



*На правах рукописи*

**Спангенберг Виктор Евгеньевич**

**Динамика структурной организации хромосом  
в профазе I мейоза у мыши и человека**

03.02.07 – генетика

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в лаборатории цитогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва.

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
**Коломиец Оксана Леонидовна**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Родионов Александр Викентьевич**  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, заведующий лабораторией биосистематики и цитологии.

доктор биологических наук, профессор  
**Поляков Владимир Юрьевич**  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, Заведующий лабораторией ультраструктуры клеточного ядра.

**Ведущее учреждение:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук.

Защита диссертации состоится «24» декабря 2013г. в 15.30 часов на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН по адресу: 119991, ГСП-1, г. Москва, ул. Губкина, дом 3. Факс: (499) 132-89-62, e-mail: [aspirantura@vigg.ru](mailto:aspirantura@vigg.ru), тел.: (499)135-14-31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Автореферат разослан «22» ноября 2013г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

**Т.А. Синельщикова**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Профаза I – ключевая и самая длительная стадия мейоза, во время которой происходит кроссинговер и закладываются условия для редукции числа хромосом. Структурная организация хромосом во время профазы I мейоза имеет решающее значение для реализации этих процессов. Молекулярная и ультраструктурная организация, а также поведение хромосом во время мейоза существенно отличаются от структуры и поведения хромосом в профазе соматического митоза.

В профазе I в составе хромосом у млекопитающих появляются новые белки-когезины – REC8, SMC1 $\beta$ , STAG3. Когезиновый комплекс, скрепляющий сестринские хроматиды, служит каркасом, к которому присоединяются новообразованные (и специфичные для профазы I мейоза) белки SYCP2 и SYCP3 млекопитающих. Эти белки формируют специфичные для мейоза белковые оси хромосом. Наконец, во время стадий зиготены и пахитены из этих и других белков формируются синаптонемные комплексы (СК) – белковые структуры, которые попарно соединяют гомологичные хромосомы и служат для выравнивания хромосом и обеспечения кроссинговера. Во время стадии диплотены СК, выполнив свою функцию, разрушаются. Параллельно с этими событиями на протяжении стадий от лептотены до конца диплотены хроматин оказывается организованным в виде латеральных петель, крепящихся к осевым элементам хромосом, а затем – к латеральным элементам СК. Во время профазы I наблюдается транскрипция хроматина, которая идет на латеральных петлях. Такая петельно-осевая структура хромосом наиболее отчетливо выражена во время стадии пахитены, однако сами латеральные петли морфологически лучше всего выражены во время стадии диплотены.

На фоне этой отчетливой картины организации и функционирования хромосом в профазе I мейоза существуют важные нерешенные вопросы.

- 1) Нет отчетливых представлений о морфологии и размерах латеральных петель хроматина и их предполагаемой изменчивости на протяжении профазы I мейоза и о связи этой изменчивости с изменениями транскрипции в мейозе.
- 2) До сих пор не выяснено, за счёт каких связей – ДНК-белковых или белок-белковых, – латеральные петли хроматина присоединяются к латеральным элементам СК.

3) Не сформированы представления о связи «горячих» и «холодных» сайтов рекомбинации с петельно-осевой структурой бивалентов хромосом в профазе I мейоза.

Настоящая работа посвящена попытке выяснения этих вопросов.

Методическим основанием для проведения исследования служат успехи в развитии методов флуоресцентной микроскопии: флуоресцентной гибридизации нуклеиновых кислот *in situ* (FISH) и флуоресцентной иммуноцитохимии белков. На протяжении первого десятилетия XXI века эти методы стали основой современных микроскопических исследований хромосом в целях цитогенетики и клеточной биологии.

Существует естественный интерес к исследованиям мейоза у модельных млекопитающих и у человека. Современная репродуктивная медицина уже использует знания, накопленные в ходе фундаментальных исследований мейоза. Поэтому часть данной диссертации выполнена в союзе с медицинскими работниками.

Актуальность настоящей работы состоит в том, что не изученные до сих пор вопросы структуры и поведения хромосом в ключевой стадии мейоза - профазе I - подвергнуты исследованию с помощью современных методов молекулярной цитогенетики и биоинформатики. Всё это вместе позволяет сделать новый шаг к пониманию организации хромосом в профазе I мейоза.

**Цель работы и задачи исследования.** Основная цель настоящего исследования – выяснение закономерностей изменения структурной организации петель хроматина в ходе длительной профазы I мейоза, закономерностей распределения горячих (ГТР) и холодных (ХТР) точек рекомбинации у человека и изучение возможности участия некоторых повторяющихся последовательностей ДНК в формировании структуры мейотических хромосом человека и мыши.

#### **Задачи исследования:**

1. С помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с ДНК-зондами разной длины к уникальным последовательностям хромосомной ДНК исследовать изменение структурной организации петель хроматина в мейотических хромосомах человека на разных стадиях профазы I мейоза.

2. С помощью методов биоинформатики исследовать закономерности распределения ГТР и ХТР в геноме человека.

3. Методом ДНК-FISH на препаратах сперматоцитов I порядка изучить закономерности распределения некоторых повторяющихся

последовательностей ДНК – минорного ДНК-сателлита мыши, *Alu*/(B1-, B2-), L1-, (GT)<sub>n</sub>-повторов, – в структуре мейотических хромосом человека и мыши и их возможное участие в прикреплении латеральных петель хроматина к СК.

**Научная новизна работы.** Впервые получены изображения открытых (развернутых) латеральных петель хроматина в профазе I мужского мейоза у человека. Предложена новая модель взаимодействия петель хроматина на стадии поздней лептотены – зиготены.

Обнаружено совпадение в декомпактизации петель хроматина с известной транскрипционной активностью, которую хромосомы проявляют во время профазы I мейоза. Предложена модель организации мейотических хромосом, в которой сайты ХТР приняты за основания латеральных петель хроматина.

Впервые установлена связь между расположением ГТР и длиной петель хроматина в мейотических хромосомах человека.

**Практическая значимость работы.** Методы исследования тонких микроскопических структур хроматина, использованные в работе, можно применять при картировании генов в структуре мейотической хромосомы. В то время как метод FISH применяется в медицине в ограниченном формате – для тестов, проводимых на метафазных митотических хромосомах, полученные в диссертационной работе результаты могут быть использованы для разработки цитогенетических диагностических систем более высокого разрешения. При этом важно, что при бесплодии мутации нередко возникают *de novo* в ходе формирования гонад, распространены только в сперматогенных клетках яичка и не могут быть выявлены при исследовании соматических клеток. Такие случаи мужского бесплодия с мутацией только в клетках сперматогенного ряда многократно описаны в литературе (Tiepolo and Zuffardi, 1973; Templado et al., 1980; Rosenmann, 1987; Jagiello and Fang, 1982; Курило, 1989; Kurilo et al., 1994). Таким образом, наш метод может быть адаптирован и использован для безоперационного обследования пациентов при анализе незрелых клеток эякулята у пациентов с азооспермией - арестом мейоза на стадии сперматоцитов I порядка.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Методом FISH с зондами к уникальным повторам разной длины (90 т.п.н., 160 т.п.н. и 480 т.п.н.) впервые установлено изменение структурной организации петель хроматина на разных стадиях профазы I мейоза в сперматоцитах человека.

2. Выявлены особенности распределения нескольких типов повторяющихся последовательностей ДНК в структуре мейотических хромосом у мыши и человека.
3. Предложена модель организации мейотических хромосом, в которой сайты холодных точек рекомбинации приняты за основания латеральных петель хроматина.
4. Впервые установлена связь между расположением горячих точек рекомбинации и длиной петель хроматина в мейозе у человека.

**Апробация результатов работы.** Результаты проведенных исследований были представлены на Международных конференциях «EMBO Meiosis 2013» (Германия, 2013г), на II Международном конгрессе по мобильным элементам (Франция, 2012г), международных конференциях "Хромосома–2009" (Новосибирск, 2009г) и «Хромосома 2012» (Новосибирск, 2012г), съезде общества клеточных биологов (Санкт-Петербург, 2012г), конференции «EMBO Meiosis 2011» (Италия, 2011г), международной конференции «Проблемы популяционной и общей генетики», посвященной 75-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова (Москва, 2011г), 4й международной конференции молодых ученых «IMBG Molecular Biology: Advances and perspectives» (Киев, 2011г).

**Декларация личного участия автора.** Автор самостоятельно готовил цитологические препараты СК человека (из биоптатов яичка, полученных из клиники) и мыши; проводил FISH и иммуноокрашивание белков СК, анализ препаратов на флуоресцентном микроскопе и обработку полученных изображений. Проводил анализ генома мыши и человека методами биоинформатики. Суммарное личное участие автора составило 85%.

**Публикации.** По результатам диссертации опубликовано 17 работ, из них 4 статьи в реферируемых журналах, рекомендованных ВАК, 2 статьи в сборниках и 11 тезисов докладов.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы, список сокращений. Работа изложена на 100 страницах машинописного текста, включает 3 таблицы и 43 рисунка. Список цитируемых литературных источников включает 110 наименований, в том числе 75 на английском языке.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы

**1. Объектом исследования служили:** **А.** Сперматоциты I порядка человека, полученные с информированного согласия пациентов, проходивших процедуру микродиссекции ТЕСЕ в ФГБУ ЭНЦ Минздрава РФ с целью получения зрелых сперматозоидов для ЭКО. Нами использованы семенные каналцы, оставшиеся после изъятия сперматозоидов; **Б.** Вторым объектом исследования были сперматоциты I половозрелых мышей *Mus musculus* L. линии C57BL; **В.** Препараты метафазных хромосом, полученные из клеток культуры эмбриональных фибробластов мыши (MEF C57BL/CBA); **Г.** Препараты метафазных хромосом клеток культуры кожи человека, полученные с информированного согласия доноров. Препараты метафазных хромосом человека и мыши любезно предоставлены для исследования сотрудниками лаборатории генетических основ клеточных технологий ИОГен.

**2. Получение тотальных препаратов распластанных СК человека и мыши.** Семенные каналцы гомогенизировали в среде ИГЛА. Полученную суспензию клеток отмывали с помощью центрифугирования. Осадок ресуспендировали. Наносили капли 0,2 М сахарозы на поверхность тефлоновой пластины. На каплю сахарозы наслаивали каплю суспензии клеток яичка. После распластывания ядер, переносили их на стекло, покрытое полилизинном. Препараты фиксировали охлажденным 4% раствором параформальдегида, приготовленным на 0,1% сахарозе (pH 8,4), промывали препараты 0,4% раствором Photoflo (pH 8,4). Препараты хранили в холодильнике при t -20°C.

**3. Иммуноокрашивание СК** проводили с помощью первичных кроличьих антител к основному белку СК – SCP3 (Abcam, USA) в разведении 1:100. и вторичных козьих антител против IgG кролика, конъюгированных с FITC (Jackson, USA) в разведении 1:500. Антитела разводили в буфере (PBS, 3% BSA, 0,05% TritonX-100) с 0,05% азида натрия. Хроматин окрашивали красителем DAPI.

**4. Метод флуоресцентной гибридизация *in situ* (FISH).** В качестве ДНК-зондов к хромосоме 17 человека использованы две локус-специфичные микроделеционные пробы (XL RAI1 – тест на синдром Miller-Dieker и PFAH1B1 – тест на синдром Smith-Magenis, <http://www.metasystems-international.com>). Для хромосомы 1 были использованы ВАС-клоны (RP11-133F5, RP11-911F20, RP11-46A12, геномная библиотека RPCI-11 human ВАС

library), хромосомы 1 человека, меченные флуорохромами FITC и TAMRA (Empire Genomics, США). В качестве FISH ДНК-зондов к семействам повторяющихся последовательностей использовали искусственно синтезированные олигонуклеотиды (44 нуклеотида), меченные флуорохромом TAMRA (Синтол, Россия).

Препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axioimager D1 (Carl Zeiss, Германия) с наборами фильтров для DAPI (Zeiss Filter set 1), для FITC (Zeiss Filter set 38HE) и для Texas Red (Zeiss Filter set 43HE), оснащенного камерой AxioCam HRm (программное обеспечение Axiovision rel. 4.6, Германия). Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы «Statistica for Windows 9.0» и графопостроителя «Microsoft Office Excel 2007».

## Результаты и обсуждение

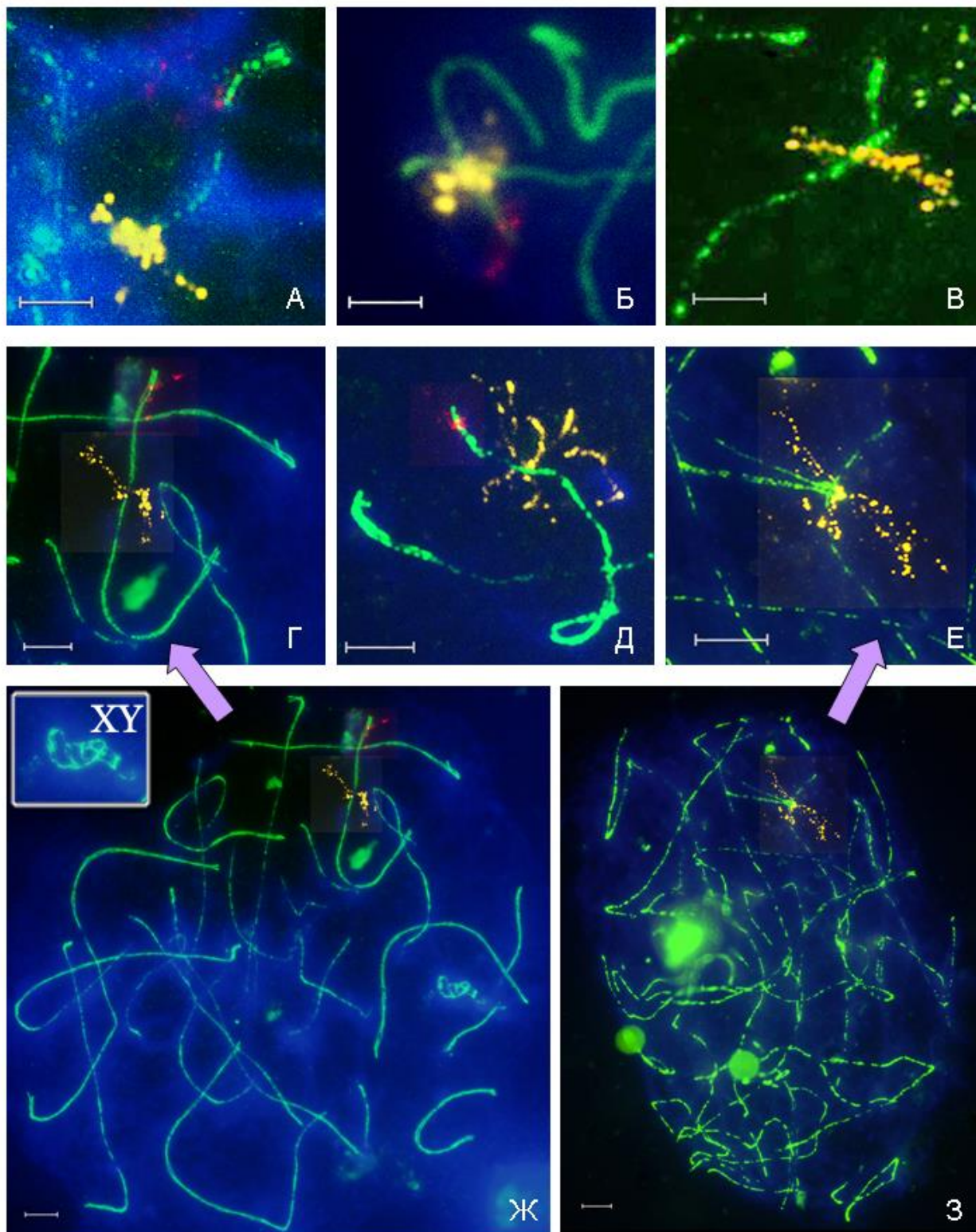
### 1. Особенности морфологии петель хроматина на разных стадиях профазы I мейоза

**FISH на распластанных препаратах сперматоцитов человека с зондами длиной 160 т.п.н. и 90 т.п.н. на хромосоме 17.** В первой серии опытов идентификацию уникальной последовательности ДНК в препаратах распластных ядер сперматоцитов человека проводили с помощью ДНК-зондов к уникальным последовательностям ДНК длиной 160 т.п.н. и 90 т.п.н. В результате проведенного анализа получено представление о динамике морфологических изменений уникальных фрагмента хроматина на всех стадиях профазы I мейоза (Рисунок 1).

В зависимости от стадии профазы I мейоза структура фрагмента 160 т.п.н. заметно менялась. Прителомерный фрагмент 90 т.п.н. менялся незначительно. Во время зиготены – ранней пахитены меченный интерстициальный фрагмент хроматина имел вид плотных глобул. Эти глобулы прилегали к СК (Рисунок 1 А, Б).

В течение ранней пахитены эти меченые фрагменты линейно вытягивались и часто пересекали СК (Рисунок 1 В). В некоторых ядрах на этой же стадии такие нитевидные структуры лежали по обе стороны от СК, не пересекая его (Рисунок 1 Г). На стадиях средней пахитены – поздней пахитены хроматин расправлялся и сильно вытягивался (Рисунок 1 Г, Ж). На стадии диплотены продолжалось выпетливание хроматина и разворачивание структуры петель.





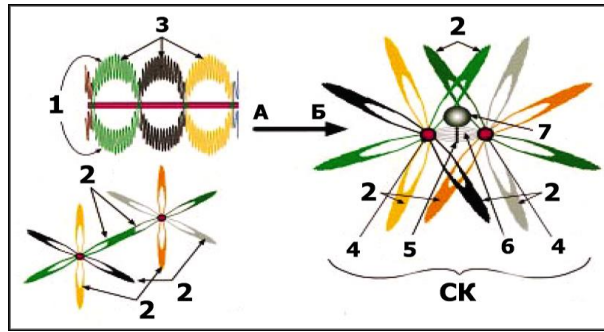
**Рисунок 1.** Динамика структурной организации фрагментов петель хроматина. Ядра сперматоцитов человека распластаны на разных стадиях профазы I мейоза. FISH-анализ с ДНК-зондами к уникальным фрагментам хромосомы 17 длиной 160 т.п.н. и 90 т.п.н. Окрашивание DAPI (синий), СК (зеленый); FISH с ДНК-зондом 160 т.п.н. (желтый), с ДНК-зондом 90 т.п.н. (красный). XY-половой бивалент. а – поздняя зиготена; б — ранняя пахитена; в — средняя пахитена; г — поздняя пахитена; д — средняя диплотена; е — поздняя диплотена; ж — тотальный препарат СК, ранняя диплотена, врезка – половой бивалент; з — тотальный препарат СК, поздняя диплотена. Подробное описание динамики структуры петель хроматина в ядрах сперматоцитов см. в тексте (стр. 7). Bar – 5 мкм.

Они постепенно приобретали вид тонких нитей с мелкими глобулами (Рисунок 1 Д, Е, З). В диплотене обнаружены четыре фрагмента петель хроматина, по два с каждой стороны СК. Наиболее вероятно, что каждый фрагмент является частью одной из четырех хроматид.

*Модель взаимодействия петель хроматина в ранней профазе I мейоза.* В работе впервые описана динамика изменения структуры двух фрагментов латеральных петель хроматина в профазе I мужского мейоза у человека. Наше наблюдение латеральных петель хроматина хорошо соответствует моделям, которые Небель и Кулон предложили в результате 3D-реконструкции ультратонких срезов пахитенных сперматоцитов голубя (Nebel & Coulon, 1962). Эти авторы во всех клетках на стадиях зиготены и ранней пахитены наблюдали линейные (нитевидные) элементы, простирающиеся в противоположные стороны от боковых элементов СК. Логичным представляется предположение о том, что здесь тесно попарно соединены петли сестринских хроматид. Позже другие исследователи, применившие FISH, наблюдали линейные структуры хроматина, пересекающие СК. Тем не менее эти авторы предполагали только межсестринский вариант взаимодействия петель хроматина (Heng et al., 1994; Froenicke et al., 2002; Pigozzi, 2007).

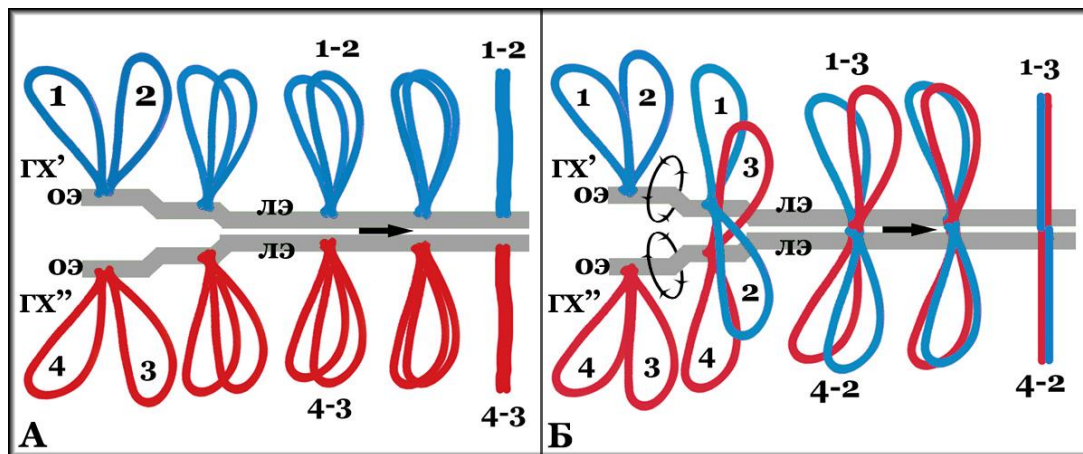
Однако, когда такая нитевидная структура хроматина непрерывна и пересекает СК, наиболее логичным представляется линейное взаимодействие петель гомологичных, а не сестринских хроматид.

Действительно, по устоявшимся представлениям, СК разделяет гомологи и таким образом разводит петли хроматина двух гомологов по разные стороны от СК. Однако тщательный анализ деталей множества фотографий, полученных при исследовании препаратов давленных сперматоцитов, окрашенных с помощью DAPI или йодистого пропидия, выявил отчетливое расположение хроматина вокруг СК. Перечисленные наблюдения подтверждают наше предположение о возможном тесном контакте петель гомологичных хромосом в раннем мейозе. Такому взаимодействию гомологов, по-видимому, способствует и спиральная структура латерального элемента СК, впервые описанная в материнских клетках пыльцы ржи (Fedotova et al., 1989) и в ядрах сперматоцитов мыши (Коломиец и др., 2001).



**Рисунок 2.** Гипотетическая схема взаимодействия несестринских петель хроматина в профазе I мейоза на стадиях лептотены (А) и зиготены/пахитены (Б). 1 – сестринские петли хроматина; 2 – несестринские (гомологичные) петли хроматина; 3 – конденсированные петли ДНК; 4 – латеральные элементы СК; 5 – центральный элемент СК, 6 – поперечные элементы СК; 7 – рекомбинационный узелок (по Stack & Anderson, 2001).

На эту особенность структуры латеральных элементов СК, обеспечивающую возможность сближения петель не сестринских, а именно гомологичных хромосом, впервые обратили внимание американские исследователи Стак и Андерсон (Stack & Anderson, 2001), предложившие модель взаимодействия петель гомологичных хромосом. Однако эти авторы предположили возможность лишь локального, точечного взаимодействия петель несестринских хроматид в связи с формированием рекомбинационных узелков (Рисунок 2).



**Рисунок 3.** Модель взаимодействия сестринских и несестринских петель хроматина в профазе I мейоза. 1, 2 - сестринские петли гомолога ГХ'; 3, 4 – сестринские петли гомолога ГХ''; ОЭ – осевые элементы гомологов ГХ' и ГХ''; ЛЭ – латеральные элементы СК. Стрелками показано возможное движение осевых элементов хромосом.

**А.** 1-2 и 4-3 – продольно сближены сестринские петли хроматина; плотно сближенные петли формируют две линейно вытянутые структуры, расположенные по обе стороны от СК.

**В.** 1-3 и 4-2 – компактная структура образована продольно сближенными несестринскими петлями хроматина. В этом случае она пересекает СК.

Нами предложена собственная модель взаимодействия петель несестринских хроматид на ранних стадиях профазы I мейоза, возможно, связанного с репарацией двунитевых разрывов ДНК (Рисунок 3). Следует заметить, что в обеспечении контактов несестринских петель хроматина может играть роль и т.н. «твистинг» - взаимное перекручивание латеральных элементов СК.

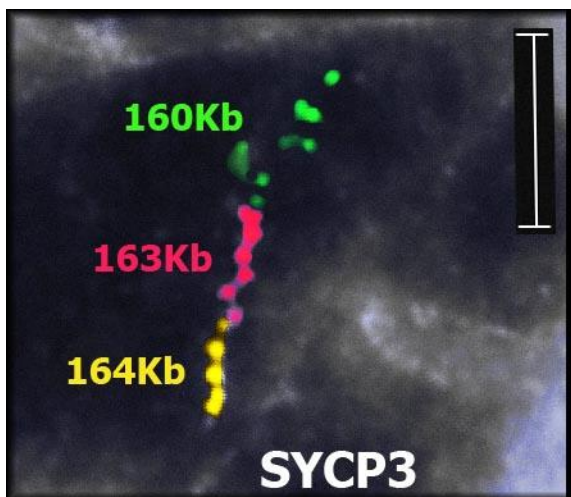
Предложенная нами модель дополняет модель Page & Hawley (Page & Hawley, 2001), акцентируя внимание на взаимодействии как сестринских (Рисунок 3 А), так и несестринских (Рисунок 3 Б) петель хроматина в ранней профазе I мейоза.

Постепенная декомпактизация и разворачивание петель хроматина происходят на стадиях средней пахитены - ранней диплотены. По времени это явление совпадает со временем активации транскрипции нескольких сотен генов в мейозе у самцов млекопитающих (Waldman Ben-Asher et al., 2010). Эта активация обусловлена необходимостью обеспечения постмейотической дифференцировки половых клеток.

**FISH на распластанных препаратах сперматоцитов человека с протяженным зондом длиной 480 т.п.н. к уникальному участку ДНК хромосомы 1.** Руководствуясь предыдущими результатами гибридизации с зондом длиной 160 т.п.н. (RAI1-зонд, хромосома 17), мы поставили задачу изучить морфологию более длинного участка ДНК и его расположение относительно синаптонемного комплекса на препаратах распластанных ядер сперматоцитов человека.

Для FISH был получен ДНК-зонд – фрагмент ДНК длиной 480 т.п.н. (487 992 п.н.) из района хромосомы 1 (chr1: 50071013-50559005) человека. Этот фрагмент хромосомы был выбран как хорошо изученный, удаленный от теломеры, содержащий участки уникальных генов *AGBL4* (ATP/GTP binding protein-like 4) и *ELAVL4* (embryonic lethal, abnormal vision, *Drosophila* – like 4 Nu antigen D). Для надежности интерпретации результатов *in situ*-гибридизации, в качестве ДНК-зондов для FISH мы использовали не одну протяженную одноцветную пробу, а три последовательно расположенных клона (фрагмента) из исследуемого участка хромосомы 1, меченных флуоресцентными красителями разных цветов. Длина клонов составляла 164 566 н.п. (желтый), 163 496 н.п. (красный) и 159 923 п.н. (зеленый), промежуток между желтым и красным – 6 пар нуклеотидов, между красным и зеленым – промежутка не было.





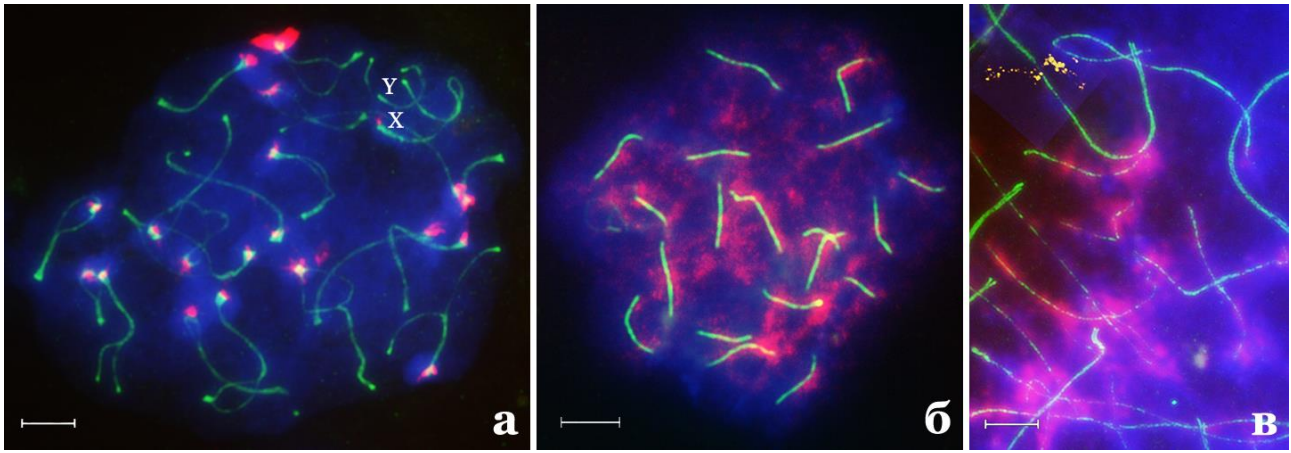
**Рисунок 4.** Фрагмент петли хроматина в распластанном на стадии пахитены ядре сперматоцита человека. Использован трехцветный FISH-зонд длиной 487 991 п.н. (желтый, красный, зеленый). Три меченых участка петли хроматина расположены тандемно. Хорошо видна тонкогранулярная структура хроматина. СК иммуноокрашены (белые линии), но не выделены цветом для четкого представления меченого участка хроматина. Bar = 5 мкм.

С помощью FISH продемонстрировано тандемное расположение меченых участков хроматина в локусе хромосомы 1 общей длиной 487 991 п.н. (Рисунок 4). Хроматин состоял из мелких глобул. Суммарная длина трех фрагментов хроматина составила 9.5мкм. Таким образом, мы подтвердили, что отдельные петли хроматина на стадии диплотены могут содержать более 480 т.п.н. в виде суперскрученной нити.

## **2. FISH с зондами к повторяющимся последовательностям на распластных препаратах сперматоцитов человека и мыши**

С целью проверки модели организации синаптонемного комплекса, предложенной ранее (Дадашев и др., 2005), нами было исследовано возможное участие некоторых семейств повторяющихся последовательностей ДНК в организации петель хроматина на стадии пахитены в ядрах сперматоцитов мыши и человека.

С этой целью методом FISH было проведено исследование распределения диспергированных повторяющихся последовательностей *Alu* (B1), B2, L1, (GT)<sub>22</sub> в пахитенных ядрах человека и мыши, а также минорного ДНК-сателлита мыши. Все зонды были конъюгированы с флуорохромом TAMRA. СК тех же ядер, на которых методом FISH проводили идентификацию распределения перечисленных последовательностей ДНК, иммуноокрашивали антителами к белку SYCP3. Хроматин окрашивали красителем DAPI. Расположение гибридизационного сигнала относительно оси мейотических бивалентов хромосом оказалось различным для разных последовательностей.



**Рисунок 5.** FISH на препаратах распластанных сперматоцитов мыши (а, б) и человека (в). Хроматин окрашен DAPI (синий), СК – антителами к SYCP3 (зеленый), гибридизация с ДНК-зондами показана красным. а – зонд к минорному ДНК-сателлиту мыши. Сигнал отсутствует только на центромере Y-хромосомы; б – зонд к B1-повторам мыши; в – зонд к *Alu*-повторам человека, фрагмент тотального препарата, желтый сигнал – фрагмент петли хроматина длиной 160 т.п.н. на хромосоме 17. Bar = 5 мкм.

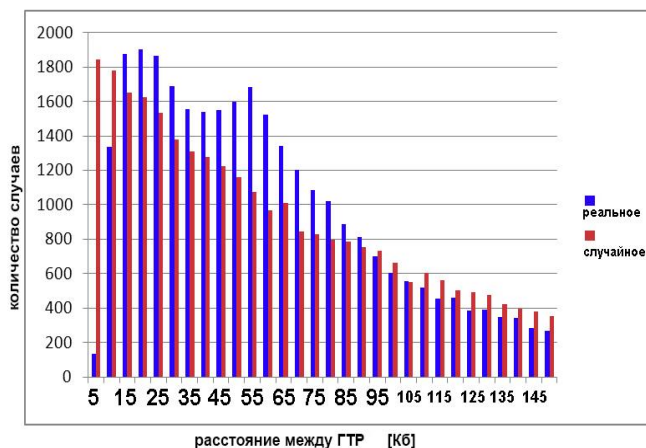
Зонд к минорному сателлиту мыши, tandemно расположенному в прицентромерных районах хромосом, выявил четкие гибридизационные сигналы, локализованные исключительно в прицентромерном гетерохроматине аутосомных бивалентов и X-хромосомы мыши: по одному сигналу для каждой хроматиды, за исключением Y-хромосомы. Следует подчеркнуть, что у Y-хромосомы прицентромерный участок не имеет пары и никогда не вступает в синапсис. Сигналы минорного ДНК-сателлита были ассоциированы с зоной латеральных элементов СК (Рисунок 5 а). Таким образом, в области центромеры метод FISH выявляет тесный контакт сателлитной ДНК с СК.

ДНК-зонд к повтору  $(GT)_n$  выявил равномерное распределение сигнала по хроматину у мыши и человека. ДНК-зонды к повторам *Alu* человека (Рисунок 5 в) и B1 (Рисунок 5 б) и B2 мыши показали сложное для интерпретации распределение их сигналов по хроматину. Наблюдалась частичная ассоциация этих сигналов с зонами осей СК. ДНК-зонд к L1-повторам человека показал сходное с *Alu* распределение, ДНК-зонд к L1-повторам мыши показал сложное распределение по хроматину, без ассоциации его с зонами СК.

Таким образом, на основе наших результатов нельзя утверждать, что повторы B1 и B2 у мыши и *Alu*-повторы у человека играют роль «якорных» последовательностей хроматина на СК, но можно утверждать, что их распределение частично ассоциировано с хроматином, прилегающим СК.

### 3. Анализ расположения горячих (ГТР) и холодных (ХТР) точек рекомбинации в геноме человека

Для анализа линейного распределения событий мейотической рекомбинации в геноме человека нами были использованы данные базы проекта «International HarMap Project». Проведен компьютерный анализ расстояний между горячими точками рекомбинации в геноме человека (Рисунок 6).



**Рисунок 6.** Гистограмма длин интервалов между ГТР (Кб) в геноме человека. Столбики синего цвета – интервалы из базы «HarMap Project», красного цвета – интервалы между ГТР при их случайном расположении в геноме человека. Вероятность того, что преимущественные расстояния между ГТР в диапазоне интервалов 35 Кб – 85 Кб являются случайными  $p=0,0000$ .

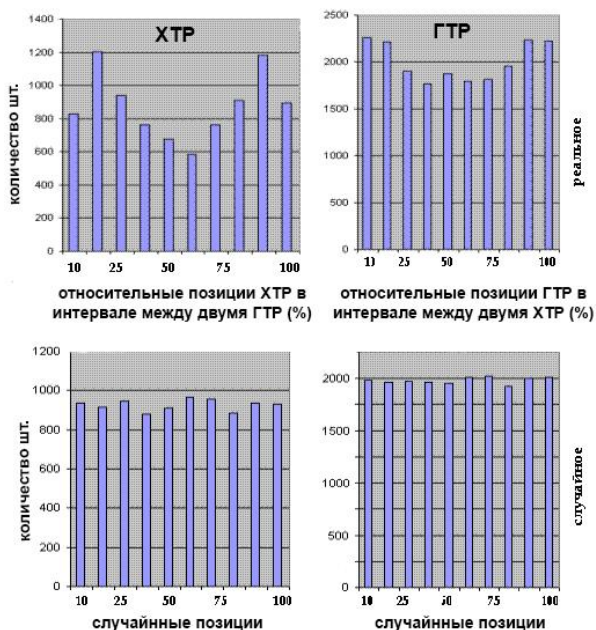
На рисунке 6 представлена гистограмма длин интервалов между ГТР в геноме человека (столбики синего цвета) и в качестве контроля - гистограмма интервалов, если бы ГТР были расположены в геноме случайно (столбики красного цвета). Как следует из полученных данных, ГТР имеют неслучайное распределение по геному; обнаружено два наиболее часто встречающихся расстояния между ГТР – 15 и 55 т.п.н. и отклонение от симулирующих данных для коротких интервалов.

Для изучения взаиморасположения ГТР и ХТР в геноме человека строили гистограммы интервалов между ними (гистограммы представлены в тексте диссертации). Выявлено превышение частоты встречаемости интервалов ГТР-ХТР над случайным распределением для интервалов 20 т.п.н. - 50 т.п.н., а для интервалов более 90 т.п.н. – снижение частоты встречаемости ниже случайного распределения. Методом статистической модели показана малая вероятность обнаружения ГТР на расстояниях менее 10 т.п.н. в окрестности ХТР. Эти результаты могут свидетельствовать о наличии предпочтительного расстояния между ГТР и ХТР в геноме человека.

**Анализ расположения ГТР и ХТР вдоль интервала между ближайшими ХТР и ГТР соответственно.** Для анализа взаимного линейного расположения ГТР между соседними ХТР, и ХТР между соседними ГТР, было исследовано



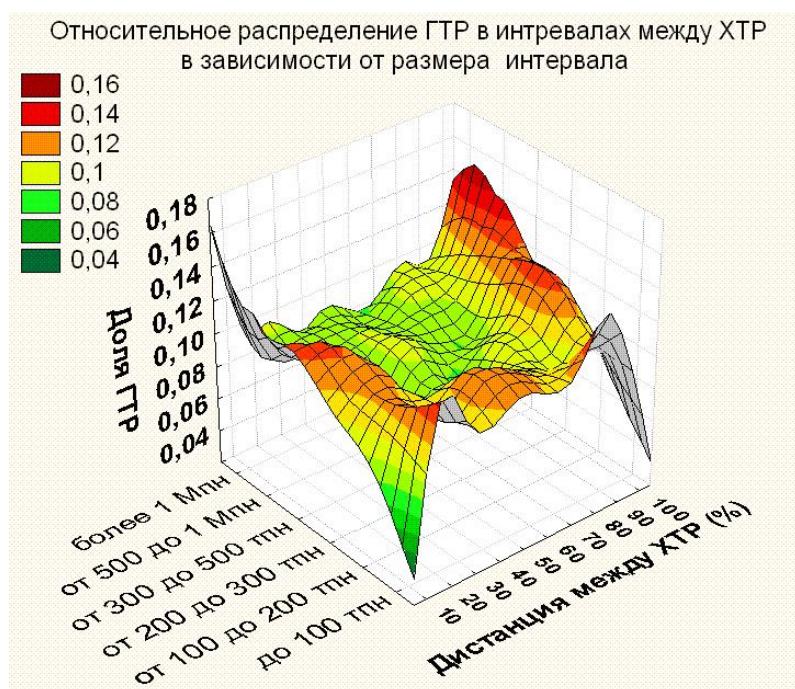
распределение этих точек вдоль дистанции соответствующего интервала. Для возможности суммирования данных по интервалам разного размера использованы относительные расстояния (%).



**Рисунок 7.** Гистограмма относительного распределения ХТР и ГТР внутри интервалов ГТР-ГТР и ХТР-ХТР соответственно, сравнение со случайным распределением ХТР и ГТР для этих рассмотрений.

Как видно из гистограммы на Рисунке 7, количество ГТР между ХТР и ХТР между ГТР увеличивается в направлении флангов выбранных интервалов и минимально в центральной части интервала. При этом симулирующие данные дают равномерные распределения по дистанциям интервалов.

Для того чтобы получить более полную картину распределения ГТР и ХТР, был построен трехмерный график, отражающий и зависимость указанного выше распределения ГТР от размера интервала между ХТР (Рисунок 8).



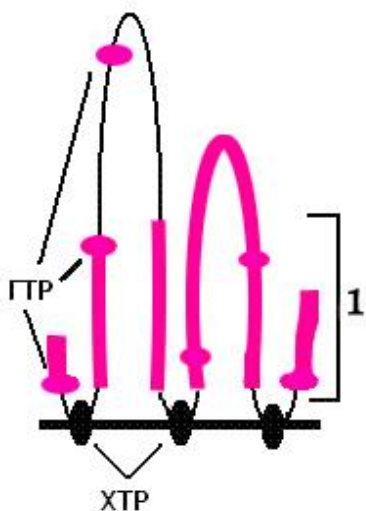
**Рисунок 8.** График зависимости доли ГТР от размера интервала между ХТР и относительного расстояния между ХТР.



Трехмерный график на рисунке 8 отражает закономерности распределения ГТР для различных интервалов между ХТР. Видно сложное распределение плотности ГТР: наличие двух вершин для относительно небольших интервалов, их снижение - для больших интервалов между ХТР, а также тяготение горячих точек рекомбинации к холодным по мере увеличения интервала между ХТР.

Таким образом, на основании наших данных и модели Клекнер и Зиклер (Kleckner & Zickler, 1999), предоставляется возможность интерпретации результатов исследования в терминах петельно-осевой модели строения хромосомы в мейозе. За основу предлагаемой модели приняты следующие положения:

- ХТР – приняты за участки прикрепления петель хроматина к СК;
- ГТР – предпочтительные сайты мейотической рекомбинации в петлях хроматина;
- ГТР, согласно нашей модели, могут располагаться случайным образом по геному, исключая относительно небольшие районы (предпочтительные участки оснований петель хроматина или т.н. межпетлевые домены);
- Существует зона преимущественного формирования ГТР. Эта зона отстоит от ХТР на 10 т.п.н.



**Рисунок 9.** Модель взаиморасположения ХТР и ГТР в петлях хроматина в мейотической хромосоме человека. Обозначена предполагаемая зона преимущественного формирования ГТР (1).

Резюмируя полученные данные о распределении ГТР и ХТР в геноме человека и данные о размере петель хроматина, нами предложена модель взаиморасположения ГТР и ХТР в петлях хроматина мейотической хромосомы человека (Рисунок 9). Вместе с тем, модель распределения ГТР в петлях хроматина дрожжей предполагает максимум формирования ГТР в вершинах петель (Blat et al., 2002). В нашей модели зона преимущественного формирования ГТР у человека предполагается вблизи оснований петель. Мы предполагаем, что различия в распределении ГТР в петлях хроматина у человека и дрожжей определяются различием в длине петель хроматина. У человека, в среднем, петли в десять раз длиннее, чем у дрожжей (Kleckner, 2006). Однако в целом мейотические события развиваются у дрожжей и человека по общему сценарию.

## ВЫВОДЫ

1. Методом ДНК-FISH с зондами к уникальным последовательностям ДНК разной длины впервые описано изменение структурной организации петель хроматина на разных стадиях профазы I мейоза в сперматоцитах человека.
2. Получены аргументы в пользу представления об очевидном попарном тесном взаимодействии петель хроматина в ранней профазе I мейоза. Предложена модель взаимодействия сестринских и несестринских (гомологичных) петель хроматина в профазе I мейоза.
3. Гибридизация с FISH-зондами к семействам повторяющихся последовательностей нуклеотидов (*Alu*, L1, (GT)<sub>n</sub> – для человека; B1, B2, L1, (GT)<sub>n</sub>, минорный ДНК-сателлит – для мыши) не позволила выявить специфических последовательностей нуклеотидов, прикрепляющих ДНК к синаптонемным комплексам.
4. На основании сравнительного анализа *in silico* предложена модель взаиморасположения горячих точек рекомбинации (ГТР) и холодных точек рекомбинации (ХТР) в петлях хроматина в профазе I мейоза человека. Выявлена связь между расположением ГТР и длиной петель хроматина.

## **Публикации по теме диссертации:**

### Статьи в рецензируемых журналах:

1. Спангенберг, В. Е. Особенности организации хромосом в мейозе / Гришаева Т. М., Коломиец О.Л., Дадашев С.Я., Богданов Ю. Ф. // Цитология. – 2013. – 55 (4) – С 275–278.
2. Спангенберг, В. Е. Морфологическое проявление в профазе I мейоза человека уникального сегмента ДНК / Богданов Ю. Ф., Дадашев С. Я., Витязева И. И., Боголюбов С. В., Коломиец О. Л. // Цитология. – 2012. – Т. 54. – № 8. – С.603-607.
3. Спангенберг, В.Е. Повторяющиеся последовательности ДНК могут принимать участие в формировании синаптонемных комплексов / Дадашев С. Я., Коломиец О. Л., Богданов Ю. Ф. // Цитология. 2011. – 53 (3) – С.235–241.
4. Спангенберг, В.Е., Каким образом хромосомы прикрепляются к синаптонемным комплексам? / Дадашев С. Я., Матвеевский С. Н., Коломиец О. Л., Богданов Ю. Ф.// Генетика. 2010. – Т.46. – № 10. – С.1363-1366.

### Статьи в сборниках:

5. Спангенберг, В. Е. Динамика организации в профазе I мейоза человека уникального сегмента ДНК / Дадашев С. Я., Витязева И. И., Боголюбов С. В., Коломиец О. Л., Богданов Ю. Ф. // Сборник материалов конференций (Москва, 14-16.11.2011 и 17-18.11.2011), посвященных 75-летию со дня рождения Ю. П. Алтухова. – С.244-249.
6. Спангенберг, В. Е. Компьютерный анализ распределения горячих и холодных точек рекомбинации в мейотических хромосомах человека / Спангенберг В. Е., Дадашев С. Я. // Расширенный доклад на конференции on-line «ИВТН-2013» ([http://www.ivtn.ru/2013/pdf/d13\\_05.pdf](http://www.ivtn.ru/2013/pdf/d13_05.pdf)).

### Избранные тезисы конференций:

7. Спангенберг, В. Е. Организация латеральных петель хроматина в мейотической хромосоме человека. Съезд общества клеточных биологов. Тезисы докладов / Богданов, И.И. Витязева, С.В. Боголюбов, С.Я. Дадашев, О. Л. Коломиец. // Цитология. –2012. – Т. 54. – № 9. – С.
8. Спангенберг, Динамика упаковки протяженных участков хроматина в ядрах сперматоцитов человека в профазе I мейоза / В.Е. Коломиец О.Л., Дадашев С. Я., Богданов Ю.Ф. // Материалы Международной

- конференции «Хромосома 2012» (Новосибирск, 2-7 сентября 2012 г.). Новосибирск: Редакционно-издательский центр НГУ. – 2012. – С. 181.
9. Spangenberg, V. Transposable Elements as the structural component of meiotic chromosomes in human and mouse / Dadashev S., Kolomiets O., Yu. Bogdanov. // Proceedings of the 2nd International Congress on Transposable genetic elements. –2012. – Saint Malo. – France. – P. 110.
  10. Spangenberg, V. E. What are the DNA sequences attaching chromatin to synaptonemal complexes? / Dadashev S. Y., Matveevsky S. N., Kolomiets O. L., Bogdanov Y. F. // The EMBO Conference on Meiosis. – 2009 – Isle sur la Sorgue. – P. 74.
  11. Спангенберг, В. Е. ДНК-белковые взаимодействия и эволюция мейоза / Богданов Ю. Ф., Дадашев С.Я., Матвеевский С. Н., Коломиец О. Л. // В сб.: Материалы международной конференции "Хромосома–2009". – Новосибирск, – 2009. – Новосибирск. – С.81.
  12. Spangenberg, V. Search for cohesin complex positioning DNA sequences // Book of Abstracts of the III International Competition for Scientific Papers in Nanotechnology for Young Researchers, RusNanoForum, – Moscow. – 2009.
  13. Спангенберг, В. Е. Организация хромосом в мейозе / Богданов Ю. Ф., Дадашев С. Я., Коломиец О. Л. // Тезисы докладов и сообщений, представленных на XV Всеросс. симпозиум "Структура и функции клеточного ядра». Цитология. – 2010. –Т. 52. – 8. – С.643.
  14. Spangenberg, V. E. New type of DNA compacting in meiosis / Bogdanov Yu. F. // The 4th International IMBG conference for young scientists "Molecular Biology: Advances And Perspectives". – 2011– Kyiv. – Ukraine. – P.132.
  15. Spangenberg, V. A search for the mode of chromatin attachment to synaptonemal complexes in mouse and human / Dadashev S., Kolomiets O., Bogdanov Yu. // Book of abstracts: The EMBO Conference on Meiosis 2nd. Italy. – 2011. – P.133.
  16. Спангенберг, В. Е. Распределение трех типов повторяющихся последовательностей вдоль синаптонемных комплексов у мыши и человека // Тезисы Международной конференции «Проблемы популяционной и общей генетики», посвященной 75-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова. 2011. – Москва – С. 243.
  17. Спангенберг, В. Е. Роль повторяющихся последовательностей в организации мейотической хромосомы // В сб.: 13-я международная пушинская школа-конференция молодых ученых. – Пущино. – 2009. С. 44.

## Благодарности

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю – профессору Оксане Леонидовне Коломиец за внимание и всестороннюю поддержку при выполнении научной работы. Выражаю благодарность сотрудникам нашей лаборатории цитогенетики ИОГен РАН: к.б.н. Т.М. Гришаевой, д.б.н. В.Л. Чубыкину, к.б.н. И.С. Мажейке, к.б.н. Т.В. Сизовой, к.б.н. С.Н. Матвеевскому, М.М. Ацаевой за помощь и поддержку в процессе работы.

Особая благодарность д.б.н., проф. Ю.Ф. Богданову и к.б.н. С.Я. Дадашеву за плодотворное обсуждение и консультации при выполнении работы.

Выражаю благодарность сотрудникам лаборатории генетических основ клеточных технологий ИОГен РАН и лично к.б.н. А.Н. Богомазовой за помощь и ценный материал для исследований; сотрудникам ФГБУ ЭНЦ МРФ и сотрудникам ЦКП «Генетический полиморфизм» ОБН РАН за сотрудничество и помощь в работе.