

На правах рукописи

ТРИФОНОВ ВЛАДИМИР АЛЕКСАНДРОВИЧ

**ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ПОЛОВЫХ ХРОМОСОМ
ПОЗВОНОЧНЫХ**

03.01.07 – молекулярная генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Новосибирск - 2018

Работа выполнена в ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии
Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

Научный консультант: **Графодатский Александр Сергеевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом, ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

Официальные оппоненты: **Лухтанов Владимир Александрович**, доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник, ФГБУН Зоологический институт Российской академии наук, г. Санкт-Петербург
Салина Елена Артемовна, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск
Литвинов Юрий Нарциссович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией, ФГБУН Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

Ведущее учреждение: ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, г. Москва

Защита состоится: 30 января 2019 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.074.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН в конференц-зале по адресу 630090, Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 8/2; тел: +7-383-373-02-49; e-mail: ovant@mcb.nsc.ru С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.mcb.nsc.ru
Автореферат разослан «___» _____ 2018г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

О. В. Антоненко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Половое размножение уже более сотни лет является ключевой проблемой биологии, которая волновала величайших мыслителей, включая Дарвина, Холдейна, Фишера, Оно и многих других. Несомненно, и сегодня интерес к этой проблеме не угасает, поскольку появление полового размножения очень тесно связано с происхождением и эволюцией эукариот, а современные методы молекулярной генетики и последние открытия палеонтологии позволяют взглянуть на вопрос с новых сторон. Тем не менее, многие вопросы, связанные с половым размножением, так и остаются открытыми. Некоторые исследователи даже называли половое размножение «главной неразрешенной проблемой биологии» [Williams, 1980]. Так, до сих пор не совсем понятно, каким образом возник такой сложный механизм деления клетки как мейоз и какие адаптивные свойства позволили именно этому довольно затратному типу размножения получить эволюционные преимущества. Относительно недавно было показано, что определение пола у животных контролируется довольно консервативным каскадом генов (хотя последовательность отдельных компонентов может меняться), но вот запуск этого каскада осуществляется с помощью совершенно разных механизмов в разных группах животных, а скорости эволюции определяющих пол систем очень сильно отличаются в разных филогенетических линиях.

Последние несколько десятилетий характеризовались существенным прорывом в разных областях биологии. Секвенирование сначала отдельных сегментов геномов, а затем и целых геномов про- и эукариот дало начало новому направлению науки - сравнительной геномике, направленной на сравнительное изучение содержания и функционирования геномов организмов из разных биологических таксонов. Сравнительное картирование геномов перешло с уровня отдельных генов и описания сходства участков кариотипа до масштабных полногеномных проектов с выявлением функциональных особенностей геномных районов.

Данные, полученные в процессе секвенирования геномов, указывают на особенности их эволюции – скорости фиксации замен на нуклеотидном уровне, амплификаций и делеций повторенных элементов, перегруппировке (дупликации, делеции и транслокации) протяженных сегментов разной длины от нескольких нуклеотидов до целых хромосом и, наконец, изменения ploидности геномов. Именно молекулярные методы позволили описать половые хромосомы и системы определения пола у тех видов, где методы классической цитогенетики были бессильны. В то же время сочетание данных молекулярной геномики и палеонтологии обеспечило исследователей оценками по дивергенции разных таксонов позвоночных, что позволяет еще более точно оценить времена происхождения отдельных половых хромосом (гоносом) на разных участках филогенетического древа и систем определения пола. Время от времени исследователи обобщают информацию об особенностях происхождения и эволюции половых хромосом на разных ветвях филогенетического древа позвоночных, но

новые данные заставляют пересматривать и уточнять картину эволюции гоносом, а также выдвигать новые гипотезы и формулировать новые проблемы.

Цели и задачи работы. Основной целью данной работы является анализ эволюции половых хромосом, способов определения пола и механизмов половой дифференциации у позвоночных из разных таксонов с помощью современных молекулярно-цитогенетических и биоинформатических подходов, включающих как выделение отдельных хромосом с последующим хромосомным пэйнтингом, так и высокопроизводительное секвенирование и анализ состава хромосомспецифичных библиотек ДНК. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- исследовать стабильность высокодифференцированных половых хромосом плацентарных и выдвинуть гипотезу, объясняющую консерватизм гоносом в данном таксоне;
- изучить виды млекопитающих, представляющих собой исключения из стандартного для этого таксона способа определения пола и выяснить, может ли в данных видах осуществляться переход к другим способам с вовлечением новых генов в каскад определения пола;
- изучить возможную связь половых хромосом с другими малорекомбинирующими элементами кариотипа – добавочными хромосомами;
- изучить системы половых хромосом в таксонах с быстроэволюционирующими системами половых хромосом – рыб, амфибий и завропсид;
- исследовать случаи многократного независимого происхождения половых хромосом в разных таксонах из одной и той же синтенной группы и роли сегментных дупликаций в появлении новых способов запуска половой дифференциации.

Научная новизна. Впервые методы молекулярной цитогенетики в сочетании с технологиями секвенирования нового поколения и сравнительного анализа геномов применены для анализа эволюции половых хромосом на обширной выборке разных таксонов позвоночных (рыбы, амфибии, рептилии и млекопитающие).

Отработаны методы выделения ДНК и получения хромосомспецифичных библиотек из половых хромосом, полученных как сортированием, так и микродиссекцией с последующей амплификацией, секвенированием и анализом состава.

Подтверждена высокая консервативность синтении половых хромосом у плацентарных млекопитающих, хотя и выявлены таксоны, где половые хромосомы подвергаются значительным преобразованиям, вплоть до потери Y-хромосом и вероятного перехода на другой способ запуска половой дифференциации у нескольких видов полевок. Показано, что транслокации X-хромосом с аутосомами часто имеют недавнее происхождение.

Предположено, что добавочные хромосомы желтогорлой мыши (*Apodemus flavicollis*) произошли из псевдоаутосомного района половых хромосом, а также предположено происхождение добавочных хромосом из половых у копытного лемминга (*Dicrostonyx torquatus*).

Выявлены высокие темпы эволюции и наличие внутривидового полиморфизма систем половых хромосом в нескольких семействах неотропических костистых рыб

(гимнотобразных и харацинообразных). Предположен состав половых хромосом азиатской араваны (араванообразные).

С помощью секвенирования хромосомспецифичных библиотек выявлен состав и особенности эволюции половых хромосом нескольких видов игуановых. Впервые выявлено вовлечение в систему половых хромосом ящериц рода *Norops* района, гомологичного половым хромосомам обыкновенного удава (*Boa imperator*), бородатой агамы (*Pogona vittiseps*) и когтистой шпорцевой лягушки (*Xenopus tropicalis*). Предположено, что тот же район формирует половые хромосомы геккона *Hemidactylus platyurus*.

Выдвинута гипотеза происхождения гомоморфных половых хромосом из гетероморфных у бесхвостых амфибий и предположен сценарий этого процесса.

Предположено существование протохромосомы четвероногих, давшей начало большинству выявленных у позвоночных систем половых хромосом.

Положения, выносимые на защиту. Добавочные хромосомы желтогорлой мыши и копытного лемминга произошли из сегментов половых хромосом.

Эволюция систем половых хромосом анолисов (игуановые) включает частые транслокации с мелкими аутосомами (микрохромосомами) у некоторых видов. Транслоцированный материал подвергается постепенному вырождению на Y-хромосомах.

Участок, содержащий ген каскада определения пола *RSPO1*, независимо принял участие в формировании систем половых хромосом у ящериц *Norops sagrei*, *Pogona vittiseps*, *Hemidactylus platyurus*, а также у удава и когтистой шпорцевой лягушки.

Переход из системы гетероморфных половых хромосом в гомоморфные у хвостатых земноводных произошел путем транслокации Y-хромосомы на аутосому.

Одна из протохромосом предка четвероногих могла включать гомологи большинства выявленных у современных позвоночных систем половых хромосом.

Системы половых хромосом в группах костистых рыб отличаются высокими скоростями эволюции и могут использоваться как модели для понимания подобных процессов у позвоночных.

Состав половых хромосом малоизученных видов позвоночных может быть исследован быстрым и относительно недорогим способом секвенирования микродиссектированных хромосом и их последующим анализом с помощью программы-конвейера DOPSeq_analyzer.

Теоретическая значимость работы и научно-практическая значимость работы. Выявлены особенности строения и эволюции половых хромосом у немодельных видов позвоночных из разных таксонов (млекопитающие, черепахи, ящерицы, амфибии и рыбы). Общее понимание процессов эволюции половых хромосом позволяет понять особенности эволюции геномов эукариот в целом.

Разработанный в ходе работы метод выделения хромосом и последующего анализа генетического состава может быть использован на широком круге объектов,

включающих половые хромосомы, добавочные хромосомы, перестроенные и маркерные хромосомы человека и животных при патологиях.

Выявленные методы анализа половых хромосом могут быть использованы для исследования хозяйственно значимых видов (например, рыб в аквакультуре), где своевременное выявление пола помогло бы существенно оптимизировать производство.

Понимание процессов эволюции половых хромосом необходимо для диагностики и понимания патологических состояний, связанных с половыми хромосомами человека в медицине.

Степень достоверности и апробация результатов. Научные положения и выводы полностью обоснованы. Достоверность результатов обеспечивается внутренней согласованностью и согласием полученных в диссертации результатов с известными результатами, процитированными в диссертации. Материалы диссертационной работы были представлены на второй и третьей В-хромосомной конференции (Гранада, Испания (2004), Гатерслебен, ФРГ (2014)), втором конгрессе Международного общества цитогенетики и геномики, Кентербери, Великобритания (2006), 52-ом бразильском генетическом конгрессе (2006), Международной конференции, посвященной 90-летию академика Д.К. Беляева, Новосибирск (2007), Международной конференции Chromosome (Амстердам, Нидерланды (2007), Болонья, Италия (2013), Фоз ди Игуасу, Бразилия (2016)), 19-ом ежегодном собрании немецкого общества генетики человека, Ганновер, ФРГ (2008), Симпозиуме памяти Г.А. Левитского «Хромосомы и эволюция», Санкт-Петербург (2008), Международной конференции «Хромосома», Новосибирск (2009, 2012, 2015, 2018), 19-м международном коллоквиуме по цитогенетике животных и генетическому картированию, Краков, Польша (2010), Ежегодной конференции немецкого генетического общества, Йена, ФРГ (2010), Второй конференции бразильской цитогенетики, Агуас де Линдойя, Бразилия (2011), Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика» Новосибирск (2011), 20-м международном коллоквиуме по цитогенетике животных и генетическому картированию, Кордоба, Испания (2012), 37-м конгрессе общества зоологов Италии Флоренция, Италия (2012), Европейской конференции по генетике человека, Нюрнберг, ФРГ (2012), 21-й Международном генетическом конгрессе, Сингапур (2013), Первой и второй всероссийской конференции с международным участием «Высокопроизводительное секвенирование в геномике», Новосибирск (2013, 2017), 22-м и 23-м Международном Коллоквиуме по цитогенетике и геномике животных (Тулуза, Франция (2016), Санкт-Петербург (2018)), Международной конференции «Водные экосистемы Сибири и перспективы их использования», Томск (2016), Международной мини-конференции «Хромосомы и митоз - 2016», Новосибирск (2016), 11-ой Европейской Цитогенетической Конференции, Флоренция, Италия (2017).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 40 статей в международных рецензируемых научных журналах, две главы в книгах, а также 54 тезиса в материалах отечественных и зарубежных конференций в 2007-2018 гг.

Вклад автора. Автор принимал участие во всех этапах исследований. В работах по получению хромосомспецифичных библиотек, их картированию, секвенированию и анализе, автор был главным организатором, а также исполнителем большей части исследований (сюда относятся работы по молекулярной цитогенетике плацентарных млекопитающих, чешуйчатых и осетрообразных). В работах по исследованию хромосом костистых рыб, черепах, амфибий, автор принимал участие в приготовлении хромосомспецифичных библиотек ДНК, в анализе результатов и подготовке публикаций.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 472 ссылки. Работа изложена на 263 страницах машинописного текста и содержит 37 иллюстраций, 4 таблицы и 6 приложений.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Эволюция половых хромосом плацентарных млекопитающих.

Утрата Y-хромосомы и транслокации гоносом на аутосомы.

К плацентарным относится большинство детально изученных позвоночных, включая человека, и именно представители этого таксона лидируют в проектах по секвенированию полных геномов. В ходе многолетних исследований сначала методами дифференциальной окраски, потом с применением методов сортировки хромосом и сравнительного пэйнтинга нами и нашими коллегами были выяснены подробности эволюции кариотипов плацентарных [Ferguson-Smith, Trifonov, 2007; Graphodatsky, Trifonov, Stanyon, 2011]. В частности, мы отметили резкое увеличение темпов хромосомной эволюции плацентарных сразу после их дивергенции от сумчатых [Ferguson-Smith, Trifonov, 2007]. Не удивительно, что эухроматиновые сегменты X-хромосомы оказались самыми консервативными элементами кариотипа, мало вовлеченными как в межхромосомные так и во внутривхромосомные перестройки. Помимо обычных для всех структурных перестроек проблем с мейозом, у плацентарных возникают проблемы, связанные с инактивацией одной из X-хромосом у самок. Любой транслоцированный материал аутосом будет также подвергаться инактивации, что может иметь негативные эффекты. Кроме того, инактивированная X-хромосома реплицируется в более позднее время, что создает дополнительные проблемы для любого материала аутосом, который должен реплицироваться раньше. Таким образом, должны создаваться дополнительные механизмы, препятствующие распространению инактивации на перенесенный аутосомный фрагмент. Тем не менее, даже у плацентарных в редких случаях описаны

транслокации аутосом на X-хромосому у грызунов, парнокопытных, рукокрылых и насекомых. Интересно, что во всех случаях это события происходят в терминальных частях филогенетического древа, что свидетельствует о редкой выживаемости видов с подобными мутациями.

Случаи транслокаций аутосом на Y-хромосому млекопитающих также редки и включают системы, описанные у лесных антилоп *Tragelaphus*, у нескольких родственных видов мангустов, у нескольких видов приматов, у мышевидных грызунов, рукокрылых и ленивцев.

Используя хромосомспецифичные пробы, полученные путем сортировки хромосом и микродиссекции, мы изучили системы половых хромосом у плацентарных млекопитающих с необычными половыми хромосомами: у копытного лемминга *Dicrostonyx torquatus* (транслокация X на аутосому и предполагаемая транслокация Y на другую аутосому, возможная роль в возникновении добавочных хромосом), у китайской полевки *Lasiopodomys mandarinus* (транслокации аутосом на половые хромосомы), у желтогорлой мыши *Apodemus flavicollis* (возможная роль в происхождении добавочных хромосом) и у семи видов бурозубок (транслокация двух аутосом на X-хромосому у предка группы нескольких видов бурозубок).

Необычная система половых хромосом и возможное происхождение из них добавочных хромосом у копытного лемминга (*Dicrostonyx torquatus*). Мы провели хромосомный сортировку культуры фибробластов самца копытного лемминга ($2n=45$, плюс 9-13 добавочных, или В-хромосом) и получили 29 пиков, содержащих ДНК как отдельных хромосом, так и их смесей (рис. 1). Все полученные библиотеки мы поместили и гибридизовали на хромосомы лемминга для характеристики их состава. В-хромосомы попали в восемь разных пиков (иногда в смеси с аутосомами), что свидетельствует о значительной гетерогенности этих элементов по размеру и ГЦ-составу.

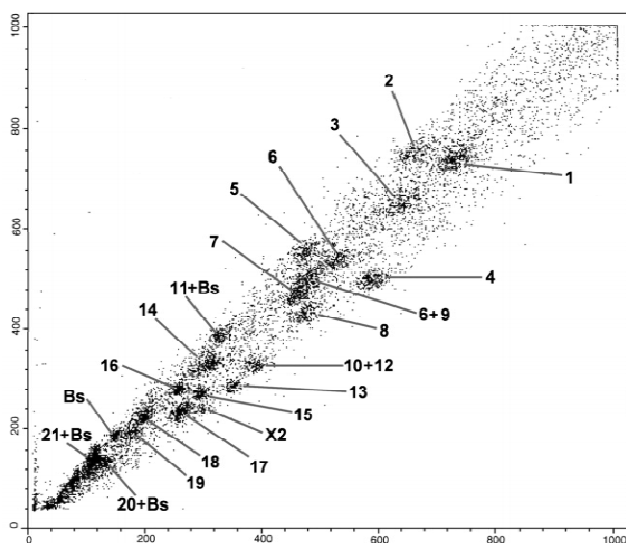


Рис. 1. Неполный проточный кариотип самца копытного лемминга. Пики хромосом X1 и Y находятся вне изображенной области. Цифры и буквы на кариотипе указывают на состав пиков, определенный методом обратного пайнтинга. По оси X — интенсивность флуоресценции хромомицина, по оси Y — хёхста 33258.

Результаты пэйнтинга показали, что половые хромосомы оказались вовлеченными в транслокации с аутосомами. Так, произошла транслокация одной крупной аутосомы (содержащей участки гомологии хромосом 6 и 12 пашенной полевки) на X-хромосому (с образованием крупнейшего метацентрика X1) и, вероятно, той же аутосомы на Y-хромосому, причем на эту Y-хромосому дополнительно транслоцировалась мелкая аутосома (гомологичная хромосоме 18 пашенной полевки) и сформировалась система (X1YX2 – рис. 2).

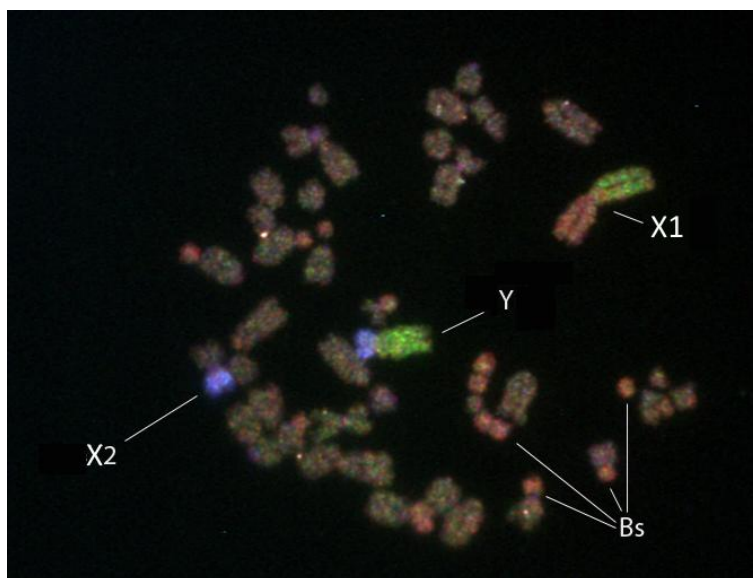


Рис. 2. FISH пэйнтинг проб хромосом “X1” (красный), “Y” (зеленый) и “X2” (синий) копытного лемминга на хромосомы самца того же вида. Хромосома X1 также метится библиотекой “Y” в q-плече. Хромосома Y также метится библиотекой “X2” в p-плече.

При описании транслокаций аутосом на половые хромосомы исследователи часто игнорируют тот факт, что при транслокации на псевдоаутосомный участок половых хромосом перенесенный район может легко фиксироваться сразу на обе половые хромосомы, ведь частота рекомбинации псевдоаутосомного района намного выше, чем других геномных районов [Hinch et al., 2014]. В эволюции плацентарных млекопитающих крайне важную роль сыграло событие переноса района, гомологичного Xp человека на обе половые хромосомы предка. Данный участок подвергся сильному вырождению на Y-хромосоме [Raudsepp, Chowdhary, 2015] и сформировал современный псевдоаутосомный район 1 (PAR1) плацентарных. С тех пор в эволюции плацентарных, вероятно, произошло всего два подобных события: у лесных антилоп [Benirschke et al., 1980], а также у двух видов копытного лемминга [Berend et al., 1997; Fredga, 1983]. У копытного лемминга помимо транслокации аутосомы на обе половые хромосомы произошла дополнительная транслокация еще одной аутосомы на Y-хромосому [Fredga, 1983]. Мы уточнили происхождение транслоцированных фрагментов и не обнаружили стандартных генов Y-хромосомы в библиотеке Y (неопубликованные данные). Причем оказалось, что у близкородственного вида – *D. groenlandicus* происходит транслокация совсем другого элемента на X-хромосому [Berend et al., 1997]. Наши данные, однако, не исключают, что Y-хромосома могла утратиться полностью, и что геном-триггером стал альтернативный ген, а не *SRY*. Эта гипотеза подтверждается данными Гилевой с Чеботарь, где было показано наличие как XX- так и XO-самок у этого вида и предположено, что ген-триггер пола находится на X-хромосоме [Gileva, Chebotar,

1979]. Однако наличие множества добавочных хромосом может маскировать присутствие настоящей Y-хромосомы.

В-хромосомы лемминга всегда привлекали большое внимание и из-за их большого числа [Chernyavsky, Kozlovsky, 1980] и благодаря гипотезам об их связи с половыми хромосомами. Так, у северного копытного лемминга (*Dicrostonyx groenlandicus*) была показана ассоциация между добавочными хромосомами и Y-хромосомой в мейозе и было предположено происхождение добавочных элементов от Y-хромосомы [Berend et al., 2001]. Для изучения добавочных хромосом копытного лемминга мы сделали кДНК библиотеку из культуры клеток самца и провели обогащение этой библиотеки с целью увеличения доли фрагментов, гомологичных добавочным хромосомам лемминга по описанному нами протоколу [Trifonov et al., 2013]. В результате секвенирования пятнадцати отобранных клонов этой библиотеки мы выявили несколько клонов, гомологичных гену *Ofd1*. Интересно, что данный ген не только расположен на X-хромосоме плацентарных и сумчатых, но и обнаружен в виде псевдогенов на Y-хромосомах мыши, крысы, лошади и человека, а у кошки этот ген экспрессируется на Y-хромосоме [Parks Wilkerson et al., 2008].

Полиморфизм по транслокациям аутосомных фрагментов на X-хромосомы китайской полевки (*Lasiopodomys mandarinus*). Китайские полевки, также как и лемминги, принадлежат к подсемейству мышевидных грызунов Arvicolinae. У этого вида была обнаружена вариация по числу хромосом, причем полиморфизм включал транслокации аутосом на X-хромосому, а система определения пола характеризовалась вариантами XX, XY и X0 [Zhu et al., 2006]. Мы применили сравнительный пэйнтинг с пробами пашенной полевки и копытного лемминга для выявления хромосом, подвергшихся перестройкам, и выявили участки генома, транслоцированные на X-хромосому у данного вида.

Одна из изученных особей оказалась полиморфной по структуре X-хромосом, причем если первая X-хромосома (нео-X1) состояла из стандартной X-хромосомы (p-плечо) и транслоцированной аутосомы (q-плечо, гомологичное хромосоме 12 копытного лемминга), то вторая X-хромосома (нео-X2) помимо этих двух сегментов содержала еще одну транслоцированную аутосому и отличалась расположением центромеры в области, гомологичной хромосоме 12 копытного лемминга (Рис. 3). Соответственно, третьим элементом такой системы (нео-X3) была аутосома, гомологичная дистальной части q-плеча нео-X2. Высокий полиморфизм по транслокациям между X-хромосомой и аутосомами у этого вида скорее всего связан с утратой функциональных Y-хромосом.

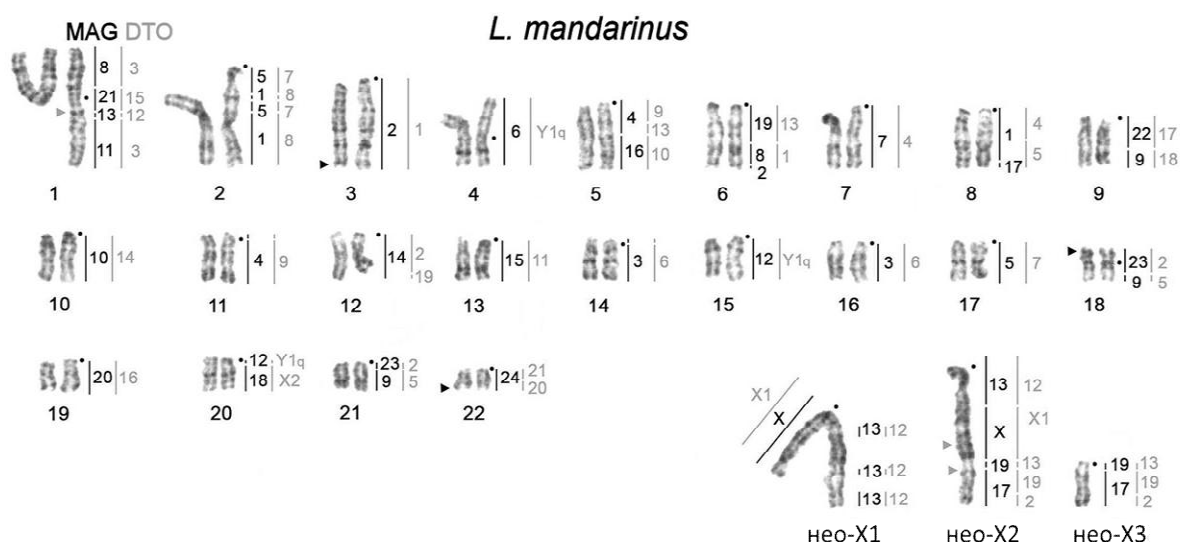


Рис. 3. Кариотип китайской полевки (*Lasiopodomys mandarinus*) с обозначенными районами гомологии хромосомам пашенной полевки (*Microtus agrestis* - MAG) и копытного лемминга (*Dicrostonyx torquatus* - DTO).

Вероятное происхождение добавочных хромосом из псевдоаутосомного района у желтогорлой мыши (*Apodemus flavicollis*). Мы исследовали два родственных вида мышей рода *Apodemus* – восточноазиатской лесной мыши (*A. peninsula*) и желтогорлой мыши (*A. flavicollis*) – с использованием микродиссекции и секвенирования добавочных хромосом. Полученные путем микродиссекции библиотеки добавочных хромосом желтогорлой мыши из Сербии при их обратной гибридизации помимо мечения самих добавочных хромосом выявили яркоокрашенные прицентромерные районы на X-хромосомах (Рис. 4).

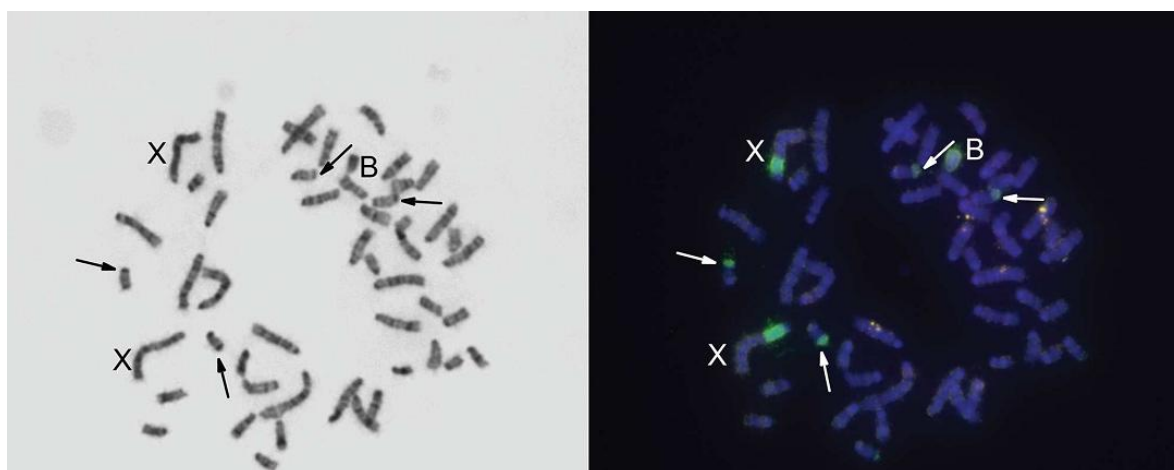


Рис. 4. FISH хромосомспецифичной библиотеки, полученной из добавочной хромосомы желтогорлой мыши (*Apodemus flavicollis*). Помимо мечения единственной добавочной хромосомы (B) выявляются яркие блоки повторенных последовательностей на перичентромерном блоке X-хромосом и в субтеломерных участках двух пар аутосом (указаны стрелками).

Полученные результаты позволили нам выдвинуть гипотезу о псевдоаутосомном происхождении добавочных хромосом у этого вида. При секвенировании библиотек добавочных хромосом желтогорлой мыши среди видоспецифичных фрагментов мы обнаружили крупный блок, содержащий ген *Kdm6*. Этот ген локализуется на X-хромосоме плацентарных млекопитающих в районе, близком к предковому псевдоаутосомному участку [Raudsepp, Chowdhary, 2015]. Таким образом, X-хромосома действительно могла участвовать в происхождении В-хромосом у желтогорлой мыши.

Транслокация аутосомы на X-хромосому у предка нескольких видов, родственных обыкновенной бурозубке (*Sorex araneus*). В большинстве случаев, описанных у плацентарных млекопитающих, транслокации аутосом на X-хромосому видоспецифичны и редко встречаются у родственных видов. Особый интерес представляют случаи, когда общая перестройка с участием X-хромосомы и аутосом была бы характерна для целой группы видов (как, например, у нескольких родов настоящих антилоп). Необычно, что при общем консерватизме половых хромосом отряда Eulipothypla, к таким случаям относится транслокация аутосомы на X-хромосому, произошедшая у предка нескольких видов бурозубок. С помощью сравнительного хромосомного пэйнтинга семи видов бурозубок мы обнаружили, что робертсоновская транслокация на X-хромосому произошла у предка 6 видов землероек из группы *Sorex araneus* около 3 млн. лет назад.

Заключение по главе 1. Таким образом, несмотря на относительно высокий консерватизм X-хромосом плацентарных млекопитающих в некоторых группах этот элемент кариотипа вовлекается в транслокации с другими хромосомами, причем транслокация на псевдоаутосомный район происходит крайне редко. Особенно наглядно эти ситуации показывают эксперименты с хромосомным пэйнтингом. Такие виды, как копытный лемминг и китайская полевка, помимо транслокаций полых хромосом с аутосомами, скорее всего, претерпели смену гена-триггера пола. Роль X-хромосом в формировании добавочных элементов обсуждается у нескольких видов грызунов (два таких вида – копытный лемминг и желтогорлая мышь описаны в данной работе), это может быть связано как с высокой рекомбинационной частотой на определенных участках половых хромосом, так и с общей толерантностью геномов к наличию лишних фрагментов X-хромосомы благодаря дозовой компенсации.

Глава 2. Сравнение систем половых хромосом однопроходных

Однопроходные занимают базальное положение на филогенетическом древе млекопитающих и обладают рядом необычных морфологических и геномных черт. Особенно необычно наличие системы множественных половых хромосом у всех современных видов однопроходных. Основными целями нашей работы с однопроходными были локализация генов, связанных с каскадом определения пола, а также анализ состава и происхождение половых хромосом у представителей двух

современных семейств – утконоса (*Ornithorhynchus anatinus*) и ехидны (*Tachyglossus aculeatus*) с помощью сравнительного хромосомного пэйнтинга.

В процессе картирования генома утконоса с помощью ВАС-клонов мы показали аутосомную локализацию восьми генов из консервативного каскада определения пола: *WT1*, *SF1*, *LHX1*, *LHX9*, *FGF9*, *WNT4* и *RSPO1*. Хотя мы и выявили, что ген *GATA4* локализовался на хромосомах Y1 и X2, но точное место локализации оказалось в районе спаривания этих элементов в мейозе, что исключало его гемизиготное состояние у самцов. Для дальнейшего исследования гоносом утконоса мы получили Y5-специфичную библиотеку методом микродиссекции, поскольку из-за малого размера этот элемент невозможно было выделить путем проточного сортирования, а библиотеки ДНК большинства аутосом и половых хромосом были получены именно методом сортирования. Для каждой хромосомы утконоса были получены хромосомспецифичные ВАС-клоны и локализованы уникальные гены, что позволило использовать эти данные для последующей сборки полного генома [Warren et al., 2008].

Для исследования системы половых хромосом ехидны мы применили пэйнтинг пробы утконоса, а также дополнительно получили набор сортированных хромосом ехидны. Сравнительный хромосомный пэйнтинг между этими видами однопроходных показал, что, несмотря на некоторое сходство в строении системы половых хромосом, имеются и специфические характеристики каждой системы. Так, у ехидны и утконоса большинство элементов цепи половых хромосом гомологичны, у ехидны имеется два дополнительных звена цепи, а у утконоса – три. Кроме того, порядок некоторых половых хромосом в пределах цепи оказался измененным. Районы, гомологичные Z-хромосоме птиц, были обнаружены на четырех половых хромосомах утконоса (X1, X2, X3, X5 и Y1).

На основании наших данных мы предположили, что процесс формирования половых хромосом однопроходных начался довольно давно, еще до расхождения утконоса и ехидны (20-50 млн. лет назад) [Phillips, Bennett, Lee, 2009], что делает эту систему множественных половых хромосом самой древней из изученных. Длительное существование такой системы могло быть возможно только благодаря возникновению особых механизмов упорядоченного мейоза у самцов. Далее, уже после расхождения линий утконоса и ехидны, происходило дополнительное усложнение системы. Интересно, что недавно путем секвенирования транскриптомов самца и самки утконоса было предположено, что ген *AMH*, кодирующий антимюллеров гормон, может быть ответственным за определение пола у однопроходных [Cortez et al., 2014]. Этот ген располагается на Y5-хромосоме однопроходных и является геном-триггером у патагонской атерины [Hattori et al., 2012] и нильской тилипии [Li et al., 2015], а по нашим данным, также располагается в псевдоаутосомной части половых хромосом серого анолиса [Kichigin et al., 2016].

Глава 3. Эволюция половых хромосом чешуйчатых

Чешуйчатые (Squamata) обладают самым высоким разнообразием систем определения пола среди завропсид. За исключением широкого исследования на большой группе рептилий консерватизма района, гомологичного Z-хромосоме птиц, в данной части работы мы в основном сосредоточились на представителях трех групп чешуйчатых – сцинковых (семейство со скрытыми половыми хромосомами), игуанообразных (крупная клада с консервативными половыми хромосомами) и гекконообразных (группа с высокой пластичностью систем определения пола). Мы применили молекулярно-цитогенетические методы, включающие сортинг и микродиссекцию хромосом, а также сравнительный пэйнтинг с помощью полученных проб и последующее секвенирование хромосомспецифичных библиотек для изучения особенностей эволюции систем определения пола в этих группах чешуйчатых.

Исследование консервативности группы сцепления, гомологичной Z-хромосоме птиц, у завропсид. Группа сцепления, гомологичная Z-хромосоме птиц, представляет особый интерес, поскольку она независимо становилась половой хромосомой у некоторых представителей чешуйчатых [Kawai et al., 2008], рыб [Chen et al., 2014] и млекопитающих (половые хромосомы утконоса и ехидны). Кроме того, копии гена *DMRT1*, принадлежащего этой же группе сцепления, являются основными триггерами пола у двух видов медак [Matsuda et al., 2002; Nanda et al., 2002] и у гладкой шпорцевой лягушки [Yoshimoto et al., 2008]. В связи с интересом к этой группе сцепления мы провели сравнительный пэйнтинг с использованием пэйнтинг пробы Z-хромосомы курицы на хромосомах 28 видов рептилий из 17 семейств чешуйчатых, крокодилов и черепах. В результате на семи видах с описанными половыми хромосомами проба Z пометила аутосомы. У видов с неописанными половыми хромосомами проба Z курицы также чаще всего метила короткое плечо хромосомы 2. На основании этих данных мы предположили, что вряд ли система с хромосомой, гомологичной Z птиц, могла быть предковой для амниот.

Скрытые половые хромосомы сцинковых. Сцинки – довольно крупное и широко распространенное семейство ящериц, включающее выше тысячи видов, кариотипировано из которых меньше 8%. Половые хромосомы надежно идентифицировать не удавалось. Мы провели сортировку хромосом и получили хромосомспецифичные библиотеки обыкновенного сцинка (*Scincus scincus*). На проточном кариотипе мы идентифицировали 9 пиков, три из которых содержали смеси хромосом близких размеров. Содержание библиотек исследовали с помощью обратного пэйнтинга. Мы также провели гибридизацию полученных зондов на пять других видов сцинков и обнаружили высокий консерватизм групп сцепления. Мы не выявили полиморфизма хромосом, связанного с полом.

Исследование хромосомной эволюции гекконообразных. Происхождение триплоидного генома партеногенетического вида чешуйчатых. Крупнейший инфраотряд чешуйчатых – гекконообразные – известен своим древним

происхождением (около 200 млн. лет назад) и включает семь современных семейств ящериц. Несмотря на большой интерес к этому таксону с точки зрения разнообразия систем определения пола, до сих пор кариотипировано менее 10% представителей гекконообразных. Среди некоторых гекконовых обнаружен настоящий партеногенез, когда ооциты созревают без слияния со сперматозоидами. Пенангский чешуепалый геккон (*Lepidodactylus lugubris*) издавна был моделью для изучения партеногенеза и эволюции механизмов определения пола у позвоночных. Это самый широко распространенный вид-партеногенетик с ареалом, включающим тропические области Азии, Австралии, Океании и Центральной Америки, причем разные популяции могут быть как диплоидными так и триплоидными. Хотя чаще всего партеногенетические популяции чешуйчатых состоят исключительно из самок, иногда в таких популяциях спонтанно рождаются самцы, однако, они оказываются стерильными [Roell, During von, 2008].

Мы использовали метод реципрокного хромосомного пэйнтинга для выявления сегментов гомологичных хромосом и реконструкции эволюции кариотипа в восьми видах семейства гекконовых (*Gekko gecko*, *G. japonicus*, *G. ulikovskii*, *G. vittatus*, *Hemidactylus frenatus*, *H. platyurus*, *H. turcicus* и *Lepidodactylus lugubris*). В качестве зонда были использованы библиотеки, полученные путем хромосомного сортирования *G. japonicus* (GJA), *H. platyurus* (HPL) и *H. turcicus* (HTU) (рис. 5). Интересно, что ни у одного из изученных видов не были описаны половые хромосомы, хотя предполагалось генетическое определение пола.

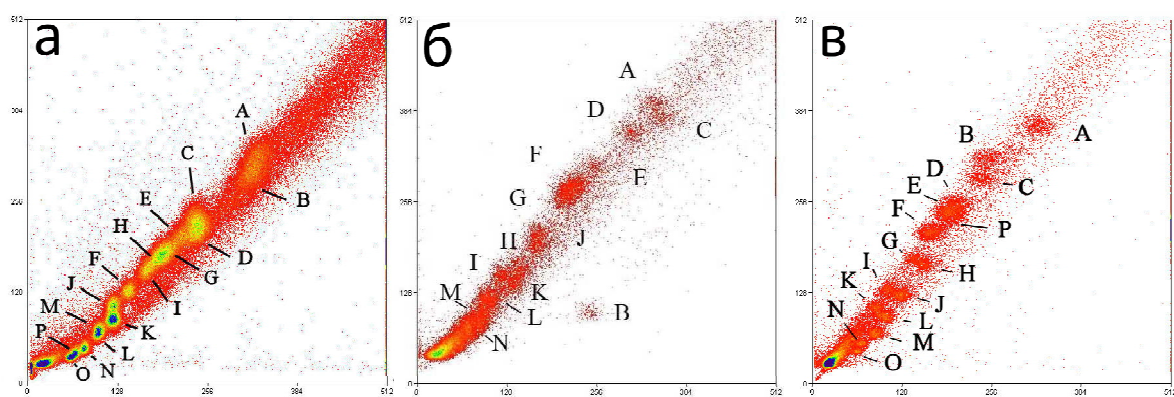


Рис. 5. Проточные кариотипы японского геккона (*Gekko japonicus*) (а), плоскохвостого домового геккона (*Hemidactylus platyurus*) (б) и турецкого полупалого геккона (*H. turcicus*) (в) с пиками, обозначенными латинскими буквами.

Мы выявили гетероморфизм, связанный с полом, хромосомы 19 самки плоскохвостого домового геккона *H. platyurus*, обусловлен наличием крупного блока гетерохроматина в дистальной части q-плеча у одного из гомологов. Этот гомолог сортировали в отдельный пик (пик В, рис. 5б), причем его позиция указывает на ГЦ-обогащенность и более крупный размер (второй гомолог обнаружился в пике М). Для того, чтобы подтвердить, что данный блок не является рибосомным кластером, мы

провели Ag-окрашивание и FISH с зондом 18S ДНК человека. Оба метода указали на наличие сигналов в р-плече хромосомы 2 (рис. 6). Для проверки на пол-специфичность данной хромосомы мы исследовали еще двух самцов и пять самок данного вида. На основании наших данных мы предположили, что у плоскохвостого геккона может быть система половых хромосом ZZ/ZW. Мы провели предварительное секвенирование библиотеки HPLB, содержащей вариант HPL19 с блоком гетерохроматина, и обнаружили гомологию хромосоме *Anolis carolinensis* 9. Интересно, что гомолог ACA9 транслоцировался на половые хромосомы *Norops sagrei* и содержит ген *RSPOL1*, что может представлять независимое вовлечение одних и тех же районов генома в формирование половых хромосом в разных группах позвоночных.

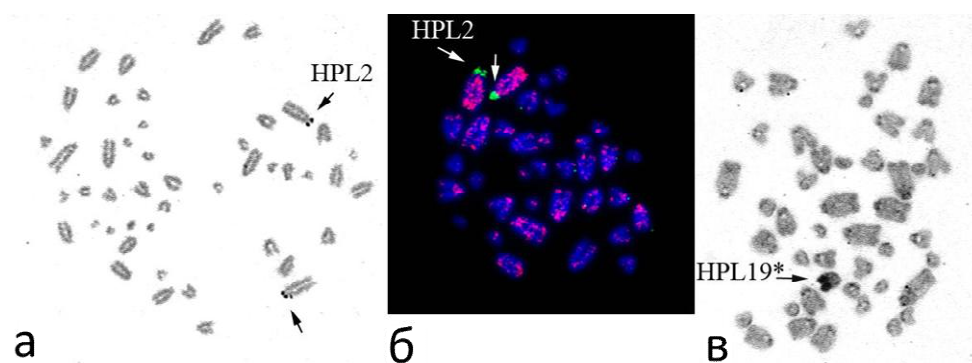


Рис. 6. ЯОР-окраска (а), локализация рибосомного кластера (б) и С-окраска (в) хромосом плоскохвостого домового геккона *Hemidactylus platyurus*. Стрелка указывает на гетерохроматиновый блок на одном из гомологов хромосомы 19 (HPL19*).

Для реконструкции кариотипической эволюции в семействе гекконовых мы провели сравнительный хромосомный пэйнтинг в пределах восьми исследованных видов гекконовых и выявили характерные перестройки для каждой линии (рис. 7). Интересно, что кариотип чешуепалого геккона (LLU) оказался очень похожим на кариотип плоскохвостого геккона (HPL). В соответствии с молекулярными филогениями, *Lepidodactylus* и *Gekko* формируют одну кладу относительно рода *Hemidactylus* [Gamble et al., 2008]. Удивительно, но, с одной стороны, мы наблюдали схожие кариотипы у LLU и HPL, а с другой стороны, имеются две общие перестройки в роде *Gekko* с *H. frenatus*. Это пример гомоплазий, наблюдаемых нами ранее и в других линиях гекконообразных. Эти гомоплазии обусловлены независимыми разрывами хромосом, гомологичных GJA1, 2 и 5.

Окраска на активные ядрышковые организаторы (Ag-окраска) и FISH с рибосомной ДНК выявили три основных блока на хромосомах разных особей *L. lugubris*. Два больших блока были локализованы в коротких плечах двух мелких акроцентрических хромосом (LLU15 и LLU18) и мелкий сигнал обнаружен в субтеломерном районе хромосомы среднего размера LLU8. Стабильность локализации ЯОР на определенных гомологах свидетельствует об отсутствии

рекомбинации между гомологами в пределах генома однажды сформированного триплоидного клона. Возможно, *Lepidodactylus* развил систему премейотического удвоения генома, которая сопровождается спариванием и рекомбинацией сестринских хроматид для поддержания гетерозиготности, как это случилось у хлыстохвостых ящериц рода *Aspidoscelis* [Lutes et al., 2010]. Этот механизм очень отличается от автомиктического партеногенеза, основанного на слиянии яйцеклетки и полярного тельца и сопровождающегося уменьшением гетерозиготности.

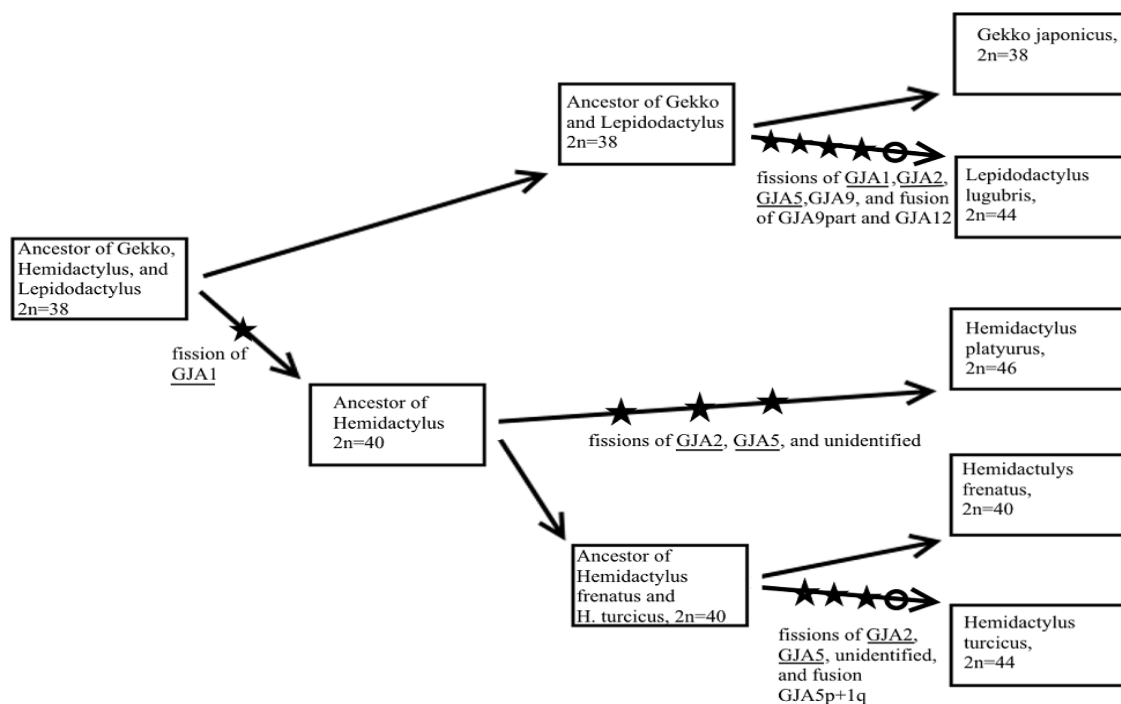


Рис. 7. Сценарий хромосомной эволюции группы *Gekko-Lepidodactylus-Hemidactylus*. Звездочки указывают на хромосомные разрывы, а кружки - на хромосомные слияния. Подчеркнуты горячие районы, подвергшиеся перестройкам в разных линиях.

Сравнительный пэйнтинг анолисовых. Согласно новейшим данным по молекулярной филогении род *Anolis* составляет целое семейство Dactyloidae [Townsend et al., 1990] и включает 400 видов, что делает его крупнейшим родом позвоночных. В настоящее время статус рода пересмотрен и разделен на восемь родов: *Anolis*, *Audantia*, *Chamaelinorops*, *Ctenonotus*, *Dactyloa*, *Deiropyx*, *Norops* и *Xiphosurus* [Nicholson et al., 2012]. Мы будем относить виды с предковым кариотипом ($2n = 36$) к роду *Anolis* (*Anolis allisoni*, *A. bartschi*, *A. carolinensis*, *A. cybotes*, *A. equestris*), тогда как *A. sagrei* и *A. valencienni* будем относить к роду *Norops*, а *A. pogus* и *A. sabanus* – к роду *Ctenonotus*. Данные по кариотипированию свидетельствуют об интенсивной эволюции в пределах семейства с диплоидными наборами, содержащими от 26 до 44 хромосом [Giovannotti et al., 2017]. Также описана значительная вариабельность по степени гетероморфизма половых хромосом: из около ста кариотипированных видов у 33 описаны гетероморфные половые

хромосомы [Gamble, 2010; Olmo, 2008]. Половые хромосомы всех анолисов возникли от одной предковой пары микрохромосом, но позже могли подвергаться дополнительным слияниям с аутосомами [Gamble et al., 2014]. Секвенирование генома зеленого анолиса (*A. carolinensis*) обнаружило некоторые интересные черты генома чешуйчатых, включающие большое разнообразие семейств активных рассеянных повторов, сходство ГЦ-состава микро- и макрохромосом (в отличие от птиц) и высокую консервативность синтении между птицами и чешуйчатыми [Alföldi et al., 2011]. Часть генома анолиса была собрана до хромосом (сюда вошли все макрохромосомы и крупные куски нескольких микрохромосом, включая X-хромосому). Около 1.78 млрд п.н. генома осталось в виде скаффолдов, никак не привязанных к хромосомам. Половая хромосома *A. carolinensis* оказалась гомологичной микрохромосоме курицы GGA15 (как и микрохромосома Z дальневосточной черепахи [Kawagoshi et al., 2009]). Несмотря на полученные данные, состав Y-хромосомы каролинского анолиса, так же как и состав большинства других микрохромосом оставались неисследованными.

Мы изучили происхождение сложных систем половых хромосом у анолисов с помощью сравнительного пэйнтинга пробамми, полученными из *A. carolinensis* (ACA), *C. pogus* (CPO) и *N. sagrei* (NSA). После кариотипирования видов *C. pogus*, *N. sagrei* и *N. valencienni* (NVA) мы обнаружили некоторые несоответствия с ранее опубликованными данными. У *C. pogus* мы обнаружили систему X_1X_2Y , что очень похоже на данные по родственному виду - *N. watsi* [Gorman, Atkins, 1969]. У *N. sagrei* (система $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, $2n=30$, 29 по [Gamble et al., 2014]) мы обнаружили гетероморфизм хромосомы 7 у самцов, однако диплоидное число было 28 у обоих полов. Похожую систему половых хромосом мы обнаружили у *N. valencienni* ($2n=30$). Таким образом, мы выявили гетероморфные половые хромосомы у четырех видов (*C. pogus*, *C. sabanus*, *N. sagrei* и *N. valencienni*), тогда как у пяти других изученных видов (*A. allisoni*, *A. bartschi*, *A. carolinensis*, *A. cybotes* и *A. equestris*) полиморфизм при рутинном цитогенетическом анализе не был обнаружен. Проточные кариотипы *A. carolinensis*, *C. pogus* и *N. sagrei* приведены на рис. 8.

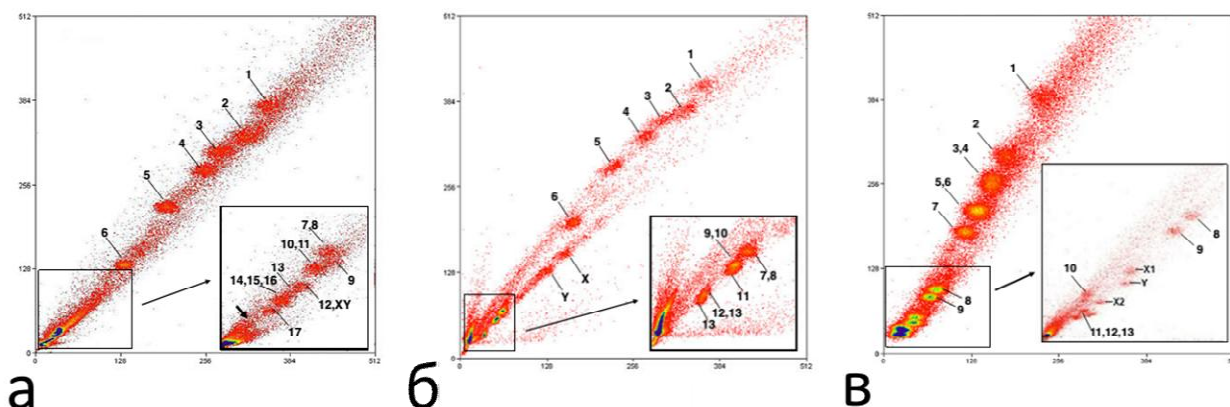


Рис. 8. Проточные кариотипы *Anolis carolinensis* (а), *Norops sagrei* (б) и *Ctenonotus pogus* (в). Области с микрохромосомами увеличены и вынесены в прямоугольные вставки. Толстая стрелка указывает на пик, содержащий добавочный элемент кариотипа.

Сравнительный пэинтинг проба подтвердил гомологию половых хромосом *A. allisoni*, *A. bartschi*, *A. equestris* и *A. cybotes*. У *N. sagrei* ($2n = 28$) проба ACA12,X,Y окрасила Xq, тогда как ACA9 окрасила Xp. ACA12,X,Y и ACA9 также окрасили Y-хромосому, но менее интенсивно, чем X, причем ACA12,X,Y окрасила дистальную часть короткого плеча Y-хромосомы, а ACA9 - дистальную часть длинного плеча, остальная часть хромосомы занята гетерохроматином. У *C. pogus* и *C. sabanus* библиотека ACA12,X,Y окрасила небольшую часть q-плеча хромосомы X1, тогда как остальная часть была окрашена пробой ACA10,11 (этот зонд также окрасил p-плечо CPO8(CSA8)). ACA12,X,Y также окрасила X2 и терминальные области обоих плечей Y-хромосомы. На *N. valencienni* ($2n = 30$) результаты такие же, как на *N. sagrei*.

Пэинтинг проба NSAX окрасила пять микрохромосом самца и шесть микрохромосом самки *A. allisoni*, *A. bartschi*, *A. carolinensis*, *A. cybotes* и *A. equestris*. Мы можем заключить, что X-хромосома NSA гомологична трем парам микрохромосом у этих видов, причем Y-хромосома не пометилась из-за вырождения последовательностей. У *N. valencienni* ($2n = 30$) обе половые хромосомы окрасились полностью, подтверждая родство с *N. sagrei*. Проба *C. pogus* CPOX1 пометила хромосому CSAX1, подтвердив полную гомологию этих элементов, а CPOX2 пометила CSAX2.

Секвенирование всех микрохромосом и макрохромосомы 6 *A. carolinensis* и *N. sagrei*. Для дальнейшего анализа половых хромосом мы провели секвенирование всех библиотек микрохромосом *A. carolinensis* и *N. sagrei*, в том числе библиотеки, содержащие половые хромосомы. В качестве контроля метода мы также секвенировали самые мелкие макрохромосомы – ACA6 и NSA6. Всего 16 библиотек были подвергнуты баркодированию и секвенированы за несколько запусков прибора. Набор прочтений обрабатывали в программе DOPSeq_analyzer, разработанной в лаборатории.

Для *A. carolinensis* было выявлено 15 групп гомологии с курицей и они были приписаны 12 микрохромосомам. Те же самые группы гомологии были выявлены и на микрохромосомах *N. sargei*, но они по-другому были распределены по хромосомам из-за видоспецифичных слияний элементов кариотипа. Таким образом мы подтвердили данные пэинтинга и показали наличие четырех слияний среди микрохромосом *N. sargei*. Данные по секвенированию микродиссекционной и сортированной библиотек Y-хромосомы *N. sargei* дали похожие результаты, что свидетельствует о том, что одной копии микродиссекционной хромосомы достаточно для описания состава мелких элементов генома.

На 12 микрохромосомах *A. carolinensis* были картированы скаффолды и анонимные группы сцепления из геномного проекта AnoCar2.0. Скаффолд LGb, определенный как часть X-хромосомы в проекте по геномному секвенированию, был представлен в пике, содержащем 12 и 13 по размеру хромосомы анолиса. На

основании анализа контаминации соседних пиков мы заключили, что именно хромосома 13 *A. carolinensis* является половой.

Сравнительный пэинтинг между NSA и ACA показал, что NSAX и NSAY подверглись слиянию, по крайней мере, с двумя другими микрохромосомами (ACA12 и ACA9). Секвенирование библиотек позволило идентифицировать третью хромосому, транслоцировавшуюся на X – ACA18. Поскольку пэинтинг показал, что р-плечо NSAX гомологично ACA(X+12), а NSAXq=ACA9, то точное расположение сегмента ACA18 на нео-X хромосоме пока остается неясным. Интересно, что хотя сегменты ACA9 и ACA12 обнаруживаются как в экспериментах по пэинтингу, так и при анализе секвенированных библиотек, сегмент ACA18 на Y-хромосоме обнаружен не был, возможно, из-за сильного вырождения.

Степень вырождения последовательностей на NSAY мы оценили путем сравнения скаффолдов с NSAX. Оказалось, что степень вырождения (потери идентифицируемых скаффолдов) оказалась близка к 25%. Для выявления скаффолдов, специфичных для псевдоаутосомного района, мы провели анализ вариации последовательностей с помощью пакета программ The Genome Analysis Toolkit [McKenna et al., 2010]. Оказалось, что идентичность скаффолдов, представленных на ACA9+ACA12, на обоих половых хромосомах NSA достигает 99%. Это говорит о том, что данная часть половых хромосом является псевдоаутосомной, т.е. подвергается рекомбинации, и расположены эти псевдоаутосомные районы на обоих плечах половых хромосом.

Поиск генов, вовлеченных в каскад определения пола, на половых хромосомах *A. carolinensis* и *N. sagrei*. Поскольку гены, вовлеченные в каскад определения пола, консервативны у позвоночных, поиск гомологов таких генов может быть полезным для идентификации гена-триггера пола. Для поиска этих генов мы воспользовались данными из RefSeq/UCSC в AnoCar2.0 и собственными данными по гомологии с хромосомами курицы. Все выбранные нами 29 генов оказались расположены на аутосомах *A. carolinensis* и, таким образом, мы не нашли генов-кандидатов. Однако у *N. sagrei* мы обнаружили гены *RSP01*, *NR0B1* и *SOX8* в той части половых хромосом, которая была перенесена путем транслокации.

Сценарий эволюции половых хромосом в роде *Anolis*. Традиционно кариотип с 36 хромосомами считается предковым для игуановых [Gamble et al., 2014]. Всего у анолисовых описано три типа систем половых хромосом в семействе – пара цитогенетически неразличимых микрохромосом [Alföldi et al., 2011], XY- система (как у *Norops*) и система множественных половых хромосом (как у *Ctenonotus*). Предковая система хромосом сохранилась в роде *Anolis*, тогда как в родах *Ctenonotus* и *Norops* произошла редукция числа микрохромосом за счет их слияния. Согласно нашему сценарию, у самцов предка *Ctenonotus* и *Norops* произошло слияние Y-хромосомы и гомолога ACA12, что привело к формированию нео-Y и возникновению системы X1X2Y (где X1= NSAX и X2= ACA12). Далее в линии *Ctenonotus* хромосома

ACA10 (или ACA11) слилась с X1 и Y, с формированием системы X_1X_2Y . В линии *Norops* X1 слилась с X2. Как на X, так и на Y хромосомы дополнительно транслоцировалась хромосома ACA9. Район на Y-хромосоме подвергся вырождению и накопил гетерохроматин. Формирование системы половых хромосом *Norops*, скорее всего, случилось до радиации видов этого рода, то есть не позже 60 млн. лет назад [Nicholson et al., 2012]. Отсутствие генов консервативного каскада определения пола на половых хромосомах анолисов может свидетельствовать о том, что либо паралог одного из известных генов подвергся сильной дивергенции, либо совсем новый ген взял на себя функцию триггера, как это было описано у рыб [Kikuchi, Hamaguchi, 2013]. Консервативность X-хромосом у игуановых указывает и на вероятную консервативность триггера пола, в связи с чем нужно продолжить поиск в регионе предковой X-хромосомы и на Y-хромосомах. Особый интерес представляет то, что район, гомологичный ACA9 и несущий ген *RSPO1*, независимо принял участие в формировании половых хромосом в роде *Norops* (наши данные), у плоскохвостого геккона, у удава (*Boa imperator*) [Gamble et al., 2017] и у лягушки *Xenopus tropicalis* [Roco et al., 2015]. Возможно, данный случай представляет собой пример неслучайного попадания определенных районов на половые хромосомы именно ввиду наличия на них генов из каскада определения пола.

Глава 4. Эволюция кариотипов и определение пола у черепахах (Testudines)

Хотя по сравнению с другими амниотами черепахи обладают довольно консервативными кариотипами, обнаруженные масштабные геномные перестройки часто сопровождаются эволюционными изменениями в системах определения пола.

Мы провели молекулярно-цитогенетический анализ 13 видов черепах (включая G- и C- бэндинг, FISH с зондом 18S рПНК и теломерным зондом) с разным числом хромосом и системами половых хромосом. Мы дополнили нашу работу сравнительным исследованием систем половых хромосом черепах из разных групп с имеющимися геномными данными.

Из 335 видов черепах у 87 механизмы определения пола были охарактеризованы как с помощью экспериментов с инкубацией яиц при разных температурах, так и с помощью цитогенетического анализа. Филогенетический анализ убедительно доказывает, что определение пола, связанное с температурой инкубации, является предковым вариантом, большинство же эволюционных преобразований было связано с переключением систем определения пола на генетические. Скорей всего, произошло два события реверсии к температурному определению пола из генетических [Valenzuela, Adams, 2011].

Из 18 видов с генетическим определением пола у 10 были обнаружены цитогенетически различимые половые хромосомы. Три вида бокошейных и четыре вида скрытошейных черепах характеризуются системой XX/XY, у трех видов скрытошейных черепах описана система ZZ/ZW. Среди 10 видов с половыми

хромосомами у трех видов половыми хромосомами являются микрохромосомы и у семи - макрохромосомы. Крайне мало известно о молекулярном составе хромосом черепах, хотя эта информация постепенно накапливается [Kawagoshi et al., 2014b; Montiel et al., 2017]. Молекулярно-цитогенетические данные по сравнительной геномной гибридизации позволили выявить пол-специфичные гоносомы у некоторых черепах [Badenhorst et al., 2013; Ezaz et al., 2006; Kawai et al., 2007; Martinez et al., 2009], благодаря уменьшению или отсутствию рекомбинации на большей части Y-или W-хромосомы.

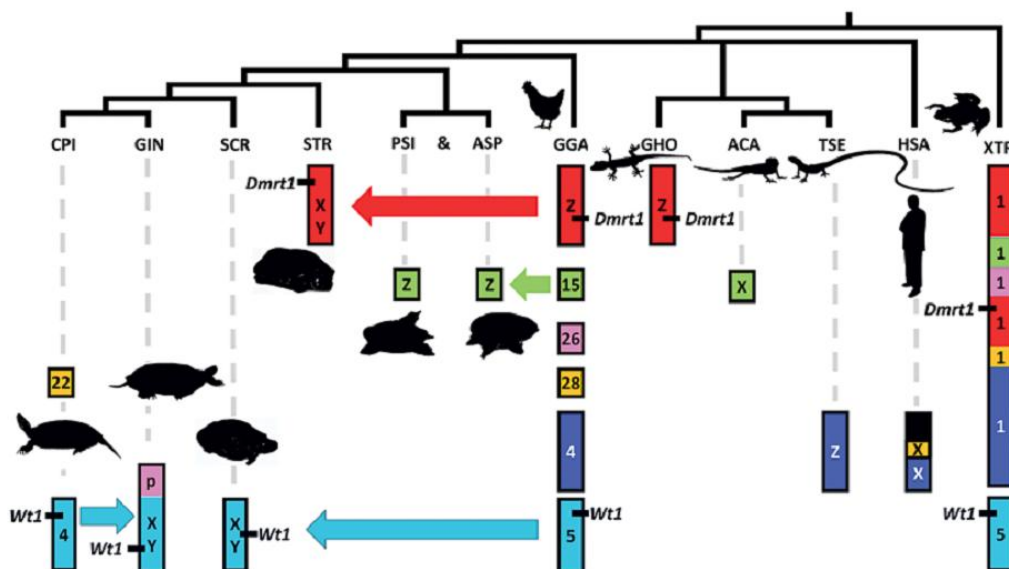


Рис. 9. Соответствие некоторых систем половых хромосом черепах, ящериц, млекопитающих и когтистой шпорцевой лягушки (*Xenopus tropicalis*, XTR). Стрелки обозначают переходы половых хромосом в аутосомы и обратно. Хромосома XTR1 построена на основе данных [Brelsford et al., 2013] и [Warren et al., 2010]. CPI = *Chrysemys picta*, GIN = *Glyptemys insculpta*, SCR = *Siebenrockiella crassicollis*, STR = *Staurotypus triporcatus*, PSI = *Pelodiscus sinensis*, ASP = *Apalone spinifera*, GGA = *Gallus gallus*, GHO = *Gekko hokouensis*, ACA = *Anolis carolinensis*, TSE = *Takydromus sexlineatus*, HSA = *Homo sapiens*, *Wtl* = ген супрессора опухоли Вилма 1, *Dmrt1* = doublesex и mab-3 связывающий транскрипционный фактор 1.

Таким образом, эти наблюдения показывают, что половые хромосомы *Staurotypus*, *Pelodiscus*, *Apalone* и *Glyptemys* (малая часть), гомологичны XTR1, в то время как половые хромосомы *Siebenrockiella* и большая часть *Glyptemys* гомологичны XTR5. Интересно, что XTR1 содержит *Dmrt1*, а XTR5 включает *Wt1*, другой важный регулятор формирования гонад и, предположительно, основной ген, участвующий в температурозависимом определении пола у расписной черепахи (*Chrysemys*) [Valenzuela, 2008]. Кроме того, эволюция системы половых хромосом черепах во всех этих случаях включала крупные инверсии, и во всех видах, кроме мягкотелых черепах, *Trionychidae* эти инверсии затрагивали либо *Dmrt1* либо *Wt1* [Kawagoshi et al., 2009; Kawagoshi et al., 2014a; Kawagoshi, Nishida, Matsuda, 2012; Montiel et al., 2016c].

Таким образом, накопленная информация свидетельствует в пользу гипотезы, что участки генома, гомологичные половым хромосомам черепах, были независимо включены в системы половых хромосом других позвоночных, и скорее всего, этот процесс был обусловлен содержанием в них определенных генов, играющих важную роль в определении пола. Кроме того, склонность этих геномных районов брать на себя роль половых хромосом и основных активаторов каскада определения пола, может иметь связь с их расположением на одной и той же группе сцепления предковых четвероногих.

Глава 5. Необычная система половых хромосом хвостатых амфибий

Большинство видов амфибий обладает недифференцированными половыми хромосомами, однако у около 50 видов были обнаружены половые хромосомы с разной степенью дифференциации и обоими типами гетерогаметности. Влияние температуры на определение пола у амфибий так и не показано, но описано много случаев лабильности систем половых хромосом. Переходы от дифференцированных систем половых хромосом к недифференцированным являются важными, но до сих пор плохо понятными эволюционными этапами, и эти процессы могут включать транслокации половых хромосом на аутосомы и транслокации между самими половыми хромосомами [Malcom, Kudra, Malone, 2014]. Два рода водных неотенных хвостатых амфибий из семейства Proteidae представляют две степени дифференциации половых хромосом: у европейского протей (*Proteus anguinus anguinus*) гетероморфных половых хромосом не выявлено, а у американских протеев рода *Necturus* половые хромосомы самые гетероморфные среди саламандр [Sessions, 1980]. Хотя размеры геномов у этих двух групп саламандр различаются почти в два раза, у них одинаковое число хромосом и ассиметричные кариотипы [Sessions, 2008].

Мы исследовали европейских протеев из трех популяций Словении с целью выявить половые хромосомы методами традиционной цитогенетики и изучили мейотические биваленты половых хромосом американского протей *Necturus maculosus*. Самцы и самки из четырех исследованных особей европейского протей имели идентичные кариотипы, причем в субтеломерном районе длинного плеча

хромосомы 1 наблюдался крупный блок гетерохроматина. Эта картина сильно отличается от американского протоя, на хромосомах которого блоки гетерохроматина локализованы в прицентромерных районах, а несколько имеют интерстициальную локализацию. У американского протоя на X-хромосоме расположен прицентромерный блок гетерохроматина, и еще один интерстициальный блок на коротком плече, тогда как Y-хромосома состоит из чередующихся светлых и темных бэндов гетерохроматина. Паттерн бэндов на хромосоме 1 европейского протоя оказался идентичным паттерну на Y-хромосоме американского (рис. 10).

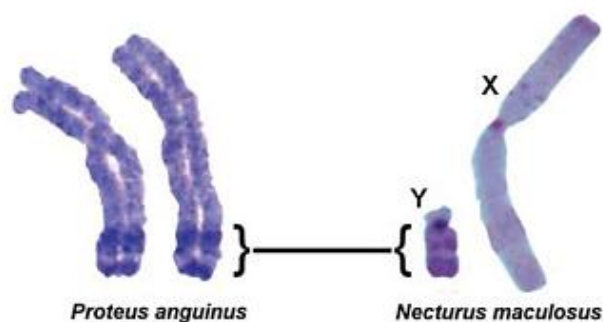


Рис. 10. С-окраска хромосомы 1 европейского протоя (*Proteus anguinus*) и половых хромосом американского протоя (*Necturus maculosus*). Паттерн чередующихся блоков гетерохроматина идентичен в дистальной части хромосомы 1 *P. anguinus* и на q-плече Y хромосомы *N. maculosus*.

Интересно, что анализ бивалентов в мейозе европейского протоя показал необычное поведение пары 1, где у плечей бивалента отсутствовали хиазмы, и происходило раннее разделение гомологов в прометафазе первого деления мейоза. У американского протоя половые хромосомы формируют характерный ассиметричный бивалент, в котором они удерживаются теломерными сайтами длинного плеча X-хромосомы и короткого плеча Y-хромосомы.

Мы предположили, что сходство паттерна блоков гетерохроматина на хромосоме 1 европейского протоя и Y-хромосоме американского протоя свидетельствуют о транслокации Y-хромосомы на аутосому или X-хромосому. Второй вариант более вероятен, поскольку половые хромосомы конъюгируют и могут не разойтись в мейозе. Раннее расхождение хромосомы 1 европейского протоя указывает на наличие нерекombинирующего района, характерного для половых хромосом.

В целом у амфибий транслокации Y-хромосомы на аутосомы описаны у 12 видов наземных лягушек [Schmid et al., 2010]. Случай с европейскими протоями интересен именно как возможный вариант перехода от дифференцированных половых хромосом к гомоморфным через транслокацию между Y- и X- хромосомами. Гипотетический сценарий включает два этапа: первый, транслокацию Y- на X-хромосому с последующей инактивацией гена-триггера на Y-блоке. Таким образом, ситуация, наблюдаемая у европейского протоя, представляет собой общую тенденцию эволюции половых хромосом амфибий из гетероморфных в гомоморфные.

Глава 6. Многообразие систем определения пола и их быстрая эволюция у костистых рыб

У костистых рыб описано много разнообразных вариантов определения пола. Пол у них может меняться в течение жизни, определяться внешними факторами, а также быть обусловлен генетически. Описаны случаи гетерогаметности как мужского, так и женского полов, но иногда в пределах вида может встречаться и тот и другой варианты. Гетероморфные половые хромосомы у рыб встречаются довольно редко, и чаще всего нет возможности определить пол по кариотипу даже у видов с доказанным генетическим определением пола. Половые хромосомы и системы определения пола были описаны только у небольшого числа видов рыб, однако в настоящее время интерес к этой группе сильно возрос, и почти каждый год описывается какая-либо новая система.

Мы выбрали для исследования систем определения пола и половых хромосом представителей разных групп костистых рыб: гимнотобразных, араванообразных, харацинообразных и окуневидных. Геномы лучеперых рыб, а соответственно и их хромосомы, обычно довольно небольшого размера и их сложно разделить в процессе сортировки, поэтому основным методом получения хромосомспецифичных библиотек мы выбрали микродиссекцию.

Половые хромосомы сома эйгенманния (*Eigenmannia virescens*, Gymnotiformes). Разные популяции сома эйгенманния обладают значительным хромосомным полиморфизмом, причем в двух популяциях показано наличие гетероморфных половых хромосом (в одной популяции описана система XX/XY, во второй – X1X2X2/X1X2Y [Almeida Toledo de, Foresti, 2001]). С помощью микродиссекции мы получили X- и Y-хромосомспецифичные библиотеки ДНК рыб из этих популяций. Реципрокная гибридизация зондов на хромосомы представителя другой популяции выявила только аутосомные сигналы, что говорит о независимом происхождении половых хромосом в двух популяциях (рис. 11).

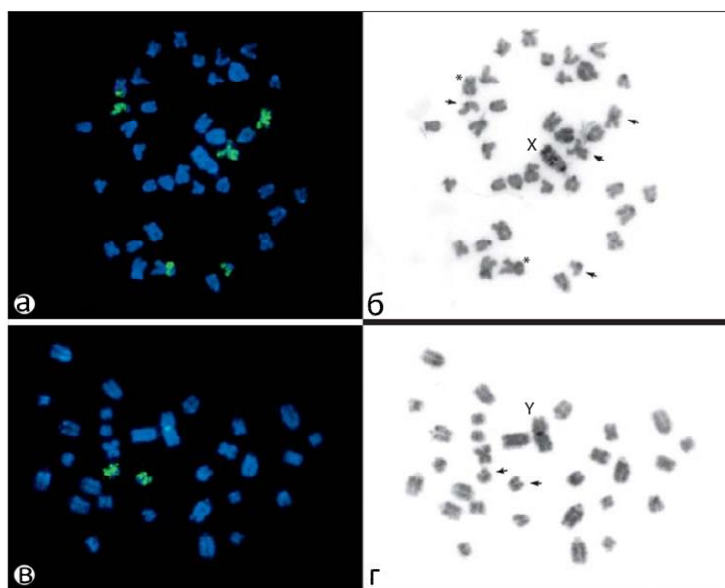


Рис. 11. Реципрокная гибридизация пэйнтинг проб половых хромосом эйгенманнии на препараты животных из разных популяций. (а,б) Y-специфичный зонд животного из популяции 2 метит две пары аутосом и гетерохроматиновые блоки на хромосоме 6 популяции 1. (в,г) X-специфичная библиотека животного из популяции 1 метит пару аутосом на метафазной пластинке самца из популяции 2.

Таким образом, мы обнаружили независимое и, скорей всего, недавнее происхождение половых хромосом в разных популяциях эйгенмании. На примере популяции 1 видно, что половые хромосомы уже начали дифференцироваться и накапливать повторенные последовательности, гомологичные последовательностям с гетерохроматиновых блоков аутосом. Результаты, полученные на популяции 2, подтверждают высказанную ранее гипотезу о происхождении крупной метацентрической нео-Y-хромосомы путем транслокации на аутосому [Almeida-Toledo et al., 2000].

Эволюция половых хромосом у представителей харацинообразных Нового Света.

Эритриновые. Семейство эритриновых включает 16 видов неотропических рыб из трех родов, характеризующихся разными числами хромосом и разными системами определения пола. Так, у двух видов – *Hoplias malabaricus* и *Erythrinus erythrinus* – описана система определения пола X1X2Y, однако оставалось неясным, происходит ли эта система в разных видах из одной и той же или из разных предковых аутосом. С помощью микродиссекции и хромосомного пэйнтинга мы показали, что данные системы возникли и развились из разных пар аутосом, причем скорей всего сначала это были малодифференцированные пары половых хромосом, которые потом дифференцировались (рис. 12). На основании полученных результатов можно сделать вывод о независимом происхождении половых хромосом у *H. malabaricus* и *E. erythrinus*.

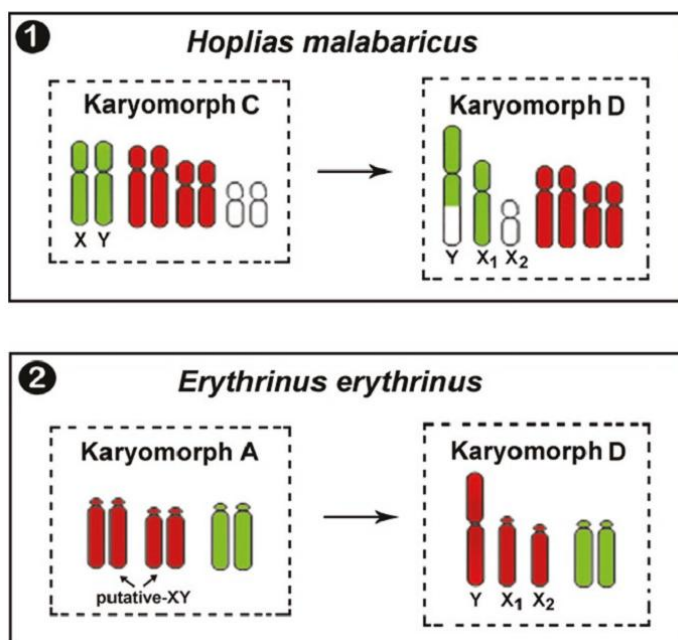


Рис. 12. У *Hoplias malabaricus* (1) система X1X2Y возникла в результате тандемного слияния Y-хромосомы (зеленый), представленной в кариоморфе С, с аутосомой (белый), с образованием крупной нео-Y-хромосомы. У *Erythrinus erythrinus* (2) похожая система возникла из центрического слияния между Y-хромосомой и аутосомой (красный), представленными в кариоморфе А, в результате образовалась крупная метацентрическая нео-Y-хромосома в кариоморфе D.

Дальнейшее исследование *H. malabaricus* показало, что в пределах вида встречается семь кариоморф (популяций с характерными кариотипическими особенностями): А – недифференцированные половые хромосомы; В – дифференцированные XY; С – малодифференцированные XY; D –

дифференцированные хромосомы X_1X_2Y ; E – недифференцированные половые хромосомы (другая пара, чем в популяции A); F – малодифференцированные хромосомы XX/XY ; G – дифференцированные хромосомы XX/XY_1Y_2 .

При анализе двух дополнительных морф (A и B) выяснилось, что половые хромосомы здесь произошли от совершенно другой пары аутосом, чем в морфах C и D, причем в морфе A половые хромосомы недифференцированы (рис. 13).

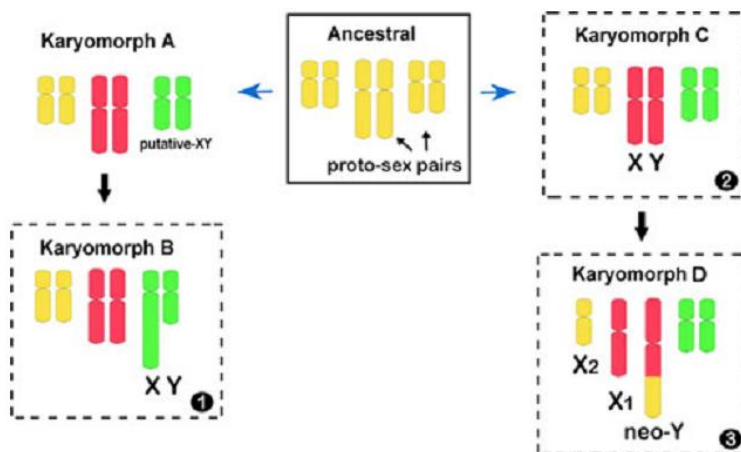


Рис. 13. Независимое происхождение половых хромосом в кариоморфах A, B, C и D *Hoplias malabaricus*.

Исследование кариоморф E, F и G показало, что половые хромосомы в этой группе произошли из новой пары аутосом, невовлеченной в формирование половых хромосом других кариоморф. На Y_1 -хромосоме в кариоморфе G был обнаружен специфичный для самцов район (рис. 14).

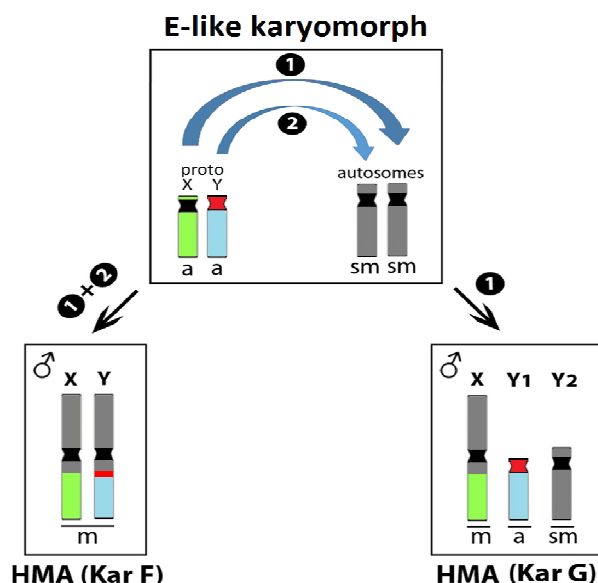


Рис. 14. Схема происхождения половых хромосом кариоморф F и G *Hoplias malabaricus* (HMA) из E-подобного предка. Тандемное слияние половых хромосом и аутосомы могло привести к возникновению морфы F. Тандемное слияние прото-X-хромосомы и одного из гомологов аутосомы привело к формированию системы половых хромосом кариоморфы G.

Полученные данные свидетельствуют об интенсивной эволюции половых хромосом эритриновых и указывают на представителей данного семейства как на уникальную естественную модель, на примере которой можно исследовать связь между хромосомной эволюцией и ранними этапами видообразования.

Трипортейные. Семейство Triportheidae включает около 23 видов в пределах одного рода, разделившихся около 26 млн лет назад и обладающих системой половых хромосом ZZ/ZW (где Z – самая крупная хромосома кариотипа, а W-хромосомы обладают разной степенью дифференциации). На примере этого семейства у нас была задача проследить корреляцию дифференциации W-хромосом с эволюционной дивергенцией видов и установить, обладают ли все виды системой половых хромосом общего происхождения. Мы получили библиотеки Z- и W-хромосом *Triportheus auritus* путем микродиссекции и провели гибридизацию этих проб, а также рибосомного зонда на хромосомы восьми видов рода *Triportheus* с разной морфологией W-хромосомы. Во всех исследованных видах W-хромосома несла крупный кластер генов рРНК. Z-библиотека равномерно окрасила Z-хромосомы всех видов. Зонд W-хромосомы окрасил р-плечи и частично q-плечи W с разной интенсивностью. Зонд Z-хромосомы также дал сигнал на большинстве W-хромосом. У всех видов зонд W-хромосомы окрасил центромерный и прителомерный блок р-плеча Z-хромосом, за исключением Z *T. auritus*, где центромерный район не окрашивался. Таким образом мы показали общее происхождение половых хромосом в данной группе и уникальную для каждой линии судьбу W-хромосом (рис. 15). Во всех исследованных случаях эволюция W-хромосомы сопровождалась амплификацией главного рибосомного кластера, накоплением гетерохроматина и вырождением эухроматиновой части.

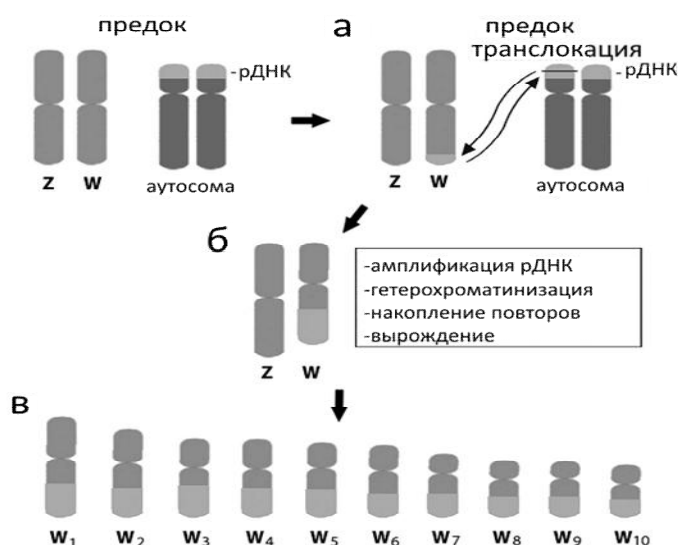


Рис. 15. Схема эволюции W-хромосом в семействе Triportheidae. Показана транслокация на предковую W хромосому ЯОР-района (а) с последующей амплификацией, экспансией гетерохроматина и дегенерацией эухроматиновой части (б) независимо у каждого вида (в).

Предполагаемые половые хромосомы арованоидных (Osteoglossomorpha). Арованоидные представляют огромный интерес с точки зрения эволюции половых хромосом костистых рыб из-за своего филогенетического положения. Филогенетические отношения крупных таксонов костистых рыб долго были предметом спора систематиков, но новейшие исследования помещают арованоидных

и элопоморф в одну кладу относительно всех остальных костистых рыб [Chen, Liang, Zhang, 2015]. Половые хромосомы у араваноидных описаны не были.

Сравнительный анализ кариотипов самцов и самок азиатской араваны (*Scleropages formosus*, SFO) позволил выявить у самок крупную акроцентрическую хромосому с крупным ГЦ-богатым гетерохроматиновым блоком в прицентромерном районе. Секвенирование и сборка генома самки араваны выявила 25 синтенных блоков [Bian et al., 2016]. Гибридизация зонда главного рибосомного кластера выявила три сигнала у самок и только два у самцов.

С помощью микродиссекции мы получили три библиотеки предполагаемой на основе морфологических данных W-хромосомы и в качестве контроля дополнительно приготовили три библиотеки аутосом. Анализ прочтений секвенированных библиотек показал, что половые хромосомы соответствуют группе сцепления SFO4 (хотя также были хорошо представлены прочтения с хромосом SFO2 и SFO17). Выравнивание последовательностей с Z- и W-хромосом полугладкой циноглоссы (*Cynoglossus semilaevis*) [Chen et al., 2014] на хромосомы араваны показало протяженную гомологию с хромосомой SFO17, при этом SFO6 (крупнейшая хромосома сборки) содержала еще два района гомологии. Пары хромосом SFO2 и SFO4, а также SFO6 и SFO17 являются частично паралогичными (паралоги произошли именно из последнего удвоения генома, специфичного для костистых рыб).

На основании данных по кариотипированию и геномной сборке мы заключили, что система определения пола у азиатской араваны ZZ/ZW, причем W представляет из себя крупную акроцентрическую хромосому с крупным GC-богатым блоком гетерохроматина в перицентромерном районе (район оказался обогащен генами главного рибосомного кластера и 5S РНК). W-хромосома оказалась гомологична группам сцепления SFO4 и SFO17, и данные по сравнительной экспрессии генов этих хромосом у самца и самки косвенно это подтверждают. Интересно, что в отличие от обычной судьбы нерекombинирующих половых хромосом, в данном случае мы наблюдаем увеличение размеров W по сравнению с Z.

Глава 7. Определение пола у осетрообразных. Пол и полиплоидия.

Среди лучеперых рыб осетровые (25 видов) и веслоносовые (два вида) формируют таксон осетрообразных, обитающих в водах Северного Полушария, занимающий базальное положение для группы Actinopteri (включает всех лучеперых кроме многоперообразных). Осетрообразные характеризуются консервативной морфологией, медленной молекулярной эволюцией генома, поздним созреванием, длинным жизненным циклом и бентосной специализацией. Многочисленные попытки найти маркеры, связанные с полом осетровых, так и не принесли успеха [Wuertz et al., 2006], что подчеркивает необходимость подробного изучения геномов этих реликтовых рыб.

Мы применили методы классической и молекулярной цитогенетики для поиска половых хромосом у стерляди и сибирского осетра. Мы отработали методики культивирования фибробластов осетровых и оптимизировали протоколы получения препаратов метафазных хромосом. Применение цитогенетических методов высокого разрешения особенно важно для видов с высоким числом хромосом. Однако обнаруженные цитогенетические особенности между самцами и самками оказались связаны с внутривидовым полиморфизмом. В ходе своей работы мы впервые показали наличие паралогичных участков метафазных хромосом с помощью микродиссекции и пэинтинга. Применение набора из разных хромосомспецифичных зондов показало, что геном стерляди имеет мозаичную структуру, где некоторые сегменты тетраплоидны, а некоторые диплоидны. Локализация повторенных последовательностей ДНК на хромосомах стерляди выявила набор маркеров, позволяющих однозначно определять некоторые сложно различимые пары хромосом и идентифицировать паралоги крупных хромосом. Сравнительный пэинтинг между хромосомами стерляди и сибирского осетра показал, что у сибирского осетра имеется несколько характерных перестроек (рис. 16). Мы применили метод секвенирования хромосомспецифичных библиотек для анализа состава крупных хромосом стерляди и обнаружили паралогичные районы на молекулярном уровне. Кроме того, при сравнении состава хромосом стерляди и панцирной щуки (недавно секвенированного вида не костистых лучеперых) мы показали существование протяженных синтенных участков.

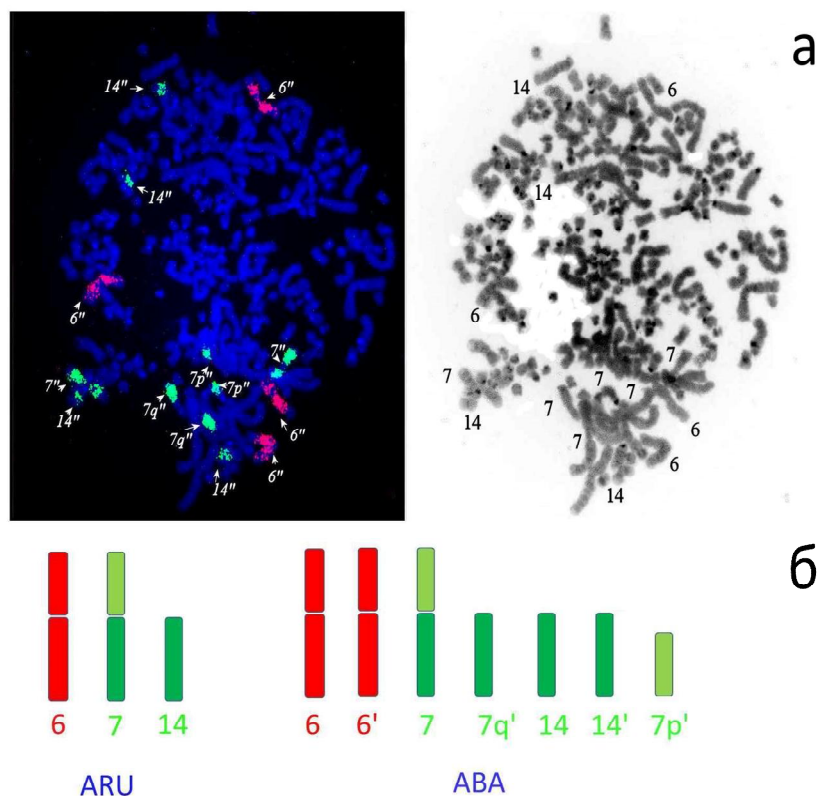


Рис. 16. (А) Локализация хромосомспецифичных проб *Acipenser ruthenus* (ARU) на хромосомах *A. baerii* (ABA) показывает тетраплоидный статус хромосом, гомологичных ARU6 (красный). ARU7 (зеленый) (ARU 7p диплоидный у стерляди, ARU7q – тетраплоидный и гомологичный ARU14) окрашивает 10 районов на хромосомах *A. baerii*: ARU7p представлен в четырех копиях, ARU7q /ARU14 – в восьми копиях. (Б) Схема гомологичных районов (ARU6, ARU7, ARU14) у *A. ruthenus* и *A. baerii*.

Высокие числа хромосом осетровых были показаны в ранних цитогенетических исследованиях. Позже было показано, что полиплоидизация была важным эволюционным механизмом у большинства современных позвоночных [Dehal, Booge, 2005; Lynch, 2002; Taylor, Raes, 2004]. Интересно, что среди позвоночных полиплоидия чаще всего отмечается у рыб и амфибий, и в этих группах важно проследить, насколько процессы полиплоидизации связаны с генетическими системами определения пола. Осетровые являются группой, где процессы полиплоидизации имели место несколько раз в разных линиях (рис. 17) и факты обнаружения спонтанных полиплоидов подтверждают, что этот процесс все еще продолжается. Вероятно, именно с общей консервативностью как внешних морфологических признаков, так и генома связано то, что в этой группе так много межвидовых гибридов. Причем часть из этих гибридов сформировалась в естественных условиях обитания видов. Конечно, предполагается, что в естественных условиях существуют серьезные барьеры для скрещивания видов, поскольку в некоторых местах ареала много видов существует симпатрично.

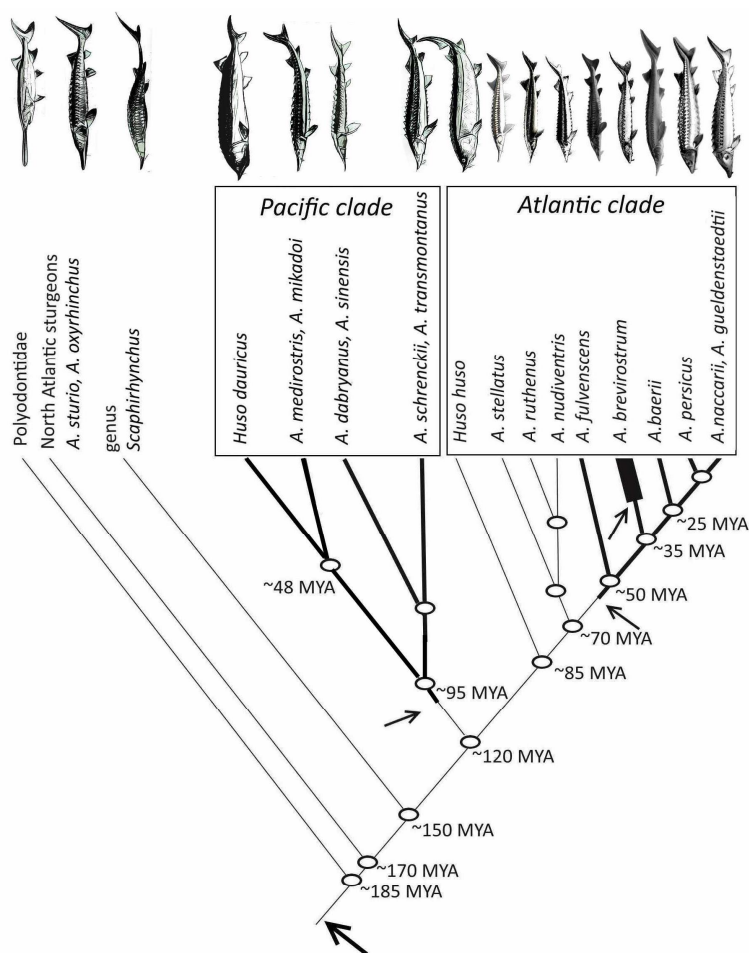


Рис. 17. Филогения осетрообразных с указанием времени расхождения основных клад. Стрелки указывают на события полиплоидизации. Толщина линии показывает ploidy (тонкая – 120 хромосом, чуть толще – 240 и самая толстая – 360).

Предположив, что 120-хромосомные кариотипы осетров и веслоносов состоят из гомологичных элементов, можно оценить время возникновения первого этапа

полиплоидии в этой группе как 200 млн. лет назад – время дивергенции отрядов [Peng et al., 2007]. При этом гаплоидный предок скорей всего содержал 30 пар хромосом, что очень близко к предковому кариотипу костных рыб, реконструированному Накатани с соавторами [Nakatani et al., 2007]. Очень похожим кариотипом обладает и панцирная щука – базальный вид костистых рыб с 29 парами хромосом [Braasch et al., 2016], и наши данные по секвенированию хромосом стерляди подтверждают консерватизм синтении между осетровыми и панцирниковыми. Еще три события полиплоидизации произошли впоследствии в семействе осетровых. Так, в тихоокеанской кладе дополнительное удвоение генома привело к ~250-хромосомным кариотипам, наблюдаемым сегодня у семи видов. Независимое удвоение генома произошло в атлантической линии около 50 млн. лет назад, когда сформировались кариотипы шести современных видов с 250 хромосомами. Наконец, еще одно дополнительное удвоение генома случилось в линии малого осетра, где сформировался кариотип с 372 хромосомами [Kim et al., 2005] (рис. 17).

Консерватизм систем определения пола можно предположить на примере бестера (гибрида между белугой и стерлядью [Burtzev, 1969]), где показан нормальный мейоз и соотношение полов в потомстве, несмотря на 85 млн. лет эволюции, разделяющих эти виды [Peng et al., 2007]. Большинство экспериментов с использованием индуцированного гиногенеза у осетрообразных показали, что потомство состояло как из самок так и из самцов, что свидетельствовало в пользу определения пола ZZ/ZW [Flynn et al., 2006; Fopp-Bayat, 2010; Van Eenennaam et al., 1999]. Учитывая высокую скорость смены систем определения пола у разных видов костистых рыб, можно предположить, что у разных видов осетровых также могут действовать разные системы определения пола, однако, это создало бы трудности при межвидовом скрещивании.

В целом несомненно, что осетровые развили ряд уникальных черт, позволяющих им облегчать негативные последствия наличия паралогичных копий хромосом в одном геноме. Именно это объясняет и их склонность к гино- и андрогенезу и способность формировать межвидовые гибриды. Такие черты, возможно, включают систему гомоморфных ZZ/ZW-хромосом, большой размер потомства, устойчивость к крупным изменениям регуляции работы генов, ослабление точек контроля пахитены. Эволюционными преимуществами полиплоидии могут быть высокая генетическая сложность, быстрое скачкообразное видообразование, приобретение новых черт для преодоления генетического груза и инбредной депрессии, позволяющее видам занимать новые ареалы, как это показано у серебряного карася [Liu et al., 2017]. Последующая эволюция генома будет включать функциональную диплоидизацию и уменьшение генома, но этот процесс скорее всего очень медленный и может занимать десятки миллионов лет и происходить с разными скоростями в разных частях генома.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сопоставляя собственные и полученные другими авторами данные, можно заключить, что эволюция половых хромосом проходит крайне динамично в разных таксонах позвоночных. Однако определенные ограничения возникают при слишком сильной дифференциации половых хромосом, как это наблюдается у млекопитающих, змей и птиц.

Амфибии, рептилии и рыбы обладают пластичными системами определения пола, на примере которых можно убедиться, что часто ген-триггер возникает из одних и тех же участков генома независимо в разных таксонах, причем не только из участников консервативного каскада определения пола, но и из других генов. Так, одна и та же группа сцепления (протохромосома 3 предка костистых рыб) берет на себя роль как системы XY девятииглой колюшки (*Pungitius pungitius*) и бурого фугу (*Takifugu rubripis*), так и системы ZW у цихлид с озера Малави (фенотип OB) и медаки (*Oryzias hubbsi*) [Marshall Graves, Peichel, 2010]. Протохромосома 7 костистых рыб принимает участие в формировании пола у трехиглой колюшки, нильской тилляпии и цихлид озера Малави (фенотип BB) [Marshall Graves, Peichel, 2010]. Система ZW дальневосточной черепахи гомологична XY-системе игуановых ящериц [Kichigin et al., 2016]. Группа сцепления, содержащая *DMRT1*, сформировала половые хромосомы птиц, геккона Квингсли, крестогрудых черепах, полугладкой циноглоссы и некоторых видов настоящих лягушек [Brelsford et al., 2013], а сегментные дубликации этого гена стали триггерами пола у гладкой шпорцевой лягушки и некоторых видов оризий. Группа сцепления, несущая *SOX3*, определяет пол у плацентарных и сумчатых и настоящих ящериц, а ген *SOX3* обнаружен на половых хромосомах одного из видов оризий (*Oryzias dancena*) и бугорчатой лягушки (*Rana rugosa*). Наконец, синтенная группа с геном *RSP01* присутствует на половых хромосомах удава, когтистой шпорцевой лягушки и ящериц *Norops sagrei*, *Hemidactylus platyurus* и *Pogona vitticeps*.

Реконструкции предкового кариотипа четвероногих не исключают, что гены, вовлеченные в каскад определения пола, могли лежать на одной группе сцепления, однако требуются дальнейшие филогенетические реконструкции, включающие большее число видов. Несомненно, присутствие одних и тех же генов и групп сцепления на половых хромосомах указывает на то, что некоторые районы генома являются более подходящими для формирования половых хромосом и часто независимо туда вовлекаются, причем вероятно, могли быть периоды, когда сразу несколько подобных генов оказывались на половых хромосомах.

Другие факторы эволюции генома, такие как полиплоидия и образование добавочных хромосом, нередко коэволюционируют с факторами определения пола, что дополнительно влияет на видообразование путем усиления изоляции. Однако эти системы скорее являются экзотическими и далеко не доминирующими. Присутствие разнообразных сегментных дубликаций на добавочных хромосомах может также

оказывать влияние на каскады определения пола, и в определенный момент не исключено переключение на определение пола, зависимое от В-хромосом, как у цихлид из озера Виктория или у серебряного карася (вида-полиплоида).

Новейшие методы секвенирования геномов немодельных видов и анализа их состава скорей всего прольют свет на эволюцию систем определения пола в разнообразных таксонах и значительно дополнят нашу картину эволюции эукариот в целом. Среди методов особую роль играют также технологии, связанные с изучением процессов мейоза. Исследование генов, регулирующих процессы мейоза, в том числе и точки контроля пахитены, позволят приблизиться к пониманию процессов межвидовой гибридизации и полиплоидизации.

ВЫВОДЫ

- 1) В отличие от большинства таксонов позвоночных, терии (плацентарные и сумчатые) обладают очень консервативной системой половых хромосом (XX/XY), однако в некоторых семействах (оленьи, полорогие, грызуны) наблюдается повышенная нестабильность X-хромосомы. Эволюционные перестройки половых хромосом терий видоспецифичны и не закрепляются в эволюции.
- 2) Подсемейство полёвковые (Rodentia, Mammalia) является исключительным по числу видов, где происходит отмена стандартного для терий определения пола с помощью гена *SRY*. Подобные случаи могут представлять собой способ эволюционного перехода к другим системам определения пола в таксонах с высокодифференцированными половыми хромосомами.
- 3) Связь половых хромосом и добавочных хромосом наглядно показана на примере желтогорлой мыши (*Apodemus flavicollis*, Muridae) и копытного лемминга (*Dicrostonyx torquatus*, Cricetidae).
- 4) Система половых хромосом однопроходных (Monotremata, Mammalia) первоначально произошла из участка генома, гомологичного половым хромосомам птиц более 60 млн. лет назад. Серия последовательных транслокаций сначала на прото-X-хромосому, а затем на вновь добавленные элементы цепи, привели к формированию сложной множественной системы половых хромосом, которая подверглась незначительным изменениям в отдельных линиях.
- 5) Система половых хромосом, гомологичных ZW-системе птиц, появлялась независимо в разных линиях позвоночных (у однопроходных (Monotremata), геккона Квангси (Squamata), крестогрудных черепах (Testudines), полугладкой циноглоссы (Actinopterygii), нескольких видов настоящих лягушек (Amphibia)), что связано с наличием гена *DMRT1*. Эту систему нельзя считать предковой для позвоночных, а независимое использование одной и той же синтенной группы как триггера для определения пола в разных таксонах следует считать эволюционным параллелизмом.

- 6) Несмотря на медленную эволюцию генома и гомоморфные половые хромосомы у большинства гекконовых (Gekkonidae, Squamata), у некоторых видов возникают цитогенетически детектируемые системы. У плоскохвостого геккона (*Hemidactylus platyurus*) система половых хромосом ZZ/ZW возникла из фрагмента, гомологичного хромосоме 9 *Anolis carolinensis* и содержащего ген *RSPO1*.
- 7) Геном триплоидного партеногенетического вида гекконов *Lepidodactylus lugubris* произошел в результате гибридизации трех разных видов гекконов. Партеногенез у данного вида идет путем удвоения генома, предшествующего мейозу со спариванием сестринских хроматид. Самцы возникают спонтанно под влиянием внешних факторов и генетически не отличаются от самок.
- 8) Хромосомный пэйнтинг и секвенирование отдельных микрохромосом игуановых *Anolis carolinensis* и *Norops sagrei* (Iguania, Squamata, Sauropsida) позволили выявить состав микрохромосом, включая X- и Y-хромосомы. Крупные половые хромосомы *Norops sagrei* произошли в результате транслокаций трех микрохромосом на аутосомный район предковых половых хромосом.
- 9) Район, содержащий ген *RSPO1*, независимо принял участие в формировании систем половых хромосом пяти филогенетических групп четвероногих: в роде *Norops* игуановых (Iguanidae, Iguania, Squamata), у плоскохвостого геккона (Gekkota, Squamata), у бородатой агамы (Agamidae, Iguania, Squamata), у удава (Serpentes) и у когтистой шпорцевой лягушки (Amphibia).
- 10) Предковым для черепах (Testudines, Sauropsida) было средовое (температурное) определение пола. Формирование половых хромосом в определенных линиях происходило на базе блоков, соответствующих возможной предковой половой хромосоме четвероногих, разные части которой многократно вовлекались в процесс формирования половых хромосом разных линий позвоночных, благодаря содержанию генов из основного каскада определения пола.
- 11) Исследование половых хромосом хвостатых амфибий (Caudata, Amphibia) предполагает альтернативный механизм, с помощью которого системы с дифференцированными половыми хромосомами могут преодолевать «эволюционный тупик», заключающийся в запрете на эволюцию половых хромосом, путем слияния Y-хромосомы с аутосомой или X-хромосомой и последующего переключения на другие системы.
- 12) Подтверждены высокие темпы эволюции систем половых хромосом лучеперых рыб (Actinopterygii) и с помощью сравнительного хромосомного пэйнтинга представлены дополнительные примеры быстро эволюционирующих таксонов неотропических видов семейств гимнотовые, эритриновые, анастомовые и трипортейные.

13) Сравнительное секвенирование геномов самца и самки азиатской араваны (*Scleropages formosus*) показало, что для этого вида характерна система ZZ/ZW и половая хромосома соответствует 4-ой по размеру группе сцепления.

14) Подробное исследование кариотипа стерляди (*Acipenser ruthenus*), включающее и локализацию предположительно связанных с полом повторенных элементов генома и анализ гибридизации хромосомспецифичных библиотек, показало отсутствие видимых отличий между самцом и самкой, что предполагает наличие очень малодифференцированных половых хромосом.

Список статей в рецензируемых научных журналах по теме диссертации

1. Кичигин И., Андреюшкова Д., Побединцева М., **Трифонов В.** Многообразие типов генетического определения пола лучеперых рыб (Actinopterygii). // Цитология. 2016. Т. 58. № 5. С. 405–411.
2. Кичигин И., **Трифонов В.** Структура генома и определение пола чешуйчатых (Squamata) // Цитология. 2013. Т. 55. № 4. С. 253–258.
3. Andreyushkova D.A., Makunin A.I., Beklemisheva V.R., Romanenko S.A., Druzhkova A.S., Biltueva L.B., Serdyukova N.A., Graphodatsky A.S., **Trifonov V.A.** Next Generation Sequencing of Chromosome-Specific Libraries Sheds Light on Genome Evolution in Paleotetraploid Sterlet (*Acipenser ruthenus*) // Genes. 2017. V. 8. № 11. P. 318.
4. Bian C., Hu Y., Ravi V., Kuznetsova I.S., Shen X., Mu X., ... **Trifonov V.A.** ...et al. The Asian arowana (*Scleropages formosus*) genome provides new insights into the evolution of an early lineage of teleosts // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 24501.
5. Biltueva L.S., Prokopov D.Y., Makunin A.I., Komissarov A.S., Kudryavtseva A.V., Lemskaya N.A., Vorobieva N.V., Serdyukova N.A., Romanenko S.A., Gladkikh O.L., ... **Trifonov V.A.** Genomic Organization and Physical Mapping of Tandemly Arranged Repetitive DNAs in Sterlet (*Acipenser ruthenus*) // Cytogenet. Genome Res. 2017.
6. Cioffi M. de B., Sanchez A., Marchal J.A., Kosyakova N., Liehr T., **Trifonov V.**, Bertollo L.A.C. Whole chromosome painting reveals independent origin of sex chromosomes in closely related forms of a fish species // Genetica. 2011a. V. 139. № 8. P. 1065.
7. Cioffi M.B., Liehr T., **Trifonov V.**, Molina W.F., Bertollo L. A. C. Independent sex chromosome evolution in lower vertebrates: a molecular cytogenetic overview in the Erythrinidae fish family // Cytogenet. Genome Res. 2013. V. 141. № 2–3. P. 186–194.
8. Cioffi M.B., Sanchez A., Marchal J.A., Kosyakova N., Liehr T., **Trifonov V.**, Bertollo L.A. Cross-species chromosome painting tracks the independent origin of multiple sex chromosomes in two cofamiliar Erythrinidae fishes // BMC Evol. Biol. 2011b. V. 11. P. 186.
9. Ferguson-Smith M.A., **Trifonov V.** Mammalian karyotype evolution // Nat. Rev. Genet. 2007. V. 8. № 12. P. 950–962.
10. Giovannotti M., Caputo V., O'Brien P.C.M., Lovell F.L., **Trifonov V.**, Cerioni P.N., Olmo E., Ferguson-Smith M.A., Rens W. Skinks (Reptilia: Scincidae) have highly

- conserved karyotypes as revealed by chromosome painting // *Cytogenet. Genome Res.* 2009. V. 127. № 2–4. P. 224–231.
11. Giovannotti M., **Trifonov V.A.**, Paoletti A., Kichigin I.G., O'Brien P.C.M., Kasai F., Giovagnoli G., Ng B.L., Ruggeri P., Cerioni P.N., et al. New insights into sex chromosome evolution in anole lizards (Reptilia, Dactyloidae) // *Chromosoma*. 2017. V. 126. № 2. P. 245–260.
12. Gladkikh O.L., Romanenko S.A., Lemskaya N.A., Serdyukova N.A.,...**Trifonov V.A.**, et al. Rapid Karyotype Evolution in *Lasiopodomys* Involved at Least Two Autosome - Sex Chromosome Translocations // *PloS One*. 2016. V. 11. № 12. P. e0167653.
13. Grafodatskaya D., Rens W., Wallis M.C., **Trifonov V.** et al Search for the sex-determining switch in monotremes: mapping *WT1*, *SFI*, *LHX1*, *LHX2*, *FGF9*, *WNT4*, *RSPO1* and *GATA4* in platypus // *Chromosome Res.* 2007. V. 15. № 6. P. 777–785.
14. Graphodatsky A.S., **Trifonov V.A.**, Stanyon R. The genome diversity and karyotype evolution of mammals // *Mol. Cytogenet.* 2011. V. 4. P. 22.
15. Henning F., **Trifonov V.**, Almeida-Toledo L.F. de. Use of chromosome microdissection in fish molecular cytogenetics // *Genet. Mol. Biol.* 2008. V. 31. № 1. P. 279–283.
16. Henning F., **Trifonov V.**, Ferguson-Smith M.A., Almeida-Toledo L.F. de. Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes) // *Cytogenet. Genome Res.* 2008. V. 121. № 1. P. 55–58.
17. Johnson Pokorna M., **Trifonov V.A.**, Rens W., Ferguson-Smith M.A., Kratochvil L. Low rate of interchromosomal rearrangements during old radiation of gekkotan lizards (Squamata: Gekkota) // *Chromosome Res.* 2015. T. 23. № 2. P. 299–309.
18. Kichigin I.G., Giovannotti M., Makunin A.I., Ng B.L., Kabilov M.R., Tupikin A.E... **Trifonov V.A.** Evolutionary dynamics of *Anolis* sex chromosomes revealed by sequencing of flow sorting-derived microchromosome-specific DNA // *Mol. Genet. Genomics*. 2016. T. 291. № 5. P. 1955–1966.
19. Lisachov A.P., **Trifonov V.A.**, Giovannotti M., Ferguson-Smith M.A., Borodin P.M. Heteromorphism of «Homomorphic» Sex Chromosomes in Two Anole Species (Squamata, Dactyloidae) Revealed by Synaptonemal Complex Analysis // *Cytogenet. Genome Res.* 2017a. T. 151. № 2. P. 89–95.
20. Lisachov A.P., **Trifonov V.A.**, Giovannotti M., Ferguson-Smith M.A., Borodin P.M. Immunocytological analysis of meiotic recombination in two anole lizards (Squamata, Dactyloidae) // *Comp. Cytogenet.* 2017b. V. 11(1). P. 129–141.
21. Makunin A.I., Rajcic M., Karamysheva T.V., Romanenko S.A., Druzhkova A.S., Blagojevic J., Vujosevic M., Rubtsov N.B., Graphodatsky A.S., **Trifonov V.A.** Low-pass single-chromosome sequencing of human small supernumerary marker chromosomes (sSMCs) and *Apodemus* B chromosomes // *Chromosoma*. 2018.
22. McMillan D., Miethke P., Alsop A.E., Rens W., O'Brien P., **Trifonov V.** et al. Characterizing the chromosomes of the platypus (*Ornithorhynchus anatinus*) // *Chromosome Res.* 2007. V. 15. № 8. C. 961–974.
23. Montiel E.E., Badenhorst D., Lee L.S., Literman R., **Trifonov V.**, Valenzuela N. Cytogenetic Insights into the Evolution of Chromosomes and Sex Determination Reveal

- Striking Homology of Turtle Sex Chromosomes to Amphibian Autosomes // Cytogenet. Genome Res. 2016. V. 148. № 4. P. 292–304.
24. Oliveira E.A. de, Sember A., Bertollo L.A.C., Yano C.F., Ezaz T., Moreira-Filho O., Hatanaka T., **Trifonov V.** et al. Tracking the evolutionary pathway of sex chromosomes among fishes: characterizing the unique XX/XY1Y2 system in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes) // Chromosoma. 2017.
25. Parise-Maltempi P.P., Silva E.L. da, Rens W., Dearden F., O'Brien P.C., **Trifonov V.**, Ferguson-Smith M.A. Comparative analysis of sex chromosomes in *Leporinus* species (Teleostei, Characiformes) using chromosome painting // BMC Genet. 2013. V. 14. P. 60.
26. Pokorna M., Giovannotti M., Kratochvil L., Kasai F., **Trifonov V.A.** et al. Strong conservation of the bird Z chromosome in reptilian genomes is revealed by comparative painting despite 275 million years divergence // Chromosoma. 2011. V. 120. № 5. P. 455–468.
27. Rajcic M., Romanenko S.A., Karamysheva T.V., Blagojevic J., Adnadevic T., Budinski I., Bogdanov A.S., **Trifonov V.A.**, Rubtsov N.B., Vujosevic M. The origin of B chromosomes in yellow-necked mice (*Apodemus flavicollis*)-Break rules but keep playing the game // PloS One. 2017. V. 12. № 3. e0172704.
28. Rens W., O'Brien P.C.M., Grutzner F., Clarke O., Graphodatskaya D., Tsend-Ayush E., **Trifonov V.A.** et al. The multiple sex chromosomes of platypus and echidna are not completely identical and several share homology with the avian Z // Genome Biol. 2007. V. 8. № 11. R243.
29. Romanenko S.A., Biltueva L.S., Serdyukova N.A., Kulemzina A.I., Beklemisheva V.R., Gladkikh O.L., ... **Trifonov V.A.** Segmental paleotetraploidy revealed in sterlet (*Acipenser ruthenus*) genome by chromosome painting // Mol. Cytogenet. 2015. V. 8. № 1. P. 90.
30. Romanenko S.A., Lemskaya N.A., **Trifonov V.A.** et al. Genome-wide comparative chromosome maps of *Arvicola amphibius*, *Dicrostonyx torquatus*, and *Myodes rutilus* // Chromosome Res. 2016. V. 24. № 2. P. 145–159.
31. Romanenko S.A., Perelman P.L., **Trifonov V.A.**, Graphodatsky A.S. Chromosomal evolution in Rodentia // Heredity. 2012. V. 108. № 1. P. 4–16.
32. Sessions S.K., Bizjak Mali L., Green D.M., **Trifonov V.**, Ferguson-Smith M. Evidence for Sex Chromosome Turnover in Proteid Salamanders // Cytogenet. Genome Res. 2016. V. 148. № 4. P. 305–313.
33. **Trifonov V.A.**, Dementyeva P.V., Larkin D.M., O'Brien P.C.M., Perelman P.L., Yang F., Ferguson-Smith M.A., Graphodatsky A.S. Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*) // BMC Biol. 2013. V. 11. P. 90.
34. **Trifonov V.A.**, Giovannotti M., O'Brien P.C.M., Wallduck M., Lovell F. et al. evolution in Gekkonidae. I. Chromosome painting between *Gekko* and *Hemidactylus* species reveals phylogenetic relationships within the group // Chromosome Res. 2011. V. 19. № 7. P. 843–855.
35. **Trifonov V.A.**, Musilova P., Kulemsina A.I. Chromosome evolution in Perissodactyla // Cytogenet. Genome Res. 2012. V. 137. № 2–4. P. 208–217.

36. **Trifonov V.A.**, Paoletti A., Caputo Barucchi V., Kalinina T., O'Brien P.C.M., Ferguson-Smith M.A., Giovannotti M. Comparative Chromosome Painting and NOR Distribution Suggest a Complex Hybrid Origin of Triploid *Lepidodactylus lugubris* (Gekkonidae) // PloS One. 2015. V. 10. № 7. e0132380.
37. **Trifonov V.A.**, Romanenko S.S., Beklemisheva V.R., Biltueva L.S., Makunin A.I., Lemskaya N.A., Kulemzina A.I., Stanyon R., Graphodatsky A.S. Evolutionary plasticity of acipenseriform genomes // Chromosoma. 2016. V. 125. № 4. P. 661–668.
38. **Trifonov V.A.**, Stanyon R., Nesterenko A.I., Fu B., Perelman P.L., O'Brien P.C.M., Stone G., Rubtsova N.V., Houck M.L., Robinson T.J., et al. Multidirectional cross-species painting illuminates the history of karyotypic evolution in Perissodactyla // Chromosome Res. 2008. V. 16. № 1. P. 89–107.
39. Vij S., Kuhl H., Kuznetsova I.S., Komissarov A., Yurchenko A.A., Van Heusden P., Singh S., Thevasagayam N.M., Prakki S.R.S., Purushothaman K., ... **Trifonov V.A.** et al. Chromosomal-Level Assembly of the Asian Seabass Genome Using Long Sequence Reads and Multi-layered Scaffolding // PLoS Genet. 2016. V. 12. № 4. e1005954.
40. Yano C.F., Bertollo L. a. C., Ezaz T., **Trifonov V.**, Sember A., Liehr T., Cioffi M.B. Highly conserved Z and molecularly diverged W chromosomes in the fish genus *Triporthus* (Characiformes, Triportheidae) // Heredity. 2017. V. 118. № 3. P. 276–283.

Разные этапы работы были поддержаны грантами РФФИ, DFG, DAAD, Wellcome Trust, Лондонского королевского общества и РФФИ (№ 14-14-00275 и № 18-44-04007).