

И.Э. Вассерлауф, К.Е. Усов, Е.Ю. Митренина, В.Н. Стегний

**ИЗУЧЕНИЕ ВИДОВЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ВЗАИМНОГО
РАСПОЛОЖЕНИЯ ПЕРВИЧНЫХ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ
В ЯДРАХ ТРОФОЦИТОВ ЯИЧНИКОВ У ВИДОВ *D. YAKUBA BURLA*
И *D. SANTOMEA LACHAISE, HARRY* ПОДГРУППЫ «*MELANOGASTER*»
РОДА *DROSOPHILA (SOPHOPHORA)***

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 04-04-48175), целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2006–2008)» (проект РНР.2.2.1.1.2038) и НШ – 4283.2006.4

Аннотация. Изучено взаимное расположение политенных хромосом в ядрах трофоцитов яичников у видов *D. yakuba* и *D. santomea*. У межвидовых гибридов была обнаружена видовая специфичность ориентации хромосом в ядре, проявляющаяся в асинхронизации гомеологичных хромосом. Это объясняется тем, что гомеологи «сохраняют» свою видоспецифичную позицию в пространстве ядра. Изучение ассоциации хромосом *D. yakuba* и *D. santomea* на протяжении всего эндомитотического цикла выявило динамику прицентромерных гетерохроматиновых блоков хромосом 3 и 2, связанную с образованием ядрышкового материала.

Ключевые слова: первичные политенные хромосомы, эндоцикл, взаимное расположение хромосом в ядрах трофоцитов яичников, подгруппа видов *Drosophila melanogaster*.

Взаимное расположение хромосом в пространстве ядра у эукариот играет важную роль в экспрессии генов и сегрегации хромосом в процессе клеточного деления [1–5]. Для интерфазного ядра характерна динамичность хроматина [6–9], при этом хромосомы сохраняют свою территориальность и взаимное расположение [10].

Расположение политенных хромосом в ядрах соматических тканей (слюнные железы, протаракальная железа, средняя и задняя кишка и мальпигиевы сосуды) и генеративной системы клеток (ядра трофоцитов яичников) у двукрылых насекомых имеет тканевую специфичность [11–12]. У близкородственных видов малярийных комаров (комплекс *Anopheles maculipennis* [11]) и дрозофилы (виды подгруппы *Drosophila melanogaster* [13], виды группы *D. virilis* [14]) в ядрах трофоцитов яичников были выявлены видовые отличия в ориентации хромосом. Видоспецифичность проявлялась в наличии или отсутствии связей определенных хромосом с ядерной оболочкой; в морфологии участков прикрепления хромосом к оболочке; наличии или отсутствии хромоцентральной организации хромосом в ядре [11, 13, 15]. Есть основания предполагать, что в подобных структурных перестройках архитектуры хромосом принимают участие мобильные генетические элементы (МГЭ), активация которых осуществляется при инбредном размножении и экстремальных температурах развития [16–18].

Для двукрылых насекомых характерен нутриментарный тип оогенеза. Ооцит и трофоциты по происхождению являются сестринскими клетками. У малярийных комаров политенные хромосомы трофоцитов хорошо структурированы, имеют дисковую исчерченность [1, 11].

У дрозофилы на стадиях оогенеза с S_3 по S_7 выявляются эндополиплоидные ядра с различной степенью политенизации и морфологией хроматина: мелкие ядра с ретикулярной структурой хроматина; первичные политенные хромосомы, имеющие гетерохроматиновые блоки; помпонообразные, компактные хромосомы; стадия распада помпонообразных хромосом и ядра с ретикулярной структурой хроматина [19–20]. Первичные политенные хромосомы на стадии S_3 – S_5 оогенеза дрозофилы являются удобными для изучения взаимного расположения хромосом в ядре.

Ранее нами была изучена ориентация хромосом в ядрах трофоцитов яичников у 8 близкородственных видов подгруппы «*melanogaster*» и построена межвидовая схема пространственной реорганизации хромосом [13]. Предполагается, что эволюция архитектуры ядер шла от локального хромоцентра (*D. orena*) к диффузному (*D. simulans*, *D. sechellia*, *D. erecta*) и к полному его исчезновению (*D. mauritiana*, *D. yakuba*, *D. teissieri*), к прикреплению прицентромерных или теломерных районов хромосом к оболочке ядра (*D. melanogaster*).

Недавно в западно-экваториальной Африке на одном из островов Гвинейского залива Sao Tome был открыт новый вид – *D. santomea*. Этот вид морфологически отличается от близкородственных подгруппы *D. melanogaster* жёлтым цветом тела без чёрных брюшных сегментов. *D. santomea* сходна с *D. yakuba* по структуре политенных хромосом (гомосеквентна), митотических хромосом, гену *period*, аллозимам [21].

В связи с этим нам было интересно изучить взаимное расположение хромосом трофоцитов яичников *D. santomea* и дополнить нашу филогенетическую схему, построенную на основе ориентации хромосом в ядрах трофоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследований служили 0,5-, 1-, 1,5-, 2-суточные самки *D. yakuba* (Фонд центра штата Аризона, США) и *D. santomea*, любезно предоставленные F. Lumeunier (Laboratoire Populations, Ge'ne'tique et Evolution, UPR CNRS, Gif-sur-Yvette, Франция).

Были получены межвидовые гибриды от скрещиваний: ♀*D. yakuba* × ♂*D. santomea*; ♀*D. santomea* × ♂*D. yakuba*.

Яичники выделяли в физиологическом растворе 0,7% NaCl и фиксировали в упрощенном спирт-уксусном фиксаторе Карнуа в соотношении 3:1. Для изучения архитектуры ядер трофоцитов яичников получали «полудавленные» лактоацетоорсеиновые препараты. Яичники, окрашенные лактоацетоорсеином (Orcein – Sigma, England), осторожно накрывали покровным стеклом и слегка давили так, чтобы хромосомы оставались внутри ядра.

Для выявления ядрышкового материала в ядрах трофоцитов яичников было проведено Ag-окрашивание – препараты инкубировали в растворе азотно-

кислого серебра. На сухие препараты наносили 3–4 капли 50%-ного раствора AgNO_3 и осторожно накрывали их покровным стеклом. Затем препараты помещали в эксикатор с дистиллированной водой и инкубировали в термостате 24–30 ч при температуре 65°C ; после этого их анализировали и фотографировали при помощи микроскопа Laboval-4 и фотоаппарата Olympus (увеличение 10×100).

Достоверность различий между контролем и экспериментальными данными вычисляли с помощью *U*-теста Манна–Уитни при заданной вероятности $p = 0,95$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимное расположение хромосом в ядрах трофоцитов яичников у гомосеквентных видов *D. yakuba* и *D. santomea*

Взаимное расположение хромосом у гомосеквентных видов *D. yakuba* и *D. santomea* оценивалось только на стадиях $S_3 - S_5$ оогенеза на протяжении которых образуются первичные политенные хромосомы.

Ориентация хромосом в ядрах трофоцитов *D. santomea* (рис. 1, в, з) сходна с таковой *D. yakuba* (рис. 1, а, б). Хромосомы не образуют общего хромосомного центра, хромосомы X и 3 прицентромерными районами близко ассоциированы по отношению друг к другу, а хромосома 2 локализована в противофазе. Гомологи хромосом 2 и 3 в прицентромерных районах слегка асинаптированы и содержат крупные гетерохроматиновые блоки, которые локально объединяют плечи хромосом. Прикреплений хромосом к оболочке ядра визуально не обнаружено (см. рис. 1, а–з).

Такое сходство в ориентации хромосом ядер трофоцитов было ранее выявлено и у других гомосеквентных видов (например, *D. simulans* и *D. sechellia*) [11, 13]. Только с помощью гибридологического анализа этих видов были обнаружены видовые отличия, которые проявляются в асинаптации гомеологичных хромосом. Это связано с тем, что гомеологи «сохраняют» свою видоспецифичную позицию в пространстве ядра.

У межвидовых гибридов от скрещиваний ♀ *D. yakuba* × ♂ *D. santomea* (рис. 1, д, е); ♀ *D. santomea* × ♂ *D. yakuba* (рис. 1, д–з) было выявлено нарушение в спаривании гомеологичных хромосом в прицентромерных районах или полное асинаптирование плеч гомеологов, которое визуально выявляется не во всех ядрах. Был проведен анализ 10 гибридных самок от скрещивания ♀ *D. yakuba* × ♂ *D. santomea* (164 ядра). Полученные результаты показали достаточно высокий процент ядер с асинаптированными гомеологичными хромосомами ($72,6 \pm 3,5\%$). Такая дезориентация гомеологов в прицентромерных районах или их полное асинаптирование, вероятно, связаны с видоспецифичной позицией гомеологичных хромосом в пространстве ядра у межвидовых гибридов, что свидетельствует о видовой специфичности ориентации хромосом в ядрах трофоцитов гомосеквентных видов *D. yakuba* и *D. santomea*.

Нарушение синапсиса у гомеологов межвидовых гибридов было обнаружено не во всех ядрах. Возможно, это связано с различной степенью политемизации и компактизации хромосом на различных стадиях эндоцикла.

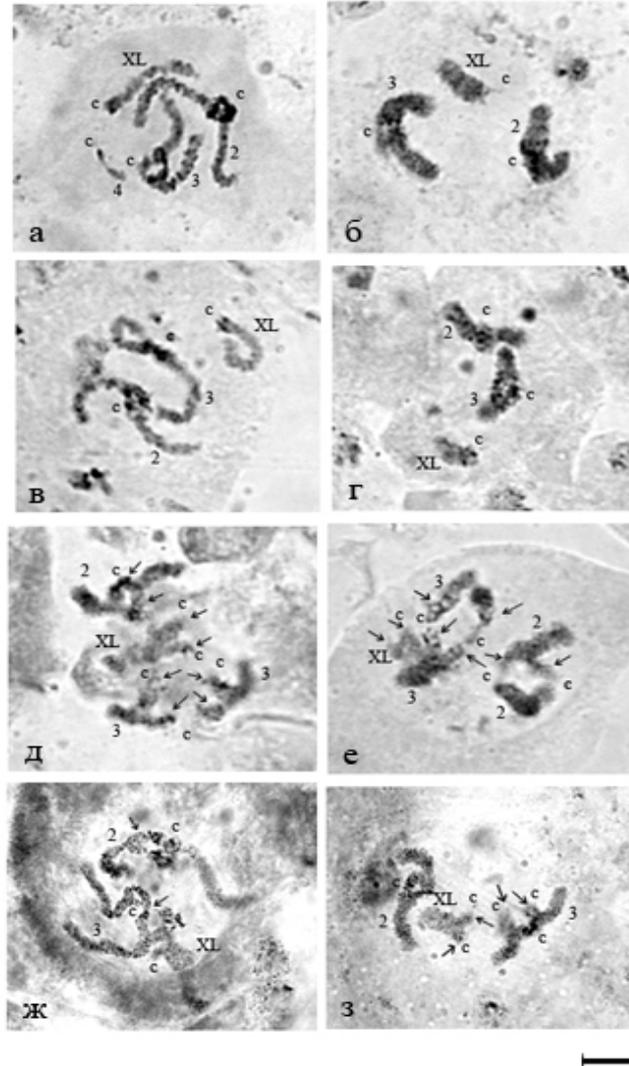


Рис. 1. Взаимное расположение хромосом в ядрах трофоцитов яичников у *D. yakuba* (а, б), *D. santomea* (в, г) и их межвидовых гибридов – ♀ *D. yakuba* × ♂ *D. santomea* (д, е), ♀ *D. santomea* × ♂ *D. yakuba* (ж, з). XL, 2, 3 – хромосомы; с – прицентромерные районы хромосом; стрелками обозначены асинапсисы гомеологичных хромосом у межвидовых гибридов (увеличение 10×100)

На ранних стадиях политемизации хромосом были едва заметны асинапсисы в прицентромерных районах, которые нами не оценивались как хромо-

сомы с нарушением синаптирования. На более поздних стадиях эндомитотического цикла нарушение синапсиса гомеологов у межвидовых гибридов является ярче. Такое асинаптирование гомеологов в гибридном ядре связано с видоспецифичным позиционированием гомеологичных хромосом в пространстве ядра. Подобные результаты были получены у гомосеквентных видов малярийных комаров *Anopheles maculipennis* и *An. subalpinus* [22], а также и у видов *D. sechellia* и *D. simulans* комплекса *D. melanogaster* [13].

Известно, что на основании данных, полученных в результате изучения структуры митотических и политенных хромосом, гена *period*, аллозимов, *D. santomea* расположили близко к *D. yakuba* в филогенетическом древе комплекса «*yakuba*». Предполагают, что *D. santomea* произошла от *D. yakuba* или эти виды имели одного общего предка. Метафазные хромосомы *D. santomea* и *D. yakuba* различаются по количеству прицентромерных гетерохроматиновых блоков X-хромосомы и хромосомы 4 [21]. Гетерохроматин играет важную роль в поддержании ориентации хромосом в пространстве ядра. Возможно, что при видообразовании с изменением количества гетерохроматина могла измениться и территориальность хромосом в пространстве ядра, т.е. произойти пространственная реорганизация хромосом в ядре (системная мутация). Могли измениться места локализаций прицентромерных районов в ядре. В связи с этим взаимное расположение хромосом в ядрах трофоцитов *D. santomea* и *D. yakuba* отличается по локализации прицентромерных районов хромосом, которая выявляется только в ядрах межвидовых гибридов. Таким образом, ориентация хромосом в ядрах трофоцитов яичников у видов *D. santomea* и *D. yakuba* видоспецифична.

Ассоциация хромосом и функционирование ядрышка в ядрах трофоцитов яичников на протяжении эндомитотического цикла

Известно, что хроматин на протяжении интерфазы динамичен в пространстве ядра и закорен с помощью ламин к ядерной мембране [6–7, 9]. При этом хромосомы занимают определенную территорию в пространстве ядра, которая сохраняется на протяжении всей интерфазы и на последующих стадиях клеточного цикла [23, 10].

У *Calliphora erythrocephala* на протяжении всего эндоцикла в полиплоидных ядрах трофоцитов яичников (от первичных ретикулярных ядер, политенных хромосом, стадии распада хромосом, до образования вторичных ретикулярных ядер) обнаружено сохранение позиционности хромосом в пространстве ядра [24]. В связи с этим мы в своих исследованиях также изучали позиционность хромосом в полиплоидных ядрах трофоцитов яичников у *D. yakuba* и *D. santomea* на различных стадиях эндоцикла (от образования тонких первичных политенных хромосом до их распада).

Был проведен сравнительный анализ позиционирования хромосом в ядрах трофоцитов в период эндомитотического цикла (S₁–S₇ стадии оогенеза; рис. 2). У 0,5–3-суточных самок были обнаружены все стадии эндомитоза, характерные для *Diptera*. Видовой особенностью являлась скорость протекания эндоцикла. Для *D. santomea* характерно более длительное прохождение эндомитотического

цикла. У 0,5-суточных самок *D. yakuba* можно было наблюдать практически все стадии эндоцикла (см. рис. 2, а–ж), а у *D. santomea* этого же возраста – только мелкие с ретикулярной структурой ядра трофоцитов (см. рис. 2, а').

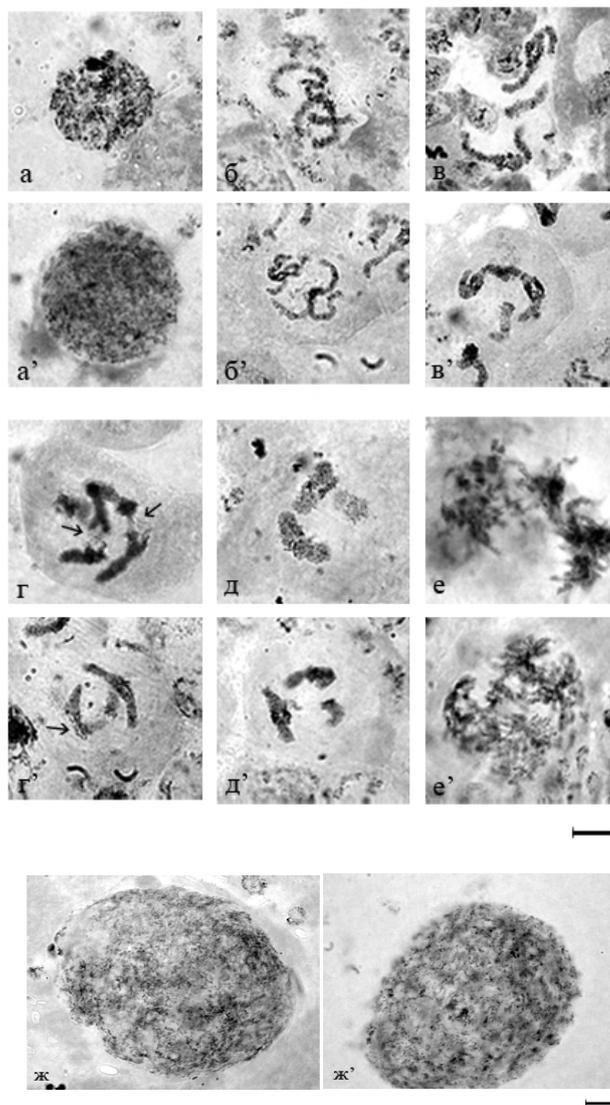


Рис. 2. Стадии эндоредупликации хроматина в ядрах трофоцитов яичников *D. yakuba* (а–е), *D. santomea* (а'–е'). Стадии эндоцикла – первичные ретикулярные ядра (а, а'), удлинённые первичные политенные хромосомы (б, б'), первичные политенные хромосомы (в, в'; г, г'), компактные политенные хромосомы (д, д'), стадия распада первичных политенных хромосом (е, е'). Стрелками обозначены районы декомпактизации прицентромерного гетерохроматина; вторичные ретикулярные ядра (ж, ж') (увеличение 10×100)

На стадии первичных политенных хромосом у *D. yakuba* и *D. santomea* были обнаружены два морфологических типа ядер, большинство которых имеют характерную для вида морфологию хромосом. Плечи хромосом 2 и 3 объединены прицентромерными гетерохроматиновыми блоками, около 10% ядер имеют хромосомы 2 и 3 с разобщением плеч в прицентромерных районах, связанных с декомпактизацией гетерохроматиновых блоков и образованием тонких фибрилл хроматина (см. рис. 2, *з*). Возможно, существует достаточно кратковременная стадия эндоцикла, в которой плечи хромосом 2 и 3 разобщаются, а при компактизации хромосом вновь объединяются с образованием гетерохроматиновых блоков (рис. 2, *д*). Поэтому ядер с такой организацией хромосом выявляется около 10%. У *D. santomea* эта стадия наблюдается реже, возможно, она проходит быстрее (см. рис. 2, *з'*), чем у *D. yakuba*, и в связи с этим не всегда заметна.

Хромосомы на протяжении эндоцикла сохраняют свою позиционность по отношению друг к другу. Такая ассоциация выявляется и на стадии, в течение которой плечи хромосом разобщаются в результате декомпактизации прицентромерных гетерохроматиновых блоков. Можно предположить, что выявленная нами стадия декомпактизации прицентромерного гетерохроматина имеет функциональную значимость, характерную для питающих клеток ооцита и, по-видимому, связана с образованием ядрышкового материала, необходимого для питания ооцита.

У *D. yakuba* с помощью Ag-окрашивания было обнаружено, что на протяжении всего эндоцикла «разрыв» плеч хромосом связан с функционированием ядрышка (рис. 3). На ранней стадии (S_2) эндоцикла прицентромерные тяжи ядрышкообразующей хромосомы XL (см. рис. 3, *а*) входят в ядрышко, а хромосомы 3 и 2 «лежат» на нем. На более поздней стадии (S_3) с образованием второго ядрышка в хромосоме 3 декомпактизируются прицентромерные гетерохроматиновые блоки в фибриллярные тяжи, входящие в ядрышко, в связи с чем плечи хромосомы разобщаются (рис. 3, *б*, *в*). На последующей стадии с увеличением и слиянием ядрышек гетерохроматиновые прицентромерные блоки хромосомы 2 также декомпактизируются и прицентромерными тяжами контактируют с ядрышком (рис. 3, *г*). На стадии компактных хромосом прицентромерные тяжи хромосом 2 и 3 компактизируются вновь, образуя плотные гетерохроматиновые блоки (рис. 3, *д*, *е*). На стадии распада первой распадается ядрышкообразующая X-хромосома (рис. 3, *ж*). В ретикулярных ядрах выявляется ядрышко, заполняющее весь объем ядра, а декомпактизованный хроматин «лежит» на ядрышке (см. рис. 3, *з*).

Таким образом, на протяжении эндоцикла наблюдается динамика гетерохроматиновых блоков, связанная с их декомпактизацией и функционированием ядрышка, причем визуально наблюдаемый «разрыв» плеч хромосом 2 и 3 непосредственно связан с образованием ядрышка. По-видимому, гетерохроматиновые блоки, содержащие р-ДНК последовательности [25], непосредственно принимают участие в образовании ядрышка.

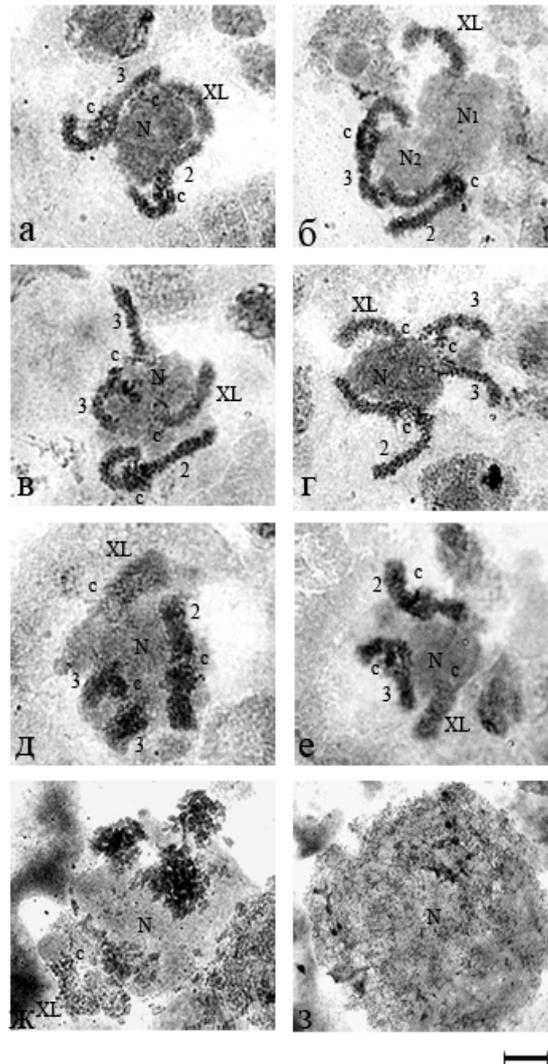


Рис. 3. Ag-окрашивание в ядрах трофобlastов яичника на выявление ядрышка на протяжении всего эндомитотического цикла у *D. yakuba* (a–з); N – ядрышко, N1, N2 – 1-е и 2-е ядрышки; XL, 2, 3 – хромосомы; c – прицентромерные районы хромосом (увеличение 10×100)

Авторы выражают искреннюю благодарность F. Lumeunier (Laboratoire Populations, Ge'ne'tique et Evolution, UPR CNRS, Gif-sur-Yvette, Франция) за предоставление линии *D. santomea*.

Литература

1. Стегний В.Н. Реорганизация структуры интерфазных ядер в онто- и филогенезе малярийных комаров // ДАН СССР. 1979. Т. 249, № 5. С. 1231–1234.
2. Глазков М.В. Ассоциация хромосом с ядерной оболочкой и упорядоченность пространственной организации генетического материала в интерфазном ядре // Цитология и генетика. 1999. Т. 33, № 2. С. 79–88.
3. Marshall W.F., Sedat J.W. Nuclear architecture. Results Probl. // Cell Differ. 1999. Т. 25. P. 283–301.
4. Sadoni N., Langer S. Nuclear organization of mammalian genomes: polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments // The Journal of Cell Biology. 1999. Vol. 146, № 6. С. 1211–1226.
5. Cremer T., Cremer C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells // Nat. Rev. Genet. 2001. Vol. 2. С. 292–301.
6. De Boni U., Mintz A.H. Curvilinear, three-dimensional motion of chromatin domains and nucleoli in neuronal interphase nuclei // Science. 1986. Vol. 234. С. 863–866.
7. Marshall W.F. et al. Interphase chromosomes undergo constrained diffusional motion in living cells // Current Biology. 1997. Vol. 7. С. 930–939.
8. Abney J.R., Cutler B., Fillbach M.L., Axelrod D.S. Chromatin dynamics in interphase nuclei and its implication for nuclear structure // J. Cell Biol. 1997. Vol. 137, № 7. С. 1459–1468.
9. Csink A.K., Henikoff S. Large-scale chromosomal movements during interphase progression in *Drosophila* // J. Cell Biol. 1998. Vol. 143, № 1. P. 13–22.
10. Croft J.A., Bringer J.M., Boyle S. et al. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus // J. Cell Biol. 1999. Vol. 145, № 6. С. 1119–1131.
11. Стегний В.Н. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция. Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та, 1993. С. 110.
12. Hochstrasser M., Sedat J.W. Three-dimensional organization of *Drosophila melanogaster* interphase nuclei. I. Tissue-specific aspects of polytene nuclear architecture // J. Cell Biol. 1987a. Vol. 104. P. 1455–1470.
13. Стегний В.Н., Вассерлауф И.Э. Видовая архитектура хромосом генеративной ткани и проблемы филогенетических отношений в подгруппе *melanogaster* рода *Drosophila* (*Sophophora*) // Генетика. 1994. Vol. 30, № 4. С. 478–483.
14. Стегний В.Н., Вассерлауф И.Э., Ананьина Т.В. Взаиморасположение первичных политеменных хромосом яичников у 12 видов группы «*virilis*» рода *Drosophila* (*Sophophora*) // Генетика. 1996. Т. 32, № 6. С. 750–754.
15. Стегний В.Н., Шарахова М.В. Системная реорганизация архитектуры политеменных хромосом в онто- и филогенезе малярийных комаров: Структурные особенности зон прикрепления хромосом к ядерной мембране // Генетика. 1991. Т. 27, № 5. С. 828–835.
16. Biemont C., Arnault C., Heizmann A. Massive changes in genomic location of P elements in an inbred line of *Drosophila melanogaster* // Naturwissenschaften. 1990. Т. 77. С. 485–488.
17. Медведева А.В., Савватеева Е.В. Влияние температуры на пространственную организацию политеменных хромосом мутантов дрозофилы с измененными функциями кальмодулина // ДАН СССР. 1991. Т. 318, № 4. С. 988–991.
18. Евгенийев М.Б., Мнджоян Е.И., Зеленцова Е.С. и др. Мобильные элементы и видообразование // Молекулярная биология. 1998. Т. 32, № 1. С. 184–192.
19. Жимулев И.Ф. Политеменные хромосомы: морфология и структура. Новосибирск: Наука, 1992. С. 480.
20. Стегний В.Н., Вассерлауф И.Э., Ананьина Т.В. Идентификация, взаиморасположение и развитие первичных политеменных хромосом в ядрах трофоцитов у *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae) // Генетика. 1999. Т. 35, № 7. С. 912–918.
21. Lachaise D., Harry M., Solignac M. et al. Evolutionary novelties in islands: *Drosophila santomea*, a new *melanogaster* sister species from Sao Tome // Evolution. 2000. Vol. 267. P. 1487–1495.

-
22. Стегний В.Н. Популяционная генетика и эволюция малярийных комаров. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1991. 137 с.
23. Zink D., Cremer T. Chromosome dynamics in nuclei of living cells // *Curr. Biol.* 1998. Vol. 8. P. 321–324.
24. Ананьина Т.В., Ведерников А.Е., Вассерлауф И.Э. и др. Визуализация хромосомных территорий в интерфазных ядрах трофобластов яичников *Calliphora erythrocephala* Mg (Diptera: Calliphoridae) // *Генетика*. 2005. Т. 41, № 10. С. 1106–1112.
25. Zurita F., Jimenez R., Diaz de la Geuardia R., Burgos M. The relative rDNA content of a NOR determines its level of expression and its probability of becoming active. A sequential silver staining and in-situ hybridization study // *Chromosome Research*. 1999. Vol. 7. P. 563–570.