

На правах рукописи



Ведерников Андрей Евгеньевич

**ДИНАМИКА СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМОСОМ
ТРОФОЦИТОВ ЯИЧНИКОВ ДВУКРЫЛЫХ НАСЕКОМЫХ
НАДСЕМЕЙСТВА OESTROIDEA**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

Томск – 2010

Работа выполнена в Обособленном структурном подразделении «Научно-исследовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета»

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Стегний Владимир Николаевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор

Ильинских Николай Николаевич

доктор биологических наук

Лебедев Игорь Николаевич

Ведущая организация: Учреждение Российской Академии наук Институт цитологии РАН, адрес: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4.

Защита состоится «___» декабря 2010 года в _____ ч на заседании диссертационного совета Д 208.096.03 при ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава по адресу: 634050, г.Томск, ул. Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава.

Автореферат разослан «___» ноября 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук


Герасимов А.В.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Современные исследования в области клеточной биологии всё чаще ориентируются на изучение структуры и пространственной организации интерфазного ядра, как основы функционального состояния клетки (Singer H., Green M., 1997; Dernburg A., Sedat J., 1998; Thomas C. et al., 2002). Благодаря развитию новейших и высокоэффективных методов клеточной и молекулярной биологии, а также приёмов 3D, 4D микрофотографирования появилась реальная возможность выяснить более тонкие закономерности структурной упорядоченности интерфазного ядра (Стегний В.Н., 1979; Lowenstein M., Goddard T., and Sedat J., 2004; Ferrai C., Pombo A., 2009). Первым шагом на этом пути должно стать изучение архитектуры ядра при функционально различных его состояниях и выяснение принципов реорганизации хроматина при переходе ядра из одного функционального состояния в другое. Последние исследования показывают, что именно изменения в пространственной укладке хроматина определяют клеточную дифференцировку (Yoshioka H. et al., 2009).

В ряде работ на цитологическом уровне был описан процесс политенизации в ядрах трофоцитов ячничков *Calliphora erythrocephala* Mg (Bier K., 1958; Ribbert D., 1979; Стегний В.Н. и др., 1999). Интерес к данному объекту обусловлен тем, что в процессе развития в ядрах трофоцитов ячничков происходят преобразования хроматина, связанные с эндомитозом. При этом выявляются политенные хромосомы, а также ряд промежуточных стадий политенизации. На конечном этапе развития трофоцитов по прошествии нескольких эндоциклов в их ядрах формируется ретикулярная структура хроматина. Таким образом, данная клеточная система предоставляет уникальную возможность для изучения морфофункциональных особенностей укладки хромосом и использования её в качестве модели преобразования структуры интерфазного ядра.

Цель исследования: Изучить структурную реорганизацию хромосом в ядрах трофоцитов ячничков в процессе политенизации трофоцитов у ряда представителей надсемейства *Oestroidea* (отряд *Diptera*): *Calliphora erythrocephala* (Mg.), *Protophormia terranova* (R.-D.), *Sarcophaga* sp., *Parasarcophaga* sp. и *Lucilia* sp.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ изменения структуры хромосом в процессе политенизации у представителей надсемейства *Oestroidea* (*Diptera*): *Calliphora erythrocephala*, *Protophormia terranova*, *Sarcophaga* sp., *Parasarcophaga* sp. и *Lucilia* sp.;

2. Выявить отличительные особенности структуры хромосом трофоцитов у линий *Calliphora erythrocephala*, полученных в результате межпопуляционных скрещиваний;

3. Проанализировать, с использованием ДНК-проб, динамику хромосомных территорий в связи со сменой стадий политенизации;

4. Выявить наличие общих ДНК последовательностей в районах хромосом, характеризующихся более плотной упаковкой хроматина у представителей семейства *Calliphoridae*: *Calliphora erythrocephala*, *Protophormia terranova* и *Lucilia* sp.

Положения, выносимые на защиту:

1. В трофоцитах яичников представителей надсемейства *Oestroidae* в процессе политенизации происходят последовательные изменения структуры хромосом: на промежуточных стадиях формируются политенные хромосомы, затем они разобщаются на эндохромосомы, декомпактизуются и, на конечном этапе, формируется полиплоидное ядро с ретикулярной структурой хроматина.

2. Структура хромосом в трофоцитах яичников особей *Calliphora erythrocephala*, полученных в результате межпопуляционных скрещиваний, отличается от структуры хромосом исходных линий.

3. В трофоцитах *Calliphora erythrocephala* в процессе политенизации происходит направленная динамика морфологии хромосомных территорий: в первичных ретикулярных ядрах хромосомы занимают отдельные протяжённые области ядра; на стадии политенных хромосом - компактизуются; во вторичных ретикулярных ядрах - занимают не перекрывающиеся обширные области ядра.

4. Районы хромосом *Calliphora erythrocephala*, *Protophormia terranovaе* и *Lucilia sp.*, отличающиеся от остальной части генома более плотной упаковкой хроматина, содержат гомологичные последовательности ДНК.

Научная новизна. Впервые выявлены общие для пяти видов надсемейства *Oestroidae* (*Calliphora erythrocephala*, *Protophormia terranovaе*, *Sarcophaga sp.*, *Parasarcophaga sp.* и *Lucilia sp.*) стадии политенизации трофоцитов, протекающие при начальных этапах оогенеза в течение первых суток жизни имаго. Смена стадий политенизации происходит в следующем порядке: первичные ретикулярные ядра, политенные хромосомы, помпоновидные хромосомы, эндохромосомы, вторичные ретикулярные ядра. Таким образом, в результате проведенных исследований установлены основные морфотипы ядер трофоцитов яичников. Впервые показаны индивидуальные видовые отличия в характере реорганизации ядерной архитектуры. Сюда относятся отличия в скорости политенизации; отличия в структуре хромосом. У *C. erythrocephala* показана структура хромосомных территорий трофоцитов и выяснен характер её изменения в процессе политенизации и в том числе на стадии ретикулярных ядер. Новыми являются данные о наличии общих последовательностей ДНК в составе половой хромосомы *C. erythrocephala*, половой хромосомы *P. terranovaе* и плотного блока хроматина в ядрах *Lucilia sp.*; эти районы характеризуются аналогичной структурой хроматина.

Теоретическая и практическая значимость.

Полученные данные об особенностях структуры и реорганизации ядерного аппарата клетки на примере генеративной системы двукрылых насекомых вносят вклад в развитие представлений о функционировании интерфазного ядра. Основные положения диссертации используются при проведении занятий со студентами и магистрантами в рамках курсов «Цитогенетика» и «Практикум по молекулярной генетике» на кафедре цитологии и генетики Биологического института Томского государственного университета.

Апробация работы. Основные результаты диссертации обсуждены на всероссийских и международных конференциях: I Съезд Общества клеточной

биологии (Санкт-Петербург, 2003), III Съезд ВОГиС (Москва, 2004), XV Всероссийское совещание «Структура и функции клеточного ядра» (Санкт-Петербург, 2005), IV Международная конференция по кариосистематике беспозвоночных животных (Санкт-Петербург, 2006), Международная молодёжная научно-методическая конференция «Проблемы молекулярной и клеточной биологии» (Томск, 2007), Международная конференция «Хромосома 2009» (Новосибирск, 2009).

Исследования поддержаны грантами РФФИ – «Механизмы реорганизации хромосомного аппарата в ядрах генеративной ткани при экстремальных температурных воздействиях и инбридинге» (№ 04-04-48175.); «Механизмы структурных модификаций хромосом и гетерохроматина в онто- и филогенезе эукариот» (№ 07-04-01484.); грантами Президента РФ для ведущих научных школ – «Молекулярно-цитогенетическое исследование реорганизации архитектуры хромосом в онто- и филогенезе. Генодиагностика видов и эколого-генетический мониторинг популяций эпидемически опасных групп двукрылых насекомых» (НШ-4283.2006.4); «Молекулярно-цитогенетическое исследование реорганизации архитектуры хромосом в онто- и филогенезе. Генодиагностика видов и эколого-генетический мониторинг популяций растений и эпидемически опасных групп двукрылых насекомых» (№НШ-2027.2008.4).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 3 статьи в центральных рецензируемых журналах из перечня ВАК Министерства образования и науки РФ.

Личное участие автора. Основные результаты исследований, вошедшие в диссертацию, получены лично автором. Автор принимал непосредственное участие на всех этапах научно-исследовательской работы, в обработке полученных результатов, иллюстративного материала и последующей подготовки результатов для печати. Микродиссекция и FISH районов хромосом 2, 3 и 6 *Calliphora erythrocephala* проводились совместно с д.б.н. Н. Б. Рубцовым и к.б.н. Т. В. Карамышевой (ИЦиГ СО РАН).

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, полученных результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 135 ссылок на литературные источники. Диссертация изложена на 104 страницах машинописного текста, иллюстрирована 16 рисунками и содержит 3 таблицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования

Объектом исследований являлись следующие представители надсемейства *Oestroidae* (отряд *Diptera*): *Calliphora erythrocephala*, *Protophormia terranova*, *Sarcophaga sp.*, *Parasarcophaga sp.* и *Lucilia sp.* взятых из природных популяций г.Томска. Была сделана выборка *C. erythrocephala* из популяции г.Алма-Ата.

Данные представители отряда *Diptera* относятся к двум семействам: *Calliphoridae* (*C. erythrocephala*, *P. terranova*, и *Lucilia sp.*) и *Sarcophagidae* (*Sarcophaga sp.*, *Parasarcophaga sp.*)

Лабораторное культивирование проводили при стандартных условиях: при температуре 20-22°C с 14 часовым суточным периодом освещения (Виноградова Е.Б., 1984). Яичники самок разного возраста (с 1 по 6 день после выхода имаго из пупария) выделяли в изотоническом растворе (0,7% NaCl) и фиксировали в метанол-уксусной смеси (3:1).

Количество проанализированных особей различных видов представлено в таблице 1. Поскольку в работе был осуществлён только качественный, а не количественный анализ статистическая обработка не применялась.

Таблица 1

Количество проанализированных препаратов для различных видов надсемейства *Oestroidae*

Вид	Возраст имаго (дней)					
	1	2	3	4	5	6
<i>C. erythrocephala</i>	120	190	250	240	280	110
<i>P. terranovaе</i>	130	140	250	260	220	120
<i>Sarcophaga sp.</i>	230	70	60	40	32	24
<i>Parasarcophaga sp.</i>	80	70	80	27	34	25
<i>Lucilia sp.</i>	130	110	290	280	140	160

Микродиссекция

Микродиссекцию проводили на микроскопе AXIOVERT 10, оснащённом микроманипулятором IR (Zeiss, ФРГ) и механическим позиционером по специальной методике (Rubtsov N. et al., 2000).

Диссектированный материал переносили в коллекционную каплю (20-40 нл): 10мМ Трис HCl (pH 7,5), 10мМ NaCl, 0,1% SDS, 30% глицерин, 500 мкг/мл протеиназы К. Затем инкубировали 2 часа на водяной бане (60°C).

Аmplификацию собранного материала проводили в два этапа. Вначале осуществляли 8 низкотемпературных циклов с Sequenase Version 2.0 T7 ДНК полимеразой (United States Biochemical) в ПЦР-смеси следующего состава: 0,6 кратный Секвеназный буфер (24мМ Трис HCl, pH 7,5; 12мМ MgCl₂; 30мМ NaCl), 5мкМ DOP-праймера (6-MW) (5'-CCGACTCGAGNNNNNATGTGG-3') (СибЭнзим), 200мкМ каждого из дНТФ. 0,5ед. фермента добавляли перед каждым циклом (при 25°C). Перед добавлением фермент Sequenase Version 2.0 (исходная концентрация 13 ед/мкл) разводили в буфере, содержащем 10мМ Трис HCl, pH 7,5; 5мМ DTT; 0,5 мг/мл БСА в соотношении 1:8. ПЦР проводили по следующей схеме: 25°C – 2 мин., 36°C – 2 мин., 94°C – 1 мин. 0,5ед.

Затем осуществляли 33 высокотемпературных цикла. При этом к ПЦР-продукту добавляли 50 мкл реакционной смеси, содержащей 1xStoffel буфер, 200 мкМ дНТФ, 1мкМ DOP-праймера, 2,5мМ MgCl₂ и 5 ед. AmpliTaq, Stoffel Fragment ДНК полимеразы (Applied Biosystems). ПЦР проводили по следующей схеме: 94°C – 1 мин.; 56°C – 1,5 мин.; 72°C – 2 мин.

Получение хромосом-специфичных ДНК-зондов

ДНК-библиотеки хромосом 2, 3 и 6 были получены путём микроманипуляционного сбора восьми копий соответствующих хромосом 3, 6 и прителомерного района хромосомы 2 с последующей амплификацией ДНК в

ПЦР с DOP-праймером (Rubtsov N. et al, 2000; Карамышева Т.В., 2001). ДНК метили в 24 циклах ПЦР. 1 мкл DOP-библиотеки использовали для приготовления 20 мкл ПЦР-смеси, содержащей – 10mM Трис HCl, 50mM KCl, pH 8,3, 200 мкМ дАТФ, дЦТФ, дГТФ и 100 мкМ дТТФ и 100мкМ родамин-дУТФ или дигоксигенин-11-дУТФ, 2 мкМ DOP-праймера, 2,5mM MgCl₂ и 1,5 ед. Ampli Taq ДНК полимеразы (Fermentas). ПЦР проводили по следующей схеме: 94°C – 1 мин.; 56°C – 1,5 мин.; 72°C – 2 мин.; с завершающей элонгацией цепей при 72°C – 8 мин.

Флуоресцентная *in situ* гибридизация

Флуоресцентную *in situ* гибридизацию (Fluorescence *In Situ* Hybridization; FISH) и детекцию меченой ДНК проводили согласно протоколам (Lichter P. et al, 1990; Rubtsov et al., 2000). Для этого препараты первоначально отмывали в трёх сменах 2xSSC при 37°C по 5 минут. Затем проводили дегидратацию в серии спиртов. После этого под покровное стекло наносили раствор зонда в гибридизационной смеси: 50% формамид, 10% сульфат декстрана, 1% Твин-20, 2xSSC, pH7,0. Денатурацию проводили при 75°C в течение 5 мин.; гибридизацию – при 37°C в течение 18 часов.

По окончании гибридизации покровные стекла смывали в 2xSSC, а препараты последовательно отмывали в трех растворах 50% формамида (ФА) в 2xSSC; один раз в 2xSSC при 42°C и три раза в 0.1xSSC при 60°C в течение 5 минут. Переносили в 4xSSC, 0,1% Твин-20 и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Затем препараты помещали в блокирующий буфер (3% обезжиренное молоко, 4xSSC; 0,1% Твин-20) на 30 минут при 42°C. Затем на препараты раскапывали по 30 мкл раствора конъюгата. В случае детекции биотинилированных зондов использовали авидин-DCS, меченый флуоресцеинизотиоционатом (авидин-FITC; 5 мкг/мл) (производства фирмы ИМТЕК), который предварительно был растворён в блокирующем буфере в соотношении 1:500. Выявление дигоксигенин меченых зондов проводили с помощью антидигоксигенина конъюгированного с родамином (конечная концентрация: 200 мкг/мл) (Roche). После нанесения соответствующего антитела препарат накрывали покровным стеклом, помещали во влажную камеру и инкубировали 30 минут при 42°C. Не связавшийся флуорохром отмывали в 4xSSC; 0,1% Твин-20 (3x5 минут, 42°C).

Общее окрашивание хромосом проводили при помощи 4,6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI) с конечной концентрацией 200 нг/мл.

Супрессионная *in situ* гибридизация

Супрессионную *in situ* гибридизацию проводили, как описано у Пинкеля (Pinkel, 1986). Для этого 0,4 мкг меченой ДНК пробы смешивали с 20 мкг соответствующей Cot-2 ДНК и осаждали тремя объёмами охлаждённого 96 % спирта при 13000 об/мин в течение 20 минут. Супернатант сливали, а осадок подсушивали и ресуспендировали в 20 мкл гибридизационной смеси (50 % формамид, 10 % сульфат декстрана, 1 % Твин-20, 2xSSC, pH 7,0). Денатурацию зонда и Cot-2 ДНК проводили при 96°C три минуты, а отжиг повторяющихся последовательностей в течение 1 часа при 42°C. После этого проводили FISH по описанной методике, за исключением того, что денатурацию ДНК на препарате в

данном случае осуществляли перед нанесением ДНК-зонда при помощи обработки в 70% формамиде в 2хSSC в течение 2 минут при 70°C.

Получение Cot-2 ДНК из личинок *Calliphora erythrocephala*

Личинок замораживали в жидком азоте и гомогенизировали. Фильтрат обрабатывали протеиназой К (0,2 мг/мл) и РНКазой А (0,1 мг/мл). ДНК фрагментировали ультразвуком на ультразвуковом дезинтеграторе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Преобразования структуры хромосом в трофоцитах яичников представителей надсемейства Oestroidea

В результате проведённых исследований было установлено, что у всех рассматриваемых представителей надсемейства *Oestroidea* (*Diptera*): *C. erythrocephala*, *P. terranovaе*, *Sarcophaga sp.*, *Parasarcophaga sp.* и *Lucilia sp.* в процессе развития трофоцитов яичников происходят аналогичные эндомитотические преобразования хроматина (рис. 1). Сходства были обнаружены в характере изменения пространственной организации ядер на различных стадиях политенизации и очерёдности этих стадий. Необходимо указать на большую эволюционную консервативность данных процессов.

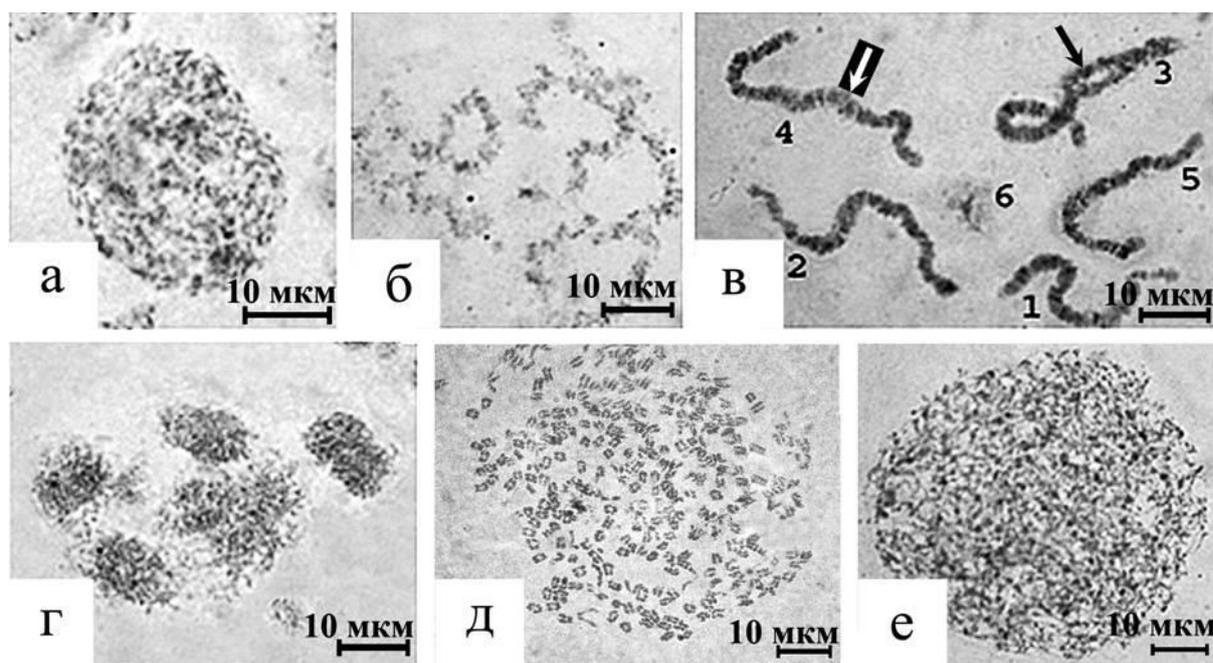


Рис. 1 - Ядра трофоцитов *C. erythrocephala* на различных стадиях политенизации
Примечание - а - первичное ретикулярное ядро; б - стадия сборки политенных хромосом; в - политенные хромосомы; г - стадия помпоновидных хромосом; д - эндометафазные хромосомы; е - вторичное ретикулярное ядро. Тёмной стрелкой обозначен район асинопсиса гомологов; светлой стрелкой обозначен пучок.

Для всех изученных видов характерно наличие пяти мета- и субметацентрических аутосом и одной точковой половой хромосомы. Одна из хромосом следующих изученных видов: *C. erythrocephala*, *P. terranovaе*, *Parasarcophaga sp.* и *Lucilia sp.*, характеризуется наличием асинопсиса

гомологов в прицентромерной области (рис. 2). По классификации принятой для *C. erythrocephala* это хромосома 3. Другая хромосома этих видов содержит обширный пуф. По классификации принятой для *C. erythrocephala* это хромосома 4. Наличие пуфа, как известно, указывает на высокую экспрессионную активность этого района.

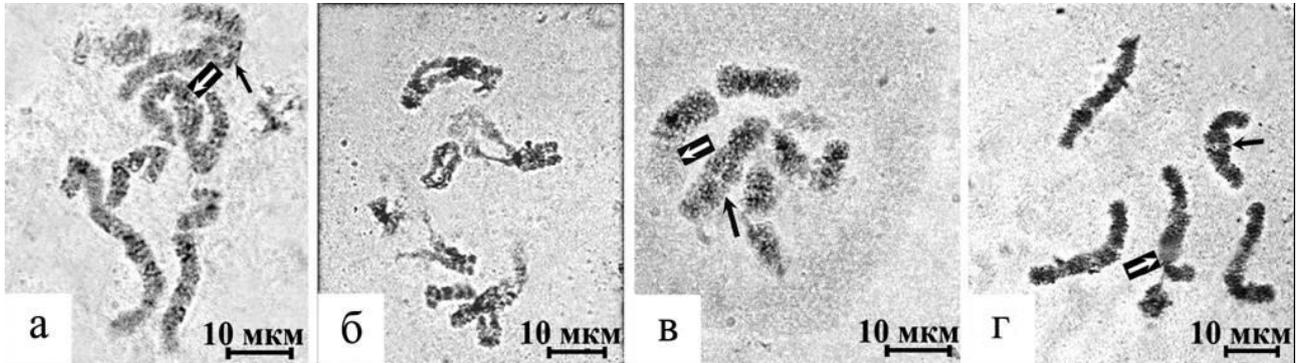


Рис. 2 - Политенные хромосомы трофоцитов представителей надсемейства *Oestroidea*

Примечание - а - *P. terranovaе*; б - *Sarcophaga sp.*; в - *Parasarcophaga sp.*; г - *Lucilia sp.* Тёмной стрелкой обозначен район асинапсиса гомологов; светлой стрелкой обозначен пуф.

Половая хромосома сохраняет свою целостную структуру на всём протяжении функциональной активности трофоцита. Остальные хромосомы подвергаются процессу эндометафазического разобшения – в конце 6 эндоцикла каждая удлинённая хромосома разобщается на 64 пары эндометафазных хромосом (рис. 1д). Эти данные были получены в результате их подсчёта. Соответственно плоидность ядра на этой стадии политенизации составляет 128С количества ДНК. Согласно исследованиям, проведённым на *Drosophila*, хроматиды в парах являются сестринскими по происхождению и удерживаются вместе за счёт наличия недореплицированных участков ДНК (Dej K., Spradling A., 1999). При этом было доказано, что недорепликация затрагивает лишь эндоцикл, предшествующий разобщению (у *Drosophila* - пятый). На более ранних стадиях хромосомы реплицируются полностью. В противном случае объединение хроматид происходило бы не в пары, а в большие по численности группы. На основе полученных результатов и литературных данных следует заключить, что первые пять эндоциклов трофоцитов *C. erythrocephala* обеспечивают полную репликацию хроматина. Последующий, шестой эндоцикл характеризуется укороченной синтетической фазой. В результате оказываются недопредставленными поздне-реплицируемые домены хромосом. Это и приводит к парному спариванию хроматид. Последующая эндоредупликация и декомпактизация эндохромосом приводит к формированию 64-плоидного политенного ядра с ретикулярной структурой хроматина (скрытая политения). Примечательно, что сходные эндомитотические преобразования ядер трофоцитов *Drosophila* приводят к формированию 32-плоидного политенного ядра. Следовательно, в данной

клеточной системе двукрылых насекомых крайне важное значение имеет этап расхождения синтезированных в процессе эндоциклов сестринских хроматид с дальнейшей их политенизацией. При этом число эндоциклов, предшествующих расхождению может отличаться у разных видов: у *Drosophila* – 5, у *C. erythrocephala* – строго 6. В более зрелых трофоцитах хроматин в ядрах приобретает ретикулярную структуру. В ходе всех описанных преобразований происходит многократное увеличение размеров ядра: от 10-20 мкм до 80-120 мкм в диаметре.

Нами были выявлены значительные отличия в скорости протекания отдельно взятых стадий и в целом формирования вторичного ретикулярного ядра. Полученные данные сравнительного анализа динамики политенизации представлены на рисунке 3.

Таким образом, у изученных представителей надсемейства *Oestroidea* смена фаз клеточного цикла, а также в целом развитие трофоцитов сопровождается сложными, но строго упорядоченными во времени процессами реорганизации ядерного аппарата. В ходе этого в диплоидных клетках происходит многократное умножение генома, приводящее к значительному увеличению размеров ядра и характеризующееся уникальной сменой стадий: изначально эндорепликация приводит к политении, а затем к формированию 64-плоидного политенного ядра.

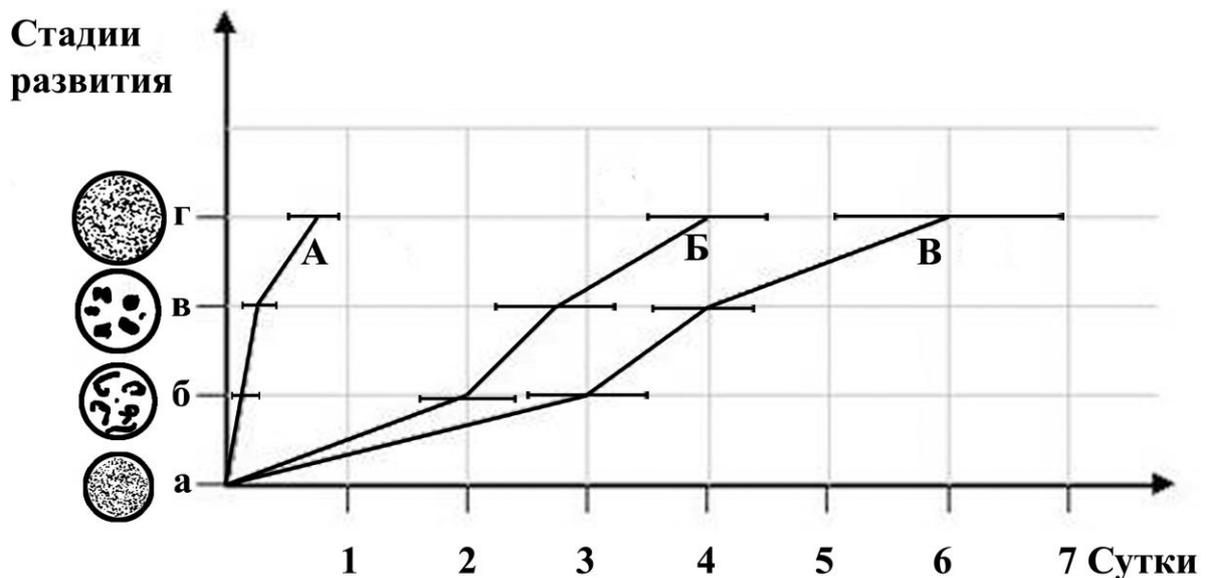


Рис. 3 - Динамика развития трофоцитов яичников представителей надсемейства *Oestroidea*

Примечание - А – *Sarcophaga* и *Parasarcophaga*; Б – *P. terranovaе* и *Lucilia*; В – *C. erythrocephala*. Стадии развития: а – ядро с первичной ретикулярной структурой; б – политенные хромосомы; в – помпоновидные хромосомы; г – ядро с вторичной ретикулярной структурой.

Особенности структуры политенных хромосом линий *C. erythrocephala*, полученных в результате межпопуляционных скрещиваний

Выявлены отличия в организации политенных хромосом в трофоцитах *C. erythrocephala* у особей в первом поколении, полученных в результате скрещивания особей алма-атинской и томской природных популяций.

Часть ядер содержит хромосомы с асинапсисами гомологов (рис. 4). Встречались ядра с полностью асинаптированными хромосомами. Особенности асинапсиса в ядрах была различна и отличалась у хромосом в пределах одного ядра. На стадии помпоновидных хромосом преобладали полностью асинаптированные хромосомы. Вероятно, причинами асинапсиса гомологов хромосом являются инверсионный полиморфизм и/или отличия в составе мобильных элементов у двух изученных популяций *C. erythrocephala*. Эти данные укладываются в теорию сальтоционного видообразования (Стегний В.Н., 1993), а также указывают на существование помимо видовой ещё и популяционной специфики организации ядерного аппарата.

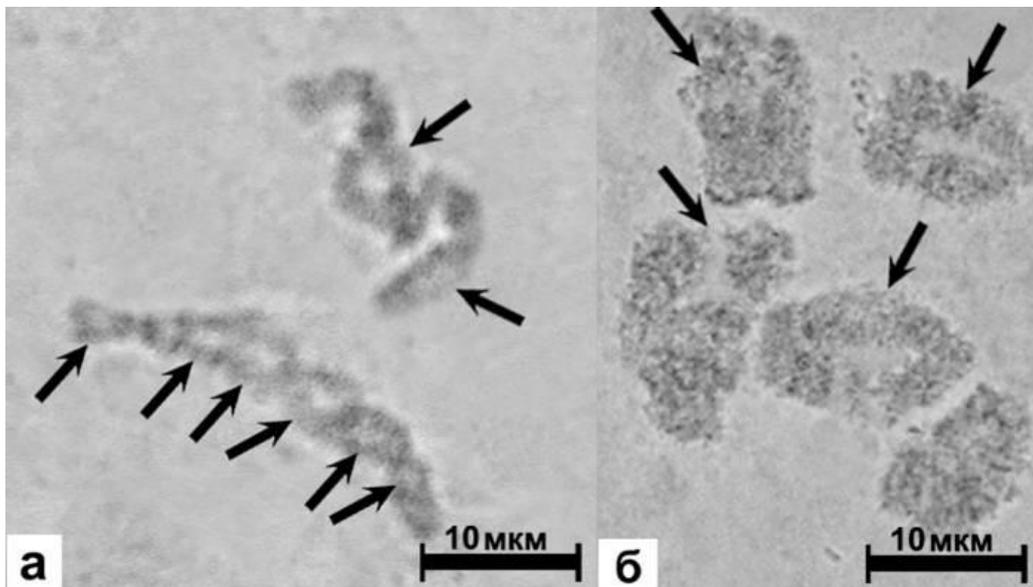


Рис. 4 - Политенные хромосомы трофоцитов *C. erythrocephala* линий, полученных в результате межпопуляционных скрещиваний представителей томской и алма-атинской природных популяций

Примечание - стрелками обозначены асинаптированные участки хромосом.

Анализ структуры хромосомных территорий в ядрах трофоцитов яичников *Calliphora erythrocephala* на различных стадиях политенизации

Ранее на недавленных лактоацето-орсеиновых препаратах яичников *C. erythrocephala* был выявлен ряд закономерностей в организации политенных хромосом (Стегний В.Н. и др., 1999). Вопрос об упорядоченности хроматина на стадии эндометафазных хромосом и в ядрах с ретикулярной структурой оставался открытым. С целью обнаружения или опровержения существования такой упорядоченности были получены хромосом-специфичные ДНК-библиотеки хромосом 3, 6 и ДНК-библиотека теломерного района хромосомы

2, отличающегося наличием плотнокомпактизованного гетерохроматического блока, который хорошо выявляется на неокрашенных препаратах.

При проведении FISH-анализа хромосом-специфичной ДНК-библиотеки хромосомы 6 был получен чёткий сигнал в ядрах с первичной ретикулярной структурой (рис. 5а). Мечение происходило в DAPI-позитивный домен, интенсивно окрашивающийся и на лактоацето-орсеиновых препаратах (рис. 1а). Мечение хромосомы происходило почти целиком, за исключением некоторых районов интенсивно окрашенных DAPI. Структура хромосомы 6 характеризуется разрыхленными участками интеркалярных районов и плотной прицентромерной областью.

Отмечена специфическая инвариабельность структуры хромосомной территории хромосомы 6 на последующих стадиях политенизации, вплоть до формирования вторичной ретикулярной структуры ядра (рис. 5в).

При использовании метода супрессионной *in situ* гибридизации и ДНК-библиотеки хромосомы 2 в качестве зонда были получены следующие результаты.

В ядрах с первичной ретикулярной структурой было обнаружено несколько сайтов гибридизации ДНК-зонда, рассредоточенных в пространстве ядра. Характер мечения характеризовался диффузным распределением сигнала, что объясняется декомпактизованным состоянием хроматина (рис. 5г).

На стадии политенных хромосом были установлены следующие особенности распределения сигнала. Хромосомы содержали по одному сайту гибридизации на одной из теломер (рис. 5д). Кроме того, метка была обнаружена в области центромеры на каждой из этих хромосом. Гибридизация зонда на хромосоме 3 происходила в теломерные районы; в интеркалярных районах сигнала не обнаружено. Это свидетельствует о наличии общих последовательностей ДНК в теломерных и прицентромерных районах. Центромеры хромосом ярко окрашиваются DAPI и характеризуются содержанием плотно структурированного хроматина.

На последующих стадиях компактизации политенных хромосом характер мечения сохраняется вплоть до начала разобщения на эндометафазные хромосомы. После этого наблюдается декомпактизация хроматина, при этом происходит перемещение меченых фрагментов к периферии ядра (рис. 5е).

Таким образом, следует сделать вывод о гомологии теломерных и прицентромерных районов хромосом, а также об их периферийном расположении в объёме интерфазного ядра.

Анализ проведенной супрессионной *in situ* гибридизации с использованием в качестве зонда ДНК-библиотеки хромосомы 3 позволил выявить ряд закономерностей в реорганизации структуры хромосомы 3 в процессе политенизации. В первичных ретикулярных ядрах был обнаружен один сайт интенсивной гибридизации и слабый сигнал на диффузном хроматине в той же области ядра (рис. 5а, г). На более поздних стадиях компактизации хроматина детекция зонда прослеживается по всей длине хромосомы (рис. 5б).

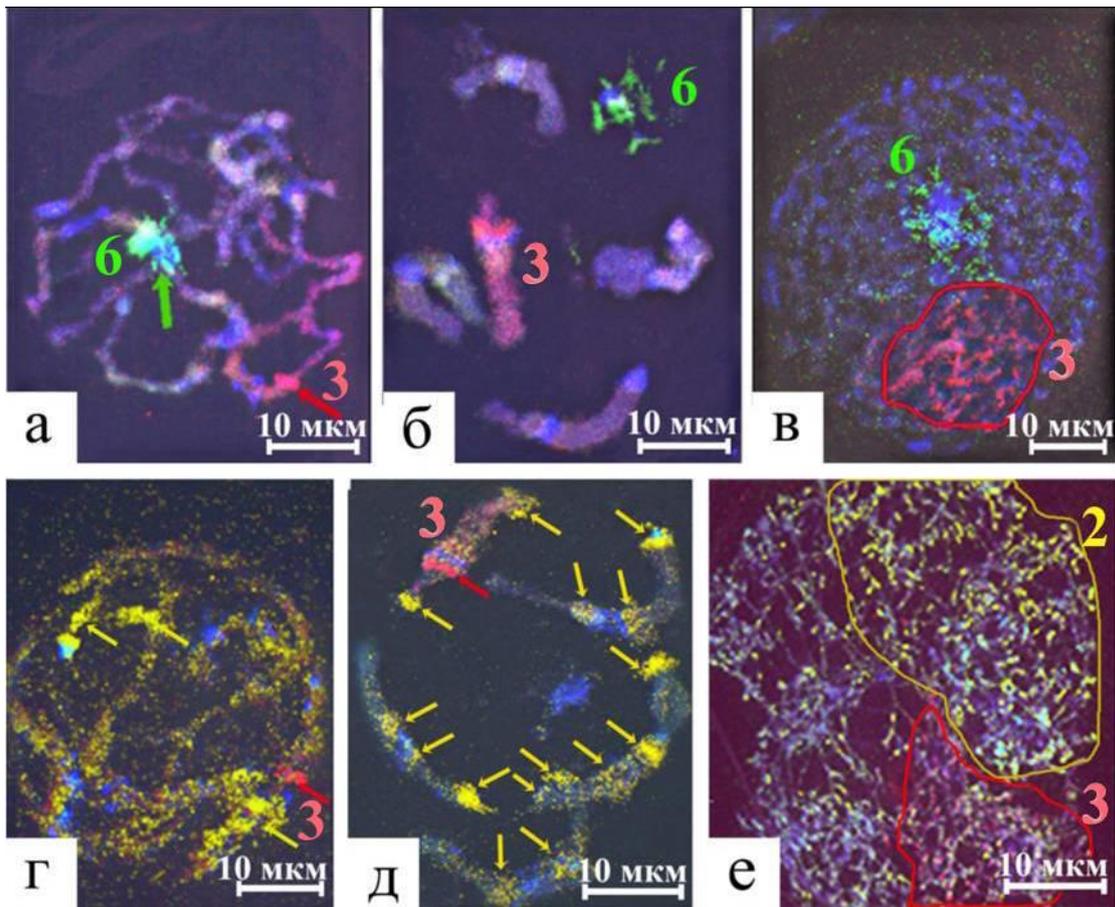


Рис. 5 - FISH на ядра трофоцитов *C. erythrocephala* на различных стадиях политенизации

Примечание - красным, зелёным и желтым цветами отмечены места гибридизации ДНК-библиотек хромосом 3, 6 и 2 соответственно. Стрелками отмечены места наиболее интенсивной гибридизации. Синим цветом отмечена тотальная окраска хромосом. Красной и желтой линиями обозначены области ядра, содержащие ДНК-зонд хромосом 3 и 2 соответственно.

Для ядер с эндометафазными хромосомами характерна дальнейшая компактизация хроматина до формирования хроматид. Метка на этой стадии не выявлена. Возможно, это обусловлено тканеспецифичной компактизацией хроматина.

На стадии начала декомпактизации хромосомного материала были обнаружены эндометафазные хромосомы, расположенные в отдельной области ядра, содержащие яркие сайты гибридизации (рис. 5e). Гибридизация ДНК-зонда хромосомы 3 происходила преимущественно в центральной части эндометафазных хромосом, на их концах была отмечена детекция зонда хромосомы 2, остальная часть хроматина окрашивалась DAPI (рис. 6). Характер мечения эндометафазных хромосом соответствует особенностям распределения метки на полителизованной хромосоме 3, у которой так же в прицентромерной области располагается интенсивный сайт гибридизации ДНК-зонда хромосомы 3, а теломерные участки гибридизуются с район-специфичным ДНК-зондом хромосомы 2. Это указывает на гомологию хромосомы 3 с данными

эндометафазными хромосомами и является дополнительным подтверждением того, что эндометафазные хромосомы являются результатом разобщения политенных хромосом на составляющие их гомологи, которые были синтезированы в процессе репликации эндомитотических циклов. Таким образом, было установлено, что каждая эндометафазная хромосома является одной из многочисленных копий данной хромосомы.

Более поздняя стадия декомпактизации эндометафазных хромосом характеризуется появлением области интенсивного мечения, в которой, предположительно, сосредоточена хромосома 3. В ходе дальнейшей декомпактизации эндометафазных хромосом формируется вторичная ретикулярная структура ядра. Распределение метки в таком ядре носит локальный характер, т.е. отдельная область ядра отмечена присутствием в ней ДНК-зонда хромосомы 3.

Таким образом, в процессе политенизации ядер трофоцитов хромосомная территория хромосомы 3 претерпевает запрограммированные во времени преобразования. В целом ядро представляет собой высокоупорядоченное образование, архитектура которого находится под строгим контролем стадии клеточного цикла и связана с выполняемой клеткой функцией.

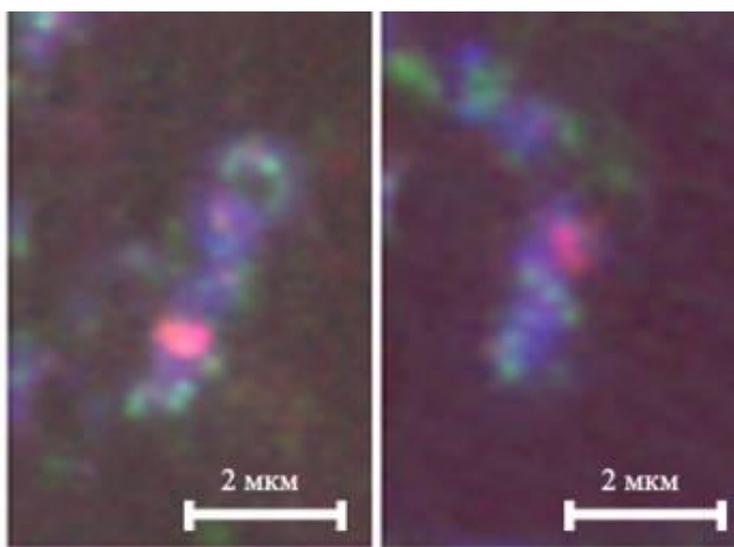


Рис. 6 - FISH на эндохромосомы трофоцитов *Calliphora erythrocephala*

Примечание - красным и зелёным цветами отмечены места гибридизации ДНК-библиотек хромосом 3 и 2 соответственно. Синим цветом отмечена тотальная окраска хромосом.

Межвидовая in situ гибридизация у представителей семейства Calliphoridae

Хромосомы трофоцитов изученных видов отряда *Diptera* характеризуются морфофункциональными преобразованиями в процессе политенизации. Исключение составляет половая хромосома. Она сохраняет свою целостную структуру на протяжении всего процесса политенизации, а также после формирования ретикулярной структуры ядра. Очевидно, это обусловлено уникальной структурой хроматина и в первую очередь содержанием особых нуклеотидных последовательностей ДНК. Подтверждением этого

предположения было бы обнаружение общих, гомологичных последовательностей ДНК в составе половых хромосом у разных видов. С этой целью была проведена межвидовая *in situ* гибридизация ДНК-библиотеки хромосомы 6 *C. erythrocephala* на хромосомы трофоцитов *P. terranova*.

В результате проведения *in situ* гибридизации и последующего анализа препаратов обнаружен сигнал ДНК-зонда хромосомы 6 *C. erythrocephala* на половой хромосоме *P. terranova* (рис. 7в). При этом у обоих видов были отмечены сходства в структуре хроматина, содержащего метку: для центральной части хромосомы характерно сужение и более плотная упаковка хроматина; на периферии хроматин веерообразно расплетён и имеет более рыхлую структуру. В остальных хромосомах сигнал отсутствовал.

Полученные данные свидетельствуют о наличии общих ДНК последовательностей в составе половой хромосомы *C. erythrocephala* и половой хромосомы *P. terranova*. Вероятно, наличие гомологичных участков ДНК в половых хромосомах этих видов является одним из ключевых моментов структурных особенностей этих хромосом на протяжении развития трофоцитов. Кроме того, это указывает на эволюционную консервативность этих участков генома.

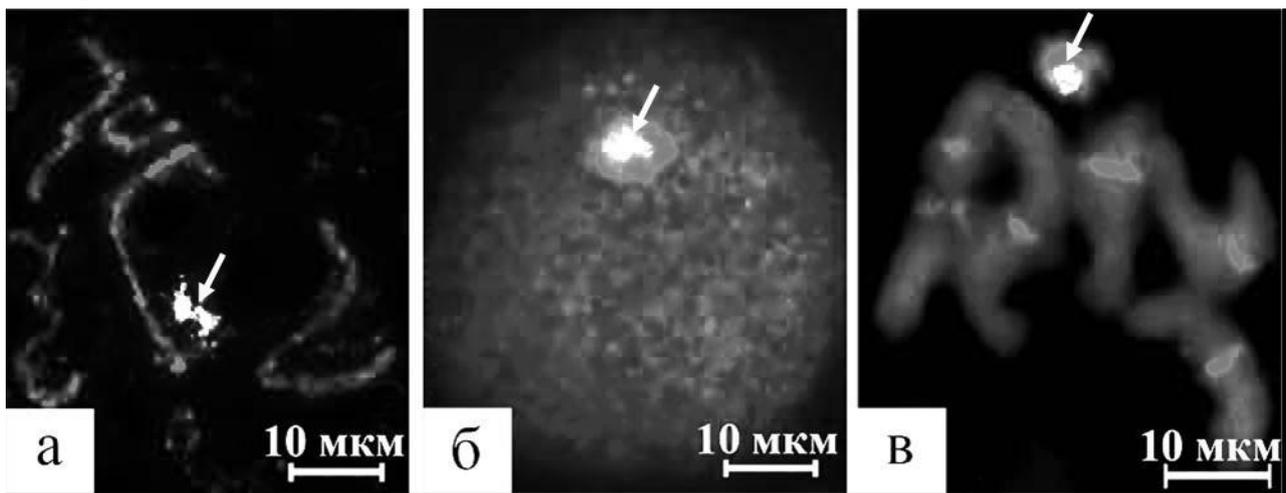


Рис. 7 - FISH ДНК-библиотеки хромосомы 6 *C. erythrocephala* на хромосомы трофоцитов *P. terranova* и *Lucilia sp.*

Примечание - а - хромосомы трофоцита *C. erythrocephala*; б - ядро трофоцита *Lucilia sp.*; в - хромосомы трофоцита *P. terranova*. Стрелочками отмечены места гибридизации хромосом-специфичной ДНК-библиотеки половой хромосомы *C. erythrocephala*.

С целью выявления гомологичных последовательностей у близкородственных видов была проведена *in situ* гибридизация ДНК-библиотеки хромосомы 6 *C. erythrocephala* на хромосомы трофоцитов *Lucilia sp.* В результате анализа полученных препаратов с использованием тотальной окраски хромосом в первичных ретикулярных ядрах был выявлен яркий блок хроматина, содержащий чёткий сигнал ДНК-зонда (рис. 7б). В остальной области ядра метка отсутствовала. Это указывает на наличие общих ДНК-последовательностей у половой хромосомы *C. erythrocephala* и

плотного блока хроматина в ядрах *Lucilia sp.* Следует отметить, что у обоих видов гибридизация происходит с той частью хроматина, который имеет более плотную упаковку.

Как было показано, наряду с общей декомпактизованностью хроматина половая хромосома в ретикулярных ядрах выявляется в виде плотного ярко окрашиваемого DAPI сгустка хроматина. Исходя из этого, можно сделать предположение, что единственный плотный блок хроматина, обнаруженный в ретикулярных ядрах трофоцитов *Lucilia sp.*, содержащий ДНК-метку библиотеки половой хромосомы *C. erythrocephala*, является половой хромосомой анализируемого вида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённых исследований получены данные об изменении структуры интерфазных ядер трофоцитов яичников у 5 видов надсемейства *Oestroidae*: *Calliphora erythrocephala*, *Protophormia terranova*, *Sarcophaga sp.* *Parasarcophaga sp.* и *Lucilia sp.* в процессе политенизации. Полученные данные расширяют общие представления о формировании интерфазных хромосом. Сравнение стадий структурных преобразований хроматина между близкими видами отряда *Diptera* позволило выявить ряд общих, эволюционно консервативных особенностей этого процесса: 1) отсутствие общего хромоцентра и разобщённость политенных хромосом в пространстве ядра, 2) их ориентированность друг относительно друга, 3) сохранение структуры половой хромосомы на всём протяжении политенизации у изученных видов. Также выявлена короткая S-фаза шестого эндоцикла политенизации, приводящая к появлению недореплицированных районов сестринских хроматид и их парному связыванию на стадии эндомитоза. В тоже время репликация в ходе предыдущих пяти эндоциклов является полной. Известно, что у *Drosophila* лишь 4 первых эндоцикла обеспечивают полную репликацию хромосом, тогда как S-фаза пятого эндоцикла укорочена (Dej K., Spradling A., 1999). В целом процесс политенизации протекает аналогично у всех изученных нами представителей надсемейства *Oestroidae*. На первых этапах в первичных ретикулярных ядрах формируются хромосомы, затем они компактизуются, а в дальнейшем разобщаются на эндохромосомы. Последние постепенно декомпактизуются, что в итоге приводит к формированию ретикулярной структуры ядра.

Хромосомные территории в ходе описываемых процессов политенизации претерпевают значительные структурные изменения, однако их структура вполне закономерна и предопределена. Таким образом, хромосомные территории данной клеточной системы можно классифицировать как строго определённым образом ориентированные друг относительно друга, не перекрывающиеся функциональные области ядра, содержащие индивидуальные хромосомы. При этом некодирующие участки ДНК располагаются по периферии ядра, а кодирующие преимущественно ближе к центру.

Выявлены уникальные, видоспецифичные особенности политенизации в трофоцитах изучаемых видов. Прежде всего, сюда относится скорость данного процесса. Наиболее быстрые изменения в реорганизации хроматина происходят в трофоцитах *Sarcophaga* и *Parasarcophaga*. При этом с повышением скорости эндоциклов у видов усиливается вариабельность морфотипов ядер трофоцитов в пределах одного фолликула.

Межвидовая *in situ* гибридизация позволила выявить наличие гомологичных ДНК-последовательностей в районах половых хромосом *Calliphora* и *Protophormia*, а так же в плотноструктурированном блоке хроматина в ретикулярных ядрах трофоцитов *Lucilia*, что указывает на эволюционную консервативность и, возможно, высокую значимость этих участков генома. У различных видов районы хромосом, содержащие гомологичные последовательности ДНК, имеют общий характер упаковки хроматина, так же отличающий эти районы от остальных участков генома.

ВЫВОДЫ

1. Структура хромосом трофоцитов видов надсемейства *Oestroidae* – *Calliphora erythrocephala*, *Protophormia terranova*, *Sarcophaga sp.*, *Parasarcophaga sp.* и *Lucilia sp.* имеет общую организацию: соматическая конъюгация гомологов, отсутствие локального хромоцентра, рассредоточенность хромосом в пространстве ядра. Одна из хромосом видов: *C. erythrocephala*, *P. terranova*, *Parasarcophaga sp.* и *Lucilia sp.*, характеризуется наличием асинопсиса гомологов в прицентромерной области. Другая хромосома этих видов содержит обширный пуф. Структура политенных хромосом трофоцитов особей *Calliphora erythrocephala*, полученных в результате межпопуляционных скрещиваний, характеризуется нарушением конъюгации гомологов.

2. Политенизация в ядрах трофоцитов у всех изученных видов происходит аналогичным образом и характеризуется сменой стадий в следующем порядке: образование первичных ретикулярных ядер, политенные хромосомы, помпоновидные хромосомы, разобщение на эндометафазные хромосомы, стадия вторичных ретикулярных ядер. Скорость протекания процесса политенизации различна у представителей надсемейства *Oestroidae*: у *Sarcophaga sp.* и *Parasarcophaga sp.* – за 0,5 суток; у *Protophormia terranova* и *Lucilia sp.* – за 4 суток; у *Calliphora erythrocephala* – за 6 суток. Половая хромосома сохраняет свою целостную структуру на всём протяжении дифференцировки трофоцита; остальные хромосомы подвергаются процессу эндометатического разобщения. У *Sarcophaga sp.* и *Lucilia sp.*, также как у *Calliphora erythrocephala*, разобщение политенных хромосом на хроматиды происходит асинхронно.

3. Политенизация в трофоцитах *Calliphora erythrocephala* сопровождается направленной динамикой структуры хромосомных территорий. Первые пять эндоциклов обеспечивают полную репликацию хроматина и формирование классических политенных хромосом. Последующий, шестой эндоцикл характеризуется укороченной синтетической

фазой, в конце которого каждая удлинённая хромосома разобьётся на 64 пары эндометафазных хромосом. Дальнейшие процессы дифференцировки трофоцитов приводят к формированию 64-плоидного политенного ядра с упорядоченной структурой и наличием хромосомных территорий.

4. Распределение сигналов ДНК-зондов хромосом 2 и 3 на эндохромосомах *Calliphora erythrocephala* соответствует распределению на политенных хромосомах, что подтверждает происхождение эндохромосом из политенных хромосом путем расхождения хроматид и дальнейшей их компактизации.

5. В составе половой хромосомы *C. erythrocephala*, половой хромосомы *P. terranovaе* и плотного блока хроматина в ядрах *Lucilia sp.* содержатся общие, отсутствующие в других участках генома, последовательности ДНК; хроматин этих районов имеет аналогичную структуру: для центральной части характерно сужение и более плотная упаковка хроматина; на периферии хроматин веерообразно расплетён и имеет более рыхлую структуру.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Изучение пространственной организации хроматина в ядрах трофоцитов в ходе эндомитотического цикла у мух *Calliphora erythrocephala* / Т. В. Ананьина, **А. Е. Ведерников** [и др.] // Цитология. – 2003. – Т.45, №9. – С.848.

2. Хромосомные территории в высокополиплоидных ядрах трофоцитов яичников *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae) / Т. В. Ананьина, **А. Е. Ведерников** [и др.] // III Съезд ВОГиС «Генетика в XXI веке : современное состояние и перспективы развития». Москва, 6-12 июня 2004г. – М., 2004. – Т.2. – С.277.

3. Эндоредупликация хроматина в ядрах питающих клеток яичников у представителей сем. Calliphoridae (Diptera) – *Calliphora*, *Protophormia*, *Lucilia* и *Sarcophagidae* (Diptera) / **А. Е. Ведерников** [и др.] // Вестн. Том. гос. ун-та. Бюллетень оперативной научной информации. – 2004. – №30. – С.50-57.

4. Визуализация хромосомных территорий в интерфазных ядрах трофоцитов яичников *Calliphora erythrocephala* Mg. (Diptera: Calliphoridae) / Т. В. Ананьина, **А. Е. Ведерников** [и др.] // Генетика. – 2005. – Т.41, №10. – С.1350-1357.

5. Особенности гибридизации ДНК-зондов с ДНК политенных хромосом трофоцитов яичников *Calliphora erythrocephala* (Calliphoridae: Diptera) (CISS-гибридизация) / Т. В. Ананьина, **А. Е. Ведерников** [и др.] // Цитология. – 2005. – Т.47, №9. – С.790-791.

6. **Ведерников А. Е.** Сравнительный анализ морфологии политенных хромосом трофоцитов яичников видов *Calliphora erythrocephala* (Mg) (*C. vicina* (R. – D.)), *Protophormia terranovaе* (R. – D.), *Lucilia sp.* и *Parasarcophaga sp.* (Diptera) / **А. Е. Ведерников**, Т. В. Ананьина, В. Н. Стегний // IV Междунар. конф. по кариосистематике беспозвоночных животных. Санкт – Петербург, 28-30 августа 2006г. – СПб., 2006. – С.12.

7. Сравнительный анализ локализации хромосомы 6 в ядрах трофоцитов яичников *Calliphora erythrocephala* и *Protophormia terranovaе* (Diptera:

Calliphoridae) / А. А. Коханенко, Т. В. Ананьина, **А. Е. Ведерников** [и др.] // Междунар. молодёжная науч. – метод. конф. «Проблемы молекулярной и клеточной биологии». Томск, 9-12 мая 2007г. – Томск, 2007. – С.102-103.

8. Развитие фолликулов яичников *Protophormia terranova* (*Diptera: Calliphoridae*) / Ходжанов А.Э., Т. В. Ананьина, **А. Е. Ведерников** [и др.] // Междунар. молодёжная науч. – метод. конф. «Проблемы молекулярной и клеточной биологии». Томск, 9-12 мая 2007г. – Томск, 2007. – С.180.

9. Коханенко А. А. Процесс репликации хроматина на различных стадиях клеточного цикла в полиплоидных ядрах на примере трофоцитов *Calliphora erythrocephala* / А. А. Коханенко, **А. Е. Ведерников**, Т. В. Ананьина // Материалы XLVII междунар. науч. студ. конф. «Студент и научно-технический прогресс». Новосибирск, 11-15 апреля 2009г. – Новосибирск, 2009. – С.170.

10. Коханенко А. А. Сопоставление морфологических преобразований хроматина с активностью синтеза ДНК на разных стадиях оогенеза в трофоцитах *Calliphora erythrocephala* / А. А. Коханенко, Т. В. Ананьина, **А. Е. Ведерников** // Материалы LVIII научной студенческой конференции Биол. ин-та. Томск, 27-30 апреля 2009г. – Томск, 2009. – С.46-47.

11. Анализ гомологии половых хромосом представителей семейства *Calliphoridae* / **А. Е. Ведерников** [и др.] // Материалы междунар. конф. «Хромосома 2009». Новосибирск, 31 августа-6 сентября 2009г. – Новосибирск, 2009. – С.124-125.

12. Развитие овариол и структур цитоскелета трофоцитов *Calliphora erythrocephala* Mg. (*Diptera: Calliphoridae*) / Т. В. Ананьина, **А. Е. Ведерников** [и др.] // Цитология. – 2010. – Т.52, №2. – С.110-116.