

KATARZYNA ANDRASZEK, EWA WÓJCIK, ELŻBIETA SMALEC, URSZULA GAŁAŁA

*Instytut Bioinżynierii i Hodowli Zwierząt
Akademia Podlaska
B. Prusa 14, 08-110 Siedlce
E-mail: andrasz@ap.siedlce.pl
wojcik@ap.siedlce.pl
esmalec@ap.siedlce.pl
ula.galala@op.pl*

ROLA SEKWENCJI (TTAGGG)_n W BADANIACH KARIOTYPU I EWOLUCJI PTAKÓW

Ptaki są bardzo charakterystyczną grupą kręgowców. Jako jedyna filogenetyczna klasa posiadają pióra i umiejętność lotu (z wyjątkiem współczesnych *ratites*: emu, struś itp.). Oprócz tych widocznych cech ptaki charakteryzują się także małymi genomami i bardzo charakterystycznym kariotypem. Jedną z charakterystycznych cech ptasiego kariotypu jest obecność sekwencji (TTAGGG)_n w interstycjalnych częściach ramion chromosomów. U większości kręgowców sekwencje (TTAGGG)_n są zlokalizowane w telomerach chromosomów.

Telomery to fizyczne końce chromosomów eukariotycznych. Termin „telomer”

po raz pierwszy użył Hermann J. Müller w 1939 r. Nazwa pochodzi od greckich słów *telos* – koniec i *meros* – część. Telomery są zbudowane z powtarzających się sekwencji niekodującego DNA. Nie zawierają żadnych genów i nie kodują żadnych białek. Telomery człowieka, podobnie jak większości strunowców, świdrowców, śluzowców, grzybów, skorupiaków i niektórych pierścienic, składają się z tandemowych powtórzeń 5'TTAGGG3' (MOYZIS i współaut. 1988, ZAKIAN 1989). Telomery pełnią kluczową rolę w utrzymaniu stabilności chromosomów i zapobiegają utracie informacji genetycznej podczas kolejnych replikacji.

SPECYFIKA GENOMU I KARIOTYPU PTAKÓW

Genom ptaków stanowi około jednej trzeciej genomu człowieka i jest jednym z najmniejszych wśród kręgowców. Średnia wielkość genomu ptaków wynosi 1,4 pg ± 0,01 i waha się od 1,97 do 2,16 (BURT i współaut. 1999, www.genomesize.com). Ten stosunkowo mały genom upakowany jest w dużej liczbie chromosomów, z których większość to mikrochromosomy. Charakterystyczną ce-

chą kariotypu ptaków, obok (i) dużej liczby diploidalnej, (ii) obecności mikrochromosomów i (iii) heterogametyczności samic związanej z obecnością chromosomów ZW, jest obecność powtarzalnych sekwencji telomerowych (TTAGGG)_n, nie tylko w telomerach, ale także w interstycjalnych częściach ramion chromosomów.

LICZBA DIPLOIDALNA

Typowy ptasi kariotyp składa się z kilku lub kilkunastu makrochromosomów oraz około sześćdziesięciu mikrochromosomów

(CHRISTIDIS 1989, 1990). Pomimo dużej liczby chromosomów, ptaki charakteryzują się stałą liczbą diploidalną. Ponad 60% obecnie

żyjących gatunków charakteryzuje się diploidalną liczbą chromosomów na poziomie $2n = 74-86$, natomiast 24% na poziomie $2n = 66-74$. Skrajne wartości diploidalnej liczby chromosomów zaobserwowano u kulona (*Burhinus oedicnemus*), $2n = 40$ i u dudka (*Upupa epops*), $2n = 142$. Genom ptaków jest ewolucyjnie bardzo konserwatywny. Istniejące ptaki prymitywne (Palaeognathae), archaiczne Neognathae (Anseriformes, Galliformes), i wiele gatunków należących do wyższych Neognathae mają bardzo podobne kariotypy (CHRISTIDIS 1990, RODIONOV 1997). Klasyczne techniki barwienia umożliwiają stwierdzenie znacznych homologii pomiędzy makrochromosomami różnych gatunków (TAKAGI i SASAKI 1974, ANSARI i współaut. 1986). Doświadczenia wykorzystujące technikę ZOO-FISH pokazały silny konserwaryzm makrochromosomów pomiędzy kurą i emu, co sugeruje, że ich genomy podlegały tylko niewielkim zmianom od czasów dywergencji *ratites* i *carina-*

tes około 80 mln lat temu (SHETTY i współaut. 1999).

Pomimo podobieństwa kariotypów ptaków należących do różnych rzędów, u wielu gatunków widoczny jest wzrost lub spadek liczby mikrochromosomów. Na przykład Falconiformes, tzw. sokoły starego świata, mają względnie niewiele mikrochromosomów. Natomiast u Picidae (dzięciołów i dzioboróżców) liczba mikrochromosomów jest bardzo duża, a ewolucyjnie konserwatywny chromosom Z pozostaje największym chromosomem ich kariotypu (CHRISTIDIS 1990). Do wyjaśnienia pozostaje kwestia, czy mikrochromosomy współczesnych gatunków ptaków powstały z makrochromosomów przodków na drodze fragmentacji, czy też makrochromosomy powstały w wyniku fuzji mikrochromosomów.

Pewnym jest natomiast, że mikrochromosomy różnią się strukturą od makrochromosomów.

MIKROCHROMOSOMY I MAKROCHROMOSOMY

Długość mikrochromosomów w metafazie nie przekracza dwóch mikrometrów, a rutynowo stosowane techniki barwienia nie umożliwiają identyfikacji mikrochromosomów ptaków nawet w stosunku do położenia centromeru (BITGOOD i SHOFFNER 1990). Do lat 80. ubiegłego stulecia sądzono, że makro- i mikrochromosomy nie różnią się składem chemicznym (SCHMID 1962, DONNELLY i NEWCOMER 1963) oraz strukturą i zachowaniem podczas podziałów komórkowych (FORD i WOLLAM 1964).

Rozwój technik molekularnych w drugiej połowie lat 80. ubiegłego stulecia zmusił uczonych do zweryfikowania teorii o jednolitości mikro- i makrochromosomów. Przyznano częściowo rację Newcomerowi, który określił mikrochromosomy jako „chromosoidy”, w celu odróżnienia ich od „prawdziwych” chromosomów (NEWCOMER 1957). Współczesna nauka nie pozostawia wątpliwości, że mikrochromosomy różnią się strukturą od makrochromosomów, nie odbiera im jednak statusu prawdziwych chromosomów. DNA mikrochromosomów nie posiada charakterystycznego zwoju spiralnego i w efekcie mikrochromosomy są pozbawione najwyższego poziomu organizacji chromatyny (RODIONOV 1996). Ponadto, zastosowanie chromomycyny A3 (CMA) czy

DAPI, barwników łączących się specyficznie z parami A-T, pokazuje, że mikrochromosomy, w stosunku do makrochromosomów, charakteryzują się niższą zawartością par adenina-tymina (A-T) przy jednocześnie wyższej zawartości par guanina-cytozyna (G-C). Proporcjonalny wzrost liczby zasad G-C w mikrochromosomach wynika nie ze wzrostu liczby tych zasad, lecz z utraty zasad charakterystycznych dla sekwencji powtarzalnych, tj. A-T. Dlatego, chociaż mikrochromosomy stanowią 25-35% całkowitej długości genomu, zawartych jest w nich około 50% genów (FILLON i współaut. 1998, MASABANDA i współaut. 2004, GRIFFIN i współaut. 2007). Mikrochromosomy ptaków charakteryzuje trzykrotnie większa częstość crossing-over niż makrochromosomy. Może być to uwarunkowane występowaniem gorących miejsc rekombinacji (ang. hot-spot), które są obecne na każdym mikrochromosomie. Wysoka częstość crossing-over zwiększa prawdopodobieństwo ich prawidłowej segregacji podczas podziału meiotycznego. Konsekwencją wyższej zawartości zasad G-C jest również wcześniejsza replikacja mikrochromosomów (KAELBLING i FECHHEIMER 1983, RODIONOV 1996, BURT i współaut. 1999, SMITH i współaut. 2000).

DETERMINACJA PŁCI

Płeć ptaków, podobnie jak u ssaków, determinuje para chromosomów o niepełnej homologii: należący do mikrochromosomów chromosom W oraz makrochromosom Z. Chromosom Y ptaków, podobnie jak chromosom Y ssaków, u większości gatunków jest często całkowicie heterochromatynowy i jest jednym z najmniejszych chromosomów w kariotypie.

Inne nazewnictwo chromosomów płci jest związane z odmienną determinacją płci u ptaków – samica jest osobnikiem heterogametycznym – ZW (u ssaków, osobnikiem heterogametycznym jest samiec – XY), natomiast samce ptaków są homogametyczne – ZZ (u ssaków, osobnikiem homogametycznym jest samica – XX).

Na tle innych gatunków ptaków najlepiej poznany jest genom kury domowej (*Gallus domesticus*). Genom kury jest jedynym zmapowanym genomem nie tylko wśród ptaków, ale także wśród zwierząt gospodarskich. Opublikowanie pełnej sekwencji genomu kury wykazało, że w genomie kury i w genomie człowieka istnieje wiele odpowiadających sobie rejonów, wskazujących że, pomimo 300 milionów ewolucyjnego roz-

dzielenia ssaków i ptaków, wiele sekwencji DNA zachowało swój konserwatyzm (SCHMID i współaut. 2000, GUTTENBACH i współaut. 2003, ICGSC 2004, MASABANDA 2004, ELLEGREN 2007, GRIFFIN i współaut. 2007). Na tle innych gatunków ptaków, kariotyp *Gallus domesticus* jest także jedynym standaryzowanym opisem chromosomów (LADJALI-MOHAMEDI i współaut. 1999). Zarówno genom, jak i kariotyp *Gallus domesticus* stanowią punkt odniesienia w badaniach genetycznych na płaszczyźnie genomiki i cytogenetyki oraz w badaniach o charakterze ewolucyjnym.

Badania o charakterze ewolucyjnym podejmowane są między innymi pod kątem organizacji sekwencji telomerowych w makro- i mikrochromosomach, jako próba wyjaśnienia pochodzenia mikrochromosomów. Obecnie, na podstawie modelu „rozpadu i fuzji” uznano, iż przynajmniej 10 par mikrochromosomów *Gallus domesticus* jest wynikiem pęknięć makrochromosomów, a większa ich część odpowiada regionom chromosomów innych gatunków kręgowców, w tym człowieka. Nadal jednak pochodzenie mikrochromosomów nie jest do końca wyjaśnione (MASABANDA 2004, GRIFFIN i współaut. 2007).

ORGANIZACJA SEKWENCJI (TTAGGG)_n W CHROMOSOMACH PTAKÓW

Genom ptaków, w przeciwieństwie do genomów ssaków, jest obdarzony znaczną liczbą sekwencji (TTAGGG)_n w interstycjalnych częściach ramion chromosomów (ang. interstitial telomeric sequences, ITS – interstycjalne telomerowe sekwencje)

Sekwencje (TTAGGG)_n u ptaków występują ponadto w centromerowych i subcentromerowych obszarach ramion chromosomów. Zważywszy, że ptasi genom jest trzykrotnie mniejszy od genomu ssaków i większość genów jest skoncentrowana w mikrochromosomach, tak duża gęstość sekwencji telomerowych musi mieć jakieś funkcjonalne znaczenie. Ponadto ptaki, podobnie jak ssaki, charakteryzują się stosunkowo dłuższą rozpiętością życia, co czyni z nich interesujące modele w analizie dynamiki telomerów (PARTRIDGE i BARTON 1993, TAYLOR i DELANY 2000, NANDA i współaut. 2002).

Biologia telomeru ptaków stała się przedmiotem intensywnych badań od momentu wykrycia telomerazy w komórkach kurcząt

gatunku *Gallus*. Regulacja działania telomerazy u *Gallus* jest dokładnie taka sama jak w komórkach człowieka (VENKATESAN i PRICE 1998, DELANY i współaut. 2000).

Po raz pierwszy powtórzenia (TTAGGG)_n w chromosomach ptasich zmapowano dla 7 gatunków ptaków należących do różnych rzędów (MEYNE i współaut. 1990). Telomery ptaków, podobnie jak ssaków, są zbudowane z sekwencji powtórzeń 5'-(TTAGGG)_n-3', która stanowi wzór zachowany w trakcie ewolucji kręgowców. Chociaż wielkość genomu ptaków stanowi tylko 1/3 wielkości przeciętnego genomu ssaków, sekwencje telomerowe stanowią aż 4% ptasiego genomu. Natomiast w genomach ssaków sekwencje telomerowe stanowią zaledwie 0,3–0,4 %.

Długość sekwencji telomerowych u kury znajduje się w zakresie 0,5–2 Mb (DELANY i współaut. 2000, NANDA i współaut. 2002). W badaniach nad organizacją telomerów u kury dokonano podziału na 3 klasy w zależności wielkości (liczby powtórzeń sekwencji pod-

stawowej), lokalizacji w chromosomie i jego stabilności. Sekwencje telomerowe należące do klasy I są zlokalizowane w interstycjalnych częściach chromosomów, mają rozmiar 0,5–10 kb i nie znaleziono dotychczas dowodów na ich skracanie podczas replikacji. Klasa II, to sekwencje zlokalizowane terminalnie, o rozmiarze 10–40 kb. Sekwencje te ulegają skracaniu podczas kolejnych replikacji, czyli są związane z tzw. problemem replikacji końca i telomerową hipotezą starzenia się komórek. Sekwencje klasy III są również zlokalizowane terminalnie, mają długość 40 kb–2 Mb i nie ulegają skracaniu podczas kolejnych cykli komórkowych. Sekwencje klasy III występują przede wszystkim w mikrochromosomach (DELANY i współaut. 2000).

W badaniach nad telomerami ptaków stwierdzono paradoks polegający na tym, że pomimo ewolucyjnej redukcji niekodujących sekwencji powtarzalnych (skutkiem tego procesu było minimalizowanie genomu mikrochromosomów), liczba sekwencji telomerowych (również powtarzalnych i niekodujących) jest proporcjonalnie bardzo wysoka w stosunku do wszystkich sekwencji genomu ptaków (GRIFFIN i współaut. 2007).

Kolejną kwestią jest określenie, czy obecność interstycjalnych sekwencji telomerowych w makrochromosomach jest odzwierciedleniem miejsc fuzji mikrochromosomów. NANDA i współaut. (2006) nie zidentyfikowali interstycjalnych sekwencji telomerowych u sępów tzw. Starego Świata (*G. fulvus*, *G. rueppelli*, *G. barbatulus*). W efekcie nadal nie znaleziono potwierdzenia, że interstycjalne sekwencje telomerowe reprezentują archaiczne punkty fuzji mikrochromosomów.

Porównawcze badania cytogenetyczne sugerują, że do zróżnicowania kariotypów istniejących współcześnie gatunków ptaków przyczyniły się fuzje robertsonowskie. Powstały w wyniku fuzji chromosom może mieć zredukowane sekwencje (TTAGGG)_n albo być całkowicie pozbawiony telomerowych powtórzeń. W takim chromosomie mogą ujawniać się subcentromerowe sekwencje (TTAGGG)_n, najczęściej identyfikowane techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Sygnały hybrydyzacji występują, gdy „stare”, niedziałające sekwencje telomerowe blokowane są w punkcie fuzji. Następnie sekwencje (TTAGGG)_n osadzone w albo blisko heterochromatyny centromerowej mogą ulegać degradacji lub amplifikacji. Prawdopodobnie regiony centromerowe składają się z mozaiki różnych, powtarzal-

nych sekwencji DNA, wykazując skłonność do duplikacji, amplifikacji lub transpozycji (HORVATH i współaut. 2000). Podczas ewolucji ptaków następowały pęknięcia chromosomów, a nowe telomery lokalizowały się w regionie pęknięcia aby zapewnić stabilność nowopowstałych chromosomów. Fuzje mogą być przyczyną obecności interstycjalnych sekwencji telomerowych zlokalizowanych na całej długości makrochromosomów.

SEKWENCJE INTERSTYCJALNE (TTAGGG)_n

Interstycjalne sekwencje (TTAGGG)_n występują szczególnie często w kariotypach u kury i prymitywnych ptaków Palaeognathae. Zgadza się to z poglądem, że kariotyp Galliformes pochodzi od przodków jeszcze sprzed dywergencji (CHRISTIDIS 1990). U strusia wiele miejsc interstycjalnych pokrywa się ze wzorem heterochromatynowych, pozytywnych prążków C. U nandu i emu większość nietelomerowych miejsc (TTAGGG)_n nie jest zlokalizowana w obrębie pozytywnych prążków C. Miejsca interstycjalne na chromosomach 1, 2 i 3 u kury są także C-negatywne. Chromosomy te prawdopodobnie powstały w wyniku fuzji tandemowych (ANSARI i współaut. 1988, PIGOZZI 1997).

Zastosowanie techniki FISH w badaniach nad występowaniem sekwencji telomerowych u 16 różnych gatunków ptaków udowodniło, że mikrochromosomy są bardziej nasyczone sekwencjami telomerowymi niż makrochromosomy (NANDA i współaut. 2002). Wzór sekwencji subcentromerowych i interstycjalnych, oprócz typowej lokalizacji sekwencji telomerowych w terminalnych częściach ramion chromosomów, stwierdzono u kury (*Gallus domesticus*) i indyka (*Meleagris gallopavo*; Galliformes), wireonka skromnego (*Vireo belli*; Passeriformes), myszółowa rdzawosternego (*Buteo jamaicensis*; Falconiformes) i łuskowiaka azteckiego (*Columbina inca*; Columbinoformes) (NANDA i SCHMID 1994, NANDA i współaut. 2002). Z kolei u kondora kalifornijskiego (*Gymnogyps californianus*; Cathartiformes), nie stwierdzono miejsc hybrydyzacji interstycjalnej, podobnie jak u wróbla domowego (*Passer domesticus*; Passeriformes) i marabuta jawańskiego (*Leptoptilos javanicus*; Ciconiiformes) sygnały ograniczały się do zakończeń chromosomów (MEYNE i współaut. 1990, RAUDSEPP i współaut. 2002). Stwierdzono to również u sępów *Gyps fulvus* i *Gyps barbatrus* i kaniuka *Elanus caeruleus* (BED'HOM i współaut. 2003, NANDA i współaut. 2003). W porównaniu

do makrochromosomów, sygnały telomero- we były silniejsze na mikrochromosomach u wszystkich badanych gatunków, przy czym najsilniejsze stwierdzono na najmniejszych chromosomach (DELANY i współaut. 2000).

Duża częstotliwość sekwencji (TTAGGG)_n na mikrochromosomach może być traktowana jako element wyjaśnienia wysokiego tempa rekombinacji ptasich chromosomów, a szczególnie mikrochromosomów. W tym kontekście należy wspomnieć, że w porównaniu z makrochromosomami, w mikrochromosomach ujawnia się szczególnie duże tempo rekombinacji, przeciętnie 1 crossing-over pojawia się co 11–12 Mb (RODIONOV 1996). Każdy mikrochromosom tworzy guzek rekombinacyjny odzwierciedlający crossing-over (RAHN i SOLARI 1986). Zdolność sekwencji telomerowych do pobudzania rekombinacji wykazano także u drożdży (PLUTA i ZAKIAN 1989).

CENTROMEROWE I SUBCENTROMEROWE SEKWENCJE (TTAGGG)_n

W chromosomach ssaków i innych kręgowców sekwencje (TTAGGG)_n oprócz lokalizacji w telomerach, są sporadycznie zlokalizowane w pobliżu centromeru (MEYNE i współaut. 1990), który składa się z różnych typów satelitarnego DNA (LEE i współaut. 1997). Intensywne sygnały hybrydyzacji zidentyfikowane w rejonie centromerowym

chromosomów przepiórki (*Coturnix coturnix*) i bażanta (*Phasianus colchicus*) mogą sugerować, że satelitarne DNA w centromerach tych gatunków wzbogacane jest przez odcinki powtórzeń (TTAGGG)_n. Obfitość centromerowych miejsc (TTAGGG)_n ewentualnie może też wynikać z częstych fuzji chromosomowych podczas ewolucji kręgowców lub wtórnej amplifikacji związanych z centromerem sekwencji (TTAGGG)_n. Sygnały centromerowe i okołocentromerowe są szczególnie wyraźne u dwóch gatunków sów (Strigiformes), w dwuramiennych chromosomach powstałych w wyniku fuzji robertsonowskich. Chociaż heterochromatyna konstytutywna u puchaczy (*Bubo bubo*) znajduje się w centromerach chromosomów 1–4, centromerowe sekwencje (TTAGGG)_n zlokalizowano tylko na dwóch parach, chromosomie fuzyjnym 1 i 4, które zachowały się u większości Strigiformes. Stąd wniosek, że chromosom 4 puchacza pochodzi od wspólnego przodka Strigiformes dzięki fuzji dwóch mniejszych chromosomów telocentrycznych. Intensywne sygnały (TTAGGG)_n na centromerach subtelo- centrycznych chromosomów 2 i 3 puszczyka mszarnego (*Strix nebulosa*) mogą odzwierciedlać podobne przypadki fuzji.

Na Ryc. 1 przedstawiono lokalizację sekwencji telomerowych w chromosomach różnych gatunków ptaków.

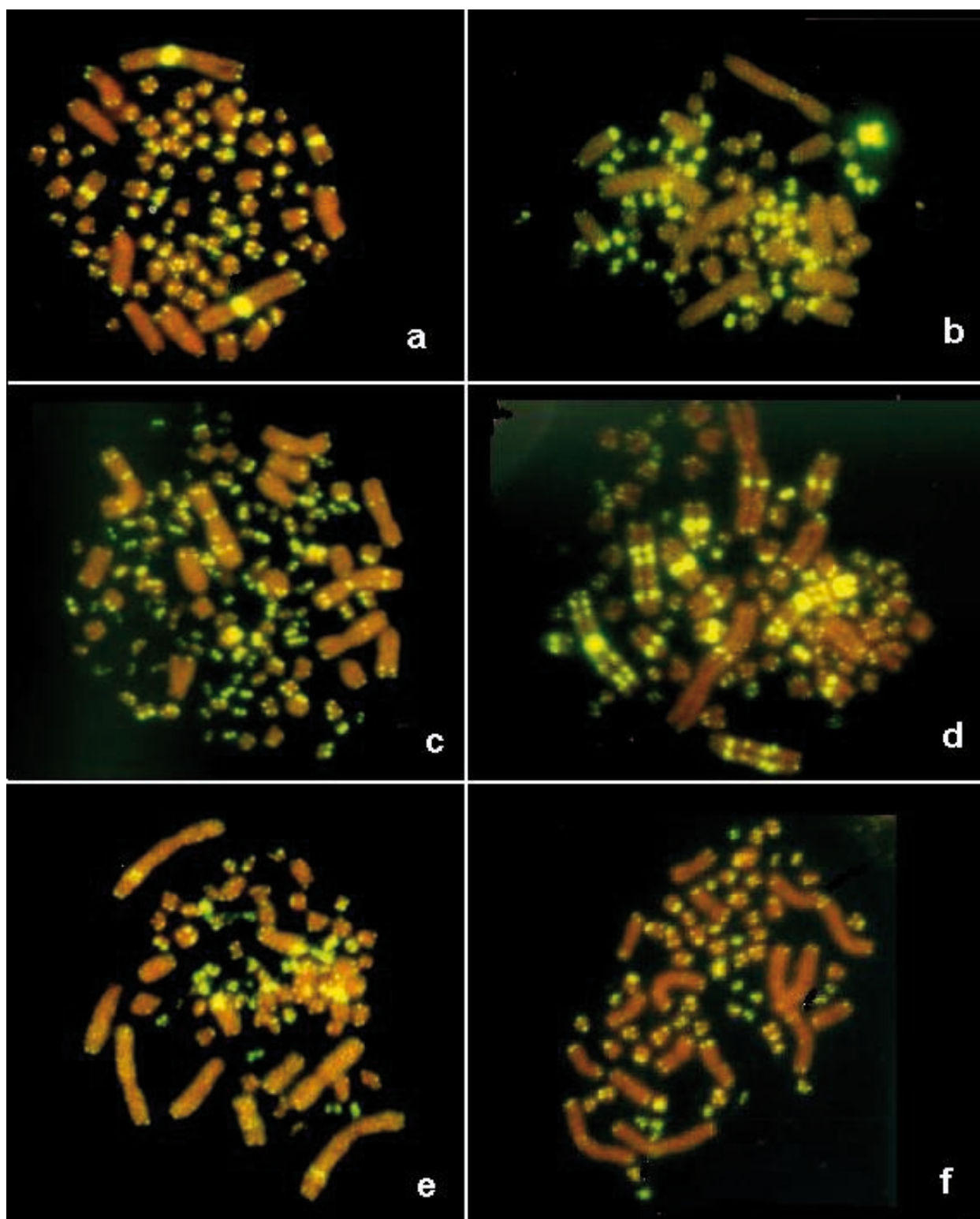
WYKORZYSTANIE CHROMOSOMÓW SZCZOTECZKOWYCH W IDENTYFIKACJI NIETELOMEROWYCH SEKWENCJI (TTAGGG)_n

Ogromną rolę w identyfikacji nietelomerowych (zlokalizowanych w innych niż telomero- we regionach chromosomów) sekwencji (TTAGGG)_n w kariotypach różnych gatunków ptaków odgrywają chromosomy szczoteczko- we (ang. lampbrush chromosomes - LBCs). Chromosomy szczoteczkowe, jako narzędzie w cytogenetyce drobiu, wprowadziły KROPOTOVA i GAGINSKAYA (1984) oraz HUTCHISON (1987). Autorki podtrzymują tezę, że LBCs dostarczają cennych informacji na temat ekspresji ptasich genów oraz są niezastąpione w badaniach cytogenetycznych u zwierząt o małych genomach, gdzie duża liczba chromosomów mitotycznych i ich małe rozmiary uniemożliwiają analizę mikrochromosomów. W raporcie dotyczącym genomu i chromosomów kury domowej (*Gallus domesticus*) chromosomy szczoteczkowe uznano za nowy

model w cytogenetyce ptaków (RODIONOV i współaut. 2005).

Podobnie jak w przypadku wzorów prążkowych chromosomów mitotycznych, chromosomy szczoteczkowe charakteryzują się specyficznym układem aktywnych i nieaktywnych chromomerów, obserwowanych jako wzór pętli bocznych i obszarów bezpętelkowych. Wzór ten oraz duże rozmiary LBCs umożliwiają lokalizację tzw. TTAGGG pozytywnych chromomerów i chiazm z dużą precyzją (RODIONOV i CHECHIK 2002, RODIONOV i współaut. 2002).

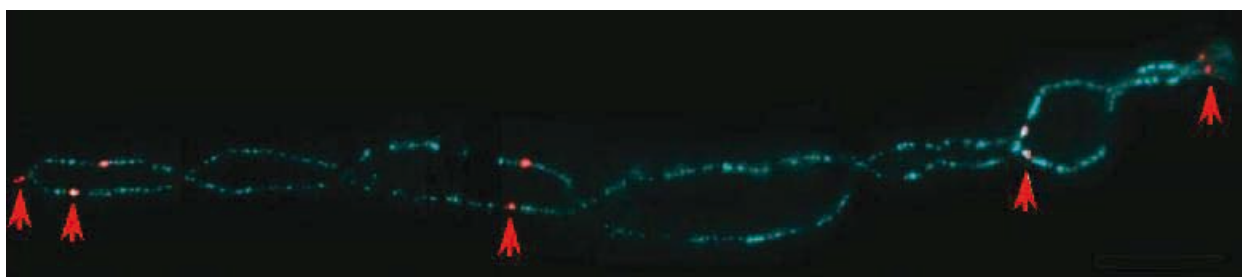
Lokalizacja sekwencji (TTAGGG)_n na chromosomach szczoteczkowych kury jest zgodna ze wzorem hybrydyzacji chromosomów mitotycznych (NANDA i SCHMID 1994, NANDA i współaut. 2002). TTAGGG pozytywne chromomery zostały zidentyfikowane nie



Ryc. 1. Lokalizacja sekwencji $(TTAGGG)_n$ w chromosomach wybranych gatunków ptaków: a – *Bubo bubo*, b – *Cairina moschata*, c – *Gallus domesticus*, d – *Struthio camelus*, e – *Anser anser*, f – *Streptopelia roseogrisea* (NANDA i współaut. 2002, zmodyfikowana).

tylko na końcach wszystkich LBCs kury, ale też w interstycjalnych miejscach biwalentów (GALKINA i współaut. 2005). Na Ryc. 2 przed-

stawiono lokalizację sekwencji telomerowych na pierwszym chromosomie szczoteczkowym *Gallus domesticus*.



Ryc. 2. Lokalizacja sekwencji (TTAGGG)_n na pierwszym chromosomie szczoteczkowym *Gallus domesticus* (GALKINA i współaut. 2005, zmodyfikowana).

ZNACZENIE NIATELOMEROWYCH SEKWENCJI (TTAGGG)_N W EWOLUCJI KARIOTYPÓW PTAKÓW

Zastosowanie techniki ZOO-FISH wykazało podobieństwo makrochromosomów w Galliformes oraz pomiędzy Galliformes i ptakami prymitywnymi (SHETTY i współaut. 1999, SCHMID i współaut. 2000). Zaobserwowano, że pomimo znacznego konserwatyizmu chromosomów, przebieg hybrydyzacji interstycjalnych sekwencji (TTAGGG)_n bardzo różni się pomiędzy tymi gatunkami, co wskazuje, że przeorganizowania chromosomów, z którymi związane są miejsca interstycjalne, pojawiały się podczas ewolucji ptaków. Mechanizmy takie jak crossing-over, konwersja czy transpozycja sekwencji, translokacje lub inwersje i nieproporcjonalna replikacja mogą powodować powielanie lub/i łączenie sekwencji (TTAGGG)_n w różnych miejscach chromosomów (HAAF i współaut. 1995, WARBURTON i WILLARD 1996). Z kolei stopniowe skracanie i degradacja nieaktywnych sekwencji (TTAGGG)_n może prowadzić do utraty interstycjalnych miejsc hybrydyzacji (TTAGGG)_n (SCHERTHAN 1990, SCHUBERT i współaut. 1992, GARAGNA i współaut. 1995, NANDA i współaut. 1995).

Z punktu widzenia ewolucji niezwykle interesujący jest wysoki konserwatyizm chromosomu Z. Chociaż chromosomy Z różnych gatunków ptaków różnią się morfologicznie nie zlokalizowano w nich nietelomerowych sekwencji (TTAGGG)_n. Najbardziej zauważalne jest to u strusia (*Struthio camelus*), u którego prawie wszystkie makrochromosomy, poza Z, ujawniają wielokrotne sygnały interstycjalne (TTAGGG)_n. Prawdopodobnie z powodu funkcji jaką pełni (chromosom płci), chromosom Z został zachowany w całości w trakcie ewolucji ptaków (OHNO 1967). Istnieje także teza, że nieobecność interstycjalnych miejsc telomerowych oraz związanych

z telomerami zmian ułożenia przyczyniła się do stabilności chromosomu Z przez okres co najmniej 120 mln lat ewolucji ptaków (VAN TUINEN i HEDGES 2001).

Najbardziej powszechne ewolucyjne zmiany chromosomowe przejawiają się w fuzjach centrycznych i rozszczepieniach, które wypierają miejsca telomerowe. Podczas ewolucji ptaków fuzje robertsonowskie stworzyły dwuramienne chromosomy w kariotypie kilku gatunków. Fuzja robertsonowska (fuzja centryczna) polega na połączeniu dwóch chromosomów akrocentrycznych w okolicach centromerów. Skutkiem takiej translokacji jest zmniejszenie liczby chromosomów o jeden, z równoczesnym zachowaniem liczby ramion chromosomów. Dla przykładu, wśród trzech gatunków sów i papużek falistych kilka dwuramiennych makrochromosomów jest uważanych za powstałe na skutek fuzji dwóch akrocentrycznych chromosomów (NANDA i współaut. 1995).

Papuzka falista (*Melopsittacus undulatus*), która spośród wszystkich papug ma największą liczbę chromosomów dwuramiennych, nie wykazuje nietelomerowych miejsc (TTAGGG)_n. Ogólnie zakłada się, że u gatunków z dużą liczbą diploidalną chromosomów fuzje prowadziły do powstania większych chromosomów dwuramiennych (VAN DONGEN i DE BOER 1984). Niepowodzenia w wykrywaniu sekwencji (TTAGGG)_n w miejscach fuzji mogą wynikać z różnych mechanizmów genomowych:

- całkowitej utraty sekwencji telomerowych przed fuzją na jednym końcu chromosomów pochodzących od przodków. Oznaczać to może, że pęknięcia pojawiły się w obrębie lub blisko heterochromatyny związanej z telomerem;

– fuzji chromosomów telocentrycznych i następującej po niej utracie oraz degradacji sekwencji telomerowych, co prowadziło do stopniowego skrócenia niedziałających odinków telomerowych.

Całkowity brak nietelomerowych miejsc (TTAGGG)_n sugeruje, że to pierwszy mechanizm mógł dominować w rodowodzie papużki falistej (SLIJEPCEVIC 1998).

PODSUMOWANIE

Ewolucja kariotypu ptaków rozpoczęła ok. 250 mln lat temu w erze triasu, jako skutek odseparowania się tych organizmów od gadów. Zainicjował się wówczas istotny proces – akumulacja mikrochromosomów, które średnio stanowiły 12,4 Mb wielkości genomu. Pochodzenie mikrochromosomów opiera się na przypuszczeniach i teoriach. Początkowo uznawano, że były to chromosomy pierwotne, które tworzyły w wyniku fuzji makrochromosomy. Obecnie, na podstawie modelu „rozpadu i fuzji” uznano, iż przynajmniej 10 par mikrochromosomów jest wynikiem pęknięć makrochromosomów. Zlokalizowanie

powtórzeń (TTAGGG)_n w różnych częściach chromosomach znacznie różniących się gatunków ptaków może doprowadzić do odpowiedzi czy wysoce zmienna liczba mikro- i makrochromosomów może mieć związek z telomerami. Telomery mogą być gubione lub mogą przyrastać podczas powstawania nowych gatunków w trakcie ewolucji gatunków. Silny konserwatyzm sekwencji telomerowej i jej obecność na telomerowych i nietelomerowych obszarach może być narzędziem, które umożliwi rekonstrukcję ewolucyjnych rearanżacji kariotypowych.

ROLE OF THE (TTAGGG)_n SEQUENCE IN STUDIES ON THE KARYOTYPE AND EVOLUTION OF BIRDS

Summary

As in mammalian chromosomes, avian chromosomes consist of 5'-(TTAGGG)_n-3' repeats, the sequence being the pattern conserved throughout vertebrate evolution. Although the avian genome is only 1/3 of the average mammalian genome, the telomeric sequences constitute as much as 4% of it and occur ten times more often than in mammals. What is particularly interesting from the point of view of bird karyotype evolution is research on the localization of telomeric sequences in the interstitial parts of chromosomal arms. Interstitial telomeric sequences occur on macro- and microchromosomes,

and their distribution, especially of those located on macrochromosomes, varies a lot. Interstitial telomeric sequences act as hot recombination places and they are correlated with occurrence of chiasms. High frequency of telomeric sequences in bird microchromosomes also results in a particularly high rate of microchromosome recombination. Determination whether interstitial telomeric sequences on macrochromosomes are evolutionary places of microchromosomal fusions is a very significant issue in studies on bird telomeric sequences.

LITERATURA

- ANSARI H. A., TAKAGI N., SASAKI M., 1986. *Interordinal conservatism of chromosomal banding patterns in Gallus domesticus (Galliformes) and Melopsittacus undulatus (Psittaciformes)*. Cytogenet. Cell Genet. 43, 6–9.
- ANSARI H. A., TAKAGI N., SASAKI M., 1988. *Morphological differentiation of sex chromosomes in three species of ratite birds*. Cytogenet. Cell Genet. 47, 185–188.
- BED'HOM B., COULLIN P., GUILLIER-GENCİK Z., MOULIN S., BERNHEIM A., VOLOBOUEV V., 2003. *Characterization of the atypical karyotype of the black-winged kite Elanus caeruleus (Falconiformes: Accipitridae) by means of classical and molecular cytogenetic techniques*. Chromosome Res. 11, 335–343.
- BITGOOD J., SHOFFNER R. N., 1990. *Cytology and cytogenetics*. [W:] *Poultry breeding and genetics*. CROWFORD B. D. (red.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo, 401–427.
- BURT D. W., BRULEY C., DUNN I. C., JONES C. T., RAMAGE A., LAW A. S., MORRICE D. R., PATON I. R., SMITH J., WINDSOR D., SAZANOV A., FRIES R., WADINGTON D., 1999. *The dynamics of chromosome evolution in birds and mammals*. Nature 402, 411–413.
- CHRISTIDIS L., 1989. *Karyotypic analyses in birds*. [W:] *Cytogenetics of animals* HALMAN C. (red.), Cambrian Printers, UK, 125–132.

- CHRISTIDIS L., 1990. *Aves*. [W:] *Animal cytogenetics 4: Chordata 3*. JOHN B. (red.). Gebrüder Bornträger, Berlin.
- DELANY M. E., KRUPKIN A. B., MILLER M. M., 2000. Organization of telomere sequences in birds: evidence for arrays of extreme length and for *in vivo* shortening. *Cytogenet. Cell Genet.* 90, 139-145.
- DONELLY G. M., NEWCOMER E. H., 1963. Autoradiographic patterns in cultured leucocytes of the Domestic fowl. *Exp. Cell Res.* 30, 363-368.
- ELLEGREN H., 2007. Molecular evolutionary genomics of birds. *Cytogenet. Genome Res.* 117, 120-30.
- FILLON V., MORISSON M., ZOOROB R., AUFRAY C., DOUAIRE M., GELLIN J., VIGNAL A., 1998. Identification of sixteen chicken microchromosomes by molecular markers using two color fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Chromosome Res.* 6, 307-313.
- FORD E. H. R., WOLLAM D. H. M., 1964. Testicular chromosomes of *Gallus domesticus*. *Chromosoma* (Berl.) 15, 568-578.
- GALKINA S., LUKINA N., ZAKHAROVA K., RODIONOV A. V., 2005. Interstitial (TTAGGG)_n sequences are not hot spots of recombination in the chicken lampbrush macrochromosomes 1-3. *Chromosome Res.* 13, 551-557.
- GARAGNA S., BROCCOLI D., REDI C. A., SEARLE J.B., COOKE H.J., CAPANNA E., 1995. Robertsonian metacentrics of the house mouse lose telomeric sequences but retain some minor satellite DNA in the pericentromeric area. *Chromosoma* 103, 685-692.
- GRIFFIN D. K., ROBERTSON L. B., TEMPEST H. G., SKINNER B. M., 2007. The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecular cytogenetics. *Cytogenet. Genome Res.* 117, 64-77.
- GUTTENBACH M., NANDA I., FEICHTINGER W., MASABANDA J. S., GRIFFIN D. K., SCHMID M., 2003. Comparative chromosome painting of chicken autosomal paints 1-9 in nine different bird species. *Cytogenet. Genome Res.* 103, 173-184.
- HAAF T., MATERA A. G., WIENBERG J., WARD D. C., 1995. Presence and abundance of CENP-B box sequences in great ape subsets of primate-specific α -satellite DNA. *J. Mol. Evol.* 41, 487-491.
- HORVATH J. E., SCHWARTZ S., EICHLER E. E., 2000. The mosaic structure of human pericentromeric DNA: a strategy for characterizing complex regions of the human genome. *Genome Res.* 10, 839-852.
- HUTCHISON N., 1987. Lampbrush chromosomes of the chicken *Gallus domesticus*. *J. Cell Sci.* 105, 1493-1500.
- ICGSC, 2004. Sequence and Comparative Analysis of the Chicken Genome Provide Unique Perspectives on Vertebrate Evolution. *Nature* 432, 695-716.
- KAELBLING M., FECHHEIMER N. S., 1983. Synaptonemal complexes and the chromosome complement of domestic fowl *Gallus domesticus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 35, 87-92.
- KROPOTOVA E. V., GAGINSKAYA E. R., 1984. Lampbrush chromosomes from the Japanese quail oocytes. *Tsitologiya* 26, 1008-1015.
- LADJALI-MOHAMMEDI K., BOTGOOD J. J., TIXIER-BOICHARD M., PONCE DE LEON F. A., 1999. International System for Standardized Avian Karyotypes (IS-SAK): standardized banded karyotypes of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Cytogenet. Cell Genet.* 86, 271-276.
- LEE C., WEVRICK R., FISHER R. B., FERGUSON-SMITH M. A., LIN C. C., 1997. Human centromeric DNAs. *Hum. Genet.* 100, 291-304.
- MASABANDA J. S., BURT D. W., O'BRIEN P. C., VIGNAL A., FILLON V., WALSH P. S., COX H., TEMPEST H. G., SMITH J., HABERMANN F., SCHMID M., MATSUDA Y., FERGUSON-SMITH M. A., CROOIJMANS R. P., GROENEN M. A., GRIFFIN D. K., 2004. Molecular Cytogenetic Definition of the Chicken Genome: The First Complete Avian Karyotype. *Genetics* 166, 1367-1373.
- MEYNE J., BAKER R. J., HOBART H. H., HSU T. C., RYDER O. A., WARD O. G., WILEY J. E., WURSTER-HILL D. H., YATES T. L., MOYZIS R. K., 1990. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequences in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99, 3-10.
- MOYZIS R. K., BUCKINGHAM J. M., CRAM L. S., DANI M., DEAVEN L. L., JONES M. D., MEYNE J., RATLIFF R. L., WU J. R., 1988. A Highly Conserved Repetitive DNA Sequence, (TTAGGG)_n, Present at the Telomeres of Human Chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6622-6626.
- NANDA I., SCHMID M., 1994. Localization of the telomeric (TTAGGG)_n sequence in chicken (*Gallus domesticus*) chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 65, 190-193.
- NANDA I., SCHNEIDER-RASP S., WINKING H., SCHMID M., 1995. Loss of telomeric sites in the chromosomes of *Mus musculus domesticus* (Rodentia: Muridae) during Robertsonian rearrangements. *Chromosome Res.* 3, 399-409.
- NANDA I., SCHRAMA D., FEICHTINGER W., HAAF T., SCHARTL M., SCHMID M., 2002. Distribution of telomeric (TTAGGG)_n sequences in avian chromosomes. *Chromosoma* 4, 215-227.
- NANDA I., KARL E., VOLOBOUEV V., GRIFFIN D. K., SCHARTL M., SCHMID M., 2006. Extensive gross genomic rearrangements between chicken and Old World vultures Falconiformes: Accipitridae. *Cytogenet. Genome Res.* 112, 286-295.
- NEWCOMER E. H., 1957. The mitotic chromosomes of the domestic fowl. *Hereditas* 48, 227-234.
- OHNO S., 1967. Sex chromosomes and sex linked genes, Springer, Berlin Heidelberg New York.
- PARTRIDGE L., BARTON N. H., 1993. Optimality, mutation and the evolution of ageing. *Nature* 362, 305-311.
- PIGOZZI M. I., 1997. Analisis citologico, ultraestructural y funcional del sistemamacromosomico sexual en la clase Aves. FCEyN, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- PLUTA A. F., ZAKIAN V. A., 1989. Recombination occurs during telomere formation in yeast. *Nature* 337, 429-433.
- RAHN M. I., SOLARI A. J., 1986. Recombination nodules in the oocytes of the chicken, *Gallus domesticus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 43, 187-193.
- RAUDSEPP T., HOUCK M. L., O'BRIEN P. C., FERGUSON-SMITH M. A., RYDER O. A., CHOWDHARY B. P., 2002. Cytogenetic analysis of California condor (*Gymnogyps californianus*) chromosomes: comparison with chicken (*Gallus gallus*) macrochromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 98, 54-60.
- RODIONOV A. V., 1996. Micro versus macro: a review of structure and functions of avian micro-and macrochromosomes. *Rus. J. Genet.* 32, 517-527.
- RODIONOV A. V., 1997. Evolution of avian chromosomes and linkage groups. *Rus. J. Genet.* 33, 605-617.
- RODIONOV A. V., CHECHIK M. S., 2002. Lampbrush chromosomes in the Japanese quail *Coturnix coturnix japonica*: cytological maps of macrochromosomes and meiotic crossover frequency in females. *Genetika* 38, 1246-1251.
- RODIONOV A. V., GALKINA S. A., LUKINA N. A., SOLOVEI I., SACCONI S., 2002. Crossing over in chicken oogenesis: cytological and chiasma-based genetic maps of the chicken lampbrush chromosome 1. *J. Hered.* 93, 125-129.

- RODIONOV A. V., GALKINA S. A., LUKINA N. A., 2005. *Maps of the lampbrush macrochromosomes of the chicken and Japanese quail*. [W:] *Second Report on Chicken Genes and Chromosomes 2005*. Cytogenet. Genome Res. 109, 415–479.
- SCHERTHAN H., 1990. *Localization of the repetitive telomeric sequence (TTAGGG) in two muntjac species and implications for their karyotypic evolution*. Cytogenet. Cell Genet. 53, 115–117.
- SCHMID W., 1962. *DNA replication patterns of the heterochromosomes in Gallus domesticus*. Cytogenetic 1, 344–352.
- SCHMID M., NANDA I., GUTTENBACH M., STEINLEIN C., HOEHN M., SCHARTL M., HAAF T., WEIGEND S., FRIES R., BUERSTEDDE J. M., WIMMERS K., BURT D. W., SMITH J., A'HARA S., LAW A., GRIFFIN D. K., BUMSTEAD N., KAUFMAN J., THOMSON P. A., BURKE T., GROENEN M. A., CROOIJMANS R. P., VIGNAL A., FILON V., MORISSON M., PITEL F., TIXIER-BOICHARD M., LADJALI-MOHAMMEDI K., HILLEL J., MAKI-TANILA A., CHENG H. H., DELANY M. E., BURNSIDE J., MIZUNO S., 2000. *First report on chicken genes and chromosomes 2000*. Cytogenet. Cell Genet. 90, 169–218.
- SCHUBERT I., SCHRIEVER-SCHWEMMER G., WERNER T., ADLER I. D., 1992. *Telomeric signals in Robertsonian fusion and fission chromosomes: implications for the origin of pseudoaneuploidy*. Cytogenet. Cell Genet. 59, 6–9.
- SHETTY S., GRIFFIN D. K., GRAVES J. A., 1999. *Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution*. Chromosome Res. 7, 289–295.
- SLIJEPCEVIC P., 1998. *Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion*. Chromosoma 107, 136–140.
- SMITH J., BRULEY C. K., PATON I. R., DUNN I., JONES C. T., WINDSOR D., MORRICE D. R., LAW A. S., MASABANDA J., SAZANOV A., WADDINGTON D., FRIES R., BURT D. W., 2000. *Differences in gene density on chicken macrochromosomes and microchromosomes*. Anim. Genet. 31, 96–103.
- TAKAGI N., SASAKI M., 1974. *A phylogenetic study of bird karyotypes*. Chromosoma 46, 91–120.
- TAYLOR H. A., DELANY M. E., 2000. *Ontogeny of telomerase in chicken: impact of downregulation on pre- and postnatal telomere length in vivo*. Dev. Growth Differ. 42, 613–621.
- VAN DONGEN M. W. M., DE BOER L. E. M., 1984. *Chromosome studies of 8 species of parrots of the families Cacatuidae and Psittacidae (Aves:Psittaciformes)*. Genetica 65, 109–117.
- VAN TUINEN M., HEDGES S. B., 2001. *Calibration of avian molecular clock*. Mol. Biol. Evol. 18, 206–213.
- VENKATESAN R. N., PRICE C., 1998. *Telomerase expression in chickens: constitutive activity in somatic tissues and down-regulation in culture*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14763–14768.
- WARBURTON P. E., WILLARD H. F., 1996. *Evolution of centromeric alpha satellite DNA: molecular organization within and between human and primate chromosomes*. [W:] *Human genome evolution*. JACKSON M., STRACHAN T., DOVER G. (red.), Bios Scientific Publishers, Oxford, UK, 121–145.
- ZAKIAN V. A., 1989. *Structure and function of telomeres*. Annu. Rev. Genet. 23, 579–604.