



## Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

### Лекція № 4

**Тема:** Механізм кросинговеру. Вплив різних чинників на кросинговер

**План:**

1. Сучасні уявлення про механізм кросинговеру
2. Вплив генетичних чинників
3. Вплив біологічних чинників
4. Вплив абіотичних чинників

#### 1. Сучасні уявлення про механізм кросинговеру

**Механізм кросинговеру «розрив-возз'єднання»** Відповідно до теорії Янсенса- 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.

**Генетичний механізм кросинговеру.** Ще до відкриття перехрещення хромосом генетичними методами цитологи, вивчаючи профазу мейозу, спостерігали явище взаємного обвивання хромосом, утворення ними х-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



## Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

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.

**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 популяції)

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).

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

### 2. Вплив генетичних чинників

Процес кросинговеру помітно модифікується крім генетичних і різноманітними внутрішніми та зовнішніми чинниками. 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.

**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. Біда 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



## Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

частоту рекомбінацій у будь-якій ділянці хромосоми впливає фізична відстань від центроміри.

**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 *y* 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<sup>m2</sup>* включає відрізок довжиною 10 сМ на генетичній карті, розташований у прицентромірній ділянці. Облік довжини генетичної карти X-хромосоми при множинному маркуванні у гетерозиготних особин за інверсією *B<sup>m2</sup>* дає величину 47 сМ замість звичайних 57 сМ у разі відсутності інверсії, а при гетерозиготності за інверсії *sc<sup>7</sup>* – 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<sup>m2</sup>* очікується нормальна кон'югація протягом всієї X-хромосоми аж до ділянки, де починається ця інверсія. У той час у гетерозиготних особин за інверсією *sc<sup>7</sup>* 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.

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



## Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

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.

**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-Редфілда». 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.

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.

**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





## Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

мутація у гомозиготному стані призводить до зниження рівня мейотичного кросинговеру до 8% порівняно з контролем, при цьому характер розподілу кросингових 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 домінуючих або рецесивних алелів модифікувати частоту кросинговеру.

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 алелів генів – модифікаторів кросинговеру.

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

### 3. Вплив біотичних чинників

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 дрозофіли 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



## Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ

організму впливає на перебіг різних стадій мейозу, тому що ступінь спіралізації хромосом, швидкість проходження різних стадій профазу може залежати від фізіологічного стану клітин.

### 4. Вплив абіотичних чинників

На частоту рекомбінації можуть впливати різні чинники 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 дрозофіли 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.

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).

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



## **Практикум з ЦИТОГЕНЕТИКИ**

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.