

ЦИТОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

УДК 575.1::576.3

Г.Н. Артемов^{1,2}, Г.М. Абылкасымова³, В.Н. Стегний^{1,2}

¹Особое структурное подразделение «Научно-исследовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета» (г. Томск)

²Биологический институт Томского государственного университета (г. Томск)

³Институт общей генетики и цитологии Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (г. Алма-Ата, Казахстан)

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАЙОНА ПРИКРЕПЛЕНИЯ ХРОМОСОМ К ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКЕ ТРОФОЦИТОВ МАЛЯРИЙНЫХ КОМАРОВ *Anopheles* КОМПЛЕКСА «*maculipennis*»

Работа выполнена в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», 2009–2013 гг. (ГК № П801; № П1702, № 02.740.11.0278), АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы (2009–2010 гг.)» (проект № 2.1.1/774) и при финансовой поддержке РФФИ «Научная работа молодых ученых из стран СНГ в российских научных организациях» моб_снг_ст 2011 г. (грант № 11-04-90911).

Проведен сравнительный молекулярно-цитогенетический анализ районов прикрепления хромосом к ядерной оболочке трофоцитов пяти видов малярийных комаров *Anopheles* комплекса «*maculipennis*». Методом флуоресцентной *in situ* гибридизации изучали локализацию ДНК, гомологичной району прикрепления XL хромосомы *Anopheles messeae* Fall., на хромосомах близкородственных видов. Показано, что район прикрепления XL хромосомы *An. messeae* является гетерохроматическим и соответствует топологии β-гетерохроматина. Выявлено, что ДНК района прикрепления XL хромосомы *An. messeae* локализуется в интеркалярных районах и прицентромерном гетерохроматине хромосом малярийных комаров комплекса «*maculipennis*», а также в прицентромерном α-гетерохроматине у *An. maculipennis* и *An. messeae*. Показаны различия изучаемых видов по распределению ДНК, гомологичной последовательностям района прикрепления XL хромосомы *An. messeae*, на хромосомах близкородственных видов. Обсуждается вопрос возникновения районов прикрепления хромосом к ядерной оболочке.

Ключевые слова: пространственная организация ядра; районы прикрепления хромосом к ядерной оболочке; гетерохроматин; малярийные комары; *Anopheles*.

Введение

Проблема пространственной организации интерфазного ядра изучается уже более 125 лет [1] и остается до сих пор актуальной [2–4]. Гены, хромосомные сегменты и геном как целое упорядочены в трехмерном простран-

стве ядра [5]. Этот порядок обеспечивается взаимодействием хромосом с ядерной оболочкой и друг с другом [6]. Малярийные комары являются исключительно удобным объектом для изучения хромосомо-мембранных отношений, так как близкородственные виды этих насекомых различаются по пространственной организации хромосом в ядрах трофоцитов яичников [7]. Наибольший интерес представляет изучение молекулярной организации районов хромосом, взаимодействующих с ядерной оболочкой. Выяснение природы контактов хромосом с оболочкой ядра позволит получить представление о закономерностях формирования и функционирования хроматина во внутриядерном пространстве.

Флуоресцентная *in situ* гибридизация ДНК отдельных районов хромосом, полученной с помощью микродиссекции, с хромосомами близкородственных видов малярийных комаров успешно применяется для оценки реорганизации последовательности ДНК районов прикрепления хромосом в филогенезе [8–10]. Ранее был проведен подобный анализ ДНК прицентромерного района хромосомы 2R *Anopheles atroparvus* Thiel., имеющего факультативные связи с оболочкой ядра [8], и района прикрепления 2L хромосомы *An. beklemishevi* Steg. et Kab. [9, 11]. В этих работах было показано, что районы прикрепления хромосом, которые находятся в прицентромерных районах, имеют общие последовательности ДНК с прицентромерными районами хромосом близкородственных видов, причем вне зависимости от их способности образовывать жесткий контакт с ядерной оболочкой. Можно сделать вывод, что исследованные прицентромерные районы хромосом содержат консервативные повторы, характерные для прицентромерных районов как таковых, а не только для районов прикрепления хромосом к оболочке ядра.

Цель настоящего исследования – выяснить, имеет ли район прикрепления XL хромосомы *An. messeae* Fall. общие последовательности с районами прикрепления хромосом других видов малярийных комаров комплекса «*maculipennis*». XL хромосома *An. messeae* образует контакт с ядерной оболочкой посредством района 2b-с, который расположен в середине плеча [7]. Район 2b-с локализуется на периферии ядра и образует «отростки», контактирующие с ядерной оболочкой, которые можно наблюдать на полудавленных препаратах ядер трофоцитов (рис. 1, на вклейке) и с использованием метода 3D-FISH ДНК района 2b-с с ядрами трофоцитов *An. messeae* (рис. 2, на вклейке).

Изучение последовательности ДНК района 2b-с интересно тем, что он не является прицентромерным. Поэтому становится возможным провести анализ района, ответственного за контакт с ядерной оболочкой, «в чистом виде», исключив последовательности, характерные для прицентромерного гетерохроматина. В данной работе исследовали локализацию ДНК района прикрепления XL хромосомы *An. messeae* на хромосомах близкородственных видов малярийных комаров, что позволило судить о реорганизации ДНК районов хромосом, принимающих участие в пространственной организации хромосом в ядре.

Материалы и методики исследования

В качестве материала для исследования использовали малярийных комаров *Anopheles* комплекса «*maculipennis*». Самки *An. messeae* и *An. beklemishevi* были собраны в пос. Коларово (Томская область) и в с. Тегульдет (Томская область), самки *An. maculipennis* Mg. и *An. melanoon* Hackett. собраны в окрестностях г. Адлер (Краснодарский край), а самки *An. atroparvus* были взяты из лабораторной культуры.

Приготовление препаратов хромосом. Для приготовления воздушно-сухих препаратов политенных хромосом яичники самок малярийных комаров фиксировали в растворе Карнуа (96%-ный этанол с ледяной уксусной кислотой в соотношении 3:1). Препараты готовили по стандартной методике [12]. Фолликулы яичников малярийного комара выдерживали 5 мин в 50%-ной пропионовой кислоте на предметном стекле. Затем материал накрывали покровным стеклом и раздавливали. Препарат опускали в жидкий азот, покровное стекло удаляли. После этого осуществляли проводку в этиловом спирте с возрастающей концентрацией (50, 70, 96%) по 5 мин в каждом при -20°C . Препараты высушивали при комнатной температуре.

Флуоресцентная *in situ* гибридизация. Метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) применяется для определения локализации на хромосомах исследуемой последовательности ДНК. Исследуемую ДНК (ДНК-зонд) «окрашивают» с помощью флуоресцентного красителя, денатурируют и гибридизуют с ДНК воздушно-сухих препаратов хромосом, распластанных на предметных стеклах. ДНК-зонд гибридизуется с ДНК хромосом по принципу комплементарности и выявляется при анализе с использованием люминесцентного микроскопа. В качестве ДНК-зонда в работе использована ДНК, полученная с помощью микродиссекции из района прикрепления XL хромосомы к оболочке трофоцитов *An. messeae*. Для его приготовления использовали модифицированный нуклеотид тетраметилродамин-5-дУТФ (TAMRA, ЗАО «Биосан», Россия). FISH с таким зондом позволяет опустить этап детекции, так как флуорохром уже связан с модифицированным нуклеотидом. В данной работе использовали стандартный протокол FISH [13] с модификациями, приведенными ниже.

Введение метки в ДНК. Введение метки в ДНК проводили в 25 циклах ПЦР в режиме: денатурация 94°C – 1 мин; отжиг 56°C – 1,5 мин; элонгация цепей при 72°C – 2 мин; с завершающей элонгацией цепей при 72°C – 8 мин. Состав ПЦР-смеси: 10 mM Трис HCl; 50 mM KCl, pH 8,3; 200 мкМ ДАТФ, дЦТФ, дГТФ и 100 мкМ дТТФ; 100 мкМ тетраметилродамин-5-дУТФ; 2 мкМ праймера MW6 (ООО «СибЭнзим-М», Россия), 5 mM MgCl_2 и 1,5 ед. Taq ДНК полимеразы. Полученный зонд промывали в 96%-ном этаноле 12 ч при -20°C , а далее – в 70%-ном этаноле при комнатной температуре 10 мин в присутствии 1:10 объема ПЦР смеси ацетата натрия 3 M с последующим высушиванием при 52°C в твердотельном термостате. Осадок зонда смешивали с гибридизационной смесью.

In situ гибридизация. Воздушно-сухие препараты промывали три раза в буферном растворе $2\times\text{SSC}$ (37°C , по 5 мин в каждом), проводили по серии этиловых спиртов возрастающей концентрации (70, 80, 96%) и высушивали при комнатной температуре. Далее препараты подвергались обработкой пепсином (200 мкг/мл) в кислой среде (10 мМ HCl) 10 мин при 37°C , после чего следовали отмывка в двух сменах $1\times\text{PBS}$ и дегидратация в серии спиртов возрастающей концентрации. На препараты наносили ДНК-зонд в гибридизационной смеси (50%-ный формамид, 10%-ный декстрансульфат натрия, 1%-ный Tween 20, $2\times\text{SSC}$) из расчета 15 мкл на один препарат. Препараты помещали на ночь в гибридизационную камеру «Termobrite» с режимом работы: денатурация 5 мин при 72°C и гибридизация 15 ч при 37°C .

Отмывку препаратов от лишнего зонда осуществляли в трех сменах 50% -ного формамида в $2\times\text{SSC}$ при 42°C с покачиванием по 5 мин в каждой. Далее препараты помещали последовательно в $2\times\text{SSC}$, $2\times\text{SSC}$ с 0,1%-ным Tween 20, две смены $0,2\times\text{SSC}$ при 42°C и $0,1\times\text{SSC}$ при 60°C по 5 мин в каждом. Препараты дегидратировали в этиловом спирте с возрастающей концентрацией (70, 80, 96%). Окраску хроматина осуществляли с помощью DAPI. Препараты анализировали на люминесцентном микроскопе AxioImager Z1 («Zeiss», Германия), фиксацию и обработку изображений проводили с использованием программного обеспечения AxioVision Rel. 4.7 («Zeiss», Германия).

Результаты исследования и обсуждение

Исследование локализации ДНК, гомологичной последовательностям района прикрепления XL хромосомы *An. messeae*, на хромосомах малярийных комаров комплекса «*maculipennis*»

Была проведена флуоресцентная *in situ* гибридизация ДНК района 2b-c XL хромосомы *An. messeae* (ДНК-пробы), полученной с помощью микродиссекции, с политенными хромосомами трофоцитов *An. messeae* и близкородственных видов *An. atroparvus*, *An. beklemishevi*, *An. maculipennis* и *An. melanoon*.

XL хромосома. В популяциях *An. messeae* с большой частотой встречается, а в западной части ареала преобладает парацентрическая инверсия в левом плече X хромосомы – XL_0 [14]. Эта инверсия распространена как в гетерозиготном (XL_{01}), так и в гомозиготном (XL_{00}) состояниях, причем показано, что инверсионный полиморфизм популяций малярийного комара имеет адаптивный характер [14, 15]. Примечательно, что инверсия в XL хромосоме захватывает район прикрепления к ядерной оболочке и переносит его из середины плеча к центромере. У особей *An. messeae*, гомозиготных по инверсии, положение района прикрепления XL хромосомы аналогично таковому у эволюционно исходного *An. atroparvus*. Было обнаружено, что гомологичные исследуемой последовательности ДНК локализованы также

в прицентромерном районе вблизи к гетерохроматическому правому плечу хромосомы и инверсией переносятся в середину плеча (рис. 3, на вклейке).

Таким образом, *in situ* гибридизация ДНК-пробы со стандартным вариантом XL хромосомы *An. messeae* и гомозиготным по инверсии демонстрирует изменение положения данного района. Причем ДНК-проба гибридизуется с прицентромерным как β -, так и α -гетерохроматином XL хромосомы *An. messeae*.

Подобные результаты были получены при гибридизации ДНК-пробы с XL хромосомой других видов малярийных комаров комплекса «*maculipennis*» (рис. 4, на вклейке).

Сигнал был обнаружен в XL хромосоме у всех изучаемых видов, вероятно, в районах, гомейологичных району 2b-с XL хромосомы *An. messeae*. Высокая интенсивность сигнала свидетельствует о сходстве последовательностей ДНК этих районов и района 2b-с *An. messeae*. В прицентромерном районе XL хромосомы также наблюдали локализацию ДНК-пробы из района 2b-с XL хромосомы *An. messeae*. Сигнал был обнаружен у *An. atroparvus*, *An. beklemishevi* и *An. melanoon* только в β -гетерохроматине, у *An. maculipennis* так же, как и у *An. messeae*, сигнал в прицентромерном районе был слабым, но локализовался как в β -, так и α -гетерохроматине. Высокая интенсивность сигнала в районе интеркалярного гетерохроматина свидетельствует о том, что «эволюция» XL хромосомы в комплексе «*maculipennis*» не происходила путем хромосомных перестроек, по крайней мере, вовлекающих районы, гомейологичные изучаемому 2b-с *An. messeae*.

Районы XL хромосом, ответственные за крепление к оболочке ядра у изучаемых видов, имели сходные последовательности с районом 2b-с *An. messeae*, однако интенсивность сигнала различалась. Хотя специальной количественной оценки интенсивности сигнала не проводилось, во всех экспериментах наиболее яркие сигналы были обнаружены в районах, гомейологичных району 2b-с *An. messeae*, и районе прикрепления XL хромосомы *An. atroparvus* (прицентромерный район). Непростая ситуация возникла с идентификацией сигнала в районе прикрепления XL хромосомы *An. beklemishevi*. Гибридизация с этим районом выявлена не во всех экспериментах и была чрезвычайно слабой. Это свидетельствует о том, что гомология ДНК района 2b-с *An. messeae* и района прикрепления XL *An. beklemishevi* либо имеет место (лишь в отношении отдельных малопредставленных у *An. beklemishevi* последовательностей), либо отсутствует полностью.

Сигнал в прицентромерном α -гетерохроматине XL хромосом можно было обнаружить только у *An. messeae* и *An. maculipennis*. Обнаружение сигнала в блоках α -гетерохроматина является типичным для указанных видов и обсуждается ниже.

Таким образом, у всех изучаемых видов, в том числе и у *An. messeae*, в XL хромосоме было обнаружено два флуоресцентных сигнала – в прицентромерном районе и в середине плеча (у *An. atroparvus* два сигнала). Такое

же распределение сигналов было отмечено у *An. melanoon*, XL хромосома которого не имеет жестких контактов с оболочкой ядра.

Хромосома 2. У большинства изучаемых видов хромосома 2 не имеет связи с ядерной оболочкой, но у *An. beklemishevi* хромосома 2 образует контакт с оболочкой ядра в прицентромерной области, и на давленных препаратах правое и левое плечи отделены друг от друга [16]. Обнаружена гомология ДНК-пробы с прицентромерным районом хромосомы 2 всех видов (рис. 5, на вклейке).

При этом происходило мечение как прицентромерного β -гетерохроматина, так и α -гетерохроматина. α -гетерохроматин в прицентромерных районах выражен у *An. maculipennis* и *An. messeae* наиболее сильно; он представлен довольно крупными блоками, и гибридизация происходила именно с ними, в то время как у *An. beklemishevi* и *An. melanoon* таких сигналов не выявлено. Следует отметить также интенсивное мечение прицентромерного β -гетерохроматина, наиболее ярко выраженное у *An. atroparvus*, а также в виде ярких отдельных сигналов у *An. melanoon*, *An. beklemishevi* и в меньшей степени у *An. maculipennis* и *An. messeae*. Кроме того, сигналы были обнаружены по всей длине обоих плеч хромосомы 2 всех видов.

Хромосома 3. В трофоцитах самок всех изучаемых видов хромосома 3 крепится к оболочке ядра, и на препаратах плечи этой хромосомы разобщены [16]. В результате FISH ДНК-пробы района 2b-с XL хромосомы в прицентромерном районе правого плеча хромосомы 3 поместились тяжи района 32d, которые отвечают за прикрепление этой хромосомы к оболочке ядра у всех видов комаров комплекса «*maculipennis*» (рис. 6, на вклейке). В прицентромерной области этой хромосомы были также обнаружены сигналы, среди которых следует отметить сигналы в районе, находящемся дистальнее α -гетерохроматического блока района 32d у *An. melanoon*, *An. atroparvus* и *An. beklemishevi*. У *An. maculipennis* и *An. messeae* таких сигналов обнаружено не было. Однако следует отметить, что лишь у видов *An. maculipennis* и *An. messeae* гибридизация происходила с α -гетерохроматическим блоком района 32d, в то время как у остальных видов сигнала в этом районе не выявлено.

В левом плече хромосомы 3 был обнаружен сигнал в прицентромерном районе 33 а-с (рис. 7, на вклейке), которым плечо крепится к ядерной оболочке. Следует отметить, что сигналы имеют место и в районах интеркалярного гетерохроматина. Причем часть из них можно было наблюдать в районах интеркалярного α -гетерохроматина у *An. beklemishevi*, *An. atroparvus*, *An. melanoon* и *An. maculipennis*. В то время как у *An. beklemishevi* и *An. atroparvus* отмечен сигнал в маркерном районе 35b, у *An. maculipennis* и *An. melanoon* – в характерном гетерохроматическом блоке района 34b. Однако следует отметить, что в районах прикрепления 3L хромосомы ни *An. melanoon*, ни *An. maculipennis* сигнала обнаружено не было.

Флуоресцентная *in situ* гибридизация ДНК района прикрепления XL хромосомы *An. messeae* с хромосомами того же вида и видов комплекса

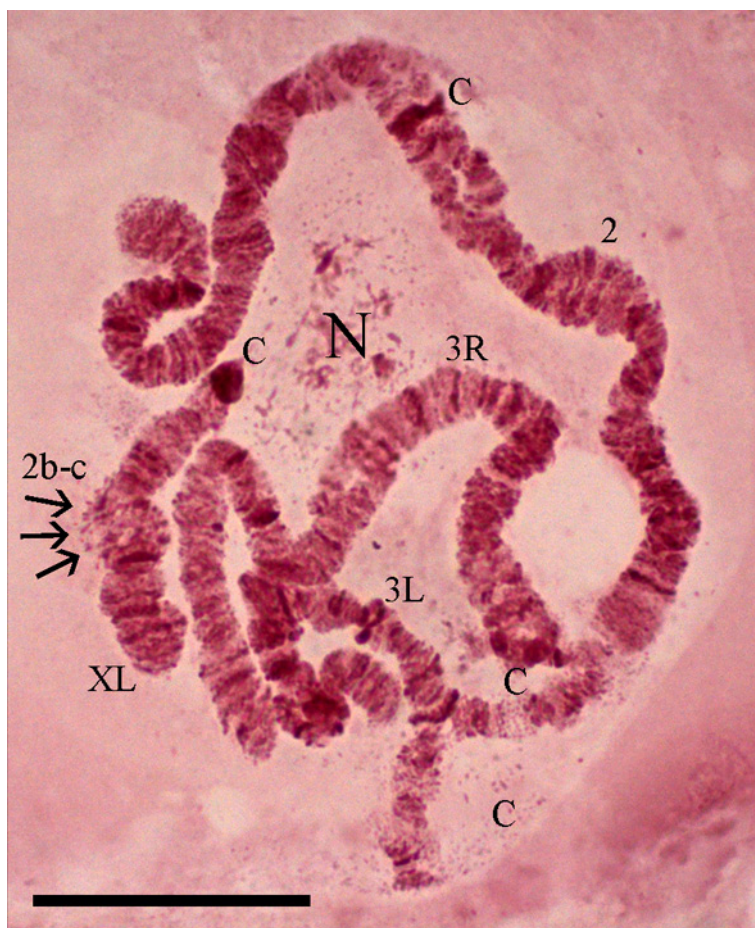


Рис. 1. Локализация тяжей хроматина, контактирующих с оболочкой в районе 2b-с XL хромосомы трофоцитов *An. messeae* (указаны стрелками):
N – ядрышко; *C* – центромера. Масштабная линейка 20 мкм

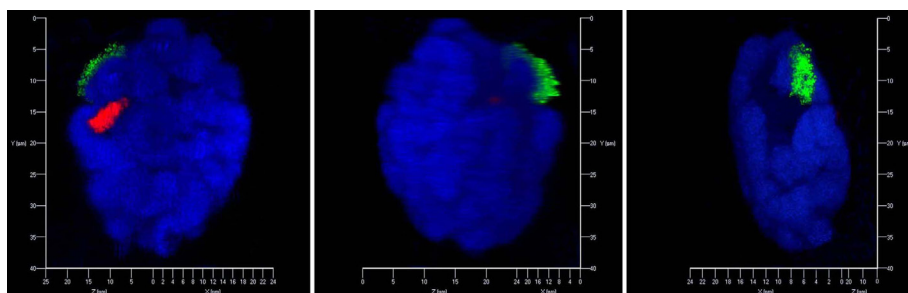


Рис. 2. Ядра трофоцитов *An. messeae*: красная область – пространственное положение района 5a XL хромосомы, зеленая – 2b-с XL хромосомы

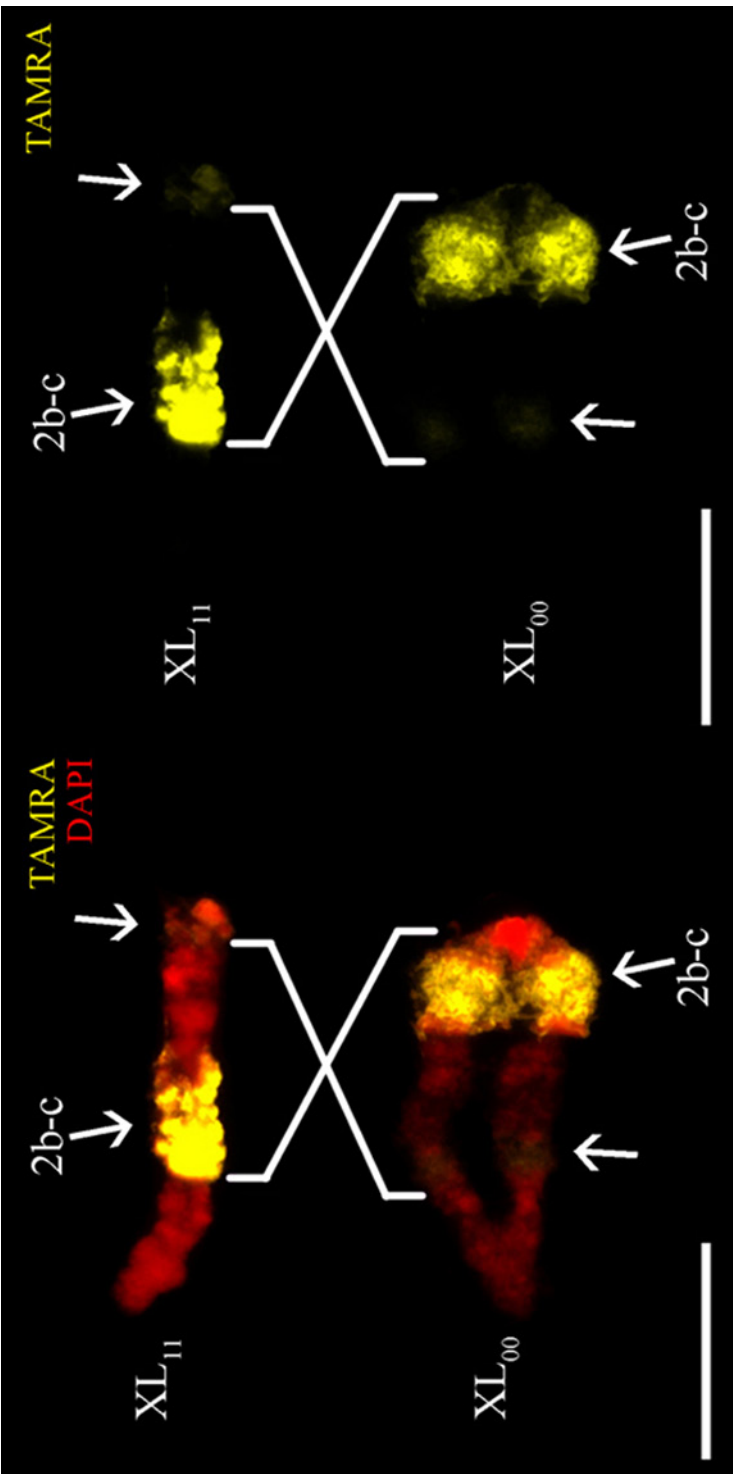


Рис. 3. Локализация ДНК района 2b-c *An. messeae* на стандартном варианте XL хромосомы (XL_{11}) и гомозиготе по инверсии (XL_{00}) у малярийного комара *An. messeae*; стрелками указана локализация флуоресцентного сигнала. Масштабная линейка 20 мкм

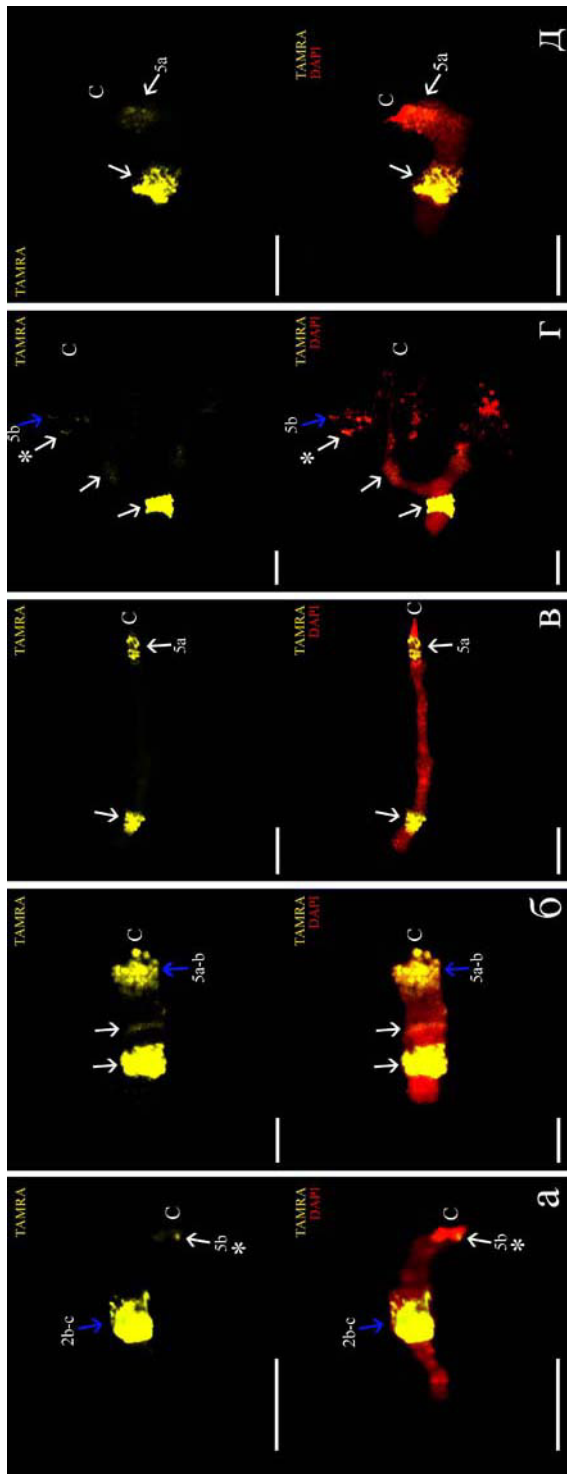


Рис. 4. Локализация ДНК района 2b-с XL хромосомы *An. messeae* на XL хромосоме малярийных комаров комплекса «*maculipennis*»: *a* – XL *An. messeae*; *б* – XL *An. atroparvus*; *в* – XL *An. beklemishevi*; *д* – XL *An. maculipennis*; *д* – XL *An. melanocephalus*; здесь и далее на рисунках стрелками показана локализация флуоресцентного сигнала, стрелки синего цвета указывают на сигналы в районах прикрепления хромосом; стрелками со звездочкой показан сигнал в α -гетерохроматическом районе; C – центромера. Масштабная линейка 20 мкм

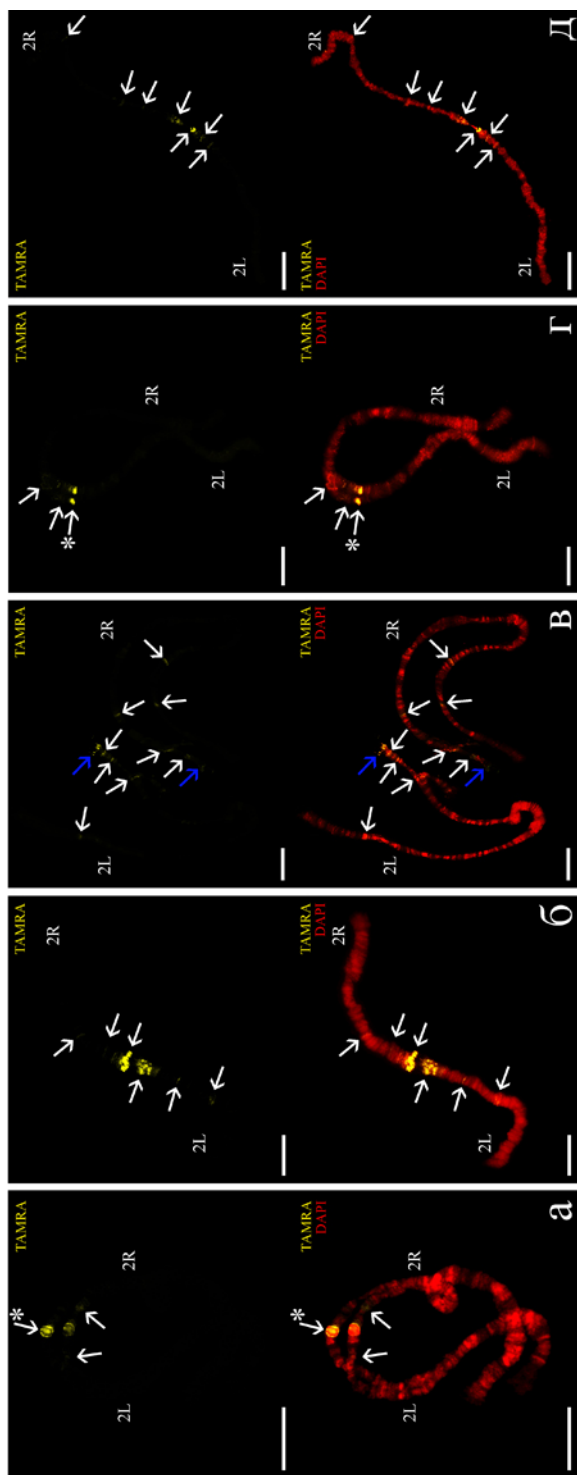


Рис. 5. Локализация ДНК района 2b-с XI хромосомы *An. messeae* на хромосоме 2 малярийных комаров комплекса «*maculipennis*»:
 а – 2 *An. messeae*; б – 2 *An. atroparvus*; в – 2 *An. beklemishevi*; г – 2 *An. maculipennis*; д – 2 *An. melanocephalus*. Масштабная линейка 20 мкм

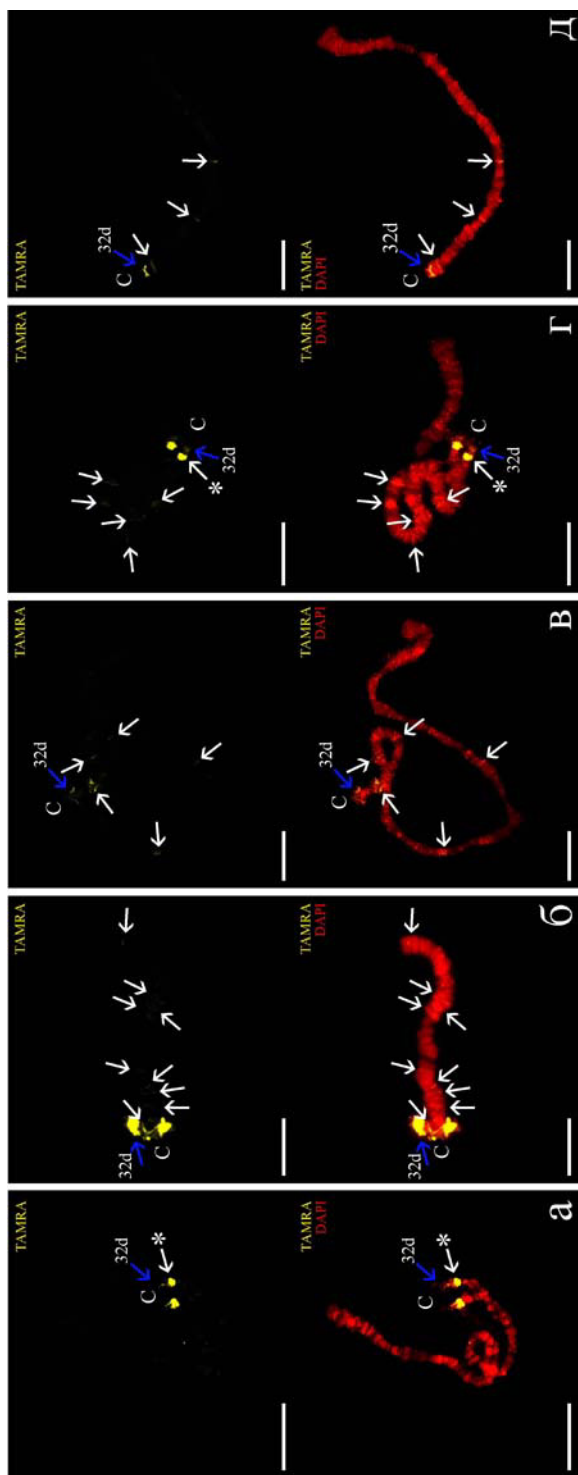


Рис. 6. Локализация ДНК района 2b-с *An. messeae* на хромосоме 3R малярийных комаров комплекса «*maculipennis*»:
а – 3R *An. messeae*; б – 3R *An. atroparvus*; в – 3R *An. beklemishevi*; г – 3R *An. maculipennis*; д – 3R *An. melanocephalus*. Масштабная линейка 20 мкм

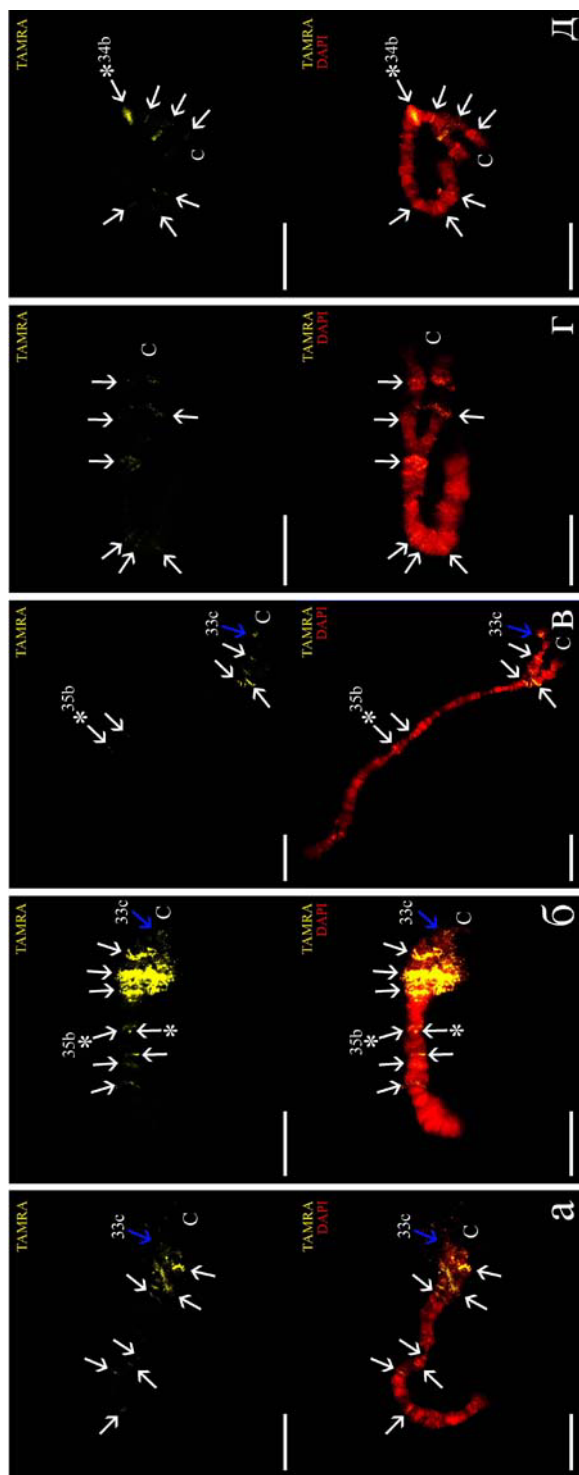


Рис. 7. Локализация ДНК района 2b-с *An. messeae* на хромосоме 3L малярийных комаров комплекса «*maculipennis*»:
 а – 3L *An. messeae*; б – 3L *An. atroparvus*; в – 3L *An. beklemishevi*; г – 3L *An. maculipennis*; д – 3L *An. melano*. Масштабная линейка 20 мкм

«*maculipennis*» показала, что этот район характеризуют последовательности прежде всего прицентромерного гетерохроматина. На данном этапе исследования можно сделать вывод о том, что, вероятно, район 2b-с является гетерохроматическим, что подтверждается работами по локализации высокоповторенной ДНК на хромосомах *An. messeae* [17, 18]. Ранее отмечалось, что район 2b-с имеет морфологию, обычную для β-гетерохроматина [16].

Предположение о том, что район 2b-с *An. messeae* характеризуется последовательностями, типичными только для районов прикрепления хромосом, не подтвердилось, так как:

1. Примерно одинаковую картину гибридизации ДНК-пробы наблюдали со всеми хромосомами разных видов вне зависимости от их отношения к ядерной оболочке. XL хромосома *An. melanoon* и хромосома 2 *An. messeae*, *An. maculipennis*, *An. atroparvus* и *An. melanoon* не образуют жестких контактов с оболочкой ядра, но имеют аналогичное распределение сигнала, что и хромосомы, взаимодействующие с ядерной оболочкой.

2. У *An. beklemishevi* в районе прикрепления XL хромосомы, а также в районах прикрепления 3L хромосомы у *An. maculipennis* и *An. melanoon*, не было обнаружено выраженных сигналов.

Вероятно, ДНК района прикрепления XL хромосомы *An. messeae* образуют повторенные последовательности разных классов, среди которых есть универсальные для гетерохроматических районов и те, которые определяют положение XL хромосомы в пространстве.

Очевидно, что в состав района 2b-с входят последовательности, характерные для β-гетерохроматина. Однако гибридизация зонда была обнаружена также и с α-гетерохроматиновыми блоками, которые расположены в левом плече хромосомы 2 и правом плече хромосомы 3, что показано в результате эксперимента FISH ДНК-пробы с хромосомами *An. maculipennis* и *An. messeae*. Важным результатом эксперимента является иллюстрация различия в локализации гетерохроматических районов у разных видов комплекса «*maculipennis*» (рис. 8).

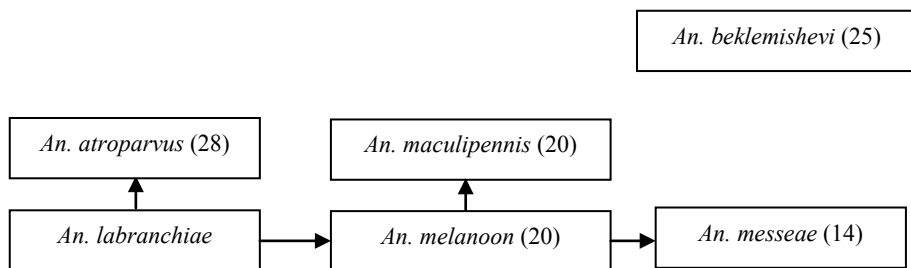


Рис. 8. Изменение количества сайтов консервативных последовательностей ДНК в филогенезе малярийных комаров комплекса «*maculipennis*»: в скобках – количество сигналов, полученных в результате FISH ДНК района 2b-с *An. messeae* с хромосомами соответствующих видов малярийных комаров.
Схема видообразования по Стегнью [17] с изменениями

Было выявлено, что согласно схеме видообразования [17] происходило уменьшение количества сайтов, содержащих последовательности ДНК района прикрепления XL хромосомы *An. messeae*. Так, у стволового вида *An. atroparvus* можно наблюдать 28 сайтов включения метки, у гомосеквентных *An. melanoon* и *An. maculipennis* – 20 сайтов, а у *An. messeae* – лишь 14 сайтов.

Причем можно предположить, что у *An. maculipennis* и *An. messeae* одновременно с элиминацией (или уменьшением) количества консервативных последовательностей в интеркалярном гетерохроматине происходит их накопление (либо образование *de novo*) в прицентромерном α -гетерохроматине хромосом 2, 3R и XL (рис. 9).

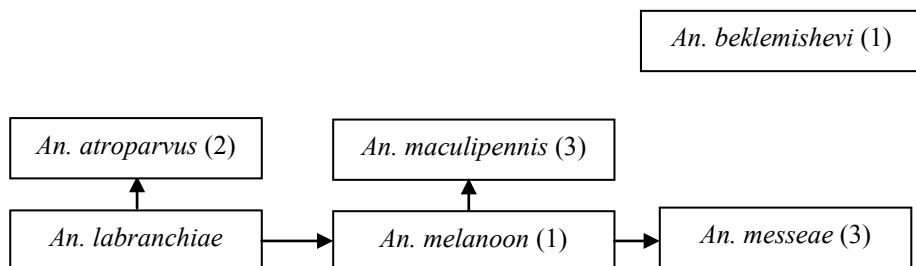


Рис. 9. Изменение количества сайтов консервативных последовательностей ДНК в α -гетерохроматине в филогенезе малярийных комаров комплекса «*maculipennis*»: в скобках – количество сигналов в α -гетерохроматических районах, полученных в результате FISH ДНК района 2b-с *An. messeae* с хромосомами соответствующих видов малярийных комаров. Схема видообразования по Стегнию [17] с изменениями

Такой вывод становится более убедительным, если учитывать, что у *An. atroparvus*, *An. melanoon*, *An. beklemishevi* указанное на рис. 9 количество сигналов соответствует только тем, которые расположены в интеркалярном α -гетерохроматине. Таким образом, район 2b-с, как показал анализ, соответствует β -гетерохроматину не только морфологически, но и по последовательностям ДНК, видимо, эволюционно консервативным.

Сравнительный анализ ДНК районов прикрепления XL хромосомы *An. messeae* и 2L хромосомы *An. beklemishevi*, а также прицентромерного района 2R хромосомы *An. atroparvus*

Ранее с помощью микродиссекции были получены ДНК-пробы районов 15d *An. beklemishevi* [9, 11] и 14с *An. atroparvus* [8, 19]. Хромосома 2 у *An. beklemishevi* крепится к оболочке ядра, и оба плеча на препаратах разобщены. Из прицентромерного района 2L плеча была взята ДНК-проба, и из нее был приготовлен ДНК-зонд. С использованием этого ДНК-зонда была проведена FISH с хромосомами *An. beklemishevi*, *An. messeae* и *An. atroparvus*. Та же работа была проведена и с прицентромерным районом 2R хромосомы *An. atroparvus*, которая образует факультативные контакты с оболочкой ядра. Так как в описываемых работах анализировали районы прикрепления

хромосом трофоцитов малярийного комара комплекса «*maculipennis*», интересно провести сравнение результатов упомянутых работ с результатами исследования района 2b-с *An. messeae*. Результат сравнения ДНК-проб районов 15d *An. beklemishevi*, 14с *An. atroparvus* и 2b-с *An. messeae* на хромосомах *An. beklemishevi*, *An. messeae* и *An. atroparvus* проиллюстрирован в таблице.

Локализация ДНК районов 15d *An. beklemishevi*, 14с *An. beklemishevi* и 2b-с *An. messeae* на хромосомах *An. beklemishevi*, *An. messeae* и *An. atroparvus*

Вид	Хромосома	ДНК районов хромосом		
		15d <i>An. beklemishevi</i>	14с <i>An. atroparvus</i>	2b-с <i>An. messeae</i>
<i>An. beklemishevi</i>	XL	β-ПГХ	β-ПГХ	β-ПГХ, ДР
	2L	РП (β-ПГХ)	–	РП (β-ПГХ), ДР
	2R	РП (β-ПГХ)	РП (β-ПГХ)	РП (β-ПГХ), ДР
	3R	РП (β-ПГХ)	РП (β-ПГХ)	РП (β-ПГХ), ДР
	3L	РП (β-ПГХ)	РП (β-ПГХ)	РП (β-ПГХ), ДР
<i>An. messeae</i>	XL	β-ПГХ	β-ПГХ	РП, β-ПГХ, α-ПГХ
	2L	β-ПГХ	α-ПГХ	β-ПГХ, α-ПГХ
	2R	ДР	β-ПГХ	β-ПГХ
	3R	РП (β-ПГХ), α-ПГХ	РП (β-ПГХ), α-ПГХ	РП (β-ПГХ), α-ПГХ
	3L	РП (β-ПГХ)	РП (β-ПГХ)	РП (β-ПГХ), ДР
<i>An. atroparvus</i>	XL	РП (β-ПГХ)	РП (β-ПГХ), ДР	РП (β-ПГХ), ДР
	2L	β-ПГХ	β-ПГХ	β-ПГХ, ДР
	2R	β-ПГХ	β-ПГХ	β-ПГХ, ДР
	3R	РП (β-ПГХ)	РП (β-ПГХ)	РП (β-ПГХ), ДР
	3L	РП (β-ПГХ)	РП (β-ПГХ)	РП (β-ПГХ), ДР

Примечание. ПГХ – прицентромерный гетерохроматин; РП – район прикрепления; ДР – другие районы.

ДНК изучаемых районов, как правило, локализовалась в β-гетерохроматине *An. atroparvus* и *An. beklemishevi*, а также в β-гетерохроматине и α-гетерохроматиновых блоках *An. messeae*. Гомология района 2b-с XL хромосомы *An. messeae* с прицентромерными районами говорит о том, что в его состав входят повторяющиеся последовательности ДНК, которыми изобилует прицентромерный гетерохроматин. Кроме того, у изучаемых районов сходная картина распределения сигнала на хромосомах близкородственных видов, что является еще одним подтверждением гетерохроматической природы района 2b-с *An. messeae*. Однако локализация ДНК-пробы 2b-с *An. messeae*, взятой из района интеркалярного гетерохроматина, отличалась от локализации ДНК-проб района 15d *An. beklemishevi* и 14с *An. atroparvus*, которые были выделены из прицентромерных районов хромосом. Отличие последовательностей из района 2b-с *An. messeae* заключается в локализации их вдоль плечей хромосом наряду с прицентромерным гетерохроматином.

В результате гибридизации ДНК районов прицентромерного гетерохроматина 2L хромосом *An. beklemishevi* и 2R *An. atroparvus* и хромосомой *An. messeae* не было выявлено гомологии с районом прикрепления XL хромосомы. Однако гибридизация ДНК-пробы района 2b-с XL хромосомы *An. messeae* дала положительный результат. Эти данные еще раз подтверждают сложность организации последовательности ДНК района прикрепления XL хромосомы *An. messeae*, в состав которого, вероятно, входят последовательности разных классов и с разной копийностью.

Заключение

Таким образом, последовательность ДНК района 2b-с не является принципиально отличной от других районов, имеющих морфологию β -гетерохроматина, в том числе хромосом, не имеющих контактов с оболочкой ядра. Морфологическое сходство этого района с β -гетерохроматином политенных хромосом лежало в основе гипотезы происхождения этого района [15, 20]. Ранее предполагалось, что эволюционно исходным инверсионным вариантом является тот, у которого район 2b-с расположен в прицентромерной области. Однако эксперименты FISH ДНК района прикрепления XL хромосомы *An. messeae* с хромосомами близкородственных видов показывают, что у предковых видов и даже представителя неарктической ветви комплекса *An. beklemishevi* гомеологичный району 2b-с район всегда находится в середине плеча XL хромосомы.

Таким образом, возникновение у *An. messeae* хромосомы с районом прикрепления, расположенным в центральной части плеча, было вызвано реорганизацией самой последовательности ДНК и не связано с хромосомными перестройками. Возникновение районов прикрепления хромосом к ядерной оболочке у малярийных комаров комплекса «*maculipennis*» могло быть вызвано перемещением мобильных элементов, содержащих SAR/MAR-последовательности ДНК. SAR/MAR-последовательности ДНК, которые стабилизируют хроматиновые петли в интерфазном ядре и участвуют в прикреплении их к ядерному каркасу [21]. Следовательно, эти участки ДНК имеют непосредственное отношение к формированию внутриядерной архитектуры. Помимо стабилизации хроматиновых петель, SAR/MAR также участвуют в процессах инициации репликации, транскрипции, репарации и сплайсинга [21].

В литературе отмечают, что некоторые мобильные элементы, такие как MITE, способны перемещать SAR/MAR-последовательности [22]. Появление района прикрепления XL хромосомы в середине плеча могло быть связано с перемещением мобильных элементов из районов прикрепления хромосом 2 или 3 предкового вида, которые захватывали последовательно, связывающие белки оболочки. Более того, такое перемещение могло бы произойти в пределах одной XL хромосомы, когда район прикрепления,

расположенный у центромеры, являлся донором функциональных элементов, участвующих в контакте. «Старый» район прикрепления мог утратить свое значение и перестать функционировать, в то время как «новый», расположенный в середине плеча, принял на себя его функции. Описанная гипотеза возникновения *de novo* районов прикрепления хромосом подтверждается данными о молекулярно-генетической структуре района 2b-c, в котором найдены мобильные элементы и SAR/MAR-последовательности [18]. Однако в настоящий момент существует очень мало информации о молекулярной организации районов прикрепления хромосом к ядерной оболочке, что не позволяет делать окончательных выводов не только о том, как возникли, но и том, как функционируют эти районы.

Литература

1. Rabl C. Über Zellteilung // Morphologisches Jahrbuch. 1885. P. 214.
2. Cremer T., Cremer C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells // Nature Reviews Genetics. 2001. Vol. 2, № 4. P. 292–301.
3. Meaburn K.J., Misteli T.J. Locus-specific and activity-independent gene repositioning during early tumorigenesis // The Journal of Cell Biology. 2008. Vol. 180, № 1. P. 39–50.
4. Mahy N.L., Perry P.E., Bickmore W.A. Gene density and transcription influence the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH // The Journal of Cell Biology. 2002. Vol. 159, № 5. P. 753–63.
5. Steffensen D.M. Chromosome architecture and the interphase nucleus: Data and theory on the mechanism differentiation and determination // Chromosomes Today. Amsterdam : Elsevier, 1977. Vol. 6. P. 247–253.
6. Куличков В.А., Жимулев И.Ф. Анализ пространственной организации геномов *Drosophila melanogaster* на основе данных по эктопической конъюгации политенных хромосом // Генетика. 1976. Т. 12, № 5. С. 81–89.
7. Стегний В.Н. Реорганизация структуры интерфазных ядер в онто- и филогенезе малярийных комаров // Доклады АН СССР. 1979. Т. 249, № 5. С. 1231–1234.
8. Грушко О.Г., Шарахова М.В., Шевченко А.И. и др. Характеристика и сравнительный анализ ДНК из прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *Anopheles atroparvus* V. Tiel (Culicidae, Diptera) // Генетика. 2004. Т. 40, № 10. С. 1325–1334.
9. Стегний В.Н., Сайджафарова А.О., Артемов Г.Н., Карамышева Т.В., Рубцов Н.Б. Сравнительный анализ молекулярного состава прицентромерного гетерохроматина политенных хромосом малярийных комаров рода *Anopheles* (CULICIDAE, DIPTERA) // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2007. № 1. С. 96–105.
10. Усов К.Е., Шелковникова Т.А., Вассерлауф И.Э., Стегний В.Н. Молекулярно-цитогенетический анализ прицентромерного гетерохроматина хромосом трофоцитов яичников у видов подгруппы *Drosophila melanogaster* // Цитология. 2008. Т. 50, № 12. С. 1044–1049.
11. Сайджафарова А.О., Артемов Г.Н., Карамышева Т.В. и др. Молекулярно-цитогенетическое изучение ДНК прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2L у малярийного комара *Anopheles beklemishevi* (Culicidae, Diptera) // Генетика. 2009. Т. 45, № 1. С. 59–63.
12. Kumar V., Cornel A.J., Mukabayire O. In situ hybridization to *Anopheles* polytene chromosomes // Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A Methods Manual. London : Chapman and Hall, 1997. P. 337–345.

13. Lichter P., Ledbetter S.A., Ledbetter D.H., Ward D.C. Fluorescence in situ hybridization with Alu and L1 polymerase chain reaction probes for rapid characterization of human chromosomes in hybrid cell lines // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. Vol. 87, № 17. P. 6634–6638.
14. Стегний В.Н. Инверсионный полиморфизм малярийного комара *Anopheles messeae*. IV. Стационарность частотного распределения инверсий по ареалу вида // Генетика. 1983. Т. 19, № 3. С. 466–473.
15. Стегний В.Н. Популяционная генетика и эволюция малярийных комаров. Томск : Изд-во Томского ун-та, 1991. 137 с.
16. Стегний В.Н. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция. Новосибирск : Изд-во Новосиб. ун-та, 1993. 111 с.
17. Стегний В.Н. Генетические основы эволюции малярийных комаров. I: Хромосомные филогенетические связи // Зоологический журнал. 1981. Т. 60, вып. 1. С. 69–77.
18. Артемов Г.Н., Стегний В.Н. Молекулярно-генетический анализ районов прикрепления хромосом к оболочке ядра трофобластов яйцеклеток малярийных комаров *Anopheles maculipennis* // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2010. Т. 10, № 2. С. 123–131.
19. Grushko O.G., Sharakhova M.V., Stegnii V.N., Sharakhov I.V. Molecular organization of heterochromatin in malaria mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* subgroup // Gene. 2009. № 448. P. 192–197.
20. Шарахова М.В., Стегний В.Н., Тимофеева О.В. Полиморфизм прицентромерного гетерохроматина политенных хромосом трофобластов яйцеклеток в природных популяциях малярийного комара *Anopheles messeae* Fall. // Генетика. 1997. Т. 33, № 2. С. 281–283.
21. Girod P.A., Nguyen D.Q., Calabrese D. et al. Genome-wide prediction of matrix attachment regions that increase gene expression in mammalian cells // Nat. Methods. 2007. Vol. 4, № 9. P. 747–753.
22. Avramova Z., Tikhonov A., Chen M., Bennetzen J.L. Matrix attachment regions and structural colinearity in the genomes of two grass species // Nucleic Acids Res. 1998. № 26. P. 761–767.

Поступила в редакцию 03.08.2011 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2011. № 4 (16). P. 157–169

Gleb N. Artemov^{1,2}, Gulnar M. Abilkasimova³, Vladimir N. Stegniy^{1,2}

¹Research Institute of Biology and Biophysics of Tomsk State University, Tomsk, Russia

²Biological Institute of Tomsk State University, Tomsk, Russia

³Institute of General Genetics and Cytology, Alma-Ata, Kazakhstan

MOLECULAR-CYTOGENETIC ANALYSIS OF CHROMOSOME ATTACHMENT REGIONS TO NURSE CELLS NUCLEAR ENVELOPE IN *Anopheles* MALARIA MOSQUITOES OF «*maculipennis*» SUBGROUP

The interphase nucleus spatial organization has been a current problem. Inter-nucleus architecture is provided by interactions of chromosomes with nuclear envelope and each other. Malaria mosquitoes are extremely useful for nucleus architecture investigation because their close related species differ by nurse cells chromosomes spatial

organization. The goal of our research is comparative analysis of DNA of XL chromosome attachment region of *Anopheles messeae* Fall. and chromosomes attachment regions sequence of «*maculipennis*» subgroup malaria mosquitoes (*An. atroparvus* Thiel., *An. beklemishevi* Steg. et Kab., *An. maculipennis* Mg. u *An. melanoon* Hackett.). XL chromosome *An. messeae* is connected with nuclear cover by region that is located in the middle of the chromosome arm. The benefit of this work is researching a region that is not pericentromeric. Therefore, the attachment region DNA analysis without pericentromeric region sequences (*per se*) is possible. DNA from XL chromosome attachment region of *An. messeae* nurse cells was separated with the help of microdissection and subsequent DOP-PCR amplification. Fluorescent *in situ* hybridization of this DNA with «*maculipennis*» subgroup malaria mosquitoes chromosomes revealed that XL chromosome attachment region of *An. messeae* contains the sequences including pericentromeric heterochromatin. We propose, decreasing the number of sites contained DNA from XL chromosome attachment region of *An. messeae* during subgroup forming. Moreover, in *An. maculipennis* u *An. messeae* conservative sequences decreasing in intercalary heterochromatin its accumulation can occur in chromosomes 2, 3R and XL pericentric α -heterochromatin.

The sequences of XL chromosome attachment region of *An. messeae* and other mosquitoes chromosome regions with β -heterochromatin morphology, including chromosome without attachment regions, do not differ significantly. Probably, XL chromosome attachment region of *An. messeae* consists of repeated sequences of different classes: universal for heterochromatic regions and taking part in XL chromosome spatial organization. Homeiological to XL chromosome attachment region of *An. messeae* regions are located in the middle of the chromosome arm in ancestral species and even nearctic specimen – *An. beklemishevi* always. Therefore, *An. messeae* XL chromosomes with the attachment region in the middle of arm appearance are not connected with chromosomes rearrangements (e.g. inversion) but could be initiated through the DNA sequences reorganization. The transposition of transposable elements, containing SAR/MAR sequences, is one of the ways to create new chromosome attachment regions to nuclear envelope.

Key words: nucleus spatial organization; chromosome attachment regions to the nucleus envelope; heterochromatin; malaria mosquitoes; *Anopheles*.

Received August 3, 2011