

Ананьина Татьяна Викторовна

**ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ, СТРУКТУРЫ И ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ
ХРОМАТИНА ТРОФОЦИТОВ ЯИЧНИКОВ
CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA
(DIPTERA: CALLIPHORIDAE)**

03.00.15 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в НИИ Биологии и Биофизики
при Томском государственном университете

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор Стегний Владимир Николаевич

Официальные оппоненты:
доктор биологических наук, профессор Назаренко Сергей Андреевич
доктор биологических наук, профессор Высоцкая Людмила Васильевна

Ведущая организация: Институт цитологии РАН (Санкт-Петербург)

Защита состоится __3 марта__ 2004 года в __9.30__ 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 «_3_» __февраля__ 2004 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

Головацкая И.Ф.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы.

Развитие исследований в области структурно-функциональной организации хромосом стимулировало интерес к интерфазному ядру как системе, отражающей репликативную и транскрипционную организацию генетического аппарата. Поиск новых подходов, применение современных молекулярно-цитогенетических методов и их адаптация к конкретным объектам необходимы для решения одной из ключевых задач клеточной биологии - изучения структурно-функциональной организации интерфазного ядра.

Трофоциты яичников насекомых - прекрасная модель для изучения важнейших клеточных процессов, происходящих в интерфазном ядре - эндоредупликации, транскрипции, а также пространственной реорганизации интерфазного хроматина, являющейся ключевым событием в процессе видообразования (Стегний, 1993). Трофоциты не только обеспечивают ооцит всеми необходимыми для формирования яйца продуктами, но и участвуют в создании видоспецифичной конформации цито- и нуклеоплазмы ооцита (Айзенштадт, 1984).

Молекулярно-цитологическое изучение хроматина трофоцитов яичников *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae) открывает уникальные возможности для выяснения принципов организации генома высших эукариот. Формирование политенных хромосом с переходом хроматина от сильно компактизованного (блоки первичных политенных хромосом) к декомпактизованному состоянию (ядра с ретикулярной структурой), позволяет оценить значение уровня компактизации хроматина и общей архитектуры интерфазного ядра в процессе оогенеза.

Цели и задачи исследования.

Целью данной работы является изучение пространственной организации и морфологии хроматина трофоцитов яичника *C. erythrocephala*. Для достижения цели были поставлены конкретные задачи:

1. Изучить развитие фолликулов яичников и изменение морфологии хроматина трофоцитов;
2. идентифицировать первичные политенные хромосомы трофоцитов и оценить их пространственное взаиморасположение;
3. микродиссектировать районы и хромосом получить ДНК-библиотеки для изучения пространственной организации хроматина ядер трофоцитов;
4. проанализировать локализацию ДНК-библиотек в ядрах трофоцитов с различной морфологией хроматина;
5. оценить упорядоченность хроматина в ретикулярных ядрах трофоцитов.

Научная новизна.

Впервые показано, что на определенной стадии развития яичника *C. erythrocephala* фолликул визуально (по морфологии хроматина трофоцитов) можно разделить на три зоны: в зависимости от близости к ооциту, в ядрах трофоцитов хроматин представлен различными морфологическими формами и имеет различную степень конденсации. Проведена идентификация первичных политенных хромосом трофоцитов методом сопоставления с цитологической картой вторичных политенных хромосом и оценена их пространственная организация в ядре. Впервые для изучения архитектуры ядер трофоцитов яичников *C. erythrocephala* применен метод микродиссекции участков политенных хромосом. Получена информация об особенностях гибридизации ДНК-проб с хроматином, находящимся на различных стадиях эндомитотического цикла. Впервые показано, что у *C. erythrocephala* в ядрах трофоцитов яичников, имеющих ретикулярную структуру хроматина, материал отдельных хромосом локализуется в определенных хромосомных территориях.

Основные результаты получены автором самостоятельно. Микродиссекции, ДОР-ПЦР и FISH проводились на базе лаб. морфологии и функции клеточных структур (ИЦиГ СО РАН) совместно с д.б.н. Н. Б. Рубцовым и к.б.н. Т.В. Карамышевой.

Практическая ценность работы.

Практический интерес имеет применение методики микродиссекции политенных хромосом для изучения пространственной организации интерфазных ядер. Работа имеет теоретическое значение в области цитогенетики.

Апробация результатов.

Результаты исследований были представлены на Научных чтениях "Проблемы эволюционной цитогенетики, селекции и интродукции", посвященных 100-летию профессора В.П. Чехова, Томск (1997); Конференции «Сибирская школа молодого ученого», Томск (1998); II Съезде ВОГиС, С-Петербург (2000); XIV Всероссийском совещании «Структура и функции клеточного ядра», С-Петербург (2002); I Съезде Общества клеточной биологии и Международном симпозиуме по проблемам мейоза, С-Петербург (2003).

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 7 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 203 ссылки. Работа изложена на 106 страницах, содержит 12 рисунков и 1 таблицу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Объектом исследования являлась сине-зеленая мясная муха *Calliphora erythrocephala* Mg., взятая из природной популяции г.Алматы. Лабораторное культивирование проводили по обычной методике (Тамарина, 1958; Виноградова, 1984). Для изучения влияния температуры на динамику изменения структуры хроматина трофоцитов из общей культуры были получены 2 линии, которые содержались при температуре 13⁰С и 25⁰С. Яичники самок разного возраста (с 1 по 9 день после выхода имаго из пупария) выделяли в изотоническом растворе (0,7% NaCl) и фиксировали в метанол-уксусной смеси (3:1).

Приготовление лактоацето-орсеиновых препаратов. Фиксированные яичники разделяли на фолликулы, красили лактоацето-орсеиновым красителем 15-20 мин, отмывали в 45% уксусной кислоте, накрывали покровным стеклом и раздавливали.

Приготовление воздушно-высушенных препаратов. Фиксированные яичники разделяли на фолликулы, помещали в 45% уксусную кислоту, накрывали покровным стеклом и раздавливали. После замораживания препарата жидким азотом удаляли покровное стекло и проводили обезвоживание в спиртах (50%, 75%, 100%, этанол-уксусный фиксатор (3:1)) по

10 мин, затем высушивали на воздухе при комнатной температуре. Для микродиссекции препараты делали на покровных стеклах (24x60 мм)

G-окраска (ASG): Воздушно-высушенные препараты инкубировали в 2X SSC при 60⁰С в течение 1 ч, затем промыли в дистиллированной воде и красили в 2%-ном растворе красителя Гимза в течение 1,5 ч.

Микродиссекция и получение хромосомо-специфичных ДНК-проб: Микродиссекцию проводили на микроскопе AXIOVERT 10, оснащенный микроманипулятором IR (Zeiss, ФРГ) и механическим позиционером, микродиссекционными иглами. ДНК-библиотеки хромосом 2, 3 и 6 были получены микроманипуляционным сбором восьми копий соответствующих хромосом 3 и 6 и теломерного района хромосомы 2 и последующей амплификацией ДНК в полимеразной цепной реакции с частично вырожденным праймером (DOP-PCR) (Rubtsov et al, 2000; Карамышева, 2001).

Супрессионная in situ гибридизация: Супрессионную in situ гибридизацию проводили, как описано у Пинкеля (Pinkel, 1986).

FISH: Флуоресцентную in situ гибридизацию (FISH) и детекцию меченой ДНК проводили согласно стандартным протоколам (Lichter, 1988). ДНК-библиотеки метили дигоксигенин-11-дУТФ (зеленый сигнал) и родамином (красный сигнал) Для окрашивания хромосом после in situ гибридизации использовали DAPI. В случае одновременной гибридизации двух ДНК-библиотек, меченных разными гаптенами, условия in situ гибридизации не отличались от условий для FISH с одним зондом.

Для одновременной детекции двух сигналов, являющихся результатом гибридизации различно меченых проб, готовили два раствора соответствующих конъюгатов в блок буфере: авидин-FITC (1:250) и Cy3 (1:125). Перед нанесением на препарат данные растворы конъюгатов смешивали в соотношении 1:1. Под покровное стекло в качестве первого антитела наносили 30 мкл общего раствора двух конъюгатов. В качестве второго антитела - биотинилированный антиавидин, затем – авидин-FITC.

Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа AXIOSCOP 2, для регистрации сигнала использовали CCD-камеру и программное обеспечение «ISIS» фирмы METASYSTEMS GmbH (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие фолликулов и политенных хромосом трофоцитов яичников *C. erythrocephala*.

Яичники *C. erythrocephala* являются мероистическими политрофными, т. е. фолликулы яичника состоят из ооцита, 15 питающих клеток (трофоцитов) и окружающих их клеток фолликулярного эпителия.

Был проведен анализ развития яичников *C. erythrocephala*. При содержании имаго при t=20⁰С в течение первых двух дней с момента выхода имаго из пупария фолликулы имеют грушевидную форму, хроматин в ядрах трофоцитов практически не окрашивается, политенные хромосомы не визуализируются (Рис.1. а). На 3-4 день фолликул приобретает овальную или округлую форму, хроматин трофоцитов окрашивается хорошо (Рис.1. а). На этой стадии развития фолликула в трофоцитах визуализируются политенные хромосомы различной морфологии.

Наблюдали фолликулы, в которых имелись все переходные стадии от хорошо оформленных палочковидных хромосом до ядер с ретикулярной структурой (Рис. 1. а, б). При анализе целых фолликулов самок 3-4-х дневного возраста, оказалось, что по морфологии хроматина трофоцитов фолликул можно разделить на 3 зоны. Первая зона – дистальная (от ооцита) часть

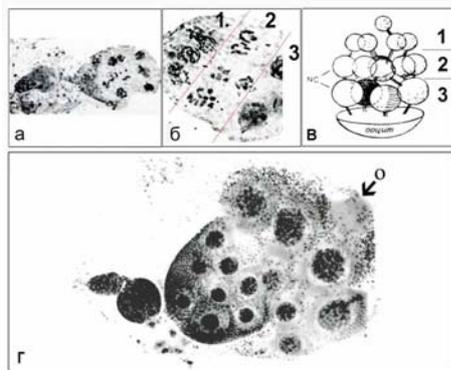


Рис. 1. Развитие фолликулов яичников и морфология хромосом трофоцитов *C. erythrocephala*.

а - фолликулы яичника мух (4 дня после выхода из пупария); б - три зоны (1, 2, 3) в фолликуле, отличающиеся морфологией хроматина трофоцитов; в - схема пространственных взаимоотношений между ооцитом и трофоцитами (Bier et al, 1969); г - фолликулы яичника мух (6 дней после выхода из пупария). о - ооцит, NC- трофоциты.

фолликула – содержит ядра трофоцитов с длинными, тонкими хромосомами. Вторую зону – среднюю часть фолликула – образуют ядра с первичными политенными и компактными хромосомами. В третьей зоне – проксимальной части фолликула – находятся ядра с эндометафазными хромосомами и ядра, в которых эндометафазные хромосомы начинают декомпактизоваться (стадия эндоанафазы), образуя ретикулярную структуру (Рис. 1. б). Эти результаты хорошо согласуются со схемой пространственных взаимоотношений между ооцитом и трофоцитами, предложенной Биром (Bier et al., 1969), где также имеет место зональность в расположении трофоцитов в фолликуле (Рис. 1. в).

На 5-6 день после выхода мух из пупария в фолликулах преобладали трофоциты с ретикулярными ядрами. Отмечалось варьирование в размерах ретикулярных ядер: ядра 4 трофоцитов, непосредственно контактирующих с ооцитом были значительно больше других ядер (Рис. 1. г). Дальнейший рост фолликула сопровождается увеличением размеров ядер и деконденсацией хроматина, после чего ядра трофоцитов постепенно деградируют.

На стадии ретикулярных ядер размер 4 трофоцитов, непосредственно контактирующих с ооцитом, больше по сравнению с остальными трофоцитами (также как и у дрозофилы: 4 трофоцита имеют ядерные объемы в среднем в 2,67 раза больше, чем объемы остальных клеток (Brown, King, 1964)). Известно, что увеличение объема ядра может свидетельствовать о резко возросшей транскрипционной активности хроматина (Анисимов 1976; Eils, Dietzel, 1996; Swedlow, Lamond, 2001). Таким образом, причиной вариации морфологии хроматина в одном фолликуле могут являться различия в уровне плоидности и транскрипционной активности, возникшие вследствие специфики геометрии синцития.

Для изучения динамики морфогенеза хроматина трофоцитов необходим детальный анализ морфологии хроматина трофоцитов на всех стадиях развития фолликула.

Морфология хроматина трофоцитов яичников *C. erythrocephala*. Формирование первичных политенных хромосом.

На ранних стадиях развития имаго (1-2 день после выхода из пупария) в фолликулах наблюдали мелкие ядра с ретикулярной структурой или ядра с тонкими, переплетенными фибриллами. Хроматин трофоцитов окрашен слабо, отдельные хромосомы не выявляются (Рис. 2.1. а, б). Конъюгация хроматиновых фибрилл приводит к появлению рыхлых жгутов с редкими гетерохроматиновыми блоками. Отдельные хромосомы еще не визуализируются (Рис. 2.1. в).

Следующая стадия – ядра с тонкими длинными политенными хромосомами, плохо структурированными и переплетенными между собой (Рис. 2.1. г). Постепенная компактизация хроматина (возможно и дальнейшая политенизация) приводит к образованию первичных политенных хромосом – укороченных, рыхлых и не имеющих дисковой исчерченности (Bier, 1958). В результате соматической конъюгации гомологов мы наблюдаем гаплоидный набор хромосом - 5 крупных и 1 маленькая, гетерохроматиновая (имеющая С-положительное окрашивание (Вассерлауф и др., 2003)) хромосома (Рис. 2.1. д). Именно на этой стадии количество ярко окрашенных блоков хроматина максимально, что и позволяет идентифицировать хромосомы.

Дальнейшая компактизация ведет к значительному укорочению первичных политенных хромосом. Блоки, которые выявлялись на предыдущей стадии, сливаются, формируя протяженные участки ярко окрашенного хроматина. Структура хромосом становится более рыхлой в результате неплотной конъюгации составляющих их хроматид. Однако, на этой стадии еще видна характерная морфология каждой хромосомы (Рис. 2.1. е).

Конъюгация гомологов первичных политенных хромосом может быть нарушена. В норме может наблюдаться как частичный асинапсис – характерен для одной хромосомы (Рис. 2.1. ж), так и редко встречаемый полный

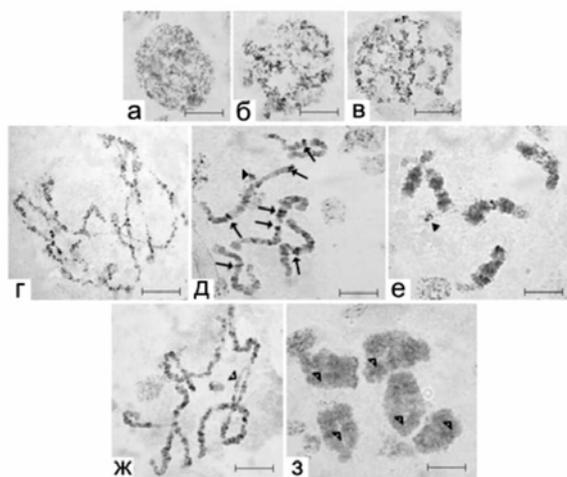


Рис. 2.1. Стадии формирования первичных политенных хромосом трофоцитов яичников *C. erythrocephala*.

а, б, в – первичные ретикулярные ядра; г, д, е - стадии постепенной компактизации хроматина первичных политенных хромосом; ж, з – первичные политенные хромосомы с нарушенной соматической конъюгацией гомологов. Окраска лактоацето-орсеином. Шкала – 10 мкм. x 100.

→ - блоки, проявляющиеся на первичных политенных хромосомах; ► - хромосома б; ► - районы асинапсисов гомологов первичных политенных хромосом.

асинапсис гомологов некоторых хромосом. Полный асинапсис гомологов был выявлен у потомства, полученного при скрещивании мух из разных популяций (популяции г. Алматы и г. Томска) и имеет большее проявление в укороченных хромосомах с рыхлой структурой (Рис. 2.1. з).

Асинапсис участка одной хромосомы, встречаемый практически во всех ядрах (Рис. 2.1. ж) - специфика этого района, а не результат раздавливания ядер в ходе приготовления препаратов. По литературным данным, варьирование методов приготовления препаратов не влияет на наличие и протяженность асинапсиса (Куличков, Беляева, 1975). Причиной асинапсиса гомологов у потомства, полученного от скрещивания особей из разных популяций, может быть разнокачественность структуры гомологов, обусловленная как наличием хромосомных перестроек (Beegmann, 1962), так и накоплением мобильных элементов генома в удаленных популяциях (Riede, Renz, 1983).

Формирование вторичных ретикулярных ядер.

Конденсация хроматина и ослабление связи между хроматидами приводит к тому, что хромосомы приобретают овальную форму с хорошо видимой перетяжкой в центромерном районе (Рис. 2.2. а). Обнаружено, что

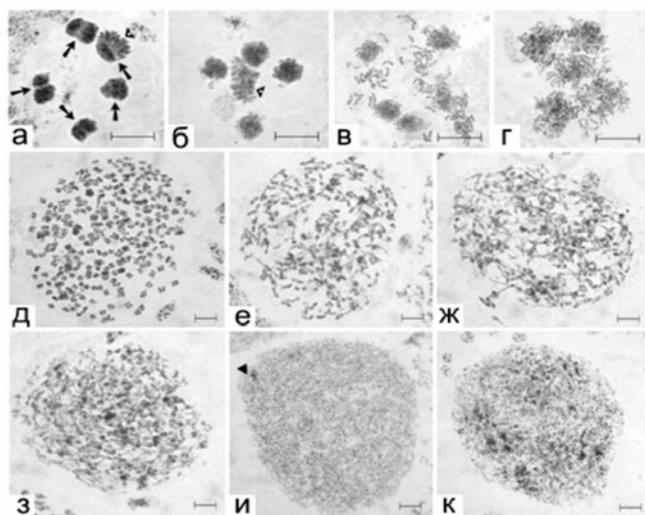


Рис. 2.2. Стадии формирования вторичных ретикулярных ядер трофоцитов яичников *C.erythrocephala*. а, б – компактные хромосомы и начало эндомитотического распада (эндопрофаза); в, г – эндометафазные хромосомы, сохраняющие свою территориальность в ядре; д – эндометафазные хромосомы, рассеянные по ядру; е, ж, з – стадии деспирализации эндометафазных хромосом (эндоанафаза); и, к – вторичные ретикулярные ядра. Окраска лактоацето-орсеином. Шкала – 10 мкм. x 100.

➡ - районы перетяжек в центромерных областях; ➤ - начало эндомитотического распада одной из хромосом; ▲ - район хромосомы б.

распад политенных хромосом на эндометафазные происходит асинхронно: одна из хромосом начинает распадаться первой, в то время как другие 4 большие хромосомы еще сохраняют свою форму (Рис. 2.2. а, б, в). Некоторое время эндометафазные хромосомы еще сохраняют свою территориальность в ядре и располагаются отдельными группами (Рис. 2.2. г). Но затем они рассеиваются, равномерно заполняя все пространство ядра (Рис. 2.2. д). Следующая стадия – эндоанафаза – постепенная декомпактизация эндометафазных хромосом (Рис. 2.2. е, ж, з). Для ядер, находящихся на этой стадии характерна дифференциальная декомпактизация хроматина. Тонкие хроматиновые нити соседствуют с участками еще не декомпактизованного хроматина.

Стадия эндоанафазы заканчивается полной декомпактизацией хроматина и образованием ретикулярного ядра. В течение эндоанафазы материал маленькой гетерохроматиновой хромосомы б выявить практически невозможно. Он теряется в общей массе хроматина и вторично (после стадии первичных политенных хромосом) начинает проявляться в виде ярко окрашиваемого района только в ядрах с ретикулярной структурой (Рис.2.2. и).

Структура хроматина ретикулярных ядер может варьировать: встречаются ядра с равномерно распределенными по кариоплазме хроматиновыми нитями, образующими однородную массу в которой выделяется один более темный участок (предположительно район маленькой хромосомы б) (Рис. 2.2. и) и ядра, в которых в однородной массе декомпактизованного хроматина встречаются участки компактного хроматина (Рис. 2.2. к).

Результаты работ по изучению неклассических форм политении у млекопитающих (Зыбына, 1986) и растений (Brady, 1973a) прямо указывают на то, что расщепление участков политенных хромосом на отдельные хромомемы и их деконденсация связаны с периодом репликации ДНК. Ретикулярные ядра трофоцитов *C. erythrocephala*, имеющие гомогенно распределенный по ядру хроматин и ядра с компактными участками хроматина, вероятно, также находятся на разных стадиях эндочикла.

Обнаружение на препарате трофоцитов с той или иной морфологией хроматина зависело от возраста мух и температуры, при которой содержалась культура. В связи с этим интересна роль температуры как экзогенного фактора в скорости развития фолликулов яичников и динамике процессов компактизации-декомпактизации хроматина трофоцитов яичников.

Влияние температуры на динамику изменения морфологии хроматина трофоцитов *C. erythrocephala*.

В опыте по влиянию температуры на развитие яичников, личинок и имаго содержали при температуре 13⁰С и 25⁰С. Опыт проводили в летние месяцы (июнь, июль). Реакцией на понижение температуры было общее замедление развития, которое выражалось в запаздывании откладки яиц по сравнению с мухами, содержащимися при t=25⁰С и в более длительном периоде продукции яиц.

Анализировали развитие фолликулов яичников и структуру хромосом трофоцитов у самок разного возраста, содержащихся при температуре 13⁰С и 25⁰С (Табл.1).

На ранних стадиях развития (1 день) отличия в развитии фолликулов не наблюдалось. В фолликулах встречались мелкие ядра с ретикулярной структурой или ядра с тонкими, переплетенными фибриллами. При t=25⁰С наибольшее количество морфологических типов ядер трофоцитов наблюдалось на 2-3 день, а при t=13⁰С - на 4-5 день после выхода имаго из пупария. Эндометафазные и крупные ретикулярные ядра обнаруживались на 4 день (при t=25⁰С) и на 8-9 день (при t=13⁰С) (Табл. 1).

Анализ динамики морфогенеза ядер трофоцитов яичников показал, что при сохранении всех морфологических типов ядер и очередности прохождения всех стадий преобразования хроматина, при снижении температуры имеет место задержка развития трофоцитов, что вероятно и определяет замедление формирования яиц и наступление репродуктивной стадии.

Таблица 1. Динамика изменения морфологии хроматина трофоцитов яичников *C. erythrocephala* при содержании имаго на 13⁰С (+) и 25⁰С (*).

типы ядер	Дни (после выхода имаго из пупария)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
I	+	*	+							
II		*	+	+	+					
III			*	+	+	+				
IV			*		+	+	+			
V			*	*		+				
VI			*	*		+	+	+		
VII				*	*	+		+	+	+
VIII					*	*			+	+

Примечание: I - мелкие ретикулярные ядра; II - ядра с тонкими олиготенными фибриллами; III – ядра с длинными первичными политенными хромосомами; IV – ядра с утолщенными первичными политенными хромосомами; V – ядра с компактными первичными политенными хромосомами; VI – начало эндомитотического распада первичных политенных хромосом; VII - ядра с эндометафазными хромосомами; VIII - крупные ретикулярные ядра.

Идентификация первичных политенных хромосом трофоцитов яичников *C. erythrocephala*.

Для анализа пространственного взаиморасположения первичных политенных хромосом необходимо их идентифицировать. Идентификация первичных политенных хромосом трофоцитов была проведена путем сопоставления с картой вторичных политенных хромосом (хромосомы, имеющие четкий дисковый рисунок) трофоцитов *C. erythrocephala*. Нами была использована номенклатура хромосом, предложенная Риббертом (Ribbert, 1979).

Вследствие особенностей структуры первичных политенных хромосом - неплотной конъюгации хроматид и отсутствия дискового рисунка, анализировали только хорошо определяемые районы – это прителомерные, прицентромерные районы и отдельные районы плеч.

Хромосома 1. Маркерным является прицентромерный район в виде перетяжки, рядом с которой локализован гетерохроматиновый блок (кинетохор по Ribbert, 1979). Характерной особенностью прителомерных районов плеч является отсутствие определенных очертаний («размытость») (Рис. 3. а).

Хромосома 2. Является наиболее легко идентифицируемой хромосомой, т.к. имеет крупный гетерохроматиновый блок в теломерном районе длинного плеча. Теломерный район короткого плеча слабо окрашивается. Прицентромерный район короткого плеча содержит крупный гетерохроматиновый блок (Рис. 3. б).

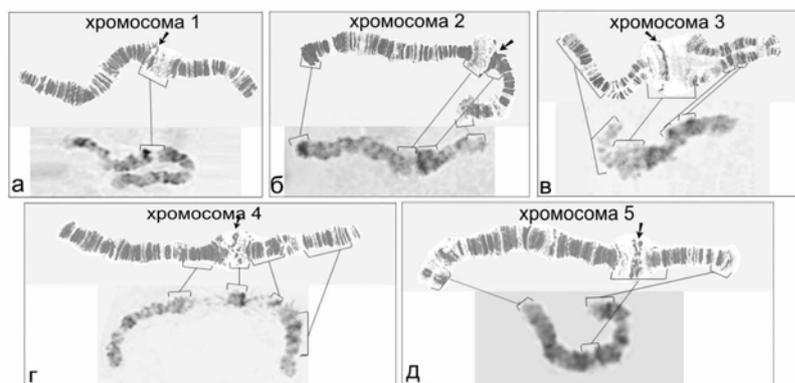


Рис. 3. Идентификация первичных политенных хромосом трофоцитов путем сопоставления с картой вторичных политенных хромосом трофоцитов *C. erythrocephala* (Ribbert, 1979).

Окраска лактоацето-орсеином. Скобками обозначены соответствующие районы; ➔ - кинетохор.

Хромосома 3. Отличается характерной морфологией: у первичных политенных хромосом (так же как и у вторичных) в прицентромерном районе имеется большой пух, вблизи которого зачастую наблюдается асиnapсис гомологов. Короткое плечо (3L) тоньше длинного плеча (3R) (Рис. 3. в).

Хромосома 4. Отличительной особенностью хромосомы 4 является морфология прицентромерного района: хромосома «разорвана», т.е. с обеих сторон центромерной области, на месте большого пуфа у вторичных политенных хромосом, расположены слабо окрашиваемые декоонденсированные районы. В центре – блок хроматина с яркоокрашенным блоком. (Рис. 3. г).

Хромосома 5. Маркером для идентификации хромосомы 5 является асиnapтированный прителомерный район длинного плеча (Рис. 3. д).

По мере сокращения длины первичных политенных хромосом происходит слияние ярко окрашенных районов в более крупные блоки, имеющие нечеткие границы (Рис. 4. а, б). Однако положение таких блоков является специфичным для хромосом, а его изменение можно проследить в ходе компактизации хроматина. Индивидуальной для каждой хромосомы является и локализация светлых зон декомпактизованного материала. Наличие этих признаков, положение центромерного района (в виде ярко окрашенного блока), соотношение плеч – т.е. общая морфология хромосом – делают возможной идентификацию первичных политенных хромосом трофоцитов яичников у *C. erythrocephala*.

Взаиморасположение первичных политенных хромосом в ядрах трофоцитов яичников *C. erythrocephala*.

Архитектура ядра с политенными хромосомами достаточно хорошо изучена у многих представителей Diptera как в соматических, так и в генеративной тканях (Hochstrasser et al., 1987; Прокофьева-Бельговская, 1967; Стегний, 1987, 1991б). Однако у *C. erythrocephala* этот вопрос изучен не был.

Анализ взаиморасположения первичных политенных хромосом трофоцитов яичников *C. erythrocephala* не выявил объединения хромосом и их плеч в общий центромерный район - локальный хромоцентр. Хромосомы рассредоточены в пространстве ядра и, по видимому, располагаются в определенном порядке по отношению друг к другу. Тяготение отдельных хромосом к ядерной оболочке может свидетельствовать о прикреплениях. Об этом же говорит и наличие тонких тяжей хроматина, отходящих от некоторых хромосом к оболочке ядра. Однако хорошо выраженные прикрепления (веерообразное расщепление хромосомы в районе прикрепления) обнаружены не были (Рис. 4 а, б).

Таким образом, отсутствие локального хромоцентра и рассредоточенность хромосом трофоцитов в пространстве ядра, характерное для видов *Anopheles* (Стегний, 1979) и *Drosophila* (Стегний, Вассерлауф, 1991 а, б; Стегний и др., 1996) выявлено и у *C. erythrocephala*.

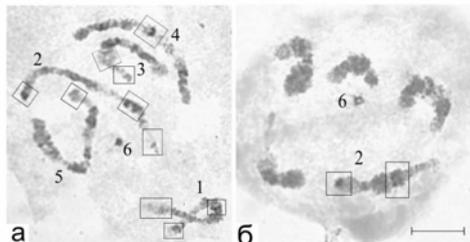


Рис. 4. Идентификация и пространственное взаиморасположение первичных политенных хромосом трофоцитов *C. erythrocephala*. Окраска лактоацето-орсеином. Шкала – 10 мкм. x 100.
□ – нумерация хромосом;
- маркерные районы.

Флуоресцентная in situ гибридизация (FISH) ДНК-библиотек, полученных методом микродиссекции, на первичные политенные хромосомы трофоцитов.

Перед нами стояла задача - оценить упорядоченность хроматина в ходе сложного эндомитотического цикла и в ретикулярных ядрах высокой ploidy. Сложность заключалась в отсутствии маркеров на определенные хромосомы *C. erythrocephala*. Эта проблема была решена путем получения хромосома- и районо-специфичных ДНК библиотек методом микродиссекции хорошо определяемого теломерного участка первичной политенной хромосомы 2 и хромосом 3 и 6 (Рис. 5). Для проверки специфичности полученных ДНК-библиотек была проведена флуоресцентная in situ гибридизация ДНК-проб на первичные политенные хромосомы.

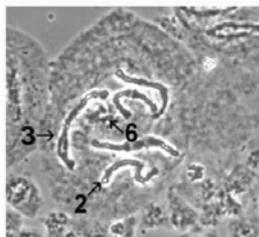


Рис. 5. Воздушно-высушенный неокрашенный препарат первичных политенных хромосом трофоцитов *C. erythrocephala*. Стрелками обозначены хромосомы 3 и 6 и район хромосомы 2, выбранные для микродиссекции. Фазовый контраст. x 40.

Хромосома-специфичная ДНК-библиотека хромосомы 6.

При анализе результатов FISH хромосома-специфичной ДНК-библиотеки хромосомы 6 на первичные политенные хромосомы оказалось, что ДНК-библиотека окрашивала только хромосому 6, сайты гибридизации пробы на других хромосомах не выявлены (Рис. 6. а). Анализ локализации ДНК-библиотеки на материале политенной хромосомы 6 выявил особенности структуры хроматина этой хромосомы: наличие двух плотнокомпактизованных блоков в

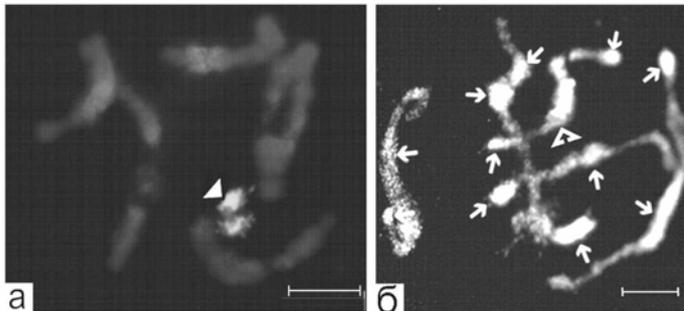


Рис. 6. FISH ДНК-библиотек на первичные политенные хромосомы трофоцитов *C. erythrocephala*.

а - FISH хромосома-специфичной ДНК-библиотеки хромосомы 6 (▷, красный сигнал); б - FISH хромосома-специфичной ДНК-библиотеки хромосомы 3 (▷, красный сигнал) и районо-специфичной ДНК-библиотеки хромосомы 2 (⇒, зеленый сигнал). Хроматин окрашен DAPI. Шкала - 10 мкм. x 100.

центромерном районе, которые не метятся зондом, и яркое окрашивание эухроматиновых плеч. Отсутствие сигнала может быть объяснено плотной упаковкой ДНК прицентромерных районов, и как следствие - недоступностью гомологичной ДНК для меченых фрагментов. Эти районы ярко окрашиваются DAPI.

Хромосома-специфичная ДНК-библиотека хромосомы 3

Вследствие сложности идентификации какого либо определенного района, хромосома 3 была микродилетирована полностью. Чтобы исключить фоновый сигнал была проведена FISH с супрессией высокоповторенных последовательностей. В результате был получен сигнал только в районе наибольшей гомологии – в прицентромерном районе хромосомы 3, вероятно, наиболее декомпактизованном (Рис. 6. б).

Районо-специфичная ДНК-библиотека хромосомы 2

Районо-специфичная ДНК-библиотека хромосомы 2 была получена микроманипуляционным сбором материала теломерного района хромосомы 2.

При проведении FISH районо-специфичной ДНК-библиотеки хромосомы 2, на первичных политенных хромосомах трофоцитов выявилось множество сайтов гибридизации ДНК-библиотеки. Предпочтительные места гибридизации – теломерные и прицентромерные районы хромосом. В некоторых хромосомах ДНК-библиотека гибридизовалась и по плечам хромосомы (Рис. 6. в). Интенсивность сигнала в ядрах даже в пределах одного препарата отличалась вариабельностью, что может быть объяснено различной компактизацией и доступностью хроматина для меченых фрагментов ДНК.

При анализе распределения сигнала на политенных хромосомах выявились некоторые закономерности в локализации ДНК-зонда: только у хромосомы 3 метятся оба теломерных района. У остальных хромосом яркие сигналы были на одном из теломерных районов, в прицентромерном и интеркалярном хроматине.

Такая специфика в распределении сигнала говорит об определенной гомологии последовательностей гетерохроматина теломерных и прицентромерных районов.

FISH ДНК-библиотека с ядрами трофоцитов различной морфологии

Визуализация хромосомы 6 в ядрах с различной морфологией хроматина.

В результате FISH хромосома-специфичной ДНК-библиотеки хромосомы 6 на первичные ретикулярные ядра трофоцитов был выявлен один сайт гибридизации ДНК-библиотеки (Рис. 7. а, б; зеленый сигнал). Область, занимаемая хромосомой 6, значительно больше и хорошо визуализируется. Наблюдаются отдельные участки мечения, находящиеся на некотором расстоянии от общей зоны гибридизации (Рис. 7. д; зеленый сигнал). Характер мечения не изменяется при образовании первичных политенных хромосом, их компактизации и начале эндомитотического распада (Рис. 7. д, е; зеленый сигнал). Отсутствие мечения наблюдается только на стадии эндометафазы (Рис. 7 ж). С началом декомпактизации эндометафазных хромосом сигнал опять начинает проявляться (Рис. 7. з).

Визуализация хромосомы 3 в ядрах с различной морфологией хроматина.

В результате FISH с супрессией высокоповторенных последовательностей ДНК-библиотеки хромосомы 3 на первичные ретикулярные ядра была выявлена одна область гибридизации, размер которой варьировал (Рис. 7. а, б, в; красный сигнал). ДНК-библиотека гибридизуется либо в обширную область, вероятно окрашивая практически всю хромосому 3 (Рис. 7. а), либо виден только один ярко окрашенный район (Рис. 7. б). Хроматин первичных ретикулярных ядер, постепенно компактизуется, формируя фибриллы, образующие затем первичные политенные хромосомы. По мере компактизации и формирования хроматиновых тяжей, область гибридизации ДНК-зонда сокращается. Часто визуализируется только небольшой яркий диск (Рис. 7. в; красный сигнал). В первичных политенных хромосомах, где конъюгация хроматид максимальная, виден один ярко окрашенный блок и менее яркое окрашивание плеч хромосомы 3 (Рис. 7. г; красный сигнал). Затем происходит сокращение первичных политенных хромосом с одновременным «разрыхлением» их структуры в результате нарушения конъюгации и увеличения расстояния между хроматидами. Процесс компактизации первичных политенных хромосом показан на примере хромосомы 3 (Рис. 7. г).

Ярко окрашиваемый блок в центромерном районе (ДНК-библиотека хромосомы 3), окрашивание теломерных районов (ДНК-библиотека хромосомы 2), а также яркий блок прицентромерного гетерохроматина, интенсивно окрашиваемого DAPI, служат прекрасными маркерами для идентификации хромосомы 3 разной степени компактности.

На стадии компактных хромосом ДНК-библиотека гибридизуется практически по всей хромосоме 3, за исключением одного блока (ярко окрашенного DAPI) (Рис. 7. д; красный сигнал). Дальнейшее эндомитотическое сжатие хроматид приводит к тому, что зона гибридизации ДНК-зонда опять сокращается до неширокой полосы (Рис. 7. е; красный сигнал). В эндометафазных ядрах, где имеет место максимальная конденсация хроматид (уже отдельных эндохромосом) ДНК-зонд не гибридизуется вообще (Рис. 7. ж). И, наконец, при деспирализации эндометафазных хромосом вновь появляется сигнал в виде области еще слабоокрашенного хроматина (Рис. 7. и).

Визуализация материала из теломерного района хромосомы 2.

В первичных ретикулярных ядрах наблюдается несколько сайтов гибридизации ДНК-библиотеки хромосомы 2 (Рис. 7. в; зеленый сигнал). Для первичных политенных хромосом характерно сокращение области мечения при уменьшении длины хромосом. Это показано на примере теломерных районов хромосомы 3 (Рис. 7. г; зеленый сигнал). На стадии компактных хромосом мечения ДНК-зондом не наблюдается вообще. Вновь сигнал появляется на стадии эндоанафазы, когда начинается деспирализация эндометафазных хромосом - ДНК зонд из прицентромерного района хромосомы 2 гибридизуется во многих местах по периферии ядра (Рис. 7. и; зеленый сигнал).

Поскольку флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) проводили на воздушно-высушенных давленных препаратах, то при анализе локализации метки необходимо учитывать расположение хроматина в одной плоскости. Вариации в окрашивании ДНК-зондом хромосомы 3 первичных ретикулярных ядер можно объяснить таким «расплющиванием» ядра, когда хромосома 3 либо располагается сверху, либо на нее налагается хроматин других хромосом и тогда заметен только наиболее ярко окрашенный блок. Различной степенью распластанный материал хромосом объясняются и вариации в размере области мечения ДНК-зондом хромосомы 6, которые можно

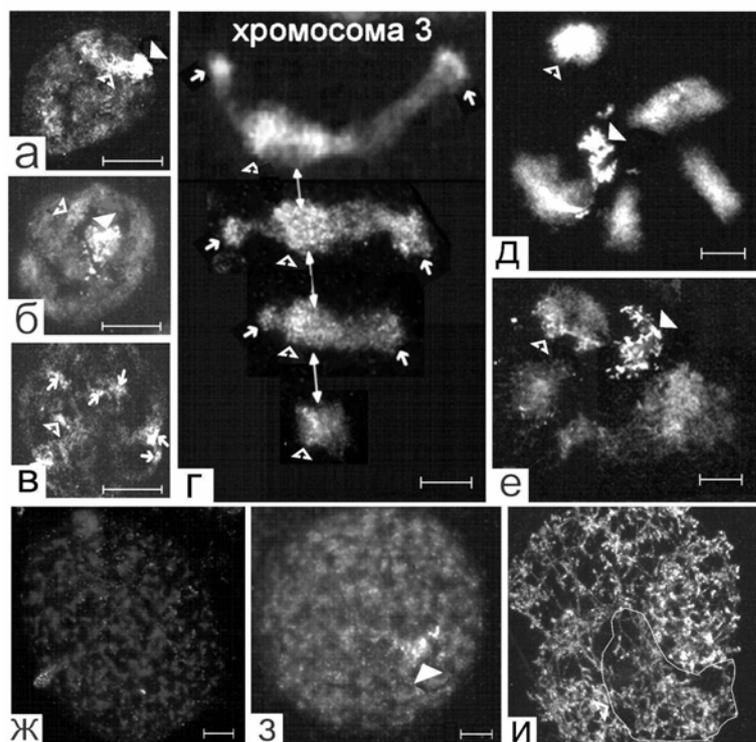


Рис. 7. Локализация ДНК-библиотек в ядрах трофоцитов яичников *C. erythrocephala*. а, б – первичные ретикулярные ядра; г – стадии компактизации первичной политенной хромосомы 3; д, е – стадии эндoproфазы; ж – стадия эндометафазы; з, и – стадии эндоанафазы. ▷ - хромосомо-специфичная ДНК-библиотека хромосомы 6; ▸ - хромосомо-специфичная ДНК-библиотека хромосомы 3; → - районно-специфичная ДНК-библиотека хромосомы 2; ↔ - блок прицентромерного гетерохроматина хромосомы 3; белая линия – область декомпактизации материала хромосомы 3. Хроматин окрашен DAPI. Шкала – 10 мкм. x 100.

наблюдать на всех стадиях морфогенеза ядер, а также наличие отдельных участков мечения «разлетевшегося» при давлении материала хромосомы 6.

Неодинаковая доступность участков ДНК для меченых зондов кажется наиболее вероятной причиной варибельности интенсивности гибридизации ДНК-библиотек не только с первичными политенными хромосомами, но и с ядрами, имеющими различную структуру хроматина. Очевидно, в данном случае решающее значение имеет степень компактности различных районов хромосом. В декомпактизованные структуры ДНК-зонд гибридизуется интенсивнее. Так при гибридизации соответствующего ДНК-зонда с хромосомой 6 мы наблюдаем обширную зону гибридизации. Очевидно, метятся эухроматиновые плечи этой хромосомы, хроматин которых настолько декомпактизован, что не выявляется при окрашивании лактоацето-орсеином. В плотноупакованные структуры, такие как центромерные районы хромосомы 6 и прицентромерный блок в хромосоме 3, ДНК-зонды не гибридизуются вообще. Изменением компактизации хроматина можно объяснить постепенное «затухание» в теломерных районах сигнала ДНК-зонда из хромосомы 2 по мере компактизации хромосомы 3, сокращение зоны гибридизации ДНК-зонда из хромосомы 3 в начале компактизации хроматид. А так же полное отсутствие сигналов всех ДНК-зондов в ядрах с эндометафазными хромосомами, хроматин которых достигает такого уровня компактности, что становится недоступным для меченых фрагментов гомологичной ДНК при проведении FISH.

Упорядоченность хроматина в высокополиплоидном ретикулярном ядре: хромосомные территории.

Хроматин вторичных ретикулярных ядер, окрашенных лактоацето-орсеином, имеет однородную диффузную структуру с редкими, более ярко окрашенными гетерохроматиновыми участками. Это крупные ядра, степень ploидности которых, по данным Бира (Bier 1958), может достигать 4096С. Лактоацето-орсеиновое окрашивание таких ретикулярных ядер не позволяет вычлнить материал отдельных хромосом из общей массы хроматина. Наличие маркеров на отдельные хромосомы значительно облегчило бы изучение упорядоченность хроматина в высокополиплоидном ретикулярном ядре и ответило бы на вопрос о сохранении хромосомных территорий при полиплоидизации и процессе конденсации / деконденсации хроматина, происходящем в эндомитотическом цикле.

Поскольку при гибридизации ДНК-библиотек из хромосом 3 и 6 на первичные политенные хромосомы было получено по одному сайту гибридизации, можно сделать вывод о хромосомо-специфичности этих зондов и о возможности использовать эти ДНК-зонды в качестве маркеров соответствующих хромосом в ядрах с ретикулярной структурой. Однако, есть вероятность, что при переходе хроматина из политенного в декомпактизованное ретикулярное состояние появятся дополнительные сайты гибридизации этих ДНК-библиотек на других хромосомах.

При проведении двухцветной FISH хромосомо-специфичных ДНК-библиотек хромосомы 3 и 6 оказалось, что не смотря на то, что FISH проводили на давленных, а не на объемных препаратах, области интенсивной гибридизации этих ДНК-зондов имели определенную локализацию в пространстве ядра (Рис. 8. а, б). Очевидно, что территории, занимаемые этими хромосомами в ядре, сохраняются при многократном возрастании уровня ploидности и преобразовании хроматина в ретикулярную структуру.

ДНК-библиотека хромосомы 2 гибридизовалась небольшими глыбками по периферии ядра (Рис. 8, б). Для анализа состава ДНК при теломерного

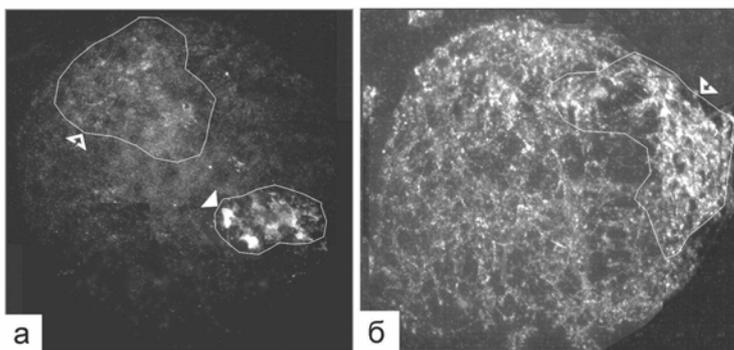


Рис. 8. Территории хромосом 3 и 6 в высокополиплоидных ретикулярных ядрах трофоцитов яичников *C. erythrocephala*. а - результат двухцветной FISH хромосомо-специфичной ДНК-библиотеки хромосомы 6 (▷, зеленый сигнал) и хромосомо-специфичной ДНК-библиотеки хромосомы 3 (▷, красный сигнал); б - результат двухцветной FISH хромосомо-специфичной ДНК-библиотеки хромосомы 3 (▷, красный сигнал) и районо-специфичной ДНК-библиотеки хромосомы 2 (зеленый сигнал). Хроматин окрашен DAPI. Шкала – 10 мкм. x 100.

района хромосомы 2, из которого была получена ДНК-библиотека, первичные политенные хромосомы были окрашены методом дифференциального G-окрашивания. Были выявлены G-положительные блоки, преимущественно прицентромержной локализации. Интересующий нас прителомерный блок хромосомы 2 также имел G-положительное окрашивание. По литературным данным, периферийная локализация и G-положительное окрашивание характерно для факультативного гетерохроматина, состоящего из позднореплицирующихся, обедненных генами хроматиновых доменов (Cook, 1995; Carvalho et al., 2001; Cremer et al., 2001).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что у *Calliphora erythrocephala* система ооцит-трофоциты является уникальной моделью для изучения проблемы становления организации зрелого яйца. Возможность наблюдать все переходные типы хроматина трофоцитов от первичных ретикулярных ядер к первичным политенным хромосомам, все стадии эндомитоза и образование вторичных ретикулярных ядер позволяет проследить изменение морфологии хроматина, а значит и его функционального состояния. Наличие стадии первичных политенных хромосом, имеющих характерную морфологию и индивидуальный рисунок ярко окрашиваемых блоков хроматина, позволяет идентифицировать хромосомы, находящиеся на этой стадии и оценить их пространственное взаиморасположение в ядре. Переход хроматина из состояния первичных политенных хромосом к ретикулярной структуре ядра (через стадии эндомитоза) не позволяет проследить дальнейшую судьбу материала отдельных хромосом. Это становится возможным при использовании хромосомо-специфичных ДНК-библиотек. По результатам дифференциального G-окрашивания и FISH районо-специфичной ДНК-библиотеки хромосомы 2 с вторичными ретикулярными ядрами следует, что теломерный район хромосомы 2 представлен факультативным гетерохроматином. FISH ДНК-библиотек хромосом 3 и 6 с ядрами трофоцитов, имеющих различную морфологию хроматина, позволила визуализировать материал этих хромосом на стадиях, когда идентифицировать хромосомы невозможно. Анализ локализации ДНК-зондов хромосом 3 и 6 позволил сделать вывод о сохранении хромосомных территорий в высокополиплоидных ядрах при переходе хроматина в ретикулярное состояние.

ВЫВОДЫ

1. В результате анализа фолликулов яичников *Calliphora erythrocephala* обнаружено, что на определенной стадии развития яичников в фолликуле трофоциты имеют различную морфологию хроматина - от первичных ретикулярных ядер до вторичных ретикулярных ядер. При понижении температуры происходит замедление морфогенеза ядер трофоцитов.
2. Показана возможность идентифицировать первичные политенные хромосомы методом сравнения с картой вторичных политенных хромосом. Установлено, что хромосомы трофоцитов не имеют общего хромоцентра и рассредоточены в пространстве ядра.
3. Анализ распределения ДНК-библиотеки хромосом 3 и 6 при проведении FISH на первичные политенные хромосомы показал, что эти ДНК-библиотеки являются хромосомо-специфичными, т.е. обнаружено по одному сайту гибридизации этих ДНК-библиотек на соответствующие хромосомы. При гибридизации ДНК-библиотеки из теломерного района хромосомы 2 обнаружено множество сайтов гибридизации на всех хромосомах (кроме 6-ой).
4. Анализ локализации ДНК-библиотек в ядрах трофоцитов с различной морфологией хроматина выявил связь между размерами области гибридизации ДНК-библиотек и степенью компактности хроматина - с повышением компактизации хроматина происходит уменьшение зон гибридизации ДНК-библиотек. В ядрах с эндометафазными хромосомами отсутствуют сигналы всех трех ДНК-библиотек.
5. В результате гибридизации ДНК-библиотек хромосом 3 и 6 с вторичными ретикулярными ядрами обнаружено, что при переходе хроматина в ретикулярную структуру имеет место сохранение территорий этих хромосом в ядре. ДНК-библиотека теломерного района хромосомы 2 гибридизуется по периферии ядра, что характерно для гетерохроматиновых доменов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. **Ананьина Т.В.**, Вассерлауф И.Э., Стегний В.Н Политенные хромосомы трофоцитов яичников у *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae) // Материалы конференции, посвященной памяти В.П.Чехова. Томск. ТГУ, 1997.

2. **Ананьина Т.В.**, Вассерлауф И.Э. Политенизация хромосом трофоцитов у *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae) // Тез. докл. на конф. «Сибирская школа молодого ученого». Томск. ТПУ. 1998.
3. Стегний В.Н., Вассерлауф И.Э., **Ананьина Т.В.** Идентификация, взаиморасположение и развитие первичных политенных хромосом в ядрах трофоцитов у *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae) // Генетика. 1999. Т. 35. № 7. С. 912-918.
4. Вассерлауф И.Э., **Ананьина Т.В.**, Стегний В.Н. Политенизация хромосом и их взаиморасположение в ядрах трофоцитов *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae) // 2000. ВОГИС (1-5 февраля). С-Петербург.
5. Вассерлауф И.Э., **Ананьина Т.В.**, Стегний В.Н. Исследование интерфазного ядра трофоцитов *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae) // Цитология. 2002. № 9. XIV Всероссийское совещание «Структура и функции клеточного ядра».
6. Вассерлауф И.Э., **Ананьина Т.В.**, Унгер М.Ф., Карамышева Т. В., Мельникова Н. Н., Рубцов Н.Б., Стегний В.Н. Организация и дифференциальная окраска хромосом эндомитотических ядер трофоцитов *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae) // Генетика. 2003. № 9.
7. **Ананьина Т.В.**, Ведерников А.Е., Вассерлауф И.Э., Карамышева Т. В., Рубцов Н.Б., Стегний В.Н. Изучение упорядоченности хроматина в ядрах трофоцитов в ходе эндомитотического цикла у *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae) // Цитология. 2003. № 9. I Съезд Общества клеточной биологии и Международный симпозиум по проблемам мейоза. 14-17 октября 2003. С-Петербург.