

Konserwatyzm genetyczny chromosomów płci w rodzinie *Bovidae*

Anna Kozubska-Sobocińska

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa*

Charakterystyka heterosomów

Chromosomy płci są szczególną parą chromosomów, specyficznych pod względem morfologii i funkcji. Na skutek postępującej specjalizacji heterosomów uwydatnił się ich dymorfizm – chromosom Y, w odróżnieniu od chromosomu X został pozbawiony wielu loci genowych, z wyjątkiem determinujących płęć i kontrolujących rozwój gonad. Uwzględniając takie właściwości chromosomów płci, jak: ewolucyjny mechanizm kształtowania się dymorfizmu heterosomów prowadzący do „erozji” chromosomu Y, różnice w zawartości heterochromatyny, holandryczny sposób dziedziczenia „chromosomu męskiego” i inaktywację chromosomu X, heterosomy były obiektem wielu badań, zarówno w aspekcie zjawiska konserwatyizmu genetycznego, jak i polimorfizmu.

Konserwatyzm genetyczny

Zjawisko konserwatyizmu genetycznego polega na występowaniu podobieństw w genomach gatunków spokrewnionych w procesie ewolucji.

Konserwatyzm może dotyczyć:

- homologii układu prążków, powstających na chromosomach barwionych różnymi technikami różnicowymi,
- sprzężeń czy kolejności w obrębie określonych grup genów i sekwencji mikrosatelitarnych,
- homologii sekwencji nukleotydowych genów kodujących podobne produkty u różnych gatunków zwierząt.

Konserwatyzm genetyczny wzorów prążkowych na chromosomach płci

Analizy porównawcze kariotypów przy wykorzystaniu prążkowych wzorów kariotypowych (ISCNDA, 1990) umożliwiły ujawnienie zjawiska konserwatyizmu genetycznego na poziomie prążków wywoływanych na chromosomach technikami barwienia różnicowego (GTG, RBA, RBG, QFQ). Identyfikacja wielu chromosomów lub ich fragmentów w kariotypach różnych gatunków zwierząt, porównywanych w obrębie rodzin wykazała, że ewolucyjnemu spokrewnieniu towarzyszy podobieństwo kariotypowe (Kozubska-Sobocińska i in., 2007; Słota i in., 2001).

Porównanie wzorów prążków G heterosomu X owiec i kóz z chromosomem X owcy grzywiastej (*Ammotragus lervia*) wykazało pełną homologię w układzie prążków w tym chromosomie u trzech wymienionych gatunków (fot. 1). Także zestawienie haploidalnych kompletów chromosomów owcy ($2n = 54$) i owcy grzywiastej ($2n = 58$), barwionych techniką GTG, ujawniło całkowitą homologię chromosomów w kariotypie i wskazało na ich ewolucyjną reorganizację, będącą efektem fuzji centrycznych (Słota i in., 2001).

Z kolei, porównywane przez Iannuzzi i Di Meo (1995) wzory prążków G i R (techniki GBG i RBG) w heterosomach bydła, bawoła rzeźnego, owiec i kóz pozwoliły na ustalenie podobieństw między badanymi gatunkami i zasugerowanie dwóch dróg ewolucji chromosomu X. Jedną polegała na rearanzacji heterosomu X bawoła rzeźnego, spowodowanej dwoma pęknięciami w proksymalnej i telomerowej części,

a następnie inwersją pericentryczną oraz inwersją paracentryczną pozostałej części i utratą dwóch niewielkich bloków heterochromatynowych. W rezultacie tych zmian z akrocentrycznego chromosomu X bawoła rzeczno powstał chromosom akrocentryczny z krótkimi ramionami, którego wzór prążków odpowiada

heterosomowi X owiec i kóz. Inna proponowana przez Iannuzzi i Di Meo (1995) reorganizacja chromosomu X bawoła rzeczno, polegająca na pęknięciu w części proksymalnej, pericentrycznej inwersji i utracie heterochromatyny, prowadziła do powstania submetacentrycznego heterosomu X bydła.



Fot.1. Porównanie prążków G na chromosomie X owcy (o), kozy (k) i owcy grzywiastej (og)
 Fig. 1. Comparison of the G-banded chromosome Y of the sheep (o), goat (k) and aoudad (og)

Sugestie te są zgodne z obserwacjami prążków G w chromosomie X bydła, owiec i kóz (Schnedl i Czaker, 1974; Hayes i in., 1991), gdzie zgodność wzorów na odcinku równym połowie chromosomu otrzymuje się po odwróceniu bydłowego heterosomu X i zestawieniu telomeru ramienia q z telomerem małych odcinków p heterosomu X owiec i kóz.

Konserwatyzm genetyczny na poziomie układu genów

Kolejna forma konserwatywności genetycznej dotyczy grup genów sprzężonych lub syntenicznych, pozostających często w takich samych relacjach u różnych gatunków, nawet odległych pod względem taksonomicznym (Świtoński, 1992 b). Ten konserwatywny układ genów pozwala na zastosowanie szeregu sond molekularnych, uzyskanych dla jednego gatunku, do mapowania danego genu lub grupy genów u innych gatunków. Umożliwia on uniknięcie bezpośredniego mapowania wszystkich genów znajdujących się w obrębie konserwatywnej grupy i daje możliwość wykorzystania rozległej wiedzy dotyczącej map genowych człowieka. Pozwala także na podzielenie zmapowanych genów na trzy kategorie: występujące w układzie syntenicznym u wszystkich gatunków, prawie zawsze synteniczne oraz nienależące do genetycznie konserwatywnych układów (Echard, 1989; Świtoński, 1992 a).

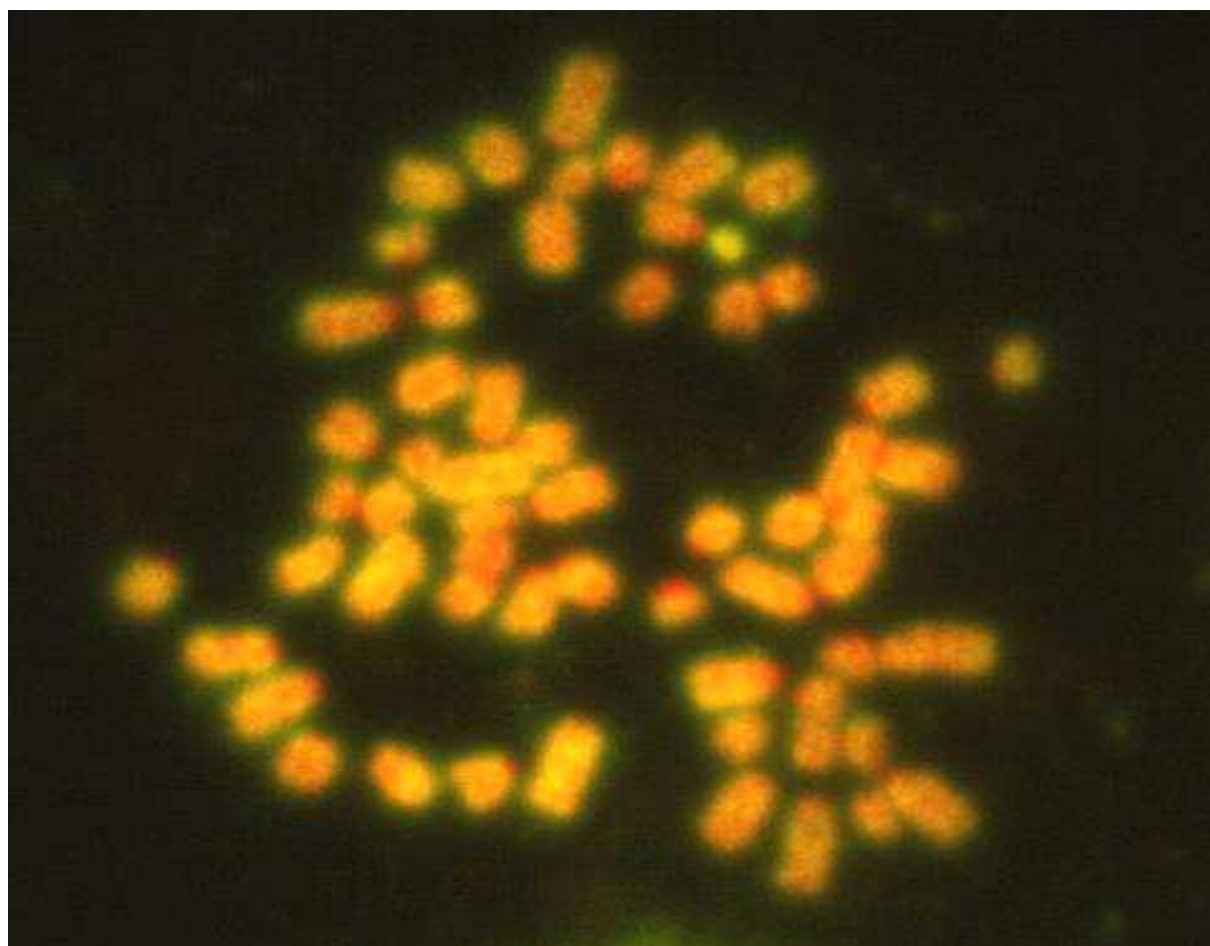
Prawidłowości zjawiska konserwatywności genetycznej stały się podstawą metody hybrydyzacji *in situ*, polegającej na przyłączeniu sondy molekularnej DNA do komplementarnego

genetycznego stały się podstawą metody hybrydyzacji *in situ*, polegającej na przyłączeniu sondy molekularnej DNA do komplementarnego

odcinka chromosomu utrwalonego na preparacie mikroskopowym. W zależności od specyficzności sondy hybrydyzacja może dotyczyć pojedynczych loci, całych chromosomów lub całych genomów, a zaletą tej metody jest możliwość zastosowania znanych, znakowanych sekwencji nukleotydowych jako sond identyfikujących odpowiednie fragmenty DNA u tego samego gatunku i w porównaniach międzygatunkowych (Prakash i in., 1996, 1997).

Występujący w rodzinie *Bovidae* konserwatyzm kariotypowy na poziomie wzorów prążkowych, ujawniający homologie między chromosomami lub ich fragmentami, spowodował dalsze poszukiwania podobieństw między gatunkami tej rodziny, które dotyczyły układów grup genów syntenicznych lub sprzężonych, a także struktury molekularnej genów i anonimowych sekwencji nukleotydowych.

Pierwsze próby wykazania podobieństw między chromosomami różnych gatunków polegały na malowaniu chromosomów badanego gatunku metodą hybrydyzacji *in situ* sondami specyficznymi dla chromosomów człowieka (ZOO-FISH). Zastosowane przez Hayes (1995) 24 chromosomowo specyficzne sondy z genomu człowieka w 18 przypadkach wykazały pełną homologię, malując tylko po jednym bydlęcym chromosomie (w tym heterosomie X); pozostałe malowały 2 lub 3 autosomy. Brak sygnałów w heterosomie Y autorka tłumaczyła dużą zawartością sekwencji powtarzalnych i krótkimi, trudnymi do wizualizacji odcinkami sekwencji DNA. Również Chowdhary i in. (1996), stosując ludzkie, chromosomowo specyficzne biblioteki plazmidowe, określili 46 homologicznych segmentów u bydła i 4 u owiec.



Fot. 2. Chromosomy metafazowe kozła. Żółty sygnał fluorescencyjny identyfikujący heterosom Y otrzymano po hybrydyzacji z bydlęcą sondą malującą

Fig. 2. Goat metaphase chromosomes. Yellow fluorescent signal indicates Y heterosome obtained by hybridization with the bovine painting probe

U obu gatunków rejestrował wyraźne sygnały w chromosomach X oraz brak hybrydyzacji z heterosomem Y. Przy pomocy techniki ZOO-FISH Solinas-Toldo i in. (1995) odnaleźli 56 homologicznych fragmentów między ludzimi i bydłecymi chromosomami, stwierdzili pełny konserwatyzm chromosomów X obu gatunków i tylko jeden fragment ZFY hybrydujący z heterosomem Y. Podobieństwa między chromosomami różnych gatunków rodziny *Bovidae* wykazywano wielokrotnie stosując sondy uzyskiwane z chromosomów bydłecych.

Sondy takie otrzymywano metodą mikrodyssekcji całych chromosomów lub ich fragmentów z płytek metafazowych, techniką sortowania chromosomów w cytometrze przepływowym lub metodą PCR z genomowego DNA, przy zastosowaniu odpowiednich starterów.

Sondy uzyskane techniką mikrodyssekcji metafazowych heterosomów bydła, znakowane biotyną, wykorzystano do hybrydyzacji międzygatunkowych z chromosomami owiec i kóz. Bydłeca sonda malująca, specyficzna dla chromosomu Y, dając u każdego z porównywanych gatunków wyraźne świecące, żółte sygnały fluorescencyjne, obejmujące całe ramiona Yp i Yq, wykazała synteniczno-konserwatywny charakter heterosomu Y u bydła, owiec i kóz (fot. 2) (Kozubska-Sobocińska i in., 2005).

Bydłecą sondę malującą chromosom X zastosowano do diagnozy chimeryzmu leukocytarnego u owiec. Efektem hybrydyzacji były dwa jasno świecące sygnały na całych chromosomach X w płytkach 54,XX, natomiast jeden intensywnie fluoryzujący X widoczny był w komórkach 54,XY (Kozubska-Sobocińska i in., 2003).

Różnie znakowane bydłecze sondy malujące heterosomy (X-biotyną, Y-digoksygeniną) wykorzystano do badań chimeryzmu komórkowego u jagniąt rasy romanowskiej i koźląt rasy barwnej uszlachetnionej, pochodzących z ciąży mnogich. Na podstawie sygnałów markerowych chromosomów płci, ujawniających obecność dwóch linii komórkowych, wskazano nosicieli chimeryzmu leukocytarnego, a także określono udział procentowy linii XX i XY (Rejduch i in., 2004; Rychlik i in., 2005).

Przykładem zastosowania sondy, uzyskanej metodą mikrodyssekcji fragmentu Yp12, jest zidentyfikowanie komplementarnej sekwencji w biwalencji XY w stadium metafazy I oraz

porównawcza hybrydyzacja sondą Yq12.1-12.6, pochodzącą od *Bos indicus*, odpowiedniego odcinka w ramieniu q heterosomu Y u *Bos taurus* (Goldammer i in., 1996). Sondę specyficzną dla odcinka Yp12, wyprodukowaną metodą PCR, stosowano również do identyfikacji chromosomu Y w płytkach metafazowych i plemnikach (Révay i in., 2000). Bydłeca sonda malująca heterosom Y umożliwiła identyfikację Y w plemnikach tryka oraz określenie proporcji plemników zawierających w zestawie haploidalnym heterosom X lub Y (Rejduch i in., 2005).

O wysokim konserwatyzmie chromosomów płci w rodzinie turowatych świadczy uzyskanie przez Révay'a i in. (2002) sygnałów hybrydyzacyjnych w plemnikach buhajów po zastosowaniu w technice FISH sond uzyskanych metodą sortowania heterosomów jaka (*Bos grunniens*).

Sondy otrzymane metodą mikrodyssekcji ramion p i q z bydłecgo heterosomu X okazały się bardzo przydatne do uwidocznienia rearanżacji w obrębie chromosomu X bydła, owiec i kóz (Ponce de Leon i in., 1996). Morfologiczne różnice między submetacentrycznym chromosomem X bydła oraz jego akrocentrycznym odpowiednikiem u owiec i kóz były analizowane symultanicznie, dwukolorowym malowaniem sondami dla krótkich i długich ramion. Otrzymane sygnały wykazały, że sekwencje homologiczne do ramienia p chromosomu bydła są zlokalizowane interstycjalnie w heterosomach X owiec i kóz (region Xq34-41), a pozostała część akrocentrycznych heterosomów jest malowana sondą bydłecą Xq. Wyniki te świadczą o tym, że morfologiczne różnice między chromosomami X tych trzech gatunków są skutkiem reorganizacji w rozmieszczeniu chromatyny. Ponce de Leon i Carpio (1995) zweryfikowali także lokalizację odcinka pseudoautosomalnego PARX bydła, ustalając jego miejsce w obrębie fragmentu Xq4. Wykorzystując tę wiedzę, zastosowali następnie sondy markerów klasy II, charakterystyczne dla PARX, uzyskane z długich ramion bydłecgo X i określili ich położenie w ramieniu q heterosomu X owiec i kóz (Ponce de Leon i in., 1996).

Kolejna próba prześledzenia homologii chromosomu X u *Bovidae* polegała na zastosowaniu trzech bydłecych klonów kosmidowych specyficznych dla heterosomu X bydła (cIOBT 314, 945 i 1489) do mapowania analogicznych

fragmentów DNA u owiec, kóz i bawoła rzeźnego (Prakash i in., 1997). Sondy te zlokalizowane w regionach p12-13, q26-31 oraz q42-43 bydlęcego submetacentrycznego chromosomu X dawały sygnały w odcinkach q13, q33-34 oraz q47 długiego akrocentrycznego heterosomu X bawoła rzeźnego. U owiec i kóz nie otrzymano żadnych sygnałów dla klonów cIOBT 314 i 1489, natomiast jeden pozytywny, specyficzny dla kosmidu 945, rejestrowano w regionie Xq31-

33. Uwzględniając brak dwóch sekwencji kosmidowych w chromosomie X owiec i kóz, ich lokalizację u bydła i bawoła rzeźnego oraz przyjmując proponowany przez Iannuzzi i Di-Meo (1995) model reorganizacji chromosomu X (na podstawie wzorów prążków G i R) można przyjąć, że sekwencje odpowiadające cIOBT 314 i 1489 zostały utracone w procesie ewolucji, prowadzącej do ukształtowania akrocentrycznego chromosomu X owiec i kóz.

Tabela 1. Zmienność haplotypowa sekwencji mikrosatelitarnych specyficznych dla heterosomu Y u bydła, owiec i kóz

Table 1. Y-specific microsatellite loci used to assay haplotypic variation in cattle, sheep and goats

Locus	Długość alleli (pz) Range of alleles (bp)					
	bydło cattle		owce sheep		kozy goat	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
<i>INRA124</i>	128	-	128	-	128	-
<i>INRA126</i>	180	-	-	-	-	-
	182	-	182	-	182	-
	184	-	184	-	184	-
	188	-	-	-	-	-
	190	-	-	-	-	-
<i>INRA189</i>	80	-	-	-	80	-
	96	-	-	-	96	-
	100	-	-	-	-	-
	-	-	108	-	-	-
<i>BM861</i>	-	-	156	-	-	-
	158	-	-	-	158	-
	-	-	162	-	-	-

Następne badania Prakash i in. (1996) polegały na zastosowaniu wcześniej opisanych sond kosmidowych do porównania gatunków bardziej odległych pod względem filogenetycznym. Trzy bydlęce sondy wykorzystano w metodzie FISH do mapowania chromosomu X renifera (*Rangifer tarandus*), należącego do rzędu parzystokopytnych (*Artiodactyla*), rodziny jeleniowatych (*Cervidae*). Ujawniono trzy wyraźne miejsca hybrydyzacji, z których dwa, podobnie jak u bydła, występowały w takim samym układzie na jednym ramieniu chromosomu X, z tą różnicą, że u bydła na ramieniu q, natomiast

u renifera na ramieniu p. Porównując heterosomy X obu gatunków, przy wykluczeniu podczas analiz heterochromatynowych bloków oraz dopuszczając niewielkie wewnątrzchromosomowe rearanżacje, można otrzymać homologię wzorów prążków G i R ramienia p chromosomu X bydła oraz ramienia q heterosomu X renifera. Obserwacje te pozwalają na przypuszczenie, że zmienność morfologii chromosomu X u różnych gatunków zwierząt związana jest z obecnością fragmentów heterochromatynowych, niekiedy traconych podczas ewolucyjnych strukturalnych reorganizacji, zwykle niezmiennających składu

grupy syntenicznej, ale powodujących modyfikacje grup sprzężeniowych.

Wyniki doświadczeń Prakash i in. (1996, 1997) potwierdziły dużą przydatność sond kosmidowych do porównań gatunków należących do tej samej rodziny (*Bovidae*), jak również bardziej odległych, z rodziny *Cervidae*, które w filogenezie rozeszły się 35 milionów lat temu.

Konserwatyzm genetyczny na poziomie sekwencji mikrosatelitarnych

Konserwatyzm genetyczny heterosomów na poziomie sekwencji mikrosatelitarnych analizowano u *Bovidae* w oparciu o mikrosatelity specyficzne dla niekoniugującego fragmentu heterosomu Y (tab. 1). Analiza zmienności haplotypowej sekwencji mikrosatelitarnych specy-

ficznych dla heterosomu Y u bydła, owiec i kóz wykazała przydatność trzech polimorficznych sekwencji: *INRA126*, *INRA189* i *BM861* do oceny konserwatyizmu genetycznego u badanych gatunków z rodziny *Bovidae* oraz ujawniła monomorficzny charakter locus *INRA124*. Uwzględnienie w doświadczeniu grup doświadczalnych złożonych z osobników żeńskich każdego gatunku miało na celu udowodnienie, że analizowane mikrosatelity są zlokalizowane w męskospecyficznym odcinku chromosomu Y (Kozubska-Sobocińska i in., 2008). Badania porównawcze przeprowadzone u *Bovidae* umożliwiły wykazanie konserwatyizmu genetycznego heterosomów u gatunków należących do tej rodziny oraz dostarczyły nowych markerów genetycznych przydatnych w analizach genomów mniej poznanych.

Literatura

- Chowdhary B.P., Fröncke L., Gustavsson I., Sherthan H. (1996). Comparative analysis of the cattle and human genomes: detection of ZOO-FISH and gene mapping – based chromosomal homologies. *Mammalian Genome*, 7: 297–302.
- Echard G. (1989). Domestic animal gene mapping: a comparative map of species investigated. In: *Cytogenetics of Animals*, Ed.: C.R.E. Halnan, C.A.B. International, ss. 84–94.
- Goldammer T., Brummer R.M., Weikard R., Schwerin M. (1996). Generation and use of chromosome fragment specific bovine DNA probes for cytogenetic studies in cattle. *Arch. Zootec.*, 45: 309–314.
- Hayes H. (1995). Chromosome painting with human chromosome-specific DNA libraries reveals the extent and distribution of conserved segments in bovine chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 71: 168–174.
- Hayes H., Petit E., Dutrillaux B. (1991). Comparison of RBG-banded karyotypes of cattle, sheep, and goats. *Cytogenet. Cell Genet.*, 57: 51–55.
- Iannuzzi L., Di Meo G.P. (1995). Chromosomal evolution in bovids: a comparison of cattle, sheep and goat G- and R-banded chromosomes and cytogenetic divergences among cattle, goat and river buffalo sex chromosomes. *Chromosome Res.*, 3: 291–299.
- ISCNDA 1989. (1990). International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals. *Cytogenet. Cell Genet.*, 53: 65–79.
- Kozubska-Sobocińska A., Słota E., Pieńkowska A. (2003). Zastosowanie techniki FISH do diagnozy chimeryzmu leukocytarnego u owiec. *Med. Wet.*, 59 (11): 987–989.
- Kozubska-Sobocińska A., Słota E., Pieńkowska-Schelling A., Schelling C. (2005). Comparative hybridization of Y chromosome in selected species of *Bovidae*. *Ann. Anim. Sci.*, 5 (1): 5–9.
- Kozubska-Sobocińska A., Ząbek T., Słota E., Kaczor U. (2007). Comparison of GTG-banded karyotypes and microsatellite sequences in some species of the *Bovidae* and *Cervidae* families. *J. Anim. Feed Sci.*, 16: 567–578.
- Kozubska-Sobocińska A., Radko A., Rejduch B., Słota E. (2008). Genetic conservation of Y chromosome basing on microsatellite sequences in some species of *Bovidae*. *Ann. Anim. Sci.*, 8 (3): 249–254.
- Ponce de Leon F.A., Carpio C. (1995). Identification of the bovine X-chromosome pseudoautosomal region. *Proc. 9th North. Amer. Colloq. Domest. Anim. Cytogenet. and Gene Mapping*, s. 8.

- Ponce de Leon F.A., Ambady S., Hawkins G.A., Kappes S.M., Bishop M.D., Robl J.M., Beattie C.W. (1996). Development of a bovine X chromosome linkage group and painting probes to assess cattle, sheep, and goat X chromosome segment homologies. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93 : 3450–3454.
- Prakash B., Kuosku V., Olsaker I., Gustavsson I., Chowdhary B.P. (1996). Comparative FISH mapping of bovine cosmids to reindeer chromosomes demonstrates conservation of the X-chromosome. *Chromosome Res.*, 4: 214–217.
- Prakash B., Olsaker I., Gustavsson I., Chowdhary B.P. (1997). FISH mapping of three bovine cosmids to cattle, goat, sheep and buffalo X chromosomes. *Hereditas*, 126: 115–119.
- Rejduch B., Kozubska-Sobocińska A., Radko A., Rychlik T., Słota E. (2004). The application of genetic markers for cell chimerism diagnosis in lamb. *J. Anim. Breed. Genet.*, 121: 197–203.
- Rejduch B., Kozubska-Sobocińska A., Słota E. (2005). Wykorzystanie bydłowej sondy malującej do identyfikacji heterosomu Y w plemnikach tryka. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 32, 1: 5–9.
- Révay T., Tardy E.P., Tóth A., Kovács A., Salgó A. (2000). Sexing bovine cells by FISH with a synthetic Y-probe. 14th Europ. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim., Abstr., Brno; s. 29.
- Révay T., Kovacs A., Rens W., Gustavsson I. (2002). Simultaneous detection of viability and sex bovine spermatozoa. *Reprod. Fert. Dev.*, 14: 373–376.
- Rychlik T., Kozubska-Sobocińska A., Rejduch B., Sikora J. (2005). The phenomenon of the cell chimerism in goats. *Vet. Med.-Czech.*, 50 (7): 311–314.
- Schnedl W., Czaker R. (1974). Centromeric heterochromatin and comparison of G-banding in cattle, goat, and sheep chromosomes (*Bovidae*). *Cytogenet. Cell Genet.*, 13: 246–255.
- Słota E., Kozubska-Sobocińska A., Bugno M., Giemza-Marek A., Kulig B. (2001). Comparison between the G-banded karyotype of the aoudad (*Ammotragus lervia*) and sheep (*Ovis aries*). *J. Appl. Genet.*, 42 (1): 59–64.
- Solinas-Toldo S., Lengauer C., Fries R. (1995). Comparative genome map of human and cattle. *Genomics*, 27: 489–496.
- Świtoński M. (1992 a). Mapowanie genów u zwierząt gospodarskich. *Med. Wet.*, 48: 131–134.
- Świtoński M. (1992 b). Wykorzystanie zjawiska konserwatyizmu genetycznego w mapowaniu genów u zwierząt. XI Zjazd PTG, Kraków, Mat. konf.: Genetyka 2000, ss. 13–18.

GENETIC CONSERVATION OF SEX CHROMOSOMES IN *BOVIDAE* FAMILY

Summary

The phenomenon of genetic conservation can be analysed using chromosome band patterns, gene order in linkage and syntenic groups, microsatellite sequences and nucleotide sequences of genes coding for the same products in different animal species. The conservative nature of sex chromosomes in *Bovidae* family enables bovine X- and Y-specific probes to be used to diagnose karyotype changes as leukocyte chimerism in sheep and goat or identification of heterosomes in spermatozoa in *Bovidae* species.

Comparative analysis at the level of microsatellite sequences specific for the non-conjugating fragment of Y chromosome showed that three polymorphic sequences: *INRA126*, *INRA189* and *BM861* are suitable for assessing of genetic conservation in the *Bovidae* species investigated and revealed the monomorphic nature of the *INRA124* locus.



**Jak to dawniej
na wsi bywało ...
w gospodarstwie hodowlanym**

(fot. D.D.)