

ЗЛОТИНА  
Анна Михайловна

ХРОМОСОМЫ ДОМАШНЕЙ КУРИЦЫ И ЯПОНСКОГО ПЕРЕПЕЛА  
(PHASIANIDAE, GALLIFORMES): СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МОЛЕКУЛЯРНО –  
ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт – Петербург – 2013

Работа выполнена в Санкт-Петербургском государственном университете в лаборатории структуры и функции хромосом кафедры цитологии и гистологии биолого-почвенного факультета

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор  
**Гагинская Елена Романовна**  
ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский  
государственный университет

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, доцент  
**Кузнецова Татьяна Владимировна**  
ведущий научный сотрудник  
ФГБУ НИИ акушерства и гинекологии  
им. Д.О.Отта СЗО РАМН, Санкт-Петербург

кандидат биологических наук  
**Трифонов Владимир Александрович**  
заведующий лабораторией сравнительной  
геномики ФГБУН Институт молекулярной и  
клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

Ведущее учреждение: ФГБУН Ботанический институт  
им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

Защита состоится «    » \_\_\_\_\_ 2013 г. в \_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного совета Д.212.232.12 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук и кандидата биологических наук при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9, Санкт-Петербургский государственный университет, биолого-почвенный факультет, кафедра генетики и биотехнологии, аудитория 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Горького Санкт-Петербургского государственного университета.

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2013 года

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д.212.232.12,

доктор биологических наук

**Мамон Людмила Андреевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Организация и эволюция кариотипов принадлежат к широко исследуемым проблемам современной биологии, при этом хромосомные перестройки и их потенциальная роль в процессе видообразования и генезисе генетически-обусловленных заболеваний вызывают особый интерес. Среди позвоночных животных к настоящему моменту в наибольшей степени изучены кариотипы млекопитающих (например: Graphodatsky et al., 2002; 2011; Murphy et al., 2005; Ferguson-Smith, Trifonov, 2007; Kemkemer et al., 2009; Romanenko et al., 2012; Trifonov et al., 2012). В то же время, исследования кариотипов других животных, в частности представителей класса Птицы, расширяют представления о закономерностях эволюции хромосом и о механизмах формирования хромосомных перестроек (Родионов, 1997; Burt et al., 1999; Griffin et al., 2007; Ellegren, 2010; Skinner, Griffin, 2012). Важность анализа хромосом представителей отряда Курообразные (Galliformes) также обусловлена большой хозяйственной ценностью ряда видов, актуальностью исследований в области их генетики, селекции и разведения, а кроме того, использованием птиц в качестве модельных объектов в разных областях биологии и биомедицины (De Groef et al., 2008; Huss et al., 2008; Datar, Bhonde, 2011).

Птицы характеризуются сложно устроенными кариотипами: типичный диплоидный набор представлен высоким числом хромосом, среди которых большая часть – крошечные морфологически сходные микрохромосомы (Tegelström, Rytman, 1981; Родионов, 1996; 1997; Burt, 2002; Griffin et al., 2007).

Кариотипы домашней курицы (*Gallus gallus domesticus*) и японского перепела (*Coturnix coturnix japonica*), двух представителей Курообразных, на первый взгляд очень сходны. Оба кариотипа содержат одинаковое число хромосом ( $2n=78$ ); в литературе описана высокая степень консерватизма ортологичных хромосом (Schmid et al., 2000; 2005; Shibusawa et al., 2001; Guttenbach et al., 2003; Galkina et al., 2006; Kayang et al., 2006; Sasazaki et al., 2006). Тем не менее, морфология (в первую очередь, положение центромеры) большинства ортологичных хромосом курицы и японского перепела заметно различается. Для исследования природы этих различий требуется детальный сравнительный цитогенетический анализ двух кариотипов. Ввиду небольшого физического размера митотических метафазных хромосом птиц, их стандартный цитогенетический анализ является крайне затруднительным. Для исследований хромосомных перестроек у птиц оказывается полезным использовать удлинённые хромосомы, а именно гигантские транскрипционно-активные хромосомы стадии ламповых щеток (ЛЩ) из растущих ооцитов.

Хромосомы-ламповые щетки – это сильно деконденсированные хромосомы диплотенной стадии профазы мейоза I, имеющие характерную хромомерно-петлевою организацию (обзоры: Callan, 1986; Morgan, 2002; Gaginskaya et al., 2009). На стадии ламповых щеток гомологичные хромосомы входят в состав бивалентов и объединены между собой в районах хиазм. Хромосомы-ЛЩ птиц в 20-30 раз превышают по размеру соответствующие метафазные хромосомы, кроме того, они обогащены цитологическими маркерами (Кропотова, Гагинская, 1984; Чельшева и др., 1990; Solovei et al., 1992; Родионов, 2001; Gaginskaya et al., 2009). Благодаря своим исключительным свойствам хромосомы-ЛЩ птиц оказываются удобным инструментом для физического картирования как уникальных последовательностей ДНК, клонированных в искусственных бактериальных хромосомах (BAC-клоны) (Galkina et al., 2006; Krasikova et al., 2006; Solinhac et al., 2010), так и повторяющихся последовательностей (Solovei et al., 1994; 1996; 1998; Saifitdinova et al., 2003; Krasikova et al., 2006; Deryusheva et al., 2007; Ogawa et al., 2007), с высоким уровнем разрешения.

Данные, полученные в ходе выполнения международного проекта по секвенированию генома курицы (ICGSC, 2004; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/111>), подробное описание кариотипа домашней курицы (Masabanda et al., 2004), а также наличие молекулярных зондов к индивидуальным хромосомам этого вида (Zoorob et al., 1996; Griffin et al., 1999; Crooijmans et al., 2000; Masabanda et al., 2004) служат необходимой базой для сравнительных молекулярно-цитогенетических исследований кариотипов птиц, в том числе представителей Курообразных.

**Целью** настоящей работы было исследование природы различий в морфологии (в частности, в положении центромер) ортологичных хромосом домашней курицы и японского перепела для выявления закономерностей кариотипических изменений в ходе эволюции птиц отряда Курообразные.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие конкретные **задачи**:

1. Локализовать центромер-специфичные последовательности макрохромосом 1, 2, 3, 5 и микрохромосом 11, 27 курицы на хромосомах типа ламповых щеток этого вида. Провести поиск последовательностей, гомологичных центромерным последовательностям этих хромосом курицы, на хромосомах японского перепела.

2. Провести поиск внутривхромосомных перестроек, различающих ортологичные макрохромосомы 1, 2, 3 домашней курицы и японского перепела. Для выявленных перестроек картировать с высоким уровнем разрешения точки разрывов/слияний.

3. Провести поиск внутривхромосомных перестроек, характеризующих наиболее крупные микрохромосомы домашней курицы (хромосомы 11 – 15) и их ортологи в кариотипе японского перепела. С высоким уровнем разрешения определить границы выявленных перестроек.

4. Охарактеризовать последовательности ДНК из районов разрывов/слияний на хромосомах, затронутых перестройками.

5. Провести сравнительный молекулярно-цитогенетический анализ околоцентромерных районов макрохромосом 1, 2, 3 и микрохромосом 11 - 15 курицы и ортологичных хромосом японского перепела. Проанализировать, чем обусловлены различия в положении центромер на ортологичных хромосомах у двух видов.

**Научная новизна работы.** В настоящей работе выявлен ряд новых внутривхромосомных перестроек, различающих ортологичные хромосомы домашней курицы и японского перепела. Для этих перестроек, а также для некоторых ранее описанных инверсий с высоким цитогенетическим разрешением определены границы. Впервые идентифицированы и детально охарактеризованы наиболее крупные микробиваленты курицы и ортологичные микробиваленты японского перепела. Полученные данные служат важным заданием для детальной характеристики микрохромосом в кариотипах обоих видов.

С использованием хромосом-ЛЦЦ показано, что в геноме японского перепела отсутствуют последовательности, гомологичные центромерным сателлитным повторам хромосом 1, 2, 3 и 11 курицы, тогда как уникальные центромерные последовательности хромосом 5 и 27 курицы присутствуют в центромерных районах ортологичных хромосом японского перепела.

Впервые проведен детальный сравнительный анализ положения фрагментов ДНК курицы, содержащихся в ВАС-клонах, относительно центромер на некоторых ортологичных хромосомах домашней курицы и японского перепела. Установлено, что дивергенции кариотипов двух видов сопутствовали не только инверсии, но и нередкие случаи формирования «эволюционно новых центромер».

**Практическая ценность работы.** Объекты исследования обладают большой сельскохозяйственной значимостью, что определяет практическую ценность настоящей работы. Результаты сравнительного картирования последовательностей ДНК на хромосомах-ЛЩ позволяют эффективно переносить информацию о хорошо изученных геноме и кариотипе курицы на значительно менее изученный кариотип японского перепела. С практической точки зрения особенно полезными оказываются результаты высокоразрешающего цитогенетического анализа микрохромосом, которые обогащены генами, в том числе генами, имеющими большую значимость для селекции. Кроме того, результаты физического картирования уникальных и повторяющихся последовательностей на ЛЩ курицы позволяют усовершенствовать карты упорядоченных секвенированных последовательностей хромосом этого вида. Так, в настоящей работе были уточнены и дополнены текущие версии карт макрохромосомы 3 и крупных микрохромосом курицы.

Результаты диссертации могут быть использованы в курсах лекций и практических занятий по клеточной биологии, цитогенетике, организации хромосом и эволюции кариотипов.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на 18-м (Бухарест, Румыния, 2008) и 19-м (Краков, Польша, 2010) Международных коллоквиумах по цитогенетике животных и картированию генов, на Международном научно-методическом семинаре «Современные методы микроскопии в исследовании живых систем» (Санкт-Петербург, 2008), на 12-ой Международной Пуцинской школе-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века» (Пушино, 2008), на Международной конференции «Хромосома 2009» (Новосибирск, 2009), на Международной конференции «Современные методы микроскопии в биологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2009), на 8-й Европейской конференции по цитогенетике (Порту, Португалия, 2011), на 18-й Международной конференции по хромосомам (Манчестер, Великобритания, 2011), на 6-й Международной конференции по курице (Эдинбург, Шотландия, 2011), на III-й конференции молодых ученых института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2012).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 5 статей.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 148 страницах машинописного текста, содержит 1 таблицу и 21 рисунок. Работа включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение, выводы и список цитированной литературы, состоящий из 272 источников.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалом** исследования служили хромосомы типа ламповых щеток, изолированные из растущих ооцитов домашней курицы (*Gallus g. domesticus*, GGA) и японского перепела (*Coturnix c. japonica*, CCO).

**Для получения препаратов хромосом** был использован метод микрохирургического выделения хромосом-ЛЩ из ооцитов амфибий, адаптированный для выделения ЛЩ птиц (Кропотова, Гагинская, 1984; Solovei et al., 1993; <http://projects.exeter.ac.uk/lampbrush/downloads/bird.doc>).

**Метод непрямого иммунофлуоресцентного окрашивания** использовали для выявления когезин-обогащенных центромерных гранул на хромосомах стадии ЛЩ обоих видов. Препараты окрашивали с помощью антител (АТ) против белков комплекса когезин по стандартной методике (Krasikova et al., 2005; 2006). В качестве первых АТ использовали поликлональные АТ K828 и K854 кролика против белков STAG2 и Rad21 человека,

соответственно (Prieto et al., 2004). После иммуноокрашивания препараты использовали для гибридизации *in situ*.

**Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH).** Для сравнительного картирования последовательностей ДНК на хромосомах двух видов в качестве зондов для FISH использовали 65 ВАС-клонов, содержащих фрагменты геномной ДНК курицы. Клоны из ВАС-библиотеки университета г. Вагенинген, Нидерланды (Crooijmans et al., 2000) были любезно предоставлены Р. Круймансом и М. Гроененом. Информация о положениях молекулярных маркеров или концевых последовательностей ВАС-клонов доступна в текущей версии сборки секвенированных последовательностей генома курицы (*Gallus\_gallus*-4.0, версия 3.1, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/111>). Для идентификации микробивалентов курицы и их ортологов у перепела дополнительно использовали цельнохромосомные зонды (англ. «chromosome paints») микрохромосом курицы (Griffin et al., 1999; Masabanda et al., 2004). ДНК ВАС-клонов выделяли по стандартной методике щелочного лизиса (Маниатис и др., 1984) с небольшими модификациями, амплифицировали с помощью DOP-PCR с вырожденными праймерами 6MW (Telenius et al., 1992), после чего метили гаптенами (биотином или дигоксигенином) с помощью ПЦР с теми же праймерами.

Центромерные сателлитные повторы хромосом 1, 2, 3 и 11 курицы амплифицировали из геномной ДНК и метили биотином с помощью ПЦР со специфичными праймерами (Krasikova et al., 2012), подобранными согласно первичным последовательностям соответствующих повторов (Shang et al., 2010). Для картирования центромер-специфичных уникальных последовательностей хромосом 5 и 27 курицы использовали ВАС-клоны, содержащие CENP-A-связывающую центромерную ДНК этих хромосом (Shang et al., 2010). В работе также были использованы одонитевые олигонуклеотидные зонды к коротким 41-п.н. tandemным CNM- и *BgIII*- повторам курицы и японского перепела, соответственно (Matzke et al., 1990; Tanaka et al., 2000; Krasikova et al., 2006; Derjusheva et al., 2007).

FISH на хромосомах-ЛЩ курицы проводили по стандартному протоколу ДНК/(ДНК+РНК-транскрипт)-гибридизации (Galkina et al., 2006). Гетерологичную гибридизацию на хромосомах японского перепела осуществляли при температуре 32-37°C. Гибридизацию с короткими зондами проводили при комнатной температуре в течение 3-5 часов или в течение ночи. Зонды, модифицированные дигоксигенином или биотином, детектировали с помощью антител против дигоксигенина, конъюгированных с флуорохромом Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories), и с помощью авидина, конъюгированного с флуорохромом Alexa 488 (Molecular Probes Inc.), соответственно. Для колокализации последовательностей ВАС-клонов и коротких повторов на одной и той же хромосоме, два набора различно меченых зондов гибридизовали на одном и том же препарате последовательно.

**Двумерная флуоресцентная и фазово-контрастная микроскопия.** Анализ препаратов осуществляли с помощью универсального флуоресцентного микроскопа DM4000B (Leica Wetzlar GmbH). Для получения изображения использовали программное обеспечение CW 4000 FISH (Leica Cambridge Ltd.).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Высокоразрешающее картирование центромерных последовательностей курицы на хромосомах типа ламповых щеток*

С целью как можно точнее картировать центромерные районы взятых в анализ макрохромосом 1, 2, 3, 5 и микрохромосом 11 и 27 курицы мы локализовали центромерные

последовательности этих хромосом на хромосомах типа ЛЩ того же вида (Krasikova et al., 2012). Стоит подчеркнуть, что центромеры хромосом 1, 2, 3 и 11 курицы содержат хромосомо-специфичные сателлитные повторы, тогда как центромеры хромосом 5 и 27 организованы необычно и представлены уникальными последовательностями, обогащенными интерсперсными повторами (Shang et al., 2010).

Центромерные сателлиты хромосом 1, 2, 3 и 11 локализовались в сильно конденсированных, обычно беспетлевых районах соответствующих хромосом-ЛЩ, называемых также «центромерными валиками» (Красикова, Гагинская, 2010; Macgregor, 2012). Как и ранее картированные центромерные повторы курицы (обзор: Красикова, Гагинская, 2010), локализованные в настоящей работе повторы приурочены к одной паре компактных хромомеров, фланкирующих центромерную когезин-обогащенную гранулу.

Центромерные последовательности большинства хромосом курицы были расшифрованы недавно, и до того момента на картах упорядоченных секвенированных фрагментов хромосом (версия 2.1, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) центромерные районы были представлены пропусками длиной 1,5 млн.п.н. и 0,5 млн.п.н. для макро- и микрохромосом, соответственно. Ранее было показано, что центромера на хромосоме 3 курицы (GGA3) не может соответствовать отведенному ей пропуску в положении 11,6-13,1 млн.п.н. (Krasikova et al., 2006). В настоящей работе было проведено детальное физическое картирование района 0-23 млн.п.н. ЛЩ3 курицы методом FISH с 23 ВАС-клонами, содержащими фрагменты геномной ДНК курицы (Zlotina et al., 2010). Совместное использование иммуноцитохимического выявления центромеры и многоцветной FISH на ЛЩ показало, что центромера на карте GGA3 соответствует пропуску между соседними контигами в положении 2,4 млн.п.н. (рисунок 2 а, б). Кроме того, мы получили доказательство того, что пропуски между контигами в положениях 5,6 млн.п.н. и 11,6 млн.п.н. соответствуют положению двух крупных нецентромерных блоков тандемного повтора CNM (рисунок 2 а, б), о существовании (но не о точной локализации) которых на этой хромосоме было известно ранее (Krasikova et al., 2006).

Последовательности, гомологичные хромосомо-специфичным центромерным сателлитам курицы, не удалось обнаружить в кариотипе японского перепела. На ЛЩ перепела они не были выявлены методом гетерологичной FISH, а также не были амплифицированы из тотальной геномной ДНК перепела методом ПЦР с праймерами, специфичными к центромерным сателлитам курицы. На основании полученных данных можно предположить, что в ходе дивергенции двух кариотипов центромер-специфичные тандемные последовательности эволюционировали независимо.

Уникальные центромерные последовательности хромосом 5 и 27 курицы также были успешно локализованы на соответствующих хромосомах-ЛЩ вблизи центромерных гранул. В отличие от сателлитных центромерных повторов курицы, которые, по всей видимости, являются видоспецифичными, эти последовательности обнаруживаются методом FISH и на хромосомах японского перепела. Более того, в настоящей работе было показано, что положение этих последовательностей в двух кариотипах консервативно.

Организация центромерного района микрохромосомы 27 оказалась наиболее сложной и необычной. Так, согласно полученным в работе данным, помимо уникальных CENP-A-связывающих последовательностей, содержащих рассеянные повторы, в центромерном районе GGA27 локализуется кластер тандемного повтора CNM. Ранее, путем секвенирования иммунопреципитированной фракции хроматина была выявлена способность последовательностей CNM связывать гистон CENP-A, что подразумевает участие CNM в формировании центромер на микрохромосомах (Shang et al., 2010). Таким образом, вероятно, что тандемно организованные последовательности CNM наряду с

уникальными последовательностями на определенных этапах клеточного цикла могут участвовать в сборке кинетохора хромосомы 27. Альтернативно, по крайней мере, в случае данной микрохромосомы, кластер повтора CNM может выполнять функцию прицентромерной ДНК. Интересно подчеркнуть, что центромерный район ортологичной микрохромосомы в кариотипе японского перепела (CCO27) также содержит последовательности разной природы, а именно уникальные последовательности, гомологичные центромерным последовательностям GGA27, и кластер видоспецифичного тандемного *BgIII*-повтора.

Исследуемые центромерные последовательности были нанесены на цитологические карты соответствующих хромосом стадии ЛЩ (рисунки 1, 2 и 3). Данные по детальному картированию центромерных последовательностей курицы на ЛЩ могут быть в дальнейшем использованы для высокоразрешающего цитогенетического анализа хромосом курицы, а так же могут быть полезны при сравнительных исследованиях кариотипов птиц, в частности, для анализа перестроек, захватывающих центромерные районы хромосом.

### ***Сравнительный анализ перестроек хромосом в кариотипах домашней курицы и японского перепела с использованием хромосом типа ламповых щеток***

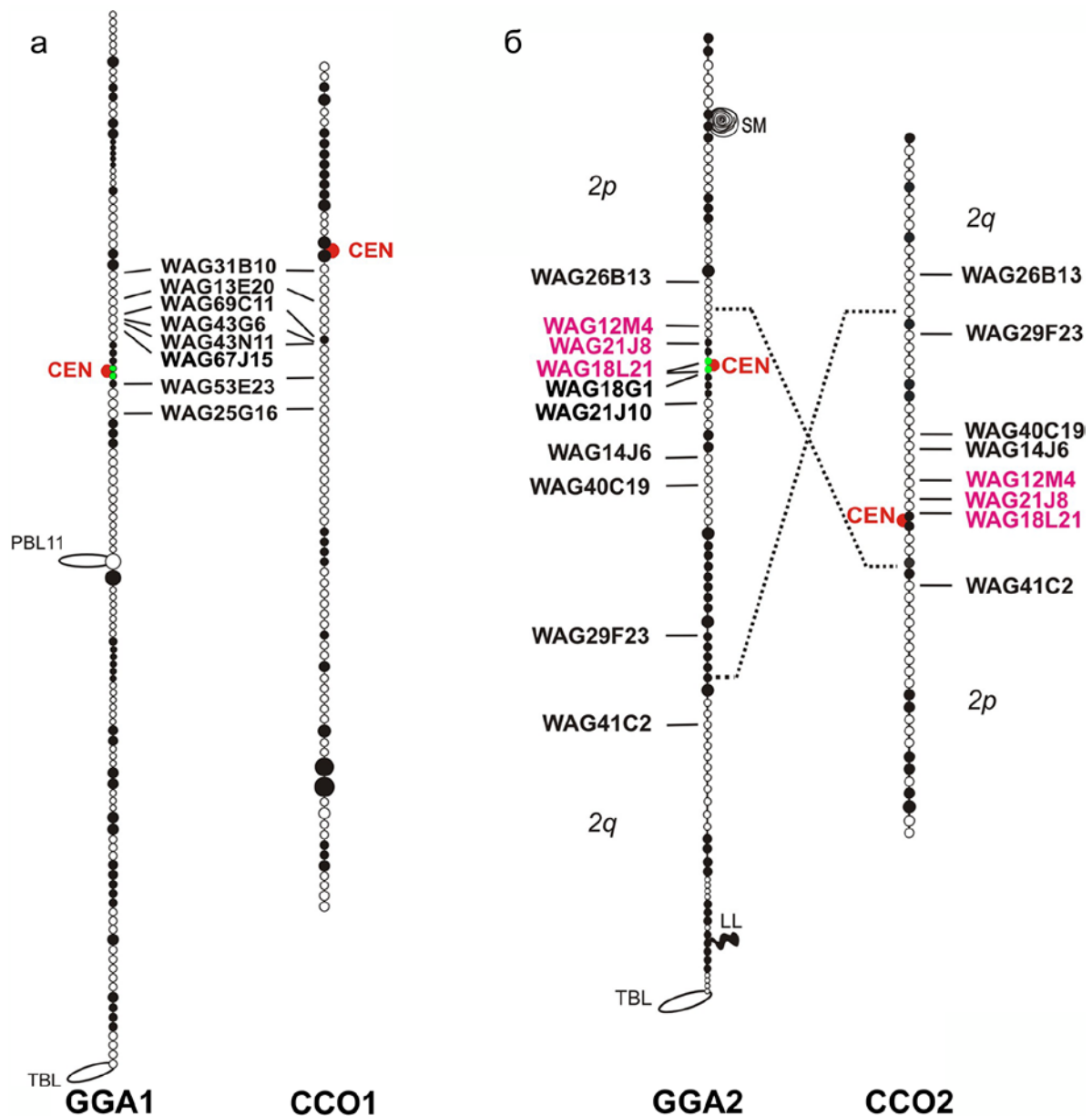
При исследовании внутрихромосомных перестроек, различающих кариотипы курицы и японского перепела, маркером положения центромер на хромосомах-ЛЩ служили центромер-специфичные последовательности и/или когезин-обогащенные центромерные гранулы. Ранее полученные данные подтверждают универсальность и надежность использования таких белковых структур в качестве маркеров центромеры на хромосомах типа ЛЩ птиц (Solovei et al., 1996; Saifitdinova et al., 2003; Krasikova et al., 2006; 2012).

#### **Макрохромосомы:**

**Хромосома 1.** Семь ВАС-клонов, покрывающих район 53,2 – 80,6 млн.п.н. на карте упорядоченных секвенированных последовательностей хромосомы 1 курицы (GGA1), успешно гибридизовались на хромосомах-ЛЩ обоих видов (Zlotina et al., 2012). Все используемые в анализе маркеры демонстрировали одинаковый порядок на GGA1 и ортологичной хромосоме 1 японского перепела (CCO1) (рисунок 1 а). Таким образом, разница в положении центромер на GGA1 и CCO1 не вызвана наличием перичентрической инверсии, предполагаемой ранее на основании цитогенетического анализа митотических хромосом у двух видов (Shibusawa et al., 2001; Kayang et al., 2006). Полученные нами результаты показали, что центромерные районы GGA1 и CCO1 находятся в окружении различного генетического материала (рисунок 1 а).

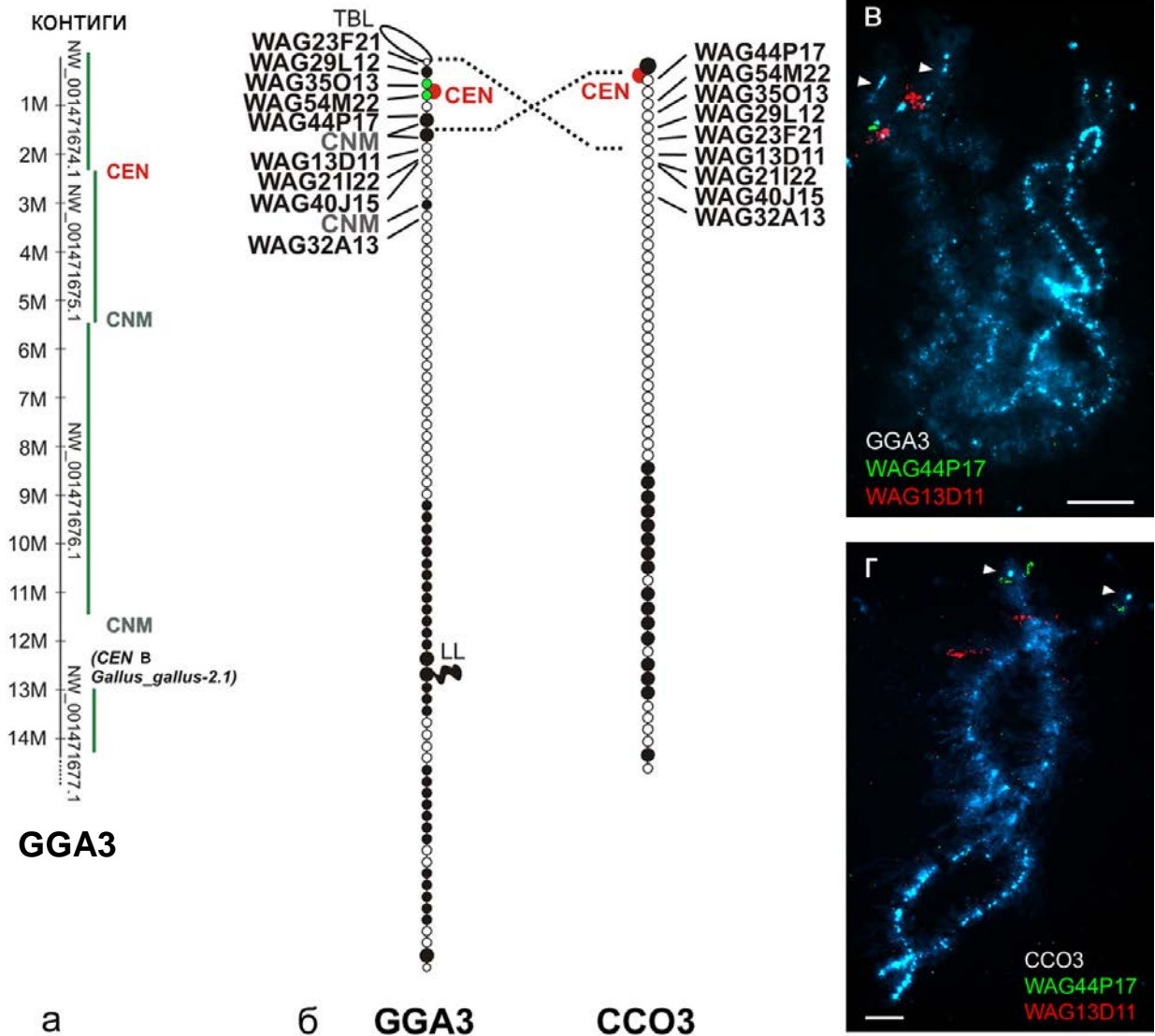
**Хромосома 2.** Сравнительное картирование ВАС-клонов, содержащих фрагменты хромосомы 2 курицы (GGA2), на хромосомах-ЛЩ двух видов подтвердило наличие ранее предполагаемой крупной перичентрической инверсии, различающей GGA2 и CCO2 (Shibusawa et al., 2001; Kayang et al., 2006; Sasazaki et al., 2006), и позволило уточнить её границы (рисунок 1 б). Так, одна граница локализуется в районе 38,5 млн.п.н. (WAG26B13) – 47,9 млн.п.н (WAG12M4), а другая – в положении между 85,2 млн.п.н (WAG29F23) и 97,0 млн.п.н (маркер в гене *Spir-1*, ранее картированном Sasazaki et al., 2006) на хромосоме 2 курицы. Внимательный анализ рисунка гибридизации картированных ВАС-клонов (в частности, клонов WAG12M4, WAG21J8 и WAG18L21, выделенных малиновым цветом на рисунке 1 б) на ЛЩ2 обоих видов позволил выявить наличие ещё одной структурной перестройки (инверсии) между GGA2 и CCO2, захватывающей центромеру.





**Рисунок 1.** Цитологические карты хромосомы-ЛЩ1 (а) и хромосомы-ЛЩ2 (б) курицы (GGA) и японского перепела (CCO) с нанесенными на них ВАС-клонами. Показаны центромерные гранулы (красный), яркие DAPI-позитивные хромомеры (черные осевые кружки), хромомеры, содержащие центромерные сателлиты (зеленый), границы крупной перичентрической инверсии (пунктир). PBL11, TBL, LL, SM – маркерные структуры.

**Хромосома 3.** Сравнительный анализ генетических карт генома курицы и японского перепела позволил предположить наличие инверсии, различающей хромосому 3 этих видов (Sasazaki et al., 2006); в то же время традиционными цитогенетическими методами какие-либо перестройки между хромосомой 3 курицы (GGA3) и перепела (CCO3) не выявлены. Сравнительное картирование ВАС-клонов на хромосомах-ЛЩ показало наличие инверсии в терминальном районе CCO3 по сравнению с GGA3, а также позволило точно определить границы перестройки (Zlotina et al., 2012). Одна из границ располагается в районе 0 - 380 тыс.п.н. (WAG23F21), а вторая – в районе 5,4 млн.п.н. (WAG44P17) - 5,8 млн.п.н. (WAG13D11) на хромосоме курицы (рисунок 2 б, в, г). Совокупность данных по локализации центромерной гранулы и картированию повтора Cen3 относительно ВАС-клонов на ЛЩ свидетельствует о том, что центромеры на GGA3 и CCO3 находятся в



**Рисунок 2.** Цитогенетический анализ хромосомы 3 курицы (GGA3) и японского перепела (CCO3). **а** - схема контигов из района 0-14 млн.п.н. на GGA3 (версия 2,1; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). На схеме обозначены пропуски, соответствующие центромере (CEN) и кластерам повтора CNM. **б** - Цитологические карты хромосомы-ЛЩ3 курицы и японского перепела с нанесенными ВАС-клонами. Обозначения как на рисунке 1. **в, г** - двухцветная FISH с ВАС WAG44P17 и WAG13D11 на хромосоме-ЛЩ3 курицы и перепела.

разном генетическом окружении. Таким образом, различие в положении центромера на хромосоме 3 курицы и перепела не может быть объяснено только наличием выявленной инверсии.

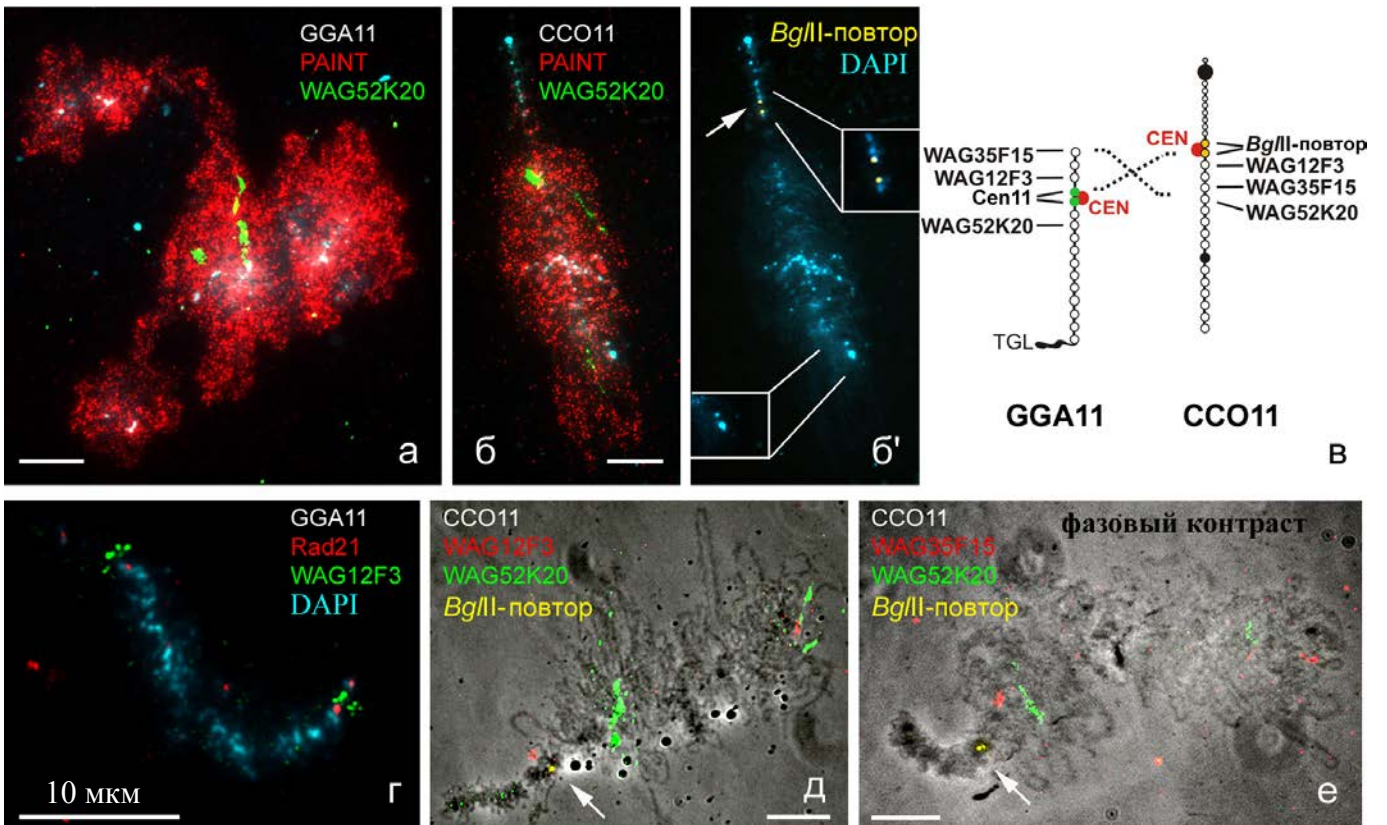
Важно отметить, что на хромосоме курицы одна из границ выявленной инверсии соответствует массивному кластеру тандемного повтора CNM (проксимальный кластер в положении 5,6 млн.п.н.) (рисунок 2 а, б). Интересным оказался тот факт, что в этом же положении была картирована точка разрыва/слияния инверсии, различающей GGA3 и ортологичную ей хромосому MGA2 в кариотипе индейки (Dalloul et al., 2010; Zhang et al., 2011). Вторая граница инверсии между GGA3 и MGA2 локализуется в положении 11,6 млн.п.н. на GGA3 (Dalloul et al., 2010; Zhang et al., 2011), где, как мы показали, располагается дистальный кластер повтора CNM (рисунок 2 а), и таким образом данная перестройка оказывается фланкированной двумя кластерами повтора.

Несмотря на то, что последовательности из точек разрывов/слияний хромосом у птиц остаются мало изученными, существующие данные, а также результаты настоящей работы свидетельствуют об участии повторяющихся последовательностей в эволюции кариотипов и геномов птиц. Так, недавно при тотальном выравнивании секвенированных геномов курицы, индейки (*Meleagris gallopavo*) и зебровой амадины (*Taeniopygia guttata*) в точках разрывов/слияний эволюционных перестроек было выявлено значительное обогащение различными классами повторов (Skinner, Griffin, 2012). Обнаружение повторов на границах хромосомных перестроек у птиц хорошо согласуется с данными о локализации повторяющихся последовательностей различной природы в точках разрывов хромосом других позвоночных (Slamovits, Rossi, 2002; Bailay et al., 2004; Armengol et al., 2005; Ruiz-Herrera et al., 2006, Kehrer-Sawatzki, Cooper, 2007; 2008; Adegas et al., 2009).

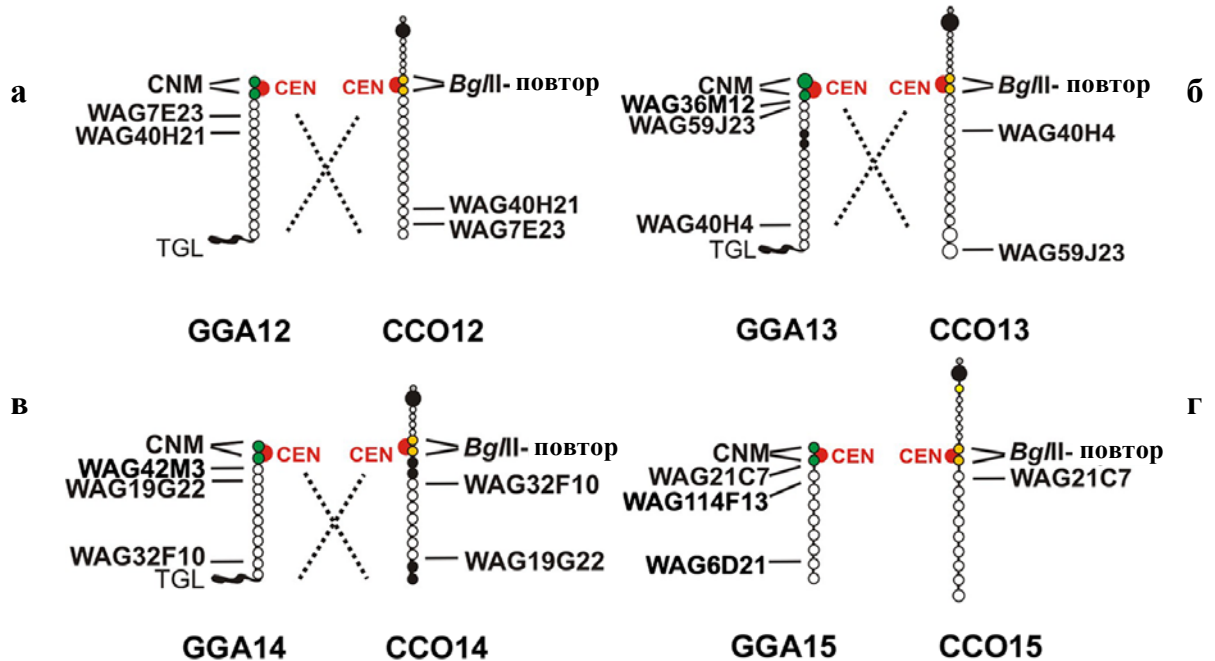
Молекулярные механизмы, лежащие в основе реструктуризации геномов позвоночных, в частности птиц, также мало понятны. В недавних работах британских исследователей у птиц была выявлена взаимосвязь между наличием структурных геномных перестроек и повышенным уровнем рекомбинации (Völker et al., 2010; Skinner, Griffin, 2012). Авторы полагают, что опосредовать формирование хромосомных перестроек в ходе эволюции могли механизмы неаллельной гомологичной рекомбинации. В связи с этим, интересным оказался тот факт, что оба кластера повтора CNM на хромосоме 3 курицы, обнаруживаемых нами на границах хромосомных перестроек у представителей Курообразных, являются горячими точками рекомбинации. Так, анализ распределения хиазм на хромосомах-ЛЩ позволяет оценить частоту рекомбинации в любом районе хромосомы вплоть до хромомера (Родионов и др., 1992; Родионов, 2001; Родионов, Чечик, 2002; Galkina et al., 2005). Результаты проведенного в настоящей работе анализа распределения хиазм внутри района 0-23 млн.п.н. на ЛЩ3 курицы демонстрируют, что в районах обоих кластеров CNM частота формирования хиазм повышена. Таким образом, полученные данные поддерживают гипотезу о повышенной рекомбинационной активности как механизме реорганизации геномов птиц.

**Микрохромосомы.** В настоящей работе были идентифицированы и подробно охарактеризованы наиболее крупные микробиваленты 11-15 курицы и их ортологи в кариотипе японского перепела (Zlotina et al., 2012). Ранее было показано, что микрохромосомы перепела обычно значительно длиннее, чем микрохромосомы курицы ввиду аккумуляции на их коротких плечах переменных по длине блоков гетерохроматина (Krasikova et al., 2009). Это затрудняет нумерацию микрохромосом перепела на основании их относительного размера. Принимая во внимание то, что два кариотипа содержат одинаковое число хромосом и межхромосомные перестройки, по-видимому, не были характерными событиями в ходе дивергенции двух кариотипов, мы условились нумеровать микрохромосомы перепела так же, как ортологичные им микрохромосомы курицы.

**Хромосома 11.** Цельнохромосомный зонд и ВАС-клоны, содержащие фрагменты хромосомы 11 курицы (GGA11), гибридизовались с одним относительно крупным микробивалентом в обоих кариотипах (рисунок 3 а, б). Сравнительное исследование локализации центромеры относительно молекулярных маркеров позволило выявить структурные различия между двумя ортологичными хромосомами. Так, ВАС-клоны WAG35F15 и WAG12F3 были картированы на коротком плече GGA11 (рисунок 3 в, г). Напротив, на ортологичной хромосоме японского перепела (CCO11) все используемые клоны локализовались на длинном плече (рисунок 3 в, д, е); короткое же плечо CCO11 сформировано частично деконденсированным гетерохроматином. Интересно, что хромосома-ЛЩ11 перепела оказалась полиморфной в отношении длины короткого плеча.



**Рисунок 3.** Сравнение микрохромосомы 11 курицы и ортологичной микрохромосомы японского перепела на стадии ламповых щеток. Идентификация хромосомы-ЛЦ11 курицы (а) и перепела (б). б' - FISH с центромерным *BglII*-повтором (желтый) на хромосоме перепела. в - цитологические карты ЛЦ11 обоих видов. Картирование ВАС-клонов курицы относительно центромеры на ЛЦ11 курицы (г) и перепела (д, е) методом FISH.



**Рисунок 4.** Цитологические карты микрохромосом-ЛЦ12 (а), ЛЦ13 (б), ЛЦ14 (в) и ЛЦ15 (г) курицы (GGA) и ортологичных микрохромосом-ЛЦ японского перепела (CCO) с картированными на них ВАС-клонами. Пунктирные линии указывают на инвертированный порядок генов на хромосомах перепела по сравнению с ортологичными хромосомами курицы.

Ранее было показано, что в некоторых ооцитах японского перепела встречаются ассиметричные биваленты, в которых более длинный гомолог - субметацентрик, а более короткий – акроцентрик, лишенный гетерохроматинового плеча и центромерного кластера *BgIII*-повтора (Deryusheva et al., 2007; Krasikova et al., 2009). В настоящей работе показано, что микробивалент 11 может быть одним из таких ассиметричных бивалентов (рисунок 3, б'). Альтернативно, в некоторых проанализированных ооцитах микробивалент 11 был образован двумя одинаковыми акроцентрическими гомологами.

Различный рисунок гибридизации ВАС-клонов WAG35F15, WAG12F3 и WAG52K20 на GGA11 и CCO11 свидетельствует о наличии перицентрической инверсии, захватывающей генетический материал всего короткого плеча GGA11, с точкой разрыва/слияния в районе центромеры, где содержится кластер сателлитного повтора *Sen11*. Интересно заметить, что инверсия этого же района была показана между GGA11 и её ортологом в кариотипе индейки (MGA13) (Dalloul et al., 2010; Zhang et al., 2011).

**Хромосома 12.** ВАС-клоны, содержащие фрагменты хромосомы 12 курицы (GGA12), выявили в наборах хромосом-ЛЩ обоих видов крупный микробивалент. ВАС-клоны WAG7E23 и WAG40H21 локализовались в непосредственной близости от терминальных DAPI-позитивных центромерных хромомеров на GGA12 (рисунок 4 а). В то же время, на ортологичной хромосоме японского перепела (CCO12) эти клоны были картированы в дистальном районе длинного плеча и в обратном порядке (рисунок 4 а). Таким образом, на GGA12 и CCO12 картированные ВАС-клоны демонстрируют обратный порядок относительно центромеры; центромеры на двух хромосомах находятся в разном генетическом окружении. При этом стоит подчеркнуть, что выявленная внутривидовая перестройка не может объяснить несовпадение центромерных индексов у GGA12 и CCO12.

**Хромосома 13.** В текущей версии карты упорядоченных секвенированных последовательностей хромосомы 13 курицы (GGA13) положение центромеры остается неоднозначным. Использование иммуноцитохимической детекции центромеры и картирования ВАС-клонов и повтора CNM на одном препарате хромосом-ЛЩ позволили нам однозначно локализовать центромерный район микрохромосомы 13 относительно молекулярных маркеров (рисунок 4 б).

Как и в случае микрохромосомы 12, картина гибридизации ВАС-клонов, содержащих последовательности GGA13, на ортологичной хромосоме японского перепела (CCO13) была неожиданной. Так, ВАС WAG59J23, маркирующий околоцентромерный район GGA13, на CCO13 локализовался в самом терминальном хромомере длинного плеча, тогда как ВАС WAG40H4, маркирующий q-терминальный конец GGA13, был картирован в проксимальном районе длинного плеча CCO13, на расстоянии нескольких хромомеров от центромеры (рисунок 4 б). Результаты свидетельствуют о том, что центромеры на GGA13 и CCO13 фланкированы разными последовательностями ДНК.

**Хромосома 14** на стадии ЛЩ у курицы (GGA14) была идентифицирована ранее (Дакс и др., 2009). В настоящей работе, с помощью гетерологичной FISH с несколькими ВАС-клонами был идентифицирован и охарактеризован ортологичный микробивалент японского перепела (CCO14). Как и в случае хромосомы 13, положение центромеры относительно молекулярных маркеров в текущей версии карты упорядоченных секвенированных фрагментов GGA14 неоднозначно. В связи с этим, для детального сравнительного анализа локализации центромер на GGA14 и CCO14 на ЛЩ двух видов были картированы ВАС-клоны, маркирующие оба конца этой хромосомы у курицы. ВАС-клоны WAG19G22 (положение 12,8 млн.п.н.) и WAG42M3 (13,8 млн.п.н.) локализируются на хромосоме курицы в непосредственной близости к CNM-позитивному хромомеру,

прилежащему к центромерной грануле, то есть маркирующему район центромеры (рисунок 4 с). Напротив, ВАС WAG32F10, содержащий последовательности из противоположного конца GGA14 (3,7 млн.п.н.), картирован в дистальном районе *q*-плеча ЛЩ курицы (рисунок 4 с). Такой гибридизационный рисунок, а также ранее полученные данные по картированию маркеров на ЛЩ14 курицы (Дакс и др., 2009), указывают на то, что реальный порядок генов относительно центромеры на GGA14 противоположен порядку, аннотированному в текущей версии карты GGA14.

На хромосоме-ЛЩ14 японского перепела оба ВАС-клона - WAG19G22 и WAG32F10 - также локализируются на длинном плече хромосомы, но в обратном порядке по сравнению с их расположением на хромосоме курицы (рисунок 4 с). При этом, как и в случае микрохромосом 12 и 13, центромеры на GGA14 и CCO14 оказываются фланкированными разными молекулярными маркерами.

**Хромосома 15.** На микрохромосоме 15 курицы (GGA15) ВАС-клон WAG21C7 (положение 11,8 млн.п.н.) прилежит крупному CNM-позитивному центромерному хромомеру, тогда как ВАС WAG6D21 (положение 0,7 млн.п.н.) картирован в *q*-терминальном районе (рисунок 4 д). Полученные результаты свидетельствуют о том, что, как и в случае хромосомы 14, в текущей версии сборки генома курицы на GGA15 неправильно аннотирован порядок генов относительно положения центромеры, и, таким образом, карты упорядоченных расшифрованных контигов хромосом 14 и 15 следует перевернуть. Важно, что эти результаты полностью согласуются с имеющимися данными о положении центромер на картах радиационных гибридов GGA14 и GGA15 (Morrison et al., 2007; д-р А. Вигнал, личное сообщение).

На ортологичной микрохромосоме перепела (CCO15) ВАС WAG21C7 локализован также на длинном плече, близко к центромере, а именно в хромомере, прилежащем к крупному центромерному кластеру *BgIII*-повтора (рисунок 4 д). Таким образом, центромеры на GGA15 и CCO15 фланкированы гомологичными последовательностями.

### ***Природа различий в морфологии хромосом домашней курицы и японского перепела: формирование центромер de novo или перицентрические инверсии?***

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что перицентрические инверсии не были главным механизмом изменения морфологии ортологичных хромосом при формировании кариотипов курицы и японского перепела. Так, по всей видимости, центромеры макрохромосом 1 (рисунок 1), 3 (рисунок 2) и 4 (Galkina et al., 2006), по крайней мере, у одного вида были сформированы *de novo* в ходе дивергенции двух кариотипов. Сходный пример формирования «эволюционно новых центромер» (ЭНЦ, англ. «evolutionary new centromere») у Курообразных был выявлен при сравнении кариотипов курицы и красноногий куропатки (*Alectoris rufa*, семейство Фазановые) (Kasai et al., 2003): на хромосоме 4 курицы и ортологичной хромосоме куропатки сохранился идентичный порядок генов, тогда как положение центромеры на них различно.

Феномен «перемещения центромеры» (англ. «centromere repositioning»), когда в ходе эволюции центромера возникает в новом локусе хромосомы без какого-либо изменения порядка генов на ней, был ранее описан в разных таксономических группах (например: Montefalcone et al., 1999; Nagaki et al., 2004; O'Neill et al., 2004; Kobayashi et al., 2008; Stanyon et al., 2008; Han et al., 2009; Piras et al., 2010; Rocchi et al., 2012; Trifonov et al., 2012). Считается, что именно перемещение центромеры могло представлять потенциально мощную эволюционную силу для репродуктивной изоляции и видообразования (Amor et al., 2004; Marshall et al., 2008). Стоит отметить, что механизмы, лежащие в основе данного явления, пока остаются не до конца понятными. Согласно одной из гипотез, описывающих

механизмы перемещения центромеры в ходе эволюции, данный процесс представляется в виде совокупности событий инактивации функциональной центромеры, содержащей сателлитную ДНК, и формирования нецентромеры в другом районе хромосомы с последующей фиксацией события в популяции (Amor et al., 2004; Marshall et al., 2008; Piras et al., 2010). При этом старая, инактивированная центромера со временем теряла сателлитные повторы, тогда как вновь сформировавшаяся центромера должна была приобрести сателлитную ДНК, преобразуясь, таким образом, в обычную «зрелую» центромеру и элиминируя свидетельства своей нецентромерной природы.

Можно ли согласно этой модели обнаружить свидетельства этапов формирования ЭНЦ в ходе эволюции Курообразных? В контексте данных, полученных в настоящей работе при сравнении кариотипов домашней курицы и японского перепела, можно было ожидать обнаружения различий в организации центромерных районов между хромосомами, на которых центромера сохраняла свое положение в ходе дивергенции двух кариотипов (хромосома 2), и хромосомами, на которых центромеры «перемещались» в новый локус (хромосомы 1, 3 и 4). Мы не знаем, как организованы центромерные районы этих хромосом у перепела, но, по крайней мере, в кариотипе курицы все они имеют сходную организацию и представлены тандемными повторами, очевидно произошедшими от общей анцестральной последовательности (Shang et al., 2010). Принимая во внимание время дивергенции курицы и японского перепела, а именно более 30 млн. лет назад (van Tuinen, Dyke, 2004), разумно предположить, что в ходе эволюции кариотипа курицы сформировавшиеся *de novo* центромеры могли со временем аккумулировать сателлитные повторы и, таким образом, преобразоваться в зрелые центромеры. В связи с этим, стоит подчеркнуть, что практически все обнаруженные к настоящему моменту ЭНЦ содержат в своем составе протяженные блоки сателлитных повторов и потому уже неотличимы по организации от обычных центромер (Rocchi et al., 2012). Альтернативно, центромеры на хромосомах 1, 3 и 4 в кариотипе курицы могли сохранить анцестральное положение, тогда как случаи формирования ЭНЦ сопровождали эволюцию кариотипа японского перепела, однако, без широкого сравнительного анализа ортологичных хромосом птиц, принадлежащих разным таксонам, эволюционная направленность случаев формирования ЭНЦ остается неопределенной.

Хромосомой, чья центромера была сформирована недавно в ходе эволюции, может являться хромосома 5 курицы. Так, центромера на GGA5 лишена сателлитных повторов, типичных для центромерных районов хромосом, и содержит уникальные последовательности и интерсперсные повторы (Shang et al., 2010). Именно такой тип организации, по всей видимости, может соответствовать начальным этапам формирования центромеры в ходе эволюции. В то же время, выявленная в настоящей работе консервативность локализации и состава центромерного района GGA5 и CCO5 свидетельствуют о том, что центромера сформировалась в этом локусе хромосомы ещё до момента дивергенции двух кариотипов от их общего предкового кариотипа. Интересно, что сходная организация центромер недавно была обнаружена в геноме картофеля (*Solanum tuberosum*) (Gong et al., 2012). В составе центромер пяти хромосом *S. tuberosum* были выявлены уникальные/низкокопийные последовательности ДНК, но не сателлитные повторы. Авторы предполагают, что центромеры, сформировавшиеся *de novo*, могли длительное время оставаться лишенными сателлитных повторов и медленно эволюционировать путем аккумуляции мутаций и встраивания транспозабельных элементов (Gong et al., 2012).

Как уже упоминалось ранее, центромерные районы микрохромосом домашней курицы и японского перепела маркированы консервативными центромерными повторами с

повторяющейся единицей длиной 41 п.н. - CNM и *BgIII*-повтором, соответственно, которые, по всей видимости, произошли от общей анцестральной последовательности (Matzke et al., 1990; Tanaka et al., 2000; Krasikova et al., 2006; Derjusheva et al., 2007). Означает ли это, что случаи «перемещения центромеры» затрагивали только макрохромосомы? На основании данных, полученных в настоящей работе, можно полагать, что, по крайней мере, на некоторых микрохромосомах центромера могла сформироваться *de novo* в ходе дивергенции двух видов. Так, результаты высокоразрешающего сравнительного анализа микрохромосом 12, 13 и 14 курицы и ортологичных хромосом японского перепела (рисунок 4) позволяют заключить, что на этих хромосомах при формировании одного из кариотипов могли происходить события перемещения центромеры или крупномасштабные парацентрические инверсии. Интересным является тот факт, что некоторые микрохромосомы в кариотипе курицы помимо центромерного кластера CNM содержат дополнительный кластер этого повтора в *q*-терминальном районе (Krasikova et al., 2006). Суммируя полученные результаты и данные литературы, мы можем предположить, что в ходе формирования современного кариотипа курицы могли происходить следующие события: (1) повтор CNM изначально маркировал оба конца хромосомы, при этом фиксация положения центромеры на одном из концов происходила стохастически, (2) «перемещение центромеры» происходило через удвоение CNM, и *q*-терминальный кластер представляет собой остаточный (следовой) массив сателлитной ДНК в старой инактивированной центромере, (3) парацентрические инверсии, вовлекающие материал целого плеча хромосомы, с точками разрывов/слияний в районах кластеров повтора сопутствовали дивергенции кариотипов двух видов.

Обсуждая природу различий в морфологии (в первую очередь, различия центромерного индекса) микрохромосом домашней курицы и японского перепела, следует отметить, что по сравнению с акроцентрическими микрохромосомами 11-15 курицы, ортологичные микрохромосомы перепела, по всей видимости, стали двулучными в процессе аккумуляции гетерохроматина. Такой гетерохроматин, как показано, формирует материал коротких плеч микрохромосом перепела (Krasikova et al., 2009). При этом особый случай представляет микрохромосома 11, где помимо формирования гетерохроматинового блока в ходе дивергенции двух кариотипов произошла перицентрическая инверсия района, соответствующего длинному плечу хромосомы курицы.

В заключение хочется подчеркнуть, что высокоразрешающее сравнительное картирование на гигантских хромосомах стадии ламповых щеток является удобным инструментом для изучения хромосомных перестроек, сопутствовавших эволюции кариотипов представителей Курообразные. Полученные результаты свидетельствуют о том, что количество внутривидовых изменений, сопровождавших эволюцию на первый взгляд очень консервативных кариотипов представителей отряда Курообразные, значительно больше, чем позволяют оценить методы стандартной цитогенетики с использованием митотических метафазных хромосом. В настоящей работе были выявлены ранее не описанные инверсии, различающие ортологичные хромосомы двух видов, а также с высоким разрешением картированы их точки разрывов/слияний. На границах выявленных инверсий были обнаружены тандемно повторяющиеся последовательности, характеризующиеся повышенной рекомбинационной активностью. Типы внутривидовых перестроек, различающих два кариотипа, по всей видимости, более разнообразны, чем считалось ранее. Так, выбранный методический подход позволил пересмотреть устоявшиеся представления о существовании множественных перицентрических инверсий, различающих хромосомы этих птиц. Помимо пара- и



перичентрических инверсий эволюцию кариотипов представителей Курообразных сопровождали события перемещения центромеры путем формирования центромер *de novo*.

## ВЫВОДЫ

1. Последовательности, гомологичные центромерным сателлитным повторам хромосом 1, 2, 3 и 11 курицы, отсутствуют в геноме японского перепела. Уникальные последовательности из центромерных районов хромосом 5 и 27 курицы присутствуют в геноме японского перепела и локализуются в центромерных районах соответствующих ортологичных хромосом.
2. Центромерные районы микрохромосомы 27 курицы и ортологичной микрохромосомы японского перепела организованы сходным образом и представлены уникальными последовательностями и кластерами тандемного повтора с длиной повторяющейся единицы 41 п.н.
3. В кариотипах домашней курицы и японского перепела отсутствует ранее предполагаемая инверсия перичентрического района хромосомы 1. Разница в положении центромеры на хромосоме 1 курицы и японского перепела обусловлена формированием центромеры *de novo* в ходе дивергенции двух кариотипов.
4. Ортологичные макрохромосомы 2 в кариотипе домашней курицы и японского перепела различают две инверсии, захватывающие центромерный район. Границы крупномасштабной инверсии располагаются в районах 38,5–47,9 млн.п.н. и 85,2–97,0 млн.п.н.
5. Хромосому 3 курицы и японского перепела различает инверсия, захватывающая терминальный район хромосомы. Границы инверсии располагаются в районах 0–380 тыс.п.н и 5,4–5,8 млн.п.н. на хромосоме 3 курицы, при этом «нижняя точка разрыва» соответствует кластеру тандемного повтора CNM. Разница в положении центромер на хромосоме 3 курицы и перепела обусловлена формированием центромеры *de novo* в ходе дивергенции двух кариотипов.
6. Кластеры повтора CNM в точках разрывов/слияний инверсий, различающих хромосому 3 курицы и её ортологов в кариотипах японского перепела и индейки, являются горячими точками рекомбинации.
7. Разница в положении центромеры на микрохромосоме 11 курицы и ортологичной хромосоме японского перепела обусловлена наличием перичентрической инверсии, при этом точка разрыва/слияния располагается в центромерном районе.
8. Центромеры ортологичных микрохромосом 12, 13, 14, но не микрохромосомы 15, курицы и японского перепела находятся в разном генетическом окружении. Различия в положении центромер относительно молекулярных маркеров на хромосомах 12, 13 и 14 у двух видов могут быть обусловлены либо формированием центромер *de novo*, либо наличием крупных парацентрических инверсий.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи:

1. **Zlotina A.**, Galkina S., Krasikova A., Crooijmans R., Groenen M., Gaginskaya E., Deryusheva S. Centromere positions in chicken and Japanese quail chromosomes: de novo centromere formation versus pericentric inversions // *Chromosome research*. 2012. V. 20. №8. P. 1017-1032.
2. Krasikova A., Fukagawa T., **Zlotina A.** High-resolution mapping and transcriptional activity analysis of chicken centromere sequences on giant lampbrush chromosomes // *Chromosome research*. 2012. V. 20. №8. P. 995-1008.

3. **Zlotina A.**, Galkina S., Krasikova A., Crooijmans R., Groenen M., Gaginskaya E., Deryusheva S. Precise centromere positioning on chicken chromosome 3 // *Cytogenetics and Genome Research*. 2010. V.129. № 4. P. 310-313.
4. Дакс А.А., Дерюшева С.Е., Красикова А.В., **Злотина А.М.**, Гагинская Е.Р., Галкина С.А. Хромосомы-ламповые щетки японского перепела *Coturnix coturnix japonica*: новая версия цитогенетических карт // *Генетика*. 2010. Т.46. № 10. С. 1335–1338.
5. Krasikova A., Daks A., **Zlotina A.**, Gaginskaya E. Polymorphic heterochromatic segments in Japanese quail microchromosomes // *Cytogenetics and Genome Research*. 2009. V. 126. № 1-2. P.148-155.

### Тезисы:

6. Красикова А.В., Маслова А.В., Василевская Е.В., **Злотина А.М.** Пространственная организация и транскрипционная активность сателлитной ДНК в клетках линии MDCC – MSB1 домашней курицы // *Цитология*. 2012. Т. 54. № 4. С. 345.
7. **Zlotina A.**, Krasikova A., Deryusheva S., Crooijmans R., Groenen M., Gaginskaya E., Galkina S. Comparative cytogenetic analysis of centromere positions in chicken and Japanese quail karyotypes using giant lampbrush chromosomes // *Chromosome Research*. 2011. V. 19. №1 (Supplement). P.190-191.
8. Krasikova A., Fukagawa T., **Zlotina A.** High- resolution mapping and analysis of transcriptional activity of chicken CENP-A- associated sequences on giant lampbrush chromosomes // *Abstract book of the 18-th International chromosome conference*. 2011. P.4.
9. Galkina S., **Zlotina A.** Comparative cytogenetic analysis of chicken and quail: high precision chromosome mapping // *Abstract book of the 6-th International chick meeting*. 2011. P. 36.
10. Galkina S., **Zlotina A.**, Daks A. High-resolution cytogenetic analysis of chicken microchromosomes // *Abstract book of the 18-th International chromosome conference*. 2011.P.87.
- 11.**Zlotina A.**, Galkina S., Crooijmans R., Groenen M., Gaginskaya E., Deryusheva S. Intrachromosomal rearrangements in chicken and Japanese quail karyotypes: inversions and neocentromere formation // *Chromosome Research*. 2010. V. 18. № 6. P. 728-729.
12. **Злотина А.М.**, Галкина С.А., Гагинская Е.Р. Цитогенетический и компьютерный анализ точек разрывов в хромосоме 3 у курицы и японского перепела // *Материалы международной конференции «Хромосома 2009»*. 2009. С. 128-129.
13. **Zlotina A.**, Galkina S., Derysheva S., Krasikova A., Gaginskaya E. Intrachromosomal rearrangements in chicken and Japanese quail karyotypes: in situ and in silico analysis // *Abstracts of the International conference «Modern microscopy techniques in biology and medicine»*. 2009. P.33.
14. **Zlotina A.**, Daks A., Galkina S., Deryusheva S., Krasikova A., Crooijmans R., Groenen M., Gaginskaya E. High-resolution comparative FISH mapping on chicken and Japanese quail lampbrush chromosomes // *Chromosome Research*. 2008. V. 16. № 7. P.1048.
15. **Злотина А.**, Галкина С., Красикова А., Дерюшева С., Гагинская Е. Центромерный район хромосомы 3 курицы (*Gallus gallus domesticus*): детальный цитогенетический анализ // *Сборник тезисов 12-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века»*. 2008. С. 26-27.
16. **Злотина А.М.** Галкина С.А. Красикова А.В. Дерюшева С.Е. Гагинская Е.Р. Детальное физическое картирование и распределение хиазм в центромерном районе хромосомы-ламповой щетки 3 курицы // *Материалы международного научно-методического семинара «Современные методы микроскопии в исследовании живых систем»*. 2008. С. 19.