

ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
БИОЛОГИИ И БИОФИЗИКИ

На правах рукописи

Грушко Ольга Геннадьевна

УДК:575.2:575.8:576.875.771

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
ПРИЦЕНТРОМЕРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА МАЛЯРИЙНЫХ КОМАРОВ КОМПЛЕКСА  
*ANOPHELES MACULIPENNIS (CULICIDAE, DIPTERA)*

03.00.15 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель  
д-р биол. наук, профессор  
В. Н. Стегний

Томск 2005

Диссертация выполнена в НИИ Биологии и Биофизики при Томском государственном университете (Томск), в Институте Цитологии и Генетики СО РАН (Новосибирск) и в Научно-образовательном Центре Тропических Болезней Университета Нотр Дама (Notre Dame, США)

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор Стегний Владимир Николаевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук Степанов Вадим Анатольевич,  
кандидат биологических наук Перевозкин Валерий Петрович

Ведущая организация – Института биологии гена им. Н.К.Кольцова РАН (Москва)

Защита состоится « 9 » ноября \_\_\_\_\_ 2005 года в \_\_\_\_\_ 10 \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 212.267.10 при Томском государственном университете (634050, г. Томск, пр. Ленина, 36).

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Томского государственного университета.

Автореферат разослан « 9 » октября \_\_\_\_\_ 2005 года

Ученый секретарь диссертационного совета \_\_\_\_\_ Головацкая И.Ф.

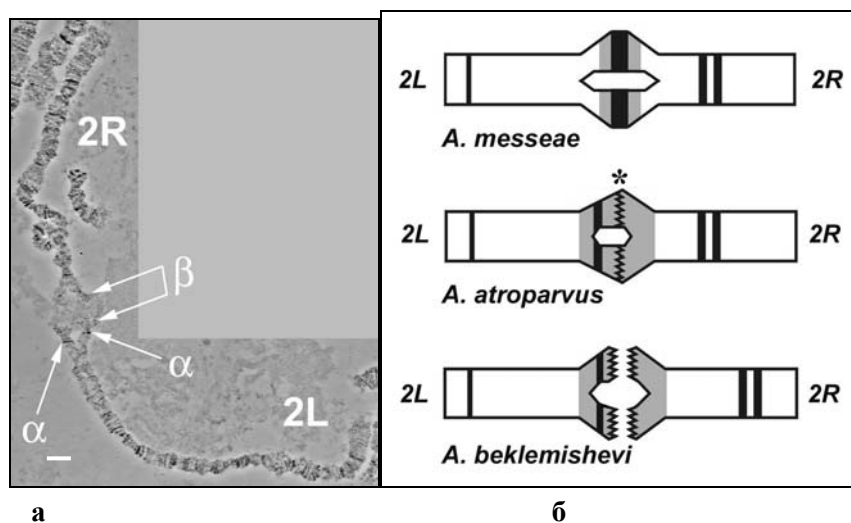
## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы

Насыщенный повторяющимися последовательностями ДНК и обедненный генами гетерохроматин (далее: ГХ) является важным функционально-структурным доменом генома эукариот, участвуя в протекании митоза, мейоза, в процессах генетической рекомбинации, в пространственной организации ядра и в регуляции генной экспрессии. ГХ характеризуется сильной эволюционной изменчивостью на цитологическом и молекулярном уровнях, что отражает его возможную роль в видообразовании. У малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* (*Culicidae*, *Diptera*) в политенных ядрах трофоцитов яичников был выявлен еще один аспект эволюционных преобразований ГХ: реорганизация его пространственного положения в ядрах клеток зародышевой линии. У восьми видов комплекса *Anopheles maculipennis* описаны четкие межвидовые различия в прочности и характере прикрепления ПГХ (далее: ПГХ) к ядерной оболочке (Стегний, 1979, 1987б; Стегний, Шарахова, 1991). Реорганизация структуры и связей с ядерной оболочкой ПГХ политенных хромосом при видообразовании была обнаружена также у дрозофил (*Drosophila*) двух подродов: в подгруппе *melanogaster* подрода *Sophophora* (Стегний, Вассерлауф, 1994), и в группе *virilis* подрода *Drosophila* (Стегний и др., 1996). Характер и направление преобразований ПГХ в группах близкородственных видов в видовых комплексах у *Anopheles* и *Drosophila* не случаен и совпадает с их филогенетическими отношениями, восстановленными на основании целого ряда признаков: перекрытия хромосомных инверсий, гибридологического анализа и биохимического анализа белков (Стегний, 1991). На основании различий пространственной структуры ГХ была предложена схема видообразовательных событий в видовых комплексах у *Anopheles* и *Drosophila*, и сформулирована теория системных мутаций, в которой преобразованиям ГХ, влияющим на пространственную организацию генома, отводится решающая роль в процессе видообразования (Стегний, 1987б, 1993). Таким образом, изучение состава ДНК ПГХ именно в этих группах помогло бы реконструировать обстоятельства, и, возможно, даже механизмы видообразовательных событий. Так как малярийные комары рода *Anopheles* являются переносчиками различных видов малярийного плазмодия, исследования молекулярных основ видообразования именно в этой группе насекомых актуальны и как теоретическая основа методов контроля распространения малярии, до сих пор занимающей первое место по смертности среди паразитических заболеваний человека (World Health Report, 2003). На примере многих видовых комплексов показано, что даже близкородственные виды *Anopheles* обладают различной способностью к переносу поражающих человека видов малярийных плазмодиев, различной антропофильностью, различной шириной ареала и численностью, что придает им разную эпидемическую значимость. Для понимания генетических основ этих явлений необходимы всесторонние исследования межвидовых отличий в организации геномов у видов рода *Anopheles*.

Дальнейшее изучение феномена реорганизации гетерохроматина при видообразовании видится нам как поиск ответов на вопросы: Какие именно различия на уровне последовательностей ДНК ответственны за разнообразие структуры ПГХ и характера его прикреплений к ядерной оболочке у видов комплекса *Anopheles maculipennis*? Связано ли образование контактов района ПГХ с ядерной оболочкой содержанием в нем каких-либо специфических последовательностей ДНК? Универсальны ли принципы изменений состава ПГХ, влияющих на пространственную организацию генома, при видообразовании в отряде двукрылых у *Anopheles* и у *Drosophila*? Для ответов на эти вопросы необходима характеристика состава ДНК отдельных районов ПГХ. Для клонирования и характеристики состава ДНК был выбран район диффузного  $\beta$ -ГХ правого плеча хромосомы 2 *A. atroparvus* (Рис. 1а), поскольку по структуре этого района и его прикреплению к ядерной оболочке

между видами комплекса *Anopheles maculipennis* наблюдаются наиболее яркие различия (Рис. 1б), а вид *A. atroparvus* введен в лабораторную культуру.



**Рисунок 1 – а – Микрофотография хромосомы 2 *A. atroparvus* в фазовом контрасте. Условные обозначения: 2R – правое плечо хромосомы, 2L – левое плечо хромосомы; α – блочный α-ГХ; β – диффузный β-ГХ правого плеча. Шкала – 10 мкм; б – Схема межвидовых различий в структуре прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 у видов комплекса *Anopheles maculipennis*. Условные обозначения: ■ – Блоки α-гетерохроматина; ▨ – Диффузный β-гетерохроматин; ΛΛΛ – Районы прикреплений к ядерной оболочке; \* – Зона факультативных контактов хромосомы 2 *A. atroparvus* с ядерной оболочкой.**

#### Цели и задачи исследования

Целью данной работы является характеристика состава ДНК ПГХ у видов комплекса *Anopheles maculipennis* и поиск молекулярной основы структурной и пространственной изменчивости ПГХ, сопровождающей видообразование. Были поставлены следующие задачи: 1) методом микродиссекции политенных хромосом, последующей амплификации материала с помощью DOP-ПЦР и клонирования в плазмидном векторе получить районспецифичную библиотеку ДНК ПГХ правого плеча хромосомы 2 *A. atroparvus*. Определить первичную последовательность клонированных фрагментов ДНК; 2) с использованием различных пакетов компьютерных программ проанализировать первичные последовательности фрагментов районспецифичной библиотеки ДНК. Выявить и охарактеризовать типичные для ГХ последовательности ДНК – повторы, мобильные элементы и гены. Проверить потенциальную способность фрагментов районспецифичной библиотеки ДНК к взаимодействию с различными белковыми структурами ядра; 3) провести сравнительный анализ общего состава ДНК ПГХ у видов комплекса *Anopheles maculipennis* с помощью *in situ* гибридизации библиотеки ДНК ПГХ правого плеча хромосомы 2 *A. atroparvus* с политенными хромосомами *A. atroparvus*, *A. messeae* и *A. beklemishevi*; 4) выявить в составе библиотеки консервативные повторяющиеся последовательности ДНК с помощью Саузерн-блот-гибридизации с мечеными геномными ДНК *A. atroparvus* и *A. messeae*. Выяснить особенности их распределения на политенных хромосомах *A. atroparvus* и *A. messeae* *A. beklemishevi* с помощью Саузерн-блот-гибридизации; 5) определить хромосомную локализацию консервативной повторяющейся последовательности ДНК из диффузного ПГХ *Drosophila melanogaster*, обеспечивающей связь ГХ с

ядерной оболочкой (клон  $\lambda 20p1.4$ ), у видов комплекса *melanogaster* (род *Drosophila* (*Sophophora*)) – *D. simulans*, *D. mauritiana* и *D. sechellia* с помощью *in situ* гибридизации. Сравнить особенности перераспределения при видообразовании консервативных повторяющихся последовательностей ДНК, способных к взаимодействию с белковыми структурами ядра, в видовых комплексах *Anopheles maculipennis* и *Drosophila melanogaster*.

#### Научная новизна

Впервые проведено прямое клонирование и изучение состава ДНК района ПГХ у малярийного комара. Анализ первичной последовательности полученных фрагментов ДНК показал, что ПГХ правого плеча хромосомы 2 *A. atroparvus* образован смесью различных повторяющихся ДНК, большинство которых – АТ-богатые, консервативны в комплексе *Anopheles maculipennis* и потенциально способны к взаимодействию с различными белковыми структурами ядра. В составе исследованного района описаны типичные для конститутивного ГХ классы ДНК – повторы, мобильные элементы и структурные гены.

Оценена эволюционная изменчивость отдельных последовательностей в составе ПГХ. Повторяющиеся последовательности ДНК консервативны в комплексах близкородственных видов, что было показано в ходе межвидовых *in situ* и Саузерн-блот-гибридизаций ДНК районспецифичного зонда и отдельных фрагментов библиотеки ПГХ правого плеча хромосомы 2 *A. atroparvus* в комплексе *Anopheles maculipennis*, а также – в ходе межвидовых *in situ* гибридизаций клона  $\lambda 20p1.4$  в комплексе *Drosophila melanogaster*. Мобильные элементы и структурные гены консервативны в отряде двукрылых насекомых, что показано в ходе сравнения фрагментов библиотеки ПГХ правого плеча хромосомы 2 *A. atroparvus* с известными последовательностями из геномов *Drosophila melanogaster* и *Anopheles gambiae*.

Впервые продемонстрированы различия районов ПГХ разной структуры и отношений к ядерной оболочке у малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* на уровне состава ДНК. В составе каждого исследованного района ПГХ были обнаружены хромосомоспецифичные повторяющиеся последовательности ДНК. Кроме того, обнаружено, что состав каждого района ПГХ у малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* уникален по композиции повторов повторяющихся последовательностей ДНК.

Показано, что структура района ПГХ и его прикрепление к ядерной оболочке как у *Drosophila*, так и у *Anopheles*, напрямую не связаны с наличием либо отсутствием в его составе последовательностей ДНК, способных к взаимодействию с белковыми структурами ядра.

#### Практическая ценность

Описан состав ДНК ПГХ хромосомы 2 *A. atroparvus*, и обнаружены межвидовые и межхромосомные отличия в составе ДНК различного по структуре ПГХ у видов комплекса *Anopheles maculipennis*. Подтверждается универсальность принципов организации ПГХ у двукрылых насекомых. Полученная библиотека клонов ДНК ПГХ правого плеча хромосомы 2 *A. atroparvus* является ценным материалом для дальнейших исследований ПГХ у малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis*.

#### Апробация результатов

Результаты исследований были представлены на VI Совещании диптерологов, посвященном 100-летию А.А. Шталькельберга, “Место и роль двукрылых насекомых в экосистемах”, Санкт-Петербург (1997), на I международном симпозиуме “Эволюция жизни на Земле”, Томск (1997), на Международной конференции, посвященной 80-летию со дня рождения академика Д.К. Беляева, “Современные концепции эволюционной генетики”, Новосибирск (1997), на региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Сибирская школа молодого ученого”, Томск (1998), на II съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров, Санкт-Петербург (2000), на I Международной конференции “Проблема вида и видообразование”, Томск (2000), и на VII интернациональной конференции по гетерохроматину *Drosophila* (“Seventh

International Conference on Drosophila Heterochromatin"), Губбио, Италия (2005) и на XV Всероссийском симпозиуме по структуре и функциям клеточного ядра, Санкт-Петербург (2005).

#### Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 работ.

#### Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, в который входит 190 ссылок, и 7 приложений. Работа изложена на 135 страницах, содержит 19 рисунков и 4 таблицы.

#### Вклад автора

Основные результаты получены автором самостоятельно. Микродиссекция и DOP-ПЦР проводились совместно с д.б.н. Н. Б. Рубцовым и к.б.н. Т. В. Карамышевой. Эксперименты по Саузерн-блот-гибридизации и секвенированию – с к.б.н. А. И. Шевченко и к.б.н. М. В. Шараховой. *In situ* гибридации проводились при участии к.б.н. И. В. Шарахова.

#### Благодарности

Автор выражает глубокую признательность Э. М. Баричевой (сектор нейрогенетики дрозофилы, ИЦИГ, Новосибирск), Н. Дж. Безански (Научно-образовательный Центр Тропических Болезней, Университет Нотр Дама, США) и Н. Б. Рубцову (Центр коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН, Новосибирск) за предоставление материальной базы для проведения экспериментов, а также - И. В. Шарахову, А. И. Шевченко, М. В. Шараховой и Т. В. Карамышевой за обучение, помощь в выполнении экспериментов и постоянную поддержку в ходе работы. За поддержку и плодотворное обсуждение проблемы автор благодарен М.В. Глазкову, М.И. Гордееву (ИОГ им. Вавилова, Москва), А.К. Сибатаеву, И.Э. Вассерлауф (НИИ ББ, Томск), а также всем сотрудникам и студентам лаборатории эволюционной цитогенетики (НИИ ББ, Томск) и сектора нейрогенетики дрозофилы (ИЦИГ, Новосибирск). За помощь в сборе полевого материала и в работе с лабораторной культурой *A. atroparvus* автор особо благодарен А.Ю. Русаковой (НИИ ББ, Томск). За предоставление базы данных мобильных элементов *A. gambiae* автор благодарит Дж. Р. Хогана (Научно-образовательный центр Центр Тропических Болезней, Университет Нотр Дама, США).

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### Получение биологического материала

Личинок и самок *A. atroparvus*, а также личинок дрозофил подгруппы *melanogaster*, отбирали из лабораторных культур лаб. эволюционной цитогенетики НИИ биологии и биофизики (Томск). Самок *A. messeae* и *A. beklemishevi* из природных популяций собирали в местах дневного отдыха в пос. Коларово и пос. Кривошеино Томской обл. Личинок *A. messeae* и *A. beklemishevi* выращивали в условиях лаборатории из яиц, отложенных пойманными в природе самками, а затем фиксировали в 96 % этаноле. Яичники комаров на стадии активного созревания трофоцитов фиксировали в растворе Карнуа (96 % этанол и ледяная уксусная кислота в объемном соотношении 3 : 1) (Шарахова и др., 1997). Воздушно-высушенные препараты политенных хромосом трофоцитов яичников *A. atroparvus*, *A. messeae* и *A. beklemishevi* и политенных хромосом ядер слюнных желез личинок дрозофил подгруппы *melanogaster* готовили по стандартному протоколу. Геномные ДНК из личинок *A. atroparvus*, *A. messeae* и *A. beklemishevi* выделяли по методу Бэндера (Bender et al., 1983).

#### Получение библиотеки ДНК диффузного ПГХ хромосомы 2 *Anopheles atroparvus*

Для получения набора фрагментов ДНК из прицентромерных районов политенных хромосом был использован метод микродиссекции, модифицированный для политенных хромосом (Рубцов и др., 1999). С помощью инвертированного микроскопа "Axivert 10", оснащенного микроманипулятором "Mrmot" ("Zeiss", Германия) было вырезано 14 фрагментов хромосом с трех препаратов, полученных из яичников одной особи *A. atroparvus*. Вырезанные фрагменты хромосом послужили источником матричной ДНК в ПЦР с частично вырожденным праймером *MW6* (Telenius et al., 1992).

Аmplифицированная ДНК вырезанных районов и ДНК векторной плазмиды *pBluescript II KS+* были гидролизованы ферментом рестрикции *Xho I* и лигированы стандартному протоколу (Маниатис и др., 1984). Трансформацию плазмид в компетентные клетки *E. coli XL-I Blue* методом теплового шока, выращивание клеток на селективной среде, отбор позитивных колоний, выращивание клеток в жидкой среде и экстракцию плазмидной ДНК методом щелочного лизиса выполняли по стандартным протоколам (Маниатис и др., 1984). Наличие встройки проверяли рестрикцией ДНК плазмидных клонов рестриктазой *Xho I* с последующим электрофоретическим разделением фрагментов в 2% агарозном геле в буфере TBE. Для разделения множественных встроек плазмидную ДНК, переваренную рестриктазой *Xho I*, электрофоретически разделяли в 2% агарозном геле в буфере TAE, после чего ДНК отдельных встроек элюировали из геля и лигировали с вектором.

#### Секвенирование клонов и анализ последовательностей ДНК *in silico*

Клоны минибιβлиотеки секвенировали на автоматическом секвенаторе в Межинститутском Центре Секвенирования ДНК (Академгородок, Новосибирск). Для выявления гомологии между фрагментами была создана база данных первичных последовательностей ДНК отдельных клонов "Atr2R", затем каждый фрагмент был проверен на наличие гомологии со всеми последовательностями базы данных с помощью программы "Blast2seq" (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov>). Поиск гомологии клонированных фрагментов с последовательностями из генома *Drosophila melanogaster* проводился с помощью "Drosophila Genome Projects Blast Searches" (<http://www.fruitfly.org>). Для поиска гомологичных последовательностей в геноме *Anopheles gambiae* использовали "Ensembl BLAST Server" (<http://www.ensembl.org>). Дополнительная проверка фрагментов на гомологии к мобильным элементам *Anopheles gambiae*, аннотированным Дж. Р. Хоганом (Hogan, неопубликованные данные), проводилась с использованием программы "FASTA SEARCH". Поиск гомологии клонированных фрагментов с известными повторяющимися последовательностями всех организмов проводился с помощью "Repeat Masker Server" (<http://woody.embl-heidelberg.de>). Поиск tandemных повторов внутри каждого фрагмента осуществлялся с помощью программы "Tandem Repeats Finder Program Version 3.21" (<http://tandem.bu.edu>). AT-состав повторов вычисляли при помощи программы "DNA Stats" (<http://www.ualberta.ca>). Поиск ДНК ядерного матрикса проводился с использованием программы "ChrClass" (<ftp://bionet.nsc.ru>).

#### *In situ* гибридизация

Для сравнительной *in situ* гибридизации районспецифичной библиотеки с политенными хромосомами трофоцитов трех видов комаров комплекса *Anopheles maculipennis* – *A. atroparvus*, *A. messeae* и *A. beklemishevi* в качестве зонда была использована ДНК диссектированных районов диффузного ГХ правого плеча хромосомы 2 *A. atroparvus*, амплифицированная в ходе DOP-ПЦР, и меченая с помощью "GIBCO BRL BioPrime DNA labeling system" ("Invitrogen/ Life Technologies", США) согласно рекомендованному протоколу. Получение биотинилированных зондов на основе отдельных фрагментов библиотеки проводили с использованием "GIBCO BRL BioPrime DNA labeling system" ("Invitrogen/Life Technologies", США) согласно рекомендованному протоколу. Для гибридизации использовали реактивы "GIBCO BRL *In situ* Hybridization and Detection system" ("Invitrogen/Life Technologies", США). Гибридизации проводили при +38°C в течение 18 час. Детекцию осуществляли с помощью "Rhodamin-Avidin/Biotinylated Anti-Avidin" ("Vector Laboratories", США). Обработку препаратов "Rhodamin-Avidin", отмывку и обработку "Biotinylated Anti-Avidin" повторяли 3 раза. Хромосомы окрашивали флуоресцентным красителем "YOYO-1" ("Sigma-Aldrich", США). Регистрацию результатов осуществляли на конфокальном микроскопе "Bio-Rad MRC 1024 Scanning Confocal System" (Университет Нотр Дама, США), а также при помощи флуоресцентного микроскопа "The Power Gene FISH Sistem PSI" (НИИ медицинской генетики, Томск). Мечение зонда и гибридизацию клона  $\lambda$ 20p1.4 на хромосомы слюнных желез дрозофил подгруппы *melanogaster* проводили с помощью реактивов для *in situ* гибридизации "GIBCO BRL *In situ* Hybridization and Detection system" ("Invitrogen/Life Technologies", США) согласно рекомендованным

протоколам. Просмотр препаратов и фотографирование осуществляли с помощью микроскопа “Laboval-4” (“Zeiss”, Германия), оснащенного фотоприставкой МФН-12. Для картирования меченых районов использовали карты политенных хромосом слюнных желез *Drosophila melanogaster* (Briges, 1935), учитывая отличия в дисковом рисунке хромосом видов *Drosophila simulans*, *Drosophila mauritiana* и *Drosophila sechellia* (Ashburner, Lemeunier, 1976).

#### Саузерн-блот-гибридизация с мечеными геномными ДНК.

Плазмидную ДНК переваривали рестриктазой *Xho I*, разделяли электрофоретически в 2% агарозном геле в буфере TBE и переносили на нитроцеллюлозные фильтры по стандартному протоколу (Маниатис и др., 1984). Геномные ДНК *A. messeae* и *A. atroparvus* радиоактивно метили [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]АТР (“Amersham”, Великобритания) до удельной активности  $10^8$  с помощью фрагмента Кленова (“Сибэнзим”, Новосибирск). Блот-гибридизацию проводили при +60°C по стандартной методике в течении 12 час (Маниатис и др., 1984).

#### Саузерн-блот-гибридизация клона Atr2R-73

Гидролизат геномных ДНК *A. atroparvus*, *A. messeae* и *A. beklemishevi* эндонуклеазами рестрикции *Bgl II* и *EcoR I* (“Сибэнзим”, Новосибирск), разделяли электрофоретически в 2% агарозном геле в буфере TAE в течении 12 час. Для приготовления зонда встройку клона Atr2R-73, вырезаемую при переваривании плазмиды рестриктазой *Xho I*, элюировали из агарозного геля и метили с помощью [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]АТР (“Amersham”, Великобритания) и фрагмента Кленова (“Сибэнзим”, Новосибирск). Блот-гибридизации проводили при +42°C по стандартной методике в течении 12 час (Маниатис и др., 1984).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Получение районспецифичной библиотеки ПГХ хромосомы 2 *Anopheles atroparvus*

Для получения районспецифичной библиотеки фрагментов ДНК из диффузного ПГХ правого плеча хромосомы 2 *A. atroparvus* (далее, “библиотека Atr2R”) (рисунок 1а) был применен метод микродиссекции политенных хромосом. Хромосомный материал был использован в качестве ресурса матричной ДНК в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с частично вырожденным праймером (DOP-ПЦР). В результате получена смесь случайно амплифицированных фрагментов длиной от 100 до 400 п.о., фланкированных сайтами рестрикции *Xho I*. Далее этот материал был частично клонирован в плазмидном векторе для получения отдельных клонов ДНК, а частично – помечен биотином в дополнительных циклах ПЦР и использован в качестве районспецифичной пробы для внутривидовой и межвидовой *in situ* гибридизации с политенными хромосомами трофоцитов яичников. В результате клонирования было получено 152 плазмидных клонов. Затем плазмидные клоны были проверены на наличие встроеной рекомбинантной ДНК с помощью переваривания плазмидной ДНК рестриктазой *Xho I* и электрофорезе в 2% агарозном геле (рисунок 4). Первичная последовательность была определена у ста двух клонированных фрагментов длиной от 32 до 549 п.о. Общая длина просеквенированных фрагментов составила более 23000 п. о. Первичные последовательности библиотеки были опубликованы в базе данных “GenBank” (индексы доступа с DQ072281 по DQ072378).

#### Характеристика состава ДНК ПГХ хромосомы 2 *Atroparvus atroparvus*

**Поиск гомологичных последовательностей в базах данных.** Поиск последовательностей, гомологичных фрагментам библиотеки Atr2R, выявил значимые гомологии с последовательностями мобильных элементов и структурных генов из геномов *A. gambiae* и *D. melanogaster*, и отсутствие гомологий с последовательностями каких-либо других организмов. Поиск в базах данных “Ensembl BLAST Server”, “NCBI/BLAST search *A. gambiae* genome”, “*Drosophila* Genome Projects Blast Searches” и “NCBI/BLAST search *D. melanogaster* genome” показал, что пять клонированных фрагментов (Atr2R-6, Atr2R-50a, Atr2R-53, Atr2R-71a, Atr2R-107) имеют значимые гомологии к последовательностям из генома *A. gambiae*, а четыре из них (Atr2R-6, Atr2R-50a, Atr2R-53, Atr2R-71a)



– также к последовательностям из генома *D. melanogaster*. Результаты поиска в базах данных суммированы в таблице 1. Фрагмент Atr2R-107 гомологичен уникальной последовательности *A. gambiae* из района 65 скэффолда AAAB01008968, расположенного в районе 20С левого плеча хромосомы 2. У фрагментов Atr2R-6 и Atr2R-71a обнаружены значимые гомологии к транскриптам генов *A. gambiae* и *D. melanogaster*. Фрагмент Atr2R-6 гомологичен предсказанному уникальному гену *ENSANGG00000018197 A. gambiae*, находящемуся в районе 20С левого плеча хромосомы 2 (2L) (скэффолд AAAB01008968). Ортологом гена *ENSANGG00000018197* является ген *extradenticle D. melanogaster*, также гомологичный фрагменту Atr2R-6. У *D. melanogaster* ген *extradenticle* локализован на хромосоме X, и кодирует гомеобокс-содержащий фактор транскрипции CG8933, участвующий в регуляции развития нотума (*anterior mesothorax*) (Aldaz et al., 2005). Мутации этого гена приводят к нарушениям развития сегментов и сегментации как таковой (Peifer, Wieschaus, 1990). Фрагмент Atr2R-71a гомологичен гену *ENSANGG00000018993 A. gambiae*. Ген *ENSANGG00000018993 A. gambiae* ортологичен гену *CG17255 D. melanogaster*, также гомологичному фрагменту Atr2R-71a. Ген *CG17255 D. melanogaster* локализован в хромосоме X, молекулярная функция кодируемого им белка неизвестна. Таким образом, выяснилось, что последовательности фрагментов Atr2R-6 и Atr2R-71a являются кодирующими. Поэтому для сравнения уровней гомологии было проведено выравнивание кодированных ими аминокислотных последовательностей и аминокислотных последовательностей белков *A. gambiae* и *D. melanogaster*. Как и при сравнении нуклеотидных последовательностей, аминокислотные последовательности транскриптов фрагментов Atr2R-6 и Atr2R-71a оказались ближе к белкам *A. gambiae*, чем белкам *D. melanogaster*.

Фрагменты Atr2R-53 и Atr2R-50a оказались гомологичны LTR-ретротранспозонам *Drosophila gypsy*-типа, соответственно, *ZAM\_I* и *MDG3*, а также целому ряду геномных скэффолдов *A. gambiae*. Последующее сравнение последовательностей библиотеки Atr2R с базой данных известных повторов всех организмов “RepBase” с помощью программы “RepeatMasker” также показало сходство фрагментов Atr2R-53 и Atr2R-50a с LTR-ретротранспозонами *Drosophila gypsy*-типа, *ZAM\_I* и *MDG3*. Сходства остальных последовательностей библиотеки Atr2R с какими-либо другими повторяющимися последовательностями базы данных “RepBase” не обнаружено. Дополнительное сравнение последовательностей библиотеки Atr2R с базой данных мобильных элементов *Anopheles gambiae* и *Drosophila melanogaster* Университета Нотр Дама (Hogan, неопубликованные данные) выявило гомологии фрагментов Atr2R-53 и Atr2R-50a со множеством LTR-ретротранспозонов. Наиболее значимые гомологии фрагмент Atr2R-50a проявил ретротранспозонам *A. gambiae gypsy*-типа *МДГ3с* и *МДГ3b*, а фрагмент Atr2R-53 – к ретротранспозонам *A. gambiae gypsy*-типа *176D*, *Toma*, *Beagle A*, *Beagle C*, *Moose H* и *Ninja P*. Причем сходство последовательностей оказалось сильнее с ретротранспозонами *A. gambiae* ( $E\text{-Value}_{\text{Atr2R-50a}} = 3,2e^{-20}$ ;  $E\text{-Value}_{\text{Atr2R-53}} = 2,8e^{-08}$ ), чем с ретротранспозонами *МДГ3* и *ZAM D. melanogaster* ( $E\text{-Value}_{\text{Atr2R-50a}} = 2,6e^{-17}$ ;  $E\text{-Value}_{\text{Atr2R-53}} = 4,3e^{-07}$ ). Таким образом, как в случае генов, так и мобильных элементов, гомологии последовательностей библиотеки выше с последовательностями *A. gambiae*, чем *D. melanogaster*. Обнаружение последовательностей, гомологичных ретротранспозонам, в составе библиотеки фрагментов ПГХ хромосомы 2 *A. atroparvus* не был неожиданным, так как ПГХ многих организмов, от дрозофилы до человека, является местом “массового скопления” мобильных элементов. В ПГХ политенных хромосом *A. gambiae* в ходе секвенирования генома было установлено высокое содержание мобильных элементов, в особенности, – ретротранспозонов (Holt et al., 2002). Причем у *A. gambiae* обнаружено преобладание ретротранспозонов в геноме среди всех мобильных элементов (Tu, Coates, 2003). Таким образом, в результате сравнения последовательностей районспецифичной библиотеки с последовательностями баз данных в составе ПГХ правого плеча хромосомы 2 *A. atroparvus* были обнаружены типичные для ПГХ мобильные элементы и структурные гены. Для характеристики состава ПГХ представляется важной консервативность этих последовательностей у двукрылых насекомых.

**Таблица 1 – Гомологии фрагментов минибιβлиотеки Atr2R-6, Atr2R-50a, Atr2R-53, Atr2R-71a и Atr2R-107 с последовательностями из геномов *A. gambiae* и *D. melanogaster*.**

Фрагмент	“Ensembl BLAST Server”				“Drosophila Genome Projects Blast Searches”		
	Длина, п.о.	Последовательности <i>A. gambiae</i> с наибольшей гомологией к фрагменту	Локализация гомологичного участка скэффолда в геноме <i>A. gambiae</i>	Вероятность случайной гомологии, E-Value	Последовательности <i>D. melanogaster</i> с наибольшей гомологией к фрагменту	Локализация гомологичного участка скэффолда в геноме <i>D. melanogaster</i>	Вероятность случайной гомологии, E-Value
Atr2R-6	424	Скэффолд: AAAB01008968 Ген:ENSANGG00000018197 кДНК:ENSANGT0000020686	2L, 20C	9.3e-37	CG8933-RB транскрипт гена [CG8933 FBgn0000611]	X, 14A5	1.6e-35
Atr2R-50a	286	Скэффолд: AAAB01005382	неизвестна	1.6e-22	gb X95908 mdg3 DMMDG3 Получен от X95908 (e990667)	неизвестна	7.3e-17
		Скэффолд: AAAB01006835	неизвестна	3.9e-20	gb - invader3 INVADER3	неизвестна	2.7e-12
		Скэффолд: AAAB01008795	3L, 38C	2.8e-17			
		Скэффолд: AAAB01008112	неизвестна	5.5e-17			
		Скэффолд: AAAB01008311	неизвестна	5.7e-15			
		Скэффолд: AAAB01002862	неизвестна	3.1e-11			
		Скэффолд: AAAB01000677	неизвестна	3.0e-09			
Atr2R-53	173	Скэффолд: AAAB01008365	неизвестна	9.1e-11	gb AJ000387 ZAM DMZAM Получен от AJ000387 (e1237231)	неизвестна	2.3e-12
		Скэффолд: AAAB01008980	3R, 35B	8.1e-10	gb - Tirant TIRANT	неизвестна	5.3e-10
		Скэффолд: AAAB01008968	2L, 20C	1.5e-07	gb AJ009736 Idefix DME9736 Получен от AJ009736 (e1371475)	неизвестна	2.5e-08
		Скэффолд: AAAB01002355	неизвестна	1.8e-05	gb - rover ROVER	неизвестна	1.8e-06
Atr2R-71a	215	Скэффолд: AAAB01008949 Ген:ENSANGG00000018993 кДНК:ENSANGP00000021482	неизвестна	6.1e-12	CG17255-RB транскрипт гена [CG17255 FBgn0030205]	X, 9C6-D1	6.9e-08
Atr2R-107	173	Скэффолд: AAAB01008968	2L, 20C	8e-32	Гомологий нет		

### **Выявление повторяющихся последовательностей ДНК в составе библиотеки Atr2R.**

Предыдущие исследования по гибридизации *in situ* меченых геномных и повторенных ДНК с хромосомами *A. messeae* и *A. atroparvus* выявили концентрацию высокоповторенной ДНК именно в районах ПГХ у обоих видов (Стегний, Шарахова, 1990). Поэтому выявление и характеристика повторяющиеся последовательности ДНК является важным этапом в анализе изучаемого района ПГХ хромосомы 2 *A. atroparvus*. Поиск повторов проводился с помощью двух подходов: Саузерн-блот-гибридизации с меченой геномной ДНК и анализа первичных последовательностей фрагментов библиотеки *in silico*, включающего поиск гомологии между фрагментами библиотеки и поиск повторяющихся последовательностей внутри каждого фрагмента с помощью программы “Tandem Repeats Finder”. На основе взаимной гомологии фрагменты библиотеки группировались в 17 пар, 2 тройки, и одну группу из одиннадцати последовательностей. Среди всех последовательностей библиотеки короткие тандемные повторы (2 мономера длиной 43 п.о., различных в пяти позициях) были выявлены в составе одного фрагмента, Atr2R-57ab. По-видимому, у малярийных комаров короткие тандемные повторы в составе ПГХ не занимают протяженных участков, что было ранее показано у *Anopheles gambiae* (Holt et al., 2002). С помощью Саузерн-блот-гибридизации с меченой до слабой удельной активности ( $10^8$ ) геномной ДНК *A. atroparvus* среди 92 протестированных клонов была выявлена 21 повторяющаяся последовательность ДНК (рисунок 3б, таблица 2).

**Таблица 2 – Характеристика первичных последовательностей фрагментов библиотеки Atr2R, повторенных в геномах *A. atroparvus* и *A. messeeae*.\***

Фрагмент	АТ-содержание, %	“ChrClass”-классификация	Гомологичные фрагменты (вероятность случайной гомологии, E-value)	АТ-содержание гомологичных фрагментов, %	“ChrClass”-классификация
<b>Atr2R-9</b>	64	скДНК	Atr2R-98a ( $2e^{-38}$ ) Atr2R-136 ( $6e^{-26}$ )	62 58	ялДНК скДНК
<b>Atr2R-22</b>	60	М/SAR ДНК	Гомологичные фрагменты отсутствуют		
<b>Atr2R-25a</b>	62	-----	Гомологичные фрагменты отсутствуют		
<b>Atr2R-28a</b>	54	ялДНК	Atr2R-118 ( $3e^{-91}$ )	56	-----
<b>Atr2R-29c</b>	60	скДНК	<b>Atr2R-68</b> ( $e^{-89}$ )	60	скДНК
<b>Atr2R-33</b>	49	-----	Atr2R-138 ( $e^{-54}$ )	60	М/SAR ДНК
<b>Atr2R-42</b>	60	скДНК	Atr2R-152 ( $e^{-179}$ )	58	-----
<b>Atr2R-43</b>	57	-----	Atr2R-137 ( $e^{-101}$ )	56	-----
<b>Atr2R-46a</b>	57	М/SAR ДНК	Гомологичные фрагменты отсутствуют		
<b>Atr2R-46b</b>	52	-----	Atr2R-117 ( $2e^{-97}$ )	53	-----
<b>Atr2R-50a</b>	56	ялДНК	Гомологичные фрагменты отсутствуют		
<b>Atr2R-57ab</b>	50	-----	Гомологичные фрагменты отсутствуют		
<b>Atr2R-60</b>	61	-----	Atr2R-18 ( $e^{-174}$ )	57	-----
<b>Atr2R-64b</b>	65	скДНК	Atr2R-90 ( $e^{-121}$ )	64	скДНК
<b>Atr2R-73</b>	56	М/SAR ДНК	<b>Atr2R-28b</b> ( $2e^{-41}$ )	58	-----
<b>Atr2R-74a</b>	56	скДНК	Гомологичные фрагменты отсутствуют		
<b>Atr2R-5</b>	62	скДНК	Atr2R-85a ( $1e^{-81}$ ) <b>Atr2R-109</b> ( $3e^{-88}$ )	60 61	М/SAR ДНК скДНК
<b>Atr2R-70a</b>	55	скДНК	Atr2R-85b ( $6e^{-49}$ )	56	М/SAR ДНК
<b>Atr2R-139</b>	48	скДНК	<b>Atr2R-46b</b> ( $8e^{-4}$ ) Atr2R-119 ( $3e^{-59}$ )	52 50	----- скДНК

\* **Примечание:** Выделенные фрагменты выявились как повторенные в геномах *A. atroparvus* и *A. messeeae* при Саузерн-блот-гибридизации.

Результаты Саузерн-блот-гибридизации и сравнения первичных последовательностей клонированных фрагментов совпали: большинство повторов, выявленных Саузерн-блот-гибридизацией, оказались гомологичны друг другу (Atr2R-29c и Atr2R-68, Atr2R-70 и Atr2R-23, Atr2R-73 и Atr2R-28b), либо тем последовательностям библиотеки, для которых гибридизация не проводилась. Среди выявленных при Саузерн-блот-гибридизации повторов оказался фрагмент Atr2R-57ab, содержащий в себе две тандемно повторенных последовательности длиной 43 п.о., и гомологичный LTR-ретротранспозонам фрагмент Atr2R-50a. Только 6 фрагментов из 21, выявленных как повторы, не обнаружили гомологии

к другим фрагментам библиотеки. Таким образом, повторенные в геноме *A. atroparvus* последовательности, повторены и в составе библиотеки Atr2R. Не гомологичные друг другу по первичной последовательности фрагменты обладали разным уровнем сигнала. Так, фрагменты Atr2R-25a, Atr2R-29c, Atr2R-22, Atr2R-23 и Atr2R-28a не гомологичны друг другу по первичной последовательности, и характеризуются различным уровнем сигнала (рисунок 3б,в). По всей видимости, они представляют собой “осколки” различных повторов, отличающихся по первичной последовательности и по копииности в геноме. Следовательно, ДНК диффузного ПГХ правого плеча хромосомы 2 *A. atroparvus* представляет собой смесь различных повторов, отличающихся и по первичной последовательности, и по копииности в геноме. АТ-состав у большинства повторенных фрагментов превышает 50%. К АТ-богатым повторам (с АТ-содержанием 60% и более) относятся: группа гомологичных фрагментов Atr2R-9/Atr2R-98a/Atr2R-136, группа Atr2R-29c/Atr2R-68, группа Atr2R-64/Atr2R-90 и группа Atr2R-5/Atr2R-85a/Atr2R-109.

**Поиск ДНК ядерных белковых структур.** В геномах эукариот обнаружены последовательности, с высокой степенью аффинности связывающие различные ядерные белковые структуры: ядерный матрикс, синаптонемный комплекс и ядерную ламину. Предполагается участие подобных последовательностей в формировании связей политенных хромосом с ядерной оболочкой (Шарахов и др., 1995). Диффузный ПГХ хромосомы 2 у *A. atroparvus* не образует облигатной связи с ядерной оболочкой, однако, способен образовывать факультативные контакты в виде отдельных тяжей β-ГХ. Поэтому клонированные фрагменты ДНК из этого района было необходимо проверить на наличие свойств ДНК ядерных белковых структур с помощью программы “ChrClass”. Оказалось, что такими свойствами обладают 80% фрагментов библиотеки (таблица 3).

**Таблица 3 – Распределение фрагментов диффузного GX правого плеча хромосомы 2 *A. atroparvus* среди различных классов ДНК ядерного матрикса.**

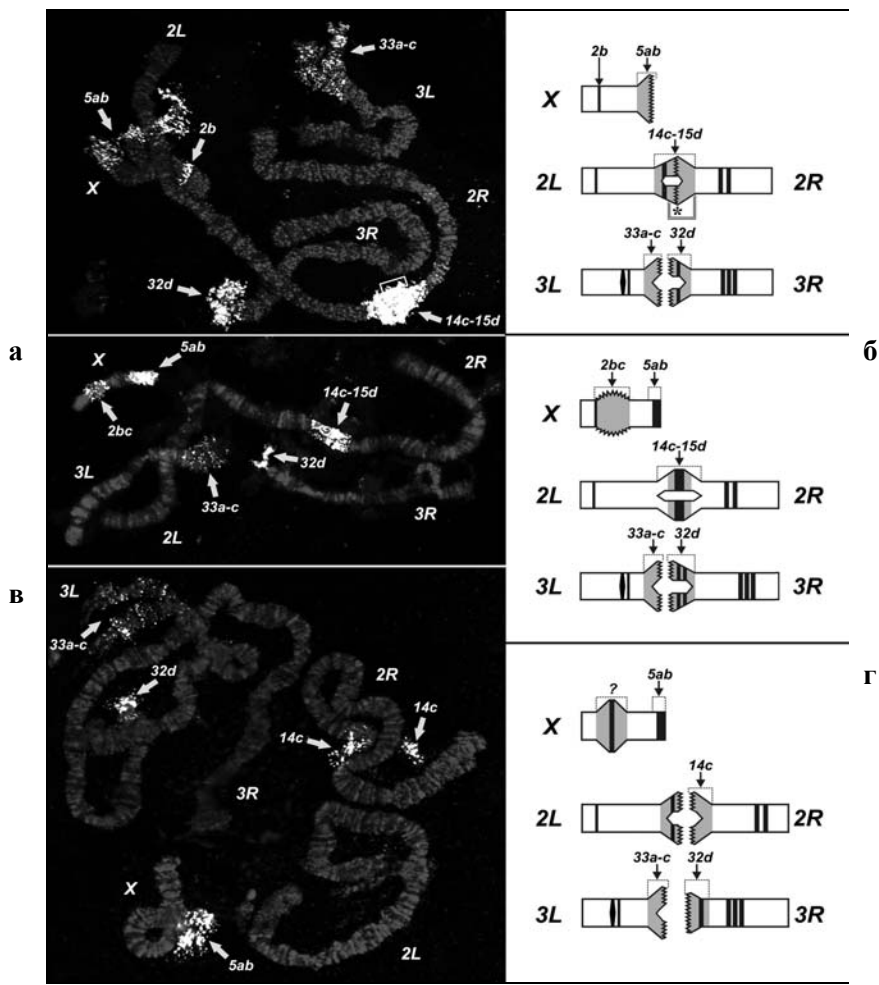
ДНК ядерного матрикса (M/SAR ДНК)	ДНК синаптонемного комплекса			ДНК ядерной ламины	Фрагменты, не обладающие свойствами ДНК ядерного матрикса
Atr2R-16	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-15
Atr2R-20	1	49	95a	13	Atr2R-18
Atr2R-22	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-25a
Atr2R-23	4	50b/c	95b	28a	Atr2R-28b
Atr2R-26a	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-33
	5	51	98b	50a	Atr2R-43
Atr2R-31	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-46b
Atr2R-46a	6	53	107	64a	Atr2R-57a
Atr2R-71b	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-60a
	8	54	108	69b	Atr2R-69a
Atr2R-73	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-114
	9	55	109	98a	Atr2R-115
Atr2R-85a	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-117
	11	56	110	133	Atr2R-118
Atr2R-104a	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-		Atr2R-134
	12	57b/c	111		Atr2R-137
Atr2R-104b	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-		Atr2R-140
	24	64b	119		Atr2R-142
Atr2R-130	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-		Atr2R-147b
	25b	65	120		Atr2R-152
Atr2R-138	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-		
	28c	67	121		
	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-		
	29b	68	123		
	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-		
	29a	70a	125		
	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-		
	29c	71a	126		
	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-		
	35	74a	136		
	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-		
	36	74b	139		
	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-		
	38	76	141		
	Atr2R-	Atr2R-	Atr2R-		
	39	77	147a		
	Atr2R-	Atr2R-			
	42	79			
	Atr2R-	Atr2R-			
	48	90			

Наиболее представлен класс ДНК синаптонемного комплекса, однако, выявляются и ДНК ядерной ламины, способные к наиболее специфическому взаимодействию с белками ламины, внутренней белковой оболочки ядра (фрагменты Atr2R-13, Atr2R-28a, Atr2R-50a, Atr2R-64a, Atr2R-69b, Atr2R-98a, Atr2R-133). Как выяснилось, различные повторенные последовательности ДНК в разной степени обладают качествами ДНК ядерных белковых структур. Например, повторенные в

геноме *A. atroparvus* фрагменты Atr2R-43, Atr2R-46b и Atr2R-60 не имеют свойств ДНК ядерных белковых структур, тогда как повторенные фрагменты Atr2R-9, Atr2R-29c и Atr2R-64b распознаются программой “ChrClass” как ДНК синаптонемного комплекса. Таким образом, несмотря на отсутствие прочного крепления изучаемого района ПГХ к оболочке ядра в трофоцитах яичников у *A. atroparvus*, в его составе присутствуют ДНК с необходимыми свойствами. Следовательно, одного наличия подобных последовательностей ДНК еще недостаточно для формирования прочной связи хромосомы с ядерной оболочкой.

#### Сравнение состава ДНК районов ПГХ у видов комплекса *Anopheles maculipennis*

Для экспериментального выявления гомологий геномов или фрагментов геномов, хромосом или районов хромосом, разных видов применяют метод сравнительной геномной гибридизации (CGH). Для этого меченую ДНК отдельных хромосом или участков хромосом, полученную методом микродиссекции, либо всю геномную ДНК организма, гибридизуют с хромосомами другого вида. В результате, распределение меченых районов хромосом отражает распределение консервативных участков со сходным генетическим содержанием. Для сравнения общего состава ДНК районов ПГХ в комплексе *Anopheles maculipennis* была проведена флуоресцентная *in situ* гибридизация районспецифичной пробы, полученной в результате микродиссекции ПГХ правого плеча хромосомы 2 *A. atroparvus*, с политенными хромосомами трофоцитов яичников *A. atroparvus*, *A. messeae* и *A. beklemishevi*. Результаты гибридизации представлены на рисунке 2. У *A. atroparvus* последовательности, гомологичные последовательностям районспецифичной пробы, обнаружены в составе прицентромерных гетерохроматиновых районов всех хромосом, а, кроме того, – у района 2b хромосомы X (рисунок 2а). Причем пометился как блочный  $\alpha$ -, так и диффузный  $\beta$ -ГХ каждого хромосомного плеча. Тем не менее, уровень гибридизационного сигнала был заметно сильнее в ПГХ хромосомы 2. У *A. messeae* (рисунок 2б) также пометились районы ПГХ всех хромосомных плеч, и район интеркалярного ГХ 2bc хромосомы X. Как и у *A. atroparvus*, у *A. messeae* пометился и  $\alpha$ -, и  $\beta$ -ГХ каждого хромосомного плеча. Уровень гибридизационного сигнала на хромосоме 2 выше, чем на других хромосомах. Менее всего пометился ПГХ левого плеча хромосомы 3. У *A. beklemishevi* пометился и  $\alpha$ -, и  $\beta$ -ГХ хромосомных плеч, за исключением левого плеча хромосомы 2 (2L) (рисунок 2в). Общий уровень гибридизационного сигнала слабее, чем на хромосомах *A. atroparvus* и *A. messeae*. ПГХ левого плеча хромосомы 3 проявил наиболее слабое мечение, также как и у *A. messeae*. Мечение района интеркалярного ГХ 2bc хромосомы X не определяется из-за гетерозиготности хромосомы по инверсии, и слияния возможного гибридизационного сигнала с сигналом на ПГХ. Таким образом, гибридизация районспецифичной пробы ПГХ правого плеча хромосомы 2 *A. atroparvus* выявила наличие гомологичных последовательностей ДНК во всех районах ПГХ у *A. atroparvus*. Результаты межвидовых гибридизаций сходны с результатами гибридизации с хромосомами *A. atroparvus*. Обнаружено, что во всех районах ПГХ у *A. messeae* и у *A. beklemishevi*, за исключением левого плеча хромосомы 2 (2L) *A. beklemishevi* содержатся последовательности, гомологичные последовательностям районспецифичной пробы. Таким образом, у трех видов комплекса *Anopheles maculipennis* – *A. atroparvus*, *A. messeae* и *A. beklemishevi* – ПГХ различной структуры и динамики взаимодействия с ядерной оболочкой характеризуется частичным сходством состава ДНК с составом ДНК диффузного ГХ правого плеча хромосомы 2 *A. atroparvus*.



д

е

Рисунок 2 – Флуоресцентная *in situ* гибридизация меченой биотином районспецифичного зонда на политенных хромосомах трофоцитов яичников (а, в, д) и схемы организации специфичных к ней гетерохроматиновых районов хромосом (б, г, е). Хромосомы окрашены YOYO-1. а, б – *A. atroparvus*; в, г – *A. messeae*; д, е – *A. beklemishevi*. Стрелки указывают на меченые районы хромосом. X – хромосома X; 2L – левое плечо хромосомы 2; 2R – правое плечо хромосомы 2; 3L – левое плечо хромосомы 3; 3R – правое плечо хромосомы 3. Условные обозначения на схемах: ■ – Блоки  $\alpha$ -ГХ; ▨ – Диффузный  $\beta$ -ГХ;  $\Lambda\Lambda$  – Районы прикреплений к ядерной оболочке; \* – Зона контакта второй хромосомы *A. atroparvus* с оболочкой; ? – Мечение района 2bc *A. beklemishevi* не определяется из-за гетерозиготности по инверсии; = – Район, подвергавшийся микродиссекции; :.....: ← – Меченые районы хромосом.

Причем районы ГХ различных хромосомных плеч отличаются по количеству гомологичных пробе последовательностей, тогда как различий между  $\alpha$ - и  $\beta$ -ГХ не обнаружено. Таким образом, состав ДНК ПГХ правого плеча хромосомы 2 *A. atroparvus* не является полностью ни хромосомо-, ни видоспецифичным. Однако, сила гибридизационного сигнала различалась у различных районов ГХ. Так, у *A. atroparvus* наиболее ярко пометился диффузный прицентромерный район правого плеча хромосомы 2, на основе которого была получена библиотека, и примыкающий к нему



гетерохроматиновый район левого плеча, включая блоки  $\alpha$ -ГХ. Наименее – ПГХ левого плеча третьей хромосомы. У *A. messeae* и *A. beklemishevi* также наблюдается пониженное включение метки в ПГХ левого плеча хромосомы 3. Разная сила сигнала у районов ПГХ различных хромосомных плеч, меченых в ходе *in situ* гибридизации, свидетельствует о различном количестве последовательностей ДНК, гомологичных последовательностям из клонированного района *A. atroparvus*. Таким образом, в районах ПГХ хромосомы 2 *A. atroparvus* содержится наибольшее количество последовательностей ДНК, гомологичных последовательностям полученной библиотеки, а в ПГХ левого плеча хромосомы 3 у всех трех видов – наименьшее. Эти результаты позволяют сделать вывод, что различные районы ГХ *A. atroparvus* содержат общие повторяющиеся последовательности ДНК, но при этом отличаются между собой по их количеству. Отсутствие мечения района ПГХ левого плеча хромосомы 2 *A. beklemishevi* говорит об отсутствии в его составе последовательностей, гомологичных фрагментам районспецифичной пробы, и, следовательно, – о возможности формирования типичных гетерохроматиновых структур на основе совершенно разных последовательностей ДНК.

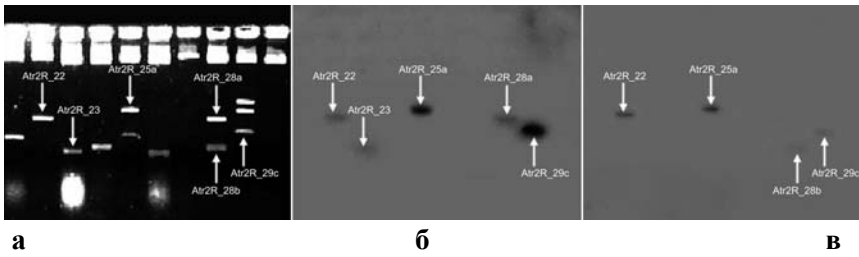
Гибридизации районспецифичной пробы не наблюдалось с районами интеркалярного ГХ, которые отличаются от районов ПГХ по цитохимическим свойствам (Стегний, Шарахова, 1990; Шарахова, 1997). Однако, в ходе *in situ* гибридизации неожиданно обнаружилось, что районы 2b хромосомы X как у *A. atroparvus*, так и у *A. messeae*, содержат последовательности, гомологичные последовательностям районспецифичной пробы из диффузного ПГХ хромосомы 2 *A. atroparvus*. То есть, гетерохроматиновая природа районов 2b хромосом X *A. atroparvus* и *A. messeae*, по различным цитохимическим свойствам сходных с ПГХ этих видов (Стегний, Шарахова, 1990), подтверждается в ходе данного исследования на уровне состава ДНК.

Очевидно, общим компонентом ПГХ всех хромосом у видов *A. atroparvus*, *A. messeae* и *A. beklemishevi* являются консервативные повторы, фрагменты которых были клонированы в ходе данной работы.

#### Характеристика повторяющихся последовательностей ДНК ПГХ у видов комплекса *Anopheles maculipennis*

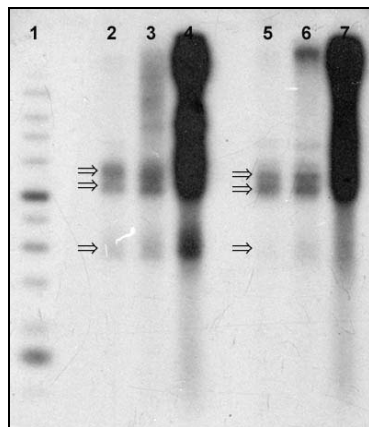
**Консервативность повторяющихся последовательностей у видов комплекса *Anopheles maculipennis*.** Консервативность повторов у видов комплекса *Anopheles maculipennis* была продемонстрирована ранее в ходе экспериментов по изучению стабильности гибридных дуплексов из высоких повторов *A. sacharovi* с тотальной геномной ДНК *A. atroparvus*. В частности, было подсчитано, что доля гомологичных высоких повторов у *A. atroparvus* и *A. sacharovi* составляет 47,5%, при этом число нуклеотидных замен составляет всего 1,1% (Владыченская и др., 1991).

Консервативность повторов у видов комплекса *Anopheles maculipennis* также подтвердилась в ходе данной работы результатами Саузерн-блот-гибридизации фрагментов библиотеки Atr2R с меченой геномной ДНК *A. messeae*. Фрагменты, выявляющиеся как повторы при гибридизации с геномной ДНК *A. atroparvus*, выявлялись и при гибридизации с ДНК *A. messeae* (рисунок 3в), единственным исключением оказался фрагмент Atr2R-28b, не выявлявшийся как повтор у *A. atroparvus* (рисунок 3в), единственным исключением оказался фрагмент Atr2R-28b, не выявлявшийся как повтор у *A. atroparvus*.



**Рисунок 3 – Пример Саузерн-блот-гибридизации фрагментов библиотеки Atr2R с мечеными геномными ДНК. а – Электрофорез клонов, переваренных рестриктазой *Xho I*, в 2 % агарозном геле. ДНК окрашена EtBr. б – Саузерн-блот-гибридизация этих клонов с геномной ДНК *A. atroparvus*. в – Саузерн-блот-гибридизация с геномной ДНК *A. messeae*. Стрелки указывают на меченые фрагменты.**

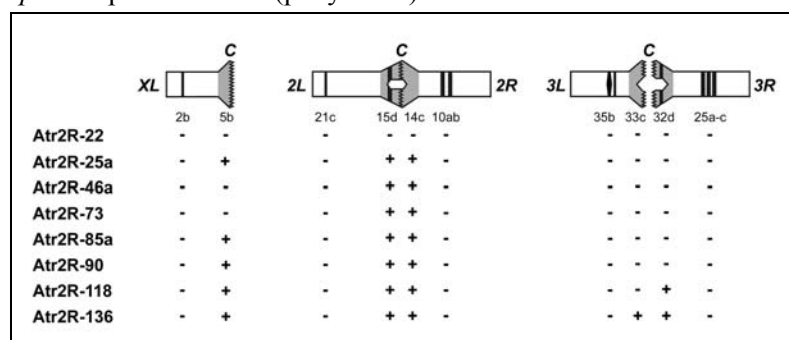
Консервативность повторов в комплексе *Anopheles maculipennis* заключается не только в консервативности их первичной последовательности. На примере фрагмента Atr2R-73 с помощью Саузерн-блот-гибридизации с геномными ДНК *A. atroparvus*, *A. messeae* и *A. beklemishevi* демонстрируется консервативность организации повторов в геномах видов комплекса *Anopheles maculipennis*. На рисунке 6 представлены результаты гибридизации. Наиболее сильно пометилась геномная ДНК *A. atroparvus*, наименее – ДНК *A. beklemishevi*. Характер мечения у всех трех видов сходен: наблюдается по несколько сайтов мечения, но без периодичности, характерной для тандемных повторов; позиции меченых сайтов сходны между видами и рестриктазами. По всей видимости, сложно организованное семейство повторов в геномах трех видов комплекса *Anopheles maculipennis*, в состав которого входит фрагмент Atr2R-73, консервативно не только по первичной последовательности повторенных единиц, но и по своей организации.



**Рисунок 4 – Саузерн-блот-гибридизация фрагмента Atr2R-73 с переварами геномных ДНК *A. atroparvus*, *A. messeae* и *A. beklemishevi*. Время экспозиции 40 минут. 1– маркер 1Кб Ladder; 2,3,4 – перевары геномных ДНК рестриктазой *Bgl II*; 5,6,7 – перевары геномных ДНК рестриктазой *EcoR I*; 2, 5 – перевары геномной ДНК *A. beklemishevi*; 3, 6 – перевары геномной ДНК *A. messeae* 4, 7 – перевары геномной ДНК *A. atroparvus*.**

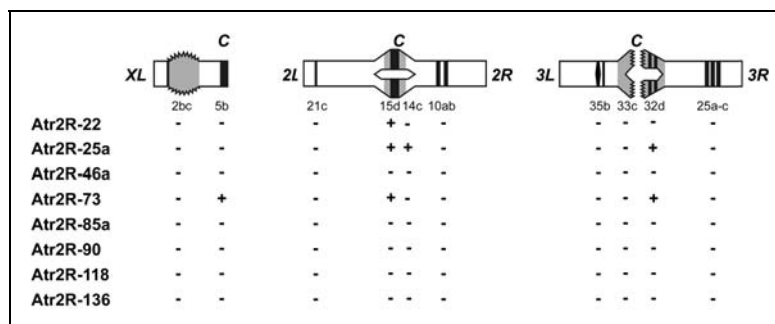
Хромосомная локализация консервативных повторяющихся последовательностей ДНК у *A. atroparvus* и *A. messeae*. Согласно результатам гибридизации районспецифичной пробы, районы ПГХ у комаров комплекса *Anopheles maculipennis* сходны по общему составу. Однако, различный уровень гибридизации, а также различия в структуре ПГХ свидетельствуют о различиях в составе или

композиции образующих их последовательностей ДНК. Для выявления этих различий необходимо выяснить хромосомную локализацию отдельных фрагментов библиотеки, в первую очередь – выявленных с помощью Саузерн-блот-гибридизации консервативных повторяющихся ДНК. Для *in situ* гибридации были выбраны фрагменты Atr2R-22, Atr2R-25a, Atr2R-33, Atr2R-42, Atr2R-43, Atr2R-46a, Atr2R-68, Atr2R-73, Atr2R-85, Atr2R-90, Atr2R-118 и Atr2R-136. Эти фрагменты либо сами выявлялись как повторенные в геномах у *A. atroparvus* или у *A. messeae*, либо гомологичны таковым. При этом, все они различны по молекулярным свойствам, вычисленным с помощью программы “ChrClass”, и не гомологичны друг другу. Для проведения *in situ* гибридаций фрагменты Atr2R-46a, Atr2R-85a, и Atr2R-25a были переклонированы. *In situ* гибридация на хромосомах *A. atroparvus* и фрагментов Atr2R-22, Atr2R-33, Atr2R-42, Atr2R-43 и Atr2R-68 не дала положительных результатов, несмотря на неоднократные попытки. Фрагменты Atr2R-46a, Atr2R-73 и Atr2R-85a обнаружены только в ПГХ правого плеча хромосомы 2 *A. atroparvus* (район 14c-15d), то есть являются районными или хромосомоспецифичными. Фрагменты Atr2R-25a и Atr2R-90 содержатся в гетерохроматиновых районах двух хромосом *A. atroparvus*: в районах ПГХ хромосом X (район 5b) и 2 (район 14c-15d). Фрагмент Atr2R-136 обнаружен во всех гетерохроматиновых районах трех хромосом. Фрагмент Atr2R-118 также содержится в районах ПГХ трех хромосом, но, в отличие от фрагмента Atr2R-136, отсутствует в ПГХ левого плеча хромосомы 3 (район 33c). Таким образом, *in situ* гибридация фрагментов Atr2R-25a, Atr2R-46a, Atr2R-73, Atr2R-85a, Atr2R-90, Atr2R-118 и Atr2R-136 показала, что по содержанию гомологичных им повторенных последовательностей ДНК в ПГХ хромосомы *A. atroparvus* различаются (рисунок 5).



**Рисунок 5 – Схема хромосомной локализации фрагментов районспецифичной библиотеки Atr2R на политеменных хромосомах *A. atroparvus*. Условные обозначения: + – меченые районы хромосом; X – хромосома X; 2L – левое плечо хромосомы 2; 2R – правое плечо хромосомы 2; 3L – левое плечо хромосомы 3; 3R – правое плечо хромосомы 3; C – центромерный район хромосомы.**

Аналогичный результат был получен при *in situ* гибридации с политеменными хромосомами *A. messeae* (рисунок 6). Фрагменты Atr2R-33, Atr2R-42, Atr2R-43, Atr2R-46a, Atr2R-68, Atr2R-85, Atr2R-90, Atr2R-118 и Atr2R-136 не гибридовались с политеменными хромосомами *A. messeae*, вероятно, – из-за их недопредставленности в ГХ политеменных хромосом, поскольку в геноме *A. messeae* они все же присутствуют, согласно результатам Саузерн-блот-гибридизаций с меченой геномной ДНК *A. messeae*. По содержанию последовательностей, гомологичным фрагментам Atr2R-22, Atr2R-25a и Atr2R-73, выявлены межхромосомные различия. Так, обнаружено, что ПГХ всех хромосом *A. messeae* содержит фрагмент Atr2R-73 (районы 5b, 15d и 35d), тогда как фрагмент Atr2R-25a содержится только в ПГХ двух хромосом – 2 (районы 14c-15d) и 3 (район 32d), и не выявлен в хромосоме X. Фрагмент Atr2R-22 обнаружен только в блоках ПГХ хромосомы 2 (район 15d). Таким образом, показано, что у *A. messeae*, также как и у *A. atroparvus*, район ГХ каждой хромосомы отличается от всех других по содержанию консервативных повторяющихся последовательностей ДНК.



**Рисунок 6 – Схема хромосомной локализации фрагментов районспецифичной библиотеки на политенных хромосомах *A. messeae*. Условные обозначения: + – меченые районы хромосом; X – хромосома X; 2L – левое плечо хромосомы 2; 2R – правое плечо хромосомы 2; 3L – левое плечо хромосомы 3; 3R – правое плечо хромосомы 3; C – центромерный район хромосомы.**

Обнаружены межвидовые различия в локализации консервативных повторяющихся ДНК. Из всех фрагментов, гибридизовавшихся на хромосомы *A. atroparvus*, только фрагменты Atr2R-25a, Atr2R-73 и Atr2R-22 гибридизовались также и на хромосомы *A. messeae*, несмотря на то что, предварительно они были выявлены как повторы генома *A. messeae* при Саузерн-блот-гибридизации (за исключением Atr2R-118, гомологичного фрагменту Atr2R-28a). Причем районы локализации каждого из трех клонов отличались у *A. atroparvus* и у *A. messeae*. Фрагмент Atr2R-25a локализован на хромосомах 2 и X у *A. atroparvus* и на хромосомах 2 и 3 у *A. messeae*. Фрагмент Atr2R-22 не гибридизовался на хромосомах *A. atroparvus*, но был выявлен в составе хромосомы 2 у *A. messeae*. Фрагмент Atr2R-73 локализован только на хромосоме 2 у *A. atroparvus*, и на всех хромосомах у *A. messeae*. Наблюдается независимость распределения фрагментов по отношению к структуре гетерохроматиновых районов. Например, фрагмент Atr2R-73 у *A. messeae* обнаружен в блочном  $\alpha$ -ГХ, а у *A. atroparvus* – в диффузном  $\beta$ -ГХ. То же наблюдается и на межхромосомном уровне: у *A. messeae* фрагмент Atr2R-25a был выявлен как в составе всего прицентромерного района хромосомы 2, включая прилежащий эухроматин и блоки  $\alpha$ -ГХ, так и в диффузном  $\beta$ -ГХ правого плеча хромосомы 3. Таким образом, различные по структуре районы содержат гомологичные последовательности, а сходные по структуре районы могут не содержать гомологичных последовательностей ДНК.

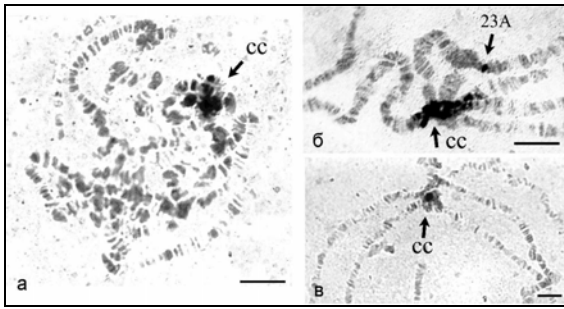
Таким образом, в настоящем исследовании показано, что каждый район ПГХ, как у *A. atroparvus*, так и у *A. messeae*, уникален по сочетанию повторов, несмотря на консерватизм их первичных последовательностей и организации. Такие различия в составе ПГХ у малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* могут быть объяснены независимыми амплификациями и делециями множеств повторов, согласно гипотезе “библиотек” (Ugarkovic, Plohl, 2002). По литературным данным, амплификация одних и утрата других консервативных повторенных последовательностей ДНК в соответствии с гипотезой “библиотек” происходили в ПГХ в самых различных группах организмов, и у растений (Vershinin et al., 1996; King et al., 1995) и у животных: у грызунов (Slamovits et al., 2001) и у насекомых (Ross et al., 1997; Mestrovic et al., 1998). Именно амплификации и делеции множеств повторов в процессе видообразования способны были привести к быстрым и радикальным изменениям состава ПГХ у малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis*, которые в свою очередь вызвали быстрые и радикальные изменения характера прикреплений хромосом к ядерной оболочке.

Закономерности локализации консервативных повторяющихся последовательностей ДНК, способных к взаимодействию с белковыми структурами ядра, у видов комплексов *Anopheles maculipennis* и *Drosophila melanogaster*

Фрагменты, локализация которых была изучена на хромосомах *A. atroparvus* и *A. messeae* с помощью *in situ* гибридизации, отличаются друг от друга по способности к связыванию с различными белковыми структурами ядра, предсказанной программой “ChrClass” (таблица 3). Так, клоны Atr2R-25a и Atr2R-118 не обладают способностью к взаимодействию с белковыми структурами ядра, тогда как клоны Atr2R-25b, Atr2R-90 и Atr2R-136 классифицированы как ДНК синаптонемного комплекса, а клоны Atr2R-46a, Atr2R-73 и Atr2R-85a – как ДНК ядерного матрикса (M/SAR ДНК). Таким образом, между районами ПГХ, различных по структуре и способности к прикреплению к ядерной оболочке, выявлена разница в содержании консервативных повторенных последовательностей ДНК с различными молекулярными свойствами. Однако, прямой связи между молекулярными свойствами последовательностей ДНК и структурой содержащих их районов ГХ не прослеживается. Так, районы, в которых локализуются фрагменты, обладающие свойствами ДНК ядерного матрикса, не обязательно образуют прочную связь с ядерной оболочкой. Так, *in situ* гибридизация фрагментов Atr2R-46a и Atr2R-73 (M/SAR ДНК), выявила локализацию гомологичных им последовательностей ДНК в диффузном β-ГХ хромосомы 2 у *A. atroparvus*, образующим лишь факультативные контакты с ядерной оболочкой. Последовательности ДНК, гомологичные фрагментам Atr2R-22 и Atr2R-73 (M/SAR ДНК), на хромосомах *A. messeae* также располагаются в блоках α-ГХ, не образующих контактов с оболочкой. Следовательно, одного наличия подобных последовательностей ДНК в районе ГХ еще недостаточно для формирования прочной связи с ядерной оболочкой.

Для проверки этого вывода была изучена хромосомная локализация консервативной повторяющейся последовательности ДНК из диффузного ПГХ *D. melanogaster*, по молекулярным свойствам являющейся ДНК ядерной ламини у видов подгруппы *melanogaster*. Клон λ20p1.4 относится к АТ-богатым (62,6 %) умеренным повторам генома *D. melanogaster* (~ 120 копий), и представлен *Hind III-EcoR I*-мономерами длиной 1,4 и 1,6 т.п.о. Клон λ20p1.4 высокоспецифично связывался с ламиниом *in vitro* при концентрации конкурентной ДНК, в 200 раз превышающей концентрацию экспериментальной ДНК и обнаруживался в совместной локализации с ламиниом *in vivo* в политенных ядрах слюнных желез личинок *D. melanogaster* (Baiborodin et al., 1993; Шарахов и др., 1997; Богачев и др., 1996; Varicheva et al., 1996). Саузерн-блот-гибридизация клона λ20p1.4 с геномными ДНК обнаружила присутствие гомологичных ей последовательностей в геномах видов комплекса *melanogaster* – *D. simulans*, *D. mauritiana* и *D. sechellia*, и в геноме анцестрального вида подгруппы *melanogaster* – *D. orena* (комплекс *yakuba*) (Шарахов и др., 1997).

**Хромосомная локализация клона λ20p1.4 у видов дрозофил подгруппы *melanogaster*.** У всех исследованных видов, *D. orena*, *D. simulans*, *D. mauritiana*, *D. sechellia* и линий *D. melanogaster* и *D. simulans* из природных популяций ДНК, гомологичная клону λ20p1.4, выявлена в ПГХ (рисунок 7). ПГХ *D. orena* помечился слабо (не показано). Распределение ДНК клона λ20p1.4 по плечам хромосом различается между видами и линиями. Результаты картирования представлены в таблице 4. *D. melanogaster* характеризуется постоянством локализации клона λ20p1.4, в то время как локализация λ20p1.4 у *D. simulans* варьирует. Отличия в локализации клона λ20p1.4 у линий *D. simulans* из различных популяций свидетельствуют о способности ДНК λ20p1.4 у этого вида к быстрому изменению положения в эухроматине хромосом, напоминающему перемещения мобильных элементов.



**Рисунок 7 – Локализация клона  $\lambda 20p1.4$  в хромоцентрах политенных хромосом слюнных желез личинок видов *Drosophila* подгруппы *melanogaster*: а – *D. mauritiana*, б – *D. simulans*, в – *D. sechellia*. Стрелки указывают на помеченные районы. СС – хромоцентр. Шкала – 10 мкм.**

**Таблица 4 – Распределение районов локализации клона  $\lambda 20p1.4$  по плечам политенных хромосом у видов *Drosophila* подгруппы *melanogaster* и их линий из природных популяций.**

Виды (линии)	Плечи хромосом				
	X L	2 L	2R	3L	3R
<i>D. melanogaster</i> (Oregon R, Berlin, Canton-S, "Душанбе", "Томск", "Чернобыль")	-- --	-- --	49 D	--- -	--- -
<i>D. mauritiana</i> "лабораторная"	-- --	-- --	--- -	--- -	96 B 98 E
<i>D. sechellia</i> "лабораторная"	-- --	-- --	53 E	--- -	10 0B
<i>D. simulans</i> "лабораторная"	1 0 A	3 5 D	--- -	63 A 64 B	86 C 93 E 98 B
<i>D simulans</i> "Armidale"	-- --	-- --	--- -	71 A 79 C	--- -
<i>D. simulans</i> "Cordova"	-- --	-- --	48 E	71 A 79 C	88 E
<i>D simulans</i> "Hawaii"	-- --	-- --	--- -	61 D 70 A 74 A B 79 C	99 A
<i>D. simulans</i> "Roussette"	-- --	2 3 A	--- -	--- -	90 A
<i>D. simulans</i> "Valence"	-- --	3 4 E	53 E 54 A 51 C	69 A	98 B

Таким образом, у видов *Drosophila* подгруппы *melanogaster*, так же как и у видов малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis*, одного присутствия последовательностей ДНК, способных к специфичному связыванию с ламиной, в районе ПГХ еще недостаточно для формирования связи с ядерной оболочкой. Этот вывод подтверждается положительными результатами гибридизации фрагмента  $\lambda 20p1.4$ , в районы ПГХ у *D. mauritiana* (рисунок 7а), не прикрепляющиеся к ядерной оболочке, и даже не образующие факультативных контактов. Как

показали проведенные ранее исследования ядер питающих клеток яичников, первичные политенные хромосомы у этого вида не контактируют с ядерной оболочкой, и свободно располагаются в пространстве ядра (Стегний, Вассерлауф, 1994). Вероятно, что для возникновения прочной связи района хромосомы с оболочкой необходимо не столько наличие последовательностей с определенными свойствами, сколько их достаточная концентрация. В этом случае способность конкретного ПГХ к связыванию с оболочкой ядра может определяться сложившимся в нем в процессе эволюции набором и числом копий повторов, обладающих свойствами ДНК ядерных белковых структур. На наш взгляд, амплификации и делеции множеств повторов в процессе видообразования, затрагивающие способные к взаимодействию с белковыми структурами ядра повторы, могли наиболее эффективно сказаться на возникновении/ исчезновении связи района ПГХ с ядерной оболочкой.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время благодаря успехам молекулярной генетики главные принципы структурной организации гетерохроматина на молекулярном уровне, принципы организации и эволюции повторяющихся последовательностей ДНК, основанные на исследованиях модельных объектов, уже известны. Однако, до сих пор даже у вида малярийного комара *Anopheles gambiae*, геном которого, согласно опубликованным данным, был “полностью” прочитан (Holt et al., 2002), состав ДНК гетерохроматина прицентромерных районов хромосом до конца не известен, поскольку методы, разработанные для секвенирования эухроматиновой части геномов, не всегда работают для гетерохроматина. Учитывая важность гетерохроматина для функционирования генома, необходимо проверить применимость имеющихся теоретических обобщений к частным случаям геномов эпидемически опасной группы насекомых – малярийных комаров рода *Anopheles*. Данная работа представляет собой первый шаг в этом направлении. Результаты настоящего исследования подтверждают, что прицентромерный гетерохроматин малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* имеет типичный для конститутивного гетерохроматина состав ДНК: содержит разнообразные повторы, мобильные элементы и структурные гены. В работе показано, что повторы, образующие прицентромерный гетерохроматин малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis*, подвергаются эволюционным процессам, обнаруженным ранее на других объектах, а в частности, – амплификации и делеции, согласно теории “библиотек”. Из полученных результатов становится ясно, что для дальнейшего изучения механизмов формирования связи района ПГХ с ядерной оболочкой и реорганизации этой связи при видообразовании потребуются не только выявление и клонирование, но и количественная оценка содержания консервативных и видоспецифичных последовательностей ДНК, способных связываться с белковыми структурами ядра. На следующем этапе изучения эволюции прицентромерного гетерохроматина видов комплекса *Anopheles maculipennis* в первую очередь будет необходима детальная характеристика отдельных семейств повторяющихся последовательностей ДНК.



## ВЫВОДЫ

1. С помощью метода микродиссекции прицентромерного гетерохроматина правого плеча хромосомы 2 *A. atroparvus* с последующей ДОР-ПЦР получены фрагменты ДНК недопредставленного ГХ политемных хромосом. Библиотеки фрагментов ДНК гетерохроматина, полученные на основе микродиссекции хромосом, могут быть использованы для первичного анализа спектра последовательностей хромосомных районов.
2. Показано, что изученный район ПГХ хромосомы 2 *A. atroparvus* обладает типичным для конститутивного гетерохроматина составом ДНК: образован смесью различных по первичной последовательности повторов и содержит мобильные элементы и жизненно важные структурные гены. Таким образом, состав прицентромерного гетерохроматина консервативен на уровне отдельных последовательностей ДНК.
3. Показано, что входящие в состав ПГХ хромосомы 2 *A. atroparvus* (подрод *Anopheles*) структурные гены и мобильные элементы консервативны у двукрылых насекомых, так как гомологичные им последовательности обнаружены у *A. gambiae* (подрод *Cellia*) и у *Drosophila melanogaster*.
4. Выяснено, что входящие в состав ПГХ хромосомы 2 *A. atroparvus* повторяющиеся последовательности ДНК консервативны в комплексе *Anopheles maculipennis*. На примере Саузерн-блот-гибридизации фрагмента Atr2R-73 с геномными ДНК *A. atroparvus*, *A. messeae* и *A. beklemishevi* показано сходство геномной организации консервативных повторяющихся последовательностей ДНК в геномах видов комплекса *Anopheles maculipennis*.
5. Выяснено, что эволюционные изменения состава районов прицентромерного гетерохроматина у видов комплекса *Anopheles maculipennis* касались композиции консервативных повторяющихся последовательностей ДНК в соответствии с теорией "библиотек", поскольку *in situ* гибридизация отдельных фрагментов библиотеки выявила различия районов гетерохроматина по набору содержащихся в них консервативных повторяющихся последовательностей ДНК.
6. Обнаружено, что уникальность состава каждого района прицентромерного гетерохроматина заключается не только в комбинации последовательностей ДНК, общих для нескольких хромосом, но и в наличии характерных только для него повторяющихся последовательностей ДНК, как показали результаты *in situ* гибридизации фрагментов Atr2R-46a, Atr2R-73 и Atr2R-85a у *A. atroparvus* и фрагмента Atr2R-22 у *A. messeae*.
7. Выяснено, что наличие в составе района хромосомы последовательностей ДНК, способных к взаимодействию с белковыми структурами ядра, не является достаточным условием для его прикрепления к ядерной оболочке, как показала *in situ* гибридизация фрагмента  $\lambda$ 20p1.4 (M/SAR ДНК) у *Drosophila mauritiana* и фрагментов Atr2R-73 и Atr2R-22 (M/SAR ДНК) у *A. messeae* в районы политемных хромосом, не контактирующие с ядерной оболочкой.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Шарахов И.В., Грушко О.Г., Богачев С.С. Филогенетические отношения в подгруппе *melanogaster* рода *Drosophila* (*Sophophora*) на основе хромосомной локализации повторяющейся ДНК // Тезисы докладов VI Всероссийского диптерологического симпозиума, посвященного 100-летию А.А. Штакельберга, “Место и роль двукрылых насекомых в экосистемах“. – Санкт-Петербург: Зоологический институт РАН, 1997. – 159 с.
2. Шарахов И.В., Грушко О.Г., Богачев С.С., Макаров В.Л. Молекулярные механизмы эволюции пространственной упорядоченности генома // Труды I международного симпозиума “Эволюция жизни на Земле”. – Томск., 1997.
3. Шарахов И.В., Шарахова М.В., Грушко О.Г., Котликова И.В., Макаров В.Л. Эволюционная консервативность повторенных фрагментов ДНК *Drosophila melanogaster* // Труды I международного симпозиума “Эволюция жизни на Земле”. – Томск, 1997.
4. Шарахов И.В., Рогачев В.А., Богачев С.С., Грушко О.Г., Фишер П.А. Организация последовательностей, гомологичных клону  $\lambda 20p1.4$ , в геномах видов подгруппы *melanogaster* // Материалы международной конференции, посвященной 80-летию со дня рождения академика Д. К. Беляева, “Современные концепции эволюционной генетики”. – Новосибирск, 1997. – С. 400–402.
5. Грушко О.Г., Шарахов И.В. Хромосомная локализация ламинной ДНК (клона  $\lambda 20p1.4$ ) у линий *Drosophila simulans* // Материалы региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Сибирская школа молодого ученого". – Томск, 1998.
6. Грушко О.Г., Шарахов И.В. Внутри- и межвидовой полиморфизм хромосомной локализации M/SAR ДНК // Материалы II Съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. – Санкт-Петербург, 2000. – Т.2. – С.140.
7. Грушко О.Г., Рубцов Н.Б., Карамышева Т.В., Стегний В.Н. Новые молекулярно-цитогенетические подходы в изучении особенностей реорганизации гетерохроматина при видообразовании у комаров комплекса *Anopheles maculipennis* // Тезисы докладов I международной конференции “Проблема вида и видообразования”. – Томск, 2000. – С.40.
8. Грушко О.Г., Шарахов И.В., Стегний В.Н. Хромосомная локализация клона  $\lambda 20p1.4$  ДНК ядерной ламины *Drosophila melanogaster* у видов комплекса *melanogaster* (род *Drosophila* (*Sophophora*)) // Генетика. – 2002. – Т. 38. – № 4. – С. 483–488.
9. Грушко О.Г., Шарахова М.В., Шевченко А.И., Карагодин Д.А., Карамышева Т.В., Рубцов Н.Б., Стегний В.Н. Характеристика и сравнительный анализ ДНК из прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *Anopheles atroparvus* V. Tiel (*Culicidae*, *Diptera*) // Генетика. – 2004. – Т. 40. – № 10. – С. 1325–1335.
10. Грушко О.Г., Русакова А.Ю., Шарахова М.В., Шарахов И.В., Стегний В.Н. Локализация повторенных последовательностей ДНК в прицентромерном гетерохроматине у малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis* // Цитология. – 2005. В печати.