосому;
- 6) гамети, що несуть тільки другу нормальну хромосому [5].

Таким чином, транслокації являють собою реципрокний обмін ділянками негомологічних хромосом. У наслідок такого обміну у гомозигот за транслокаціями змінюється характер зчеплення генів.

У гетерозиготі за транслокацією гени, які належать, до різних не гомологічних хромосом, успадковуються зчеплено однією групою. Це пояснюється тим, що повністю функціонуючими виявляються лише ті спори (у рослин) та гамети у (тварин), які несуть батьківське поєднання хромосом.

Характер кон'югації транслокованих хромосом змінюється та утворюється фігура хреста. Щільна кон'югація поблизу точок розриву виявляється утрудненою, що призводить до пригнічення кросинговеру у цих ділянках [3].

У гетерозиготи за транслокацією у профазі мейозу утворюються квадриваленти замість бівалентів, оскільки гомологічні ділянки виявляються у всіх чотирьох кон'югуючих хромосомах. Із шести можливих типів гаплоїдних продуктів, які виникають внаслідок трьох способів розходження хромосом, тільки два типи функціонують нормально – ті які отримують повноцінні набори генів, характерні для вихідних батьківських форм. Інші чотири типи несуть дуплікації та нестачі і тому як правило дають не життєздатних нащадків, або які не беруть участі у заплідненні.

Гетерозиготи за реципрокними транслокаціями у тварин зустрічаються рідко, але поширені серед рослин. Прикладом цього можуть бути різні види Ослінника – *Oenothera*. Наприклад *O. Lamarkiana* із 14 хромосом 12 задіяні у реципрокних транслокаціях. Тому при мейозі у цієї рослини спостерігається один бівалент та мультивалент, який містить 12 хромосом. У інших видів ослінника число хромосом, які утворюють мультиваленти варіює, що відображає кількість реципрокних транслокацій [4].

Функціонуючими залишаються лише ті два типи мікро- та мегаспор, які отримали повні набори плечей хромосом. І таким чином, нормальне запліднення відбувається тільки при об'єднанні типів гамет, які поєднують в гаметі цілі батьківські комплекси транслокованих хромосом. Завдяки такому «комплексному» заплідненню численні види ослінника підтримують збалансовану гетерозиготність за транслокаціями, навіть при самозапиленні.

Таким чином, із трьох можливих типів розходження хромосом, які складають тетравалент, тільки при чергуванні утворюються генетично збалансовані продукти мейозу. У результаті обох типів суміжного розходження утворюються продукти мейозу (спори у рослин або гамети у тварин), одночасно несучі значні нестачі і дуплікації. Ці нестачі і дуплікації не компенсують один одного, а навпаки, посилюють генетичну незбалансованість [3].

Якщо гетерозиготи за сегментним обміном орієнтації тетраваленту у вигляді кільця та зигзагу рівноймовірні, то суміжні розбіжності відбуваються у 50% мейоцитів і, отже, 50% спор виявляються стерильними. Така цитогенетична основа напівстерильності гетерозигот за сегментним обміном, або за транслокацією, як пізніше стали називати цей тип хромосомних аберацій [6].

**3. Методи виявлення та ідентифікації транслокацій.** Основні взаємодоповнюючі методи виявлення транслокацій – генетичний та цитологічний. Перший заснований на виявленні зміни в зчепленні генів, другий – на демонстрації характерних конфігурацій під час мейозу у гетерозигот за транслокаціями.

Для виявлення транслокацій у рослин потрібно шукати організми з напівстерильним пилком – встановити це вельми просто. У таких напівстерильних рослин у квіткових бутонах, якщо вони є, або у частини нащадків у мейозі очікується присутність тетравалентів, які наприкінці профазі I виглядають у вигляді чотирьохчленних кілець або ланцюгів [3].

У переважної більшості тварин немає гаплоїдного покоління, аналогічного гаметофіту рослин. Продуктами мейозу є клітини, безпосередньо перетворюються у гамети. Це перетворення і подальше функціонування гамет здійснюється під контролем продуктів метаболізму, накопичених у мейоцитах ще до мейозу. Очевидно, саме тому гамети у тварин здатні брати участь у заплідненні, навіть якщо їх ядра різко генетично незбалансовані. Можуть бути успішно запліднені навіть без'ядерні яйцеклітини та яйцеклітини з вбитим ядром.

Таким чином, при виявленні гетерозигот за транслокаціями у тварин до певної міри можна орієнтуватися на виявлення самок з різко зниженою плодючістю або самців, при використанні сперми яких різко знижується плодючість всіх самок [6].

Цитогенетичний метод дозволяє виявляти у дрозофіли транслокацію за наявності у потомстві від заключного схрещування половини з теоретично можливих генотипів. Маркування всіх хромосом дає можливість визначити і те, які хромосоми залучені у транслокації. Оскільки гамети, що утворилися у результаті суміжних розходжень тетраваленту, дають зиготичну летальність, тільки деякі (батьківські) комбінації маркерів хромосом,

включених до транслокації, виявляються у потомстві. У даному випадку маркери різних хромосом демонструють не незалежне, а зчеплене успадкування.

Транслокація може бути встановлена при ретельному аналізі каріотипу (мітотичні хромосоми), якщо використання методів диференціального фарбування дозволяє надійно ідентифікувати хромосоми і ті ділянки, якими вони обмінюються при транслокації [9].

**4. Роль транслокацій в еволюційних перетвореннях каріотипів.** Дослідження хромосомних наборів видів у межах роду, а також хромосомних наборів родичів дозволяє зробити припущення про те, що еволюція каріотипів, що характеризують рід і вид, більшою мірою здійснювалася завдяки появі і закріпленню транслокацій. Ймовірність такого шляху еволюційних перетворень каріотипів особливо велика у тих родин, у яких значна частина хромосом (а у деяких видів – всі хромосоми) акроцентричні (або субтелоцентричні). У таких родах для каріотипів різних видів характерно правило збереження константної кількості плечей хромосом у ході каріотипових перетворень [11].

Робертсонівські транслокації можуть призводити як до злиття акроцентриків у метацентрики, так і до поділу метацентриків на акроцентрики. Проте другий процес утруднений тим, що необхідний «донор» центромера, на який можна транслокувати плече. Обговорюється питання про те, чи можуть у якості таких «донорів» центромерів виступати В-хромосоми.

Транслокації забезпечують ізоляцію нових форм та сприяють

дивергенції у межах виду. Особливий тип транслокації, так звані робертсонівські транслокації, або злиття, призводять до зміни числа хромосом. Якщо дві телоцентричні хромосоми зливаються у ділянці центромери, то утворюється одна метацентрична хромосома. Якщо ця робертсонівська транслокація є результатом злиття довгих плечей хромосоми 21, то всі гамети будуть незбалансованими. У сім'ї, в якій один з батьків є носієм такої транслокації, всі діти будуть з хворобою Дауна [1].

Коли ми порівнюємо каріотиби різних видів ссавців, ми виявляємо, що у ході еволюції цих видів відбувалися і закріплювалися і інші хромосомні мутації, такі як транслокації та інверсії. Каріотип людини відрізняється від шимпанзе та інших антропоїдів однією транслокацією і декількома інверсіями. За десятки мільйонів років незалежної еволюції у каріотипі людини і землерийки виникли і закріпилися десятки різних транслокацій і інверсій. Ці хромосомні перебудови не могли б закріпитися, якщо б вони різко порушували життєздатність або плодючість їх носіїв.

У результаті транслокацій змінюється взаємне розташування генів і, отже, характер їх взаємодії. У даний час добре відомо, яку важливу роль у прояві генів грають їх регуляторні елементи. Ці елементи, як правило, знаходяться у тих же хромосомах, що і контрольовані гени, але часто на великій відстані від них. Відрив гена від його регуляторного елемента, обумовлений інверсією або транслокацією, або з'єднанням цього гена з чужим регуляторним елементом. Що може призводити до значних змін у функції гена – часу його прояву у розвитку, типі клітин, у яких цей ген активний,

у кількості синтезованого білка. До таких же наслідків може призводити і переміщення мобільних генетичних елементів, які можуть захоплювати і переносити з місця на місце регуляторні елементи [8].

У геномі знайдені ділянки, де досить часто відбуваються розриви хромосом, що ведуть до утворення хромосомних перебудов. Знайдено і ділянки переважної локалізації мобільних генетичних елементів. Цікаво, що у багатьох випадках це одні й ті ж ділянки. Таким чином, ми можемо говорити про не випадковий розподіл цих ділянок у геномі. Однак, і як всі інші мутації, хромосомні перебудови і переміщення мобільних елементів випадкові. Вони випадково змінюють функції генів, що знаходяться поблизу точок розривів, вони випадково розподіляють гени у геномі. Вони призводять до того, що виникає безліч нових «коаліцій» генів, а пристосувальна цінність цих «коаліцій» оцінюється відбором [10].

Питання для самоперевірки:

1. Що таке хромосомні перебудови?
2. Які фактори впливають на хромосомні перебудови?
3. З яких двох моментів складаються ці перебудови?
4. Які бувають обміни за місцем локалізації?
5. Що таке транслокація? Які вони бувають?
6. Які типи гамет утворюються при Робертсонівській транслокації?
7. До чого призводять різні види транслокацій?



## Лекція 8

### Інверсії та подвоєння хромосом

1. Виявлення інверсій
2. Цитологічні основи пригніченні кросинговеру у гетерозигот за інверсіями
3. Роль інверсій в еволюції

**1. Виявлення інверсій.** *Інверсія* – хромосомна перебудова, при якій відбувається поворот ділянки хромосоми на  $180^\circ$ . Інверсії є збалансованими внутріхромосомними перебудовами.

Інверсії, як правило, не впливають на фенотип носія. Патологічний фенотип при інверсії може формуватися, якщо розрив знаходиться у межах гена, або якщо перебудова порушує регуляцію гена. Через утворення аберантних рекомбінантних хромосом у мейозі гетерозиготи за інверсією можуть мати знижену фертильність, з цієї ж причини у них є ймовірність народження потомства з аномальним фенотипом [7].

Історично виявлення інверсій як одного з можливих типів хромосомних перебудов було наслідком розвитку досліджень з порівняльної генетики різних видів дрозофіли. А. Стертевант із співробітниками виявили, що у споріднених видів дрозофіли *D. melanogaster* і *D. simulans* мутації з однаковим фенотиповим проявом розподілялися схожим чином за групами зчеплення, але у структурі генетичних карт хромосоми III виявлялася відмінність у прихильності трьох генів щодо інших. На основі цих даних природно було припустити можливість хромосомної перебудови, що полягає у повороті (інверсії) ділянки хромосоми на  $180^\circ$ .

Ці результати стали інтерпретацією природи встановленого раніше у дрозофіли особливого класу домінантних мутацій *C* – пригнічувачів кросинговеру (*crossover suppressors*). Кожна така мутація у гетерозиготному стані знижувала частоту кросинговеру у тому плечі, в якому була локалізована. А. Стертевант припустив, що пригнічувачі кросинговеру можуть бути інверсіями. У гетерозигот за інверсіями кон'югація гомологів у ділянці інверсії має бути відсутня або бути помітно зміненою, що супроводжується пригніченням кросинговеру. Разом з тим у гомозигот за інверсіями кон'югація і кросинговер здійснюються нормально [6].

Цитологічно інверсії вперше спостерігали на політенних хромосомах слинних залоз у дрозофіл. У інших таксономічних групах великі інверсії можна виявити за допомогою диференціального забарвлення метафазних хромосом. Відомі поліморфні варіанти інверсій можна аналізувати за допомогою флуоресцентної гібридизації *in situ* з використанням локус-специфічних ДНК-проб.

У людей і у інших видів з секвенованим геномом субмікроскопічні інверсії можна виявити за допомогою парнокінцевого секвенування [3]. Міжвидові відмінності по інверсіях можна виявляти за допомогою прямого порівняння гомологічних послідовностей.

Отже, генетичний метод виявлення інверсій – це виявлення мутацій, які у гетерозиготному стані сильно пригнічують кросинговер у будь-якій визначеній ділянці однієї з хромосом. Серед таких мутацій з великою ймовірністю можуть бути знайдені

інверсії.

Цитологічний метод виявлення інверсій пов'язаний з реєстрацією специфічних конфігурацій при дослідженні мейозу. У гетерозигот за інверсіями у значному відсотку мейоцитів на пахітенній стадії профазі I під час кон'югації утворюється петля у тому біваленті, де одна з хромосом несе інверсію. При гетерозиготності за інверсіями може спостерігатися не тільки петлеподібна фігура кон'югації, але і відсутність кон'югації у ділянці інвертованої ділянки [11].

**2. Цитологічні основи пригніченні кросинговеру у гетерозигот за інверсіями.** Розрізняють парацентричні (інвертований фрагмент лежить по одну сторону від центромери) і перецентричні (центромера знаходиться всередині інвертованого фрагмента) інверсії. Інверсії грають роль у еволюційному процесі, видоутворенні і у порушеннях фертильності.

У одній хромосомі буває і кілька інверсій. У цих випадках інверсії можуть бути неперекриваємі, частково або повністю перекриваємі. При гетерозиготності за декількома інверсіями у одній хромосомі гомологічна кон'югація дуже ускладнена і частіше виявляється відсутність кон'югації.

Для виникнення інверсії необхідною умовою є пошкодження ДНК у вигляді двониткового розриву з наступною помилкою репарації. Репарація двониткового розриву ДНК може проходити двома способами: негомологічним з'єднанням розривів і гомологічною рекомбінацією. При репарації шляхом негомологічних з'єднань можуть помилково з'єднатися два

внутріхромосомних розриви з поворотом ділянки між ними на  $180^\circ$ . При гомологічній рекомбінації може статися невірний вибір послідовності ДНК, на основі якої йде репарація пошкодженої ДНК. Замість алельної гомологічної послідовності відбувається помилковий вибір паралогічної послідовності на цій же хромосомі. В останньому випадку для формування інверсії необхідно виникнення двониткового розриву ДНК у одній з двох повторюваних послідовностей, що знаходяться на одній хромосомі в інвертованому положенні по відношенню один до одного. Двониткові розриви ДНК можуть виникати внаслідок впливу екзогенних факторів, таких як іонізуюче випромінювання або хіміотерапія, а також внаслідок впливу на ДНК ендогенно утворюваними вільними радикалами [7].

Які ж наслідки кросинговеру у інвертованій ділянці, якщо при гетерозиготності за інверсією гомологічна кон'югація здійснюється з утворенням петлі? Спочатку розглянемо ці наслідки у гетерозигот за парацентричною інверсією. У інвертованій ділянці одиничний кросинговер призводить до утворення містка і безцентромерного фрагмента в анафазі I. Місток сформований одиничними кросоверними хроматидами, і у ньому вже повністю відсутній деякий генетичний матеріал цього плеча хромосоми. Де б не стався розрив містка по завершенні редукційного поділу, поодинокі кросоверні хромосоми обов'язково виявляються зі значними нестачами (адже відповідний матеріал втрачається з безцентромерним фрагментом). Таким чином, спори рослин, які отримують поодинокі кросоверні хромосоми, виявляються

стерильними, а гамети тварин з такими хромосомами дають летальні зиготи.

Якщо одиничний кросинговер в інвертованій ділянці поєднується ще й з обміном у неінвертованій ділянці між центромерою та інверсією, то може виникнути своєрідна конфігурація в анафазі I – фрагмент за відсутності містка. У цьому випадку місток виникає у анафазі II, і генетично незбалансованими з великими нестачами виявляються знову такі поодинокі кросоверні (по генам інвертованої ділянки) хромосоми [3].

Таким чином, при проходженні мейозу у профазі I між гомологічними хромосомами відбувається синапсис, після чого можливий кросинговер і рекомбінація між ними. Гетерозиготність за інверсіями ускладнює пошук гомологічних послідовностей при синапсисі хромосом. Короткі гетерозиготні інверсії зазвичай відчують труднощі при синапсисі, але, як правило, в їх випадку запускається процес так званої синаптичної підгонки у результаті якої на місці інверсії здійснюється негомологічний синапсис (гетеросинапсис), у якому існує заборона на рекомбінацію. Досить протяжні гетерозиготні інверсії можуть утворювати повноцінний гомологічний синапсис за рахунок формування інверсійної петлі і, отже, у межах інвертованої ділянки може статися кросинговер. Якщо у гетерозиготи за періцентричною інверсією при мейозі відбувається кросинговер у межах інвертованої ділянки, то формуються аномальні рекомбінантні хромосоми з дуплікацією і делецією. У гетерозиготи за парацентричною інверсією кросинговер у межах інвертованої ділянки призводить до

формування дицентричної хромосоми і ацентричного фрагмента. В обох випадках утворилися гамети з рекомбінантними хромосомами які виявляються генетично незбалансованими, і ймовірність появи життєздатного потомства з таких гамет є низькою [1]. Отже, гетерозиготність за інверсіями призводить до пригнічення рекомбінації у межах інверсії за рахунок двох основних механізмів: через заборону рекомбінації у разі гетеросинапсису та за рахунок низької ймовірності появи рекомбінантних продуктів у потомства внаслідок генетичної незбалансованості гамет.

Слід підкреслити, що мова йде про пригнічення фактичного кросинговеру. Про те, що кросинговер насправді здійснюється в інвертованих ділянках з набагато більшою частотою, ніж це показує частота виявляємих кросоверів, свідчить виявлення у гетерозигот за парацентричними інверсіями з більшою частотою мостів і фрагментів [8].

**3. Роль інверсій в еволюції.** Орієнтування хроматид у анафазі I завдяки містку характерно тільки для гетерозигот за парацентричними інверсіями, оскільки у гетерозигот за періцентричними інверсіями містки у мейозі не виникають. Таким чином, саме парацентричні інверсії могли б більш успішно використовуватися в еволюції як засіб захисту від рекомбінації якогось певного комплексу зчеплених генів, оскільки при овогенезі і мегаспорогенезі у гетерозигот за такими інверсіями забезпечується високий рівень плодючості. І дійсно, у більшості видів, природним популяціям яким властивий поліморфізм за інверсіями, це поліморфізм за парацентричними інверсіями. У роді

*Drosophila* поліморфізм за інверсіями характеризує популяції багатьох видів, які були цитогенетично досліджені. Цей механізм внутрішньопопуляційної мінливості у даному випадку знайшов настільки широке поширення, можливо, через своєрідні цитогенетичні ситуації: сперматозоїди гетерозиготних за інверсіями самців не несуть незбалансованих хромосом зважаючи на відсутність у них кросинговеру, а гетерозиготні за інверсіями самки не знижують плодючості завдяки орієнтуючій ролі містка в овогенезі [5].

У видів, для яких характерний кросинговер у самців, орієнтація хроматид за рахунок містка при сперматогенезі виключається, і тому спаровування з такими самцями призводить до зниження плодючості самок. Цей фактор повинен обмежувати поширення інверсійного поліморфізму у популяціях порівняно з рівнями, що спостерігаються у різних видів дрозофіли. У процесі каріотипової еволюції у межах роду *Drosophila* відбувається і фіксація інверсій, що створює характерні відмінності каріомів споріднених видів [10].

Питання для самоперевірки:

1. Що таке інверсія?
2. До якого типу перебудов вони відносяться?
3. Які бувають інверсії за місцем локалізації?
4. Якими методами можна виявити інверсії?
5. Генетичне значення інверсій?

## Лекція 9

### Дуплікації та нестачі

1. Методи виявлення дуплікацій та нестач
2. Отриманні дуплікацій та нестач
3. Роль дуплікацій та нестач в еволюції геному

**1. Методи виявлення дуплікацій та нестач.** *Дуплікації* – локальне подвоєння (повторення) певної ділянки хромосоми (відомі також випадки багаторазових повторень, або мультиплікацій будь-якої ділянки). Дуплікації однієї хромосоми або анеуплоїдія практично завжди ведуть до різкого зниження пристосованості. У ссавців вони часто летальні або ведуть до стерильності. Найбільш відомим випадком хромосомної дуплікації у людини є хрестоматійний синдром Дауна (трисомія по третій хромосомі) [2].

Цитогенетичний метод, що дозволяє встановити дуплікації у межах генома (наявність у різних, негомологічних хромосомах однакових ділянок), – це виявлення можливих наслідків кросинговеру між такими гомологічними ділянками у негомологічних хромосомах. Ясно, що наслідком такого кросинговеру повинно бути виникнення нової транслокації між хромосомами, що містять дупліковані ділянки. Ефективне використання цього методу для виявлення у геномі подвоєних ділянок серед негомологічних хромосом утруднюється тим, що кожна з цих ділянок переважно і навіть виключно кон'югує з такою ж у складі парної, гомологічної хромосоми за нормального процесу



утворення бівалентів. Підвищити частоту кон'югації можна, якщо усунути партнера для нормальної кон'югації гомологів. «Усунення гомологічного партнера» дозволяє вирішити використання деяких своєрідних цитогенетичних ситуацій, які дозволяють отримати гетерозиготні за великими нестачами каріоти́пи.

Генетичні методи виявлення дуплікацій неможливі коли виникають тандемні подвоєння, при яких такі ділянки розташовуються у хромосомі у безпосередньому сусідстві один з одним. Генетичний аналіз, що дозволяє виявити подібні дуплікації, ґрунтується на можливості реєстрації за фенотипом наявності дуплікації або її відсутності. Якщо присутність дуплікації проявляється у зміні фенотипу, у потомстві організмів з тандемною дуплікацією можна з певною частотою виявляти зміни до нормального стану ознаки і до накопичення ще більшої кількості тандемно повторених ділянок. Ці зміни – результат нерівного кросинговеру при зміщеній кон'югації. Інтерпретація заснована на відмінній особливості таких рідко зустрічаємих змін: вони, як правило, виявляються кросоверами за фланговим маркерним геном [7].

Генетичний метод виявлення нестач (делецій) заснований на виявленні при схрещуванні типу  $aa \times AA$  помилкового домінування рецесивної алелі. Якщо при такому схрещуванні з'являється організм з ознакою, відповідним прояву рецесивної алелі, цей результат може бути наслідком або генної мутації  $A \rightarrow a$  або нестачі – втрати ділянки хромосоми, що несе ген  $A$ .

Дві основні особливості характерні саме для нестач. По-перше,

гомозиготність за нестачами має летальний ефект, і зареєстровані лише поодинокі винятки з цього правила. Як вже зазначалося, нестача у спорах у вищих рослин призводить до різкого зниження життєздатності, зазвичай до неможливості розвитку із спори гаметофіту. Друга особливість, що характеризує більшість нестач – це досить велика їх протяжність, яка часто перевищує розміри одного гена. У результаті при виявленні ефекту помилкового домінування рецесивної алелі у тій ділянці, де відомі тісно зчеплені гени, цей ефект може бути продемонстрований на декількох генах відразу [6].

Висновок про те, що аналізована мутація являє собою нестачу, підтверджується за допомогою цитологічного методу. При значному розмірі нестачі і можливості успішного каріотипування з ідентифікацією усіх хромосом на мітотичних пластинках ця нестача надійно виявляється. У організмів, для яких вивчення бівалентів на пахітенній стадії профазі I мейозу методично здійсненна, можна виявити не тільки кінцеві нестачі у гетероморфних бівалентах, але і нестачі внутрішніх ділянок хромосом, що супроводжуються утворенням петель у гетероморфних бівалентах [8].

**2. Отриманні дуплікацій та нестач.** Дуплікована ділянка може бути розташована у вихідній хромосомі: або безпосередньо примикаючи до вихідної ділянки (тандемна дуплікація), або у тому ж плечі, але на деякій відстані від вихідної ділянки, або в іншому плечі вихідної хромосоми. Крім того, подвоєна ділянка може бути локалізована у негомологічній хромосомі, тобто в іншій групі

зчеплення. У разі дуплікації двох ідентичних генів, подібних за характером дії і які опинилися в різних групах зчеплення, при схрещуванні буде спостерігатися характерне для дигібридного розщеплення полімерних генів у співвідношенні 15:1.

Дуплікації можуть відбуватися у межах однієї і тієї ж хромосоми або виникати у результаті перенесення копії ділянки хромосоми на іншу хромосому (транспозиції). Повтори, що виникли в одній хромосомі можуть розташовуватися у вигляді прямих або інвертованих тандемних повторів. Відомі випадки багаторазових повторень ділянки хромосоми, названих ампліфікацією [2]. В еволюції у результаті дуплікацій може відбуватися утворення повторюваних нуклеотидних послідовностей, кластерів генів і мультигенних родин [3]. При дуплікації гена друга копія гена часто вже не піддається тиску селекції – так, мутація однієї з копій гена не несе шкоди організму. Отже, копії накопичують мутації швидше, ніж гени, що існують у одному екземплярі. Дуплікація є протилежністю делеції генів.

Ефективним джерелом аберацій цього виду, як і інших хромосомних перебудов, може бути індукований мутаційний процес, особливо при використанні мутагенів, здатних викликати розриви в хромосомах. Крім того, нестачі регулярно виникають у результаті кросинговеру і певних типів розбіжностей хромосом у гетерозигот за різними хромосомними перебудовами.

Згадаймо насамперед про те, що нестачі різної протяжності регулярно виникають при одиничному кросинговері в інвертованій ділянці у гетерозигот за парацентричними інверсіями. Якщо

інвертована ділянка розміщується дистально, тобто близько до кінця плеча, то деякі поодинокі кросоверні хромосоми можуть іноді виявитися лише з невеликою нестачею, яка передається через мегаспору у рослин або не викликає зиготичної летальності у тварин [6].

Дуплікації можна також виділити у потомстві певного типу гетерозигот за хромосомними абераціями. У потомстві гетерозиготи за двома перекриваємими інверсіями можлива поява хромосоми з дуплікацією (і без нестачі), що утворюється при кросинговері в інвертованій ділянці [2].

### **3. Роль дуплікацій та нестач в еволюції геному.**

Більшість нестач (якщо тільки вони не виявляються летальними у гетерозиготному стані через істотне порушення балансу генів) використовуються для цитологічної локалізації генів. Ставити таке завдання можна у тих випадках, коли є можливість досить виразно встановлювати у хромосомі, межі ділянки, що бракує. Така можливість створюється при дослідженні двокрилих комах, які мають гігантські політенні хромосоми з чітким унікальним малюнком дисків. За наявності колекції нестач, які захоплюють певну ділянку хромосоми, можна іноді досить точно локалізувати конкретні гени. Для дослідження особливо зручно, якщо нестачі опиняються частково перекриваємі [8].

Розвиток уявлення А. С. Серебровського про роль мутацій – часткових внутрігенних нестач – у еволюції геному отримали у його гіпотезі про походження нових генів за рахунок вихідної дуплікації і подальшої диференціації двох однакових генів. А. С.

Серебровський вважав, що два різних гена могли виникнути на основі вихідної дуплікації завдяки появі у дуплікованих копіях нестач різних фрагментів гена.

Накопичення такої інформації дозволило у одного і того ж організму виявити сімейства споріднених білкових молекул і відповідно сімейства схожих генів, що кодують ці молекули [12].

Так, у всіх хребетних, починаючи з найпримітивніших, є два типи білків-глобінів, відповідальних за перенесення кисню – міоглобін і гемоглобін.

У геномі людини знайдено 9 активних генів, що контролюють синтез різних видів молекул гемоглобіну: два гени  $\zeta$ -глобіну, два майже ідентичних гена  $\alpha$ -глобіну, ген  $\varepsilon$ -глобіну, два дуже схожих гена  $A\gamma$ - та  $G\gamma$ -глобінів, гени  $\delta$ -глобіну і  $\beta$ -глобіну. Крім того, у людини, мабуть, є не один ген міоглобіну. Первинна структура всіх цих глобінових молекул настільки схожа, що ця схожість не може бути випадковою і вона є наслідок спільного походження генів. Виявляється і кілька родин протеолітичних ферментів: серинові протеази (трипсин, хімотрипсин, еластаза, тромбін та ін), кислі протеази (пепсин, ренін), залізопротеази та інші групи. Молекули ферментів, що належать до кожної такої родини, також виявляють значну схожість у первинній структурі, а значить, і у структурі контролюючих їх генів [3].

Таким чином, у даний час можна вже впевнено говорити про те, що еволюція геному, безсумнівно, регулярно здійснювалася за допомогою появи дуплікацій та подальшої їх дивергенції. Диференціація першочергово ідентичних генів після дуплікації

відбувалася як шляхом замін пар нуклеотидів, так і завдяки появі невеликих нестач. Однак деякі з таких змін могли послужити основою для вдосконалення адаптаційних механізмів у ході еволюції. Так, з'явилася близько 500 млн. років тому у хребетних перша дуплікація послужила основою для створення двох варіантів молекул, що переносять кисень: міоглобіну і гемоглобіну.

Приклад з генами глобінів, один з найбільш добре вивчених, підтверджує концепцію про велику роль дуплікацій як генетичної основи прогресивної еволюції, що базується на виникненні генів, здатних забезпечити нові функції, більш різноманітні і досконалі механізми адаптації організмів. При цьому процес дивергенції дуплікованих ділянок міг ґрунтуватися і на появі в них невеликих нестач поряд із замінами основ.

Роль нестач, мабуть, значна і в іншому важливому процесі. Справа у тому, що у структурі деяких генних продуктів – РНК і білків іноді достатньо чітко виявляються внутрішні дуплікації – дві або три ділянки, дуже подібні за структурою. Дуплікації у межах молекули виявлені у білках 18 різних підродин. Навіть якщо при виникненні таких дуплікацій подвоюються тільки кодуючі частини генів (інтрони + екзони до термінуючого кодону), то при виникненні єдиного гена подвоєного розміру необхідна нестача на межі між ними, що прибирає кодон-термінатор першого гена та ініціює кодон наступного за ним другого гена [7].

Таким чином, швидкий прогрес досліджень з молекулярної біології підтверджує велику роль дуплікацій, нестач та ампліфікації в ході еволюції геномів.

Питання для самоперевірки:

1. Що таке дуплікації? Методи їх виявлення?
2. Генетичні особливості дуплікацій?
3. Що таке тандемні дуплікації та транспозиції?
4. Що таке хромосомні нестачі?
5. Роль хромосомних нестач в еволюції геному?

## Лекція 10

### Ефект положення генів

1. Докази ефекту положення
2. Ефекти положення генів
3. Мутації та ефект положення

**1. Докази ефекту положення.** Уявлення про те, що характер експресії гена може залежати від положення цього гена щодо сусідніх з ним ділянок хромосоми (явище, назване ефектом положення), сформувалося у генетиці на основі узагальнення ряду експериментальних даних.

Вперше термін «ефект положення» використовував А. Стертевант, який показав, що самки *D. melanogaster*, гомозиготні за мутацією *Bar* (*B/B*), відрізняються за кількістю фасеток в очах від самок, гетерозиготних за мутацією «подвійний *Bar*» (*BB/+*), хоча за дозою домінантної мутантної алелі *Bar* ці самки не розрізнялися. Як було з'ясовано пізніше, мутація *Bar* – це подвоєння ділянки з 6 дисків, а подвійний *Bar* – це три таких ділянки поспіль. Отже, загальна доза даного матеріалу – чотирьохкратна і у самок *B/B*, і у самок *BB/+*. Таким чином, різниця між ними за кількістю фасеток в очах – це результат неоднакового розташування даних чотирьох ділянок у двох X-хромосомах, тобто, прояв ефекту положення [2].

У 1930 р. Г. Меллер описав мозаїчний прояв гена *w+* при перебудові, що торкнулася X-хромосому *D. melanogaster*, а у 1932 р. Ф. Г. Добжанський виявив мутацію *baroid*, схожу за проявом з класичною мутацією *Bar*, але яка є наслідком транслокації за



участю X-хромосоми.

Н. П. Дубінін і Б. Н. Сидоров вперше здійснили переконливу перевірку різноманітних гіпотез, які пояснюють зміну у прояві ефекту гена у разі перебудови. Вони отримали 19 різних транслокацій у *D. melanogaster* за участю хромосоми IV. Було виявлено, що із вказаної кількості 10 транслокацій супроводжувалися незвичайним ефектом: у гетерозигот за даними транслокаціями проявлявся ефект рецесивної алелі гена *cubitus interruptus (ci)* хромосоми IV, незважаючи на те що транслокована хромосома мала нести алель  $ci^+$ . Ступінь прояву ефекту рецесивної алелі  $ci$  в гетерозиготі  $R (ci^+)/ci$  у разі кожної з 10 транслокацій був своєрідним: від дуже слабкого до більш різкого, ніж у гомозигот  $ci/ci$ .

У гомозиготному стані транслокації у дрозофіли у більшості випадках летальні. Проте деякі з цих 10 транслокацій виявилися життєздатні і у гомозиготному стані, і у компаундах з іншими транслокаціями. Сама алель  $ci^+$  у транслокованій хромосомі зберегла здатність детермінувати ознаку, властиву дикому типу. Мутація  $ci^+ \rightarrow ci$  не відбулася.

Таким чином, залишалось прийняти, що нездатність алелі  $ci^+$  повністю домінувати над рецесивною алелю  $ci$  була обумовлена її незвичайним становищем, що створилося у результаті перебудови у кожній з 10 транслокацій, тобто ефектом положення [9].

**2. Ефекти положення генів.** Якщо при переміщенні гена в наслідок перебудови виявляється зміна у його експресії, то вона найчастіше реєструється як мозаїчний прояв алелі дикого типу. У

тканині, ознака якої контролюється даним геном, у гетерозиготи  $R$  ( $a^+$ )/ $a$  у одних ділянках реалізація цієї ознаки відповідає ефекту алелі  $a^+$ , у інших – алелі  $a$  чи іншій рецесивній алелі цього гена. Від англійського слова *variegation* (мозаїчність) цей тип ефекту положення називають ще V-типом.

Д. Ліндслі і Е. Грелл перераховують 72 гена дрозофіли, для яких зареєстровано мозаїчний ефект положення при перебудовах. У всіх досліджених випадках (312 хромосомних аберацій) один із розривів відбувався поблизу досліджуваного гена, а інший – у прицентромерному гетерохроматині будь-якої хромосоми або у Y-хромосомі [12].

Це явище прийнято називати першою особливістю, яка властива мозаїчному ефекту положення. Вона виявляється для генів, які у нормі локалізовані біля еухроматинових ділянок, якщо при перебудові вони виявляються по сусідству з розірваною гетерохроматиновою ділянкою.

Для генів, зазвичай розташованих по сусідству з гетерохроматиновою ділянкою або всередині неї, мозаїчність проявляється тоді, коли ген виявляється поруч із еухроматином. Такий ефект відзначений для гена *light (It)* з лівого плеча хромосоми II. Однак такі випадки дуже рідкісні. В основному мозаїчність проявляється при переміщенні гена з еухроматинової ділянки до розірваної гетерохроматинової ділянки.

Встановлено, що чим більше розмір гетерохроматинової зони, що опинилася поруч з геном при перебудові, тим сильніше виражена мозаїчність (тим рідше алель дикого типу в аберрантній хромосомі

проявляється як така).

Ще одна характерна особливість мозаїчного ефекту положення – його здатність до поширення вздовж хромосоми від місця розриву [3].

При дослідженні мух, несучих вставку ділянки X-хромосоми всередину гетерохроматину хромосоми IV, було виявлено, що ефект положення поширюється від обох кінців ділянки всередину. Судячи з того, що по 4 гени на обох кінцях ділянки демонструють мозаїчний прояв, ефект положення розповсюджується на значну відстань (у політенній хромосомі кожен з цих інтервалів включає не менше 20 дисків).

Мозаїчний ефект положення може бути модифікований оскільки мозаїчний прояв генів у дрозофіли пригнічується при додаванні Y-хромосоми [5].

Збільшення у каріотипі кількості матеріалу з будь-яких гетерохроматинових зон також сприяє пригніченню мозаїчності, але ефект додаткової Y-хромосоми найбільш сильний.

Встановлено, що відбір може призвести до посилення або ослаблення мозаїчності. Це показує, що є гени, здатні модифікувати мозаїчний ефект положення. Були виявлені окремі гени з відносно сильним впливом такого роду: наприклад, домінантний супресор *Su-V* у хромосомі III.

У деяких випадках при перебудовах реєструється не мозаїчний прояв гена, а стійка зміна у його експресії. При цьому один з розривів обов'язково розташовується у безпосередній близькості від досліджуваного гена, і обидва розриви локалізуються в

еухроматинових ділянках Таким чином, для стабільного (*stable*), або *S*-типу, ефекту положення поширення по хромосомі від місця розриву не властиво. Стабільний ефект положення гена спостерігається при переміщенні гена між еухроматиновими ділянками хромосом. Можливий механізм цього явища – залучення переміщеного гена у систему регуляції інших генів [2].

**3. Мутації та ефект положення.** При дослідженні мутацій у дрозофіли виявлено, що хромосомні аберації супроводжуються досить чітким впливом на будь-які ознаки організму. Часто відбувається зміна, яка у гомозиготному стані визначає нежиттєздатність організму на ранніх етапах його розвитку: інверсії, транслокації і практично всі нестачі. Але і у гетерозиготному стані хромосомні аберації іноді викликають зниження життєздатності та плодючості. Є всі підстави вважати подібні характеристики, пов'язані з хромосомними абераціями, результатом ефекту положення.

Більшість нестач та дуплікації у дрозофіли відрізняються чітким специфічним домінантним проявом, який позначається на зміні тих чи інших ознак. При цьому характерний плейотропний прояв таких мутацій. Так, деякі нестачі виражаються не тільки у зміні щетинок, а й у зміні розмірів тіла, поверхні і розмірів очей, будови крил, плодючості. Очевидно, і ці фенотипові прояви хромосомних аберацій цілком можна вважати результатом ефекту положення [4].

Таким чином, дані генетики та цитогенетики свідчать про те, що хромосоми представляють собою певним чином організовані

генні комплекси, у межах яких і здійснюється робота генів. Порушення в організації цих комплексів при хромосомних перебудовах часто призводять до змін в експресії генів. Це часто спостерігається у дрозофіли при перебудовах, які зачіпають одночасно еухроматинові та гетерохроматинові ділянки, але подібні зміни супроводжуються і абераціями, які зачіпають тільки еухроматинові ділянки.

Мутації, значна частина яких представляє собою хромосомні перебудови, мабуть, можуть потрапляти під контроль природного відбору навіть у гетерозиготному стані саме внаслідок ефекту положення – незвичайного прояву генів, найближче оточення яких змінилося [2].

Таким чином, на додаток до тієї ролі, яку хромосомні перебудови відіграють у процесі еволюції геномів, забезпечуючи збагачення генетичного матеріалу, створення нових генів, зміна у розподілі генів у межах хромосоми і між хромосомами, вони у багатьох випадках характеризуються ще й специфічною зміною тих чи інших ознак організму в наслідок ефекту положення.

Питання для самоперевірки:

1. Що таке «ефект положення гена»?
2. Докази теорій положення генів?
3. Які ефекти положення Вам відомі?
4. Як впливають мутації на ефект положення?

## Література

1. Ворсанова С. Г. Медицинская цитогенетика / С. Г. Ворсанова, Ю. Б. Юров, В. Н. Чернышов. – М. : Медпрактика, 2006. – 376 с.
2. Петухов В. Л. Генетика : учеб. для студентов высш. учеб. заведений / В. Л. Петухов, О. С. Короткевич, С. Ж. Стамбеков. – Новосибирск, 2007. – 628 с.
3. Дубинин Н. П. Потенциальные изменения ДНК и мутации. Молекулярная цитогенетика / Н. П. Дубинин. – М., 1978. – 244 с.
4. Жимуёв И. Ф. Общая и молекулярная генетика : курс лекций / И. Ф. Жимулёв. – Новосибирск, 1998. – 123 с.
5. Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции : учеб. для биол. ун-тов / С. Г. Инге-Вечтомов. – М. : Высш. шк., 1989. – 591 с.
6. Льюин Б. Гены / Б. Льюин. – М. : Мир, 1987. – 544 с.
7. Методы анализа хромосомных aberrаций у человека / под ред. К. Бэктон, Г. Эванса. – Женева : ВОЗ, 1975.
8. Прокофьева-Бельговская А. А. Основы цитогенетики человека / А. А. Прокофьева – Бельговская. – М. : Медицина, 1969.
9. Смирнов В. Г. Цитогенетика / В. Г. Смирнов. – М. : Высш. шк., 1991. – 247 с.
10. Спирин А. С. Молекулярная биология : Структура и биосинтез белков / А. С. Спирин. – М. : Высш. шк., 1990. – 352 с.
11. Фролов А. К. Иммуноцитогенетика / А. К. Фролов, Н. Г. Арцимович, А. А. Сохин. – М. : Медицина, 1993.
12. Wikipedia, the free encyclopedia [Електронний ресурс] : офіційний веб-сайт / Wikimedia Foundation, Inc. – San Francisco. – Режим доступу : <http://www.wikipedia.org/> – [Мови англ., укр. рос. та ін.] – Дата останнього доступу: 1.12.2013. – Назва з екрану.

Навчальне видання

**Каратєєва Олена Іванівна**

**Цитогенетика**

*курс лекцій*

Відповідальний за випуск: М.І. Гиль

Технічний редактор: О.І. Каратєєва

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 16,2

Тираж 15 прим. Зам. №

Надруковано у видавничому відділі Миколаївського національного аграрного університету 54020, м. Миколаїв, вул. Паризької Комуни,9 Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.