



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

Лекція № 3

Тема: Кросинговер

План:

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 не зчеплених генів – генів, локалізованих у різних хромосомах. Можливості такої рекомбінації у забезпеченні комбінативної мінливості досить великі.

Оскільки вдається виявити лише один з комплементарних (взаємодоповнюючих) продуктів цього процесу у прокариот різні види рекомбінації генів, зчеплених у їх кільцевих молекулах ДНК (трансформація, трансдукція, рекомбінація при статевому процесі), позначаються як види нереципрокну 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 реципрокну.

Для реципрокну 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 домігантних і рецесивних алелів. Ці факти пояснюються здійсненням кросинговеру у соматичних клітинах (мітотичний кросинговер).

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



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

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 прокариот 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.

Основні положення мейотичного кросинговеру:

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

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

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

Сутність кросинговеру полягає в якісному матеріальному обміні ділянками між хроматидами.

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

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 алелем 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.

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



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

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.

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 алелей 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.

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



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

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.

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.

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 двоххроматидних і зростає частка чотирьоххроматидних обмінів. Негативна хроматидна інтерференція, навпаки, призводить до збільшення частки двоххроматидних 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).

Чим вище показник C , тим менше позитивна хіазменна інтерференція і тим менше один обмін впливає на ймовірність здійснення іншого. При повній хіазменній 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.

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



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

відстаней між генами у дослідах 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.

5. Кросинговер 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 центромірами 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.

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 анафази I і II показали, що в 13% клітин на стадії анафази 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 трьооххроматидних подвійних обмінів також відбувався з частотою 13%.



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

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%).

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 сантіморганях (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.

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



Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

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.

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.