

**Международная конференция
ХРОСОМОМА 2012
Новосибирск**

МАТЕРИАЛЫ



**International conference
CHROMOSOME 2012
Novosibirsk**

ABSTRACTS



СОДЕРЖАНИЕ

A BARCODE BASED MULTIPLEX TRANSGENE SYSTEM TO STUDY THE CHROMATIN MICROENVIRONMENT <i>Akhtar W., de Jong J., Pindyurin A.V., Pagie L., Wessels L., van Lohuizen M., van Steensel B.</i>	7
“WHERE ENDS MEET”: GENE ORIENTATION PARADIGM GENOME WIDE <i>Babenko V.N.</i>	8
DETECTION OF LOCI UNDER POSITIVE SELECTION IN RATS SELECTED FOR TAME AND AGGRESSIVE BEHAVIOUR <i>Cagan A., Albert F.W., Plyusnina I., Trut L., Schoneberg T., Paabo S.</i>	9
DROSOPHILA SEPARASE INTERACTS WITH HP1 TO PROTECT TELOMERES <i>Cipressa F., Morciano P., Bosso G.S., Raffa G.D., Cenci G.</i>	10
GENOMICS AND NUCLEOSOME ARRANGEMENT OF THE RYE SYBTELOMERES <i>Evtushenko E.V., Elisafenko E.A., Levitsky V.G., Vershinin A.V.</i>	11
THE TWO PROTEASES, <i>INVADOLYSIN</i> AND <i>NON-STOP</i> , INTERACT GENETICALLY TO REGULATE CHROMOSOME STRUCTURE IN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> <i>Janiszewski M.M., Rao S.G., Duca E., Nelson B., Heck M.M.S.</i>	13
MOLECULAR BIOLOGY OF MOSQUITO VITELLOGENESIS: FROM BASIC STUDY TO GENETIC ENGINEERING OF ANTIPATHOGEN IMMUNITI <i>Kokoza V.A., Shin S.W., Zhou Z., Raikhel A.S.</i>	14
MURINE MULTICOLOR BANDING <i>Kosyakova N., Trifonov V., Mkrchyan H., Graphodatsky A., Liehr T.</i>	15
REMARKABLE CHROMOSOMAL DIVERSITY IN ETHIOPIAN RODENTS ATTRIBUTED TO <i>ACOMYS CAHIRINUS</i> AND <i>TACHYORYCTES SPLENDENS</i> <i>Lavrenchenko L.A., Nadjafova R.S., Bulatova N.Sh.</i>	16
SMALL SUPERNUMERARY MARKER CHROMOSOMES (sSMC) <i>Liehr T.</i>	17
DIFFERENTIAL DNA REPLICATION IN DEVELOPMENT <i>Orr-Weaver T.L., Nordman J., Kashevsky H., Alexander J., Sher N., Von Stetina J.R., Bell G.W.</i>	18
GENETICALLY AND CONDITIONALLY INDUCIBLE DAMID MAPPING OF CHROMATIN PROTEINS IN <i>DROSOPHILA</i> <i>Pindyurin A.V., van Steensel B.</i>	19
THE ROLES OF TERMININ AND ITS ACCESSORY FACTORS IN <i>DROSOPHILA</i> TELOMERE MAINTENANCE <i>Raffa G.D., Cenci G., Ciapponi L., Burla R., Saggio I., Gatti M.</i>	20
A NEW CHROMOSOMAL PHYLOGENY SUPPORTS THE REPEATED ORIGIN OF VECTORIAL CAPACITY IN MALARIA MOSQUITOES OF THE <i>ANOPHELES GAMBIAE</i> COMPLEX <i>Sharakhov I.V., Kamali M., Xia A., Tu Z.</i>	21
A NOVEL MODEL OF NUCLEAR ORGANIZATION DEMONSTRATES THE EFFECT OF NUCLEAR ENVELOPE-CHROMOSOME CONTACTS ON 3D CHROMOSOME ORGANIZATION <i>Sharakhov I.V., Kinney N.A., Onufriev A.V.</i>	22
NEW APPROACHES FOR CHROMOSOME MAPPING OF MOSQUITO GENOMES <i>Sharakhova M.V., Timoshevskiy V.A., deBruyn B.S., Severson D.W., Sharakhov I.V.</i>	23
A SHORT INTRODUCTION TO CYTOGENETIC STUDIES OF LESSER APE CHROMOSOMES <i>Stanyon R., Rocch M., Archidiacono N.</i>	24
EVOLUTION OF KARYOTYPES AND SEX DETERMINATION SYSTEMS IN SQUAMATA: A MOLECULAR CYTOGENETICAL APPROACH <i>Trifonov V.A., Kichigin I.G., Giovannotti M., Rens W., Pokorna M., Kratochvil L., O'Brien P., Ferguson-Smith M., Graphodatsky A.</i>	25
INTRASPECIFIC <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> HYBRID DYSGENESIS AND ITS CONNECTION WITH MOBILITY OF TRANSPOSABLE ELEMENTS <i>Zakharenko L.P., Dorogova N.V., Fedorova S.A.</i>	26
КАРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ <i>AURELIA AURITA</i> ИЗ АКВАТОРИИ БЕЛОГО МОРЯ И ЕЕ КРИПТОВИДА (<i>AURELIA SPI</i>) ИЗ ЯПОНСКОГО МОРЯ <i>Адоини Л.С., Найден А.В., Котова А.В., Подгорная О.И., Демин С.Ю.</i>	28
БЕЛОК “ЧЕРНОГО ХРОМАТИНА” SUUR В ООГЕНЕЗЕ И РАННЕМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> <i>Андреева Е.Н., Шлома В.В.</i>	30

РАЙОНЫ ПРИКРЕПЛЕНИЯ ХРОМОСОМ К ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКЕ МАЛЯРИЙНЫХ КОМАРОВ ИМЕЮТ ОБЩИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК <i>Артемов Г.Н., Сапунов Г.А., Стегний В.Н.</i>	32
МАЛЯРИЙНЫЕ КОМАРЫ <i>ANOPHELES MESSEAE</i> И <i>ANOPHELES ATROPARVUS</i> РАЗЛИЧАЮТСЯ ПО ЛОКАЛИЗАЦИИ ЛАМИНА НА ХРОМОСОМАХ ТРОФОЦИТОВ ЯИЧНИКОВ <i>Артемов Г.Н., Сапунов Г.А., Стегний В.Н.</i>	34
ОСОБЕННОСТИ СЕЛЕКЦИИ СПЕРМАТОЦИТОВ I ПОРЯДКА МЫШИ В ОТВЕТ НА ВВЕДЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ <i>Ацаева М.М., Дадашев С.Я., Корноухова А.Г., Коломиец О.Л.</i>	36
ЗАГАДОЧНАЯ СИСТЕМА ДЕТЕРМИНАЦИИ ПОЛА У СЛЕПУШОНОК <i>ELLOBIVUS</i> , ИЛИ ВОЗМОЖНА ЛИ ЖИЗНЬ БЕЗ Y-ХРОМОСОМЫ <i>Баклушинская И.Ю., Коломиец О.Л., Романенко С.А., Матвеевский С.Н., Графодатский А.С., Ляпунова Е.А., Джаст В.</i>	38
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЦИТОГЕНЕТИКА СЕМЕЙСТВА ВИВЕРРОВЫХ <i>Беклемишева В.Р., Юдкин Д.В., Перельман П.Л., Петрина Т.Н., Рожнов В.В., Янг Ф., Ни В., Графодатский А.С.</i>	40
ПОИСК Tc1-ПОДОБНЫХ ДНК ТРАНСПОЗОНОВ В ТРАНСКРИПТОМАХ БАЙКАЛЬСКИХ СИГОВЫХ РЫБ <i>Беломестных Т.В., Сидоров И.А., Скоров В.В., Быченко О.С., Азжикина Т.Л., Кирильчик С.В., Суханова Л.В.</i>	42
РЕГУЛЯЦИЯ РЕПРЕССИРОВАННЫХ РАЙОНОВ ГЕНОМА В РАЗВИТИИ ДРОЗОФИЛЫ <i>Белякин С.Н., Максимов Д.А., Лактионов П.П., Коряков Д.Е.</i>	44
ФЕНОТИП ИНТЕРФАЗНОГО ЯДРА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИЯХ <i>Беляков В.К., Монахова М.А., Тагирова М.К., Кузнецов А.Б., Мантурова Н.Е.</i>	45
ПОЛИТЕННЫЕ ХРОМОСОМЫ ХИРОНОМИДЫ <i>PARACHIRONOMUS VARUS</i> (<i>GOETGHEBUER, 1921</i>) (<i>DIPTERA, CHIRONOMIDAE</i>) <i>Белянина С.И.</i>	47
ХРОМОСОМНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ НАСЕКОМОЯДНЫХ <i>Билтуева Л.С., Воробьева Н.В.</i>	49
АССОЦИАЦИЯ ГЕНОВ ДЕТОКСИКАЦИИ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ РМЖ В ЧЕЧЕНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ <i>Бисултанова З.И.</i>	50
ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ И УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МЕЙОТИЧЕСКИХ ХРОМОСОМ <i>Богданов Ю.Ф.</i>	52
КОЛОКАЛИЗАЦИЯ РАЙОНОВ ПРИКРЕПЛЕНИЯ XL И 3R ХРОМОСОМ В ЯДРАХ ГЕНЕРАТИВНЫХ И СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК У <i>ANOPHELES MESSEAE</i> FALL <i>Бондаренко С.М., Артемов Г.Н., Стегний В.Н.</i>	54
МЕТАПОПУЛЯЦИОННЫЕ СИСТЕМЫ А- И В- ХРОМОСОМ МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В ПРОСТРАНСТВЕ И ВРЕМЕНИ <i>Борисов Ю.М.</i>	56
САРАНЧОВЫЕ СЕМЕЙСТВА RAMPHAGIDAE – НОВАЯ МОДЕЛЬ ЭВОЛЮЦИИ Y-ХРОМОСОМЫ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ XX/XU МЕХАНИЗМА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА ИЗ ИСХОДНОГО XX/X0 <i>Бугров А.Г.</i>	58
ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОФИЛИ, СУЩЕСТВЕННЫЕ ДЛЯ ОПИСАНИЯ ВИДОВ И БИОРАЗНООБРАЗИЯ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ: ХРОМОСОМНЫЙ ПОЛИТИПИЗМ И ГИБРИДИЗАЦИЯ <i>Булатова Н.Ш.</i>	60
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК ХРОМОЦЕНТРА <i>D. VIRILIS</i> НА ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМАХ <i>D. VIRILIS</i> И <i>D. KANEKOI</i> <i>Вассерлауф И.Э., Усов К.Е., Саруханян М.С., Стегний В.Н.</i>	62
МОДИФИКАЦИИ НЕАКТИВНОГО ХРОМАТИНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ САЙЛЕНСИНГА X-ХРОМОСОМЫ У ГРЫЗУНОВ <i>Васькова Е.А., Шевченко А.И., Дементьева Е.В., Павлова С.В., Григорьева Е.В., Закиян С.М.</i>	64
РОЛЬ ГИСТОНА γ H2AX В КЛЕТОЧНОМ ОТВЕТЕ НА СТРЕСС <i>Величко А.К., Петрова Н.В., Разин С.В., Кантидзе О.Л.</i>	65
ДИНАМИКА ЭВОЛЮЦИОННЫХ ПРЕОБРАЗОВАНИЙ КАРИОТИПОВ У ГОЛУБЯНОК ГРУППЫ <i>AGRODIAETUS PHYLLIS</i> (<i>LEPIDOPTERA, LYCAENIDAE</i>) <i>Вершинина А.О., Лухтанов В.А.</i>	66

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОВ МИКРОРНК, УЧАСТВУЮЩИХ В ОНКОГЕНЕЗЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА <i>Веряскина Ю.А., Козлов В.В., Ахмерова Л.Г., Буренкова Н.Н., Титов С.Е., Иванов М.К., Войццкий В.Е., Сидоров С.В., Гуляева Л.Ф., Колесников Н.Н., Жимулёв И.Ф.</i>	68
ОСОБЕННОСТИ РАСПОЛОЖЕНИЯ ХРОМОСОМНЫХ ТЕРРИТОРИЙ В МЕЗИНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ СТАРЕНИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ <i>Вольдогори Я.И., Лавров А.В.</i>	70
SAУР И ВРАНМА ВАЖНЫ ДЛЯ ОСТАНОВКИ КОМПЛЕКСА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ II, КАК ПРИ РЕПРЕССИИ, ТАК И В СОСТОЯНИИ АКТИВНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ <i>Воробьева Н.Е., Николенко Ю.В., Набирочкина Е.Н., Краснов А.Н., Шидловский Ю.В., Георгиева С.Г.</i>	71
ПЕРЕОСМЫСЛЕНИЕ МЕТОДА ЗС: ЛИГИРОВАНИЕ В ЯДРЕ, А НЕ В РАСТВОРЕ <i>Гаврилов А.А., Гушанская Е.С., Киреев И.И., Яровая О.В., Разин С.В.</i>	73
ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ ЦЕНТРА НОВЫХ МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ: РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ <i>Гайнер Т.А., Каримова О.Г.</i>	75
СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ДОМЕНЫ ИНТЕРФАЗНЫХ ХРОМОСОМ <i>Глазков М.В.</i>	77
РЕВИЗИЯ КАРТИРОВАНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДИСКОВ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ ВИДОВ ГРУППЫ С. PLUMOSUS (DIPTERA, CHIRONOMIDAE) <i>Голыгина В.В., Кикнадзе И.И.</i>	79
РОЛЬ ТРАДИЦИОННЫХ И НОВЫХ МЕТОДОВ В ИССЛЕДОВАНИИ ХРОМОСОМ ПАРАЗИТИЧЕСКИХ ПЕРЕПОНЧАТОКРЫЛЫХ (HYMENOPTERA) <i>Гохман В.Е.</i>	80
О ПРОИСХОЖДЕНИИ БЕЛКОВ СИНАПТОНОМНОГО КОМПЛЕКСА: НЕКОТОРЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА IN SILICO <i>Гришаева Т.М.</i>	82
ЭВОЛЮЦИЯ ХРОМОСОМНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ СЕМЕЙСТВА ГЕНОВ РИБОСОМНОЙ РНК (rRNA) В ТРИБЕ CHIRONOMINI <i>Гундерица Л.И., Голыгина В.В., Брошков А.Д., Ермолаева О.В., Кикнадзе И.И.</i>	84
МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИСКОВ И МЕЖДИСКОВ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ ДРОЗОФИЛЫ <i>Демаков С.А., Андреев О.В., Волкова Е.И., Семешин В.Ф., Зыкова Т.Ю., Николаев Д.А., Гончарова А.А.</i>	86
ГЕНОТИПИРОВАНИЕ КОСТНЫХ ОСТАНКОВ ДЕНИСОВОЙ ПЕЩЕРЫ CAPREOLUS PYGARGUS: ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ СОВРЕМЕННЫХ И ДРЕВНИХ ПОПУЛЯЦИЙ <i>Дружкова А.С.</i>	88
ЭФФЕКТ МУТАЦИЙ ОПУХОЛЕВОГО СУПРЕССОРА <i>MERLIN</i> НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК КРЫЛА <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> <i>Дубатолова Т.Д., Омелянчук Л.В., Копыл С.А.</i>	90
МОГУТ ЛИ ТЕЛОМЕРАЗА И ALT ОДНОВРЕМЕННО ЭКСПРЕССИРОВАТЬСЯ В НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ? <i>Жданова Н.С., Минина Ю.М., Карамышева Т.В., Зверева М.Э., Скворцов Д.А., Ново К., Драскович И., Рубцов Н.Б., Лондон А.</i>	91
ХРОМОСОМНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА У <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> <i>Жимулёв И.Ф., Зыкова Т.Ю., Беляева Е.С., Демаков С.А., Демакова О.В., Болдырева Л.В., Гончаров Ф.П., Хорошко В.А.</i>	93
СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМОСОМ ОПИСТОРХИД (PLATYHELMINTHES, TREMATODA) <i>Задесенец К.С., Карамышева Т.В., Катохин А.В., Мордвинов В.А., Рубцов Н.Б.</i>	94
ИССЛЕДОВАНИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО СТАТУСА X-ХРОМОСОМЫ В ЛИНИЯХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА <i>Захарова И.С., Шевченко А.И., Григорьева Е.В., Малахова А.А., Сметанина М.А., Закиян С.М.</i>	96
ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ <i>ARG-X</i> ПРОТЕАЗОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ САЙТОВ В СУПРАСТРУКТУРАХ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР ИНДУЦИРОВАННЫХ К РОСТУ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ <i>Иванов Р.С., Иванова Э.А., Вафина Г.Х., Карпова Л.М.</i>	98
В-ХРОМОСОМЫ И ПРОГРАММА ИССЛЕДОВАНИЯ ИХ ДЕЙСТВИЯ В РЕГУЛЯЦИИ ПЛОТНОСТИ ПОПУЛЯЦИИ ВИДА <i>Иванов Ю.Н.</i>	100
ХРОМОСОМЫ И ЭВОЛЮЦИЯ ПЕСЧАНОК РОДОВ <i>MERIONES</i> И <i>RHOMBOMYS</i> (RODENTIA, CRICETIDAE, GERBILLINAE) <i>Картавецва И.В., Коробицына К.В.</i>	103

ВАРИАЦИИ ЧИСЛА ПОВТОРОВ (CNV) В ГЕНОМЕ ПАЦИЕНТОВ С ИДИОПАТИЧЕСКОЙ УМСТВЕННОЙ ОТСТАЛОСТЬЮ <i>Кашиварова А.А., Скрябин Н.А., Черемных А.Д., Толмачёва Е.Н., Саженова Е.А., Салюкова О.А., Чечеткина Н.Н., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н.</i>	104
ИНВЕРТИРОВАННОЕ РАСПОЛОЖЕНИЕ ГЕТЕРОХРОМАТИНА – НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА ОРГАНИЗАЦИЮ ЯДРА <i>Киселева Е.В., Морозова К.Н., Скуридина Е.Г., Соловей И., Йоффе Б.</i>	106
НЕЙРОГЕНЕЗ В ОБОНЯТЕЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ У РЫБ: МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДЕЛЯЩИХСЯ КЛЕТОК <i>Клименков И.В., Судаков Н.П., Пастухов М.В., Косицын Н.С.</i>	108
РАЙОНЫ ПОЗДНЕЙ РЕПЛИКАЦИИ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> <i>Колесникова Т.Д., Беляева Е.С., Андреевкова Н.Г., Гончаров Ф.П., Зыкова Т.Ю., Болдырева Л.В., Жимулёв И.Ф.</i>	110
ИЗУЧЕНИЕ АТФ-ЗАВИСИМЫХ ФАКТОРОВ СБОРКИ И РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОМАТИНА ДРОЗОФИЛЫ <i>Конев А.Ю., Макасе А.А., Метельская Д.Н., Котлованова Л.В., Покровский Д.К., Игнатъева М.А., Полторадня Ю.А.</i>	112
ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИЙ БЕЛКА dSGF11, КОМПОНЕНТА КОМПЛЕКСА SAGA <i>Копытова Д.В., Гурский Д.Я., Георгиева С.Г.</i>	114
ДИНАМИКА ТЕЛОМЕРНОЙ ДНК У БАЙКАЛЬСКИХ ПЛАНАРИЙ И МОЛЛЮСКОВ <i>Королева А.Г., Максимова Н.В., Ситникова Т.Я., Евтушенко Е.В., Тимошкин О.А., Вершинин А.В., Кирильчик С.В.</i>	115
ИНДУЦИРОВАННАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ В РАЙОНЕ ИНТЕРКАЛЯРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА В ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМАХ ДРОЗОФИЛЫ <i>Коряков Д.Е., Похолокова Г.В., Максимов Д.А., Белякин С.Н., Беляева Е.С., Жимулёв И.Ф.</i>	117
ИЗМЕНЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМОСОМЫ 6 В ЯДРАХ ТРОФОЦИТОВ И КЛЕТОК СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ <i>CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA</i> MG. (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) <i>Коханенко А.А., Ананьина Т.В., Стегний В.Н.</i>	118
АРХИТЕКТУРА ГЕТЕРОХРОМАТИНА И ТРАНСКРИПЦИЯ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ ДНК В КЛЕТКАХ ЛИМФОБЛАСТОМЫ КУРИЦЫ <i>Красикова А.В., Маслова А.В., Василевская Е.В., Злотина А.М., Попова Д.А.</i>	120
РОЛЬ БЕЛКА SU(HW) В ПОЗИЦИОНИРОВАНИИ ОРИДЖИНОВ РЕПЛИКАЦИИ <i>Краснов А.Н., Мазина М.Ю., Воробьева Н.Е.</i>	122
ПРЕДКОВЫЙ КАРИОТИП ПОДОТРЯДА ЖВАЧНЫХ (RUMINANTIA) <i>Кулемзина А.И., Янг Ф., Трифионов В.А., Райдер О.А., Фергюсон-Смит М., Графодатский А.С.</i>	123
НАКАПЛИВАЮЩИЕ ПОЛИ(A)+РНК ЯДЕРНЫЕ ДОМЕНЫ, ФОРМИРУЮЩИЕСЯ НА ХРОМОСОМАХ ТИПА ЛАМПОВЫХ ЩЁТОК ПТИЦ, НЕ СОДЕРЖАТ МАРКЕРНОГО БЕЛКА ПАРАСПЕКЛОВ PSF/SFPQ <i>Куликова Т.В., Гагинская Е.Р.</i>	124
РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА COOKIE MONSTER В РЕГУЛЯЦИИ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ В ПРОЦЕССЕ СПЕРМАТОГЕНЕЗА <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> <i>Лактионов П.П., Максимов Д.А., Белякин С.Н.</i>	126
РОЛЬ ДЛИНЫ МОНОМЕРА И НУКЛЕОТИДНОГО КОНТЕКСТА ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ САЙТОВ ПОСАДКИ НУКЛЕОСОМ В ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРАХ РАСТЕНИЙ <i>Левицкий В.Г., Вершинин А.В.</i>	128
ХРОМОСОМЫ И ГИБРИДОГЕННОЕ ВИДООБРАЗОВАНИЕ У НАСЕКОМЫХ <i>Лухтанов В.А., Кузнецова В.Г., Шаповал Н.А., Анохин Б.А.</i>	130
ИНСУЛЯТОРНЫЙ БЕЛОК D. MELANOGASTER SU(HW) РЕКРУТИРУЕТ КОМПЛЕКСЫ SAGA И ВРАНМА И СОЗДАЕТ УСЛОВИЯ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ БЕЛКОВ, УЗНАЮЩИХ УЧАСТКИ НАЧАЛА РЕПЛИКАЦИИ (ORC) <i>Мазина М.Ю., Воробьева Н.Е., Краснов А.Н.</i>	131
ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ФАКТОРА CHD1 В РЕГУЛИРОВАНИИ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИНА И ТРАНСКРИПЦИИ НА МОДЕЛИ ГЕНОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> <i>Макасе А.А., Конев А.Ю.</i>	132
ВЫЯВЛЕНИЕ КЛЕТОК ДРОЗОФИЛЫ ПРОХОДЯЩИХ СОМАТИЧЕСКУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ПО ПОЛУ <i>Максимов Д.А., Белякин С.Н.</i>	133
ОБНАРУЖЕНИЕ БЕЛОК-КОДИРУЮЩЕГО ГЕНА НА В-ХРОМОСОМАХ КОПЫТНОГО ЛЕММИНГА (<i>DICROSTONYX TORQUATUS</i>) <i>Макунин А.И.</i>	134

РОЛЬ ГЕНА <i>HRS</i> В РАЗВИТИИ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> <i>Мариловецца Е.В., Копыл С.А., Дубатолова Т.Д., Омелянчук Л.В.</i>	135
ИССЛЕДОВАНИЕ СИНАПТОНЕМНЫХ КОМПЛЕКСОВ У КАРИОМОРФ И ГИБРИДОВ ГРУППЫ БАРАБИНСКИХ ХОМЯЧКОВ РОДА <i>CRICETULUS</i> <i>Матвеевский С.Н., Коломиец О.Л., Лебедев В.С., Малыгин В.М., Поплавская Н.С., Суров А.В.</i>	137
ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ <i>IN ORGANELLO</i> И <i>IN VIVO</i> <i>Милешина Д.В., Кулинченко М.В., Клименко Е.С., Катышев А.И., Шмаков В.Н., Черникова В.В., Лактионов П.П., Ибрагим Н., Вебер-Лотфи Ф., Диетриш А., Константинов Ю.М.</i>	139
СТРУКТУРА ПРЕРЫВИСТЫХ ТЕЛОМЕР В КЛЕТКАХ БУРОЗУБКИ ИБЕРИЙСКОЙ <i>Минина Ю.М., Карамышева Т.В., Рубцов Н.Б., Драскович И., Лондоно-Валеджо А., Жданова Н.С.</i>	141
МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРЕДПОСЫЛОК ПРАВИЛЬНОГО РАСХОЖДЕНИЯ ХРОМОСОМ В МЕЙОЗЕ У РЖИ <i>SECALE CEREALE</i> L <i>Михайлова Е.И.</i>	143
КАРИОТИПИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПИЯВОК ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ <i>Натяганова А.В., Кайгородова И.А., Сороковикова Н.В.</i>	145
ДЕТЕРМИНАЦИЯ ПОЛА У ПТИЦ. РОЛЬ РЕТИНОИДНОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ВСТУПЛЕНИИ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК В МЕЙОЗ <i>Некрасова А.А., Трухина А.В., Конева Н.Д., Лукина Н.А., Смирнов А.Ф.</i>	147
ВОЗМОЖНАЯ СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ И ОНКСУПРЕССОРА P53 С РАЗВИТИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА (ХЛЛ) <i>Овсеян В.А., Росин В.А., Загоскина Т.П.</i>	149
ВОЗМОЖНОСТИ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ГЕНОМНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ В ИДЕНТИФИКАЦИИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРИЧИН ОСТАНОВКИ ВНУТРИУТРОБНОГО РАЗВИТИЯ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА <i>Олюшина Д.И., Скрябин Н.А., Саженова Е.А., Толмачёва Е.Н., Лебедев И.Н.</i>	151
ИЗОЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ РОБЕРТСОНОВСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ХРОМОСОМ У ОБЫКНОВЕННОЙ БУРОЗУБКИ <i>SOREX ARANEUS</i> (МАММАЛИА) <i>Орлов В.Н., Сычева В.Б.</i>	153
СРАВНИТЕЛЬНОЕ ХРОМОСОМНОЕ КАРТИРОВАНИЕ МАРКЕРНЫХ САЙТОВ ДНК - ТЕЛОМЕРНЫХ ПОВТОРОВ И ГЕНОВ <i>rRNA</i> - У ХРОМОСОМНО-ДИВЕРГИРОВАВШИХ ВИДОВ И ГИБРИДОВ РОДА <i>MICROTUS</i> (RODENTIA, МАММАЛИА) <i>Павлова С.В., Булатова Н.Ш., Романенко С.А., Сердюкова Н.А.</i>	155
СПОСОБСТВУЮТ ЛИ ГИБРИДНЫЕ ЗОНЫ ВИДООБРАЗОВАНИЮ У ОБЫКНОВЕННОЙ БУРОЗУБКИ <i>SOREX ARANEUS</i> : О ЧЕМ СВИДЕТЕЛЬСТВУЮТ ДАННЫЕ ИЗУЧЕНИЯ МЕЙОЗА? <i>Павлова С.В., Матвеевский С.Н., Ацаева М.М., Коломиец О.Л., Булатова Н.Ш.</i>	157
ЭВОЛЮЦИЯ КАРИОТИПА <i>NEOGOBIVUS GORLAP</i> (PISCISCES: PEERCIFORMES: <i>GOBIIIDAE</i>) <i>Праздников Д.В.</i>	159
ОСОБЕННОСТИ ВИДООБРАЗОВАНИЯ У ИНFUЗОРИЙ КАК СЛЕДСТВИЕ МЕХАНИЗМА РЕАРАНЖИРОВКИ ИХ ГЕНОМОВ В ПОЛОВОМ ПРОЦЕССЕ <i>Раутиан М.С.</i>	161
ДЕФИЦИТ ГИСТОНОВ ЯДРА В ПРОФАЗЕ-МЕТАФАЗЕ, КАК ГЛАВНАЯ ПРИЧИНА ПРЕВРАЩЕНИЯ ХРОМОНЕМНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА В ХРОМОСОМНУЮ В ТО ВРЕМЯ КАК ВОСПОЛНЕНИЕ ГИСТОНОВ ХРОМОСОМ В АНАФАЗЕ-ТЕЛОФАЗЕ ОПРЕДЕЛЯЕТ ОБРАТНЫЙ ПРОЦЕСС ПРЕВРАЩЕНИЯ ХРОМОСОМ В ХРОМОНЕМЫ <i>Рафаилов А.М., Рафаилова М.А.</i>	163
ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМОВ И ХРОМОСОМНЫХ НАБОРОВ ЗЛАКОВ <i>Родионов А.В., Коцераба В.В., Ким Е.С., Носов Н.Н., Пунина Е.О.</i>	165
ХРОМОСОМНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ В ОТРЯДЕ ГРЫЗУНОВ <i>Романенко С.А., Лемская Н.А., Беклемишева В.Р., Гладких О.Л., Сердюкова Н.А., Перельман П.Л., Трифонов В.А., Фергюсон-Смит М.А., Янг Ф., Графодатский А.С.</i>	167
В-ХРОМОСОМЫ ВОСТОЧНОАЗИАТСКОЙ МЫШИ <i>APODEMUS PENINSULAE</i> (RODENTIA) ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА: ИЗМЕНЧИВОСТЬ, МОЗАИЦИЗМ И МОРФОТИПЫ <i>Рослик Г.В., Картавецца И.В.</i>	169
СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМОСОМ В-ГЕНОМА И ЭВОЛЮЦИЯ АЛЛОПОЛИПЛОИДНЫХ ПШЕНИЦ <i>Салина Е.А., Сергеева Е.М., Добровольская О.Б., Адопина И.Г., Щербань А.Б., Шалуб Б., Сурдий П., Бернард М.</i>	171
МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ХРОМОСОМ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ <i>Саматадзе Т.Е., Амосова А.В., Земцова Л.В., Суслина С.Н., Быков В.А., Зеленин А.В., Муравенко О.В.</i>	173

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МИТОТИЧЕСКОГО КАРИОТИПА И КАРИОТИПА СИНАПТОНЕМНЫХ КОМПЛЕКСОВ СОБОЛЯ, <i>MARTES ZIBELLINA</i> <i>Сафронова Л.Д., Черепанова Е.В., Сергеев Е.Г., Орлов В.Н.</i>	175
ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ДНК В ПРОЦЕССЕ СТАНОВЛЕНИЯ ТЕПЛОКРОВНЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ <i>Сизова Т.В.</i>	177
МНОЖЕСТВЕННЫЕ ХРОМОСОМНЫЕ АБЕРРАЦИИ В ТКАНЯХ СОСУДОВ С АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ <i>Скрябин Н.А., Назаренко М.С., Олюшина Д.И., Лебедев И.Н.</i>	178
ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА <i>MANOG</i> ПОЛЁВКИ <i>Сорокин М.А., Елисафенко Е.А.</i>	180
ДИНАМИКА УПАКОВКИ ПРОТЯЖЕННЫХ УЧАСТКОВ ХРОМАТИНА В ЯДРАХ СПЕРМАТОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В ПРОФАЗЕ I МЕЙОЗА <i>Спангенберг В.Е., Коломиец О.Л., Дадашев С.Я., Богданов Ю.Ф.</i>	181
МАКРОЭВОЛЮЦИОННАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ЭУКАРИОТ. ПАРАМЕТРЫ ЭВОЛЮЦИОННО ЛАБИЛЬНОГО И ЭВОЛЮЦИОННО КОНСЕРВАТИВНОГО ВИДОВОГО ГЕНОМА <i>Стегний В.Н.</i>	183
ИЗУЧЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИИ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ АГРЕССИВНОГО ПОВЕДЕНИЯ У МУЖЧИН АФРИКАНСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ ХАДЗА И ДАТОГА <i>Суходольская Е.М., Васильев В.А., Шибалев Д.В., Буркова В.Н., Мабула А., Бутовская М.Л., Рысков А.П.</i>	185
ЗАГАДКИ ЭВОЛЮЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНА ЦИТОХРОМА B ГОЛОМЯНОК БАЙКАЛА <i>Тетерина В.И., Суханова Л.В., Мамонтов А.М., Кирильчик С.В.</i>	187
НАРУШЕНИЯ КОНДЕНСАЦИИ ХРОМАТИНА РЖИ <i>SECALE CEREALE</i> L. У МУТАНТОВ С ДЕФЕКТАМИ СИНАПСИСА И РЕКОМБИНАЦИИ <i>Толкачева А.В., Михайлова Е.И., Соснихина С.П.</i>	189
ПРОСТРАНСТВЕННО ВРЕМЕННАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ <i>ARG-X</i> ПРОТЕАЗОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ САЙТОВ В СУПРАСТРУКТУРАХ ХРОМОСОМЫ В ЖИЗНЕННОМ ЦИКЛЕ ПОПУЛЯЦИИ <i>ESCHERICHIA COLI</i> <i>Тропынина Т.С., Иванова Э.А., Вафина Г.Х., Иванов Р.С.</i>	191
ОБ ЭВОЛЮЦИОННОМ ХАРАКТЕРЕ СВЯЗЕЙ 9-Й И Y-ХРОМОСОМЫ <i>Тюняев А.А.</i>	193
СОДЕРЖАНИЕ ДНК В ЯДРАХ КЛЕТОК ГРАНУЛЕМ МЫШЕЙ Balb/c В КУЛЬТУРЕ EX VIVO НА ЛАТЕНТНОЙ СТАДИИ РАЗВИТИЯ VCG-ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ <i>Уфимцева Е.Г., Дубатолова Т.Д.</i>	196
ХРОМОСОМНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ <i>CHIRONOMUS ENTIS</i> (DIPTERA CHIRONOMIDAE) УРАЛЬСКИХ ОЗЕР <i>Филинкова Т.Н.</i>	198
ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ СПЕЦИАЛИЗАЦИЯ ДУПЛИЦИРОВАННЫХ КОПИЙ ГЕНОВ В ГЕНОМЕ ПШЕНИЦЫ <i>Хлесткина Е.К., Терещенко О.Ю.</i>	200
ВЛИЯНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО АКТИВАТОРА И ПОВЫШЕННОГО АЦЕТИЛИРОВАНИЯ ГИСТОНОВ НА ПОЛОЖЕНИЕ РАЙОНОВ ХРОМОСОМ ОТНОСИТЕЛЬНО ЯДЕРНОЙ ПЕРИФЕРИИ <i>Целебровский М.В., Федотова А.А., Ненашева В.В., Михалева Е.А., Шевелев Ю.Я.</i>	202
УСЛОВНЫЕ МУТАЦИИ У <i>D. MELANOGASTER</i> : ОСОБЕННОСТИ ЛОКАЛИЗАЦИИ И ВТОРИЧНОГО МУТИРОВАНИЯ <i>Чадов Б.Ф., Федорова Н.Б., Чадова Е.В.</i>	204
ПАРАНЕМИЧЕСКАЯ СПИРАЛИЗАЦИЯ ХРОМАТИД В МЕЙОЗЕ. СПИРАЛИЗАЦИЯ БЕЗ ЗАКРУЧИВАНИЯ <i>Чубыкин В.Л., Коломиец О.Л.</i>	206
ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИЙ РАЗЛИЧНЫХ ДОМЕНОВ БЕЛКА CHROMATOR НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> <i>Шапвалов И.С., Головнин А.К.</i>	208
НОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ И ИХ РОЛЬ В ВОЗНИКНОВЕНИИ И ЭВОЛЮЦИИ РОДА <i>НОМО</i> <i>Шематорова Е.К., Шпаковский Д.Г., Долудин Ю.В., Шпаковский Г.В.</i>	209
ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ	211

A BARCODE BASED MULTIPLEX TRANSGENE SYSTEM TO STUDY THE CHROMATIN MICROENVIRONMENT

Akhtar W., de Jong J., Pindyurin A.V., Pagie L., Wessels L., van Lohuizen M., van Steensel B.
Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands, a.pindyurin@nki.nl

The genetic information in the cell comprises of coding and non-coding genes and regulatory elements arranged on the DNA, which is bound by histones and other proteins to form chromatin. This genetic information is under epigenetic control mediated by DNA methylation and post-translational modifications of histones. It is however unclear how local chromatin context affects the function of regulatory elements. Here we present a system to study the influence of neighboring chromatin environment on gene expression in a high-throughput manner. To this end, we have generated libraries of mouse embryonic stem cells with random insertions of reporter transgenes using PiggyBac transposon. Each of these transgenes (harboring the identical promoter and reporter sequences) contains a unique nucleotide barcode at the end of its transcription unit. We have optimized an insertion site mapping method based on high-throughput sequencing to identify the insertion sites of thousands of transgenes along with their respective barcodes, which serve as location identifiers. Analysis of barcode representations in cDNA preparations from the same population of cells allows us to quantify the expression of each transgene. We have generated a data set of ~15,000 transgenes with murine housekeeping PGK promoter integrated throughout the genome. These transgenes, depending on their locations, show a great deal of variability in their expression. In particular, we found that transgenes landing in lamina-associated domains show very low expression indicating that these domains are not readily accessible to transcription machinery. Interestingly, reporter transgenes with the PGK promoter landing in polycomb domains marked by H3K27me3 were not silenced. In addition to PGK promoter, we have also generated mouse embryonic stem cell libraries with inducible transgenes and have analyzed the expression of those under different levels of induction. The data showing the influence of chromatin microenvironment on the dynamics of transcriptional activation will also be presented. Taken together, our novel approach has a great potential in understanding the biology of chromatin and how it influences transcription.

“WHERE ENDS MEET”: GENE ORIENTATION PARADIGM GENOME WIDE

Babenko V.N.

Institute of Cytology and Genetics SD RAS, Novosibirsk, Russia

We explored a range of features of intergenic loci depending on the mutual orientation of neighboring genes. We found out that cases of expression coordination of neighboring genes don't depend on intergenic length, instead, a chromatin landscape in the locus is of importance. We propose possible mechanisms for gene expression coordination, including spatial co-location of promoter regions and bi-directional promoters. The chromatin in the intergenic region flanked by convergent genes maintains specific histone signature, while the divergent intergenic regions often comprise open chromatin and favor P-element insertions in fly as well as GWAS (genome wide association studies) related SNPs.

We made the conclusion that mutual gene orientation often demarcates certain chromatin states and mechanisms accommodating tissue - specific coordinated expression of neighbor genes.

DETECTION OF LOCI UNDER POSITIVE SELECTION IN RATS SELECTED FOR TAME AND AGGRESSIVE BEHAVIOUR

Cagan A.¹, Albert F.W.^{1,2}, Plyusnina I.³, Trut L.³, Schoneberg T.⁴, Paabo S.^{1,5,6}

¹Department of Evolutionary Genetics, Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology, Deutscher Platz 6, 04103 Leipzig, Germany

²Lewis-Sigler Institute for Integrative Genomics, Carl C. Icahn Laboratory, Princeton University, Washington Rd., Princeton, NJ, 08544

³Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia

⁴Institute for Biochemistry, Medical Faculty, University of Leipzig, Johannisallee 30, 04103 Leipzig, Germany

⁵Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University, Uppsala, Sweden

⁶Department of Genetics and Pathology, Rudbeck Laboratory, Uppsala University, 75123 Uppsala, Sweden

We are investigating the genetics basis of variation in tameness and aggression in two lines of wild-derived Brown Norway Rat (*Rattus norvegicus*) that have been under continuous divergent artificial selection for over 70 generations. One line is selected for tameness and the other for aggression towards humans, resulting in substantial behavioural differences between the lines. Previous QTL mapping in an F2 intercross population derived from these lines revealed 5 genomic loci influencing tameness and aggression. However, these loci contain many genes, making identification of causal changes difficult. To further increase our resolution to detect functional loci we are currently utilising the genomic signal created by positive selection. Positive selection leaves distinct localised patterns in DNA polymorphism around positively selected loci. We have undertaken genomic scans for these 'signatures of selection' after generating genome-wide sequence data from 20 individuals of each population. We search for loci where the tame or aggressive rats differ in measures of allele frequency and haplotype homozygosity and test if the identified loci deviate from expectations under neutral evolution derived from simulations of the population history of the rats. Loci with evidence for positive selection are candidates for containing genetic variants influencing tameness and aggression.

DROSOPHILA SEPARASE INTERACTS WITH HP1 TO PROTECT TELOMERES

Cipressa F.¹, Morciano P.¹, Bosso G.S.¹, Raffa G.D.², Cenci G.¹

¹Dipartimento di Scienze Cliniche Applicate e Biotecnologiche, Università degli Studi dell'Aquila Coppito (AQ), Italy

²Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "C. Darwin" SAPIENZA, Università di Roma (RM), Italy

The *Drosophila Sse* gene encodes for separase, the conserved cystein protease required for resolution of sister chromatid cohesion during the metaphase-to-anaphase transition. Previous work has shown that mutations in *Sse* resulted into polyploid cells with endoreduplicated (either diplo- or quadruplo-) chromosomes. We have identified a new recessive lethal mutation in the *Sse* gene, designated as *diplo-telomeric fusions (dtf)*, that in addition to endoreduplication, exhibits telomeric fusions (TFs) giving rise to multicentric linear and ring chromosomes which were also endoreduplicated. TFs are also present in all heteroallelic combinations between *Sse^{dtf}* and previously characterized *Sse* alleles, suggesting that telomere uncapping is indeed a consequence of loss of *Sse*. Immunofluorescence experiments revealed that SSE localizes at centromeric regions and remarkably on 40% of telomeres where it also co-localizes with the specific telomeric factor HOAP. By immunoprecipitation, we found that SSE physically interacts with terminin (a *Drosophila* specific protein complex that binds to and protect chromosome ends from fusion events) and with Heterochromatin Protein 1 (HP1). However, while terminin and SSE localize at telomeres independently, loss of SSE determines a drastic reduction of HP1 expression and localization, although the levels of HP1-encoding mRNA remain unchanged. Collectively, these results suggest that SSE, in addition to its canonical role in triggering anaphase, interacts with HP1 and plays an unanticipated role in the epigenetic regulation of *Drosophila* telomeres.

GENOMICS AND NUCLEOSOME ARRANGEMENT OF THE RYE SYBTELOMERES

*Evtushenko E.V.*¹, *Elisafenko E.A.*², *Levitsky V.G.*², *Vershinin A.V.*¹

¹Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, ²Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, evt@mcb.nsc.ru

Subtelomeric regions form the junction between the chromosome-specific DNA sequences and the array of the telomeric repeats. According to the current concept, formed through a comprehensive analysis of the molecular structure of human and yeast subtelomeres, these regions are particularly dynamic and variable parts of chromosomes enriched for segmental duplications. The segmental duplications range from 1 kb to more than 200 kb and derived from frequent sequence exchanges between ends of nonhomologous chromosomes. The question on the generality of the concept on a high plasticity of subtelomeres and their enrichment for segmental duplications, characteristic of the human genome, for the plant species is still to be answered. Among the plants, the most detailed large-scale organization patterns of subtelomeric regions have been obtained for the species with completely sequenced genomes. These are the species with a small genome size, arabidopsis and rice. The subtelomeric regions of *Arabidopsis thaliana* chromosomes lack major satellite repeats, as well as multi-copies mobile elements. Unlike arabidopsis rice subtelomeres contain several families of the tandem repeat sequences arranged in discrete clusters with relatively small copy numbers.

The rye *Secale cereale* genome is among the largest plant genomes and it is about 20-fold larger than of rice and 80-fold larger than the arabidopsis genome. Large heterochromatin blocks in subtelomeric regions considerably contribute to an increase in genome size, which had occurred in many species during their evolution. Within the genus *Secale*, the interspecies variation reaches 20% between *Secale cereale* (cultivated rye) and the ancient species *S. silvestre*. *S. cereale* has the highest content of subtelomeric heterochromatin among the *Secale* species and *S. silvestre*, the lowest. Several multicopy tandemly repeated DNA families are major components of the *S. cereale* subtelomeric heterochromatin. Despite that the monomers forming tandem arrays are well characterized, their mutual arrangement, molecular structure, nucleosome organization within the arrays composed of different-sized monomers, and the junctions between arrays and adjacent non-array DNAs are vague. We addressed these issues using the BAC clones carrying rye tandem repeat families with different monomer sizes. Several arrays of each family have been detected in the heterochromatin of rye chromosome 1 short arm. The arrays are of various lengths and display specific patterns of hierarchical arrangement into multimeric blocks, where the monomers form various higher-order repeat (HOR) units. Analysis of the molecular structure shows the following general trend: the HOR units are formed in the central part of tandem arrays, while only

monomers and dimers are present near the boundaries. In a contig of about 130 kb length, we have found the genome region with three tandem repeat families—pSc250, pSc119.2, and *XbaI*—where the arrays of different monomers are directly juxtaposed. The monomers belonging to different families are likely to have different origins. While the *XbaI* monomer in its major part originates from LTR retrotransposon, the pSc250 monomer is a patchwork of numerous fragments with a random homology to different mobile elements. The nonarray genomic DNA flanking tandem monomer arrays is represented by copies of various class retrotransposons, also present in wheat and barley genomes. Our results suggest that only an explosive amplification of pSc200 and pSc250 monomers, on the background of a saturated mixture of various retrotransposons, can be regarded as a specific molecular process in formation of subtelomeres during the divergence of rye genome from the common ancestor of cereals.

As a rule, nucleosomes are regularly spaced in chromatin similar to regularly alternating monomers in the long tandem DNA arrays. Such a similarity in the structure makes these arrays especially interesting for clarifying the role of intrinsic DNA preferences in nucleosome positioning. The Phase method, which we have elaborated, has been applied to clarify the nucleosome positioning patterns along the extended arrays of monomers and the adjacent non-array genomic DNA. The junction sites between the tandem arrays and genomic nonarray DNA, as a rule, fall into the region of linker DNA. Note that in the genomic nonarray DNA, the regions reaching several hundred of nucleotide pairs located immediately before the junction sites display a lowest nucleosome formation potential.

The work is supported by the Russian Foundation For Basic Research (grant 12-04-00512) and Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (integration project 37).

THE TWO PROTEASES, *INVADOLYSIN* AND *NON-STOP*, INTERACT GENETICALLY TO REGULATE CHROMOSOME STRUCTURE IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Janiszewski M.M.¹, Rao S.G.², Duca E.¹, Nelson B.³, Heck M.M.S.¹

¹Centre for Cardiovascular Science, Queen's Medical Research Institute, University of Edinburgh, Edinburgh, UK

²Department of Molecular, Cell and Developmental Biology, University of California, Los Angeles, USA

³Donnelly Center for Cellular and Biomolecular Research, University of Toronto, Toronto, Canada

Higher order chromosome architecture is regulated by several activities, including cyclin-dependent kinases and ubiquitin-mediated proteolysis. In this study, we analyse the role of invadolysin, a novel and conserved metalloprotease, in chromosome structure. We used a second-site non-complementation screen to identify genetic interactors of invadolysin. We have identified a genetic interaction between invadolysin (*IX-14*) and non-stop (*not*), a de-ubiquitinating protease that has been demonstrated to be part of the SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase) chromatin-remodelling complex. *invadolysin* and *non-stop* mutants exhibit phenotypic similarities in terms of chromosome structure in both diploid and polyploid cells. Furthermore, *not*¹/*IX-14*¹ transheterozygotes accumulate mono-ubiquitinated histone H2B and histone H3 tri-methylated at lysine 4. However, these histone modifications do not universally co-localise with one another in wild type polytene chromosomes. Whole mount immunostaining of *not*¹/*IX-14*¹ transheterozygous mutant salivary glands revealed that H2Bub1 accumulates, surprisingly, in the cytoplasm, rather than the nucleus. As the SAGA complex exhibits both DUB and HAT activity, it is thus significant that mutants in other SAGA subunits (*gcn5*, *ada2b* and *sgf11*) suppress an invadolysin-induced rough eye phenotype. We propose that the aberrant chromosome phenotype may be a result of these histone modifications, as ectopic expression of the Bre1 ubiquitin ligase phenocopies the neuroblast chromosome condensation phenotype, as well as resulting in the accumulation of both H2Bub1 and H3K4me3. We therefore propose that invadolysin plays a crucial role in chromosome organization via the ubiquitin pathway.

MOLECULAR BIOLOGY OF MOSQUITO VITELLOGENESIS: FROM BASIC STUDY TO GENETIC ENGINEERING OF ANTIPATHOGEN IMMUNITY

Kokoza V.A., Shin S.W., Zhou Z., Raikhel A.S.

Department of Entomology, University of California, Riverside, USA, vladimir.kokoza@ucr.edu

Mosquito transmit numerous pathogens of devastating human diseases. Elucidation of molecular mechanisms underlying stage- and tissue-specific expression of genes activated by a blood meal is of great importance for current efforts directed towards utilizing molecular genetics to develop novel strategies of mosquito and pathogen control. Regulatory regions of such genes can be used to express anti-pathogen effector molecules in engineered vectors in a precise temporal and spatial manner, designed to maximally affect a pathogen. A transgenic approach was used in our studies of mosquito immunity. We provided evidence that the transgenesis has been instrumental in demonstrating a proof-of-principal concept of creating a vector with elevated resistance to malaria pathogen. We showed that co-overexpression of two effector molecules (cecropin and defensin) with anti-pathogen action in the same transgenic mosquito results in a total refractory phenotype to malaria infection. This research serves as foundation for the future design of mosquito-specific expression cassettes with predicted stage- and tissue-specificity at the desired levels of transgene expression. This also allows overexpression of genes with potentially harmful effects on development, behavior and fertility using Gal4 binary expression system to further refine methods of genetic engineering available now in mosquito vectors.

MURINE MULTICOLOR BANDING

Kosyakova N.¹, Trifonov V.^{1,2}, Mkrtchyan H.^{1,3}, Graphodatsky A.², Liehr T.¹

¹Jena University Hospital, Friedrich Schiller University, Institute of Human Genetics, Kollegiengasse 10, D-07743 Jena, Germany

²Institute of Molecular and Cellular Biology, Lavrentev Str. 8/2, 630090 Novosibirsk, Russia

³Yerevan State Medical University, Faculty of General Medicine, Department of Medical Genetics, Koryun Str. 2, 0025 Yerevan, Armenia

Mouse remains the most accessible mammalian model to study human disease. Multiple murine cell lines are used in research worldwide. However, karyotype stability is rarely checked due to the difficulties in G-banding and R-banding (murine chromosome are all acrocentric and are similar in size). Murine chromosomal rearrangements can only be characterized in detail by molecular cytogenetic approaches. However, FISH methods using whole chromosome paints (WCP), like SKY or mFISH, fail to detect exact breakpoints and do not allow characterization of intrachromosomal rearrangements, such as inversions, deletions or duplications. These limitations can be overcome by FISH banding methods, such as multicolour banding (MCB). Here we present the first multicolor banding probe sets for all 19 murine autosomes and X-chromosome (mcb). All region-specific chromosome paints were obtained by glass-needle microdissection followed by DOP-PCR or whole genome amplification using WGA4 kit (Sigma). 10 to 20 copies of the target region were dissected to generate each DNA library. Different approaches were used to identify the chromosome of interest during microdissection (dissecting from somatic cell hybrids and cell lines with known chromosomal rearrangements, FISH-microdissection based on murine WCP probes). Generated mcb probe sets were successfully applied to karyotype several cell lines (WMP1, WMP2, NIH3T3) and in the study of karyotype evolution of muroid rodents. Application of mcb technique has demonstrated a high potential of mcb probes for evolutionary studies and for cytogenetical characterization of laboratory models.

Supported by the DFG (LI 820/17-1, 436 RUS 17/49/02, 436 RUS 17/135/03, 436 RUS 17/48/05, LI 820/19-1).

REMARKABLE CHROMOSOMAL DIVERSITY IN ETHIOPIAN RODENTS ATTRIBUTED TO *ACOMYS CAHIRINUS* AND *TACHYORYCTES SPLENDENS*

Lavrenchenko L.A., Nadjafova R.S., Bulatova N.Sh.

AN Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow,
llavrenchenko@gmail.com

Three new karyotypes ($2n=40, 44, 52$) are described revealing what are probably new cryptic species of Ethiopian spiny mice (genus *Acomys*). Two other diploid numbers have already been reported for the country in 1968-1993 ($2n=36$ and 68) and, overall, the five known karyotypic forms constitute a common lineage differentiated by a Robertsonian process. Such arrays of karyotypic forms are known as a 'Robertsonian fan' with variation in number of metacentrics from 8 to 14. This view of the situation in Ethiopian *Acomys* is based on standard chromosomal morphology that reveals a constant FN (68) and needs further investigation of chromosome homology by differential staining and/or molecular cytogenetic techniques as well as further molecular phylogenetic analysis. In addition to the preliminarily published materials (Lavrenchenko et al. *Comp Cytogen.* 2011. www.pensoft.net/journals/compcytogen), the acrocentric karyotype with $2n=68$ was found by us in a new locality.

Additional materials from Ethiopia extend the known limits of the variability of the karyotypes of *Tachyoryctes*. Taking into account already published (1993-2005) and our recent data, there are 4 different karyotypes with two $2n$ values (48, 50) in Ethiopian taxa. The new karyotype with $2n=50$ and 4 small metacentric pairs (50/4M) is detected in Simien district in specimens attributed to *T. splendens*. It is unusual for the species which typically showed $2n=48$. Karyotypes with 3 (3M), 4 (4M) and 5 (5M) small metacentrics are found by us in addition to the formerly described 48/3M karyotype, and they all are not simply related. Only the difference between the 4M and 5M karyotypes ($2n=50$ and 48 , correspondingly) may be explained by a Robertsonian change, but homologies with the 48/3M karyotype remain unclear because of the absence of correspondence between the diploid number and the number of metacentrics required in a proposition of Robertsonian rearrangements.

Further analyses of the homology of chromosomes will show whether the presence of the three karyotypes and, in particular, a non-Robertsonian difference of the 48/3M karyotype from 48/5M - 50/4M karyotypes, should be of taxonomic value. If so, at least 3 cryptic species differed in number of metacentrics and $2n$ should be separated among the Ethiopian populations traditionally united under the same species name *T. splendens*. Besides, further detail geographic mapping of heterochromatin variants will be helpful for the statement of complex structure of *Tachyoryctes* taxa not only in Ethiopia, but other parts of the distributional range in Africa as well.

In contrast to results of the geometric morphometry which recently suggested lumping a majority of African populations into a single species, *T. splendens* (Beolchini & Corti. *It J Zool.* 2004) with the exception of *T. macrocephalus*, the endemic of Ethiopian Bale ($2n=50$), the priority of cytogenetic study in structuring genetic taxa of *T. splendens* ($2n=48, 50$) is remarkable.

The support of grants of the Russian Fund of Basic Research (12-04-01283) and Program of RAS Presidium "Dynamics and conservation of genofonds" is acknowledged.

SMALL SUPERNUMERARY MARKER CHROMOSOMES (sSMC)

Liehr T.

Jena University Hospital, Friedrich Schiller University, Institute of Human Genetics,
Kollegiengasse 10, D-07743 Jena, Germany, i8lith@mti.uni-jena.de

Humans normally have a total of 46 chromosomes with each chromosome present twice, apart from the X- and Y-chromosomes in male. About three million individuals, however, do have 47 chromosomes: they have a small supernumerary marker chromosome (sSMC) in addition to the 46 normal ones. These sSMC can originate from each of the 24 human chromosomes and can have different shapes. Approximately one-third of the sSMC carriers show clinical symptoms, in the remaining two thirds the sSMC have no phenotypic effects. Data on >4.600 single sSMC cases were collected during the last years on the freely available sSMC-homepage (<http://www.fish.uniklinikum-jena.de/sSMC.html>). Together with the advance of technical possibilities for a comprehensive characterization of this special group of rearranged chromosomes nowadays already first genotype-phenotype correlations for sSMC became possible. In this review the present knowledge on sSMC including biological background and clinical relevant information are summarized. Supported in parts by Else-Kröner-Fresenius Stiftung.

DIFFERENTIAL DNA REPLICATION IN DEVELOPMENT

Orr-Weaver T.L., Nordman J., Kashevsky H., Alexander J., Sher N., Von Stetina J.R., Bell G.W.

Whitehead Institute and Dept. of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02142, USA

Changes in gene copy number occur frequently in cancer cells, illustrating that proper regulation of DNA replication is crucial. Gene amplification is common in tumors, and chromosome fragile sites, thought to be regions of the genome resistant to DNA replication, lead to genome instability. Despite the prevalence in cancer cells, it has been difficult to determine the primary events leading to gene amplification or under-replication. We have used *Drosophila* as a model to study these mechanisms. In *Drosophila*, differentiated tissues increase DNA content to become polytene by a modified cell cycle called the endo cycle. The entire genome, however, is not integrally doubled in most cells and differential DNA replication occurs. We used aCGH (array Comparative Genome Hybridization) to identify genomic intervals increased or decreased in copy number relative to overall ploidy in seven tissues from different stages of *Drosophila* development. Gene amplification was observed only in the ovarian follicle cells. All seven tissues had under-replicated domains, some common to multiple cell types and others tissue specific. We also have analyzed the transcriptomes from these cell types. In most, but not all, under-replication occurs in domains that are repressed for gene expression.

The six amplified regions in the follicle cells permit investigation of the mechanisms controlling origin activation and replication fork progression. Using transgenes to insert the amplification control elements at ectopic sites in the genome we found that the insertion site affects both the number of rounds of origin firing and the rate of replication fork progression, presumably because of the structure of chromatin at the insertion site.

Specific tissues in mammals also increase their DNA content via an endo cycle. We investigated whether differential DNA replication occurs to change the copy number of specific euchromatic regions by aCGH on DNA from isolated mouse trophoblasts and polyploid megakaryocytes (in collaboration with Prof. Katya Ravid of Boston University Medical School). In striking contrast to *Drosophila*, the euchromatin is uniformly replicated in these cells and domains are not amplified or under-replicated. The integral doubling of the euchromatin in these cells reflects fundamental differences in the regulation of the endo cycle between *Drosophila* and these mouse tissues.

GENETICALLY AND CONDITIONALLY INDUCIBLE DAMID MAPPING OF CHROMATIN PROTEINS IN *DROSOPHILA*

Pindyurin A.V., van Steensel B.

Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands, a.pindyurin@nki.nl

Structural and regulatory components of chromatin are responsible for gene expression program, DNA replication, and genome maintenance. Therefore, genome-wide mapping of chromatin proteins is necessary to understanding the mechanisms of these processes. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) is a commonly used method to achieve this goal, but it requires a highly specific antibody against the protein of interest. Dam identification (DamID) is an alternative method based on *in vivo* expression of the protein of interest fused to DNA adenine methyltransferase (Dam). This way, Dam is targeted to the native binding sites of its fusion partner and methylates adenines in their immediate vicinity. The methylated regions are subsequently selectively amplified and identified by microarray hybridization or high-throughput sequencing. At present, more than a hundred of broadly selected chromatin proteins have been mapped in cultured *Drosophila* Kc167 cells by DamID. However, we and others have found that transgenesis of flies with Dam-expressing vectors is inefficient. In addition, temporal and cell type specific control of Dam(fusion) expression would offer new opportunities to study the dynamics of chromatin proteins during development.

We developed a set of Dam vectors to address these issues. First, we constructed a hypomorphic mutant of Dam by inserting the 4-hydroxytamoxifen-regulated intein (4-HT-intein) in it. In the absence of the ligand, Dam[4-HT-intein] demonstrates about 100 times lower activity compared with the native enzyme. If necessary, the activity of Dam[4-HT-intein] can be enhanced by feeding flies with 4-hydroxytamoxifen. Using this system, we successfully mapped a set of chromatin proteins in the larval brain. Second, we constructed flippase recombinase (FLP)-inducible Dam vectors. In the absence of FLP, no adenine methylation is detected in the genome of such transgenic flies. Stage- and lineage-specific expression of FLP allows identification of chromatin protein targets in the affected cells without the need to sort them out, e.g. in glial cell of the larval brain. Moreover, DamID seems to be superior in sensitivity than ChIP (also in the latter application), since the protein binding profile could be obtained even from an individual larva. All described vectors are suitable for the DamID functional mapping studies on GAL4-driven genetic backgrounds, like gene over-expression or RNAi knockdown. Taken together, our new inducible DamID approaches have a great potential in mapping of chromatin proteins in *Drosophila* tissues and especially cell lineages.

THE ROLES OF TERMININ AND ITS ACCESSORY FACTORS IN *DROSOPHILA* TELOMERE MAINTENANCE

Raffa G.D.¹, Cenci G.², Ciapponi L.¹, Burla R.¹, Saggio I.¹, Gatti M.¹

¹Dipartimento di Biologia e Biotechnologie, Sapienza, Università di Roma

²Dipartimento di Biologia di Base ed Applicata, Università dell'Aquila

Drosophila telomeres are epigenetically determined, sequence-independent structures that are not maintained by telomerase, but by transposition to chromosome ends of specialized retroelements. Genetic and biochemical analyses have recently shown that fly telomeres are capped by terminin, a complex that includes at least four proteins: HOAP, HipHop, Modigliani (Moi) and Verrocchio (Ver). With the exception of Ver, which exhibits a structural homology with Stn1, the terminin proteins are not conserved outside the Drosophilidae and are encoded by fast-evolving genes. Terminin localizes and appears to function only at telomeres just like shelterin, the protein complex that protect human telomeres. Thus, we have previously suggested that terminin is a functional analogue of shelterin. We have now analyzed the structure of terminin using suitable protein truncations and DNA binding assays. HOAP binds double stranded (ds) and Ver single stranded (ss) DNA; Moi does not bind DNA but interacts directly with HOAP and Ver forming a bridge between the two proteins. Thus, the architecture of terminin is similar to that found in other telomere capping complexes including shelterin, where the ss DNA-binding Pot1 protein is connected to the TRF1/TRF2 ds DNA-associated proteins by the non-DNA-binding factor TPP1. Collectively, these results reinforce the idea that the basic mechanisms of telomere capping are conserved from yeast to flies and humans, and support a unifying model for telomere protection.

Drosophila telomeres are also protected by a number of conserved “terminin accessory” factors, which include HP1a, ATM, Mre11, Rad50, Nbs, UbcD1 and Woc. We proposed previously that terminin accessory factors did not evolve as rapidly as terminin because of the functional constraints imposed by their involvement in diverse cellular processes. The *Drosophila* gene, *pendolino* (*peo*) encodes a conserved ubiquitin E2 variant enzyme that interacts with terminin and is required to prevent telomere fusion. We found that the homologues of Peo (AKTIP in humans and Ft1 in mouse) bind TRF1 and TRF2 and are required for proper telomere replication. These findings provide a strong support for the idea that terminin accessory factors identify conserved telomere-related functions.

A NEW CHROMOSOMAL PHYLOGENY SUPPORTS THE REPEATED ORIGIN OF VECTORIAL CAPACITY IN MALARIA MOSQUITOES OF THE *ANOPHELES GAMBIAE* COMPLEX

Sharakhov I.V., Kamali M., Xia A., Tu Z.

Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, United States of America, igor@vt.edu

Understanding phylogenetic relationships within species complexes of disease vectors is crucial for identifying genomic changes associated with the evolution of epidemiologically important traits. However, the high degree of genetic similarity among sibling species confounds the ability to determine phylogenetic relationships using molecular markers. The goal of this study was to infer the ancestral–descendant relationships among malaria vectors and nonvectors of the *Anopheles gambiae* species complex by analyzing breakpoints of fixed chromosomal inversions in ingroup and several outgroup species. We identified genes at breakpoints of fixed overlapping chromosomal inversions 2Ro and 2Rp of *An. merus* using fluorescence *in situ* hybridization, a whole-genome mate-paired sequencing, and clone sequencing. We also mapped breakpoints of a chromosomal inversion 2La (common to *An. merus*, *An. gambiae*, and *An. arabiensis*) in outgroup species using a bioinformatics approach. We demonstrated that the “standard” 2R⁺P arrangement and “inverted” 2Ro and 2La arrangements are present in outgroup species *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus*. The data indicate that the ancestral species of the *An. gambiae* complex had the 2Ro, 2R⁺P, and 2La chromosomal arrangements. The “inverted” 2Ro arrangement uniquely characterizes a malaria vector *An. merus* as the basal species in the complex. The rooted chromosomal phylogeny implies that *An. merus* acquired the 2Rp inversion and that its sister species *An. gambiae* acquired the 2R⁺0 inversion from the ancestral species. The karyotype of nonvectors *An. quadriannulatus* A and B was derived from the karyotype of the major malaria vector *An. gambiae*. We conclude that vectorial capacity, being a recently evolved combination of traits, had originated repeatedly in the complex. Our findings also strongly suggest that saltwater tolerance originated first in *An. merus* and then independently in *An. melas*. The new chromosomal phylogeny will facilitate identifying the association of evolutionary genomic changes with epidemiologically important phenotypes.

A NOVEL MODEL OF NUCLEAR ORGANIZATION DEMONSTRATES THE EFFECT OF NUCLEAR ENVELOPE–CHROMOSOME CONTACTS ON 3D CHROMOSOME ORGANIZATION

Sharakhov I.V., Kinney N.A., Onufriev A.V.

Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, United States of America, igor@vt.edu

We describe a novel technique for modeling interphase nuclear organization that captures the essential biological parameters of polytene chromosomes from salivary glands of *Drosophila melanogaster*. We demonstrate that the contacts formed between chromosomes and the nuclear envelope (Chr-NE contacts) are not formed by chance within the limited nucleus volume, rather, they are determined by chromatin type. We show that the addition of Chr–NE contacts may have long range effects on gene-gene interactions taking place elsewhere in the genome. Our model can be used to simulate chromosome-tracing experiments and objectively determine Chr-NE contact positions. When applied to previously published data, 33 new Chr-NE contacts were revealed which significantly overlap with regions of intercalary heterochromatin and late replication. We develop methods to quantify chromosome territories and intertwining and show that our model reproduces the description of these features from experimentally observed polytene nuclei. Our modeling approach is a valuable tool for studying the interphase nuclear organization of *D. melanogaster* polytene chromosomes, other organisms, and possibly to non-polytene interphase chromosomes of humans.

NEW APPROACHES FOR CHROMOSOME MAPPING OF MOSQUITO GENOMES

Sharakhova M.V.¹, Timoshevskiy V.A.¹, deBruyn B.S.², Severson D.W.², Sharakhov I.V.¹

¹Department of Entomology, Fralin Life Science Institute, Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA

²Department of Biological Sciences, Eck Institute for Global Health, University of Notre Dame, Notre Dame IN, USA, msharakh@vt.edu

Mosquitoes are vectors of numerous deadly human diseases such as malaria, West Nile, dengue, yellow fever, and, lymphatic filariasis. To facilitate the development of new strategies for vector control, the genomes of the three most dangerous species of mosquitoes, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* had been sequenced in the last decade. Among these three species, the vector of dengue and yellow fever viruses, *Aedes aegypti*, has the largest genome with 1,310 Mb. However, about half of this genome is represented by transposable elements, causing very poor development of polytene chromosomes. As a result of the highly repetitive nature, the genome for this mosquito is hard to assemble and map to chromosomes. Previous work based on genetic mapping, assigned only ~31% of *Ae. aegypti* genome sequences to the chromosomes without order and orientation. The physical map developed for *Ae. aegypti* in the past included only 37 markers. This map was distance-based: each clone was placed to the chromosome depending on the distance from the telomere on the short arm (p-terminus). Here, we report the first band-based chromosomal map of the *Ae. aegypti* genome. For the first time, we developed idiograms for the mitotic chromosomes of *Ae. aegypti*. Three chromosomes of the mosquito were subdivided into 23 regions and 94 subdivisions. Instead of previously used cell lines, which usually accumulate chromosomal rearrangements, our method utilized chromosomes from a live mosquito. We found that imaginal discs of 4th instar larvae are an excellent source of mitotic chromosomes. Based on results of fluorescent *in situ* hybridization (FISH), a total of 500 BAC clones from the largest genomic supercontigs was assigned to the specific band onto idiograms. The BAC clone locations within the supercontigs were predicted by fingerprint analysis. BAC clones were directly labeled with Cy3 and Cy5 fluorescent dyes by nick-translation. Unspecific hybridization of the repetitive DNA was prevented by adding unlabeled C₀t1-3 DNA fraction to the probe in 1:20 ration. From all BAC clones, which were mapped, 106 were carrying previously mapped major genetic markers. These BAC clones were additionally ordered within each band by multicolor FISH because of the importance to link their genomic locations to the genetic locations of quantitative trait loci (QTL) related to pathogen transmission. The current study placed ~50% of the *Ae. aegypti* genome to precise chromosomal positions and also for the first time combined cytogenetic, genetic and genome maps into one integrated physical map (iMap) of the yellow fever mosquito. Further application of this map will enhance the quality of the current genome assembly of *Ae. aegypti* and also will help to find the genomic locations of QTL that might be important targets for developing advanced genome-based strategies for vector/disease control.

A SHORT INTRODUCTION TO CYTOGENETIC STUDIES OF LESSER APE CHROMOSOMES

Stanyon R.¹, Rocch M.², Archiadiacono N.²

¹Department of Evolutionary Biology, University of Florence, Florence, Italy,
roscoe.stanyon@unifi.it

²Department of Genetics and Microbiology, University of Bari, Bari, Italy

In the 1960s on the basis of classical staining some worker erroneously allied lesser apes with leaf eating monkeys (Colobinae). Later, difficulties in matching banded hylobatid chromosomes to humans led other researchers to equally wild and erroneous conclusions about gibbon phylogeny. Chromosome painting revealed that these errors were due to the vast number of rearrangements that had rapidly transformed gibbon karyotypes. Indeed, the small apes are one of the most dramatic examples of extremely rapid karyotype evolution and it is intriguing to note that among the Hominoidea the hylobatids have the highest number of species (anywhere from 14 to 19). However, because the rearrangements were so complex, chromosome painting did not allow final conclusions about the steps that led to the four existing karyomorphs ($2n= 38, 44, 50$ and 52) that typifies each genus of small apes or permit confidence in their exact phylogeny. Here the results of FISH using panels of 500-800 BAC on the karyotypes from species of each of the four small ape genera are summarized. Breakpoints were defined by spanning or flanking BACs with an average resolution of about 140 kbp. These data provides the basis to understand the steps that led to the amazing chromosomal diversity found today among small apes and permitted a more complete and accurate reconstruction of the hylobatid ancestral karyotype. The precise definition of synteny block boundaries and orientation, chromosomal fusions, and centromere repositioning events will facilitate genome sequence assembly for these close relatives of humans.

EVOLUTION OF KARYOTYPES AND SEX DETERMINATION SYSTEMS IN SQUAMATA: A MOLECULAR CYTOGENETICAL APPROACH

Trifonov V.A.¹, Kichigin I.G.¹, Giovannotti M.², Rens W.³, Pokorna M.⁴, Kratochvil L.⁴, O'Brien P.³, Ferguson-Smith M.³, Graphodatsky A.¹

¹Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk

²Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy

³Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics, Department of Veterinary Medicine, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

⁴Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic

Squamata is the largest reptilian order including snakes and reptiles. A variety of sex determination mechanisms are described within the taxon including sex chromosomes (either XX/XY or ZZ/ZW) and temperature-dependent sex determination (TDS). Most of sex chromosome systems within reptiles were discovered using methods of classical cytogenetics, and many squamate species remain unstudied. Comparative chromosome painting has mostly been applied on therian species with stable chromosome determination system (XX/XY) to describe the evolutionary rearrangements of karyotypes. Here we report the application of squamate chromosome specific libraries in different reptile lineages which allowed to demonstrate relative karyotype conservation and to describe the sex chromosomal systems.

INTRASPECIFIC DROSOPHILA MELANOGASTER HYBRID DYSGENESIS AND ITS CONNECTION WITH MOBILITY OF TRANSPOSABLE ELEMENTS

Zakharenko L.P., Dorogova N.V., Fedorova S.A.

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia, zakharlp@bionet.nsc.ru

In the last century the phenomenon of so-called intraspecific hybrid dysgenesis (HD) was described for *Drosophila melanogaster*. HD is realized usually only in one cross-direction. One of the strongest HD manifestations is female sterility for some marker strains. It is considered that HD appears as a result of active moving of transposable elements (TEs). It is described several types of HD. The most known PM and IR HD are presumably caused by active moving of *P* and *I* elements correspondingly.

However, we suppose, that rate of TEs transposition is insufficiently high to provide practically 100 % the same well reproduced manifestation of HD for marker strains. Each *Drosophila melanogaster* TE family is represented by 10-20 active copies. Rate of moving of TE varies from 10^{-2} to 10^{-5} . It means that no more than one-two copies of TE can change its position per genome for generation. In general, TE transpositions in a genome are statistical process. In different individuals TEs can be found in different bands of polytene chromosomes. There are some conformational preferences for the sites of TE insertions, but there are no strong nucleotide consensuses. Moreover we did not found new hybridization sites of *P-element* on the polytene chromosomes of dysgenic larvae. At the same time PM HD manifestation for marker strains was very reproducible: all dysgenic females had defective ovaries if hybrid progeny was grown up at the high temperature.

On the other hand, according to our FISH data a position of every fifth TE doesn't coincide with the *in silico* data, received about 20 years ago for the *y cn bw sp Drosophila melanogaster* completely sequenced genome. Thus, some TEs families are stable, others (including *I* element) move with a rate $10^{-2} - 10^{-3}$ per genome for generation. However it was not noticed any dysgenic trades in the given strain.

Different HD types are realized in marker strains only under definite conditions. It is necessary to grow up PM dysgenic progeny under elevated temperature. In this case the dysgenic females have defective ovaries. IR HD is shown only for young females. IR dysgenic females can lay eggs, but development of embryos from such eggs goes only up to a stage of hatching. This feature of HD development suggests that certain epigenetic mechanisms may be involved in HD realization.

We found also that reduced ovaries of PM dysgenic females do not contain germ stem cells. The embryonic development and the beginning of larval age are temperature sensitive for manifestation of HD. We studied moving of pole germ cells during the embryogenesis and found that the number of germ stem cells is equal in both cross directions at the beginning, but the part of germ stem cells is lost in dysgenic embryos in late embryogenesis.

Participation of TE in HD manifestation in our opinion is extremely improbable if to consider only their transposition on a genome, however it could be possible for other reasons. There is an assumption that piRNA, being derivative of TE, participates in regulation of a gene expression during embryogenesis (Rouget et al., 2010) and germ stem cells division (Samji, 2009). As manifestation of PM HD depends on temperature, and manifestation of IR HD depends on age of females, epigenetic regulation of activity of the key genes responsible for formation of ovaries can be involved in process.

Acknowledgments: The work was partially funded by 09-04-00213a and 10-04-00075a grants RFBR and grant 30.30 “Wild nature” of Russian Academy of Sciences.

КАРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ *AURELIA AURITA* ИЗ АКВАТОРИИ БЕЛОГО МОРЯ И ЕЕ КРИПТОВИДА (*AURELIA SPI*) ИЗ ЯПОНСКОГО МОРЯ
KARYOLOGICAL ANALYSIS OF *AURELIA AURITA* FROM THE WHITE SEA AND ITS CRYPTIC SPECIES (*AURELIA SPI*) FROM THE JAPAN SEA

Адонин Л.С., Найден А.В., Котова А.В., Подгорная О.И., Демин С.Ю.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, leo.adonin@gmail.com

Несмотря на то, что *A. aurita* – наиболее изученный вид морских кишечноротовых, ее таксономия, биогеография, филогеография и эволюция изучены очень слабо (Dawson, Jacobs, 2001, Bayha et al., 2010). Затруднения начинаются с диагноза вида. По морфологии в роде *Aurelia* в настоящее время удается дифференцировать только три вида *A. labiata*, *A. limbata* и *A. aurita* (Russell, 1970). Хотя в начале прошлого века в роде *Aurelia*, наряду с хорошо морфологически отличимыми видами *A. labiata* и *A. limbata*, выделяли более десяти видов (Mayer, 1910), на сегодняшний день включенных в *A. aurita*. В последнее время проявляется большой интерес к валидности таксона, как отдельного вида, что подтверждено молекулярными данными: исследователи выделяют от 9 до 14 видов, при этом 6 (11) из них являются криптовидами *A. aurita* (Dawson, Jacobs, 2001; Dawson, 2003). Описанная ситуация дополнительно осложняется тем, что в крупных гаванях возможно появление межвидовых гибридов *Aurelia* (Matsumara et al., 2005). Наилучшим способом решения этой проблемы, вероятно, могла бы быть кариосистематика, которая позволяет относительно легко дифференцировать виды-двойники. Но, к сожалению, кариосистематика морских беспозвоночных находится в зачаточном состоянии. Имеется только одна кариологическая работа, выполненная на медузах *A. aurita* из южной части Мексиканского залива (Diupotex-Chong et al., 2009). Молекулярно-таксономической характеристики животных этой популяции авторы не определяли, а представленный в статье кариотип совершенно не пригоден для диагноза вида по хромосомам. Цитогенетического протокола получения препаратов хромосом из клеток медуз не существует. Не существует и стабильно работающих методов дифференциального окрашивания хромосом морских беспозвоночных. Вместе с тем такие техники совершенно необходимы. Во-первых, это нужно для надежной идентификации индивидуальных хромосом набора и видового кариотипа. Во-вторых, это необходимо для хромосомной локализации генов и картирования их на хромосомах с помощью методов молекулярного зондирования (FISH).

Нами разработан воспроизводимый протокол получения препаратов хромосом из клеток личиночных стадий развития медузы *A. aurita*. Наилучшие результаты получены на

личинках, выделенных из медуз либо сразу после отлова, либо после 5 дней адаптации к условиям морского аквариума. Личинок подвергали 10-15 мин гипотонической обработке в 110-140mM KCl при комнатной температуре. Для фиксации и последующего G-сегментирования хромосом использовали протокол (Islam, Levan, 1987), позволяющий снизить чувствительность хромосом к действию протеаз, к которым особо чувствительны хромосомы беспозвоночных, и достичь воспроизводимых результатов при дифференциальном G-окрашивании хромосом медуз. Для получения DAPI-сегментации хромосом использован модифицированный протокол (Heng, Tsui., 1993).

Установлено, что для идентификации паттерна бэндов у всех хромосом набора пригодны только спрэды прометафазных и позднепрофазных хромосом. В метафазе после дифференциального окрашивания удается различить не более трети самых крупных хромосом набора. В ранне-метафазных клетках идентификация как минимум 3-4 пар коротких хромосом набора представляется затруднительной.

Кариотип *A. aurita* (губа Чупа, Кандалакшский залив, Белое море) представлен 8 парами субметацентрических (№№ 1,2,3,7,8,9,10,14) и 11 парами акроцентрических хромосом ($2n=38$).

Кариотип *Aurelia sp1* (Амурский залив, Японское море) представлен 3 парами субметацентрических (№№ 1,2,3) и 14 парами акроцентрических хромосом ($2n=34$).

В кариотипе *Aurelia sp1* по сравнению с *A. aurita* утрачены довольно крупные хромосомы №№ 12 и 14, короткие плечи хромосом №№ 6, 7, 8, 9, 12, а также дистальные участки обеих плеч хромосомы № 1 (из-за этого она в кариотипе *A. sp1* стала короче, чем хромосома № 2 *A. aurita*) и длинного плеча хромосом №№ 10 и 11.

Таким образом, согласно кариологическим данным *Aurelia sp1*, выделенный Доусоном с коллегами на основании молекулярных исследований из вида *Aurelia aurita*, является валидным видом, легко идентифицируемым по кариотипу.

БЕЛОК “ЧЕРНОГО ХРОМАТИНА” SUUR В ООГЕНЕЗЕ И РАННЕМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Андреева Е.Н., Шлома В.В.

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Хроматин играет важную роль в регуляции функционирования наследственного материала. В геноме *D. melanogaster* в культуре клеток Kc167 методом DamID было выявлено 5 типов функционального хроматина, различного по составу белков. Наиболее поздно реплицирующиеся районы генома представлены в транскрипционно неактивном хроматине. Молчащий хроматин включает три класса: “зеленый” – ассоциированный с белком HP1, “синий” - с белками PcG, “черный” – с белками SUUR, гистоном H1, D1 и IAL. В состав “черного” хроматина входят также такие белки как ламин Dm0, SU(HW) и EFF, а активные гистоновые метки H3K4me2 и H3K79me3 в нем отсутствуют. В клетках Kc две трети молчащих генов генома дрозофилы содержится в “черном” хроматине. В настоящее время предполагается, что «черный» хроматин не только маркирует транскрипционно неактивный хроматин, но и непосредственно связан с репрессией транскрипции, однако механизм репрессии в этих районах неизвестен. РНК генов черного хроматина детектируется на всех стадиях развития дрозофилы и наиболее высокий уровень РНК наблюдается на стадии раннего эмбрионального развития и в яичниках. В связи с этим возникает вопрос о роли специфических белков черного хроматина, в частности, белка SUUR. В настоящей работе исследовалось поведение этого белка в оогенезе и раннем эмбриогенезе.

Методом непрямой иммунодетекции в целых яичниках дрозофилы мы показали, что белок SUUR в норме детектируется в гермари (в герминальных и фолликулярных стволовых клетках), в ядрах питающих клеток и ооцита начиная со 2 стадии развития яйцевых камер. В ядрах питающих клеток белок SUUR детектировался вплоть до программируемой дегенерации питающих клеток. Белок SUUR активно транспортируется в ооцит и накапливается в будущем яйце. Мы показали, что для ядерной локализации белка SUUR в клетках яичников дрозофилы необходим белок Lamin Dm0. У мутантов *SuUR[ES]* повышена частота встречаемости апоптозов на 8-9 стадии развития яйцевых камер. При культивировании мух на 29 градусах Цельсия в линии *ru h SuUR[ES]* резко увеличивается число апоптозов в яйцевых камерах на стадиях 2-9, что приводит к стерильности самок. Мы обнаружили, что у мутантов *SuUR[ES]* отсутствие белка SUUR приводит к появлению двуцепочечных разрывов ДНК в хромосомах питающих клеток, что может служить причиной повышения числа апоптозов. Наличие двуцепочечных разрывов ДНК также

может приводить к изменениям параметров клеточного цикла. Мы проверили, как распределяется *sucln E* (переход конец G-начало S фазы) и PCNA (маркер S-фазы) в ядрах питающих клеток. Оказалось, что у мутантов *SuUR[ES]* увеличена доля яйцевых камер, у которых в ядрах питающих клеток нет *sucln E* и практически нет PCNA, что позволяет предполагать, что значительная доля питающих клеток может находиться в конце S-фазы или в G- фазе.

К увеличению числа двуцепочечных разрывов ДНК может приводить повышение уровня экспрессии транспозонов. Известно, что белок SUUR взаимодействует с гетерохроматиновым белком HP1a, который напрямую взаимодействует с белком PIWI (один из ключевых белков, участвующих в регуляции экспрессии транспозонов). Кроме того, HP1 связывается с ДНК в 5'UTR транспозона ZAM. Мы обнаружили, что в яичниках мутантов *SuUR[ES]* уровень экспрессии транспозонов *Zam* и *Gypsy* в 18 раз выше, чем в диком типе. В питающих клетках у мутантов *SuUR[ES]* нарушена регуляция экспрессии *Zam*, поскольку в эмбрионах (0-2 часа) количество транскриптов *Zam* увеличено в 14 раз. Полученные нами данные позволяют говорить о том, что белок SUUR как компонент черного хроматина важен для поддержания целостности генома.

Мы обнаружили, что на стадии второго деления мейоза у самок белок SUUR детектируется в ядрах. Кроме того, SUUR выявлен в ядре спермия, претерпевающего декомпактизацию в процессе преобразования в мужской пронуклеус. Также этот белок обнаружен в сформировавшихся ядрах мужского и женского пронуклеусов, находящихся на стадии сближения и удвоения ДНК.

В эмбрионах дрозофилы на стадиях деления дробления локализация SUUR в хроматине меняется в ходе клеточного цикла. Так, с 1 по 10 деление дробления белок SUUR детектируется в хроматине уже на стадии анафазы клеточного цикла, но отсутствует в метафазе. На протяжении всего S-периода SUUR присутствует в хроматине на всех стадиях делений дробления. Начиная с 13 деления дробления SUUR начинает выявляться исключительно в S-периоде, что отражает процесс постепенного формирования гетерохроматина на стадиях деления дробления. Поскольку на стадиях делений дробления в эмбрионах дрозофилы нет подразделения хроматина на функциональные домены и отсутствует транскрипция (за исключением небольшого числа генов), то полученные нами данные позволяют считать белок SUUR одним из белков-инактиваторов транскрипции, либо предполагать, что он каким-то образом влияет на процесс репликации ДНК в клетках эмбрионов, находящихся на стадиях делений дробления.

РАЙОНЫ ПРИКРЕПЛЕНИЯ ХРОМОСОМ К ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКЕ МАЛЯРИЙНЫХ КОМАРОВ ИМЕЮТ ОБЩИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК

Артемов Г.Н., Сапунов Г.А., Стегний В.Н.

Томский государственный университет, г. Томск, glebsapunov@yandex.ru

У малярийных комаров в трофоцитах яичников формируются политенные хромосомы, которые образуют выраженные контакты с ядерной оболочкой (районы прикрепления; РП). Близкие виды малярийных комаров различаются по наличию или отсутствию РП хромосом, месту расположения этих районов на хромосоме и их морфологией (Стегний, 1979). Молекулярная организация таких районов вызывает интерес, так как их последовательность ДНК или/и белковый состав обеспечивает свойство крепления к ядерной оболочке. Анализ молекулярной структуры РП хромосом необходимо проводить, сравнивая организацию РП разных хромосом одного вида и хромосом близкородственных видов.

Ранее была получена ДНК РП XL хромосомы из трофоцитов малярийного комара *Anopheles messeae* Fall. методом микродиссекции и определена нуклеотидная последовательность фрагментов ДНК данного района (Сайджафарова и др., 2007; Артемов и Стегний, 2011). Также была проведена гибридизация ДНК РП XL хромосомы с политенными хромосомами трофоцитов *An. messeae* и *An. atroparvus* Thiel. Обнаруженный сигнал в РП 3R хромосомы (район 32d), прицентромерном гетерохроматине (ПГХ) хромосомы 2 (район 15d) и хромосомы XL свидетельствуют о наличии гомологичных последовательностей в данных районах (Артемов и др., 2010). Хромосома 2 и ПГХ XL хромосомы не имеют контактов с ядерной оболочкой, но при гибридизации в этих районах был также обнаружен сигнал. Результаты работы показывают отсутствие непосредственной связи между составом ДНК в районе хромосомы и функцией контакта с ядерной оболочкой; из чего следует, что ДНК районов прикрепления разнокачественна. Между тем по результатам анализа в программе ChrClass, около 75% клонов оказались гомологичными ДНК, выделенной из внутриядерных структур гепатоцитов мыши, участвующих в прикреплении хромосом к ЯО. Таким образом, РП образуют последовательности ДНК разных классов, одни из которых участвуют в контакте с ядерной оболочкой, а другие характерны только для гетерохроматина. Цель настоящего исследования заключалась в разделении данных последовательностей и выделении тех, которые обеспечивают контакт хромосомы с ядерной оболочкой.

Методом микродиссекции хромосом были получены ДНК-пробы РП хромосом 3R *An. messeae* и XL *An. atroparvus* (Артемов и др., 2010) и района прицентромерного

гетерохроматина 15d хромосомы 2 *An. messeae*. ДНК-пробы использовали для приготовления зонда, которые гибридизовали с ДНК библиотеки клонов РП XL хромосомы *An. messeae*. Результатом дот-блот гибридизации ДНК изучаемых районов на нитроцеллюлозной мембране были пятна различной яркости. В настоящей работе мы проводили только качественную оценку наличия или отсутствия в изучаемом районе тех или иных последовательностей ДНК библиотеки клонов РП XL *An. messeae*. Полученные в ходе дот-блот гибридизации результаты демонстрируют, что РП хромосом, а также прицентромерный гетерохроматин хромосом, не взаимодействующих с ядерной оболочкой, различаются по составу последовательностей ДНК.

РП хромосомы XL *An. messeae* содержит набор ДНК, в состав которого входят последовательности, специфичные только для РП хромосом, в том числе разных видов, а также последовательности характерные для гетерохроматина

7% проанализированных клонов, присутствуют в ПГХ всех хромосом *An. messeae* (тандемный повтор с консенсусом GAAGTATGAAAGA), а также ПГХ хромосом *An. messeae* и *An. atroparvus* (LINE-элементы, SAR/MAR). 11% клонов было обнаружено только в районах прикрепления изучаемых видов. Эти клоны содержали SAR/MAR, ДНК синаптонемного комплекса, а также тандемный повтор с консенсусом GAAAGGAGAAA. Общими для РП 3R и XL хромосомы *An. messeae* оказалось лишь 4% клонов, включающих ДНК ядерной ламины и ядерного матрикса. Наиболее представленным (63%) оказался класс последовательностей характерных для РП XL хромосом *An. messeae* и *An. atroparvus*. Он включает многочисленные LINE-элементы, тандемные повторы с консенсусами TAC и TC, фрагмент экзона гена, гомологичного гену AAGAP005897 *An. gambiae*, ДНК ядерной ламины и ядерного матрикса. Лишь 15% клонов библиотеки, которые не были выявлены в результате скрининга библиотеки клонов РП XL хромосомы *An. messeae* мы отнесли к районспецифичным (это LINE-элементы, тандемные повторы AAAGAAAGAACGAAAG, TTTTGT TTTTGT TTTGG и фрагменты генов, гомологичных AAGAP001531, AAGAP005897, AAGAP000621 *An. gambiae*).

Таким образом, в результате настоящей работы мы можем заключить, что РП хромосомы XL действительно содержат последовательности по-разному представленные в районах прикрепления хромосом. Предварительные результаты анализа показывают, что наиболее сходства в последовательности ДНК проявляют районы прикрепления XL хромосом *An. messeae* и *An. atroparvus*, хотя эти районы не являются гомейологичными.

Работа финансируется грантом Президента РФ для поддержки молодых ученых – кандидатов наук МК-4158.2012.4, грантом компании ОПТЭК для поддержки молодых ученых (№69/11 КЦ)

МАЛЯРИЙНЫЕ КОМАРЫ *ANOPHELES MESSEAE* И *ANOPHELES ATROPARVUS* РАЗЛИЧАЮТСЯ ПО ЛОКАЛИЗАЦИИ ЛАМИНА НА ХРОМОСОМАХ ТРОФОЦИТОВ ЯИЧНИКОВ

Артемов Г.Н., Сапунов Г.А., Стегний В.Н.

Томский государственный университет, г. Томск, center_cu@res.tsu.ru

Пространственная организация хромосом в трофоцитах яичников является видоспецифичным признаком у малярийных комаров *Anopheles* комплекса «*maculipennis*» (Стегний, 1979). Виды *Anopheles* могут различаться по наличию или отсутствию в хромосомах трофоцитов районов, которые обеспечивают их крепление к ядерной оболочке (районов прикрепления), а также морфологическими характеристиками этих районов и их положением на хромосоме (Стегний, 1979). Районы прикрепления, обычно имеют нарушенную дисковую исчерченность и соответствуют характеристикам прицентромерного β -гетерохроматина хромосом слюнных желез *Drosophila virilis* (Heitz, 1928). Характерной особенностью районов прикрепления является образование веерообразных отростков, которые распластаны на внутренней поверхности ядерной оболочки или формирование «присосок» (Стегний, 1979). Механизмы взаимодействия хромосом с ядерной оболочкой в трофоцитах малярийных комаров и пути реорганизации этих районов, которые привели к столь дискретным межвидовым различиям, до сих пор остаются не выясненными.

Известно, что ламин В типа у дрозофилы – Dm0 представляет собой основной компонент ядерной оболочки и встречается во всех тканях этого насекомого (Stuurman et al., 1995). В настоящей работе с помощью антител к ламину Dm0 дрозофилы локализовали остатки ядерной ламины на хромосомах трофоцитов *An. messeae* и *An. atroparvus*. Места локализации ламина на хромосомах свидетельствуют о взаимодействии этих районов хромосом с ядерной оболочкой. Нам было интересно выяснить имеют ли, описанные ранее на цитологическом уровне, районы прикрепления хромосом трофоцитов малярийных комаров (Стегний, 1979) остатки ядерной ламины, существуют ли другие районы которые контактируют с ядерной оболочкой и если да, то имеют ли место межвидовые различия в локализации ламина на хромосомах трофоцитов.

Иммуноокрашивание хромосом трофоцитов *An. messeae* показало, что районы прикрепления XL хромосомы и правого и левого плеча хромосомы 3 взаимодействуют с ламинном. В районе прикрепления XL хромосомы (район 2bc) мы наблюдали яркий сигнал, в то время как в районах прикрепления 3R (32d) и 3L (33c) хромосом сигнал был очень слабый и наблюдался не во всех ядрах. Вероятно, что такой характер сигнала может быть связан с довольно сильной деконъюгацией хроматиновых фибрилл в районе прикрепления

хромосомы 3. Наиболее яркие сигналы были обнаружены нами в дистальных районах прицентромерной области хромосомы 3 (районы 33a и 33bc) и в прицентромерном участке хромосомы 3R (район 32c). Неожиданным оказалось то, что в прицентромерном районе хромосомы 2 был обнаружен тонкий ярко окрашенный бенд, хотя на цитологическом уровне было показано, что хромосома 2 не образует контактов с ядерной оболочкой. Сигналы в виде тонких бендов распределенных вдоль плеч наблюдались во всех хромосомах трофоцитов *An. messeae*. Довольно примечательным оказалось то, что район прикрепления XL хромосомы и дистальный район прицентромерного участка 3R хромосомы, несут яркие сигналы, которые на препаратах локализовались только по одну сторону хромосомы. Это наблюдение показывает, что хромосомы в этих районах взаимодействуют с ядерной оболочкой только теми хроматиновыми фибриллами, которые обращены к ядерной оболочке.

Результаты иммуноокрашивания хромосом трофоцитов *An. atroparvus* в целом дали сходный результат с полученным на *An. messeae*. Однако были найдены два существенных отличия: 1) сайты локализации сигналов в прицентромерной области 3R хромосомы *An. atroparvus* и *An. messeae* имели различия: у *An. atroparvus* наблюдали два сигнала в прицентромерной зоне; 2) ламин не был обнаружен в районе прикрепления XL хромосомы *An. atroparvus*. Последнее наблюдение чрезвычайно важно, так как XL хромосома *An. atroparvus* не имеет других районов настолько же ярко окрашенных антителами к ламину как район прикрепления XL хромосомы *An. messeae*. Таким образом, проведенное нами исследование послужило серьезным доказательством видоспецифичности пространственной организации хромосом в ядре. Было продемонстрировано, что хромосомы разных видов могут различаться паттерном сайтов, взаимодействующих с ламинном. Однако не все эти районы, по-видимому, способны обеспечивать крепление к ядерной оболочке, как например, локус в прицентромерном районе хромосомы 2. Перед нами открылась новая сторона проблемы «разнокачественности» структуры районов прикрепления XL хромосом *An. messeae* и *An. atroparvus*, которая обсуждалась ранее в других работах (Артемов и др., 2010; 2011). Очевидно, что функция прикрепления хромосом к ядерной оболочке может обеспечиваться несколькими механизмами и в процессе видообразования эти механизмы сменяют друг друга или комбинируют, что приводит в конечном итоге к реорганизации внутриядерной архитектуры.

Работа финансируется грантом Президента РФ для поддержки молодых ученых – кандидатов наук МК-4158.2012.4, грантом компании ОПТЭК для поддержки молодых ученых (№69/11 КЦ)

ОСОБЕННОСТИ СЕЛЕКЦИИ СПЕРМАТОЦИТОВ I ПОРЯДКА МЫШИ В ОТВЕТ НА ВВЕДЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Ацаева М.М.^{1,2}, Дадашев С.Я.¹, Корноухова А.Г.¹, Коломиец О.Л.¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

²Чеченский государственный университет, г. Грозный, acaeva-mm@mail.ru

Известно, что действие многих противоопухолевых и противотуберкулезных препаратов может приводить к полному или частичному блоку мейоза и стойкому нарушению фертильности. Антибиотики и другие антимикробные препараты также обладают высокой метаболической активностью, однако представления об их влиянии на спермато- и оогенез и потомство весьма противоречивы. Ранее нами не было обнаружено ни количественных, ни качественных изменений в спермограммах самцов мыши после введения антибиотиков трех групп, хотя при электронно-микроскопическом анализе СК были выявлены множественные хромосомные нарушения.

Целью настоящего исследования служило выявление особенностей повреждающего действия лекарственных антимикробных препаратов трех групп на ядра сперматоцитов мыши и анализ селекции поврежденных геномов на стадии профазы I мейоза. В работе были использованы половозрелые самцы мыши - F1 (СВА x C57BL/6). Самцы были разделены на 5 групп по 6 животных в каждой. Ежедневно в течение 10 дней животным I группы внутрибрюшинно вводили «Секстофаг» (поливалентный пхиобактериофаг); животным II группы – фурацилин (производное 5-нитрофурана); животным III группы – «Цифран» (антибиотик группы фторхинолонов). В качестве отрицательного контроля исследованы мыши IV группы, которым вводили высоко генотоксичный противоопухолевый препарат – циклофосфан; в качестве положительного контроля использованы мыши V группы, которым вводили воду для инъекций. Препараты вводили в терапевтической дозе. Животных забивали на 1, 10 и 36 сутки после окончания введения перечисленных препаратов. Исследовано не менее 100 препаратов распластанных синаптонемных комплексов (СК), полученных от каждого самца. Препараты СК окрашивали с помощью антител против белка SCP3; гистона гамма H2AX и белков кинетохора (ACA). Хроматин окрашивали Dapi. Наиболее тяжелые нарушения СК выявлены на 1-ые сутки после окончания введения препаратов. Особого внимания заслуживает фрагментация хромосом (ФР-хр). В некоторых ядрах не идентифицируется ни один СК, ни половые хромосомы, а видны только короткие фрагменты осевых элементов. ФР-хр выявлена в 100% клеток на стадии профазы I мейоза после окончания введения циклофосфана и фурацилина; в 43% ядер после введения цифрана. Совершенно

неожиданным оказалось выявление фрагментации СК в 32 % ядер после введения бактериофага. Этот препарат был выбран нами в качестве альтернативы антибиотикам. Долгое время считалось, что использование бактериофагов не вызывает побочных эффектов. Однако, в последнее время в литературе появились данные о том, что бактериофаги могут участвовать в формировании негативных свойств возбудителей. Описана возможность генетического обмена не только между геномами бактерий и фагов, но и между геномами фагов и эукариот. Следует подчеркнуть, что при столь высокой частоте клеток с Фр-хр доля клеток, в которых выявлена ассоциация половых хромосом с аутосомами встречается гораздо реже. С половым бивалентом ассоциировали только гетероморфные биваленты, но не фрагменты СК или осевых элементов. Как известно, ассоциация поврежденных СК с половым бивалентом, нарушение формирования полового тельца являются типичными признаками пахитенного ареста (ПА), при котором происходит сайленсинг асинаптированных участков аутосом. Одним из маркеров сайленсинга хроматина при ПА является гамма H2AX. Фрагменты СК не ассоциируют с XY бивалентом и не связываются с гамма H2AX. После введения всех перечисленных препаратов выявлен также преждевременный асинапсис аутосом и половых хромосом, нарушение формирования полового тельца. Такие нарушения несут риск анеуплоидии сперматозоидов и потомства. После введения фурацилина на 10 и 36 сутки наблюдалось формирование кольцевых хромосом в 10% ядер и резкое нарушение архитектоники ядер. После отмены препаратов отмечено постепенное снижение нарушений в структуре СК. Однако, даже на 36-е сутки доля их остается высокой, что свидетельствует о том, что нарушения генома имели место и в стволовых сперматогенных клетках. Кроме того, в 3% ядер сперматоцитов после введения бактериофага выявлены загадочные кольцевые структуры, с которыми связывались антитела к - SCP3. Получены последовательные картины «отпочковывания» таких колец от латеральных элементов СК.

Мы полагаем, что выраженная фрагментация хромосом в профазе I мейоза является проявлением мейотической катастрофы по аналогии с т. н. митотической катастрофой, которая рассматривается как сложный молекулярный механизм, предотвращающий анеуплоидизацию соматических клеток и являющийся защитным механизмом, направленным против возможности их малигнизации. Мейотическую катастрофу можно рассматривать в качестве механизма, направленного на защиту последующих поколений от генетического груза. Нельзя исключить, что фрагментация хромосом обусловлена не только генетическими нарушениями хромосом, но, возможно, и токсичностью вводимых препаратов, нарушающих метаболизм сперматоцитов. Таким образом, мейотическая катастрофа может являться следствием энергетической катастрофы.

ЗАГАДОЧНАЯ СИСТЕМА ДЕТЕРМИНАЦИИ ПОЛА У СЛЕПУШОНОК *ELLOBIUS*, ИЛИ ВОЗМОЖНА ЛИ ЖИЗНЬ БЕЗ Y-ХРОМОСОМЫ

Баклушинская И.Ю.¹, Коломиец О.Л.², Романенко С.А.³, Матвеевский С.Н.², Графодатский А.С.³, Ляпунова Е.А.¹, Джаст В.⁴

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва, irina.bakl@gmail.com

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

³Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

⁴Университет г. Ульм, Германия

Представления об эволюции половых хромосом и генов каскада определения пола у млекопитающих претерпели значительные изменения в последние годы. Описание множественных половых хромосом у однопроходных млекопитающих, различий структуры XX-XY хромосом и первичных факторов, определяющих формирование семенников ("testis-determining factor", TDF), у двух других инфраклассов свидетельствуют о значительном разнообразии механизмов определения пола в пределах класса Mammalia. Ведущая роль Y-хромосомы в детерминации пола у плацентарных млекопитающих определяется наличием TDF, гена *SRY* (*Sex-determining Region Y*), (Sinclair et al., 1990; Kashimada, Koorman, 2010). Существует ряд исключений, описанных у грызунов, например: у *Myopus schisticolor*, *Dicrostonyx torquatus*, *Akodon* sp. при обычном наборе половых хромосом у самцов наблюдаются отклонения у части самок, которые могут иметь как XX, так и XY (Fredga 1983; Hoekstra & Edwards 2000); у *Microtus oregoni* самцы – XY, а часть самок – X0 (Ohno et al., 1963). Только у слепушонок *Ellobius* и колючехвостых мышей *Tokudaia* описаны как типичные для плацентарных млекопитающих половые хромосомы (*E. fuscocapillus*, *T. muenninki*), так и необычные половые хромосомы, характерные для всех самцов и самок: X0 у *Ellobius lutescens* (Matthey 1953; Just et al. 1995) и *Tokudaia osimensis*, *T. tokunoshimensis* (Soullier et al. 1998; Sutou et al. 2001; Arakawa et al. 2002), или XX у *E. tancrei*, *E. talpinus* и *E. alaicus* (Vorontsov et al., 1969; Lyapunova et al., 1980; Vorontsov, 1980; Bakloushinskaya, Lyapunova, 1990; Just et al., 2007; Romanenko, et al., 2007). У слепушонок ген *Sry* отсутствует (Just et al., 1995), как и вся Y-хромосома (Romanenko et al., 2007; Bakloushinskaya et al., 2012). В отличие от слепушонок, у *T. osimensis* Y-хромосома утрачена не полностью, часть генов (*Zfy* и *Tspsy*) транслоцирована на X-хромосому (Arakawa et al., 2002), но ген *Sry* также отсутствует. У *T. muenninki* Y-хромосома сохранилась, возможно, благодаря слиянию с аутосомой, кроме того, она несет не одну, а 24 копии гена *Sry* (Murata et al., 2010, 2012).

У видов слепушонок, не имеющих Y-хромосомы, в поисках TDF был проведен анализ большого количества генов. В результате, исключены из претендентов на роль TDF гены *Sox9*, *Sox3*, *Atrx*, *Nr0b1*, *Nr5a1*, *Foxl2/Pisrt1*, *Dmrt1* (Baumstark *et al.*, 2001; Just *et al.*, 2002; Baumstark *et al.*, 2005; Just *et al.*, 2007). Анализ кариотипов с помощью метода Zoo-FISH не выявил различий XX хромосом у самцов и самок *E. lutescens*, *E. talpinus* и *E. tancrei* (Romanenko, 2007; Bakloushinskaya *et al.*, 2012). Но был обнаружен половой диморфизм поведения XX хромосом у *E. talpinus*, *E. tancrei* и межвидовых гибридов в профазе I мейоза (Kolomiets *et al.*, 1991, 2010; Bakloushinskaya *et al.*, 2012). В ооцитах половые XX хромосомы синаптируют по всей длине полового бивалента, СК половых хромосом не отличим от СК аутосом, тогда как в сперматоцитах в центральной части половых бивалентов сохраняется обширная зона асинопсиса, короткие СК формируются лишь в теломерных районах. Обнаруженные особенности структуры и поведения полового XX бивалента у самцов и самок видов-двойников слепушонок свидетельствуют о функциональных различиях изоморфных половых хромосом.

У афганских слепушонок *E. fuscocapillus* сохранились Y-хромосома и ген *Sry* (Just *et al.*, 1995), однако недавно было показано, что у 4 видов слепушонок, включая афганскую, произошла делеция гена *Sox9*. Возможно, именно вследствие этой мутации у предка современных слепушонок возник необычный каскад генов определения пола, в котором ген *Sry* оказался не нужен, и это, в свою очередь, могло привести к утрате Y-хромосомы (Bagheri-Fam *et al.*, 2012). К сожалению, эта гипотеза не объясняет парность X-хромосом у самцов и самок слепушонок надвида *E. talpinus* и оставляет открытым вопрос о TDF в этой группе.

Эволюция половых хромосом плацентарных млекопитающих, как показали современные исследования, идет в двух противоположных направлениях (Graves, 2006): добавления аутосомальных районов в X-хромосому и прогрессирующего истощения Y-хромосомы, причем деградация Y-хромосомы происходит независимо в различных эволюционных линиях. Исчезновение Y-хромосомы эволюционно может быть выгодно, так как снимает эффект прогрессирующего накопления вредных мутаций из-за отсутствия рекомбинации, т.н. "храповик Мёллера" (Muller, 1932). В случае кариотипа с X0 у обоих полов храповик Мёллера действует в отношении X-хромосомы, кроме того, такой кариотип приводит к 50% зиготической смертности, что эволюционно невыгодно. С этой точки зрения формирование кариотипов XX у обоих полов является выходом из эволюционного тупика, но также и возвращением к анцестральному состоянию, к началу формирования половых гетерохромосом из гомологичных аутосом.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЦИТОГЕНЕТИКА СЕМЕЙСТВА ВИВЕРРОВЫХ

Беклемишева В.Р.¹, Юджин Д.В.¹, Перельман П.Л.¹, Петрина Т.Н.², Рожнов В.В.², Янг Ф.³, Ни В.⁴, Графодатский А.С.¹

¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, bekl@mcb.nsc.ru

²Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, г. Москва

³Институт Сэнгера, Кэмбридж, Великобритания

⁴Институт зоологии, Кунминь, КНР

Отряд Хищные (Carnivora) является одним из наиболее изученных таксонов Laurasiatheria. На основании исследований этой группы млекопитающих описаны ключевые тенденции хромосомной эволюции, присущие процессу преобразования геномов в ходе филогенеза.

Более 50 видов Хищных изучено молекулярно-цитогенетическими методами с использованием хромосомных пейнтинг-проб 9 видов Carnivora и хромосомной библиотеки человека. Данные о хромосомной гомологии между Хищными и человеком позволяют сопоставлять результаты исследований геномов представителей разных отрядов млекопитающих и формулировать гипотезы о составе предковых кариотипов для таксонов разных уровней.

Отряд Carnivora насчитывает более 280 видов и представлен двумя ветвями: Feliformia и Caniformia. Применение методов классической цитогенетики предсказало значительные различия между Кошачьим и Псовыми в скоростях преобразования кариотипов в ходе эволюции. Эти сведения были подтверждены с помощью хромосомного пейнтинга. Наряду с видами Feliformia и основной части Caniformia, геномы которых подверглись незначительным преобразованиям, существенно не изменившим предковый геном, в семействах Хищных Canidae, Ursidae и Mephitidae обнаружены виды с кариотипами, радикально перестроенными по сравнению с предковым.

Большинство изученных видов Carnivora принадлежат к ветви Caniformia. При этом некоторые семейства Хищных либо вообще не были исследованы методами молекулярной цитогенетики, либо в анализ были вовлечены единичные представители некоторых семейств. Семейство Viverridae насчитывает наибольшее число видов во всем отряде Хищных, но до недавнего времени только три вида были изучены с помощью хромосомного пейнтинга. Полученные данные соответствовали представлениям о высокой консервативности геномов Виверровых, как и ранее изученных представителей Feliformia.

Нами была проведена локализация пейнтинг-проб каменной куницы (*Martes foina*, 2n=38) на хромосомах лесной генетты (*Genetta pardina*, 2n=52) и мусанга (*Paradoxurus*

hermaphroditus, $2n=42$). Полученные для генетты данные опровергают традиционное представление о консервативности кариотипов у Feliformia. Использование 18 аутомных проб куницы выявило 21 гомологичный фрагмент в геноме мусанга и 40 фрагментов в геноме лесной генетты. Таким образом, кариотип мусанга консервативен, а кариотип лесной генетты отличается от кариотипа каменной куницы по меньшей мере 20 разрывами. Кроме того, при формировании хромосом *G. pardina* произошла по крайней мере одна инверсия и более десятка слияний фрагментов предкового кариотипа. Полученные данные являются первым примером обнаружения у Кошачьих высокоперестроенного кариотипа.

Для детального описания преобразований предкового генома при формировании геномов представителей Виверровых планируются дальнейшие детальные исследования кариотипов этого семейства с помощью пейнтинг-проб домашней собаки – инструмента высокого разрешения. Большой интерес представляет вопрос: сохраняются ли высокие темпы геномных преобразований и после формирования подсемейства генеттовых во время радиации видов. Исследование кариотипов других генетт и близкородственных африканских линзангов рода *Poina* позволило бы описать скорости преобразований геномов внутри ветви подсемейства Genettinae и составить кариотип предка подсемейства.

ПОИСК Tc1-ПОДОБНЫХ ДНК ТРАНСПОЗОНОВ В ТРАНСКРИПТОМАХ БАЙКАЛЬСКИХ СИГОВЫХ РЫБ

Беломестных Т.В.¹, Сидоров И.А.², Скоров В.В.², Быченко О.С.³, Ажикина Т.Л.³, Кирильчик С.В.¹, Суханова Л.В.¹

¹Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, kir@lin.irk.ru

²Институт теории и динамики систем управления СО РАН

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Последние годы характеризуются беспрецедентным ростом информации о влиянии мобильных элементов (МЭ) на регуляторные механизмы экспрессии генов (Biemont & Vieira, 2005). Следы МЭ представлены в большом количестве в транскрипционных регуляторных модулях и других участках геномов, консервативных между отдаленно родственными видами. Становится очевидным, что они являются одной из движущих сил в эволюции эпигенетической регуляции и имеют долговременное влияние на стабильность геномов и эволюцию. Однако способ, которым они воздействуют на транскриптом, не до конца ясен (Jurka et al., 2007; Biemont et al., 2009).

Проведенные нами ранее полногеномные исследованиями двух видов рода *Coregonus*, байкальских озерного сига и омуля (Быченко и др., 2009 а,б), интересных тем, что их симпатрическая (!) дивергенция от общего предка произошла всего 10 – 20 тыс. лет назад, свидетельствуют о малых различиях в геномах и, по-видимому, о дивергенции идущей по пути регуляторной эволюции. Так, все найденные в геномах потенциально дифференциальные последовательности при проверке на выборке особей оказались полиморфными некодирующими участками, варьирующими внутри видов в результате однонуклеотидных замен и коротких делеций. В то время как при сравнении транскриптомов мозга исследуемых видов около 4% последовательностей достоверно имели различный уровень транскрипции. Интересно, что в полиморфных внутри видов фрагментах геномов многие имели участки на 65 -85% сходные с широко распространенными среди рыб Tc1-подобными ДНК транспозонами (у ближайших родственников сиговых - лососевых - это 5% генома). А среди дифференциально транскрибирующихся последовательностей был обнаружен Tc1-подобный транспозон семейства DTSsa4. У лососевых рыб недавно выявлено неожиданно большое количество транскрибирующихся Tc1 подобных ДНК транспозонов и стимуляция их транскрипции в ответ на внешние воздействия (Boer et al., 2007; Krasnov et al., 2005). Можно предположить, что Tc1-подобные ДНК транспозоны, наряду с другими МЭ, играют важную роль в адаптивной дивергенции сиговых рыб. Не исключено, что высокая фенотипическая

пластичность сиговых (и вообще рыб) отчасти обеспечивается активностью многочисленных транспозонных копий в их геноме.

В настоящей работе для выявления транскрибирующихся Tc1-подобных ДНК транспозонов и анализа их окружения в транскриптах проведено определение первичных нуклеотидных последовательностей транскриптомов мозга байкальских озерного сига с использованием техники параллельного секвенирования на приборе Genome Analyzer Ix (Illumina, Inc.): Общий объем данных составил ~ 3 млрд. нуклеотидов. На суперкомпьютере системы Blakford центра коллективного пользования ИДСТУ СО РАН (г. Иркутск) с помощью программы ABySS осуществлена сборка первичных коротких (70 п.н.) фрагментов в протяженные транскрипты (контиги - contigs). Получено около 19 тыс. контигов, длина которых составила более 500 пар нуклеотидов. Проводится их аннотирование согласно международным EST и белковым базам данных.

Предпринят поиск 14-ти групп транспозонов семейства DTSSa, найденных *in silico* в протяженных фрагментах геномов лососевых рыб, клонированных в бактериальные хромосомы (Boer et al., 2007). Фрагменты, гомологичные 11-ти из вышеуказанных МЭ найдены среди контигов сига, что подтвердило транскрипционную активность данного семейства мобильных элементов, выявленную для этой группы Боэром и соавторами (Boer et al., 2007). На примере дифференциально транскрибирующегося у байкальских сига и омуля DTSSa4 (Быченко и др., 2009) выявлен большой полиморфизм транскрибирующихся копий этого МЭ у байкальского сига.

Небольшая средняя длина контигов, содержащих фрагменты искомых МЭ (преимущественно менее 500 п.н., вероятно обусловленная в т.ч. и их высоким полиморфизмом) послужила основным препятствием при поиске контигов, содержащих не только фрагменты искомых МЭ, но и фланкирующие их последовательности. Поскольку нахождение таких последовательностей являлось первоочередной задачей, для решения этой проблемы разработан алгоритм «достройки» флангов к целевым контигам. Алгоритм универсален, т. к. позволяет начинать сборку с любого целевого контига в конкретном направлении. Разработан также дополнительный алгоритм поиска контигов, «перспективных» для описанной выше достройки. Алгоритм также универсален, осуществляет наложение первичных 70-буквенных прочтений на известные последовательности-трафареты, позволяет варьировать значение степени гомологии между накладываемыми фрагментами и трафаретом, имеет наглядный выходной файл, дающий представление о количестве наложившихся прочтений и рисунке их наложения.

Работа проведена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 10-04-01583-а, 12-04-10007-к), и Программы РАН «Поддержка вивариев, коллекций, клеточных и бактериальных культур».

РЕГУЛЯЦИЯ РЕПРЕССИРОВАННЫХ РАЙОНОВ ГЕНОМА В РАЗВИТИИ ДРОЗОФИЛЫ

Белякин С.Н., Максимов Д.А., Лактионов П.П., Коряков Д.Е.

Институт молекулярной и клеточной биологии, Новосибирск

У Дрозофилы районы хромосом, обогащенные тканеспецифичными генами, формируют гетерохроматин во многих клетках организма. Процесс регуляции этих районов в развитии организма остается неясным. Белок Suppressor of Under-Replication (SUUR) связан с такими районами, но не необходим для их репрессии. В представленной работе мы провели картирование связывания белка SUUR в разных тканях Дрозофилы при помощи метода DamID. Изменение связывания белка SUUR в исследованных образцах отражало динамику репрессированных районов и сопровождалось регуляцией части генов в них. Кроме этого, варьирование связывания белка SUUR наблюдалось в определенных типах хроматина.

Наиболее заметным классом генов в репрессированных районах Дрозофилы являются семенник-специфичные гены. Они активны только в созревающих сперматоцитах и необходимы для мейоза и созревания сперматозоидов. Одним из регуляторов таких генов является белок Cookie monster (COMR), также избирательно активный в семенниках. Чтобы прояснить механизм активации гетерохроматиновых семенник-специфичных генов, мы определили гены-мишени белка COMR в сперматоцитах Дрозофилы методом DamID. Оказалось, что этот белок связывается с протяженными районами хромосом и районы его связывания зачастую совпадают с районами, обогащенными SUUR в соматических клетках. Связывание COMR с хромосомами оказалось избыточным в том смысле, что не все связанные с ним гены активировались в семенниках Дрозофилы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что существует механизм, способный регулировать репрессированные районы генома как целое. Однако, для выборочной активации расположенных в них генов необходимы специфические активирующие факторы.

ФЕНОТИП ИНТЕРФАЗНОГО ЯДРА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИЯХ

Беляков В.К.^{1,3}, Монахова М.А.², Тагирова М.К.^{2,3}, Кузнецов А.Б.¹, Мантурова Н.Е.¹

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, г. Москва

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва,
monakhova@list.ru

³ООО «Весттрэйд ЛТД», г. Москва

Фенотип интерфазного ядра - это совокупность генетически детерминированных цитологических компонентов структурно функциональной организации цитогенетической системы интерфазного ядра. Формирование этого представления стало возможным благодаря использованию методов молекулярной цитогенетики, техники многоцветного окрашивания и специализированного программного обеспечения. К элементам фенотипа относятся хроматин (эу-, гетеро-, периферический хроматин и хромосомные территории), ядрышко, скелетные структуры ядерного матрикса, ядерная оболочка.

Основными принципами организации цитогенетической системы интерфазного ядра являются а) динамическая структурно-функциональная связь хроматина с элементами ядерного матрикса и внутренней ядерной оболочкой б) компартментный характер организации в) неслучайное расположение хромосомных территорий г) соматическое спаривание гомологов (соматическая конъюгация), обеспечивающая нормальное функционирование аллелей д) полярность (наличие центромерных и теломерных полюсов) е) системный характер организации, при котором нарушение в одном из элементов приводит к нарушению цитогенетической системы в целом. Пространственное расположение хромосом в интерфазном ядре («эффект положения хромосом») является одним из цитологических механизмов регуляции экспрессии генов.

Фенотип интерфазного ядра может быть использован в качестве тест-системы при проведении цитогенетического мониторинга для оценки воздействия на организм факторов внешней среды и тестирования фармакологических препаратов (метод ДНК-комет, микроядерный тест), а также для индивидуализации лечения онкологических заболеваний методами радиационной и химиотерапии. Визуализация компонентов интерфазного ядра позволяет использовать цитологические маркеры для анализа численных и структурных хромосомных нарушений, в том числе в пренатальной диагностике, и проводить оценку воздействия нанобъектов на структурно-функциональное состояние клетки.

Маркерами пространственного расположения хромосом в интерфазном ядре могут быть центромерные и теломерные районы, обогащенные гетерохроматином. Частота

соматического спаривания прицентромерных районов гомологичных хромосом используется как показатель состояния цитогенетической системы интерфазного ядра. Показано, что частота соматической ассоциации прицентромерных областей изменяется при патологии. Изменение частоты соматического спаривания описано в лимфоцитах периферической крови человека при лимфоме, синдромах Прадера-Вилли и Ангельмана, а также в клетках мозжечка при атаксии-телеангиэктазии (Iourov I.Y., 2005). При анализе теломерных ассоциаций используются такие показатели как пространственная организация теломер, число и размеры теломерных агрегатов, число и длина теломерных районов. Показано, что наличие теломерных агрегатов является цитологическим маркером малигнизации клетки.

Важнейшим маркером функционального состояния цитогенетической системы интерфазного ядра являются скелетные структуры: ядерная мембрана и ядерный матрикс. Изменение экспрессии белков ядерного матрикса может быть показателем патологического состояния премалигнизации (Leman et al., 2008). Нарушение функционирования белка ламины и трансмембранных белков, находящихся во внутренней оболочке ядра, сопровождается изменением формы ядра, появлением инвагинаций и разбуханием ламины. Мутации в генах, кодирующих белки ламины, приводят к системным нарушениям всего организма, объединенным под общим названием «ламинопатии». К ним относятся прогерия, мышечная дистрофия Emery-Dreifuss (EDMD), дилатационная кардиомиопатия (DCM), семейная очаговая липодистрофия (FPLD), нейропатия Шарко-Мари-Тус второго типа и другие заболевания (Chi et al., 2009; Parnaik, Manju 2006; Sullivan et al., 1999).

Изменение количественных и морфофункциональных показателей ядрышка - числа ядрышек, количества и размеров ЯОР, изменения фибриллярного и гранулярного компонентов могут быть использованы для оценки влияния температурного, кислородного стрессов, вирусных инфекций на функциональное состояние клетки, а также как прогностический маркер при онкологических заболеваниях человека (фарингеальной карциноме, множественной миеломе, раке груди у мужчин, карциноме простаты и др.). Все перечисленные элементы фенотипа интерфазного ядра могут применяться в клинической практике для оценки нормы и патологического состояния клеток.

**ПОЛИТЕННЫЕ ХРОМОСОМЫ ХИРОНОМИДЫ *PARACHIRONOMUS VARUS*
(*GOETGHEBUER, 1921*) (*DIPTERA, CHIRONOMIDAE*)**

Белянина С.И.

Государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского, г.Саратов,
microtus43@mail.ru

Впервые описываются политенные хромосомы голярктического вида хирономид *Parachironomus varus* (Goetghebuer, 1921). Личинки его (9 особей) собраны в черте г.Брянска в июле 2009 г. у кромки берега реки Десны на заиленном грунте с растительными остатками. Готовили давленные, окрашенные ацетоорсеином, препараты хромосом из клеток слюнных желез личинок.

$2n=8$ (рис.). Номера хромосом и их плечи: I (AB), II (CD), III (EF), IV (GH). Хромосомы I, II, III – длинные, хромосома IV – короткая. Прицентромерные (ПЦМ) районы в длинных хромосомах располагаются в них почти в середине в виде четких двойных утолщенных гетерохроматиновых дисков. Хромосома IV является субметацентрической, её ПЦМ район в виде хорошо выделяющегося утолщенного темного диска расположен субмедиально. Известно (Белянина, 1984; Михайлова, 1989; Петрова, 1999), что у видов хирономид подсемейства *Chironominae* с $2n=8$ короткая хромосома IV относится к акроцентрическому типу. Наличие в кариотипе *Parachironomus varus* короткой хромосомы IV субметацентрического типа для хирономид этого подсемейства отмечается впервые. Ядрышковый организатор и кольцо Бальбиани локализованы в хромосоме IV. В хромосоме I и хромосоме III находятся по одному пуфу. Длинные хромосомы часто вступают в теломерно-центромерные слияния с хромосомой IV – ПЦМ районы длинных хромосом конъюгируют с одним из теломерных районов хромосомы IV.

У исследованных нами личинок *P.varus* найден только один вид хромосомной перестройки – гетерозиготная инверсия в хромосоме I – A1.2, встречаемая у всех девяти изученных особей.

Приводится цитофотокарта политенных хромосом *Parachironomus varus* (рис.), разделенных нами на отделы (выражаю благодарность Н.А. Дурновой за техническую помощь).

Хромосома I (AB). Разделена на 27 отделов. ПЦМ район – в отделе 12. Плечо A в отделах 4 – 7 маркировано гетерозиготной инверсией - var A 1.2. В плече B на границе 15 – 16-го отделов выражена перетяжка. В отделе 13 наблюдалось небольшое нарушение конъюгации гомологов.

Хромосома II (CD). Разделена на 27 отделов. ПЦМ район – в отделе 13. Плечо С маркируется двумя, хорошо выделяющимися перетяжками – на границе 5 – 6-го отделов и в отделе 10. В плече D четко выражена перетяжка в отделе 23. В отделе 18 находится пуф. Теломерный отдел (27) этого плеча с разрыхленными дисками.

Хромосома III (EF). Разделена на 24 отдела. ПЦМ район – в отделе 11. В плече E в отделе 3 локализован пуф, в плече F находятся две перетяжки – в отделах 18 и 20.

Хромосома IV (GH). Разделена на 16 отделов. ПЦМ район – в отделе 6 на границе с отделом 7. В плече G в отделе 1 локализован ядрышковый организатор, в отделе 3 – кольцо Бальбиани. Плечо H с четкими дисками разной степени толщины.

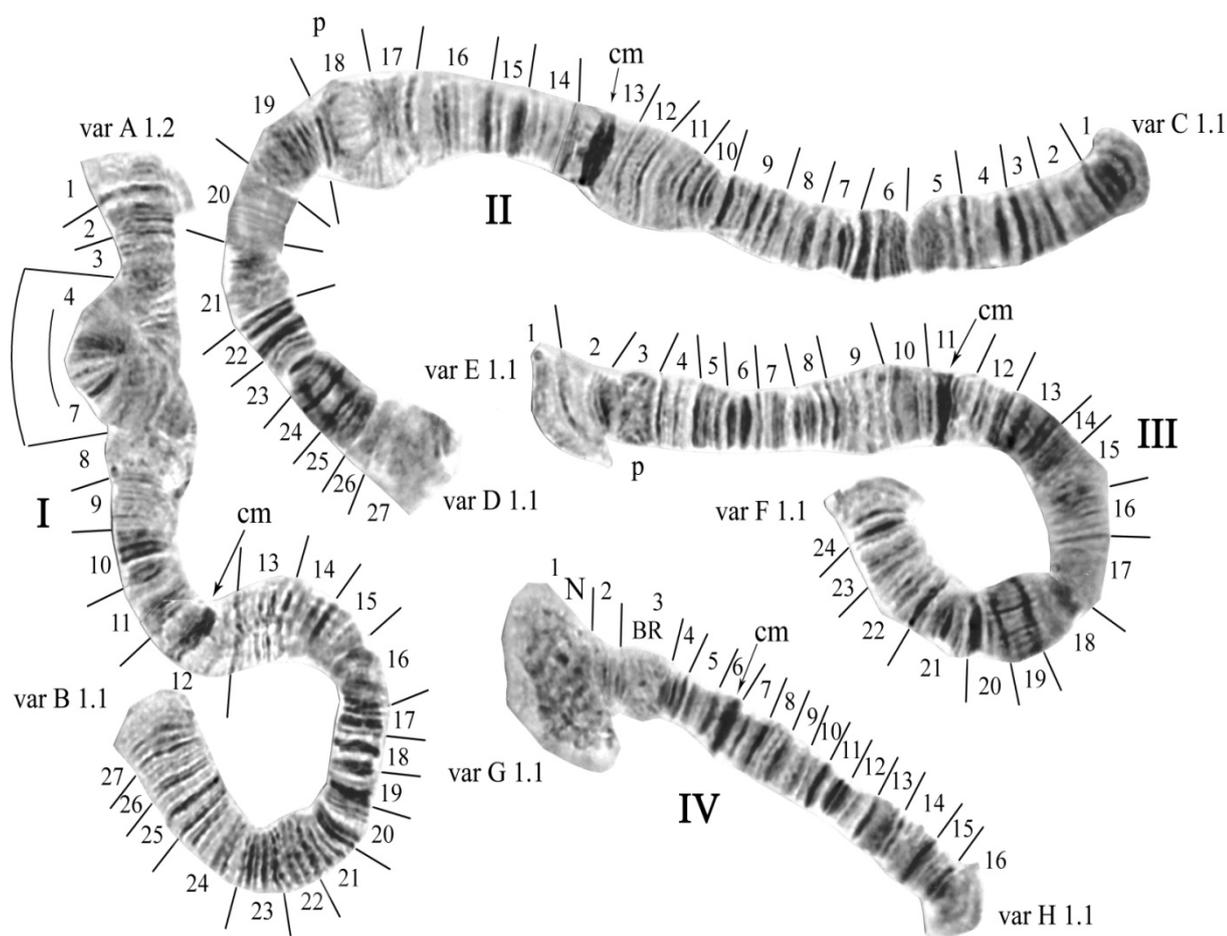


Рис. Цитофотокарта политенных хромосом хирономиды *Parachironomus varus*.

I, II, III, IV – номера хромосом. Стрелками отмечены прицентромерные районы (cm); var A 1.2, var B 1.1, var C 1.1, var D 1.1, var E 1.1, var F 1.1, var G 1.1, var H 1.1 – обозначения порядков дисков в плечах гомологов хромосом; N – ядрышковый организатор, BR – кольцо Бальбиани, p – пуф. Скобкой обозначены примерные границы гетерозиготной инверсии A12.

ХРОМОСОМНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ НАСЕКОМОЯДНЫХ

Билтуева Л.С., Воробьева Н.В.

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, bilar@mcb.nsc.ru

Насекомоядные являются одной из базовых групп в исследовании филогенетических взаимоотношений у млекопитающих. Предполагается, что данный таксон одним из первых дивергировал у плацентарных. За последнее десятилетие проведена радикальная ревизия группы на основании молекулярных данных. В настоящее время в отряд включают 4 семейства: ежовых, кротовых, землеройковых и щелезубов. Взаимоотношения между основными семействами группы все еще не определены: так, по морфологическим данным существует фундаментальное разделение на *Erinaceomorpha* and *Soricomorpha*, в то время как согласно молекулярным данным *Soricidae* группируются с *Erinaceidae*, а *Talpidae* выделяется в отдельную ветвь.

Высокий уровень хромосомных преобразований у насекомоядных не позволял ранее провести классический сравнительный анализ видов из разных семейств. Молекулярная цитогенетика, имеющая в своем арсенале наборы сортированных хромосом многих видов, помогает реконструировать филогенетические взаимоотношения на любом таксономическом уровне. С помощью хромосомспецифических библиотек человека, бурозубки и крота выявлены консервативные сегменты геномов у сравниваемых видов, установлено число слияний и разделений, предшествовавших формированию их кариотипов. На основании литературных данных и полученных нами результатов предложены наборы хромосомных маркеров для основных семейств отряда и оценена их эволюционная значимость.

АССОЦИАЦИЯ ГЕНОВ ДЕТОКСИКАЦИИ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ РМЖ В ЧЕЧЕНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Бисултанова З.И.

Чеченский государственный университет, г. Грозный, bisultana@yandex.ru

Ключевую роль в активации и детоксикации канцерогенов играют ферменты семейства цитохромов 450. Ферменты 1-й фазы биотрансформации эндогенных и экзогенных ксенобиотиков активируют проканцерогены в активные канцерогенные продукты. Ферменты второй фазы детоксицируют их и удаляют из организма. Широкий изоморфный спектр ферментов суперсемейства цитохромов обусловлен полиморфизмом детерминирующих их генов. Генетический полиморфизм влияет на активность этих ферментов, что, в свою очередь, определяет характер канцерогенного эффекта их взаимодействия.

В настоящей работе изучается причинно-следственная связь между полиморфизмом генов детоксикации (GSTM1, GSTT1, GSTP1) и риском возникновения РМЖ, который занимает ведущую роль в структуре заболеваемости женщин злокачественными новообразованиями

Материал и методика. Геномная ДНК была извлечена из образцов периферической крови 123 женщин с гистологическим диагнозом рак молочной железы и 331 здоровых женщин. Генотипирование полиморфных вариантов GSTM1, GSTT1, GSTP1 проводили с помощью метода тетрапраймерной полимеразной цепной реакции. Статистическую обработку данных провели с использованием пакета программ «Statistica».

Результаты: Глутатион-S-трансферазы (GSTs) представляют собой семейство ферментов, которые играют важную роль в детоксикации ксенобиотиков. Основываясь на их биохимических, иммунологических и структурных свойствах, GSTs делятся на 4 основных класса: альфа, мю, пи, и тета. Ген, кодирующий глутатион-S-трансферазы класса мю GSTM1 локализован на хромосоме 1p13. Нулевой генотип этого гена, вызванный делецией, как показывают многочисленные исследования, связан с увеличением числа раковых заболеваний, в том числе, и рака молочной железы, вероятно, из-за повышенной восприимчивости к экологическим токсинам и канцерогенам. Гены GSTT1 и GSTT2 детерминируют образование ферментов класса тета. Ген GSTT1 локализован на хромосоме 22q11.23. В ряде работ показана важная роль нулевого генотипа GSTT1 в человеческом канцерогенезе. GSTP1 локализуется в хромосоме 11q13. Полиморфизм гена GSTP1 с.313 A>G (rs 1695) определяет замену аминокислоты изолейцин на валин. и также может играть важную роль в восприимчивости к раку и другим заболеваниям.

Результаты настоящего исследования показали отсутствие связи между нулевым генотипом GSTM1 и общей восприимчивостью к раку молочной железы у чеченских женщин. Частота нулевых генотипов у больных женщин незначительно отличалась от таковой в группе контроля. (47,15% и 49,30%, соответственно). Сравнительный анализ частот полиморфных вариантов генов GSTT1 и GSTP1 выявил что частота нулевого генотипа GSTT1 статистически значимо ассоциирована с РМЖ (OR = 2.25, 95% C.I. = 1.32 to 3.84, p=0,004). Тогда как повышенная частота носителей генотипов AG/AA гена GSTP1 по сравнению с контрольной группой не имела достоверных различий (65,05% и 56,55 % соответственно). В то же время сочетание с гомозиготным по делеции генотипом GSTT1 дает «положительный» эффект в развитии рака молочной железы (OR = 1,77, 95% C.I. = 1.18 - 2.66, p=0,007). Таким образом, наши исследования показывают эффект нулевого генотипа GSTT1 в восприимчивости к развитию рака молочной железы у чеченских женщин.

ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ И УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МЕЙОТИЧЕСКИХ ХРОМОСОМ

Богданов Ю.Ф.

ФГБУН Институт общей генетики им Н.И. Вавилова РАН, Москва, yubogdanov@vigg.ru

Организация хромосом, вступивших в мейоз, отличается от их организации в соматических клетках, делящихся путем митоза. Хромосомы в профазе I мейоза максимально «линеаризованы» и приспособлены для взаимного узнавания и рекомбинации гомологичных локусов. Это достигается в результате формирования «осевых элементов» (axial cores, axial elements) во всех хромосомах клеточного ядра (включая В-хромосомы). Осевые элементы (ОЭ) формируются из белков-когезинов, скрепляющих сестринские хроматиды, путём добавления к ним специфических мейотических когезинов – белков Rec8 (ортолог соматического белка Rad21), Smc1 β (ортолог соматического Smc1 α) и Stag3 (паралог соматических Stag1 и Stag2). При этом соматические когезины не исчезают из хромосом [1]. Мейотические когезины весьма консервативны в пределах типа хордовых животных. Но и при сравнении Rec8 у *Arabidopsis*, *Saccharomyces* и *Drosophila* с Rec8 хордовых обнаруживается мозаика гомологичных мотивов первичной структуры белков.

Формирование ОЭ приводит к растягиванию профазных хромосом. На стадии пахитены ОЭ гомологичных хромосом превращаются в латеральные элементы (ЛЭ) синаптонемных комплексов (СК). Белковый состав ЛЭ существенно богаче состава ОЭ за счёт появления в этих линейных структурах «мажорных» белков СК. У млекопитающих – это белки Sycp2 и Sycp3. У растений, грибов, насекомых и в других таксонах мажорные белки СК не имеют гомологии с белками млекопитающих и между собой [1, 2]. Построение морфологически и функционально сходных СК из негомологичных белков – принципиальное открытие последних 20 лет в области молекулярной биологии мейоза [3]. СК – это мейотические аксессуарные хромосом, необходимые для растяжения, выравнивания и точного по-локусного синапсиса гомологичных хромосом, а также для обратимости этого синапсиса – отталкивания гомологов накануне кинетических стадий мейоза. Отталкивание гомологов происходит в ходе постепенного разрушения СК и благодаря их разрушению. СК необходим также для интерференции кроссинговера и хиазм.

У большинства организмов механизм синапсиса инициируется начальными этапами локус-специфичной рекомбинации молекул ДНК: программируемыми ферментативными разрывами двух нитей ДНК и инвазией однострочной ДНК в гомологичный локус интактной хроматиды.

К ОЭ и ЛЭ крепятся «латеральные» петли хроматина. Места их прикрепления располагаются довольно равномерно вдоль ЛЭ. Длина большинства петель в разных локусах лежит в пределах 50-100 т.п.н. [4], хотя встречаются петли длиной более 400 т.п.н.

[5]. Ведется экспериментальный поиск последовательностей нуклеотидов, которые служат «якорными» звеньями, прикрепляющими хроматин к ОЭ и ЛЭ [6, 7]. Есть данные и теоретические построения в пользу того, что основания петель хроматина на когезиновой оси формируют «очередь» из АТ-пар нуклеотидов. Возможно, что «слой» АТ-пар крепится к когезиновой сети, служащей каркасом для ОЭ и ЛЭ [4]. Однако не исключено, что петли хроматина контактируют с ЛЭ за счёт взаимодействия белков хроматина с белками когезиновой «оси» хромосом [6].

В пахитене ооцитов СК в два раза длиннее, чем в пахитене сперматоцитов, но при этом латеральные петли хроматина оказываются в два раза короче. Эта обратная зависимость длины СК и размера петель выявляется и при мутации, когда длина СК, лишённого белка SMC β , оказывается в два раза меньше, а петли хроматина в два раза больше. Это служит доказательством растягивания профазных мейотических хромосом за счёт добавления к хромосомам мейотических когезинов.

Хроматин в мейозе претерпевает некоторую перестройку, что тестируется во время длительной (несколько суток) и синхронной профазы I у лилий при гидролизе его стафилококковой нуклеазой [8]. В хроматине появляются мейоз-специфичные гистоны.

Молекулярная «архитектура» центрального пространства СК между его ЛЭ – гораздо сложнее, чем было описано в обзоре [3]. Оно содержит сеть из нескольких белков (негомологичных у растений, грибов, насекомых и млекопитающих).

Центральное пространство СК служит компартментом для размещения и функционирования многочисленных белков, являющихся медиаторами и катализаторами рекомбинации. Они формируют «рекомбинационные узелки». Эти белки весьма консервативны. Однако существуют варианты их наборов и варианты взаимодействия этих белков при рекомбинации молекул ДНК в профазе I мейоза у разных организмов при кроссинговере и конверсии генов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 10-04-00666-а

[1] Гришаева Т.М. и др. (2010) Вестник ВОГиС. 14 (1) 96-105.

[2] Гришаева Т.М. (2012) В этом сборнике тезисов.

[3] Bogdanov Yu.F. et al. (2007) Intern. Rev. Cytol. 257:

[4] Kleckner N. (2006) Chromosoma 115: 175-194.

[5] Спангенберг В.Е. (2012) В этом сборнике тезисов.

[6] Hernandez-Hernandez A., et al. (2008) Chromosoma. 1171: 77-87.

[7] Спангенберг В.Е. и др. (2011) Цитология. 53: 235-241.

[8] Строков А.А. (2007) Генетика. 43: 1468-1477.

КОЛОКАЛИЗАЦИЯ РАЙОНОВ ПРИКРЕПЛЕНИЯ XL И 3R ХРОМОСОМ В ЯДРАХ ГЕНЕРАТИВНЫХ И СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК У *ANOPHELES MESSEAE* FALL

Бондаренко С.М., Артемов Г.Н., Стегний В.Н.

Томский государственный университет, г. Томск, center_cu@res.tsu.ru

Неслучайное расположение хромосом является общепринятым фактом в современной науке. Доказано, что каждая хромосома занимает вполне определенный объем в пространстве ядра, называемый хромосомной территорией (Cremer T., Cremer M., 2010). Проблема изучения расположения хромосомных территорий находится пока на ранних стадиях изучения, но актуальность ее очевидна. Архитектура ядра в различных тканях одного организма может сильно отличаться, что говорит о её функциональном значении (Kosak S.T., Groudline M., 2004). Имеются так же работы, свидетельствующие о межвидовых различиях пространственной организации хромосом в трофоцитах яичников комаров рода *Anopheles* комплекса «*macullipenis*», это свидетельствует об эволюционном значении ядерной архитектуры (Стегний В.Н., 1979).

Малярийный комар *Anopheles messeae* является удобным объектом для изучения ядерной архитектуры, поскольку политенные хромосомы в трофоцитах яичников этого комара имеют выраженные контакты с ядерной оболочкой (районы прикрепления, РП), что, определенно, может оказывать влияние на расположение хромосом в ядре. Кроме того, у этого объекта есть еще ряд тканей, где также образуются политенные хромосомы. Целью нашей работы было определить, существуют ли различия клеток генеративной и соматической систем по пространственному расположению районов хромосом, которые в трофоцитах яичников *An. messeae* выполняют функцию РП. В качестве модели клеток соматической системы нами были выбраны клетки слюнных желез личинок и фолликулярного эпителия имаго, а модели клеток генеративной системы – трофоциты яичников самок малярийного комара. Таким образом, были поставлены следующие задачи: (1) изучить взаиморасположение (колокализацию) районов прикрепления в ядрах трофоцитов яичников; (2) изучить колокализацию РП XL и 3R хромосом хромосом в ядрах клеток слюнных желез и фолликулярного эпителия.

Ранее были получены ДНК-пробы из РП хромосом 3R (район 32d) и XL (район 2b-c). Для обнаружения РП использовался метод FISH ДНК-зондов из районов 32d и 2b-c с надавленными ядрами клеток. Послойную микрофото съемку препаратов клеток слюнных желез и фолликулов с последующей программной реконструкцией трехмерного изображения проводили с помощью микроскопа AxioImager Z1 (с модулем ApoTome, “Carl Zeiss”) и программы AxioVision 4.7 (“Carl Zeiss”). По виртуальным реконструкциям ядер определяли координаты точек прикрепления хромосом и центра каждого ядра. В качестве

критерия удаленности друг от друга РП XL и 3R хромосом выбрали угол между векторами, проведенными от центра ядра к РП соответствующей хромосомы. Все полученные величины углов (в градусах) были разбиты на три класса: 0° - 60° ; 60° - 120° ; 120° - 180° .

Во всех изучаемых клетках районы 32d и 2b-с располагались на периферии ядер, что может быть связано с выполнением этими районами функции прикрепления к ядерной оболочке во всех тканях. Стоит отметить, что такая специфическая черта морфологии ядер клеток слюнных желез, как наличие очень крупного ядрышка в центре ядра не позволяет утверждать, что находящиеся на периферии ядра сигналы 32d и 2b-с выполняют функции районов прикрепления. Однако в ядрах фолликулярного эпителия, где ядрышко имеет относительно меньшие размеры сигналы районы 32d и 2b-с всегда располагались у периферии ядра.

В трофоцитах яичников у 50,79% ядер величина угла между векторами составляла 60° - 120° , что примерно совпадает с данными по соматическим тканям для этой величины угла (52,08% и 47,00% для ядер слюнных желез и фолликулярного эпителия, соответственно). В класс со значением углов 0° - 60° попали лишь 17,39% ядер трофоцитов, но в случае с клетками соматической системы – 43,75% ядер клеток слюнных желез и 49,00% ядер клеток фолликулярного эпителия. Еще более интересная ситуация возникает при рассмотрении класса ядер со значением угла между векторами 120° - 180° , куда в обоих типах соматических тканей попадает только 4,00% ядер, а в случае с трофоцитами – 31,82%. Таким образом, в клетках соматической системы чаще встречаются ядра, в которых РП расположены ближе друг к другу, по сравнению с ядрами трофоцитов. В клетках слюнных желез малярийных комаров наблюдают образование хромоцентра. Возможно, что хромоцентр образуется также в клетках фолликулярного эпителия, о чем свидетельствует присутствие в ядрах этих клеток яркоокрашенной DAPI или орсеином области. Это означает, что в случае с соматическими клетками возможно участие в прикреплении хромосом к ядерной оболочке не только хромоцентра, который включает район 32d 3R хромосомы, но и района 2b-с XL хромосомы, не связанного с ним.

На основании полученных нами данных можно заключить, что существует значительная разница в пространственном расположении РП XL и 3R хромосом в ядрах клеток генеративной и соматических систем.

Работа финансируется грантом Президента РФ для поддержки молодых ученых – кандидатов наук МК-4158.2012.4, грантом компании ОПТЭК для поддержки молодых ученых (№69/11 КЦ).

МЕТАПОПУЛЯЦИОННЫЕ СИСТЕМЫ А- И В- ХРОМОСОМ МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В ПРОСТРАНСТВЕ И ВРЕМЕНИ

Борисов Ю.М.

ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, г. Москва,

boris@sevin.ru

При стабильности кариотипа у большинства видов млекопитающих, у некоторых из них выявлена изменчивость популяционных систем А- и В- хромосом. В докладе дан анализ изменчивости уникальных хромосомно-полиморфных видов образующих метапопуляции.

Sorex araneus (обыкновенная бурозубка) - ее ареал от Байкала до Британских островов распадается на 75 территориальных хромосомных рас. Для каждой их них характерны свои варианты Rb транслокаций 10 пар диагностических аутосом. В надвиде *Sorex araneus* выявлено три типа контактов: от широких и узких гибридных зон, до полной их изоляции (самостоятельные виды). Это позволяет выделить три основных аспекта эволюционных последствий дифференциации хромосомных форм (популяционных систем Rb транслокаций аутосом) *Sorex araneus* и их контактов:

1. *Ведущие к образованию широких гибридных зон, в результате возможности свободного скрещивания особей родительских популяций* [1]. В таких зонах гибридизации, популяции обособленные от родительских рас и занимающие определенную территорию, формируют новую полиморфную хромосомную расу. В частности, в окрестностях г. Борисова нами выявлена новая полиморфная хромосомная раса *Борисов*, населяющая территорию (40 км на 40 км) восточной Белоруссии. При изучении кариотипов 73 особей этой расы из 8 пунктов ее ареала выявлена клинальная изменчивость возрастания в южном направлении числа акроцентрических хромосом. Показано гибридное происхождение расы *Борисов* в результате расселения с севера расы *Зап. Двина*, мономорфной по Rb транслокациям, в ареале местных популяций с акроцентрическими хромосомами.

2. *Ведущие к частичной изоляции исходных родительских хромосомных рас и образованию с невысокой частотой их гибридных особей* [2]. В таких зонах контакта образуются узкие гибридные зоны. Особый интерес представляют результаты изучения открытой нами на юге Валдайской возвышенности узкой гибридной зоны трех хромосомных рас обыкновенной бурозубки: *Москва*, *Зап. Двина* и *Селигер*.

3. *Ведущие к почти полной изоляции самостоятельных краевых видов - *S. antinorii* Bonaparte, 1840, *Sorex coronatus* Millet, 1828 и кавказской *Sorex satunini* Ognev, 1922* [3]. Кариотипы этих видов в основном гомологичны и являются производными от исходного акроцентрического кариотипа обыкновенной бурозубки. Отличия их формируются за счет различных Rb транслокаций первоначально акроцентрических аутосом.

Apodemus peninsulae (восточноазиатская мышь) – ареал мыши от Алтая до Приморья представлен совокупностью метапопуляционных систем 1-30 В-хромосом, при стабильности ее 46 акроцентрических аутосом + XY. У этого вида мыши только две островные популяции (острова Сахалин и Стенина) не имеют В-хромосом. Метапопуляционные системы В-хромосом сибирских особей этого вида уникальны и состоят из 1-30 микро- и 1-10 двуплечих макро-В-хромосом и их комбинаций в различных сочетаниях [4]. При постулировании “случайного” наследования В-хромосом у мышей наблюдается *устойчивость популяционных систем В-хромосом в пространстве и во времени*. Но у этого правила стабильного популяционного наследования определенных вариантов системы В-хромосом было обнаружено исключение. У мышей Горного Алтая (побережье Телецкого озера) *открыто новое микроэволюционное явление* - трехкратный рост числа В-хромосом за короткий исторический период (1980-2002 годы), *вероятно имеющее адаптивное значение* [5,6]. Это явление, как оказалось, представлено во времени двумя основными фазами. На первой фазе, которая продолжалась с 1980 по 2002 год, наблюдался быстрый многократный рост числа макро-В-хромосом от показателя среднего популяционного значения равного 2.3 до 6.5. Затем последовала фаза стабильности (2002 - 2011) этого показателя на уровне 6.5-7.1. Процесс стабилизации среднего числа В-хромосом сопровождался возникновением *de novo* микро-В-хромосом и сохранением высокого их уровня в этой популяции мышей в 2006, 2008 и 2011 годах. В 1980 году число В-хромосом у мышей варьировало от 2 до 4, а у мышей этой же популяции в 2002-2011 годах число В-хромосом варьировало от 2 до 10. Среди 153 изученных мышей отловленных на побережье Телецкого озера не обнаружено особей с числами В-хромосом выше 10. Это число В-хромосом является критическим для мышей данного района. Отловлено только 5 особей с 10 В-хромосомами. Следует отметить, что регион Горного Алтая и в частности Телецкого озера более 30 лет является районом падения (РП-326, 327) вторых ступеней космических ракет с остатками компонентов ракетного топлива, в том числе и гептила. Возможные эффекты влияния этого сильнейшего токсического вещества на живую природу этого региона остаются не изученными.

1. *Borisov Yu.M. et al.*, Comparative cytogenetic, 2010, 3 (2): P.195-201.
2. *Орлов В.Н., Борисов Ю.М. и др.*, Генетика, 2012, 1: С. 80-88.
3. *Borisov Yu. M., Orlov V.N.*, Comparative cytogenetic, 2012, 3: P. (в печати).
4. *Борисов Ю.М. и др.*, Генетика, 2012, 7: С. (в печати).
5. *Борисов Ю.М.*, Генетика, 2008, 9: С.1227-1237.
6. *Борисов Ю.М.*, Природа, 2012, 5: С.9-19.

САРАНЧОВЫЕ СЕМЕЙСТВА RAMPHAGIDAE – НОВАЯ МОДЕЛЬ ЭВОЛЮЦИИ Y-ХРОМОСОМЫ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ XX/XУ МЕХАНИЗМА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА ИЗ ИСХОДНОГО XX/X0

Бугров А.Г.

Институт систематики и экологии животных СО РАН

Новосибирский госуниверситет

Половые хромосомы играют уникальную роль во многих биологических процессах и явлениях и, прежде всего, в определении пола. По современным представлениям половые хромосомы возникли из пары аутосом. Механизмы превращения исходной аутосомы в гоносому со специфическими чертами, резко отличающимися её от других хромосом (обеднённость генами; присутствие значительных гетерохроматиновых районов и др.), могут отличаться, что делает актуальным поиск новых моделей, исследование которых поможет реконструировать последовательность процессов, приводящих к появлению гетерохромосом в эволюции хромосомных наборов той или иной группы животных.

Оригинальная исследовательская модель эволюции Y-хромосомы базируется на обнаруженных нами в природе редких случаях транслокации аутосомы и X-хромосомы с образованием нового механизма определения пола - XX/XУ у саранчовых семейства Ramphagidae. В цитогенетическом отношении семейство Ramphagidae было одним из наименее изученных в надсемействе настоящих саранчовых (Acridoidea). До недавнего времени подчеркивалась исключительная кариотипическая консервативность этого семейства. Диплоидные наборы включают 19(♂♂) и 20(♀♀) акроцентрических хромосом при определении пола X0♂/XX♀. Это давало основание предполагать особый путь эволюции кариотипа в этой группе, не связанный с изменением числа и морфологии хромосом (Hewitt, 1979). Наше сравнительно-кариологическое исследование некоторых Ramphagidae из фауны России, Казахстана, Средней Азии и Болгарии позволило опровергнуть мнение об этой группе как исключительно единообразной по структуре кариотипа, поскольку наряду с типичными для нее кариотипами нами впервые были описаны хромосомные наборы, возникшие в результате реципрокной транслокации исходно акроцентрической X-хромосомы и акроцентрической аутосомы. При этом другая аутосома из пары у самца становится гетерохромосомой (Y-хромосомой), формируя нео-XX♀/нео-XУ♂ механизм определения пола. Исследованные нами виды отражают разные стадии гетероморфизации первоначальных гомологов - X_R-плеча нео-X хромосомы и нео-Y хромосомы. У *Asiotmethis zachariini* и *Saxetania cultricolis* X_R и нео-Y хромосома изоморфны. Начальные признаки гетероморфизации X_R и нео-Y отмечены у *A. limbatus* и *A.*

heptapotamicus. У этих видов в проксимальной части нео-Y хромосомы выявляются множественные глыбки гетерохроматина, отсутствующие в X_R плече нео-X хромосомы. Выше упомянутые виды демонстрируют нормальную конъюгацию X_R и нео-Y в профазе I мейоза, формирующих бивалент с двумя, реже тремя хиазмами. По степени гетероморфизма эта группа видов может считаться исходной на пути эволюции XY/XX гетерогаметного пола. Пример более продвинутой гетероморфизации половых хромосом при одинаковых размерах гомологов демонстрирует *Atrichotmethis semenovi*, у которого нео-Y целиком гетерохроматическая. У *Paranocaracris bulgaricus*, *P. rubripes*, *Paranocarodes straubei*, *P. chopardi* и *Nocaracris cyanipes* отмечается гетерохроматинизация проксимальных и интеркалярных участков нео-Y хромосомы и значительное её уменьшение в размерах по сравнению с исходно гомологичным ей X_R плечом нео-X хромосомы. Независимо от особенностей формирования аутосомных бивалентов, X_R и нео-Y у этих видов ассоциируют только дистальными участками, причем природа этой ассоциации до настоящего времени остается не изученной. Анализ примеров изменения механизма определения пола у прямокрылых насекомых показывает, что, несмотря на более чем 100 случаев спонтанного возникновения нео-XX/нео-XY гетерогаметного пола у прямокрылых насекомых, только у Pamphagidae это привело к дивергенции форм на базе цитологически трансформированного пола, что и делает эту группу уникальным модельным объектом исследования утраты структурно-функциональной гомологии между парными аутосомами, ставшими плечом нео-X хромосомы и нео-Y хромосомой. Предлагаемая исследовательская модель позволяет проследить эволюцию Y-хромосомы от её гомологии с парной аутосомой до превращения в гетерохромосому с присущими ей специфическими чертами.

Исследование поддержано грантом РФФИ (проект №12-04-01233-а).

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОФИЛИ, СУЩЕСТВЕННЫЕ ДЛЯ ОПИСАНИЯ ВИДОВ И БИОРАЗНООБРАЗИЯ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ: ХРОМОСОМНЫЙ ПОЛИТИПИЗМ И ГИБРИДИЗАЦИЯ

Булатова Н.Ш.

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН, Москва,

bulatova.nina@gmail.com

История цитогенетики млекопитающих начинается в 1920-е годы с элементарного определения диплоидного числа и формы хромосом у человека и ряда хозяйственно-полезных и лабораторных видов, и только в 1950-х г.г. получена возможность их сравнительного изучения благодаря усовершенствованию возможностей индивидуализации хромосом. Через полвека особенности современного периода определит сочетание ряда подходов, включающих культивирование клеток *in vitro* и применение молекулярных методов анализа. Суммарно полувековой отрезок цитогенетического изучения млекопитающих недавно эффективно оценен в свете развития генетической концепции вида (Baker, Bradley 2006). Особая теоретическая ценность придана описаниям криптических видов, выявляемых анализом кариотипа и молекулярных маркеров. Как ни в какой другой группе животных, цитогенетические данные востребованы для видового распознавания в кариосистематике млекопитающих. Благодаря исследованию хромосомного полиморфизма, некоторые виды оказались надолго и в целом в фокусе генетики. Десятилетиями накапливались материалы по хромосомной и молекулярной изменчивости различных представителей модельных видовых групп *Microtus arvalis*, *Mus musculus*, *Sorex araneus* и др., разные стороны генетической изменчивости открыли заново для систематиков вопросы видовых границ и видового ареала. Как выяснилось, у млекопитающих феномен хромосомного политипизма весьма распространен. Парапатрические формы, не поддающиеся открытию другими методами таксономического анализа, способны к смешиванию в зоне контакта с образованием узких гибридных зон, что говорит о наличии генетических изолирующих механизмов между ними. Пусть ограниченный, имеющийся опыт построения классификации в подобных случаях выявляет иерархическое соподчинение генетических таксонов и, следовательно, отражает эволюцию сложной системы, каковой является линнеевский вид животных, подобно таковым у растений по данным классического изучения культурной флоры (Вавилов 1931). Задача сбора коллекций с учетом хромосомных и геномных форм становится актуальной для выявления истинных масштабов биоразнообразия и разработки глобальных и региональных стратегий охраны генофондов. Поддержка грантами РФФИ (12-04-01283) и Программы Президиума РАН «Динамика и сохранение генофондов».

CYTOGENETIC PROFILES OF MAMMAL SPECIES WHICH SHOULD BE RESULTED IN ACCELERATING THE SPECIES DESCRIPTIONS AND MAMMALIAN BIODIVERSITY: CHROMOSOMAL POLYTYPY AND HYBRIDIZATION

Bulatova N.

A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow,
bulatova.nina@gmail.com

The history of chromosome studies in mammals has begun in the 1920's, from poor possibilities in definition of chromosome number and morphology in human in company with selected agricultural and laboratory species, and only since the 1950's, karyological comparisons became available due to essential improvements in chromosome individualization techniques. In a half of century, the peculiarity of the modern state became a combination of various approaches, including the cell cultivating *in vitro* applied with a variety of molecular methods. The effectiveness of half-age efforts in mammalian cytogenetics was recently outlined in frameworks of the developing Genetic Species Concept, GSP (Baker, Bradley 2006). A particular theoretical significance belongs to the descriptions of cryptic species, revealed by karyotype analysis and molecular marking. As in no other group of animals, cytogenetic data were in particular useful for the species recognition in the mammalian karyosystematics. Studies of chromosome polymorphism brought some taxa in the focus of the genetics in general for a long time. For decades, materials have been collected showing the chromosome and molecular variation in different parts of model species of such groups as *Microtus arvalis*, *Mus musculus*, *Sorex araneus*, where various sides of genetic variability opened the questions of species boundary and species range anew for systematicists. As it turned out, the phenomenon of chromosomal polytypy in mammals is rather widely distributed. In cases of parapatric hybridization, not identified by any method of taxonomic analysis, the introgression restricted to a narrow zone may indicate that genetic isolating mechanisms are evolved, in correspondence with the GSC theory. Though restricted, a practical experience of classification in such situations show the hierarchy relationships of genetic taxa, reflecting thus the evolution of a complex system to which species belong either in animals or in plants, as classic researches in cultivated plants discovered (Vavilov 1931). The current collection tasks meaning the chromosomal and genomic forms appear to be actual for the view of the real scale of biodiversity and working out the nature conservation strategies. Grants of RFBR (12-04-01283) and RAS Presidium Program "Dynamics and conservation of genofonds" are acknowledged.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК ХРОМОЦЕНТРА *D. VIRILIS* НА ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМАХ *D. VIRILIS* И *D. KANEKOI*

Вассерлауф И.Э.¹, Усов К.Е.², Саруханян М.С.², Стегний В.Н.²

¹НИИ биологии и биофизики Томского государственного университета

²Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск,
gene@res.tsu.ru

Филогенетический анализ последних лет, основанный на современных молекулярных данных, зафиксировал существование 14 видов в группе *virilis*, подразделенных на две филлады – «*virilis*» и «*montana*» и две подфиллады – «*littoralis*» и «*kanekoi*» [Spicer, 1992; Spicer, Bell, 2002]. Основу эволюционных преобразований кариотипов в группе *virilis* составляют транслокации и инверсии хромосомных участков, которые привели к изменению структуры и морфологии хромосом. В филогенетическом преобразовании видов группы *virilis* важную роль сыграли 92-120 инверсий, в основном это парацентрические инверсии [Patterson, Stone, 1952; Stone et al., 1960]. *D. virilis* является анцестральным видом, кариотип которого состоит из 5 пар акроцентрических хромосом и одной пары микрохромосом. Преобразование палочковидной хромосомы 2 у предкового вида (Primitive II) в метацентрическую у Primitive III произошло в результате перицентрической инверсии, которая дала начало расхождению двух ветвей в филогенетическом древе на филлады – «*virilis*» и «*montana*». Все члены филлады «*montana*» имеют новые инверсии [Patterson, Stone, 1952]. Таким образом, эволюция кариотипов в группе *virilis* преимущественно происходила путем преобразования акроцентрических хромосом в метацентрические вследствие Робертсоновского слияния центромерных районов хромосом. Виды филлады «*virilis*» содержат большее количество гетерохроматина, чем виды филлады «*montana*». Полагают, что на протяжении эволюции происходила редукция гетерохроматина в геноме, затрагивающая центромерные гетерохроматические блоки аутосом [Mahan, Beck, 1986].

Известно, что гетерохроматин играет важную роль в пространственной организации хромосом в ядре. *D. virilis* (филлада «*virilis*») и *D. kanekoi* (филлада «*montana*») имеют видоспецифичную архитектуру ядер трофоцитов. Для *D. virilis* характерен локальный хромоцентр с ярким блоком α -гетерохроматина, который объединяет прицентромерные районы всех политенных хромосом трофоцитов, в то время как у *D. kanekoi* все хромосомы образуют диффузный хромоцентр и не содержит крупных блоков α -гетерохроматина [Вассерлауф, 2008]. В связи с этим целью наших исследований являлось выявить

перераспределение гетерохроматина по геному при филогенетической реорганизации архитектуры ядер трофоцитов, а также провести сравнительный анализ локализации гетерохроматина в хромосомах слюнных желез и трофоцитов у этих видов. Для этого была проведена микродиссекция хромоцентра политенных хромосом слюнных желез *D. virilis* и получена район-специфичная библиотека ДНК (DvirIII). С помощью *in situ* гибридизации DvirIII с политенными хромосомами слюнных желез *D. virilis* и *D. kanekoi*, выявлено, что сигнал локализовался не только в районе хромоцентра, а также в прителомерном районе хромосомы 5 и во всей хромосоме 6. В тоже время, выявилась видовая специфичность в распределении DvirIII на хромосомах слюнных желез. Для *D. kanekoi* характерно наличие фиксированной перичентрической инверсии в хромосоме 2, вследствие которой хромосома стала метацентрической и произошло перераспределение гетерохроматина. Поэтому ДНК-проба локализовалась в центромерный район хромосомы 2 и в теломерный район плеча 2R. Видовая специфика у *D. virilis* проявлялась в наличии сигнала в некоторых интеркалярных районах всех хромосом, в то время как такое распределение DvirIII не выявлялось у *D. kanekoi*.

У *D. virilis* в ядрах трофоцитов DvirIII локализовалась в β -гетерохроматине прицентромерных районов всех хромосом, но не выявлялась в α -гетерохроматиновом блоке, возможно, из-за плотной упаковки хроматина. ДНК-проба, так же как и в хромосомах слюнных желез, была локализована в прителомерном районе хромосомы 5, однако локализация в интеркалярных районах всех хромосом, как в хромосомах слюнных желез, не была обнаружена. По-видимому, это связано с тканевой специфичностью в организации политенных хромосом трофоцитов, т.к. эти хромосомы по своей структуре и морфологии резко отличаются от политенных хромосом слюнных желез (хромосомы трофоцитов сильно укорочены и не имеют дисковой структуры). *In situ* гибридизация пробы с политенными хромосомами трофоцитов *D. kanekoi* показала наличие сигнала в диффузном хромоцентре и в прителомерном районе хромосомы 5, а также в теломерном районе хромосомы 2R.

Таким образом, яркой внутривидовой тканеспецифичности в распределении прицентромерного гетерохроматина (DvirIII) на хромосомах трофоцитов и слюнных желез у *D. virilis* и *D. kanekoi* не выявлялось. Виды *D. virilis* и *D. kanekoi*, являющиеся представителями различных филлад, отличаются не только по количеству [Cohen, Kaplan, 1982], но и по распределению гетерохроматина в хромосомах, что, по-видимому, привело к видовой специфичности архитектуры хромосом в ядрах трофоцитов.

МОДИФИКАЦИИ НЕАКТИВНОГО ХРОМАТИНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ САЙЛЕНСИНГА X-ХРОМОСОМЫ У ГРЫЗУНОВ

Васькова Е.А.^{1,2,3}, Шевченко А.И.^{1,2,3}, Дементьева Е.В.^{1,2,3}, Павлова С.В.^{1,2,3}, Григорьева Е.В.^{1,2,3}, Закиян С.М.^{1,2,3}

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

²Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, vaskova@bionet.nsc.ru

У млекопитающих существует три формы инактивации X-хромосомы: мейотическая, импринтированная и случайная. Мейотическая инактивация происходит в сперматогенезе у самцов на стадии пахитены в мейозе, когда обе половые хромосомы становятся транскрипционно неактивными. Транскрипционный сайленсинг половых хромосом продолжается и на постмейотических стадиях сперматогенеза вплоть до созревания зрелых сперматозоидов. На предимплантационных стадиях развития у самок имеет место импринтированная инактивация, когда инактивации подвергается X-хромосома, унаследованная от отца. Во время имплантации в клетках эпибласта отцовская X-хромосома подвергается реактивации, после чего выбор будущей неактивной хромосомы происходит случайным образом.

В данной работе мы изучили динамику ряд модификаций неактивного хроматина (убиквитинированного гистона H2A (uH2A), триметилированного гистона H3 по лизину K9 (H3K9me3), триметилированного гистона H3 по лизину K27 (H3K27me3), триметилированного гистона H4 по лизину K20 (H4K20me3) и гетерохроматинового белка HP1 γ) при различных формах сайленсинга X-хромосомы у двух видов грызунов – мыши и полевки *M. levis*. Было показано, что в основе мейотического и постмейотического сайленсинга X-хромосомы, а также на ранних этапах импринтированной инактивации лежит единая система сайленсинга: H3K9me3/HP1 γ , H4K20me3, uH2A. Тогда как в дальнейшем развитии происходит аккумуляция H3K27me3, что приводит к реорганизации и перераспределению модификаций вдоль X-хромосомы. Эти данные позволяют по-новому оценить механизмы, лежащие в основе инактивации X-хромосомы, преемственность между процессами мейотической и импринтированной форм инактивации, а также происхождение и эволюцию процесса импринтированной инактивации X-хромосомы.

РОЛЬ ГИСТОНА γ H2AX В КЛЕТОЧНОМ ОТВЕТЕ НА СТРЕСС

Величко А.К., Петрова Н.В., Разин С.В., Кантидзе О.Л.

Институт биологии гена РАН, г. Москва, omar.kantidze@genebiology.ru

Одним из наиболее изученных экзогенных факторов, действующих на организм или отдельные клетки, является тепловой стресс (гипертермия, тепловой шок). Механизмы ответа на тепловой стресс изучаются уже около пятидесяти лет, однако накопленный массив экспериментальных данных касается, в основном, нарушения высокоуровневых структур белков и связанных с этим процессом клеточными патологиями. В ходе недавних исследований, проведенных с использованием технологий ДНК-чипов и высокопроизводительного секвенирования, удалось идентифицировать большое количество генов, которые дифференциально экспрессируются (активируются либо репрессируются) в условиях теплового стресса. Несмотря на определенный прогресс в области изучения механизмов ответа на стресс, связанный с этими исследованиями, все еще крайне мало известно о влиянии гипертермии на целостность ДНК и такие ассоциированные с ДНК процессы, как репликация, распознавание и репарация повреждений ДНК. В клетках эукариот с данными процессами также связаны изменения в эпигеноме клеток, который представляет собой совокупность модификаций хроматина, не затрагивающих непосредственно последовательность ДНК (модификации гистонов, метилирование ДНК и т.д.). В данной работе было продемонстрировано, что эффект теплового стресса на культуры клеток высших эукариот зависит от стадии клеточного цикла: в то время как в G1- и G2-фазах клеточного цикла тепловой стресс приводит к образованию небольшого количества двунитевых разрывов ДНК, в S-фазных клетках происходит замедление/остановка процесса репликации ДНК без образования двунитевых разрывов (Velichko et al., 2012). Интересно, что данные процессы маркируются фосфорилированием вариантного гистона H2AX (γ H2AX), которое до недавнего времени считалось признаком наличия в клетке двунитевых разрывов ДНК. Более того фосфорилирование H2AX, ассоциированное с репликацией, предотвращает возникновение двунитевых разрывов ДНК в реплицирующихся областях и полную остановку репликации. Результаты данной работы демонстрируют существующую многофункциональность эпигенетических маркеров, в данном случае гистона γ H2AX, которая зависит от состояния клетки (в частности, стадии клеточного цикла) и тех патологических процессов, которые могут индуцироваться в клетке (образование разрывов ДНК и замедление репликации).

A.K. Velichko, N.V. Petrova, O.L. Kantidze*, S.V. Razin. Dual effect of heat shock on DNA replication and genome integrity. *Molecular Biology of the Cell*, 2012 (accepted)

ДИНАМИКА ЭВОЛЮЦИОННЫХ ПРЕОБРАЗОВАНИЙ КАРИОТИПОВ У ГОЛУБЯНОК ГРУППЫ *AGRODIAETUS PHYLLIS* (LEPIDOPTERA, LYCAENIDAE)

Вершинина А.О., Лухтанов В.А.

Зоологический институт РАН, Санкт-Петербургский Государственный Университет,
г. Санкт-Петербург, verшинina.alice@gmail.com

Многие группы живых организмов характеризуются стабильностью кариотипов, в частности отсутствием или невысоким уровнем межвидовой изменчивости хромосомных чисел. В качестве примера такой консервативной в отношении хромосомных чисел группы можно привести насекомых – представителей отряда отряд Lepidoptera. Кариотипы Lepidoptera обычно стабильны, и одно и то же гаплоидное число хромосом (n) $n=31$ характеризует подавляющее большинство видов, родов и семейств этого отряда.

В то же время в пределах почти каждой крупной группы животных и растений можно найти отдельные роды или группы близких видов, в которых хромосомные числа необычайно изменчивы. Среди всех представителей Lepidoptera, виды группы *Agrodiaetus phyllis* отличаются наиболее контрастным хромосомным полиморфизмом (разброс хромосомных чисел от $n=10$ до $n=134$), который возник быстро и является исключительным примером кариотипического разнообразия среди животных.

Наличие групп организмов, характеризующихся высоким уровнем хромосомного консерватизма с одной стороны, и групп, характеризующихся высокой изменчивостью хромосомных чисел с другой стороны, говорит о неравномерности темпов хромосомной эволюции и о существовании феномена быстрой хромосомной эволюции. Однако механизмы быстрой хромосомной эволюции изучены крайне слабо. Открытым является вопрос о динамике возникновения и накопления хромосомных перестроек в ходе филогенеза.

Контрастные различия в кариотипах между близкими видами могут возникать скачкообразно за счет фиксации множества хромосомных перестроек (гипотеза хромосомной мегаэволюции). В этом случае гомологизация перестроек, характерных для разных видов, становится невозможной. Это также приводит к невозможности реконструкции филогении на базе хромосомных перестроек. Поэтому, используя терминологию современной филогенетики можно сказать, что хромосомные изменения, возникающие в ходе хромосомной мегаэволюции, не несут филогенетического сигнала.

Альтернативой гипотезе хромосомной мегаэволюции является модель постепенного накопления хромосомных перестроек в филогенетических линиях. Такое накопление может происходить либо равномерно (градуализм), либо неравномерно по времени (пунктуализм).

Ранее для описания закономерностей быстрого преобразования хромосомных чисел у бабочек-голубянок рода *Agrodiaetus* была предложена статистическая модель «броуновского движения». Эту модель не рекомендуется принимать *a priori* и её применение до настоящего момента оставалось необоснованным. Мы протестировали гипотезу о соответствии эволюционной динамики изменений хромосомных чисел модели броуновского движения.

Проверка всех вышеупомянутых моделей требует не только знания о кариотипах, но и знания о филогенетических отношениях между сравниваемыми таксонами, поскольку понять эволюцию признака и динамику его проявления в ходе филогенеза невозможно без исследования филогении организмов - носителей этого признака. Современные методы филогенетических реконструкций, основанные на анализе нуклеотидных последовательностей, являются мощным инструментом для выявления закономерностей эволюции. Однако состоятельность моделей быстрой хромосомной эволюции никогда серьезно не тестировалась с применением современных молекулярно-филогенетических подходов.

Нам удалось реконструировать филогенетические отношения для всех известных на сегодняшний день представителей группы *A. phyllis*. Для выяснения эволюционной истории признака мы картировали данные о кариотипах на множество деревьев, полученных с помощью метода Байеса. Затем, с помощью метода Байеса и цепей Маркова Монте-Карло, учитывающих топологию и длины ветвей, было проведено моделирование эволюции признака при заданных параметрах. В нашем случае мы проверяли наличие\отсутствие филогенетического сигнала и наличие\степень пунктуальности и градуальности в эволюции кариотипов. Модели предсказывают поведение признака в ходе филогенеза. Метод максимального правдоподобия (через критерий отношения правдоподобия и Байесов фактор) позволил сравнить и оценить наши данные и результаты моделирования при «идеальных» параметрах.

В наблюдаемом разнообразии хромосомных чисел нами выявлен филогенетический сигнал. Анализ хромосомных и филогенетических данных представителей группы *A. phyllis* позволяет отвергнуть гипотезы об абсолютно градуальном и абсолютно пунктуальном характере эволюции хромосомных чисел. Также мы выяснили, что анализ хромосомных и филогенетических данных свидетельствует в пользу модели эволюции хромосомных чисел путём «броуновского движения».

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОВ МИКРОРНК, УЧАСТВУЮЩИХ В ОНКОГЕНЕЗЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Веряскина Ю.А.^{1,2}, Козлов В.В.⁴, Ахмерова Л.Г.¹, Буренкова Н.Н.⁵, Титов С.Е.^{6,1}, Иванов М.К.⁶, Войциский В.Е.⁴, Сидоров С.В.⁵, Гуляева Л.Ф.³, Колесников Н.Н.¹, Жимулёв И.Ф.¹

¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, kolesnikovnn@mcb.nsc.ru

²Институт лазерной физики СО РАН

³ФГБУ Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики СО РАМН

⁴ГБУЗ НСО Новосибирский областной онкологический диспансер

⁵МБУЗ Городская Клиническая Больница №1 г. Новосибирска

⁶ЗАО Вектор-Бест, г. Новосибирск

На сегодняшний день рак молочной железы является наиболее распространенным злокачественным новообразованием и угрожающей причиной смертности у женщин. Это заболевание редко имеет наследственный характер, при своевременной ранней диагностике современные методы терапии и хирургического лечения позволяют избежать летального исхода. Поэтому разработка методов в диагностике рака молочной железы, как и других онкологических заболеваний, является весьма актуальной задачей. Новый подход в этом направлении наметился в последнее десятилетие и связан с открытием малых некодирующих регуляторных микроРНК, размером 20-25 нуклеотидов. Их функция заключается в негативной регуляции экспрессии белок кодирующих генов на посттранскрипционном уровне. МикроРНК играют важную роль в разных метаболических и биологических процессах, таких как, эмбриогенез, клеточная дифференцировка, пролиферация, апоптоз, а дерегуляция их экспрессии ведет к многочисленным патологиям, включая канцерогенез.

Цель работы заключалась в исследование роли некоторых микроРНК в канцерогенезе молочной железы у человека, сравнительном анализе изменения уровня их экспрессии в норме и при злокачественных и доброкачественных образованиях, и после различной неoadьювантной терапии, биоинформационном анализе их структурной организации в геноме. Клинический материал для анализа был предоставлен Новосибирским областным онкологическим диспансером и МБУЗ г. Новосибирска ГКБ №1 в соответствии с законодательством РФ. Методом ПЦР в реальном времени (Chen et al., 2005) анализировали профиль экспрессии пяти онкогенных микроРНК – miR-21, miR-221, miR-222, miR-155, miR-146b, и miR-205, относящейся к туморсупрессорным микроРНК, в разных типах опухолей и после терапевтического воздействия. Всего проанализировано 8 образцов с диагнозом фиброаденома и 35 образцов с диагнозом протоковый инфильтрирующий рак, среди которых 8 пациентов с диагностированными метастазами в лимфатические узлы.

Мы показали, что существует различие между экспрессией вышеуказанных микроРНК при инфильтрирующем протоковом раке молочной железы и при фиброаденоме, с учётом стадий развития болезни. Также микроРНК могут быть

использованы в качестве контроля на проводимую неоадьювантную терапию. Выявлен уникальный профиль экспрессии всего набора микроРНК, в зависимости от типа и интенсивности проводимого предоперационного лечения. В частности наблюдаются различия показателей микроРНК при лучевой и химиотерапии, а так же при смешанных типах лечения.

Ген MIR-21, локализован в межгенной области 17 хромосомы в позиции q23.1 и является сильным онкогеном. Увеличение экспрессии этого гена ассоциировано с неблагоприятным развитием злокачественного новообразования. Результаты экспериментов показали увеличение уровня экспрессии miR-21 в 10 раз в опухолевой ткани, по отношению к нормальной ткани, взятой у того же пациента ($p=0.001$) с диагнозом инфильтрирующий протоковый рак. Между тем в биоптатах, взятых у пациентов с диагнозом фибroadенома, уровень экспрессии miR-21 не увеличивается. На длинном плече 17 хромосомы расположен ген *BRCA1* с координатами q21.31, ассоциированный с наследственным раком молочной железы. Показано, что мутации в гене *BRCA1* коррелируют с увеличенной экспрессией miR-155, локализованной на 21 хромосоме в позиции q21.3. В наших экспериментах выявлено увеличение уровня экспрессии miR-155 в опухолевой ткани в 20 раз, по отношению к нормальной ткани, взятой у того же пациента ($p=0.003$). У пациентов с доброкачественным новообразованием увеличение экспрессии miR-155 не отмечено.

Гены MIR-221 и MIR-222 являются онкогенами и участвуют в процессе клеточной пролиферации. Для них характерна кластерная организация на X хромосоме в позиции p11.3 и возможно они транскрибируются совместно. Однако в некоторых тканях могут показывать различные уровни экспрессии, что указывает на то, что они могут находиться под контролем различных регуляторных элементов. При новообразованиях молочной железы уровни экспрессии miR-221 и miR-222 изменяются сходным образом, тогда как в опухолях щитовидной железы – независимо.

Ген MIR-205, локализован на первой хромосоме в позиции q32.2 и является супрессором опухолевого образования. Выявлено уменьшение уровня экспрессии miR-205 в опухолевой ткани в 20 раз, по отношению к нормальной ткани, взятой у того же пациента ($p=0.005$), между тем в биоптатах фибroadеномы наблюдается увеличение экспрессии miR-205 в 10 раз ($p=0.005$).

Ген MIR-146b, расположен в межгенной области 10 хромосомы в позиции q24.32 и является онкогеном, показывая увеличение экспрессии, как при злокачественных, так и при доброкачественных новообразованиях в 2 раза ($p=0.005$).

Таким образом, выявлены существенные изменения экспрессии микроРНК в разных типах опухолей и их различная структурная организация в геноме, что представляет значительный интерес для изучения механизмов онкогенеза, а сами микроРНК могут быть использованы в практических целях в качестве потенциальных биомаркёров для диагностики онкологических заболеваний.

ОСОБЕННОСТИ РАСПОЛОЖЕНИЯ ХРОМОСОМНЫХ ТЕРРИТОРИЙ В МЕЗИНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ СТАРЕНИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ

Вольдгорн Я.И., Лавров А.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук, г. Москва, amrita86@mail.ru

В настоящее время одним из наиболее многообещающих направлений клеточной биологии является эпигенетика. Изменение взаимного расположения хромосомных территорий (ХТ) в интерфазном ядре является важным механизмом эпигенетической регуляции таких процессов, как активация/инактивация генов, дифференцировка и старение клеток. Особенности положения отдельных хромосом описаны в ядрах многих клеток человека, включая эмбриональные стволовые клетки. В нашей работе приводятся данные о строении ядра мезенхимных стволовых клеток человека (МСК). Целью данной работы было изучение изменений в положении ХТ в МСК в процессе культивирования и дифференцировки. МСК являются удобной и легко доступной моделью для изучения данных процессов. Кроме того, МСК представляют интерес для медицины, поскольку обладают большим терапевтическим потенциалом для восстановления поврежденных тканей.

Фиксированные на стадии интерфазы МСК подвергались методу FISH с использованием центромерных зондов к 6, 18, 12 и X хромосомам. С помощью специально разработанной программы оценивалось радиальное положение ХТ в ядре.

Ядра МСК анализировали на ранних (до 4) и поздних (после 5) пассажах, а так же после адипогенной и остеогенной дифференцировок. Было проанализировано более 4000 ядер 19 различных культур МСК. Между культурами не было выявлено индивидуальных различий. Один из гомологов каждой хромосомы всегда находится существенно ближе к центру ядра, чем другой. После дифференцировок в адипогенном и остеогенном направлениях наблюдалось более дистальное расположение хромосом 18 и X по сравнению с их расположением в МСК. В мужских культурах хромосома X занимает промежуточное положение по сравнению с проксимальным и дистальным гомологами хромосомы X в женских культурах. Показано специфическое строение ядра МСК, отличающее их как от эмбриональных стволовых клеток, так и дифференцированных клеток. Такое строение может являться уникальной характеристикой МСК, связанной с эпигенетической регуляцией их активности.

SAYP И ВРАHМА ВАЖНЫ ДЛЯ ОСТАНОВКИ КОМПЛЕКСА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ II, КАК ПРИ РЕПРЕССИИ, ТАК И В СОСТОЯНИИ АКТИВНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Воробьева Н.Е.¹, Николенко Ю.В.¹, Набировкина Е.Н.², Краснов А.Н.^{1,4}, Шидловский Ю.В.², Георгиева С.Г.^{2,3}

¹Группа по изучению транскрипции и транспорта мРНК, Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия, nvorobyova@gmail.com

²Лаборатория регуляции экспрессии генов, Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия

³Лаборатория факторов транскрипции, Институт молекулярной биологии РАН, Москва, 119991 Россия

⁴Университет Осло, Центр медицинских исследований в России, Москва, 119334, Россия

Впервые феномен остановки РНК-полимеразы II был описан для гена *hsp70*. На данном гене, в состоянии паузы коактиваторы, а также РНК-полимераза II привлекаются на промотор, однако активной транскрипции гена не происходит. В дальнейшем было обнаружено, что процесс остановки РНК-полимеразы II широко распространен по геному и может быть обнаружен на многих генах. В основном, феномен остановки РНК-полимеразы II характерен для генов развития, а также генов стресса. Можно предположить, что данный процесс важен для быстрого и точного контроля экспрессии генов. Наше исследование еще больше расширяет данную область и описывает новую группу факторов, вовлеченных в процесс остановки РНК-полимеразы II.

Коактиватор SAYP *Drosophila melanogaster* (гомолог белка PHF10/BAF45a человека) ассоциирован с ремоделирующим комплексом Brahma и необходим для привлечения комплекса к промоторам генов. В данном исследовании была продемонстрирована роль SAYP в транскрипции гена *ftz-f1*, активируемой при участии ядерного рецептора DHR3. Гены *dhr3* и *ftz-f1* являются основными участниками экдизинового каскада дрозофилы.

В состоянии репрессии гена *ftz-f1* при участии активатора DHR3 на промоторе формируется комплекс «остановленной» РНК-полимеразы II. РНК-полимераза II начинает транскрипции, но останавливается на 1,5 т.п.о. ниже промотора. В данной области SAYP и Brahma формируют «нуклеосомный барьер» (район высокой нуклеосомной плотности) перед сайтом остановленной РНК-полимеразой II. Снижение уровня SAYP ведет к нарушению рекрутинга Brahma, а также к снижению «нуклеосомного барьера». Во время активной транскрипции на гене *ftz-f1* происходит временная остановка РНК-полимеразы II. Она наблюдается в том же сайте, что и в состоянии репрессии и коррелирует с сайтом внесения модификации Ser2 фосфорилирования в CTD РНК-полимеразы II. В состоянии активной транскрипции гена *ftz-f1* коактиватор SAYP необходим для фосфорилирования Ser2 и элонгации транскрипции.

Таким образом, SAYP в составе ремоделирующего комплекса Brahma участвует в процессах остановки РНК-полимеразы II, как в состоянии репрессии, так и в состоянии активной транскрипции.

SAYP AND BRAHMA ARE IMPORTANT FOR “REPRESSIVE” AND “TRANSIENT” POL II PAUSING

Vorobyeva N.E.¹, Nikolenko J.V.¹, Nabirochkina E.N.², Krasnov A.N.^{1,4}, Shidlovskii Y.V.^{2,4}, Georgieva S.G.^{2,3}

¹Group of Transcription and mRNA Transport, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia, nvorobyova@gmail.com

²Department of Regulation of Gene Expression, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

³Department of Transcription Factors, Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

⁴University of Oslo, Centre for Medical Studies in Russia, Moscow, 119334 Russia

The phenomenon of Pol II pausing was described initially for *hsp70* gene. In paused state coactivators as well as Pol II are accumulated on the promoter, however, the productive transcription is blocked until certain stimulation. The attention to Pol II pausing has further increased since it was found to be a genome-wide event. There are a lot of evidence, that PolII pausing is prevalent at genes involved in development and response to stimuli, suggesting that it is important for rapid activation and precise control of gene expression. Our study further expands the scope of this molecular phenomenon and indicates novel factors involved in it.

Drosophila SAYP, a homologue of human PHF10/BAF45a, is a metazoan coactivator associated with Brahma and essential for its recruitment on the promoter. The role of SAYP in DHR3 activator-driven transcription of the *ftz-fl* gene, a member of the ecdysone cascade was studied. At the repressed state of *ftz-fl* in the presence of DHR3 stalled Pol II complex is present on promoter: Pol II starts transcription but is paused 1.5 kb downstream of the promoter, with SAYP and Brahma forming a “nucleosomal barrier” (a region of high nucleosome density) ahead of paused Pol II. SAYP depletion leads to the removal of Brahma, thereby eliminating the nucleosomal barrier. During active transcription, Pol II pausing at the same point correlates with Pol II CTD Ser2 phosphorylation. SAYP is essential for Ser2 phosphorylation and transcription elongation.

Thus, SAYP as part of the Brahma complex participates in both “repressive” and “transient” Pol II pausing.

ПЕРЕОСМЫСЛЕНИЕ МЕТОДА 3С: ЛИГИРОВАНИЕ В ЯДРЕ, А НЕ В РАСТВОРЕ

Гаврилов А.А.¹, Гуцанская Е.С.^{1,2}, Киреев И.И.², Яровая О.В.¹, Разин С.В.^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена РАН, г. Москва

²Биологический факультет Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва, aleksey.gavrilov@mail.ru

Метод 3С (Chromosome Conformation Capture, фиксация конформации хромосомы) служит для изучения пространственной организации протяженных участков генома *in vivo*. Вот уже 10 лет этот метод успешно используется по всему миру для исследования взаимодействия регуляторных элементов генома в ядерном пространстве и анализа высших уровней упаковки хроматина в интерфазных хромосомах. В основе метода лежит принцип предпочтительного лигирования близкорасположенных фрагментов ДНК.

Экспериментальный протокол включает формальдегидную фиксацию ДНК-белковых комплексов *in vivo* с последующей обработкой ДНК эндонуклеазами рестрикции и религированием полученных фрагментов ДНК. Фрагменты, расположенные в непосредственной близости друг от друга, имеют большие шансы встретиться и быть сшитыми лигазой. Это относится, в частности, и к фрагментам, находящимся в составе одного ДНК-белкового комплекса. Согласно экспериментальной процедуре, клетки после фиксации обрабатываются детергентами, и рестрикция также проводится в присутствии детергента (SDS). Авторы протокола считали, что такая обработка обеспечивает высвобождение ДНК-белковых комплексов из ядер в раствор. Дальнейшее лигирование проводили после сильного разведения материала. Понижение концентрации ДНК должно было минимизировать лигирование фрагментов, не объединенных белковыми сшивками, в то время как вероятность лигирования фрагментов, сшитых через белковые мостики, должна оставаться высокой вне зависимости от концентрации. В этой связи частоту лигирования различных фрагментов ДНК рассматривали как прямой показатель вероятности их нахождения в составе одного ДНК-белкового комплекса.

В данной работе мы показываем, что как рестрикция, так и лигирование в методе 3С происходят внутри ядра. Прежде всего, с использованием методов иммуногистохимического анализа и электронной микроскопии мы демонстрируем, что в ходе обработок фиксированных формальдегидом ядер ионным детергентом ядра не лигируются. Более того, в таких ядрах сохраняются различные функциональные компартменты, включая ядрышки, тельца сплайсинга, компоненты ядерного матрикса и места предпочтительной локализации гетерохроматина. Судя по окраске ядер DAPI,

значительная, а возможно и большая часть ДНК также остается внутри ядер. Это подтвердил и прямой анализ распределения ДНК между остаточными ядрами и экстрагируемым материалом. С целью выяснения вопроса о том, в какой фракции происходит лигирование фрагментов, регистрируемое в последующем как «3С-сигнал», остаточные ядра и растворимый материал после рестрикции были разделены центрифугированием, после чего реакция лигирования была поставлена отдельно с растворимой фракцией (экстрагированная ДНК) и нерастворимой фракцией (ядра). Оказалось, что при использовании эндонуклеазы рестрикции HindIII (базовая эндонуклеаза для 3С-анализа) практически весь ДНК-материал остается в ядре и, соответственно, весь 3С-сигнал поступает из ядра. В случае использования частощепящей эндонуклеазы рестрикции MboI, около половины ДНК обнаруживалось в растворе, однако весь 3С-сигнал по-прежнему происходил из нерастворимой фракции. Эти эксперименты были проделаны на мышинных эмбриональных эритроидных клетках, 3С-сигнал детектировали от элементов бета-глобинового локуса.

Основываясь на полученных результатах, мы предлагаем обновленную модель действия энхансера, постулирующую динамичность хроматинового хаба (комплекса регуляторных элементов ДНК) и важность сосредоточения различных регуляторных элементов в одном функциональном компартменте, где они не обязательно объединены в единый регуляторный комплекс. При фиксации ядер формальдегидом динамический функциональный компартмент стабилизируется за счет сшивок между расположенными рядом хроматиновыми фибриллами, тогда как образование прямых белковых мостиков между регуляторными элементами является достаточно редким событием.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ ЦЕНТРА НОВЫХ МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ: РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

Гайнер Т.А.^{1,2}, Каримова О.Г.^{1,2}

¹АНО «Центр новых медицинских технологий в Академгородке», г. Новосибирск

²Центр новых медицинских технологий ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск, tatyana@cnmt.ru

Хромосомные аномалии занимают существенное место в структуре врожденной патологии человека. Число больных с хромосомной патологией (ХП) в России составляет около 400 тыс. человек, каждый двухсотый новорожденный имеет ХП. Как правило, хромосомные болезни имеют тяжелое течение, нередко приводят к инвалидности, а иногда и к ранней гибели больных. Поэтому так важна диагностика и профилактика хромосомных аномалий.

Цитогенетическая лаборатория ЦНМТ была организована и начала свою работу в январе 2011 г. С 12.01.11 по 12.07.12 было сделано 393 цитогенетических исследования (таблица 1).

Таблица 1. Исследования, выполненные в лаборатории в период с 01.2011 по 07.2012

Наименование исследования	Количество исследований	Выявленная патология	
		количество	процент
Исследование кариотипа (периферическая кровь)	343	10	3
Кордоцентез	11	-	-
Исследование ворсин хориона диагностического	7	-	-
Исследование ворсин хориона абортного	32	15	60
Всего	393	25	

Как известно, ХП является одной из причин нарушения нормального внутриутробного развития. Подсчитано, что частота ХП у детей с МВПР достигает 40%. Большинство хромосомных аномалий сопровождается умственной отсталостью и пороками развития. Поэтому так важна пренатальная цитогенетическая диагностика. В январе 2011 г. такая диагностика в лаборатории была представлена только кордоцентезом (исследование хромосом плода по пуповинной крови, проводится во II триместре беременности). Не вызывает сомнений важность проведения диагностики ХП в I триместре. Поэтому в апреле 2011 г. мы внедрили исследование ворсин хориона (проводится на ранних сроках беременности – с 8 недель). Забор ворсин происходит трансабдоминально под контролем аппарата УЗИ. ЦНМТ – единственное учреждение в городе, в котором биопсия ворсин проводится в том же здании, где находится лаборатория. Цитогенетик присутствует в операционной и сразу оценивает взятый материал, что позволяет избежать повторной биопсии. Доставка хориона в лабораторию занимает несколько минут, что является важным фактором для получения результата исследования.

При замершей беременности мы проводим исследование ворсин abortного хориона. По литературным данным, 35-40% спонтанно abortированных эмбрионов имеют ХП. Нами исследовано 32 abortных хориона, из них в 10 случаях был выявлен нормальный кариотип (40% от 25 результативных исследований), в 15 – ХП (60%), в 7 – кариотип не выявлен.

Таблица 2. Патология, выявленная при исследовании ворсин abortного хориона

Кариотип	Число случаев
48,XX,+4,+7	1
47,XX,+8 / 47,XY,+8	3
47,XX,+13	1
46,XY,+13,der(13;14)(q10;q10)	1
47,XX,+15 / 47,XY,+15	2
47,XX,+21	1
47,XX,+22	1
45,X	2
46,XY,+?der(X)	1
mos 92,XXYY/46,XY	1
92, XXYY	1

Хотелось бы отметить, что нам удалось добиться самых кратких сроков выдачи заключения в городе – 2 недели с момента забора крови, и всего 2-5 дней для дородовой диагностики.

В 2013 году мы планируем внедрить амниоцентез (исследование хромосом плода через амниотическую жидкость). Он проводится с 17 недель

беременности и является самым безопасным видом дородовой диагностики. Амниоцентез – более дорогостоящее исследование, чем остальные методы. Но мировая практика показывает, что все вложения в пренатальную диагностику многократно окупаются за счет снижения процента рождения детей с ВПР, сокращения детской смертности и уменьшения уровня детской инвалидности.

Второе перспективное направление развития лаборатории – это внедрение молекулярных методов исследования, в частности, FISH. Этот метод можно использовать для додиагностики сложных случаев хромосомной патологии и для быстрой диагностики самых распространенных анеуплоидий у плода. Известно, что на анеуплоидию по хромосомам 13, 18, 21, X и Y приходится более 95% всей ХП плода.

Еще одно перспективное направление использования FISH - индикация радиационного воздействия на организм человека. С помощью G-окрашивания можно выявить в крови человека, подвергшегося облучению, маркеры радиационного воздействия (кольцевые и дицентрические хромосомы), но этот метод не позволяет оценить полученную дозу. В РФ есть закон, по которому лица, получившие определенную дозу облучения, имеют право на значительные льготы. Одним из самых разработанных и обоснованных является метод оценки полученной дозы облучения по частоте транслокаций, выявляемых в клетках периферической крови с использованием FISH. Метод зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения и может применяться в медицинской практике.

СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ДОМЕНЫ ИНТЕРФАЗНЫХ ХРОМОСОМ

Глазков М.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Российской академии наук
Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН, г. Москва, mvglazkov@yandex.ru

Существование в эукариотических хромосомах доменов, имеющих разную степень компактизации (эухроматин, гетерохроматин), соседствование в хромосомах транскрипционно активных и неактивных локусов (генов) привело к представлению о существовании в хромосоме каких-то барьерных элементов между перечисленными выше структурами. В настоящее время постулируется существование двух типов барьерных элементов. Первый тип, наиболее изученный, - это энхансер-блокирующие инсуляторы. Второй тип – барьерные элементы между «активным» (транскрибирующиеся локусы) и «неактивным» (транскрипционно неактивные в данный момент локусы, гетерохроматин) хроматином. Мы предполагаем, что барьерными элементами второго типа могут быть участки прикрепления интерфазных хромосом к ядерной оболочке (яоДНК), что не только «фиксирует» хромосомы в объеме ядра, но и приводит к разделению хромосомы на серию структурно-функциональных доменов. Об этом могут свидетельствовать следующие экспериментальные данные:

- Интерфазная хромосома имеет множество точек прикрепления к ядерной оболочке.
- яоДНК – особый класс хромосомных нуклеотидных последовательностей, отличающийся от таких хромосомных участков как SARs/MARs, ДНК, выделенных из белковых сердцевин розеткоподобных структур и синаптонемного комплекса.
- Участки хромосомной ДНК, выделенные из ядерных оболочек (яоДНК) сиквенс- и конформационно-специфично связываются с белковыми компонентами ядерной оболочки.
- яоДНК обладают высокой эволюционной консервативностью, преимущественно локализуется в межгенных участках и реже в интронах.
- Фрагменты яоДНК способны поддерживать высокий уровень экспрессии трансгена(ов), который они фланкируют вне зависимости от места его интеграции в хозяйские хромосомы, не обладают какой-либо регуляторной функцией в транскрипции, а также энхансер-блокирующей активностью.
- Максимальную защиту от эффекта положения фрагменты яоДНК осуществляют совместно с инсуляторами. При этом, воздействие инсулятора (Wari) не распространяется через яоДНК.

Следует отметить, что прикрепление интерфазной хромосомы к ядерной оболочке может иметь структурный и функциональный характер. Структурный тип прикрепления обусловлен существованием в хромосомной ДНК специфических участков - яоДНК. Функциональный тип прикрепления связан с механизмом компактизации хромосомных локусов (ген-содержащих и не содержащих) при участии коротких (9-11 пн) полипуриновых/полипиримидиновых треков ДНК, способных образовывать триплексные структуры с высвобождением одностранных участков ДНК, которые прочно, но неспецифично связываются с ядерной ламиной. Хромосомный локус, расположенный между двумя участками яоДНК, может содержать один или несколько генов, функциональное состояние которых определяется их регуляторными элементами. «Правильную» регуляцию экспрессии генов в локусе, в свою очередь, определяют (контролируют) инсуляторы. Причем действие инсуляторов, возможно, осуществляется только в пределах данного локуса и не может распространяться за пределы яоДНК. Структурной основой независимой экспрессии линкированных генов в таких локусах является их организации в виде независимых серий петель небольшого размера (розеткоподобных структур).

Применительно к политенным хромосомам дрозофилы, как модели организации интерфазной хромосомы, яоДНК располагаются в междисковых участках, тогда как тканеспецифичные гены (наряду с сателлитной ДНК и некоторыми другими ген-несодержащими участками) – в дисках (состоящих из розеткоподобных структур). Однако, в случае неполитенизированных интерфазных хромосом, для понимания их функциональной организации требуется учитывать более высокие уровни организации интерфазного хроматина чем 100 нм фибриллы (хромомерный уровень).

Следует отметить, что изложенная выше модель также способна удовлетворительно объяснить существование в хромосомах различных организмов эволюционно-консервативных кластеров координировано экспрессирующихся генов (располагающихся между двумя сайтами фиксации хромосом на ядерной оболочке).

Работа частично поддержана грантом Программы фундаментальных научных исследований Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития», Подпрограмма «Динамика и сохранение генофондов».

РЕВИЗИЯ КАРТИРОВАНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДИСКОВ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ ВИДОВ ГРУППЫ *C. PLUMOSUS* (DIPTERA, CHIRONOMIDAE)

Голыгина В.В.^{1,2}, Кикнадзе И.И.¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, nika@bionet.nsc.ru;

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Группа видов-близнецов *C. plumosus* является уникальным объектом для изучения путей линейной реорганизации генома в ходе видообразования. Среди 14 видов этой группы, известных в настоящее время, имеются виды с обширными ареалами, такие как голарктические *C. plumosus* и *C. entis*, и виды с очень узкими ареалами, например эндемичные для Японии *C. suwai* и *C. sp.* К. Входящие в данную группу виды также значительно отличаются по уровню хромосомного полиморфизма в природных популяциях. Главным достоинством видов группы *C. plumosus* для исследования эволюции кариотипов является высокая гомология рисунка дисков в гомеологичных плечах хромосом разных видов, позволяющая изучать закономерности реорганизации линейной структуры всего генома с помощью сравнения последовательностей дисков политенных хромосом и использовать эти данные для построения филогенетических деревьев. Однако для точного картирования точек инверсионных разрывов, отличающих кариотипы видов, необходимо наличие качественных цитофотокарт высокого разрешения. К сожалению, для большинства видов группы *C. plumosus* имеющиеся к настоящему времени цитофотокарты не отвечают современным требованиям. Кроме того, нуждается в ревизии и само картирование последовательностей дисков политенных хромосом большинства видов группы *C. plumosus*, так как нередко оно было проведено неточно.

Нами созданы цитофотокарты высокого разрешения для 12 видов-близнецов группы *C. plumosus*. Проведена ревизия картирования основных и альтернативных последовательностей дисков в 6 плечах – А, В, С, D, Е и F (основные последовательности дисков встречаются с наивысшей частотой в большинстве популяций вида, альтернативные встречаются в большинстве популяций вида, но имеют высокую частоту лишь в отдельных популяциях). Для 69 из 97 проанализированных последовательностей дисков проведено уточнение границ инверсий и предложен новый вариант картирования. На основе полученных данных для каждого плеча построены дендрограммы, отражающие эволюционные взаимосвязи последовательностей дисков разных видов и позволяющие уточнить филогенетические отношения между видами группы *C. plumosus*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 09-04-01440а и программ Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов» и «Происхождение биосферы и эволюция гео-биологических систем».

РОЛЬ ТРАДИЦИОННЫХ И НОВЫХ МЕТОДОВ В ИССЛЕДОВАНИИ ХРОМОСОМ ПАРАЗИТИЧЕСКИХ ПЕРЕПОНЧАТОКРЫЛЫХ (HUMENOPTERA)

Гохман В.Е.

Ботанический сад Московского государственного университета, г. Москва,

vegokhman@hotmail.com

Паразитические перепончатокрылые, или наездники, – одна из наиболее многочисленных, таксономически сложных и практически важных групп насекомых. В настоящее время в той или иной степени исследованы хромосомные наборы примерно 450 видов паразитических Hymenoptera, что составляет менее одного процента от числа описанных видов. Вследствие относительно слабой изученности кариотипов наездников, даже исследование рутинно окрашенных хромосом этих насекомых (обычно в сочетании с другими методами) может предоставить результаты, важные как для анализа структуры кариотипа паразитических перепончатокрылых, так и для понимания процессов эволюции их хромосомных наборов. Так, выполненный нами морфометрический анализ кариотипов паразитических орехотворок семейства Figitidae из родов *Leptopilina* и *Ganaspis* продемонстрировал положительную, хотя и нелинейную, корреляцию между размерами их генома, с одной стороны, и суммарной длиной хромосом – с другой. Более того, результаты исследования кариотипов этих групп, как и некоторых представителей хальцидоидных наездников из семейств Encyrtidae (род *Metaphycus*) и Eurytomidae (род *Eurytoma*), позволили нам выделить синапоморфии по хромосомным признакам на уровне отдельных групп видов. Таким образом, указанные признаки могут использоваться в исследованиях по филогении наездников не только для подтверждения существующих схем, но и для создания новых филогенетических реконструкций. Кроме того, изучение структуры кариотипа паразитических перепончатокрылых позволяет определить некоторые генетические характеристики этих насекомых (например, наличие специфических В-хромосом и аналогичных элементов, несущих особые факторы, смещающие соотношение полов в сторону самцов или самок), а также степень распространения в популяции тех или иных хромосомных форм.

Наряду с этим, традиционные методы дифференциального окрашивания хромосом, используемые в сравнительно-кариологических исследованиях наездников с начала 90-х годов прошлого века, к настоящему времени позволили определить общие закономерности распределения гетерохроматина (С-окраска) и хромосомной локализации ядрышковых организаторов (AgNOR-окраска). Так, для хромосом паразитических Hymenoptera характерны умеренно развитые блоки прицентромерного и теломерного гетерохроматина; возможно также присутствие интерстициальных блоков (обычно более слабых). Область

ядрышкового организатора, как правило, расположена терминально или субтерминально на акроцентрических/субтелоцентрических (реже на метацентрических) хромосомах и в диплоидном кариотипе присутствует на обоих гомологах той или иной хромосомной пары (редко – двух пар). Отдельного упоминания заслуживает G-окраска, которая позволяет идентифицировать гомологичные хромосомы в пределах видового кариотипа, однако попытки ее применения для сравнения хромосомных наборов различных видов перепончатокрылых (как и других насекомых) оказались относительно малоэффективными вследствие специфической структуры их хромосом.

Новые методы дифференциального окрашивания, активно развивающиеся в последние годы, существенно расширили и углубили наши знания о хромосомах наездников. Так, окраска хромосом с помощью флуорохромов, специфически окрашивающих участки, обогащенные АТ- (например, DAPI) и ГЦ-парами оснований (хромомицин А₃), а также аналогичных нефлуоресцирующих агентов (в частности, метилового зеленого, связывающегося с АТ-парами), позволяет выявить хромосомные сегменты с соответствующими структурой и составом. На материале паразитических Hymenoptera подобное комплексное исследование впервые выполнено нами для двух близких видов хальцид семейства Eulophidae – *Entedon cioni* и *E. cionobius*, а позднее – для *Leptopilina boulandi*, *L. heterotoma*, *L. victoriae* и *Ganaspis xanthopoda* из семейства Figitidae.

Весьма специфичным методом определения хромосомной локализации нуклеиновых кислот с той или иной первичной структурой является их гибридизация *in situ*, и прежде всего ее наиболее востребованная современная модификация – флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), также выполненная нами на примере 45S рДНК на хромосомах *Leptopilina heterotoma*, *Entedon cioni* и *E. cionobius*. Значение этого метода существенно повышается еще и по той причине, что подобные исследования могут предоставить важную информацию, необходимую для секвенирования геномов насекомых, активно проводимого в настоящее время в различных лабораториях. Здесь, очевидно, следует упомянуть, что геном единственного вида наездников (*Nasonia vitripennis* из семейства Pteromalidae), изученного с помощью хромосомного пэйнтинга, был (впервые среди паразитических перепончатокрылых) полностью просеквенирован вместе с таковым двух других представителей этого рода.

Наконец, близким к FISH по разрешающей способности является иммунохимическое выявление распределения тех или иных компонентов по длине хромосом. В частности, этим методом (с использованием антител к 5-метилцитозину) нами (впервые для перепончатокрылых) изучено распределение интенсивности метилирования ДНК по длине хромосом *Entedon cioni* и *E. cionobius*.

О ПРОИСХОЖДЕНИИ БЕЛКОВ СИНАПТОНЕМНОГО КОМПЛЕКСА: НЕКОТОРЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА IN SILICO

Гришаева Т.М.

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва, grishaeva@vigg.ru

Вопрос о происхождении и эволюции механизма мейоза, в том числе белков, участвующих в мейотических процессах, является в настоящее время одним из актуальных в клеточной биологии [Maguire, 1992; Богданов, 2003]. Ранее мы показали, что некоторые структурные белки мейоза тяготеют к бактериальным белкам, тогда как другие – к архейным. Однако сходство этой группы белков с прокариотическими белками весьма низкое, часто на уровне такового для случайных наборов аминокислот [Захаров и др., 2010]. Задачей настоящего исследования явился поиск в протеомах примитивных эукариот и кишечнорастворимых животных белков, сходных с известными белками синаптонемного комплекса (СК) – белковой структуры, формирующейся между конъюгирующими гомологами в профазе I мейоза.

Были исследованы практически все известные к настоящему времени белки СК семи модельных видов эукариот от дрожжей до человека (всего 33 белка). Это белки центрального пространства СК – Zip1 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, C(3)G и CORONA насекомого *Drosophila melanogaster*, ZYP1a и ZYP1b растения *Arabidopsis thaliana*, SYP-1, SYP-2, SYP-3 и SYP-4 нематоды *Caenorhabditis elegans*, SYCP1, SYCE1, SYCE2, TEX12 рыбы *Danio rerio* (в одном случае *Anoploptoma fimbria*) и мыши *Mus musculus*, SYCE3 мыши; белки латеральных элементов СК – Hop1 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*, Red1 *Saccharomyces cerevisiae*, Rec10 *Schizosaccharomyces pombe*, C(2)M *Drosophila melanogaster*, HIM-3 *Caenorhabditis elegans*, ASY1 и ASY2 *Arabidopsis thaliana*, SYCP2 и SYCP3 *Danio rerio* и *Mus musculus*; белки, аннотированные как белки СК – SC65 *Danio rerio* и *Mus musculus*, FKBP6 *Mus musculus*. Эти белки не гомологичны у представителей разных таксонов эукариот [Bogdanov et al, 2007]. Они несут разные функциональные домены или вовсе лишены их.

Аминокислотные последовательности белков СК искали в базах данных NCBI. В качестве контроля использовали случайные аминокислотные последовательности, генерированные из оригинальных белков программой RandSeq. С помощью программы Protein BLAST (NCBI) вели поиск сходных последовательностей в протеомах водорослей, низших грибов, простейших и кишечнорастворимых. Показатель сходства Score (результат работы программы BLAST) учитывал три параметра: число совпадений аминокислот, число аминокислот одного типа и число так называемых gaps, т.е. тех случаев, когда в одном белке на данном месте есть аминокислота, а в другом она отсутствует. При анализе каждого белка СК сравнивали средние показатели (Score) сходства этого белка с 10 белками из протеома изучаемой группы эукариот и 10 случайными последовательностями,

показавшими наибольшее сходство с соответствующим белком СК (с помощью программы STATISTICA).

Установлено, что наибольшим сходством с известными белками синаптонемного комплекса обладают белки, несущие общие с ними функциональные домены (максимальный показатель сходства – 163). Прежде всего, это белки с доменом NORMA, узнающим состояние хроматина и рекрутирующим другие белки (у бурых и зелёных водорослей, части низших грибов, у кишечнорастворимых). Они проявили сходство с такими белками СК, как Нор1, НМ-3, АSY1 и АSY2. Видимо, такие белки имеют широкое распространение у всех эукариот. У бурых водорослей найден белок, аннотированный как прямой гомолог белка латерального элемента СК - Нор1.

Меньшим сходством с белками примитивных эукариот обладают белки СК, несущие домены SMC и SCP, отвечающие за взаимодействие с хроматином (максимальные показатели сходства – не выше 65). Они сходны с известными белками СК: C(3)G, ZYP1a, SYCP1.

Стабильно высоким сходством с белками примитивных эукариот и кишечнорастворимых обладает компонент СК – фермент FKBP6, найденный пока лишь у мыши. Но из литературы и из наших исследований известно, что ферменты гораздо более консервативны, чем структурные белки [Bogdanov et al, 2007; Захаров и др., 2010].

Наиболее интересным результатом является обнаружение у кишечнорастворимых животных если не прямых, то, несомненно, близких родственников для второстепенных белков СК высших эукариот – SYCP3 мыши и рыбы Данио, являющихся компонентами латерального элемента СК (Score = 143-148), белков SC65 мыши и рыбы, аннотированных просто как белки СК (Score = 100-105), и в меньшей степени для SYCE2 мыши и рыбы Данио, входящих в состав центрального элемента СК (показатели сходства от 52 до 63).

Интересен также тот факт, что в протеоме хоанофлагеллят, считающихся ближайшими родственниками Metazoa среди одноклеточных животных [King et al, 2008], нет белков, имеющих высокую степень сходства с каким-либо известным белком СК. Максимальный показатель Score не превышал 76 даже для фермента FKBP6. Это свидетельствует о том, что белки СК берут своё начало не в протеоме этих простейших. Работа поддержана грантом РФФИ №10-04-00666-а.

Список использованной литературы

Maguire M. P. (1992) Evolution of meiosis. *J. Theor Biol.* V. 154. P. 43-55.

Богданов Ю.Ф. (2003). Изменчивость и эволюция мейоза. *Генетика.* Т. 39. С. 453-473.

И.А. Захаров, С.Я. Дадашев, Т.М. Гришаева (2010) Ортологи белков мейоза в протеомах прокариот. *Доклады Академии наук.* Т. 435. №5. С. 696-698.

Bogdanov Y.F., Grishaeva T.M., Dadashev S.Y. (2007). Similarity of the domain structure of proteins as a basis for the conservation of meiosis. *Intern. Rev. Cytol.* V. 257. P. 83-142.

King N., Westbrook M.J., Young S.L. et al. (2008) The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature.* V. 451. P. 783-788.

ЭВОЛЮЦИЯ ХРОМОСОМНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ СЕМЕЙСТВА ГЕНОВ РИБОСОМНОЙ РНК (rRNA) В ТРИБЕ CHIRONOMINI

Гундерина Л.И.¹, Голыгина В.В.^{1,2}, Брошков А.Д.^{1,2}, Ермолаева О.В.^{1,2}, Кикнадзе И.И.¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, nika@bionet.nsc.ru

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Гены рибосомной РНК (rRNA) в геномах эукариот многократно повторены и образуют семейство рибосомных генов. Они организованы в кластеры, включающие сотни тандемно повторенных единиц, каждая из которых состоит из копий трех генов: 18S, 5.8S и 28S rRNA, - и межгенных транскрибируемых и нетранскрибируемых спейсеров. Установлена высокая межвидовая консервативность нуклеотидных последовательностей рибосомных генов и значительная вариабельность межгенных транскрибируемых спейсеров, что обуславливает широкое использование этого семейства генов в филогенетических исследованиях. Эти свойства семейства генов rRNA оказались удобными и для изучения линейной реорганизации хромосом в эволюции различных групп эукариот.

Эволюцию линейной организации групп сцепления генов (хромосом) в геномах хирономид изучают в основном на видах рода *Chironomus*, поскольку политенные хромосомы этих видов обладают четкой дисковой структурой, позволяющей идентифицировать гомологичные районы хромосом у разных видов. Хорошо изучен внутривидовой и межвидовой полиморфизм дискового рисунка политенных хромосом и установлены особенности эволюции их линейной организации в роде *Chironomus*. Вместе с тем, эволюция числа сайтов локуса rDNA и их локализации в хромосомах видов хирономид изучены недостаточно полно. Отсутствие этих сведений не позволяет установить общие закономерности хромосомной эволюции семейства генов rRNA в трибе Chironomini. Необходимо отметить еще один аспект проблемы. Дело в том, что районы ядрышкового организатора (ЯО) в политенных хромосомах хирономид трудно (или невозможно) отличить от других транскрипционно-активных районов хромосом (Колец Бальбиани и пуфов). Не помогает выявить район ЯО в хромосомах хирономид и окраска серебром, поскольку окрашиваются не только районы ЯО, но и другие сайты хромосом. Изучение локализации генов rRNA на хромосомах кариотипов хирономид позволит решить эту проблему.

Цель настоящей работы состоит в сравнительном анализе хромосомной локализации локуса рибосомной РНК у видов хирономид из 7 родов трибы Chironomini с использованием метода FISH (флуоресцентной in situ гибридизации). В качестве зонда

использовали выделенные и секвенированные нами последовательности ДНК из локуса rDNA разных видов хирономид, в состав которых входили ген 5.8S rRNA (5.8S rDNA) и внутренний транскрибируемый спейсер (ITS1). Анализ нуклеотидных последовательностей показал высокую межвидовую гомологию последовательностей 5.8S rDNA. Гомология последовательностей ITS1 была не ниже 80%.

В кариотипах большинства видов трибы Chironomini содержится четыре пары хромосом. У некоторых видов число хромосом снижается до трех и двух пар за счет слияния хромосомных плеч. FISH-анализ показал, что у большинства видов рода *Chironomus* locus rDNA локализован в единственном сайте на короткой телоцентрической четвертой хромосоме (плечо G). Вместе с тем, у ряда видов этого рода наблюдалось от 2 до 5 сайтов гибридизации, локализованных не только в плече G, но и в других хромосомах кариотипа. У большинства видов рода *Glyptotendipes* также 4 пары хромосом. В кариотипах этих видов обнаружено от трех до 16 мест гибридизации с ДНК-зондом. У всех изученных видов этого рода как минимум один сайт гибридизации локализуется в плече G. У нескольких видов из этих родов обнаружен внутривидовой полиморфизм по количеству сайтов локализации ЯО. В кариотипе вида из рода *Polypedilum* – *P. nubeculosum* ($2n=8$) – найдено два сайта гибридизации ДНК-зонда, однако в короткой четвертой хромосоме они отсутствуют. У изученных в настоящей работе видов из родов *Cryptochironomus*, *Endochironomus*, *Lipiniela* и *Stictochironomus* число хромосом в кариотипе варьирует от 2 до 3 пар мета- или субметацентрических хромосом. Обнаружено от 1 до 3 сайтов локализации ДНК-зонда, специфических для каждого из видов.

Полученные результаты показали, что число сайтов и места локализации локуса rDNA в хромосомах кариотипов видов хирономид из 7 родов трибы Chironomini варьируют как между родами, так и внутри каждого рода, а в отдельных случаях и внутри вида. Число сайтов локуса rDNA варьирует от 1 до 16. У видов из родов *Chironomus* и *Glyptotendipes* один из сайтов локуса rDNA всегда локализуется в плече G. Проведенный анализ позволил уточнить локализацию районов ЯО на хромосомах кариотипов изученных видов трибы Chironomini. Обсуждаются возможные механизмы вариабельности числа и локализации локуса rDNA в хромосомах кариотипа видов хирономид из трибы Chironomini.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 10-04-00899а и программ Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов» и «Происхождение биосферы и эволюция гео-биологических систем».

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИСКОВ И МЕЖДИСКОВ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ ДРОЗОФИЛЫ

Демаков С.А., Андреенков О.В., Волкова Е.И., Семешин В.Ф., Зыкова Т.Ю., Николаев Д.А., Гончарова А.А.

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Одним из ключевых механизмов регуляции активности генома эукариот является его организация в структурно-функциональные домены. Как соотносятся выявляемые домены со структурными особенностями организации хромосом до сих пор мало изучено. Политенные хромосомы дрозофилы благодаря гигантским размерам являются уникальным объектом, позволяющим с высокой точностью сопоставить такого рода домены с морфологическими структурами хромосом, прежде всего компактно упакованными дисками и менее плотными междисками. Несмотря на обширную накопленную информацию, функции междисков и причины их декомпактного состояния, а значит и механизмы организации хромосом в целом, во многом остаются загадочными.

Ранее, используя одновременное картирование встроек ДНК Р-транспозонов на физической и цитологической картах, мы разработали подход, который позволяет установить, какой участок генома входит в состав междиска и исследовать его свойства.

На примере междиска из района 3С6/С7 X-хромосомы изучена способность различных последовательностей ДНК формировать междиск в новом генетическом окружении. Сайт-специфичная гомологичная FRT/FLP рекомбинация между двумя транспозонами, содержащими FRT-сайты, позволяет внедрять конкретные фрагменты ДНК из известных междисков в цитологически хорошо охарактеризованный район с последующим выявлением изменений электронно-микроскопической картины этого района, вызванных встройкой изучаемого фрагмента ДНК. Таким образом было показано, что перемещение фрагмента ДНК длиной 276 п.н. из района междиска 3С6/С7 в конструкцию pIcon(dv) приводит к образованию нового междиска в районе встройки этого транспозона. Этот фрагмент ДНК оказался минимальной известной на сегодняшний день последовательностью, необходимой и достаточной для формирования междиска. Помимо этого, получена последовательность, содержащая три тандемно повторенных копии участка ДНК из района междиска 3С6/С7, включающего фрагмент в 276 п.н.,. Введение дополнительных копий не изменяло морфологию образующегося междиска. Показано сохранение сайтов гиперчувствительности к ДНКазе I в междисковых последовательностях, перенесенных в составе транспозона в новое генетическое окружение.

Другим важным направлением исследований, необходимых для понимания механизмов формирования декомпактного состояния междисков и в целом дискового рисунка интерфазных хромосом, является выявление последовательностей ДНК, содержащих предсказанные функциональные сайты, а также комбинаций белков, вовлеченных в формирование междисковых структур. Для решения этих вопросов мы использовали метод направленного моделирования структур хромосом *in vivo* с помощью искусственного привлечения конкретных белков или интеграции фрагментов ДНК в определенный район хромосомы. Для этого в состав хорошо изученного диска 10A1-2 методом гомологичной рекомбинации была введена последовательность attP из системы сайт-специфичной интеграции фага *ΦC31*. Введенный таким образом attP сайт позволяет неоднократно и эффективно вводить в локус любые фрагменты. В диск по этому сайту будут встроены фрагменты ДНК, определяющие формирование междисков, что позволит более уверенно соотнести локализацию материала экзогенных междисков с исследуемыми белками. Кроме того, по сайту attP предполагается внедрить многократноповторенный участок ДНК дрожжей UAS, специфически взаимодействующий с ДНК-связывающим доменом (DBD) белка GAL4. Этот домен, соединенный с белками, характерными для междисков, позволит привлечь эти белки в район диска и определить их участие в формировании открытого хроматина. Проводимые эксперименты позволят определить, какие белки являются междиск-формирующими и в каких комбинациях они представлены в конкретных междисках.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ КОСТНЫХ ОСТАНКОВ ДЕНИСОВОЙ ПЕЩЕРЫ *CAPREOLUS PYGARGUS*: ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ СОВРЕМЕННЫХ И ДРЕВНИХ ПОПУЛЯЦИЙ

Дружкова А.С.

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Существует два вида косули (*Capreolus* Gray, 1821): косуля европейская (*C. Capreolus*) и косуля сибирская (*C. pygargus*), которые различаются морфологически и кариотипически. Косуля сибирская занимает обширную территорию в Азии, но значительно менее изучена, чем европейские косули. До сих пор остается спорным разделение косули сибирской на 4 морфологических подвида. В Денисовой пещере (Алтай, Южная Сибирь) среди многочисленных костных останков разных обнаружено большое количество костных фрагментов косули сибирской, датируемых от настоящего времени до позднего плейстоцена.

Мы проанализировали фрагмент контрольного района митохондриальной ДНК в 629 п.н. из 14 ископаемых образцов косули сибирской из Денисовой пещеры, а также 37 современных образцов, взятых из популяций Алтая, Тянь-Шаня (Киргизия), Якутии, Новосибирской области и Дальнего Востока России.

Выделение образцов ДНК проводили по методу Янга (Yang D.Y. et al. 1998) с модификациями. Все процедуры проводили согласно «Протоколу Аутентичности» (Hofreiter et al. 2001, Willerslev and Cooper 2005, Paabo et al. 2004) в отдельном стерильном помещении, с соблюдением всех средств защиты от возможных контаминаций. Параллельно выделяли пустую пробу (т.н. бланк-контроль).

Сиквенсы были выровнены с помощью программы CLUSTAL W version 1.8 (Tompson et al., 1994). Гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие, Transition/transversion parameter=9.72 and gamma distribution parameter alpha=0.28 а также процент вариаций внутри и между популяциями определяли по модели Кимуры 2P (AMOVA; Excoffier et al 1992), ARLEQUIN version 3.1 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>). Для построения филогенетических деревьев использовали методы ближайших соседей (NJ), максимального правдоподобия (ML), и максимальной экономии (MP) (PHYLIP package version 3.66 (Felsenstein 1989), а также , likelihood and distance programs of MOBYLE PORTAL (<http://mobyale.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py>)). В качестве аутгруппы использовали косулю европейскую Z70318 (GeneBank). Для установления генетических взаимоотношений между сиквенсами (gene

genealogies) методом statistical parsimony использовали программу TCS1.21 (Clement et al., 2000).

Генеалогические реконструкции показали, что большинство гаплотипов голоцена, вероятно, являются предками современных популяций косуль Западной Сибири и Тянь-Шаня и Якутии. Большинство современных географических популяций (за исключением Западно-Сибирской равнины) являются неоднородными по составу, но есть некоторые предварительные свидетельства их структурированности. Низкое генетическое разнообразие западносибирской популяции указывает на эффект основателя.

Наши данные показывают, что в течение последних 50000 лет происходило несколько замен популяций косули сибирской в горах Алтая, соответствующие климатическим изменениям. Косуля сибирская представляет собой сложный гетерогенный вид с высоким уровнем миграции.

**ЭФФЕКТ МУТАЦИЙ ОПУХОЛЕВОГО СУПРЕССОРА *MERLIN* НА
ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК КРЫЛА *DROSOPHILA
MELANOGASTER***

Дубатолова Т.Д., Омелянчук Л.В., Копыл С.А.

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск, ome@mcb.nsc.ru

Методом анализа мозаичных клонов, индуцированных γ -излучением, показали, что клетки дрозофилы, мутантные по Merlin, делятся быстрее (клеточный цикл короче), чем клетки дикого типа, и пролиферация имагинальных дисков в случае действия мутации продолжается дольше. Известно, что начиная с некоторого момента развития жилки крыла служат границами, которые растущие мозаичные клоны не могут пересекать. Нами продемонстрировано, что для мутантных по гену Merlin клонов это свойство не выполняется. Это означает, что рассматриваемый ген вовлечен не только в контроль клеточной пролиферации, но также и в контроль клеточной подвижности и адгезии. При измерениях относительной длительности фаз клеточного цикла с помощью метода проточной флуоресцентной цитометрии не обнаружено различий между мутантными и нормальными особями, что указывает на то, что сокращения фаз клеточного цикла происходят пропорционально. Исследование, проведенное с помощью импульсно меченых митозов, подтвердило эти данные, показав, что длина клеточного цикла у контрольных особей составила 7 ч (длина S_фазы 3 ч), а у мутантов по гену Merlin – 5 ч (длина S_фазы 2 ч).

МОГУТ ЛИ ТЕЛОМЕРАЗА И ALT ОДНОВРЕМЕННО ЭКСПРЕССИРОВАТЬСЯ В НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ?

Жданова Н.С.¹, Минина Ю.М.¹, Карамышева Т.В.¹, Зверева М.Э.², Скворцов Д.А.², Ново К.³, Драскович И.³, Рубцов Н.Б.¹, Лондоно А.³

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия, zhdanova@bionet.nsc.ru

²Московский государственный университет, химический факультет, г. Москва, Россия

³Институт Кюри, Париж, Франция

Теломеры представляют собой динамичные структуры, длина которых в клетках млекопитающих устанавливается в результате процессов, направленных, с одной стороны, на их удлинение, а с другой стороны – на их укорочение. Важным показателем функционального состояния теломер является их длина и наличие кэпинга, особой характерной только для концов хромосом структуры, Т-петли, которая запечатывает конец хромосомы, так что он перестает распознаваться как двунитевой разрыв. Теломеры в клетках зародышевого пути человека содержат в среднем 4-12 т.п.н теломерного повтора. Для этих клеток характерна высокая активность теломеразы, которая предотвращает эрозию теломер, возникающую в результате концевой недорепликации из-за неспособности ДНК-полимеразы полностью реплицировать 5' конец отстающей в ходе репликации нити ДНК после дегградации РНК-прайма. Недавно было показано, что на случай повышенной активности теломеразы и удлинения теломер сверх необходимого контроль над длиной теломер может осуществляться с помощью механизма быстрого укорочения теломер, получившего название “telomere trimming” (Pickett et al., 2009; 2011). Он представляет собой выстригание Т-петли в результате гомологичной рекомбинации ДНК в основании Т-петли. Однако в соматических клетках человека активность теломеразы постепенно уменьшается, и в тканях взрослых индивидуумов она практически не регистрируется. В результате длина одной или нескольких теломер уменьшается до критической, появляются дисфункциональные теломеры, следствием чего является кризис клеточного роста, известный как репликативное старение. Репликативное старение рассматривается как механизм, предупреждающий у человека злокачественную трансформацию клеток (Shay and Wright 2010). Преодоление репликативного старения приводит к клеточной трансформации и злокачественному перерождению. При этом либо активируется теломераза, либо длина теломер устанавливается альтернативным путем (ALT, Alternative Lengthening of Telomeres). Механизм ALT до конца не ясен. Считается что, он связан с меж- и внутри хромосомной гомологичной рекомбинацией теломерной ДНК. Определен ряд признаков, характерных для ALT-клеток (Reddel et al., 2010). Сейчас становится ясно, что репликативное старение характерно не для всех видов млекопитающих. Такие виды

выявлены в нескольких отрядах млекопитающих, в том числе среди грызунов. Для ряда этих видов описана повышенная чувствительность теломер к окислительному стрессу (Gomes et al., 2012). Однако не ясно, существуют ли в клетках этих видов механизмы поддержания функционального статуса теломер дополнительные к активной теломеразе.

Мы выявили вид без репликативного старения среди бурозубок, относящихся к отряду Eulipotyphla. Мы показали, что фибробласты бурозубки иберийской способны делиться без остановки как минимум 2 года, сохраняя при этом активную теломеразу, а теломеры - защитную функцию. С другой стороны, оказалось, что для первичных фибробластов этого вида характерен ряд признаков ALT. Это: повышенная частота сестринских теломерных обменов (T-SCE) и маркеров двунитевых разрывов ДНК (γ -H2AX) в теломерах (DDR+ теломеры), наличие APBs (ассоциированных с ALT PML телец), ассоциированных с теломерными кластерами и белком Rap1, входящем в состав защитного теломерного комплекса shelterin, а также наличие кольцевой теломерной ДНК. Следствием повышенной частоты DDR+ теломер и APBs телец является, очевидно, формирование в первичных фибробластах бурозубки иберийской теломерных кластеров, в состав которых входят как длинные, так и короткие теломеры.

По своим проявлениям telomere trimming и ALT схожи. Но «золотым стандартом» ALT является отсутствие в клетках активной теломеразы (Reddel et al., 2010), а при быстром укорочении теломер отсутствует межхромосомная гомологичная рекомбинация теломерной ДНК и T-SCE, характерные для ALT (Pickett et al., 2011). В первичных фибробластах иберийской бурозубки мы наблюдали, как признаки характерные для ALT, так и для быстрого укорочения теломер. Идентификация компонентов shelterin и выяснение их роли в сохранении функциональных теломер показали, что RAP1 является ключевыми при репрессии в клетках гомологичной рекомбинации теломерной ДНК, для этого также необходимы TPP1/POT1, а TRF2 осуществляет репрессию негомологичной рекомбинации и запрещает концевые слияния хромосом. Таким образом, целостность теломер и их функционирование напрямую связано с shelterin комплексом, концентрацией на теломерах отдельных компонентов комплекса и взаимодействием этих компонентов друг с другом. Бурозубка иберийская характеризуется наличием на концах хромосом двух типов теломер очень длинных и прерывистых и очень коротких (Zhdanova et al., 2005; 2007). Вполне вероятно, что диспропорция в количестве компонентов shelterin, отвечающих за рекомбинацию теломерной ДНК в связи с особой структурой теломер у иберийской бурозубки может быть причиной экспрессии элементов механизма ALT у вида, характеризующегося активной теломеразой и отсутствием репликативного старения.

ХРОМОСОМНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Жимулёв И.Ф., Зыкова Т.Ю., Беляева Е.С., Демаков С.А., Демакова О.В., Болдырева Л.В., Гончаров Ф.П., Хорошко В.А.

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск,

zhimulev@mcb.nsc.ru

Дисковый рисунок политенных хромосом можно смело назвать самой загадочной их чертой, а изучение молекулярно-генетической организации дисков и междисков (хромомеров и межхромомеров) – многолетним разгадыванием увлекательной головоломки. Недавно благодаря усилиям международного проекта modENCODE по полногеномному картированию белков была создана большая база данных по распределению хромосомных белков в разных типах клеток *Drosophila*, что дает новые возможности для изучения организации интерфазной хромосомы. Однако остается неясным как соотнести эти молекулярные данные по организации хроматина с морфологическими структурами политенных хромосом слюнных желез. В нашей лаборатории удалось осуществить молекулярное картирование границ ряда междисков и дисков, что позволило с большой точностью соотнести цитологическую карту хромосом с молекулярной картой генома *Drosophila* и, используя данные modENCODE, проанализировать особенности белкового состава морфологических структур политенных хромосом. Мы обнаружили, что хромосомы *Drosophila* состоят как минимум из двух типов дисков и междисков, причем все эти типы структур характеризуются как определенным временем репликации, так и специфическим белковым составом.

Для междисков характерна связь с белками «открытого» хроматина, ремоделинга нуклеосом, а также с белками ORC. Таким образом, они могут участвовать в таких важнейших клеточных процессах как ремоделинг нуклеосом и инициации транскрипции и репликации. Мы обнаружили, что границы и организация конкретных дисков и междисков очень сходны в хромосомах разных типов клеток. Это указывает на то, что паттерн дискового (хромомерного) рисунка является универсальным свойством организации интерфазных хромосом.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМОСОМ ОПИСТОРХИД (PLATYHELMINTHES, TREMATODA)

Задесенец К.С., Карамышева Т.В., Катохин А.В., Мордвинов В.А., Рубцов Н.Б.

Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, kira_z@bionet.nsc.ru

Трематоды, или печеночные сосальщики, являются эндопаразитами беспозвоночных и позвоночных, включая человека. Характерной особенностью трематод является наличие сложного жизненного цикла (ди- или триксенного типа). Представители семейства *Opisthorchiidae* занимают среди трематод особое положение, так как являются эпидемиологически значимыми видами и отличаются высокой экологической пластичностью. Несмотря на это, виды данной таксономической группы с точки зрения цитогенетики практически не изучены. На сегодняшний день описаны кариотипы 230 видов трематод (число хромосом, их морфология). Классические цитогенетические методы, такие как С-дифференциальное окрашивание, AgNOR-бэндинг, были проведены лишь для единичных видов (Hirai et al., 1981; Grossman et al., 1981; Komalamisra, 2001; Dong et al., 2004). В настоящей работе был проведен молекулярно-цитогенетический анализ хромосом пяти видов описторхид: *O. felineus* (Rivolta, 1884), *O. viverrini* (Poirier, 1886), *C. sinensis* (Cobbold, 1875), *M. bilis* (Braun 1790), *M. xanthosomus* (Creplin, 1846)). Нами кариотип *M. bilis* был описан впервые. Несмотря на сложную программу онтогенеза геном описторхид можно отнести к малоразмерным геномам (около 300 Mb). Кариотипы вовлеченных в настоящее исследование видов представлены как $2n=14$, за исключением *O. viverrini* ($2n=12$). Кариотипы описторхид можно отнести к асимметричным кариотипам, они содержат две пары крупных хромосом и пять пар маленьких хромосом. В кариотипе виверровой двуустки помимо 2 пар крупных хромосом и 3 пар маленьких присутствует одна пара метацентрических хромосом среднего размера. Мы полагаем, что эта хромосома возникла в результате слияния хромосом. Интересным представляется расхождение данных, полученных нами, и опубликованных ранее о кариотипе клонорха. Ранее было показано, что кариотип клонорха (из Китая и Кореи) – $2n=56$ (Park, 2001), нами кариотип клонорха (с Дальнего Востока РФ) определен как $2n=14$ (Zadesenets et al., 2012). Данное расхождение могло быть вызвано несколькими причинами: методическая ошибка ($n=7$, а не $n=28$); полиплоидия ($n=7$, $8n=56$); представители клонорха из РФ и стран Азии – разные виды.

Анализ данных после проведенного молекулярно-цитогенетического исследования, включающего методы дифференциального окрашивания (С-, AgNOR-бэндинг) и метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), и данных, опубликованных ранее, показал,

что кариотип описторхид является консервативным. В тоже время попытки проведения сравнительного хромосомного пэйнтинга между хромосомами *O. felineus* и *M. xanthosomus*, *M. bilis* и *M. xanthosomus* не позволили выявить гомологичных районов в кариотипах указанных выше видов. В данном эксперименте использовались пэйнтинг-пробы для крупных хромосом *M. xanthosomus* и *O. felineus*, cross-гибридизация проводилась без супрессии повторенных последовательностей.

Сравнительный анализ морфологии хромосом описторхид (митотических и мейотических на стадии диакинеза) оказался неинформативным в связи с высоким уровнем конденсации хромосомного материала. В связи с этим нами были подобраны условия фиксации хромосомного материала для приготовления препаратов пахитенных хромосом. Сравнительный анализ пахитенных хромосом, окрашенных DAPI, показал, что в ходе эволюции кариотипа описторхид произошли небольшие парацентрические инверсии.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО СТАТУСА X-ХРОМОСОМЫ В ЛИНИЯХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Захарова И.С.^{1,2}, Шевченко А.И.^{1,2}, Григорьева Е.В.^{1,2}, Малахова А.А.^{1,2}, Сметанина М.А.³, Закиян С.М.^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, zakharova.is@gmail.com

²Федеральное государственное учреждение Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина

Минздравсоцразвития России, г. Новосибирск

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

В настоящее время вопрос об эпигенетическом статусе X-хромосом в линиях эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека изучен не достаточно хорошо. Полученные к настоящему моменту линии ЭСК человека характеризуются различным эпигенетическим статусом X-хромосом и демонстрируют высокую динамичность и нестабильность этого статуса при длительном культивировании. Плюрипотентные ЭСК человека с набором половых хромосом XX имеют переменный статус X-хромосом. Так, некоторые линии ЭСК человека имеют две активные X-хромосомы, и инактивация одной из них происходит в процессе дифференцировки. С другой стороны, некоторые линии ЭСК человека содержат одну активную и одну неактивную X-хромосому, проявляя при этом все свойства плюрипотентных клеток. Более того, в таких линиях возможна последующая реактивация неактивной X-хромосомы в процессе клеточного культивирования. Кроме этого, существуют линии, содержащие две активные, совершенно утратившие способность к инактивации X-хромосомы. Сведения о статусе инактивации X-хромосомы в линиях ИПСК человека являются противоречивыми. Не решенным также остается вопрос стабильного поддержания статуса X-хромосом в линиях ЭСК и ИПСК человека.

В данной работе проведено исследование статуса X-хромосом в линиях ИПСК, полученных из нейтральных стволовых клеток эмбриона женского пола с использованием плазмидных векторов. С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к маркерам неактивного и активного хроматина выявлено, что в этих линиях X-хромосома не реактивируется. Это подтверждается наличием экспрессии гена *XIST*, а также деметилированным состоянием его промотора. Применение химических веществ VIX01294 и VPA при получении ИПСК не способствует реактивации неактивной X-хромосомы.

Показано, что при культивировании данных линий ИПСК модификации неактивного хроматина на неактивной X-хромосоме (H3K27me3, H3K9me3) могут утрачиваться, тем не менее, не приобретаются модификации, характерные для активного хроматина (H3K4me2). При культивировании преИПСК, полученных из клеток амниотической жидкости и плаценты, в среде, содержащей вещества – ингибиторы сигнальных путей дифференцировки SHIR99021, PD0325901, LIF человека, наблюдается реактивация неактивной X-хромосомы, которая происходит в клетках, не достигших плюрипотентного состояния. Кроме того, в работе произведена оценка степени и полноты инактивации и реактивации X-хромосомы с использованием полногеномного анализа с помощью технологии ДНК- и РНК- гибридизации на микрочипы CytoChip на платформе Illumina.

ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ *ARG-X* ПРОТЕАЗОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ САЙТОВ В СУПРАСТРУКТУРАХ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР ИНДУЦИРОВАННЫХ К РОСТУ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ

Иванов Р.С., Иванова Э.А., Вафина Г.Х., Карпова Л.М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии УНЦ
РАН, г. Уфа, evilina@anrb.ru

В организации хроматина, на каждом её уровне заложены значительные возможности для перестройки этой конструкции, конкретная форма которой разрешает экспрессию определенного спектра генов. Аргинин богатые гистоны по аминокислотной последовательности эволюционно стабильные белки, что свидетельствует об их важной роли в сохранении и реализации генетической информации эукариот. Работы конца XX века показали, что в клеточных ядрах, функционирует система протеиназ, специфический эффект которых связан с конформационными перестройками биополимерных структур. Наиболее ярким представителем ядерных протеиназ являются трипсиноподобные протеиназы, действие которых также направлено на *Arg-X* связи, которыми богаты коровые белки ассоциированные в нуклеосомы. Эти протеиназы получили название триптаз. Доказано, что активность триптаз в течение клеточного цикла четко коррелирует с началом синтеза ДНК, а их ингибирование приводит к задержке синтеза ДНК на определенное время. Таким образом, в клеточных ядрах функционирует система триптаз, которая может вызывать релаксацию хроматиновых структур и тем самым изменять соотношение его активных и неактивных локусов. Исследование *Arg-X* протеазочувствительных сайтов в цепи нуклеосомной организации хроматина интересно тем, что гуанидиновые группы аргинина выходят за пределы нуклеосомы и активно вступают в циклы межнуклеосомных ассоциаций и диассоциаций. Кроме того, одним из механизмов пространственной реорганизации хроматина и перехода определенных его зон в состояние активности к транскрипции является ацетилирование нуклеосомных гистонов. Известно, что бутират натрия подавляет деацетилирование ядерных белков и приводит к усилению ацетилирования и транскрипции.

В связи с этим, целью нашей работы было определение локализации *Arg-X* протеазочувствительных сайтов белков в надмолекулярных структурах клеточных ядер, как одного из молекулярно-генетических механизмов пространственно-временной реорганизации хроматина, при индукции ростового морфогенеза зародышей пшеницы, в нормальных условиях и при гиперацетилированном состоянии протеома клеточных ядер пшеницы.

Объектом исследования служили элитные семена пшеницы (*Triticum aestivum L.*) сорта Артемовка (яровая) (коллекция семян Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова). Проращивание семян в контрольном варианте осуществляли в дистиллированной воде, в опытном - в присутствии 0,004 мМ бутирата натрия. В определённые интервалы времени от 0 до 21 часа с интервалами в 3 часа проводили выделения клеточных ядер и их надмолекулярных структур: нуклеоплазмы, хроматина непрочного- и прочносвязанного с ядерным матриксом, а также самого ядерного матрикса по методам представленным в патентах (Иванова, Вафина, 1991; патент № 1701747, и Иванова, Вафина, 1992; патент № 1733471). *Arg-X* активность оценивали по расщеплению *Arg-X* связей в аргининбогатом белке – протамине (молекула которого состоит из 33 аминокислот: 22-х молекул *Arg*; 4-х молекул *Ser*; 3-х молекул *Pro*; по 2 молекулы *Glu* и *Val*) (Иванова, Вафина, 1992; патент № 1733471).

Выделенные надмолекулярные структуры (супраструктуры) характеризуются разным компонентным составом хроматина в течение инициации ростового морфогенеза зрелого зародыша пшеницы. В ходе проведенного исследования было установлено, что в условиях ингибирования деацетилирования белков происходит изменение пространственно-временной локализации *Arg-X* протеазочувствительных сайтов в надмолекулярных структурах клеточных ядер зародышей пшеницы в течение инициации ростового морфогенеза. Было показано, что *Arg-X* протеазочувствительные сайты под действием ингибитора деацетилирования белков проявляются наиболее ярко во фракции нуклеоплазмы (15-18ч): представляющей собой развернутую интерфазную 11-нм хроматиновую матрицу. Известно, что нуклеоплазма богата шаперонами, участвующими в сборке нуклеосом. Возможно, что подавление деацетилирования и усиление ацетилирования хроматина в этот период приводит к дополнительной активации хроматина и усилению транскрипции, что может быть связано с реорганизацией нуклеосомной сборки и открытию определенных зон хроматина. Увеличение активности хроматина в этот период прорастания может быть необходимым для подготовки репликации ДНК (15ч) и переходу к синтезу ДНК (21ч), а для клетки, и организма в целом, важно сохранить в митозе её генетическую память. И если такая память в виде модификации структуры хроматина сохраняется в ряду клеточных поколений, то, возможно, что на этом уровне структурной организации ДНК работает особый эпигенетический механизм.

В-ХРОМОСОМЫ И ПРОГРАММА ИССЛЕДОВАНИЯ ИХ ДЕЙСТВИЯ В РЕГУЛЯЦИИ ПЛОТНОСТИ ПОПУЛЯЦИИ ВИДА

Иванов Ю.Н.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, iyn@bionet.nsc.ru

Дополнительные, сверхкомплектные, или В-хромосомы (**В-хр.**), имеющиеся у многих видов растений и животных, казались совсем бесполезными для вида, т.к. их наличие неблагоприятно влияет на многие показатели приспособленности и тем сильнее, чем больше В-хр. присутствует в кариотипе. Проблема была в том, что, несмотря на постоянную элиминацию В-хр. отбором, они устойчиво сохраняются в популяции, а при определённых условиях их количество и доля их носителей в популяции даже возрастают.

Hasegawa (1934) обнаружил накопительный механизм В-хр., и ему мы обязаны объяснением их стойкого присутствия в популяции. Действие аккумулирующего механизма состоит в том, что иногда в первом митозе пыльцевого зерна (при образовании спермиев), а также в зародышевом мешке (при образовании яйцеклетки), две хроматиды В-хромосомы не расходятся к разным полюсам, как обычно, а обе попадают в ту клетку, которая образует гамету, но не в другую, не участвующую в сингамии. В результате такого направленного нерасхождения В-хр. в линии, образующей генеративные клетки, шансы передачи их следующему поколению увеличиваются против ожидания по Менделю, и это компенсирует элиминацию В-хр. отбором. Именно поэтому они сохраняются, вопреки их вредному действию на жизнеспособность. В таком поведении В-хр. нередко усматривали признаки паразитирующей, эгоистической ДНК, но данная трактовка прегрешает в том, что неправильно распространяет конкуренцию на части единого организма, которая в таком случае привела бы к гибели всех В-хромосомных носителей: «Царство, разделившееся само в себе, не устоит» (Мк 3:24). Было обнаружено, что вредное действие В-хр. служит сокращению численности вида при высокой плотности популяции и тем самым служит интересам не отдельного индивида, а интересам вида и экосистемы в целом, т.е. является аллоцентрическим признаком (Иванов, 2007).

Итак, установлено участие В-хр. в регуляции численности вида путём самоизреживания, что подтверждается такими явлениями:

1) При высокой плотности популяции преимущественную гибель испытывают носители В-хр., за счёт которых и происходит самоизреживание. 2) Существует накопительный механизм В-хр., который включается, активизируется и усиленно нагнетает В-хр. в популяцию при повышении плотности, когда требуется местное сокращение численности вида. 3) В-хр. чаще встречаются у растений, чем у животных, т.к. последние

подвижны и могут регулировать плотность популяции миграцией, тогда как фиксированные на месте растения вынуждены пользоваться самоизреживанием, которому служат В-хр. 4) Угнетающее действие В-хр. не зависит от генотипа и этим надёжно обеспечивается их регуляторная функция, ибо при существовании наследственных типов, резистентных к В-хр., они бы фиксировались в популяции, расстраивая регуляцию численности и разрушая экосистему. 5) Распространение В-хр. ограничено видами с перекрёстным оплодотворением, т.к. у агамных и апогамных видов механизм накопления В-хр., необходимый для компенсации их убыли при самоизреживании, отсутствует, а у автогамных он бесполезен вследствие репродуктивной замкнутости линий и накопления в них В-хр. до летального уровня, что привело бы к элиминации последних.

Конечная причина, или цель, В-хр. есть ограничение плотности популяции вида. Движущих причин, т.е. передаточного механизма от плотности популяции к накопительному механизму В-хр., мы не знаем. Не исключено, что движущих причин здесь нет, и тогда мы имеем дело с фундаментальным законом природы, по которому *количество В-хр. приводится в соответствие с потребностями изменения численности вида непосредственно идеальной, невещественной, конечной причиной.*

Для исследования ограничивающей роли В-хр. и выяснения того, какова природа причины действия их накопительного механизма, можно предложить следующую программу из пунктов А и Б. Пункт А устанавливает явление, пункт Б выясняет природу его причины: а) метафизическую или б) физическую. Метафизическая, конечная причина принимается как данное, ибо она не имеет механизма; физическая же, движущая причина может быть исследована как вещественный механизм.

А. Для проверки представления, что В-хр. служат для регуляции плотности популяции путём самоизреживания, следует проверить эквивалентную ему гипотезу *H* : накопительный механизм В-хр. действует при высокой плотности популяции и ослабляется при низкой. Выращивая рожь *Secale cereale* L., имеющую В-хр., в течение одного – нескольких поколений при густом и редком посеве и сравнив среднее число В-хр. в популяциях с разной густотой посева, мы проверим гипотезу *H* .

Сидячие формы животных, аналогично растениям, при высокой плотности популяции нуждаются в самоизреживании. Поэтому следует ожидать, что В-хромосомных видов среди них не меньше, чем среди растений, и, во всяком случае, больше, чем среди подвижных, неприкреплённых форм. Кариотипическому исследованию на В-хр. подлежат такие типы царства животных, избыливающие сидячими формами или хотя бы содержащие их, как кишечнополостные (актинии и кораллы), губки, мшанки, форониды, плеченогие,

кольчатые черви (сидячие полихеты), членистоногие (усоногие раки), иглокожие (криноидеи, или морские лилии), погонофоры и хордовые (асцидии).

Б. Для выяснения того, является ли действие накопительного механизма В-хр. а) законом метафизическим, т.е. не имеющим движущих причин, а только конечную цель, или же б) законом физическим, имеющим движущие причины, требуется провести следующий опыт. Популяция ржи *S. cereale*, имеющая В-хр., высевается на 3 делянках в течение одного или (для усиления эффекта) нескольких поколений:

Делянка (1). Высокая густота посева чистой ржи. Плотность популяции ржи и конкуренция между особями велики.

Делянка (2). Такая же густота посева смеси ржи и пшеницы *Triticum aestivum* L., при этом плотность популяции ржи должна быть низкая. Плотность популяции ржи мала, а конкуренция между особями велика.

Делянка (3). Низкая густота посева чистой ржи, такая же, как на делянке (2) среди пшеницы. Плотность популяции ржи и конкуренция между особями малы.

Подсчитывается среднее число x_i В-хр. в проращиваемых семенах ржи с i -й делянки ($i = 1, 2, 3$). Если $x_1 > x_2 = x_3$, то накопление В-хр. – закон метафизический, ибо оно вызывается самой по себе плотностью популяции ржи, независимо от конкуренции. Если же $x_1 = x_2 > x_3$, то накопление В-хр. – закон физический, ибо оно вызывается конкуренцией (густотой стояния растений).

Ввиду того, что провиденциальное назначение В-хр. регулировать численность вида, несмотря на убедительные подтверждения, как правило не встречает признания, провести опыт, схема которого предложена в программе пунктом Б, имело бы огромное значение для установления истины. Если бы действие В-хр. свелось к метафизическому закону, это послужило бы представлению о наличии специфических биологических законов, первичных (фундаментальных) и метафизических, т.е. не выводимых из физико-химических принципов, и вящему утверждению за биологией статуса самостоятельной науки, независимой от низших дисциплин. Тогда люди, далёкие от биологии, не позволяли бы себе невежественное вмешательство в неё, как это широко практикуется ныне вследствие административного господства механистического селекционизма, отрицающего законы биогенеза и признающего в нём только случайность.

ХРОМОСОМЫ И ЭВОЛЮЦИЯ ПЕСЧАНОК РОДОВ *MERIONES* И *RHOMBOMYS* (RODENTIA, CRICETIDAE, GERBILLINAE)

Картавцева И.В., Коробицына К.В.

Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток, irina-kar52@rambler.ru

Песчанки (Gerbillinae) эволюционно молодая группа грызунов, насчитывающая около 80 видов, 18 родов, распространенных в аридных зонах Африки, Палеарктики и Индии (Павлинов, 1995). Хромосомные наборы известны почти для всех видов песчанок, однако методами дифференциального окрашивания хромосом охвачено чуть более половины известных видов. Кариологические исследования показали высокую степень хромосомной дифференциации видов и внесли вклад в систематику родов *Gerbilliscus*, *Tatera* и *Gerbillus*.

На территории бывшего СССР: Армения, Азербайджан, Туркменистан, Казахстан, Узбекистан, Кыргызстан обитают представители двух родов: *Meriones* (*M. libycus*, *M. meridianus*, *M. tristramy*, *M. tamariscinus*, *M. unguiculatus*, *M. vinogradovi*, *M. persicus*, *M. zarudnii*) и *Rhombomys* (*R. opimus*). На территории России: Калмыкия, Астраханская область, Тыва, Забайкальский край обитают *M. meridianus* и *M. unguiculatus*. Три вида - тамарисковая *M. tamariscinus*, песчанка Зарудного *M. zarudnii* и персидская *M. persicus* песчанки, имеющие наиболее архаичные морфологические признаки среди видов рода - не исследованы методами дифференциального окрашивания хромосом, что не дает полной картины изменчивости кариотипа палеарктического рода *Meriones*. С целью выяснения роли хромосомного преобразования в процессах видообразования песчанок Палеарктики, нами впервые исследованы дифференциально G- и C- окрашенные кариотипы песчанок семи видов рода *Meriones* и одного вида рода *Rhombomys* - большую песчанку *R. opimus* из природных популяций. Так кариотипы *R. opimus* впервые изучены из популяций Казахстана, *M. tamariscinus* - из России и Казахстана, *M. persicus* - из Азербайджана и Туркмении.

Сравнительный анализ собственных и литературных данных дифференциально-окрашенных хромосом песчанок Палеарктики, как архаичных, так эволюционно молодых видов, подтвердил значительную роль робертсоновских преобразований в процессах макроэволюции в исследуемой группе видов, позволил по-новому представить картину преобразования кариотипа и показать обособленное положение тамарисковой песчанки, допускающее поднятие ее таксономического ранга с видового до родового.

ВАРИАЦИИ ЧИСЛА ПОВТОРОВ (CNV) В ГЕНОМЕ ПАЦИЕНТОВ С ИДИОПАТИЧЕСКОЙ УМСТВЕННОЙ ОТСТАЛОСТЬЮ

Кашеварова А.А., Скрыбин Н.А., Черемных А.Д., Толмачёва Е.Н., Саженова Е.А., Салюкова О.А., Четчикова Н.Н., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н.

ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН, г. Томск,

anna.kashevarova@medgenetics.ru

Фундаментальной проблемой современных биомедицинских исследований является интерпретация наблюдаемой генетической вариабельности вследствие существования как нейтральных полиморфных, так и патогенных вариаций. Генетическая вариабельность включает в себя однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) и структурные вариации, представляющие собой последовательности ДНК в виде вариаций числа повторов (CNV, микро- и минисателлиты), вставок/делеций, инверсий и транслокаций (Ceulemans et al., 2012). Под CNV понимается вид структурных вариаций генома, различающихся числом копий определенных регионов хромосом. В Базе данных Геномных Вариантов уже зарегистрировано более 66 741 CNV у здоровых индивидов (<http://projects.tcag.ca/variation/?source=hg19>).

В зависимости от метода определения вариаций числа повторов они составляют до 12 % от всего генома человека (Redon et al., 2006). Более 41 % CNV перекрываются с известными генами, что указывает на возможную важную роль данного типа полиморфизма в регуляции генной экспрессии через эффект дозы или положения (Stranger et al., 2007; de Smith et al., 2008). Также возможно, что для развития заболевания необходима комбинация различных CNV, а иногда и других генетических вариаций, таких как SNP. Пока неизвестно точное число наследственных болезней, обусловленных CNV. Однако очевидно, что их количество может быть значительным. Возможно, что те вариации, которые раньше считались клинически незначимыми, впоследствии могут оказаться CNV, определяющими различную подверженность к заболеванию, или будут иметь отношение к патологии с поздним или вариабельным проявлением.

Исследование структурной вариабельности генома при умственной отсталости у детей явилось одной из задач международного проекта «Улучшение диагностики умственной отсталости у детей Восточной Европы и Центральной Азии через генетическую характеристику, биоинформатику и статистику» (CHERISH), финансируемого Европейской Комиссией в рамках 7 Рамочной Программы Евросоюза по направлению «Здоровье» (Грантовое соглашение № 223692). В выполнении данного проекта принял участие НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск), специалистами которого обследовано 206 детей с умственной отсталостью неясной этиологии, у которых

были исключены крупные хромосомные перестройки, биохимические дефекты и некоторые известные моногенные наследственные синдромы, проявляющиеся нарушениями интеллектуального развития ребенка (Мартина-Белл, Прадера-Вилли, Энгельмана).

К настоящему времени на базе Университета г. Болонья (Италия), а также непосредственно в НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск) проведен aCGH-анализ с помощью чипов Agilent (США) с разрешением 44К и 60К для 71 пациента. Данные чипы содержат около 44 000 и 60 000 олигонуклеотидных проб, соответственно, расположенных с интервалом 43 kb и 41 kb по всему геному. Патогенная, вероятно патогенная вариация или CNV с неясной клинической значимостью были выявлены у 22 пациентов (31%). У остальных 49 детей (69%) был установлен нормальный кариотип или полиморфные, доброкачественные CNV.

В ряде случаев нами было показано сочетание нескольких CNV у одного пациента, например del15q11.1-q11.2 и dup3p26.3, dup15q11.1-q11.2 и dup22q11.22, del15q11.1-q11.2 и del15q24.1-q24.2. Интересно, что у всех трех пациентов в CNV оказался вовлеченным локус 15q11.1-q11.2, ранее не ассоциированный ни с какими заболеваниями и не содержащий гены, потенциально имеющие отношение к функционированию нервной системы. Однако данный регион расположен рядом с критическим локусом 15q11.2 синдромов Прадера-Вилли / Энгельмана, включающего область 15q11.2 BP1/BP2 микроделеционного синдрома. Этот синдром сопровождается задержкой развития, интеллектуальными расстройствами и эпилепсией. Что касается других CNV, вовлеченных в комбинации, то дупликация 3p26.3 была идентифицирована нами впервые у больного с умственной отсталостью неясной этиологии. В данном регионе находится ген контактин (*CNTN6*), который участвует в обеспечении межклеточных взаимодействий при развитии нервной системы. Дупликация 22q11.22 отмечена как у здоровых людей, так и у пациентов с задержкой психомоторного развития и лицевыми дизморфиями, что может указывать на ее сниженную пенетрантность. Делеция 15q24 дала название 15q24 рекуррентному микроделеционному синдрому, проявляющемуся умственной отсталостью и рядом неспецифических фенотипических признаков. Таким образом, разная степень выраженности отдельных клинических признаков у пациентов с одной и той же патогенной CNV может быть обусловлена модифицирующим действием другой CNV или кумулятивным эффектом нескольких вариаций, каждая из которых в отдельности не проявляется фенотипически или дает менее выраженные симптомы. Эти находки свидетельствуют в пользу гипотезы о возможном сочетанном влиянии нескольких CNV на формирование аномальных фенотипических признаков или симптомов.

ИНВЕРТИРОВАННОЕ РАСПОЛОЖЕНИЕ ГЕТЕРОХРОМАТИНА – НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА ОРГАНИЗАЦИЮ ЯДРА

Киселева Е.В.¹, Морозова К.Н.¹, Скуридина Е.Г.¹, Соловей И.², Йоффе Б.²

¹ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия, elka@bionet.nsc.ru

²Biocentrum DER LMU, Munchen, Germany,

В интерфазном ядре гететерохроматин располагается по периферии, контактируя с ядерной оболочкой, а хромосомы занимают специфические области во внутриядерном пространстве. Такой принцип строения ядра универсален в эволюции и характерен для большинства клеток эукариот, однако, недавние исследования строения фоторецепторных клеток (палочек) в сетчатке глаз животных с ночным видением выявили уникальную архитектуру их ядер с инвертированным расположением эу- и гетерохроматина (Solovei et al., Cell, 2009).

С использованием световой и электронной микроскопии мы провели сравнительное исследование расположения и структурной организации фоторецепторных клеток (палочек) в сетчатке глаз мыши и кошки, обладающих ночным, а также свиньи, обладающей дневным типами зрения. В сетчатке глаз, как мыши, так и кошки палочки формируют расположенные вдоль линии прохождения света вертикальные столбики из тесно контактирующих 8-10 клеток. Гетерохроматин в ядрах фоторецепторных клеток мыши в виде электронноплотной сферы занимает центр ядра и формирует радиально расположенные узкие выросты к ядерной оболочке. В области контакта соседних палочек в столбике, цитоплазма практически отсутствует, а нуклеоиды клеток разделены шестью почти сливающимися параллельными мембранами, включающими по две ядерных мембраны и плазматическую мембрану от каждой клетки. Ядерные поры в оболочке ядер клеток распределены неравномерно: они полностью отсутствуют в области тесного контакта соседних клеток и выявляются только в их латеральных участках, содержащих слой цитоплазмы. В отличие от мыши, центрально расположенный гетерохроматин в фоторецепторных клетках глаза кошки представлен двумя компактными серповидными структурами, обращенными друг к другу вогнутыми сторонами. От этих структур отходят более широкие, чем у мышей выросты, к ядерной оболочке. Нуклеоиды соседних клеток, формирующих столбик, могут разделяться в области горизонтального контакта 8-10 тесно расположенными параллельными мембранами, Дополнительные мембраны свидетельствуют о впячивании в эту область отростков других клеток. Клетки в районе тесного контакта содержат узкий слой цитоплазмы и единичные поры в ядерной оболочке. Основное число пор, также как и у мыши, локализуется в латеральных участках ядерной

оболочки клеток. В сетчатке глаза свиньи палочки представлены более крупными, чем у мыши и кошки клетками, Они не образуют типичных столбиков, но могут формировать группы из 2-3 клеток расположенных одна над другой. Гетерохроматин имеет типичное для интерфазных ядер расположение в виде узкой электронноплотной полосы, прилегающей к ядерной оболочке, а также хаотично расположенных скоплений в нуклеоплазме. Ядерные поры выявляются по всему периметру ядерной оболочки. В сгруппированных фоторецепторных клетках участки тесного контакта могут на небольшом протяжении иметь сходство с тем, что наблюдается в сетчатке глаз мыши и кошки, но чаще они представлены близко расположенными плазматическими мембранами, отделенными от ядерных оболочек слоем цитоплазмы содержащей органеллы. Таким образом, расположение палочек и инвертированное положение гетерохроматина в их ядрах имеет большое сходство в сетчатке глаза кошки и мыши и сопровождается реорганизацией общего строения клетки. Уникальность такой архитектуры ядра состоит в том, что новая функциональная роль гетерохроматина обусловлена не генетическими, а физическими его свойствами, востребованными в процессе эволюционной адаптации глаза животных к ночному видению. В модельных экспериментах показано, что при прохождении света через подобные ядра, они функционируют как система фокусирующих свет микролинз, (Kreysing et al., 2010). увеличивая интенсивность светового потока и повышая чувствительность глаза к слабым световым сигналам.

Работа поддержана грантами РФФИ и Программой Президиума РАН Молекулярная и клеточная биология (6.12).

НЕЙРОГЕНЕЗ В ОБОНЯТЕЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ У РЫБ: МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДЕЛЯЩИХСЯ КЛЕТОК

Клименков И.В.¹, Судаков Н.П.², Пастухов М.В.³, Косицын Н.С.⁴

¹ФГБУН Лимнологический Институт СО РАН, Иркутск, iklimen@mail.ru

²ФГБУН Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии СО РАМН, Иркутск

³ФГБУН Институт геохимии им. А. П. Виноградова СО РАН, Иркутск

⁴ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

С помощью электронно-микроскопических и светооптических методов нами установлено, что длительная хемостимуляция рыб нетоксичными водорастворимыми веществами (гетерогенная смесь пептидов и аминокислот) вызывает не только избирательную дифференцировку и гибель отдельных клеток периферического отдела обонятельного анализатора, но и активизирует компенсаторные процессы нейрогенеза (Клименков и др., 2011).

Для выявления и оценки конкретных цитологических параметров нейрогенеза, происходящего в базальных отделах обонятельного эпителия экспериментальных (стимулированных в течение 15 суток смесью пептидов в концентрации $1-2 \cdot 10^{-8}$ М) и контрольных рыб, использовали метод иммуноцитохимического мечения пролиферирующих клеток с помощью бромдезоксипуридина (BrdU), Nowakowski, 1989. Изотоничный раствор BrdU (10 мг/мл) вводили внутривентрально рыбам (*Paracottus knerii*) в количестве 5 мкл на 1 г. веса животного. Через 13 час. обонятельные розетки извлекали и, используя набор реагентов BD Pharmingen™ BrdU Flow Kit (Becton Dickinson, USA), последовательно проводили фиксацию, пермеабиллизацию и мечение антителами с FITC к BrdU. Тотальное окрашивание хроматина осуществляли 7-аминоактиномицином D (7-AAD). Полученные препараты исследовали с использованием конфокального лазерного микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Germany).

Предварительный анализ количества BrdU-позитивных клеток показывает, что у стимулированных пептидной смесью рыб интенсивность пролиферативной активности в эпителии выражена в большей степени. Характерно, что в контрольной и экспериментальной группах наряду с ядрами обычного размера и формы, включившими BrdU, выявляются образования, имеющие достаточно специфическую ориентацию и структуру. Они располагаются перпендикулярно базальной мембране эпителия, при этом, их проксимальный участок расширен и имеет форму «оперения стрелы». В отличие от него, дистальный полюс заострен (рис. 1, а). Важно отметить, что центральную часть некоторых

таких образований занимает плотная зона хроматина, окрашенного 7-AAD (рис. 1, в).
 Используемая технология пермеабиллизации и селективной окраски ядерного материала клеток дает основание полагать, что данные структуры отражают различные фазы деления (рис. 1, а, б) стволовых (или прогениторных) клеток, которые, осуществляются в базальных отделах обонятельного эпителия (Graziadei, 1973). Такая асимметричная форма вертикально ориентированного веретена деления может иметь важное функциональное назначение: после митоза нижняя новообразованная клетка сохраняет прежнее место расположения, а верхняя (за счет заостренного полюса) еще в ходе цитокинеза приобретает способность к проникновению между вышележащими клетками, что необходимо для ее миграции и дальнейшей дифференцировки в апикальных слоях многорядного нейроэпителия. Для более полной характеристики обнаруженных структур необходимы дополнительные исследования.

Работа поддержана Грантом РФФИ № 11-04-01231-а

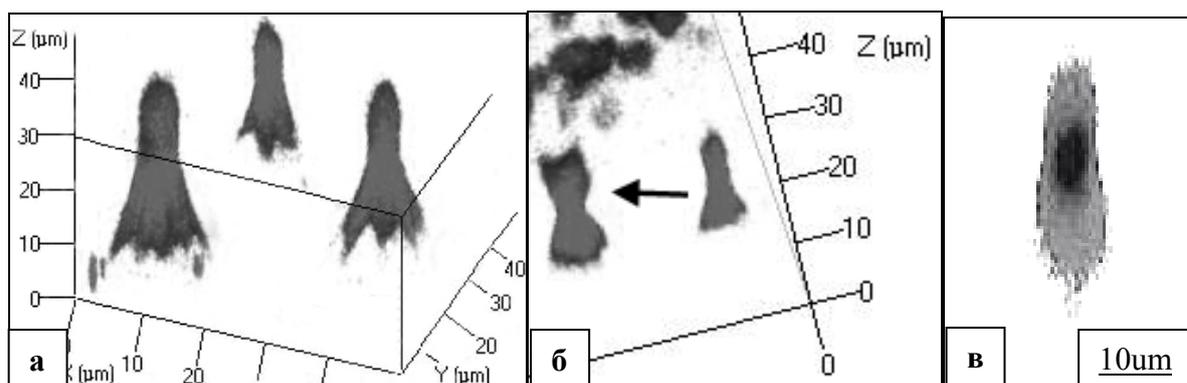


Рис. 1. Морфологические и цитохимические особенности ядерного материала делящихся клеток в базальных отделах обонятельного эпителия у рыб (*Paracottus knerii*): а – стреловидные формы хромосомного материала; б – различные фигуры митоза (а, б – окраска антителами с FITC к BrdU); в – отдельный профиль делящегося ядра клетки (центральный участок хроматина окрашен 7-AAD).

РАЙОНЫ ПОЗДНЕЙ РЕПЛИКАЦИИ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Колесникова Т.Д., Беляева Е.С., Андреевкова Н.Г., Гончаров Ф.П., Зыкова Т.Ю., Болдырева Л.В., Жимулёв И.Ф.

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

У эукариот синтез ДНК подвержен точной пространственно-временной регуляции, что необходимо для поддержания эпигенетического состояния хроматиновых доменов, а также целостности генома в клеточных поколениях. Политенные хромосомы слюнных желез стали в свое время одной из первых экспериментальных моделей для исследования пространственно-временных закономерностей репликации. Эксперименты по импульсному включению меченого предшественника ДНК, проведенные еще в 1970-е годы, показали, что в политенных хромосомах слюнных желез первыми в репликацию вступают междиски и пуфы, затем наступает фаза сплошного мечения, когда все районы хромосом включают метку, а в конце S-периода только районы интеркалярного и прицентромерного гетерохроматина включают [³H]-тимидин. В плечах политенных хромосом слюнных желез *D. melanogaster* дикого типа обнаруживаются примерно 240 таких поздно реплицирующихся сайтов, 25% которых на цитологическом уровне имеют тенденцию образовывать «разломы», что является следствием недорепликации в этих районах (Zhnmmulev et al., 2003).

Открытие гена *SuUR* явилось переломным моментом в исследовании природы поздно реплицирующихся районов политенных хромосом. Оказалось, что все районы, для которых свойственна недорепликация, связывают белок SUUR. Мутация *SuUR* полностью восстанавливает недорепликацию в районах интеркалярного гетерохроматина, что позволило промаркировать эти районы на геномном уровне и установить их локализацию (Belyakin et al., 2005). Новый шаг к установлению границ районов интеркалярного гетерохроматина на физической карте генома дрозофилы позволили сделать накопленные знания о молекулярном содержании междисков политенных хромосом и данные проекта modENCODE. Используя полученные в рамках программы modENCODE данные по распределению белков, характерных для междисков политенных хромосом, в культуральных клетках дрозофилы, мы с высокой точностью определили границы границы 60 дисков интеркалярного гетерохроматина на геномной карте дрозофилы. Точное установление границ позволило провести сравнение организации индивидуальных районов интеркалярного гетерохроматина в разных тканях. Было показано, что 97% последовательностей, лежащих внутри дисков интеркалярного гетерохроматина

политенных хромосом слюнных желез, в Кс клетках соответствуют репрессированным поздно реплицирующимся типам хроматина. При этом были обнаружены и участки рано реплицирующегося открытого хроматина, но такие участки всегда локальны и никогда не затрагивают целого диска интеркалярного гетерохроматина. Полученные данные позволили с уверенностью сказать, что районы интеркалярного гетерохроматина существуют, как особые хроматиновые домены с локальной регуляцией репликации и экспрессии генов не только на политенных хромосомах, но и на хромосомах диплоидных клеток.

Определение границ районов интеркалярного гетерохроматина на геномном уровне позволило подойти к вопросу исследования эволюционной консервативности этих районов. В качестве показателя консервативности мы использовали синтенные блоки (orthologous landmarks) полученные в работе von Grotthuss et al. (2010) для девяти видов рода *Drosophila*. Мы показали, что районы интеркалярного гетерохроматина характеризуются пониженной плотностью точек разрывов хромосомных перестроек. В частности, оказалось, что 45% районов ИГХ перекрываются только одним синтенным блоком, не распадаясь на несколько. Эти данные хорошо согласуются с недавно опубликованными в работе (Ranz et al., 2012), где было показано, что районы, связывающие белок SUUR демонстрируют, в среднем, большую эволюционную стабильность, чем районы, не связывающие эти белки. Кроме того, мы обнаружили, что самые протяженные синтенные блоки, выявленные в работе von Grotthuss et al. (2010), соответствуют районам интеркалярного гетерохроматина.

Ранее было показано, что связывание белка SUUR в политенных хромосомах слюнных желез приурочено к поздно реплицирующимся районам (Makunin et al., 2002). Мы исследовали динамику связывания SUUR с политенными хромосомами слюнных желез в эндоцикле и обнаружили, что интенсивное связывание SUUR с хромосомами наблюдается только во время поздней S-фазы, при этом распределение сигналов соответствует распределению сигналов белка PCNA, маркирующего репликационные вилки. Эти данные позволяют по-новому взглянуть на механизм действия белка SUUR в регуляции пространственно-временной организации репликации в хромосомах дрозофилы.

ИЗУЧЕНИЕ АТФ-ЗАВИСИМЫХ ФАКТОРОВ СБОРКИ И РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОМАТИНА ДРОЗОФИЛЫ

Конеv А.Ю., Макасе А.А., Метельская Д.Н., Котлованова Л.В., Покровский Д.К., Игнатьева М.А., Полторадня Ю.А.

ФГБУ Петербургский Институт Ядерной Физики, г. Гатчина, konev.alexander@gmail.com

Сборка хроматина представляет собой принципиально важный процесс, необходимый для восстановления хроматиновой структуры после репликации ДНК. Удаление и включение гистонов происходит также в течении всего клеточного цикла в ходе таких процессов метаболизма ДНК как транскрипция, репарация или рекомбинация. Изучение того, как собирается хроматин и какие факторы участвуют в этом процессе, необходимо и для понимания того, как воспроизводится эпигенетическая информация, закодированная в структуре хроматина. Исследования *in vitro* свидетельствуют, что для эффективной сборки протяженных нуклеосомных повторов необходимо взаимодействие белковых факторов относящихся к двум различным классам: гистоновых шаперонов и АТФ-зависимых SWI/SNF-подобных хроматин-ремодулирующих факторов. Все известные факторы, способные к АТФ-зависимой сборке хроматина *in vitro* (ACF, CHRAC, RSF, CHD1), содержат моторные белки ISWI или CHD1 в качестве каталитических субъединиц. Эти факторы увеличивают эффективность включения гистонов в хроматин и регулируют расстояние между нуклеосомами. Нами выявлен новый АТФ-зависимый фактор сборки хроматина - комплекс ToRC, образованный белками Toutatis, CtBP и ISWI. Наличие всех трех компонентов комплекса ToRC необходимо для его оптимальной ферментативной активности. Нами показано, что именно белок – ко-репрессор CtBP отвечает за привлечение этого комплекса к специфическим сайтам хромосом.

Эволюционно - консервативный белок CHD1 необходим для происходящей на уровне всего генома независимой от репликации сборки хроматина в транскрипционно-неактивном мужском пронуклеусе дрозофилы (Konev et al., *Science*, 2007). В деконденсирующийся спермий включается исключительно вариантный гистон H3.3 и этот процесс требует участия CHD1. CHD1 был изначально охарактеризован как фактор элонгации транскрипции. В процессе транскрипции происходит по крайней мере частичная потеря нуклеосом и замещение канонического гистона H3 на вариантный гистон H3.3. Логично было предположить, что CHD1 участвует в сопряженной с транскрипцией сборке хроматина. Однако, нуль-мутантные по гену CHD1 личинки не имеют дефектов в структуре хромосом и глобальной организации хроматина. Нами показано, что экспрессия CHD1 имеет сильную материнскую компоненту: продукты гена *chd1*, заложенные в

эмбрионы матерью, сохраняются вплоть до конца личиночной стадии развития. Кроме того, наши исследования свидетельствуют о наличии существенного компенсаторного потенциала в механизмах сборки и ремоделирования хроматина. АТФ-зависимые факторы, вовлеченные в сборку хроматина у дрозофилы (Chd1, dRSF, Tou и Acf1) способны частично компенсировать отсутствие друг друга. В то время как одиночные мутанты лишь незначительно снижают жизнеспособность особей, двойные мутанты являются синтетическими летальными. Нами создана модель для изучения функций и механизмов работы фактора Chd1, основанная на использовании доминант-негативного трансгена. Использование экспрессии доминант-негативных форм белка позволяет преодолеть проблемы, связанные как с наличием материнского продукта, так и с взаимозаменяемостью различных факторов, вовлеченных в процесс сборки хроматина. Замена лизина 559 на аргинин в консервативном домене гена Chd1 элиминирует АТФ-азную активность белка, превращая его в доминант-негативную форму. Экспрессия доминант-негативной формы белка CHD1 в слюнных железах приводит к появлению многочисленных, ярко окрашиваемых антителами на белок CHD1 деконденсированных участков в политенных хромосомах. Окраска хромосом антителами на гистон H3 (которые выявляют оба варианта гистона H3 – H3 и H3.3) показала отсутствие флюоресцентного сигнала в образующихся в результате экспрессии доминант – негативной формы CHD1 дополнительных пучках. Иммуноокрашивание антителами на элонгирующую форму РНК полимеразы II выявляет яркое окрашивание во всех сайтах связывания доминант-негативной формы белка CHD1, свидетельствуя о том, что деконденсация этих районов хромосом связана с процессом активной транскрипции. CHD1 ко-локализуется с укороченной формой гистона H3.3, кодируемой трансгеном H3.3-core-GFP, которая встраивается в хроматин исключительно в процессе независимой от репликации сборки хроматина, ассоциированной с транскрипцией. Мы показали что экспрессия доминант-негативной формы белка CHD1 приводит к существенному снижению эффективности включения гистона H3.3-core-GFP состав хроматина. В наиболее деконденсированных участках хромосом в сайтах связывания доминант-негативной формы белка CHD1 и элонгирующей формы РНК полимеразы II гистон H3.3-core-GFP не выявляется. Инактивация chd1 с помощью RNAi приводит к супрессии фенотипа, вызванного экспрессией укороченной формы гистона H3.3 (H3.3-core-GFP) в клетках крылового имагинального диска. Таким образом, впервые идентифицирован АТФ-зависимый хроматин-ассемблирующий фактор - CHD1, вовлеченный в сопряженную с транскрипцией сборку хроматина.

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИЙ БЕЛКА dSGF11, КОМПОНЕНТА КОМПЛЕКСА SAGA

Копытова Д.В., Гурский Д.Я., Георгиева С.Г.

Институт биологии гена РАН, г. Москва, d_dmitrieva@mail.ru

SAGA - мультибелковый коактиваторный транскрипционный комплекс, который был найден во многих организмах. Как показано ранее, этот комплекс состоит из нескольких модулей, один из которых отвечает за ацетилирование гистонов, второй отвечает за деубиквитинилирование гистона H2B (у человека также H2A). В состав деубиквитинилирующего модуля (DUBm) у дрожжей входят такие белки, как Sgf11, Ubp8 (Nonstop), Sus1 (ENY2) и Sgf73. Считается, что DUBm дрозофилы состоит из трех белков: ENY2 и Sgf11, выполняющих структурную функцию, и деубиквитиназы Nonstop. Мы показали, что белок Sgf11, кроме функции в составе DUBm модуля, участвует и в других процессах в ядре. Sgf11 взаимодействует с компонентом Cap-binding комплекса-белком Cbr80. В составе этого небольшого комплекса Sgf11 рекрутируется на растущую новосинтезированную мРНК. Кроме того, Sgf11 взаимодействует с комплексом AMEX, отвечающим за экспорт мРНК из ядра в цитоплазму. Мы показали также, что интерференция Sgf11 в S2 клетках дрозофилы приводит к нарушению как экспорта мРНК *hsp70*, так и общего экспорта мРНК из ядра в цитоплазму.

Таким образом, Sgf11 функционирует как компонент DUBm SAGA и также участвует в биогенезе мРНК.

ДИНАМИКА ТЕЛОМЕРНОЙ ДНК У БАЙКАЛЬСКИХ ПЛАНАРИЙ И МОЛЛЮСКОВ

Королева А.Г.¹, Максимова Н.В.¹, Ситникова Т.Я.¹, Евтушенко Е.В.², Тимошкин О.А.¹,
Вершинин А.В.², Кирильчик С.В.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт
СО РАН, г. Иркутск, takonedo.bb@mail.ru

²Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск,
avershin@mcb.nsc.ru

Теломеры относятся к важнейшим специализированным районам хромосом, ответственным за поддержание их стабильной структуры и постоянного размера. Исследования молекулярной структуры и функций теломер интенсивно развиваются на хромосомах человека, растений и различных видов позвоночных животных. Из исследований динамики теломерной ДНК (тДНК) позвоночных ясно, что она может быть разной: тДНК может укорачиваться с возрастом (как у орангутанга *Pongo pygmaeus* (Steinert, 2002), черепахи *Caretta caretta* (Hataze, 2008), галки *Corvus monedula* (Salomons, 2009) и др.), может не изменяться (у черепахи *Emys obicularis* (Girondot, 1999), альбатроса *Diomedea exulans* (Hall, 2004), питона *Liasis fuscus* (Ujvari, 2009) и др.) или увеличиваться (например, у качурки *Oceanodroma leucorhoa* (Hausmann, 2003)). Как правило, увеличение или постоянство длины тДНК связано с большой продолжительностью жизни организма (ПЖ). Однако, гораздо меньше известно о возрастной динамике тДНК у беспозвоночных животных. Исследование этого показателя представляет большой интерес, т.к. у некоторых видов характер изменения тДНК связан с продолжительностью жизни как отдельных клеток, так и организма в целом. Среди беспозвоночных животных длина тДНК не меняется с возрастом у долгоживущего морского ежа *Strongylocentrotus franciscanus* (Francis, 2006) и укорачивается у муравьев *Lasius niger* (Jemiely, 2007) и планарий *Schmidtea mediterranea* (Tan, 2012).

Целью настоящей работы было исследование динамики тДНК у четырех видов байкальских планарий (Tricladida, Dendrocoelidae и Planariidae) и трех видов моллюсков (Prosobranchia, Benedictiidae) с помощью методов количественной ПЦР и TRF (Terminal Restriction Fragment). Как среди первых, так и среди вторых были гигантские виды и виды обычного размера, которые отличаются по ПЖ и условиям обитания. Интересно, что гигантский вид моллюсков *Benedictia fragilis* и вид обычного размера *B. baicalensis* в среднем имели более протяженные тяжи тДНК, чем карликовый вид *Kobeltocochlea martensiana* (17 и 12 тпн, соответственно). Кроме того, по данным TRF анализа у гиганта и

обычного вида размеры тДНК нелинейно увеличивались с возрастом, а у карлика уменьшались. Исследование длины тДНК у 11 видов байкальских планарий обнаружило, что гигантские планарии также в среднем имели более протяженную тДНК (более 20 тпн, за исключением *Rimacephalus arecepta*) по сравнению с видами обычного размера (в среднем 12 тпн). По результатам количественной ПЦР динамика тДНК в процессе развития (с увеличением размера тела) имела следующий характер: у видов обычного размера *Baikalobia guttata* и *Phagocata sibirica* она уменьшалась, у одного гигантского вида *R. arecepta* увеличивалась, а у другого *Sorocelis hepatizon* уменьшалась незначительно.

Таким образом, полученные данные указывают, во-первых, на существование определенной корреляции между размерами тела и длиной тДНК у исследованных видов байкальских моллюсков и планарий. Возможно, такая корреляция имеет место и у других представителей байкальской фауны, для которых характерно явление гигантизма - карликовости. Во-вторых, увеличение длины тДНК в процессе развития планарии *R. arecepta*, имеющей относительно короткую тДНК, возможно является адаптацией к большей ПЖ. Напротив, планария *S. hepatizon*, имеющая протяженную тДНК, вероятно, не нуждается в ее поддержании для долгой жизни. Уменьшение длины тДНК у планарий *B. guttata* и *Ph. sibirica* иллюстрирует типичный механизм укорочения тДНК с каждым делением клетки, характерный для большинства нормальных соматических клеток различных организмов. Небольшие исследованные виды планарий не живут долго и, возможно, размеры их тДНК достаточны для осуществления нормального жизненного цикла.

Работа частично поддержана интеграционными проектами СО РАН № 49, 37 и 51, а также благотворительным Фондом Михаила Прохорова.

ИНДУЦИРОВАННАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ В РАЙОНЕ ИНТЕРКАЛЯРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА В ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМАХ ДРОЗОФИЛЫ

Коряков Д.Е., Похолкова Г.В., Максимов Д.А., Белякин С.Н., Беляева Е.С., Жимулёв И.Ф.
Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Районы интеркалярного гетерохроматина политенных хромосом *Drosophila melanogaster* характеризуются поздней репликацией, недорепликацией и отсутствием генетической активности. Используя систему Gal4/UAS, мы активировали транскрипцию последовательностей, прилегающих к двум разным встройкам транспозонов в районе интеркалярного гетерохроматина 11A6-9. Искусственная активация приводит к исчезновению эпигенетических маркеров, характерных для молчащего хроматина, появлению маркеров активного хроматина, РНК-полимеразы II и формированию пуфа. Активированный район становится рано реплицирующимся и увеличивает степень политенизации. Однако эти изменения носят локальный характер и ограничены областью вокруг встройки, тогда как остальная часть района 11A6-9 остается неактивной и поздно реплицирующейся. Но, несмотря на это, индуцированная транскрипция вызывает формирование “открытого” хроматина на значительном большем расстоянии от встройки, чем протяженность транскрипции. Мы можем заключить, что районы интеркалярного гетерохроматина не являются целостной единицей поздней репликации и недорепликации. Каждая часть такого района может быть активирована независимо от остальных частей.

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМОСОМЫ 6 В ЯДРАХ ТРОФОЦИТОВ И КЛЕТОК СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ *CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA* MG. (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)

Коханенко А.А., Ананьина Т.В., Стегний В.Н.

Томский государственный университет, г. Томск, alinakokhanenko@gmail.com

В основе трехмерной организации интерфазного ядра эукариот лежит дифференциальное позиционирование различных районов хромосом относительно друг друга и ядерной оболочки (Стегний, 1993, Cremer, 2001, Dekker et al., 2008). Однако, принципы функционирования генома остаются на сегодня до конца неизвестными. Предполагается, что негенетическая регуляция транскрипционной активности ядра может осуществляться, по крайней мере, двумя способами, которые тесно связаны между собой – эпигенетический (модификация гистонов, метилирование или ацетилирование ДНК и др.) и на уровне пространственной организации хромосом в ядре.

Для исследования связи функции генома и пространственной организации хромосом в качестве модельного объекта нами была выбрана синяя мясная муха *Calliphora erythrocephala* Mg. У *C. erythrocephala* выявляются четкие тканеспецифичные особенности в степени политении и типе организации политенных ядер, что вероятно связано с разным функциональным значением этих тканей. В ядрах слюнных желез *C. erythrocephala* на всем этапе политенизации выявляются политенные хромосомы классического типа. В ядрах трофоцитов в процессе политенизации хроматин претерпевает ряд морфофункциональных изменений (Bier, 1957).

В данной работе нами была поставлена задача: выяснить, как пространственная организация ядрышкообразующей хромосомы связана с активностью самого ядрышка. С помощью метода двуцветного 3D FISH было определено пространственное положение хромосомы 6 и кластеров гена 18S рРНК в ядрах трофоцитов и клеток слюнных желез в ходе политенизации. Кроме того, с помощью метода NOR-окраски недавленных ядер были выявлены активные ядрышки на разных этапах политенизации ядер трофоцитов и клеток слюнных желез.

В результате проведенного исследования было показано, что как в трофоцитах, так и в клетках слюнных желез, организация ядрышкообразующей хромосомы 6 и ассоциированного с ней ядрышка в объеме ядра существенно изменяется в ходе политенизации хроматина. На начальных этапах политенизации, как в ядрах трофоцитов, так и в ядрах клеток слюнных желез хромосома 6 расположена в центральной части ядра. На этих стадиях происходит формирование одиночного крупного ядрышка, ассоциированного с хромосомой 6 и занимающего центральное положение в ядре. В ходе

политенизации происходит изменение организации хромосомы 6 в пространстве ядра. Во вторичных ретикулярных ядрах трофоцитов, как и в высокополитенных ядрах клеток слюнных желез, ядрышкоорганизующие районы хромосомы 6 распределены в пространстве ядра и ассоциированы с микроядрышками. Кроме того, NOR-окрашивание микроядрышек свидетельствует, что расположенные в объеме высокополитенных ядер гены рРНК являются активно экспрессирующимися.

Однако, наряду с описанными закономерностями в изменении организации хромосомы 6 в ходе политенизации хроматина существуют и различия в пространственной организации хромосомы 6 в ядрах трофоцитов и клеток слюнных желез *C. erythrocephala*.

В ядрах трофоцитов наблюдается перемещение хромосомы 6 на периферию ядра. В ядрах со вторичной ретикулярной структурой на периферии ядра расположена основная масса хромосомы 6, в составе которой находится так же и рибосомальные гены. В ходе политенизации ядер клеток слюнных желез подобного перемещения хромосомы 6 на периферию ядра не происходит. В высокополитенных ядрах клеток слюнных желез хромосома 6 распределяется во всем пространстве ядра.

Перемещения хромосомы 6 на периферию ядра трофоцитов может объясняться изменением экспрессионной активности всех хромосом в ядре. Часть генов, не только гены рРНК, расположенные на 6 хромосоме становятся неактивными, что приводит к перемещению основной массы хромосомы 6 на периферию ядра. В ядрах клеток слюнных желез активность генов хромосомы 6 сохраняется, в результате чего перемещения на периферию не происходит.

Показано, что в целом существуют общие закономерности расположения хромосомных территорий внутри ядра. Расположение хромосомных территорий в активно транскрибируемых клетках динамично, что указывает на возможный механизм генной регуляции через внутриядерное позиционирование отдельных локусов хромосом. Кроме того, ядрышко, как значительный домен ядра, играет важную роль в пространственной организации ядра. Описанная в данной работе динамика хромосомной территории ядрышкоорганизующей хромосомы и ассоциированного с ней ядрышка в пространстве ядра, вероятно, связана с изменением общей экспрессионной активности ядра. Кроме того описанное распределение ядрышкоорганизующих районов и микроядрышек в пространстве высокополитенных ядер, вероятно, является особенностью функционирования ядрышка на завершающих этапах политенизации. Таким образом, изменения транскрипционной активности связаны с изменением пространственной организации хроматина в ядре. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов: РФФИ 10-04-01059, МК -158.2012.4.

АРХИТЕКТУРА ГЕТЕРОХРОМАТИНА И ТРАНСКРИПЦИЯ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ ДНК В КЛЕТКАХ ЛИМФОБЛАСТОМЫ КУРИЦЫ

Красикова А.В., Маслова А.В., Василевская Е.В., Злотина А.М., Попова Д.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург,

alla.krasikova@gmail.com

Формирование «конститутивного» гетерохроматина в ходе дифференцировки клеток связано с активностью сателлитных повторов ДНК, которые образуют протяжённые однородные массивы в теломерных, центромерных и интерстициальных районах хромосом. Пластичность в уровне компактизации сателлитной ДНК приводит к разнообразию в трёхмерной организации генома, которая оказывает влияние на транскрипционную активность генов. Конкретные механизмы участия центромерных и теломерных районов хромосом в поддержании упорядоченной радиальной организации генома, формировании хромоцентров и регуляции экспрессии генов во многом остаются не раскрытыми. Целью настоящей работы было проанализировать пространственную организацию и транскрипционную активность tandemных повторов ДНК в клетках лимфобластомы домашней курицы (*Gallus gallus domesticus*). К преимуществам этой модели относится кариотип курицы, который состоит из отличающихся по размеру и плотности генов групп хромосом.

В геноме курицы в настоящий момент охарактеризованы теломерный, субтеломерные (PO41 и Z-макро-сателлит), центромерные, W-специфичные и интерстициальные tandemные повторы ДНК. Геном этого вида птиц характеризуется сложным строением центромер: некоторые хромосомы содержат как tandemно, так и не tandemно повторяющиеся CENP-A-взаимодействующие последовательности ДНК. Сателлитные повторы Cen1, Cen2, Cen3, Cen4, Cen7, Cen8 и Cen11, а также не содержащие tandemных повторов CENP-A-связывающие фрагменты ДНК CenZ, Cen4 и Cen27 локализуются в центромерных районах соответствующих хромосом и на стадии ламповых щёток занимают два крупных хромомера, окружающих центромерную гранулу. При этом наши результаты показали, что хромосом-специфичные центромерные повторы Cen1, Cen2, Cen3, Cen4, Cen7, Cen8 и Cen11 курицы не транскрибируются в ооцитах на стадии ламповых щёток. Центромеры ряда макрохромосом японского перепела не содержат повторов, гомологичных хромосом-специфичным центромерным повторам курицы.

Анализ локализации перечисленных повторов в клетках линии MDCC-MSB1 курицы проводили с помощью метода 3D-FISH. Результаты анализировали методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с последующим построением

изоповерхностей по контуру флуоресцентного сигнала с использованием программ Imaris и ImageJ. В результате мы обнаружили, что в интерфазных ядрах клеток MDCC-MSB1 центромеры большинства макрохромосом локализируются на периферии ядра. Повтор CNM, характерный для центромерных районов микрохромосом, был найден в DAPI-позитивных хромоцентрах, располагающихся преимущественно в центральной части ядра. Помимо CNM, теломерный повтор (TTAGGG)_n также участвует в формировании внутренних хромоцентров в соматических клетках курицы. При этом оказалось, что хромоцентры очень редко содержат одновременно центромерные последовательности ДНК макро- и микрохромосом, территории которых находятся в разных радиальных зонах ядра. Сходную пространственную организацию центромерных последовательностей ДНК выявили и в ядрах клеток ряда соматических тканей курицы, что свидетельствует об универсальности наблюдаемой картины распределения сателлитных повторов. Таким образом, у домашней курицы центромеры обедненных генами макрохромосом закорены в периферийном слое гетерохроматина вблизи ядерной оболочки, тогда как центромеры обогащенных генами микрохромосом локализируются в центральной части ядра, будучи закоренными в хромоцентры.

Мы также продемонстрировали, что наиболее крупный не содержащий повтора CNM хромоцентр в ядрах клеток лимфобластомы соответствует сильно гетерохроматинизированной половой хромосоме W курицы, которая состоит преимущественно из высокоповторяющихся последовательностей пяти видов (в том числе *EcoRI*-, *XhoI*-, *SspI*-повторы). Полученные результаты показали, что с этим хромоцентром часто ассоциирован основной блок Z-макро-сателлита, который содержится в хромосоме Z курицы, что может свидетельствовать о митотической (соматической) рекомбинации половых хромосом.

С помощью метода ДНК/РНК *in situ* гибридизации мы впервые выявили транскрипцию тандемных повторов ДНК в соматических клетках курицы. В частности, мы смогли доказать, что субтеломерный тандемный повтор PO41 транскрибируется в клетках лимфобластомы MDCC-MSB1 с С-богатой нити. В интерфазных ядрах транскрипты повтора PO41 формируют один-два крупных домена в нуклеоплазме, а на стадии анафазы/ранней телофазы кластрируются около терминальных районов хромосом. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что синтезируемые в интерфазе транскрипты субтеломерных тандемных повторов ДНК участвуют в формировании гетерохроматина после анафазы митоза.

РОЛЬ БЕЛКА SU(HW) В ПОЗИЦИОНИРОВАНИИ ОРИДЖИНОВ РЕПЛИКАЦИИ

Краснов А.Н., Мазина М.Ю., Воробьева Н.Е.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена РАН,
г. Москва, krasnov@genebiology.ru

Несмотря на множество исследований, посвященных изучению ориджинов репликации, до сих пор остается непонятным молекулярный механизм, лежащий в основе их позиционирования. Мы показали, что инсуляторный белок Su(Hw) рекрутирует гистон ацетилтрансферазный комплекс SAGA и ремоделер хроматина Brahma на Su(Hw)-зависимые инсуляторы, что приводит к формированию области с низкой плотностью нуклеосом и формированию условий для посадки репликационного комплекса ORC. Нокаунт Su(Hw) приводит к драматическому западению комплексов SAGA, Brahma, ORC и значительному увеличению нуклеосомной плотности на Su(Hw)-зависимых инсуляторах. Кроме того, мы показали, что белок Su(Hw) достаточен для привлечения комплексов SAGA, Brahma и ORC. В то время, как большинство репликационных ориджинов ассоциированы с промоторами активных генов, сайты связывания Su(Hw) представляют небольшую часть ориджинов, которые расположены преимущественно в транскрипционно неактивном хроматине. Несмотря на это, мы показали общие свойства сайтов связывания Su(Hw) и активных промоторов, касаясь ремоделинга хроматина и привлечения ORC комплексов, что наводит на мысль о существовании универсального механизма позиционирования ориджинов репликации. Мы предполагаем, что ключевым детерминантом позиционирования областей начала репликации являются ДНК-связывающие белки, которые привлекают комплексы модификации и ремоделинга хроматина на различные регуляторные элементы генома, что создает условия для посадки ORC и связывает регуляцию транскрипции и репликации. Su(Hw) это первый пример такого белка.

ПРЕДКОВЫЙ КАРИОТИП ПОДОТРЯДА ЖВАЧНЫХ (RUMINANTIA)

Кулемзина А.И.¹, Янг Ф.², Трифонов В.А.¹, Райдер О.А.³, Фергюсон-Смит М.⁴,
Графодатский А.С.¹

¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

²Институт Сэнгера, Кэмбридж, Великобритания

³Zoo's Institute for Conservation Research, Эскондидо, Сан Диего, Калифорния, США

⁴Центр ветеринарии, Кэмбридж, Великобритания

Подотряд Жвачных (Ruminantia) состоит из шести семейств и является самым многочисленным в отряде Китопарнокопытных (Cetartiodactyla). Семейства Antilocapridae (Вилороги), Giraffidae (Жирафовые), Moschidae (Кабарги), Cervidae (Олени) и Bovidae (Полорогие) объединяются в группу Resoга или настоящие жвачные. Tragulidae (Оленьки) включает в себя всего шесть видов, однако как базальное и наиболее древнее семейство Жвачных очень важно для изучения ранней эволюции хромосом современных представителей этого подотряда.

В нашей работе с помощью хромосомного пэйнтинга впервые исследован кариотип представителя Оленьков *Tragulus javanicus* (2n=32). Были использованы хромосомоспецифичные пробы человека и верблюда для выявления консервативных сегментов на хромосомах *T. javanicus*. Этот же набор пэйнтинг-проб ранее был локализован на хромосомах представителей практически всех семейств отряда китопарнокопытных, поэтому полученные результаты в совокупности с опубликованными данными позволили предположить предковый кариотип и проследить эволюцию хромосом Жвачных. Согласно нашему анализу, предковый кариотип Жвачных наиболее вероятно содержал 23 пары аутосом (2n=48) и оказался довольно схожим с предковым кариотипом отряда Китопарнокопытных. Всего три слияния (предковых хромосом, гомологичных аутосомам верблюда CDR4+31, CDR 2+32 и CDR 19+35), четыре инверсии (на хромосомах гомологичных CDR 3/22-два раза, CDR 6/27, и CDR 25/29) и один разрыв (предковый элемент гомологичный хромосоме CDR1/17) отличают предковый кариотип Китопарнокопытных от предкового кариотипа Жвачных. Многочисленные перестройки, которые сопровождали формирование современного кариотипа *T. javanicus* оказались апоморфными и не происходили на хромосомах других видов из группы Resoга.

НАКАПЛИВАЮЩИЕ ПОЛИ(А)+РНК ЯДЕРНЫЕ ДОМЕНЫ, ФОРМИРУЮЩИЕСЯ НА ХРОМОСОМАХ ТИПА ЛАМПОВЫХ ЩЁТОК ПТИЦ, НЕ СОДЕРЖАТ МАРКЕРНОГО БЕЛКА ПАРАСПЕКЛОВ PSF/SFPQ

Куликова Т.В., Гагинская Е.Р.

Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург,

spbchromas@gmail.com

Для определённых локусов хромосом типа ламповых щеток большинства изученных видов птиц и амфибий характерно формирование латеральных петель с необычной морфологией РНП-матрикса, называемых также сложными петлями (СП). РНП-матрикс СП на хромосомах типа ламповых щеток исследованных видов птиц и амфибий проявляет отсроченное по сравнению с РНП-матриksom нормальных латеральных петель включение меченных предшественников РНК (Gall and Callan, 1962; Sallacz and Jantch, 2005; наши неопубликованные данные). Ингибирование транскрипции в ооцитах амфибий (Angelier et al., 1990; Sallacz and Jantch, 2005) или угасание транскрипционной активности при переходе к стадии большого роста в ооцитах птиц ведет к сокращению нормальных боковых петель и конденсации хромосом, но не влияет на СП. Недавно в нашей лаборатории было показано, что большинство СП на ламповых щетках птиц (курицы, голубя, зяблика и зебровой амадины) и бесхвостых амфибий (шпорцевой и озерной лягушек) содержат поли(А)+РНК. В целом, эти данные позволяют рассматривать СП, как ядерные домены, накапливающие поли(А)+РНК и удерживающие её в ядре ооцита. Для многих СП в ядрах ооцитов птиц и амфибий было показано обогащение РНП-матрикса факторами сплайсинга SR-семейства и мяРНП (Sallacz and Jantch, 2005; Gaginskaya et al., 2009; Красикова и др. 2010), однако эти компоненты не являются универсальными маркерами всех СП. Такой маркерный компонент СП до сих пор не был найден, а единственным универсальным свойством РНП-матрикса всех исследованных СП можно считать отсутствие белка L гетерогенных ядерных РНП (Wu et al., 1991, Sallacz and Jantch, 2005; наши не опубликованные данные). В ядрах соматических клеток млекопитающих недавно были описаны новые ядерные домены – параспеклы (Fox et al, 2002). Параспеклы удерживают РНК в ядре за счет связывания её гиперредактированных участков маркерными белками параспеклов – многофункциональными белками PSF/SFPQ и p54/nrb (Prasanth et al., 2005). Для биогенеза параспеклов необходима экспрессия РНК-организатора параспеклов – длинной некодирующей РНК NEAT1/Men β , которая связывает и аккумулирует белки параспеклов (Mao et al., 2011). Недавно в нашей лаборатории было показано, что СП на биваленте 2 курицы (lumpy loop – LL2) формируются в месте локализации нового длинного

тандемного повтора LL2R, а РНП-матрикс этих петель обогащен его транскриптами (Красикова и др. 2010). Большинство СП в ядрах ооцитов птиц представлено гигантскими терминальными петлями (ГТП), которые формируются в субтеломерных участках хромосом и, по-видимому, РНП-матрикс ГТП также составляют нкРНК – транскрипты субтеломерных последовательностей. В геноме курицы не обнаруживаются последовательности гомологичные генам РНК длинной нкРНК NEAT1/Menεβ млекопитающих, а локализация белков параспеклов в клетках птиц до сих пор не была исследована. Для того, чтобы установить соответствуют ли СП в ядрах ооцитов птиц параспеклам в ядрах соматических клеток млекопитающих, мы исследовали локализацию белка PSF/SFPQ на хромосомах типа ламповых щеток курицы и голубя, а также распределение этого белка в целых ооцитах курицы с помощью непрямой иммунофлуоресценции. Степень сходства первичной последовательности фрагмента белка человека PSF/SFPQ, против которого выработаны использованные в работе поликлональные антитела, и соответствующего фрагмента белка PSF/SFPQ домашней курицы составляет 92%. На хромосомах типа ламповых щеток курицы и голубя антитела против белка PSF/SFPQ интенсивно окрашивали РНП-матрикс большинства нормальных латеральных петель, за исключением некоторых латеральных петель на макро- и микрохромосомах. У курицы в число таких петель вошли латеральные петли, на которых транскрибируются последовательности Z-макросателлита курицы. 3D-иммуноокрашивание с помощью антител против белка PSF/SFPQ ооцитов курицы выявило более интенсивную флуоресценцию в РНП-матриксе нормальных петель хромосом типа ламповых щёток, чем в нуклеоплазме. В ядрах окружающих ооцит фолликулярных клеток нуклеоплазма окрашивалась равномерно и отдельные фокусы, которые соответствовали бы параспеклам в ядрах клеток млекопитающих, не выявлялись. При этом РНП-матрикс всех СП на хромосомах типа ламповых щеток обоих видов птиц не окрашивался антителами против белков PSF/SFPQ. Такое распределение белка PSF/SFPQ совпадает с распределением белка гяРНП L, что подтверждено двойным иммуноокрашиванием. Таким образом, мы показали что СП – домены, удерживающие РНК в ядрах ооцитов птиц, не содержат белка PSF/SFPQ, участвующего в удержании РНК в параспеклах соматических клеток млекопитающих. Наличие белка PSF/SFPQ в РНП-матриксе нормальных латеральных петель может свидетельствовать о том, что в ядрах ооцитов птиц белок PSF/SFPQ функционирует как фактор сплайсинга.

РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА COOKIE MONSTER В РЕГУЛЯЦИИ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ В ПРОЦЕССЕ СПЕРМАТОГЕНЕЗА DROSOPHILA MELANOGASTER

Лактионов П.П., Максимов Д.А., Белякин С.Н.

Институт молекулярной и клеточной биологии, г. Новосибирск, laktionov@mcb.nsc.ru

Сперматогенез дрозофилы – многоступенчатый процесс, в ходе которого недифференцированная стволовая клетка превращается в подвижный сперматозоид. Образование функциональных гамет сопровождается многочисленными морфологическими изменениями, в основе которых лежит реализация определенных генетических программ. Таким образом, процесс дифференцировки и созревания клеток зародышевого пути требует координированного и четко определенного во времени взаимодействия множества генов и их продуктов.

Стадия сперматоцитов является одним из наиболее значимых этапов сперматогенеза. В течение этой стадии активируются гены дифференцировки, и запускается транскрипционная программа, в результате которой нарабатываются практически все транскрипты, необходимые для прохождения мейоза и дальнейшего сперматогенеза. Вплоть до стадии сперматоцитов, гены дифференцировки находятся в неактивном состоянии, которое поддерживается белками группы Polycomb (PcG). Предполагается, что основную роль в противодействии Polycomb-опосредованной инактивации генов дифференцировки и последующем контроле активности семенник-специфичных генов играют белки, кодируемые генами остановки мейоза.

Нарушения в работе генов остановки мейоза (гены *aly*- и *can*-классов) приводят к полной остановке сперматогенеза на стадии сперматоцитов и снижению активности большей части семенник-специфичных генов. Механизмы активации семенник-специфичных генов белками *aly*- и *can*-класса и их взаимодействие между собой остаются неясными.

Мутация по гену *Cookie monster*, принадлежащему к *aly*-классу генов остановки мейоза, приводит к нарушению экспрессии более чем тысячи семенник-специфичных генов. Для определения генов-мишеней транскрипционного фактора *Cookie monster* (*Comr*), мы создали генетическую систему для проведения DamID в клетках зародышевого пути. Использование этой системы позволило нам определить полногеномный профиль связывания белка *Comr*. На следующем шаге, мы сопоставили данные по связыванию *Comr* с данными по экспрессии генов в семенниках организмов, мутантных по гену *comr*. Полученные результаты были сопоставлены с данными по распределению гистоновых

модификаций хроматина на стадии развития, предшествующей действию транскрипционного фактора Comr. В результате мы установили, что Comr связывается с протяженными последовательностями генов и является прямым активатором транскрипции семенник-специфичных генов. Также мы обнаружили, что до начала действия Comr его гены-мишени находятся в неактивном хроматине, обогащенном метками PcG-комплекса. Это наблюдение свидетельствует в пользу того, что белок Comr противодействует белкам группы Polycomb. В конечном итоге, на основе полученных данных, мы разработали модель взаимодействия белков aly- и cap-класса в процессе регуляции активности семенник-специфичных генов *D. melanogaster*.

РОЛЬ ДЛИНЫ МОНОМЕРА И НУКЛЕОТИДНОГО КОНТЕКСТА ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ САЙТОВ ПОСАДКИ НУКЛЕОСОМ В ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРАХ РАСТЕНИЙ

Левицкий В.Г.¹, Вершинин А.В.²

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия, levitsky@bionet.nsc.ru

²Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

Тандемно организованная повторяющаяся ДНК представляет собой тяжи регулярно следующих друг за другом мономеров. Такая структура делает эти тяжи особенно интересными для выяснения роли нуклеотидного контекста ДНК в определении сайтов посадки нуклеосом (СПН). Периодичное расположение динуклеотидов на расстоянии одного витка двойной спирали ДНК (10-11 пар оснований) является одним из немногих универсальных свойств СПН. На основе литературных данных и распределения ДМ в семействах тандемных повторов для ДНП нами был установлен диапазон значений от 155 до 205 пар оснований. 165 семейств тандемных повторов из базы данных PlantSat (<http://w3lamc.umbr.cas.cz/PlantSat/>, [1]) были разделены нами на два класса с помощью критерия отношения длины мономера (ДМ) к длине нуклеосомного повтора (ДНП). К первому классу отнесены семейства, имеющие длину мономера равную целому числу нуклеосомных повторов, ко второму классу – семейства, у которых длина мономера не совпадала с целым числом нуклеосомных повторов. Для предсказания СПН был применен метод Phase (<http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/mgs/programs/phase/>, [2]), который сочетает преимущества нескольких методов предсказания сайтов посадки нуклеосом.

Для каждого мономера с помощью метода Phase рассчитывается профиль значений функции предсказания, максимальные значения которого (пики) соответствуют СПН, а минимальные — участкам между соседними СПН (ликерной ДНК). Пик с наибольшей высотой в профиле Phase для одного мономера мы определяем как доминантный. Для сравнения высот разных пиков оценили пороговую высоту пика, достаточную для определяемого нуклеотидным контекстом СПН. Критерий пороговой высоты пика был установлен на основе распределения высот пиков для полных геномов риса и человека с учетом того, что доля определяемых нуклеотидным контекстом СПН в ДНК полного эукариотического генома составляет 50% [3].

Четыре критерия были разработаны нами для классификации семейств тандемных повторов по типу нуклеосомной организации: (а) отношение ДМ к ДНП; (б) отношение числа пиков в профиле к числу нуклеосомных повторов в нем; (в) доля мономеров в семействе с высотой доминантного пика больше пороговой; (г) высота наименьшего пика в

профиле. На основе этих критериев среди большого разнообразия профилей Phase были определены три основных типа нуклеосомной организации в ДНК тандемных повторов: регулярный, частично регулярный (частичный) и гибкий. Регулярный тип, для которого расположение каждой нуклеосомы в тяже мономеров тандемного семейства поддерживается нуклеотидным контекстом, оказался представленным только в первом классе семейств. Для частичного типа нуклеотидный контекст влияет на формирование только части нуклеосом тяжа мономеров. В гибком типе нуклеосомной организации влияние нуклеотидного контекста на формирование нуклеосом незначительно. Численность семейств гибкого типа самая большая (65), большинство из них относятся ко второму классу семейств.

Работа поддерживается грантом Российского Фонда Фундаментальных исследований №12-04-00512а.

Список литературы:

1. J. Macas et al. (2002) PlantSat: a specialized database for plant satellite repeats, *Bioinformatics*, **18**: 28-35.
2. V.G. Levitsky et al. (2008) Nucleosome formation potential estimation via dinucleotide periodicity preferences, *Proceedings of the sixth international conference on bioinformatics of genome regulation and structure*, 140.
3. N.Y. Kaplan et al. (2009) The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome. *Nature* 458: 362-366.

ХРОМОСОМЫ И ГИБРИДОГЕННОЕ ВИДООБРАЗОВАНИЕ У НАСЕКОМЫХ

Лухтанов В.А., Кузнецова В.Г., Шаповал Н.А., Анохин Б.А.

Зоологический институт РАН, г. Санкт-Петербург, karyo@zin.ru

Новые виды живых организмов, в том числе и насекомых, могут возникать не только в ходе дивергентной, дихотомической эволюции, но и в результате гибридизации, приводящей к слиянию эволюционных линий. К настоящему времени гибридная природа подтверждена лишь для небольшого числа видов насекомых, относящихся к разным отрядам. В то же время многочисленные данные по интрогрессии генов косвенно свидетельствуют о широком распространении межвидовой гибридизации среди членистоногих и потенциально большом значении этого процесса в формировании современного разнообразия насекомых.

Существуют два принципиально разных генетических механизма гибридного видообразования: 1) объединение целых родительских геномов в процессе аллополиплоидизации и 2) комбинирование частей геномов родительских видов без изменения уровня ploидности (гомоплоидное гибридогенное видообразование). Из этих механизмов второй изучен значительно хуже. Это связано с тем, что диплоидные гибридные виды невозможно обнаруживать с помощью методов классической цитогенетики, а молекулярные подходы к их анализу еще только разрабатываются. В нашей работе для исследования гибридогенного видообразования на диплоидном уровне мы впервые применили метод геномной гибридизации *in situ*. Использование этого подхода в сочетании с методами молекулярной филогенетики и филогеографии позволяет выявлять случаи гибридогенного видообразования, распознавать родительские виды, изучать генетические механизмы формирования и стабилизации гибридных геномов и реконструировать основные этапы эволюционной истории гибридных видов (локализация географических районов, где происходила гибридизация, восстановление маршрутов гибридных видов по территории, формирующей современные ареалы, датировка событий).

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты 12-04-00490 и 11-04-00734) и программ Президиума РАН «Динамика и сохранение генофондов» и «Происхождение биосферы и эволюция гео-биологических систем».

ИНСУЛЯТОРНЫЙ БЕЛОК D. MELANOGASTER SU(HW) РЕКРУТИРУЕТ КОМПЛЕКСЫ SAGA И BRAHMA И СОЗДАЕТ УСЛОВИЯ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ БЕЛКОВ, УЗНАЮЩИХ УЧАСТКИ НАЧАЛА РЕПЛИКАЦИИ (ORC)

Мазина М.Ю., Воробьева Н.Е., Краснов А.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена РАН,
г. Москва, magadovam@yandex.ru

Белок Su(Hw) необходим для функционирования ряда хорошо изученных инсуляторов *D.melanogaster*. В нашей работе мы показали, что Su(Hw) привлекает комплексы ацетилирования гистонов SAGA и ремоделирования хроматина Brahma на Su(Hw)-зависимые инсуляторы, что приводит к созданию областей с низкой плотностью нуклеосом и создает условия для связывания комплекса белков, узнающих участки начала репликации (ORC). Нокаун Su(Hw) приводит к значительному снижению количества белковых комплексов SAGA, Brahma и ORC, и, в то же время, к увеличению плотности нуклеосом на Su(Hw)-зависимых инсуляторах. Эксперименты по артефактному рекрутингу Su(Hw) показали, что этого достаточно для привлечения SAGA, Brahma и ORC комплексов. Таким образом, мы показали, что Su(Hw) необходим и достаточен для ремоделинга хроматина и привлечения репликационного комплекса ORC. Эти результаты были подтверждены с помощью полногеномного анализа ChIP-chip и ChIP-Seq данных из базы modENCODE. Анализ всех сайтов связывания Su(Hw) в геноме дрозофилы показал, что на них присутствуют комплексы SAGA и Brahma. Кроме того, анализ полногеномных профилей гистонов H1, H3 и H4 подтвердил, что на сайтах связывания Su(Hw) формируются области, свободные от нуклеосом. Аналогичным образом было показано, что на сайты связывания Su(Hw) привлекаются комплексы ORC и Mcm 2-7, участвующие в формировании ориджинов репликации. Анализ всех участков начала репликации дрозофилы показал, что Su(Hw) содержится на 6% репликационных ориджинов.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ФАКТОРА CHD1 В РЕГУЛИРОВАНИИ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИНА И ТРАНСКРИПЦИИ НА МОДЕЛИ ГЕНОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Макасе А.А., Конев А.Ю.

ФГБУ Петербургский Институт Ядерной Физики, г. Гатчина, anna.makase@gmail.com

Преобразования хроматина, в том числе его разборка и сборка, происходят в ходе всех процессов метаболизма ДНК в эукариотической клетке – репликации, транскрипции, репарации и рекомбинации. Поэтому исследование механизмов сборки хроматина и факторов, вовлеченных в этот процесс, является фундаментальной биологической проблемой. Предыдущие исследования показали, что консервативный хроматин-ремоделирующий белок CHD1 необходим для происходящей на уровне всего генома независимой от репликации сборки хроматина при реорганизации спермия у дрозофилы после оплодотворения. В политенных хромосомах АТФ-зависимый фактор CHD1 связывается с регионами активной транскрипции – пуфами и междисками и ко-локализуется с элонгирующей формой РНК полимеразы II.

В данной работе изучается роль фактора CHD1 в процессах преобразования хроматина политенных хромосом в ходе транскрипции на модели генов теплового шока. В условиях теплового шока у дрозофилы при синтезе кодирующих белки теплового шока РНК на политенных хромосомах возникают специфические пуфы. Эти области отвечают наиболее деконденсированному состоянию хроматина; в них осуществляется активный синтез РНК. При снятии теплового шока пуфы постепенно исчезают, и хроматин возвращается в исходное состояние.

Изучали динамику образования и убывания пуфов при тепловом шоке и относительную локализацию белка CHD1 и элонгирующей формы РНК-полимеразы II у особей дикого типа, нуль-мутантов по гену *chd1*, при гиперэкспрессии белка CHD1, а также его доминант-негативной формы. Результаты исследований показали, что в хромосомах особей дикого типа локализация элонгирующей формы РНК полимеразы II и фактора CHD1 совпадает все время в процессе теплового шока и после его снятия. При гиперэкспрессии доминант-негативного CHD1 после снятия теплового шока нормальная структура хроматина восстанавливается гораздо дольше, чем у особей дикого типа и CHD1 не наблюдается в пуфах теплового шока ни во время него, ни после его завершения. Аналогичные эффекты наблюдались при гипер-экспрессии нативной формы белка CHD1. При этом транскрипция генов теплового шока продолжается даже после снятия стимула – теплового стресса.

В хромосомах личинок нуль-мутантных по гену *chd1* особей (у которых присутствует продукт гена *chd1* материнского происхождения) наблюдается задержка восстановления нормальной структуры хроматина после снятия теплового шока в 27% случаев по сравнению с диким типом.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что фактор CHD1 необходим для эффективного возвращения к нормальной структуре хроматина после окончания транскрипции и существенен для регуляции завершения самого процесса транскрипции.

ВЫЯВЛЕНИЕ КЛЕТОК ДРОЗОФИЛЫ ПРОХОДЯЩИХ СОМАТИЧЕСКУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ПО ПОЛУ

Максимов Д.А., Белякин С.Н.

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск, vift@mcb.nsc.ru

На сегодняшний день исследованы лишь начальные этапы процесса формирования полового диморфизма у *D. melanogaster*. Основным геном, отвечающим за соматическую дифференцировку мухи по мужскому или женскому типу, является ген *doublesex (dsx)*. На данный момент известно, что белковый продукт этого гена нарабатывается в сравнительно небольшом числе клеток организма. Это может означать, что не во всех клетках дрозофилы определяется их половая принадлежность, а вкрапленные в ткань клетки, нарабатывающие *dsx* регулируют рост ткани за счет межклеточных сигналов, например, WNT2. Однако, можно предположить, что в тех клетках, в которых не наблюдалась экспрессия гена *dsx*, этот ген уже сработал на более ранней стадии развития ткани и прекратил работу в зрелой ткани. Тогда редкие клетки, экспрессирующие этот ген могут быть, например, не до конца созревшими или стволовыми клетками.

В данной работе мы разработали генетическую систему для отслеживания всех клеток организма дрозофилы, когда либо экспрессировавших ген *dsx*. Для этого мы внедрили в геном мухи трансгенную конструкцию, несущую ген рекомбиназы *cre*. Ее экспрессия находится под контролем копии регуляторных областей гена *dsx*, находясь в непосредственной близости от него. Таким образом, рекомбиназа CRE нарабатывается только в тех клетках, где активен ген *dsx*. Благодаря этому, в этих клетках, и во всех их потомках происходит вырезание терминатора транскрипции, блокирующего наработку флуоресцентного белка mCD8-GFP из второй трансгенной конструкции. Данная система позволяет детектировать все соматические клетки, когда либо прошедшие половую дифференцировку, под микроскопом. Выяснилось, что далеко не все клетки взрослого организма дрозофилы когда-либо дифференцируются по полу. Таким образом, данные клетки либо не отличаются между полами, либо регулируются *dsx*-экспрессирующими клетками за счет межклеточных сигналов.

ОБНАРУЖЕНИЕ БЕЛОК-КОДИРУЮЩЕГО ГЕНА НА В-ХРОМОСОМАХ КОПЫТНОГО ЛЕММИНГА (*DICROSTONYX TORQUATUS*)

Макунин А.И.

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск, alex@mcb.nsc.ru

В-хромосомы – это добавочные элементы кариотипа, число которых может варьировать на уровнях от популяционного до клеточного. До сих пор остается открытым вопрос о функциональности добавочных хромосом у позвоночных. За последние несколько лет копии белок кодирующих генов были обнаружены на В-хромосомах хищных млекопитающих, пецилии, цихлид. Настоящая работа посвящена изучению добавочных хромосом копытного лемминга, грызуна из семейства Хомяковых (*Cricetidae*), обитающего в тундрах Палеарктики. Помимо добавочных хромосом (от 0 до 15), его кариотип интересен необычной системой половых хромосом – X транслоцирована на аутосому, а Y не обнаруживается цитологическими методами и, возможно, находится среди В-хромосом.

Было проведено секвенирование 94 клонов двух В-хромосомспецифичных библиотек копытного лемминга. Обнаружено несколько уникальных фрагментов, среди них – OFD1, ген, расположенный на X хромосоме у плацентарных млекопитающих. Далее было проведено ПЦР-картирование на хромосомспецифичных библиотеках, в результате которого выяснилось, что полные копии этого гена присутствуют как на X, так и на В-хромосомах.

Далее планируется проведение оценки копийности обнаруженного гена на добавочных хромосомах и функциональности копий, расположенных на В-хромосоме.

РОЛЬ ГЕНА *HRS* В РАЗВИТИИ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Мариловцева Е.В., Копыл С.А., Дубатолова Т.Д., Омелянчук Л.В.

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск,
star_kochab@mcb.nsc.ru

Одним из важнейших белков-участников процессов везикулярного трафика является субстрат рецептор-связанных тирозинкиназ *Hrs* (Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate). *Hrs* является жизненно важным белком: эмбрионы мутантных форм *Drosophila*, у которых отсутствует *Hrs*, обнаруживают множественные дефекты гаструляции; у мышинных *hrs^{-/-}* эмбрионов наблюдаются дефекты формирования вентральных структур [M. Komada, P. Soriano. *Genes Dev.*, 1999, Vol. 13 (11), pp. 1475-1485]. Более детальные исследования показали, что *Hrs* участвует в направлении на лизосомную деградацию различных рецепторов и, таким образом, принимает участие в регуляции сигнальных каскадов [E. S. Seto, H. J. Bellen, T. E. Lloyd. *Genes & Dev.*, 2002, Vol.16, pp. 1314-1336 (review)].

Проведенное нами исследование функции гена *hrs* в развитии крыла *Drosophila* подтвердило данные [E.S. Seto, H. Bellen. *J. Cell Biol.*, 2006, Vol. 173(1), pp. 95-106] о его участие в процессе формирования D/V границы крылового имагинального диска: эктопическая экспрессия *UAS-hrs* в почке крыла приводит к изменению морфологии MTR и паттерна репортера *neur-LacZ* в MTR. В оригинальном эксперименте нами было показано, что паттерн экспрессии *ap-LacZ* при эктопической экспрессии *UAS-hrs* в почке крыла также отличается от нормы. Поскольку ген *ap* является наиболее ранним геном, демаркирующим D/V границу крыла, было сделано заключение о существовании более ранней, чем известная в настоящее время, функции *hrs* в формировании этой границы. Исследование эффекта сайленсирующего конструкта *RNAi-hrs* показало существование ещё одной функции гена *hrs* – его участие в процессе сужения прожилок крыла (vein refinement). Анализ структуры транскриптов гена *hrs* позволяет полагать, что за процесс сужения жилок отвечает транскрипционная форма *hrs B*.

Эктопическая экспрессия гена *eu* в крыловом имагинальном диске под действием драйвера *1096-Gal4* вызывает трансдифференцировку части клеток крылового имагинального диска, в результате которой они преобразуются в клетки глаза. Эктопические глаза индуцируются в определенных участках крылового диска и формируют стабильный паттерн на крыле взрослой мухи. Мы показали, что эктопическая экспрессия *Wg* ингибирует образования эктопических глаз; при этом в местах эктопической экспрессии *Eu* экспрессия *Wg* редуцирована. Т.о. антагонизм действия *Eu* и

Wg, характерный для нормального развития глаза, имеет место и при образовании эктопического глаза. Эксперименты с оверэкспрессией Hrs, способного ингибировать Wg сигналинг, согласуются с тезисом об антагонистичности Wg и Ey в эктопических глазах.

Также нами был создан химерный GFP-белок, включающий VHS и FYVE домены Hrs. Исследование локализации этого белка в клетках слюнных желез, трофоцитах яичников, стволовых клетках семенников дрозофилы, показало, что имеет место одна и та же картина: белок локализуется на ядерной мембране и клеточной стенке. Т.о. найден GFP маркер, позволяющий наблюдать преобразования оболочки ядра.

ИССЛЕДОВАНИЕ СИНАПТОНЕМНЫХ КОМПЛЕКСОВ У КАРИОМОРФ И ГИБРИДОВ ГРУППЫ БАРАБИНСКИХ ХОМЯЧКОВ РОДА *CRICETULUS*

Матвеевский С.Н.¹, Коломиец О.Л.¹, Лебедев В.С.², Малыгин В.М.², Поплавская Н.С.³, Суров А.В.³

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, sergey8585@mail.ru

²МГУ им. М.В. Ломоносова

³Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН; г. Москва

Процесс видообразования млекопитающих неразрывно связан с формированием механизмов репродуктивной изоляции. Известно два альтернативных взгляда на роль хромосомных перестроек в этом процессе: первый придает решающее значение хромосомным перестройкам в видообразовании, а второй, напротив, отрицает их роль. Исследование особенностей синапсиса хромосом у гибридов между дивергирующими формами весьма целесообразно для установления механизмов репродуктивной изоляции в процессе становления видов.

Серые хомячки рода *Cricetulus* – типичные обитатели обширных степных и полупустынных районов Палеарктики. В составе рода представлены несколько видовых групп. Надвид *Cricetulus barabensis* sensu lato включает 3 близкородственные формы (полувида): барабинский хомячок *C. b. barabensis* ($2n=20$, $NF=38$), китайский хомячок *C. b. griseus* ($2n=22$, $NF=38$), забайкальский хомячок *C. b. pseudogriseus* ($2n=24$, $NF=38$). Кариотипы этих хомячков различаются по одной или двум робертсоновским транслокациям. Таксономический статус форм неоднозначен, иногда их рассматривают в качестве отдельных видов (Малыгин и др., 1992; Громов, Ембаева, 1995). Экспериментальная гибридизация показала, что гибридные особи оказались плодовитыми в разных комбинациях прямых и возвратных скрещиваний (Поплавская, 2009).

В настоящем исследовании предпринято изучение механизмов репродуктивной изоляции *C. b. barabensis*, *C. b. pseudogriseus* и *C. b. griseus*. Синапсис хромосом *C. b. griseus* детально описан ранее (Moses et al., 1977; Dresser, Moses, 1980). Нами впервые исследованы синаптонемные комплексы (СК) сперматоцитов родительской формы *C. b. pseudogriseus*, гибридов *C. b. pseudogriseus* (♀) x *C. b. griseus* (♂) ($2n=23$) и *C. b. griseus* (♀) x *C. b. barabensis* (♂) ($2n=21$). В ядрах *C. b. pseudogriseus* на стадии средней зиготены синапсис аутосом инициируется в теломерных участках и не завершен полностью (сформированы только 4-5 СК-бивалентов), уже на этой стадии половой бивалент выселен на периферию ядра, между вытянутыми осевыми элементами хромосом X и Y сформирован короткий фрагмент СК. На стадии пахитены все 11 аутосомных СК полностью сформированы. Между половыми X и Y хромосомами СК формируется в

псевдоаутосомном районе, длина которого значительно варьирует на разных стадиях пахитены. X- и Y-оси, как правило, неравномерно утолщены, неспаренный участок X хромосомы окутан электронноплотным облаком. Согласно классификации Moses et al. (1977), половой бивалент *C. b. pseudogriseus* на стадии средней пахитены по своему строению соответствует классу IIa *C. b. griseus*.

В сперматоцитах плодового гибрида *C. b. pseudogriseus* × *C. b. griseus* на стадии зиготены так же, как и у родительских форм синапсис начинается в теломерных зонах хромосом. На стадии пахитены сформированы, как и ожидалось, 9 СК-бивалентов, один СК-тривалент (образован метацентриком №3 и двумя акроцентриками) и половой бивалент. Уже на стадии ранней пахитены СК-тривалент полностью синаптирован, в зоне коротких плеч акроцентриков имеется протяженный СК. Согласно ранее принятой терминологии (Коломиец и др., 1985) такой тривалент принято называть «быстрым». Половой бивалент гибрида имеет типичные для родительских форм признаки: смещение к периферии ядра, протяженный СК в псевдоаутосомном районе, неравномерно утолщенные неспаренные участки. Однако есть некоторые особенности: в районах утолщений обеих осей выявляются петли, в ряде ядер на стадии поздней пахитены наблюдаются сильно утолщенные униваленты X и Y хромосом. Согласно классификации Moses et al. (1977), выявлены все классы (I-III) половых бивалентов, принятой для *C. b. griseus*. Нами внесены дополнения в известную классификацию: появление многочисленных отростков на неспаренных осях половых хромосом (класс IIb); преждевременный десинапсис X и Y хромосом; удлинение и «разветвление» осей-унивалентов (класс III); фрагментация осей, сегменты разной длины с многочисленными отростками разбросаны на большей площади ядра, чем на предыдущих стадиях (класс III⁺).

В пахитенных ядрах сперматоцитов плодового гибрида *C. b. griseus* × *C. b. barabensis* 8 СК-бивалентов, 1 СК-тривалент и один половой бивалент.

В сперматоцитах обоих гибридов на стадии профазы I мейоза нет нарушений синапсиса хромосом, т.е. отсутствуют предпосылки для будущего ареста данных клеток. Этот факт позволяет утверждать, что между формами нет существенных хромосомных различий, которые могли бы лежать в основе репродуктивной изоляции. Т.о., электронно-микроскопическое изучение СК гибридов позволило сделать вывод о том, что *C. b. barabensis*, *C. b. griseus* и *C. b. pseudogriseus* имеют незначительные кариотипические различия и на данном этапе находятся на начальной стадии видового обособления (in status nascendi). Вероятно, более корректным было бы рассматривать *C. b. griseus* и *C. b. pseudogriseus* не как самостоятельные виды, а как кариологические формы барабинского хомячка *Cricetulus barabensis*.

ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ *IN ORGANELLO* И *IN VIVO*

Милешина Д.В.¹, Кулинченко М.В.¹, Клименко Е.С.¹, Катышев А.И.¹, Шмаков В.Н.¹, Черникова В.В.¹, Лактионов П.П.², Ибрагим Н.³, Вебер-Лотфи Ф.³, Диетриш А.³, Константинов Ю.М.¹

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия
yukon@sifibr.irk.ru

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

³Институт молекулярной биологии растений НЦНИ, г. Страсбург, Франция

Поразительная уникальность организации митохондриального генома высших растений остается до настоящего времени, во многом, загадочным феноменом. Митохондриальные геномы разных видов растений очень существенно различаются по своему размеру, варьируя от 300 до 2400 т.п.н. В составе митохондриального генома растений обнаруживается ДНК ядерного, хлоропластного, вирусного и неизвестного происхождения, что, в целом, может составлять значительную часть генома органелл. Помимо высокомолекулярной ДНК митохондриальный геном включает также видоспецифические наборы кольцевых и линейных плазмид, генетические функции которых остаются малоизученными. Весьма вероятными предпосылками формирования структуры митохондриальных геномов растений в их современном виде может быть (1) обнаруженный нами природный механизм активного поглощения («импорта») ДНК этими органеллами (Константинов и др. 1988, 1989; Koulintchenko et al., 2003, 2006; Weber-Lotfi et al., 2009; Mileshina et al., 2011; Ibrahim et al., 2011), (2) толерантность митохондриального генома к включению ДНК чужеродного происхождения, (3) высокая рекомбиногенная активность геномов этих органелл. Получено достаточно много экспериментальных данных в пользу широкой распространенности горизонтального переноса генов в митохондриях растений (Bergthorsson et al., 2003; Won, Renner, 2003; Bergthorsson et al., 2004; Davis, Wurdack, 2004; Nickrent, Blarer A., 2004). Особенно детально изучен горизонтальный перенос генов, происходящий с участием митохондрий растения-хозяина и растения-паразита (Davis et al., 2005; Barkman et al., 2007). На основе собственных и полученных другими исследователями данных мы выдвигаем гипотезу о молекулярном механизме горизонтального переноса генов в растительных митохондриях. Основу этого механизма, по нашему мнению, составляет энергозависимый трансмембранный перенос молекул ДНК, названный «природной компетентностью митохондрий к поглощению ДНК»

(Koulintchenko et al., 2006). При этом импорт ДНК в митохондрии является обратимым процессом (Клименко и соавт. 2011). Для выяснения биологической роли этого механизма и с целью его реконструкции *in vivo* мы исследовали перенос трансгенов в растительные митохондрии в системах *in organello* и *in vivo*. Установлено, что как генетические конструкции на основе линейных митохондриальных плазмид кукурузы и турнепса, так и бактериальные векторные плазмиды в системе изолированных митохондрий *Solanum tuberosum*, *Zea mays* и *Nicotiana tabacum* способны проникать во внутреннее пространство органелл и служить матрицей для синтеза мРНК и ДНК. При использовании в качестве фланкирующих последовательностей для трансгена (фрагмент гена *gfp*) гомологичных резидентной мтДНК фрагментов размером около 500 н.п. происходит эффективная интеграция трансгена в митохондриальную хромосому путем гомологической рекомбинации (Mileshina et al., 2011). Для решения задачи селекции клеток, несущих трансгенные митохондрии, нами использована векторная конструкция с интегративными свойствами, включающая модифицированный вариант митохондриального гена *cob* табака, кодирующий устойчивость к антибиотику антимицину А (Катышев и соавт., 2010). Путем трансформации митохондрий *Nicotiana tabacum* этой конструкцией биобаллистическим методом с использованием в качестве объекта листовых высечек и каллусной культуры клеток получено несколько каллусных линий, демонстрирующих устойчивый рост на среде с антимицином А и салицилгидроксамовой кислотой в отличие от контрольных нетрансформированных линий (Катышев и соавт., 2010). Безусловно, феномен горизонтального переноса генов в митохондрии растений требует еще дальнейших интенсивных молекулярно-биологических исследований, но уже сейчас ясно, что он может служить основой для разработки технологии эффективной генетической трансформации митохондрий для решения задач молекулярной биологии, генетики, биотехнологии, селекции и биомедицины. Обнаруженные в митохондриях многих видов высших растений кольцевые и, в особенности, линейные плазмиды, с одной стороны, являются удобным инструментом для изучения трансмембранного переноса ДНК, а с другой, могут служить основой для конструирования митохондриальных векторов репликативного и интегративного типа. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№№ 09-04-00992, 12-04-01400), Президиума РАН (проект ФНМ-16) и Интеграционного проекта СО РАН (проект № 58).

СТРУКТУРА ПРЕРЫВИСТЫХ ТЕЛОМЕР В КЛЕТКАХ БУРОЗУБКИ ИБЕРИЙСКОЙ

Минина Ю.М.¹, Карамышева Т.В.¹, Рубцов Н.Б.¹, Драскович И.², Лондоно-Валеджо А.²,
Жданова Н.С.¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия, minina_jul@bionet.nsc.ru

²Институт Кюри, Париж, Франция

Теломеры млекопитающих представляют собой защитные структуры на концах линейных хромосом, состоящие из теломерных повторов ТТАГГГ на отстающей в ходе репликации нити ДНК и белкового защитного комплекса shelterin, обеспечивающего функционирование теломер. Длина теломер в хромосомах млекопитающих, как правило, варьирует от 5 до 25 т.п.н. Исключением являются теломеры в хромосомах лабораторной мыши, которые могут достигать до 80 т.п.н. Ранее мы показали, что бурозубка иберийская (*Sorex granarius*, Eulipotyphla), обладает необычными теломерами, значительно отличающимися от теломер других видов млекопитающих по размеру, структуре и локализации. На коротких плечах всех 32-х акроцентрических хромосом локализованы длинные теломеры размером, в среднем, 213 т.п.н. А на длинных плечах всех акроцентриков и 4-х метацентриков локализованы короткие теломеры размером около 3,8 т.п.н. Оказалось, что длинные теломеры бурозубки иберийской наряду с теломерной содержат рДНК. Детальное изучение этих районов хромосом с помощью FISH на вытянутых фибриллах показало, что рибосомные повторы перемежаются с теломерными по крайней мере в части длинных теломер. Такие прерывистые теломеры, когда канонические теломерные повторы разделены вставками из других повторов, были описаны ранее только у неплацентарных млекопитающих.

Для дальнейшего исследования морфофункциональных особенностей длинных теломер бурозубки иберийской мы изучили транскрипцию теломерных и рибосомных последовательностей в этих районах. До недавнего времени считалось, что теломеры являются транскрипционно неактивными районами. Однако оказалось, что теломерные последовательности транскрибируются, причем преимущественно с Ц-обогащенной нити в клетках изученных видов млекопитающих. Проведя РНК-FISH с однонитевыми пробами, выявляющими теломерную РНК, мы установили, что в клетках бурозубки иберийской теломерная РНК синтезируется как с Ц-обогащенной, так и с Г-обогащенной нити.

Ранее мы показали, что после окрашивания хромосом бурозубки иберийской нитратом серебра выявляются 32 потенциально активных ЯО района на коротких плечах всех акроцентриков. Однако оставалось неясным, все ли рибосомные последовательности

или только их часть активны в этих районах. FISH с PNA-пробой к теломерным последовательностям и иммунодетекция транскрипционного фактора рДНК UBF (upstream binding factor) в интерфазных ядрах показала, что 60% теломерных кластеров контактируют с UBF. При совместной локализации теломерной ДНК и компонента ядрышка белка B23 так же продемонстрировано, что только часть теломерных кластеров имеет контакт с ядрышками. Полученные данные позволяют предположить, что не все рибосомные последовательности в длинных теломерах активны, а с ядрышком ассоциированы в основном те теломерные районы, где рибосомные гены активны.

Ранее было показано, что геномы высших эукариот организованы в ДНК-петлевые домены, которые могут представлять собой отдельные репликоны, а также играть важную роль в процессе транскрипции. На препаратах ядерных «гало» бурозубки иберийской мы выявили особенности доменной организации теломерного гетерохроматина, которая принципиально отличается от таковой у других видов млекопитающих. FISH с пробами к теломерной и рибосомной ДНК показала, что длинные теломеры формируют три вида ДНК-петель, выступающих в «гало»: петли с плотными сигналами от пробы к теломерной ДНК, петли с сигналами от рДНК пробы и петли, содержащие оба вида сигналов. Помимо петель, выступающих в «гало», теломерные и рибосомные последовательности были локализованы в основании петель, в месте прикрепления к ядерному матриксу. Полагают, что активно транскрибируемые последовательности ассоциированы с ядерным матриксом, тогда как неактивные гены локализованы в петлях «гало».

Таким образом, длинные теломеры бурозубки иберийской содержат как минимум часть транскрипционно активных теломерных и рибосомных кластеров. Возможно, особенности структуры гетерохроматина и транскрипционной активности теломерных районов обусловлены структурой прерывистых теломер бурозубки иберийской.

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРЕДПОСЫЛОК ПРАВИЛЬНОГО РАСХОЖДЕНИЯ ХРОМОСОМ В МЕЙОЗЕ У РЖИ *SECALE CEREALE* L

Михайлова Е.И.

Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им Н.И. Вавилова РАН, Кафедра генетики и селекции Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Elena.Mikhailova@paloma.spbu.ru

Использование оригинальной «Петергофской» коллекции мейотических мутантов ржи *S. cereale* L. в молекулярно-биологических экспериментах позволило выявить элементы консервативности и специфичности в реализации генетического контроля этапов мейоза, являющихся у ржи необходимыми предпосылками правильного расхождения хромосом. К числу таких этапов отнесены: кластеризация теломерных и центромерных доменов хромосом, рекомбинация, сборка СК.

- Консервативность рекомбиногенных белков Rad51 и Dmc1, гомологичных двум доменам одного белка RecA кишечной палочки *Escherichia coli*, позволила нам амплифицировать и клонировать фрагменты ортологичных генов ржи, а консервативность устройства эпитопов этих белков - применить методы иммуноцитохимии и локализовать их с использованием антител к ортологичным белкам томатов на хроматине в мейозе у ржи дикого типа и у двух ее синаптических мутантов: асинаптика sy9 и десинаптика sy10.
- Успешность иммуноцитохимической локализации белков синапсиса Asy1 и Zyp1 у ржи с использованием антител к ортологичным белкам арабидопсиса свидетельствует в пользу консервативности третичной структуры этих белков в районах эпитопов у отдельных представителей покрытосеменных растений, относящихся к разным классам, а именно к классам однодольных и двудольных.
- Предложена гипотеза о взаимозависимости отдельных ключевых событий мейоза у ржи: кластеризация теломерных и центромерных доменов хромосом, а также правильная конденсация хромосом в ядрах микроспороцитов ржи на стадиях предмейотической интерфазы-профазы I, обеспечивают успешное осуществление ранних событий рекомбинации. События, связанные с инициацией и успешностью сборки линейных треков белка Asy1, являются определяющими для завершения рекомбинации, но не для ее инициации. Сборка трехполосой структуры СК также необходима для завершения рекомбинации и обеспечивается белком отличным от Zyp1.

Экспериментальным обоснованием предложенной концепции являются следующие результаты.

У ржи, как и у пшеницы, кластеризация теломерных доменов хромосом приурочена к переходу от предмейотической интерфазы к мейозу и происходит раньше, по сравнению с другими видами (например кукурузой), у которых она ассоциируется с началом синапсиса. Более того, формирование «раннего кластера» указанных доменов у ржи не является обязательной предпосылкой регулярного синапсиса, поскольку оно не нарушено ни у асинаптического мутанта *sy9*, ни у десинаптического мутанта *sy10*.

Продукт гена *SY9* участвует в сборке линейных трактов белка *Asy1*. Мутация *sy9* нарушает этот процесс, но не сопровождается нарушениями ни в формировании «раннего кластера», ни в образовании промежуточных продуктов рекомбинации, связанных с участием рекомбиногенных белков *Rad51/Dmc1*. С другой стороны, дефект «раннего кластера» и сопряженный с этим блок рекомбинации на этапе взаимодействия ДНК с белками *Rad51* и *Dmc1* не сопряжены с нарушением сборки линейных трактов белка *Asy1*. Об этом свидетельствует сборка протяженных осей, образованных белком *Asy1*, а также отсутствие иммуноцитохимического сигнала, соответствующего белкам *Rad51* и *Dmc1*, у асинаптического мутанта *sy1*. Выявленный нами эпистаз гена *SY9*, над геном *SY1*, свидетельствует в пользу того, что ген *SY9* действует в мейозе раньше, чем *SY1*, что, в свою очередь, явно указывает на независимость ранних событий рекомбинации на уровне ДНК от начальных этапов синапсиса.

Сборка белков *Asy1* и *Zyp1* на осях мейотических хромосом начинается у ржи до формирования «ранних кластеров», то есть в предмейотической интерфазе, с образования обособленных друг от друга точечных дисперсных центров, которые преобразуются в ранней профазе I в обособленные друг от друга линейные тракты. Характер сборки белков *Asy1* и *Zyp1* на осях мейотических хромосом отличает рожь от арабидопсиса, риса и кукурузы.

Белки *Asy1* и *Zyp1* в избытке присутствуют на мейотических хромосомах у мутанта *sy10*, образуя двухполосые линейные треки. При этом сборка СК осуществляется индискриминантным образом, то есть имеются переключения с гомологичного партнера спаривания хромосом на негомологичный, а в рекомбинацию вовлечены как гомологичные хромосомы, так и негомологичные. Ген *SY10*, по-видимому, кодирует белок, необходимый для соединения двухполосых треков *Asy1Zyp1* в трехполосую структуру СК. Роль этого белка может заключаться в завершении рекомбинации по гомологичному и/или негомологичному сценарию.

КАРИОТИПИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПИЯВОК ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ

Натяганова А.В., Кайгородова И.А., Сороковикова Н.В.

Лимнологический институт, СО РАН, г. Иркутск, avn61@mail.ru

Хромосомные комплексы пиявок (Annelida: Hirudinida) представляют собой активно эволюционирующие признаки. Ещё в начале XX в. выявлены видоспецифические морфологические и количественные особенности кариотипов пиявок, на основе которых построена схема эволюции их хромосомных комплексов (Wendrowsky, 1928). Анализируя хромосомные наборы 12 видов пиявок, В. Вендровский выделил исходное диплоидное значение ($2n = 16$) и предположил, что механизмами преобразований хромосомных чисел могли быть полиплоидия, полисомия и фрагментация. К настоящему времени у 20 исследованных морских и пресноводных видов выявилась картина межвидовой дифференциации по диплоидным значениям ($2n$ варьирует от 12 до 32), согласующаяся с различиями в морфологических характеристиках, в частности, по окраске, имеющей таксономическое значение. Это обстоятельство позволило предложить несколько иную схему эволюции хромосомных комплексов в подклассе Hirudinida (Cichocka, Bielecki, 2008). С помощью методов молекулярной цитогенетики показано, что Робертсоновские транслокации также были преобразующими механизмами в эволюции хромосом у пиявок (Vitturi et al., 2002).

В данной работе впервые предпринята попытка кариологического изучения пиявок, обитающих в различных водоёмах Восточной Сибири, в том числе и в озере Байкал. Кариотипический анализ проведён пока на пяти видах - представителях двух отряда и трёх семейств (Табл.). С учётом наших данных, видно, что диплоидные значения в подклассе Hirudinida варьируют в более широких пределах: от 12 до 38. Из таблицы видно, что хромосомные числа у пиявок из Восточной Сибири могут различаться как у видов из разных родов (как у *T. maculosum* и *H. stagnalis*), так и у видов из одного рода (как у *B. torquata* и *B. cottidarum*). Интересно отметить, что диплоидные значения представителей отряда Rhynchobdellea значительно превышают таковые у представителей Arhynchobdellea. Важной особенностью изученных хромосомных комплексов являются добавочные В-хромосомы, которые в виде плотных круглых телец или точек, встречались на метафазных пластинках. Хейке Салемаа (Salemaa, 1986, 1988), наблюдавший В-хромосомы у рачков-бокoplавов, предположил, что эти генетически инертные элементы «индуцируют внутри и межпопуляционную дифференциацию и постепенные кариотипические изменения». Возможно, небольшие различия в диплоидных значениях у видов пиявок одного рода обусловлены именно этим механизмом. Проведённый нами молекулярно-генетический

анализ четырёх образцов пиявок неопределённого видового статуса *Erpobdella* sp.1, *Erpobdella* sp.2, *Erpobdella* sp.3, *Erpobdella* sp.4 (Табл.), собранных из разных районов Восточной Сибири, показал, что все они относятся к одному виду. Тем не менее, и они демонстрируют различия в морфологии хромосомных бивалентов, отражая внутривидовые межпопуляционные вариации в рекомбинационных параметрах.

Таблица

Хромосомные числа некоторых видов пиявок из Восточной Сибири

SUBCLASS HIRUDINIDA (ПИЯВКИ)	Локализация (район сбора)	2n
Order RHYNCHOBDELLEA (глоточные, хоботковые)		
<u>Family GLOSSIPHONIIDAE</u>		
<i>Theromyzon maculosum</i> (Rathke, 1862)	Р.Кударейка - приток р. Ангара	38
<i>Helobdella stagnalis</i> (Linnaeus, 1758)	Малое море - оз. Байкал	36
<u>Family PISCICOLIDAE</u>		
<i>Baicalobdella torquata</i> (Grube, 1871)	Южный Байкал, паразит амфипод	32
<i>Baicalobdella cottidarum</i> Dogiel, 1957	Южный Байкал, паразит бычковых рыб	34
Order ARHYNCHOBDELLEA (челюстные, безхоботковые)		
<u>Family ERPOBDELLIDAE</u>		
<i>Erpobdella</i> sp.1	Чивыркуйский залив, горяч.источник	22
<i>Erpobdella</i> sp.2	Р. Лена	22
<i>Erpobdella</i> sp.3	Р. Кударейка - приток р. Ангара.	22
<i>Erpobdella</i> sp.4	Р. Ангара (г.Иркутск)	22

Исследование частично профинансировано грантами:

РФФИ № 11-04 -01394-а; РФФИ № 11-04 – 90452 – Укр.; РФФИ № 12 – 04 -10007-к.

ДЕТЕРМИНАЦИЯ ПОЛА У ПТИЦ. РОЛЬ РЕТИНОИДНОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ВСТУПЛЕНИИ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК В МЕЙОЗ

Некрасова А.А., Трухина А.В., Конева Н.Д., Лукина Н.А., Смирнов А.Ф.

Санкт-Петербургский государственный университет, г. С-Петербург, smirnovaf@bio.pu.ru

У птиц, в отличие от млекопитающих, гетерогаметная комбинация половых хромосом Z и W ассоциирована с женским полом (ZW), в то время как гомогаметная - с мужским (ZZ). Существуют также другие существенные различия между птицами и млекопитающими в молекулярных механизмах детерминации пола. В частности, у птиц отсутствует ген SRY, определяющий развитие семенников у млекопитающих. В то же время детерминация пола у птиц остается в значительной степени неясной и основные полоопределяющие гены до настоящего времени не определены. Представляет существенный интерес вопрос о механизмах инициации мейоза у птиц и млекопитающих и причинах одновременного вступления мужских и женских половых клеток (ПК) в мейоз, а также о роли в этом процессе ретиноидной кислоты (РК). У курицы - наиболее полно изученного представителя класса птиц - мейоз в женских ПК начинается во второй половине эмбрионального развития (с 14-х суток эмбриогенеза), в то время как в мужских гонадах на этой стадии развития присутствуют лишь сперматогонии и вступление мужских ПК в мейоз у курицы наблюдается лишь после вылупления. В пользу индукции мейоза сигналами, поступающими от окружающих соматических тканей гонад, свидетельствуют данные о влиянии РК на мейоз половых клеток у мышей. Аналогичный вывод был сделан при исследовании вступления в мейоз ПК курицы в условиях культивирования фрагментов яичника *in vitro* на протяжении 6 суток в присутствии РК.

С целью подтверждения роли РК в индукции мейоза у птиц нами было проведено исследование влияния на мейоз РК при ее введении куриным эмбрионам на разных сроках эмбрионального развития. Исследовали вступление ПК в мейоз у куриных эмбрионов и 21-суточных цыплят после введения РК в инкубируемые яйца на 9-е или 14-е сутки инкубации. Показано, что время появления и количество ооцитов на стадии прелептотены профазы мейоза существенно не отличалось у контрольных и экспериментальных самок на 17-е и 19-е сутки эмбриогенеза. У 17- и 19-суточных эмбрионов самцов после введения РК в гонадах также наблюдались ПК на стадии прелептотены в отличие от контрольных животных. Однако следующие стадии профазы мейоза выявлены не были, в то время как у самок того же возраста уже присутствовали ооциты на стадии зиготены. В цитоплазме ПК у контрольных и экспериментальных эмбрионов обоих полов обнаружен мейотический маркер -- белок синаптонемного комплекса SCP3 -- который не был выявлен у контрольных

самцов на 17-е сутки эмбрионального развития. В семенниках у контрольных и экспериментальных 20-суточных цыплят отсутствовали ПК в мейозе. Полученные результаты свидетельствуют о том, что кратковременное воздействие РК может индуцировать вступление мужских ПК в прелептотену профазы мейоза у птиц, однако дальнейших мейотических преобразований хромосом не происходит. Можно полагать, что РК включена в регуляцию вступления в мейоз ПК как у млекопитающих, так и птиц, однако очевидно, что существуют и другие факторы, возможно, характерные для самих ПК и зависящие от генетического пола эмбрионов, которые и определяют направление дифференциации ПК. Не исключено, что у птиц, как и у млекопитающих, в контроле гаметогенеза определенную роль играют продукты генов FGF9, DMRT1, а также гены регуляторы клеточного цикла. Эти предположения следует уточнить применительно к птицам.

ВОЗМОЖНАЯ СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ И ОНКСУПРЕССОРА P53 С РАЗВИТИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА (ХЛЛ)

Овсеян В.А., Росин В.А., Загоскина Т.П.

ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА», vovseryan@mail.ru

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) – опухолевое заболевание системы крови с выраженной клинико-эпидемиологической гетерогенностью и вариабельностью прогноза и ответа на терапию. В последнее время в качестве возможного фактора, влияющего на возникновение и прогрессирование злокачественных новообразований, включая лейкозы, все большее внимание привлекают конституциональные особенности генома, в частности, функционально значимый полиморфизм гена онкосупрессора p53 и некоторых генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков. Имеется ряд данных, свидетельствующих о возможной роли однонуклеотидных полиморфизмов *G199C (Arg72Pro)*, *A2455G (Ile462Val)* и *A1578G (Ile105Val)* соответственно генов p53, цитохрома P4501A1 (CYP1A1) и глутатион-S-трансфераз μ 1 (GSTP1), а также делеционных («нулевых») полиморфизмов генов глутатион-S-трансфераз μ 1 (GSTM1) и θ 1 (GSTT1) в развитии и прогрессировании некоторых форм солидных опухолей и гемобластозов. В то же время патогенетическое значение указанных полиморфизмов при ХЛЛ мало изучено, имеющиеся же сведения носят противоречивый характер.

Целью настоящего исследования явилось изучение возможной ассоциации между заболеваемостью ХЛЛ и полиморфизмом генов *TP53*, *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* и *GSTP1*.

В обсервационную группу были включены 153 больных ХЛЛ в возрасте от 35 до 91 года (медиана - 63 года). Группу сравнения составили 203 практически здоровых добровольцев в возрасте от 46 до 78 лет (медиана - 56). Все обследованные являлись жителями Кировской области. Материалом для исследования полиморфизма послужила ДНК, выделенная из лейкоцитов венозной крови больных ХЛЛ. Анализ «нулевого» (0) полиморфизма генов *GSTM1* и *GSTT1* проводили методом мультиплексной ПЦР. Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов *A2455G (Ile462Val)*, *A1578G (Ile105Val)* и *G199C (Arg72Pro)* соответственно в генах *CYP1A1*, *GSTP1* и *TP53* выполняли методом ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Достоверность различий в распределении полиморфных вариантов анализируемых генов в сравниваемых группах определяли с помощью критерия χ^2 или точного критерия Фишера, когда в группе сравнения было менее 5 наблюдений. Силу ассоциации разных генотипов с риском развития заболевания оценивали по показателю отношения шансов (OR).

Моноклусный (раздельный) анализ частот встречаемости полиморфных вариантов генов *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* и *TP53* среди больных ХЛЛ и здоровых лиц позволил выявить статистически значимое межгрупповое различие только в отношении полиморфных вариантов гена *GSTP1*, связанных с заменой *Ile>Val* в 105 кодоне. Установлено статистически значимое преобладание встречаемости гомозигот по мажорному (полноценному) аллелю *GSTP1*105Ile* среди здоровых индивидуумов над таковой у больных ХЛЛ (34,0% против 45,8% у здоровых лиц, $\chi^2=5,05$, $p=0,02$). При этом гомозиготы по минорному (непоноценному) аллелю *GSTP1*105Val* достоверно превалировали среди больных по сравнению группой здоровых индивидов (10,8% у здоровых лиц против 19% у больных, $\chi^2=4,68$, $p=0,03$). Из анализа отношения шансов следует, что генотип *GSTP*105IleIle* ассоциируется с пониженным риском развития ХЛЛ (OR=0,62, 95% CI=0,40-0,94) и соответственно с протективным эффектом в отношении развития заболевания. В то время как гомозиготное носительство функционально неполноценного аллеля *GSTP1*105Val* ассоциировалось с повышенным риском развития ХЛЛ (OR=1,92, 95% CI=1,06-3,05).

Билокусный анализ выявил несколько двухгенотипных сочетаний с участием полиморфных вариантов гена *GSTP1*, достоверно различающихся по распространенности в группах больных и здоровых индивидов. Так, совместное носительство генотипов *CYP1A1*462IleIle* и *GSTP1*105IleIle* встречалось значимо чаще среди здоровых лиц по сравнению с группой больных (27,5% против 40,8% контрольной группы, $\chi^2=6,24$, $p<0,05$) и ассоциировалось с пониженным риском развития ХЛЛ (OR=0,55, 95% CI=0,34-0,88; $p<0,05$). В то же время зарегистрировано преобладание распространенности сочетания генотипов *GSTP1*105ValVal* и *GSTT1*00* среди больных над таковой у здоровых лиц (0,9% против 5,3% у больных, $p<0,05$) и повышенный риск болезни у носителей такого сочетания (OR=5,54; 95% CI=1,16-26,5; $p<0,05$). Значительно чаще встречалось у больных по сравнению с контрольной группой (1,7% против 10,3% у больных, $\chi^2=8,0$; $p<0,01$) и ассоциировалось с повышенным риском заболевания также совместное носительство генотипов *GSTP1*105ValVal* и *TP53*72ArgPro* (OR=5,35, 95% CI=1,48-19,37; $p<0,01$).

Таким образом, проведенные исследования показали, что раздельное носительство генотипов *GSTP1*105IleIle* и *GSTP1*105ValVal* соответственно препятствует и способствует риску развития ХЛЛ. Совместное носительство функционально неполноценных генотипов *GSTP1*105ValVal* и *GSTT1*00*, а также генотипов *GSTP1*105ValVal* и *TP53*72ArgPro* связаны с повышенным риском заболевания. Напротив, совместное носительство генотипов *CYP1A1*462IleIle* и *GSTP1*105IleIle* снижает риск развития ХЛЛ.

ВОЗМОЖНОСТИ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ГЕНОМНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ В ИДЕНТИФИКАЦИИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРИЧИН ОСТАНОВКИ ВНУТРИУТРОБНОГО РАЗВИТИЯ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА

Олюшина Д.И.¹, Скрыбин Н.А.², Саженова Е.А.², Толмачёва Е.Н.², Лебедев И.Н.²

¹Томский государственный университет, г. Томск, dasha_150291@mail.ru

²ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН, г. Томск

Наибольшее количество репродуктивных потерь регистрируется в первом триместре беременности и значительная их часть связана с числовыми аномалиями кариотипа (Кулешов, 1979; Назаренко, 1993; Лебедев и др., 2003). Однако детальная характеристика числа и спектра хромосомных аномалий затруднена сложностью культивирования тканей внутриутробно погибших зародышей, следовательно, значительная их часть остается с невыясненным кариотипом. Данная проблема частично решается использованием FISH метода с центромеро-специфичными ДНК-зондами, который не требует культивирования. Однако исследования с помощью данного метода также ограничены, поскольку спектр регистрируемых аномалий определяется набором используемых ДНК-зондов. В настоящем исследовании был применен метод сравнительной геномной гибридизации (Comparative Genomic Hybridization, CGH), который также не требует культивирования исследуемых тканей, однако позволяет в рамках одного эксперимента выявить все числовые и несбалансированные хромосомные aberrации.

Целью исследования явилось изучение спектра и частоты несбалансированных хромосомных аномалий в тканях внутриутробно погибших зародышей с низкой пролиферативной активностью.

Из архива лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики СО РАМН был отобран материал, полученный от 6 женщин с привычным невынашиванием беременности (три и более спонтанных аборта). Объектом исследования являлись либо экстраэмбриональная мезодерма, либо цитотрофобласт хориона спонтанных абортусов I триместра беременности, клетки которых не удалось культивировать в ходе стандартного цитогенетического исследования. Низкая пролиферативная активность клеток абортусов *in vitro* исключила возможность получения хромосомных препаратов. Использование CGH в подобных исследованиях обосновано тем, что метод не требует приготовления препаратов метафазных хромосом из исследуемой ткани, то есть не зависит от процесса культивирования клеток и связанных с ним артефактов.

Среди 6 проанализированных образцов аномалии были обнаружены в 4 случаях: *ish cgh enh(16),enh(3)(p)*; *ish cgh enh(16)*; *ish cgh enh(19)*; *ish cgh enh(17),enh(20)*. Трисомия 16

была отмечена дважды, данная аномалия встречается у 6-10% спонтанных абортусов I триместра беременности и составляет около 30% всех трисомий, регистрируемых в этой группе (Кашеварова, 2007; Ворсанова, 2010). В одном случае была найдена двойная трисомия (17 и 20 хромосомы). Вероятность обнаружения подобной аномалии с помощью FISH методов не высока, поэтому использование метода сравнительной геномной гибридизации обосновано еще тем, что он позволяет зарегистрировать в рамках одной реакции все числовые несбалансированные хромосомные перестройки путем сравнительного анализа числа копий ДНК в клетках тестируемой ткани и контрольного образца. Тем не менее, обнаруженные нами аномалии требуют проверки с помощью интерфазного FISH-анализа с центромеро-специфичными ДНК-зондами, поскольку необходимо учитывать высокую частоту мозаичных форм геномных мутаций среди спонтанно абортированных зародышей человека (Ворсанова и др., 2010; Lebedev, 2011). Среди всех случаев спонтанных абортусов с хромосомными аномалиями мозаицизм с использованием интерфазного FISH-анализа был обнаружен в 50,3% (Ворсанова, 2010). Ранее в работах, выполненных с применением стандартного цитогенетического анализа, также был зафиксирован достаточно высокий уровень межтканевого мозаицизма, который достигал 15% (Лебедев, Назаренко, 2001).

Отдельного внимания заслуживает факт обнаружения сегментной трисомии по короткому плечу хромосомы 3 у одного из эмбрионов, полученного от женщины с привычным невынашиванием беременности. Появление такой аберрации может быть объяснено носительством у одного из родителей сбалансированной транслокации, вовлекающей материал короткого плеча хромосомы 3, и являющейся наиболее вероятной причиной повторяющихся репродуктивных потерь.

Полученные в ходе настоящего исследования данные являются интересными и раскрывают новые возможности в исследовании цитогенетических причин внутриутробной смертности зародышей и привычного невынашивания беременности.

Проведение исследования поддержано государственным контрактом № П1161 в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг.

ИЗОЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ РОБЕРТСОНОВСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ХРОМОСОМ У ОБЫКНОВЕННОЙ БУРОЗУБКИ *SOREX ARANEUS* (MAMMALIA)

Орлов В.Н., Сычева В.Б.

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва 119071,
orlovvic@yandex.ru

Молекулярные исследования с использованием микросателлитных маркёров плеч метацентрических хромосом показали, что у обыкновенной бурозубки поток нейтральных аллелей через перестроенные Rb хромосомы и не перестроенные акроцентрические хромосомы не отличается во всех изученных до сих пор межрасовых гибридных зонах. Могут ли при этом сохраняться морфологические различия контактирующих популяций хромосомных рас и следует ли рассматривать хромосомные расы как этапы на пути видообразования? Имеющиеся в литературе сведения о морфометрических различиях хромосомных рас в зонах их контакта крайне ограничены и противоречивы.

В настоящем сообщении мы приводим данные о краниометрических различиях контактирующих популяций четырех хромосомных рас обыкновенной бурозубки (Москва, Селигер, Западная Двина и С.-Петербург), разделенных узкими гибридными зонами с гибридами комплексными гетерозиготами (RVI, CVIII-CXI) и объясняем сохранение морфологических различий рас в зоне контакта ограниченной гибридизацией.

В зонах контакта исследованы различия хромосомных рас по 12 промерам черепа у 190 бурозубок с известным кариотипом. Наш анализ выявил достоверные краниометрические различия контактирующих популяций. В районах контакта хромосомных рас популяции достоверно отличаются по некоторым коррелятивно изменяющимся признакам, характеризующим плечо (рычаг) сил сокращения основного аддуктора - височного мускула. В частности, уменьшение высоты нижней челюсти (уплощение черепа), и сближение сил сокращения челюстных аддукторов с горизонталью, компенсируется удлинением венечного отростка и смещением вниз челюстного сустава.

Мы полагаем, что морфометрические различия контактирующих хромосомных рас на Валдайской возвышенности могли сохраняться и накапливаться вследствие уменьшения доли гибридов в 2 раза по сравнению с ожидаемой при свободном скрещивании.

В зонах совместного распространения хромосомных рас с гибридами - комплексными гетерозиготами соотношение генотипов и гаплоидных наборов хромосом резко отличается от ожидаемого в соответствии с законом Харди – Вайнберга. Частота гибридов в таких зонах близка к 20% и составляет менее половины ожидаемой, а коэффициенты инбридинга превышают 0,5.

Популяции бурозубок отличаются простой демографической структурой. В летних популяциях доля сеголеток (рожденных в данном году) достигает 95%. Поэтому отмеченная нами низкая доля гибридов – комплексных гетерозигот не может быть следствием нарушения плодovitости гибридов или их пониженной постнатальной жизнеспособности. При этом нарушенное равновесие в данной генерации гибридной популяции также не может быть следствием каких-то изменений этой популяции в прошлых генерациях, поскольку в каждой генерации равновесие должно восстанавливаться (на новом уровне).

Высказано предположение, что отклонения частот генотипов и гаплоидных наборов хромосом от соотношения по Харди-Вайнбергу в гибридных зонах можно объяснить эмбриональной смертностью гибридов или, более вероятно, ассортативным скрещиванием хромосомных рас. Этологическая изоляция могла сформироваться в эволюции хромосомных рас в ответ на пониженную приспособленность гибридов.

Сделан вывод, что хромосомные расы обыкновенной бурозубки, отличающиеся по 3-5 разным Rb соединениям хромосом, можно рассматривать как частично изолированные формы, этапы на пути аллопатрического видообразования.

По мере усиления этологической изоляции и уменьшения доли гибридов гибридные зоны хромосомных рас могут стать границами самостоятельных видов. Например, уменьшение доли гибридов в 4 раза, по сравнению со свободным скрещиванием, в гибридной зоне бурозубки Бонапарта, *S. antinorii* Bon. и хромосомной расы Vaud обыкновенной бурозубки, создает изолирующий барьер как для морфологических, так и для нейтральных молекулярных признаков (Brünner et al., 2002).

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ХРОМОСОМНОЕ КАРТИРОВАНИЕ МАРКЕРНЫХ САЙТОВ ДНК - ТЕЛОМЕРНЫХ ПОВТОРОВ И ГЕНОВ rRNA - У ХРОМОСОМНО-ДИВЕРГИРОВАВШИХ ВИДОВ И ГИБРИДОВ РОДА *MICROTUS* (RODENTIA, MAMMALIA)

Павлова С.В.¹, Булатова Н.Ш.¹, Романенко С.А.², Сердюкова Н.А.²

¹Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, г. Москва, bulatova.nina@gmail.com

²Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск, rosa@mcb.nsc.ru

COMPARATIVE CHROMOSOME MAPPING OF MARKER DNA SITES - TELOMERIC REPEATS AND rRNA GENES - IN THE KARYOLOGICALLY DIVERGED SPECIES AND HYBRIDS OF THE GENUS *MICROTUS* (RODENTIA, MAMMALIA)

Pavlova S.¹, Bulatova N.¹, Romanenko S.², Serdyukova N.²

¹A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, bulatova.nina@gmail.com,

²Institute of Molecular and Cell Biology, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, rosa@mcb.nsc.ru

Эволюция кариотипа в модельной для экспериментального сравнительно-цитогенетического изучения группе грызунов, у серых полевков рода *Microtus*, сопровождается сокращением диплоидного числа за счет множественных слияний предковых хромосом. Анализ хромосомных перестроек в двух под родах (*Microtus*, *Terricola*) десятилетиями совершенствовался, по мере развития методов цитогенетического анализа, от уровня тотальной окраски хромосом вплоть до дифференциальной окраски хромосом и новых методов молекулярно-цитогенетического изучения, включая хромосомный пэинтинг (Lemskaya et al. 2010. Chromosome Res). Целью работы является выяснение особенностей эволюции кариотипа у 5 видов из двух под родов, встречающихся, в частности, на территории России. Проведено сравнительное хромосомное картирование сайтов рДНК и теломерных повторов, локализованных в районах хромосом, которые в первую очередь могут затрагиваться перестройками типа центрических, теломерных и центромерно-теломерных слияний, то есть затрагивающих концевые участки хромосом.

Распределение сайтов ДНК изучено на препаратах метафазных хромосом с применением флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). Впервые на полевках подобное исследование проведено с привлечением уникального материала по экспериментальным

межвидовым гибридам. В изученных материалах подземные полевки (подрод *Terricola*) представлены кавказским 54-хромосомным видом, *M. majori*, а обыкновенные полевки (подрод *Microtus s. str.*) 4 видами группы “*Microtus arvalis*”, включая европейские хромосомные виды-двойники (*M. arvalis*, *M. obscurus*, *M. rossiaemeridionalis*) с диплоидными числами $2n=46$ и 54 и азиатский вид *M. transcaspicus* с промежуточным диплоидным числом $2n=52$. Впервые для проведения сравнительного изучения полевок на современном уровне осуществлено культивирование клеток из тканей межвидовых гибридов ($2n = 54 \times 52$ и 54×46).

Теломерные повторы у всех исследованных полевок локализованы в теломерных участках каждой из метацентрических и акроцентрических хромосом. В отдельных случаях выявлены теломерные FISH сигналы в центромерном районе метацентрической хромосомы – в крупной аутосоме у 46-хромосомной обыкновенной полевки (*M. arvalis*) и в X-хромосоме у *M. majori*. Такой же тип распределения сигналов с выявлением интерстициальных теломерных сайтов (ITS) в метацентрической X-хромосоме и в двух крупных парах двуплечих аутосом ранее обнаружен у итальянских представителей подрода (группа *M. savii*: Gornung et al. CompCytogen. 2011), но впервые демонстрируется для обыкновенных полевок. У другого варианта 46-хромосомного кариотипа (*M. obscurus*) не выявлено ни одного ITS сигнала.

FISH сигнал рибосомальных генов присутствует во всех NOR несущих аутосомах и не выявляется в половых хромосомах этих видов. Локализация сигнала в трех больших парах у *M. obscurus* соответствует данным NOR-окраски, в то же время сигнала в 5 паре не обнаружено, хотя функционирующий ядрышковый организатор обычно выявляется при перестройке этой хромосомы из субтелоцентрика в телоцентрик при внутривидовом полиморфизме.

Обнаружение ITS в метацентрической аутосоме, одной из 5 крупных пар 46-хромосомного кариотипа, у гибрида с участием *M. arvalis* необычайно интересно. По данным G-окраски 4 крупные двуплечие пары из 5 образованы разными типами слияний – центромерно-теломерными в 3 парах и теломерно-теломерным лишь в одной из пар. Распределение теломерных проб согласуется с предположением о том, что ITS сигнал присутствует только в паре двуплечих хромосом, происходящей от теломерно-теломерного слияния. Причина отсутствия соответствующего сигнала в таких же хромосомах *M. obscurus* неясна.

Исследование поддержано грантами РФФИ, а также Грантом Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых (МК-2500.2011.4, для С.П.).

СПОСОБСТВУЮТ ЛИ ГИБРИДНЫЕ ЗОНЫ ВИДООБРАЗОВАНИЮ У ОБЫКНОВЕННОЙ БУРОЗУБКИ *SOREX ARANEUS*: О ЧЕМ СВИДЕТЕЛЬСТВУЮТ ДАННЫЕ ИЗУЧЕНИЯ МЕЙОЗА?

Павлова С.В.¹, Матвеевский С.Н.², Ацаева М.М.², Коломиец О.Л.², Булатова Н.Ш.¹

¹Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, swpavlova@mail.ru

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, sergey8585@mail.ru

CAN CHROMOSOMAL HYBRID ZONES PROMOTE SPECIATION IN THE COMMON SHREW *SOREX ARANEUS*: WHAT DOES THE STUDY OF MEIOSIS?

Pavlova S.¹, Matveevsky S.², Atsaeva M.², Kolomiets O.², Bulatova N.¹

¹A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Russian Academy of Sciences, Moscow, swpavlova@mail.ru

²N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, sergey8585@mail.ru

Возникновение структурных хромосомных перестроек, таких как Робертсоновские (Rb) транслокации и полно-плечевые обмены хромосомных плеч (WART), может приводить к нарушению архитектоники мейотического ядра, и, в конечном счете – к формированию несбалансированных гамет и репродуктивной изоляции гибридов. Наиболее информативными естественными моделями для изучения последствий хромосомных перестроек служат пограничные гибридные зоны, возникающие в группах с парапатрическим распространением видов или внутривидовых кариоформ.

Группа *Sorex araneus* является одной из наиболее внушительных по разнообразию внутривидовых хромосомных рас среди млекопитающих. На евразийском ареале вида обыкновенная бурозубка, *Sorex araneus* s. str., ныне известно более 70 парапатричных хромосомных рас, которые отличаются друг от друга наличием одной или нескольких робертсоновских (Rb) или реципрокных полноплечевых транслокаций (WART). Вне зависимости от числа перестроек, в местах контакта рас образуются различные по типу и структуре хромосомные гибридные зоны (ГЗ), и к настоящему времени обнаружено и детально изучено 17 межрасовых гибридных зон и имеются одиночные сообщения о гибридах, указывающие на еще ряд зон. Анализ кариотипических различий по перестройкам типа робертсоновских у цитогенетически хорошо обследованного вида, каким является *S. araneus*, показывает существенные преимущества перед другими типами гибридных зон, благодаря возможности точной идентификации гибридных особей.

До проведения лабораторных скрещиваний, материалом для сравнительной оценки фертильности гибридов и исходных рас в природе являются данные изучения мейоза.

При изучении ГЗ особый интерес вызывают следующие вопросы: 1. Влияют ли гибридные зоны на поток генов между хромосомными расами *S. araneus*?; 2. Фертильны ли гибриды? и 3. Существует ли репродуктивная изоляция между расами, ведущая к их дивергенции в дальнейшем? Хотя общие сведения о мейотическом поведении получены для нескольких типов гибридных комбинаций у *S. araneus*, например - СК-тривалент (СIII), СК-тетравалент (RIV) и СК-гептавалент (CVII), вопросы взаимодействия гомологов в мейозе в случае сложных гетерозигот все еще недостаточно изучены. Нами проведено комплексное иммуноцитохимическое и электронно-микроскопическое исследование СК-тетравалента у гибридов F1, впервые обнаруженных между расами Москва и Нерусса в центре Европейской России, с различиями по комбинации хромосомных плеч в 2 робертсоновских метацентриках (*gm, no - go, mn*). Согласно теоретическим ожиданиям, в пахитенных сперматоцитах выявлены семь СК-бивалентов, а также половой XY₁Y₂ тривалент, типичный для этого вида, и закрытый СК-тетравалент (*go/gm/mn/no*). В структуре прицентромерных районов осевых элементов СК-тетравалента обнаружены бреши. При иммуноокрашивании антителами γ H2AX установлено, что в сперматоцитах гибридов облако γ H2AX окутывает только район синапсиса X и Y₁ хромосом и несинаптированной утолщенной части «истинного» плеча X-хромосомы. Таким образом, выявлены признаки транскрипционной инактивации половых хромосом MSCI (*meiotic sex chromosome inactivation*), характерной для самцов млекопитающих. В структуре СК-мультивалентов у исследованных гибридов признаки транскрипционной инактивации MSUC (*meiotic silencing of unsynapsed chromatin*) не выявлены, т.к. связь хроматина с гистоном γ H2AX, даже в зоне брешей осевых элементов СК-тетравалента не обнаружена. Это позволяет предположить, что сперматоциты гибридов, прогрессируют и формируют зрелые сперматозоиды, которые выявлены в суспензии клеток семенника.

Полученные результаты согласуются с представлениями о том, что гибридизация как таковая не противоречит генетической концепции вида и, что целостность хромосомных рас *S. araneus* и структура их взаимоотношений в гибридной зоне могут быть обусловлены эволюционными, экологическими, популяционными или другими факторами, обуславливающими генетическую изоляцию этих рас.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (12-04-00937, 12-04-01283) и Гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых (МК-2500.2011.4, С.П.).

ЭВОЛЮЦИЯ КАРИОТИПА *NEOGOBIOUS GORLAP* (PISCISCES: PEERCIFORMES: GOBIIDAE)

Праздников Д.В.

Институт проблем экологии и эволюции РАН – ИПЭЭ, г. Москва, pdvfish3409@rambler.ru

Neogobius gorlap, является представителем семейства бычковых рыб Gobiidae. В семействе Gobiidae, согласно последней сводке по кариотипам рыб (Arai, 2011), к настоящему времени кариологически изучено более 80 видов бычков, примерно у 23 видов наблюдается хромосомная изменчивость. Наибольшее количество бычковых рыб, у которых обнаружен хромосомный полиморфизм, относятся к Понто-Каспийским видам. Понто-Каспийские виды бычков (реликты океана Тетис, а затем Сарматского моря), прошли сложную эволюцию в связи с неоднократной изоляцией популяций и вторичными контактами между ними. Одним из таких представителей является *Neogobius gorlap* (каспийский бычок - головач), населяющий солоноватые и пресные воды бассейна Каспийского моря и низовья реки Дон. В четырёх изученных популяциях *N. gorlap*, с использованием стандартных методик получения препаратов и окрашивания, был обнаружен хромосомный полиморфизм. Общее количество кариоморф по всем исследованным популяциям составило одиннадцать, при варьировании числа хромосом от 43 до 46 и постоянном числе хромосомных плеч – 46 (Праздников и др., в печати). Полученные данные по кариотипам из разных популяций *N. gorlap* показали особенности сложившегося хромосомного полиморфизма в каждой из них. Так, в одной популяции наблюдалось, что все кариоморфы несут в себе инвертированные участки хромосом (с наличием гетерозигот по периферическим инверсиям), в другой присутствуют особи, имеющие наряду со сложными по структуре кариотипами (мета- и субметацентрическими хромосомами), кариоморфу, которая состоит из 46 акроцентрических хромосом. Необходимо отметить, что хромосомный набор из 46 акроцентрических хромосом, принято считать предковым кариотипом для группы бычков рода *Neogobius* (*N. melanostomus*, *N. fluviatilis*, *N. gymnotrachelus* и ряд др. видов).

Если в целом оценивать хромосомную изменчивость во всех популяциях *N. gorlap*, то можно говорить о том, что полиморфизм, вероятно, обусловлен 5-6 хромосомными мутациями (Робертсоновскими транслокациями и периферическими инверсиями). Однако, рамки наблюдаемого внутривидового хромосомного полиморфизма несколько уже. Таким образом, можно отметить, что для *N. gorlap* характерен не только внутривидовой полиморфизм, но и межвидовой изменчивость кариотипов.

Наблюдаемый в настоящее время полиморфизм у *N. gorlap* отчасти связан с географической изолированностью ряда популяций, в которых происходит накопление и увеличение частоты различных хромосомных перестроек. Поэтому хромосомный полиморфизм мог возникнуть двумя путями: либо в результате хромосомной перестройки у одной или нескольких особей и распространения этой перестройки в популяции, либо в результате гибридизации кариотипически различающихся популяций.

Столь широкий хромосомный полиморфизм, характерный для *N. gorlap*, в бассейне Средиземного моря и Понто-Каспия наблюдается у небольшого числа видов бычковых рыб, среди них *Gobius paganellus*, *Neogobius gymnotrachelus*, *N. cyrius* и др. Однако размах их хромосомного полиморфизма, заметно меньше, чем у каспийского бычка – головача.

Таким образом, проведённые исследования показали, что в эволюции кариотипа *N. gorlap* хорошо прослеживается тенденция к снижению числа хромосом и формированию более сложных по структуре кариотипов.

Автор глубоко благодарен д.б.н. В.П. Васильеву и д.б.н. Е.Д. Васильевой за помощь в сборе материала и проведении исследований; сотрудникам Нижегородской лаборатории, филиала ГосНИОРХ А.А. Клевакину и Ю.В. Анучину, а также аспиранту ИПЭЭ РАН Д.А. Медведеву за помощь в сборе материала на Чебоксарском водохранилище.

Исследования кариологии и таксономии бычковых рыб проводятся при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 10-04-00339).

ОСОБЕННОСТИ ВИДООБРАЗОВАНИЯ У ИНФУЗОРИЙ КАК СЛЕДСТВИЕ МЕХАНИЗМА РЕАРАНЖИРОВКИ ИХ ГЕНОМОВ В ПОЛОВОМ ПРОЦЕССЕ

Раутиан М.С.

Санкт-Петербургский университет, Санкт-Петербург, mrautian@mail.ru

Инфузории характеризуются необычной структурой вида: выделяются хорошо очерченные «морфологические виды», каждый из которых включает морфологически неразличимые, но 100% репродуктивно изолированные внутривидовые группы, так называемые сингены. Каждый вид включает множество (часто более 10) сингенов. Особи относящиеся к разным сингенам могут встречаться в одних водоемах, но не скрещиваются ни в природе, ни в лабораторных экспериментах. Редкие межсингенные скрещивания дают нежизнеспособное потомство. Детальное исследование видовой структуры в роде *Paramecium* выявило неодинаковую степень различий между сингенами в разных морфологических видах. Например, сингены *P.aurelia* различаются по спектру изозимов, ряду молекулярных маркеров, по морфометрическим характеристикам. На этом основании им был придан ранг видов-двойников в составе комплекса видов *P.aurelia* (Sonneborn, 1975). В то же время, сингены *P.caudatum* значительно ближе друг к другу: это было показано различными методами в разных лабораториях (см., например, Hori et al., 2008). Парадокс состоит в том, что степень репродуктивной изоляции сингенов в обоих случаях одинакова и близка к 100%. Это приводит к заключению, что степень репродуктивной изоляции сингенов не коррелирует со степенью генетических различий между ними.

Другая специфическая особенность инфузорий – их ядерный гетероморфизм. Все инфузории имеют ядра двух типов: макронуклеусы (МА) и микронуклеусы (МИ). В ходе полового процесса (конъюгации) МА разрушается, и новые МА и МИ образуются из продуктов деления зиготического ядра. При развитии нового МА происходит полная реорганизация генома: элиминируется часть (иногда очень значительная, до 95% у *Stylonychia*, 98% у *Euplotes*) последовательностей ДНК, хромосомы фрагментируются; затем фрагменты *de novo* фланкируются теломерами и амплифицируются. Реаранжировка является необходимым условием жизнеспособности потомства, поскольку многие удаляемые последовательности находятся в кодирующей части генов и их точное удаление обязательно для развития функционального МА. В результате МА содержит редуцированный геном в виде множества коротких «минихромосом». Поиски механизма, способного узнавать участки, которые должны быть элиминированы, осложнялись тем, что их фланги не содержат достаточно длинных консенсусных последовательностей. В настоящее время накоплено много доказательств того, что реаранжировка МА, а именно узнавание последовательностей, подлежащих удалению, находится под контролем малых ядерных РНК. Они образуются на ранних стадиях конъюгации: весь геном МИ транскрибируется двунаправленно и образовавшиеся дунитевые РНК разрезаются РНКазой, гомологичной Dicer. Затем происходит два этапа сканирования генома с

помощью этих РНК (scanRNA): пул малых РНК взаимодействует с ДНК старого МА (опосредованно через несошедшие транскрипты), находит комплементарные последовательности и связываясь с ними детерминирует их и свою деградацию. Таким образом, из всего пула сканРНК выводятся те, которые комплементарны последовательностям в старом МА. В результате остаются те сканРНК, которые соответствуют последовательностям МИ, не представленным в МА. Эта фракция сканРНК взаимодействует с ДНК развивающегося МА (через несошедшие транскрипты), помечая на удаление те последовательности, которые представлены в МИ, но отсутствовали в старом МА). Ясно, что этот механизм узнавания позволяет удалить любую вновь приобретенную МИ последовательность.

Я предлагаю гипотезу, которая позволяет связать особенности видовой структуры инфузорий и особенности организации их генома.

Предположим, что в геноме МИ произошла вставка транспозона в кодирующую часть жизненно важного гена. Поскольку МИ неактивен, такое изменение не скажется на жизнеспособности клетки. Однако, при половом процессе и формировании нового МА эта последовательность должна быть удалена. Если обе клетки, участвующие в скрещивании, содержат новую вставку, она будет удалена, описанным выше механизмом. Но если в конъюгацию вступят клетки, одна из которых содержит вставку, а другая – нет (гетеротипичная пара), у того партнера, который не имел вставки в МИ, ее элиминации не будет, поскольку в зиготическом МА вставка будет присутствовать в гетерозиготе, а в МИ и, соответственно, в пуле сканРНК этой вставки не будет и, соответственно, она не может быть удалена. Если гетерозигота не жизнеспособна или имеет сниженную жизнеспособность, то до половины потомков такого скрещивания погибнет. Если же гетерозигота жизнеспособна, то во втором поколении погибнет от $\frac{1}{4}$ до $\frac{3}{4}$ потомства. Таким образом, против гетеротипичных пар (пар, где один партнер несет новую вставку, а другой – нет) будет действовать мощный вектор отбора. Соответственно, любые мутации, препятствующие образованию гетеротипичных пар, будут поддержаны отбором. В результате могут возникнуть репродуктивно изолированные группы – сингены, которые затем, уже после возникновения нескрещиваемости могут дивергировать дальше, накапливая генетические различия.

Постулируемый механизм образования сингенов имеет ряд неожиданных следствий. Во-первых, жесткость репродуктивной изоляции не зависит от уровня генетических различий, поскольку последние являются не причиной, а следствием уже возникшей изоляции. Во-вторых, изоляция возникает только симпатрически, т.к. для ее возникновения необходимо образование гетеротипичных пар. В-третьих, механизм эффективен для перекрестно размножающихся видов, т.к. при самооплодотворении нет гетеротипичных пар.

Работа поддержана грантом РФФИ 10-04-01188а

ДЕФИЦИТ ГИСТОНОВ ЯДРА В ПРОФАЗЕ-МЕТАФАЗЕ, КАК ГЛАВНАЯ ПРИЧИНА ПРЕВРАЩЕНИЯ ХРОМОНЕМНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА В ХРОМОСОМНУЮ В ТО ВРЕМЯ КАК ВОСПОЛНЕНИЕ ГИСТОНОВ ХРОМОСОМ В АНАФАЗЕ-ТЕЛОФАЗЕ ОПРЕДЕЛЯЕТ ОБРАТНЫЙ ПРОЦЕСС ПРЕВРАЩЕНИЯ ХРОМОСОМ В ХРОМОНЕМЫ

Рафаилов А.М., Рафаилова М.А.

Северо-восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, г. Якутск,
archinay@mail.ru

Предложено объяснение причин загадочного до настоящего времени явления превращения хроматина в хромосомы и обратно в хроматин в течение хромосомного цикла. Классическая хромонемная организация хроматина наблюдается в G₁ периоде интерфазы. Каждая бывшая хромосома представлена одной длинной хроматиновой нитью с диаметром 11 нм. Она в свою очередь состоит из плотно прилежащих друг к другу нуклеосом. Каждая нуклеосома состоит из гистоновой сердцевинки (core), на которую накручен участок ДНК из 146 пар нуклеотидов, называемых коровыми. Такую нуклеосому называют минимальной. Сердцевина имеет форму диска и представляет октамер из четырех пар гистонов, H2A, H2B, H3, H4. Такой октагистоновый диск (ОГД) состоит из двух тетрагистоновых дисков (ТГД), каждый из которых включает по одному из четырех разновидностей указанных гистонов. Полная нуклеосома включает также соединительный (линкерный) участок ДНК, с помощью которого соседние нуклеосомы соединены между собой. С линкером взаимодействует гистон H1. Благодаря ему «бусины» нуклеосом притягиваются плотно друг к другу, образуя сплошную нить с одинаковым диаметром на всем протяжении хромонемы.

В G₁ периоде интерфазы каждая минимальная нуклеосома состоит из двуцепочечной молекулы коровой ДНК и октагистонового диска, т.е. соотношение цепей ДНК (с) и тетрагистоновых дисков октамера составляет 2:2 (2с : 2 ТГД). Из соотношения видно, что на каждую цепь коровой ДНК нуклеосомы количественно приходится по одному тетрагистоновому диску.

В течение S периода интерфазы происходит почти полное удвоение ДНК хромосом, но количество гистонов в ядре остается на прежнем уровне, поскольку предназначенные для дочерних цепей ДНК новые гистоны начинают активно синтезироваться в цитоплазме только в G₂ периоде интерфазы. Новые гистоны надежно изолированы от удвоенной ДНК нуклеосом ядерной мембраной, которая препятствует массивному проникновению гистонов в ядро. Поэтому в ядре после репликации возникает отношение ДНК : гистон

равное $4c : 2ТГД$, т.е. возникает дефицит гистонов. При этом количественно число гистонов ядра остается достаточным только для связывания со старыми цепями ДНК, как было до репликации. Гистоны для новых цепей должны синтезироваться в цитоплазме и транспортироваться в ядро через поры. На это необходимо время и достаточное количество крупных пор. Дефицит гистонов в ядре сохраняется на протяжении G_2 периода интерфазы, профазы, премегафазы, т.е. до тех пор пока активному транспорту новых гистонов препятствует ядерная оболочка. Дефицит сохраняется частично даже в метафазе, ввиду медленного слияния вязких по консистенции цитоплазмы и нуклеоплазмы, также ограничивающих быстрое взаимодействие новых гистонов с ДНК и гистонами старых тетрагистоновых дисков ядра.

Как известно, именно в профазе-премегафазе клеточного деления происходит спирализация и конденсация хроматина и формирование хромосом. Следовательно, явление спирализации и конденсации хроматина в хромосомы является свойством дефицитного по гистонам хроматина, т.е. хроматина с соотношением $4c : 2ТГД$ на удвоенную хромосому или $2c : 1ТГД$ на одну сестринскую хроматиду.

Активное формирование полноценных октагистоновых дисков нуклеосом за счет новых гистонов начинается с анафазы. При этом тетрагистоновые диски, получая дополнительный комплект тетрагистонов, H_2A , H_2B , H_3 , H_4 , превращаются в октагистоновые. В дочерних хромосомах, т.е. в бывших сестринских хроматидах с соотношением $2 : 1$, в местах образования октагистоновых дисков происходит формирование участков полноценного хроматина с соотношением $2 : 2$. В таких участках хромосомы подвергаются процессам деконденсации и деспирализации с образованием участков нитевидного хроматина. На протяжении анафазы-телофазы хромосомы постепенно разрыхляются, хромосомная организация перестает существовать и исчезает из поля зрения светового микроскопа. Это определяется полным устранением дефицита гистонов в хроматине и восстановлением октагистоновой структуры к началу G_1 периода. Т.о., явление спирализации и конденсации в хромосомы является естественным процессом, присущим дефицитному по гистонам хроматину с соотношением ДНК : гистон равным $2c : 1ТГД$. Для полноценного хроматина с соотношением $2c : 2ТГД$ характерна хромонемная организация.

ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМОВ И ХРОМОСОМНЫХ НАБОРОВ ЗЛАКОВ

Родионов А.В., Коцера В.В., Ким Е.С., Носов Н.Н., Пунина Е.О.

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

На первый взгляд, кариотипы злаков удивительно консервативны – у большинства видов злаков основное число хромосом в кариотипе (x) равно 7, в том числе у всех 500 видов *Triticeae*. Однако в некоторых систематических группах x иное: у *Bambusoideae*, *Oryzoideae* и *Arundoideae* чаще всего $x=12$, а для *Eragrostideae* и *Panicoideae* обычны $x=9$ и 10 (Hilu, 2004). Число хромосом в кариотипе может варьировать от $2n=4$ (*Colpodium versicolor*) до $2n=265$ (*Poa litorosa*) – оба вида, между прочим, относятся к одной трибе – Мятликовые. У некоторых видов этот показатель ($2n$) необычно вариабелен, так, например, у обычно апомиктически размножающихся мятликов *P. alpa* $2n=63$, но около 5-10% растений этого вида – потомство от факультативно происходящих скрещиваний – имеет $2n=56, 60-63, 66, 70, 82-84, 90-93, 98-102, 126$ или 147 хромосом (Clausen, 1961).

Существовали две гипотезы о том, каким был геном общего предка всех злаков. Н.П. Авдулов (1931) предполагал, что общий предок злаков имел 12 пар хромосом, после чего число хромосом в ходе дивергенции таксонов снижалось в разных филогенетических ветвях – это так называемая «редукционная гипотеза». Альтернативный взгляд, получивший название «гипотезы вторичной полиплоидизации», предложен Стеббинсом (Stebbins, 1982) – по Стеббинсу в геноме общего предка злаков было 5 или 6 хромосом, а большие хромосомные числа есть результат полиплоидизации.

Экспериментально проверить эти гипотезы стало возможным только с развитием методов сравнительной геномики. Исследование полностью секвенированных геномов представителей разных филогенетических ветвей злаков (Salse et al., 2009; Murat et al. 2010) показало, что обе гипотезы оказались верными: сначала общий предок всех злаков имел $n=5$, затем, еще на стадии общего предка всех злаков, произошла полиплоидизация генома протозлака и появился кариотип с $n=10$, после чего, за счет транслокации между 2-мя парами хромосом, возникли две новые группы сцепления и n стало 12. Затем, 50-60 млн. лет назад, злаки разделились на две ветви – кладу ВЕР (к ней относятся рис, пшеница, коротконожка) и кладу РАССАД, к которой относятся сорго и кукуруза. В кладе ВЕР геном с 12 хромосомами сохранился у риса, у пшеницы – 7 хромосом, у коротконожки (*Brachypodium*) – 5 пар. В кладе РАССАД число хромосом в геноме сначала уменьшилось до 10 за счет транслокации – такой геном сохранился у сорго, а в линии кукурузы около 5 млн лет назад произошла полиплоидизация ($n=20$), после чего, вторичная диплоидизация до $n=10$.

Используя сочетание методов молекулярной филогении и молекулярной цитогенетики, мы исследовали происхождение уникальных кариотипов у злаков с сильно редуцированным числом хромосом в геноме, изучили, происходила ли редукция числа хромосом в кариотипе у злаков до 2, 5, 6 независимо, или это характерно только для злаков одной или нескольких филогенетических ветвей, а также исследовали происхождение некоторых полиплоидных видов, и, в частности, происхождение рекордсменов по числу хромосом среди злаков *P. cita* ($2n = \text{ок. } 96-100$), *P. chathamica* ($2n = 112$) и *P. litorosa* ($2n = \text{ок. } 265$), а также большого числа мятликов с $2n = 70$. Далее, нами показано, что редукция хромосом у злаков происходила в разных филогенетических ветвях независимо, но при этом злаки с наиболее сильно редуцированным числом хромосом в геноме *Zingeria biebersteiniana* и *Colpodium versicolor* ($n=2$), традиционно относимые систематиками к двум разным, хотя и близким трибам, в действительности, близкие родственники. Был обнаружен и злак, который относится к этой же филогенетической ветви, но у которого сохранилось основное число хромосом 7, характерное для большинства представителей подсемейства Настоящих злаков. Использование GISH показало, что недавние предки *Z. biebersteiniana*, *C. versicolor* и какой-то неизвестный или не существующий сейчас, но близкий к *C. versicolor* вид вступали в межвидовую (межродовую) гибридизацию в результате которой появились аллополиплоидные виды *Z. pisidica* ($2n=8$) и *Z. kochii* ($2n=12$). После формирования гибридного генома часть последовательностей одного из родителей, в частности, рДНК одного из родителей, терялась – по-видимому, терминальная стадия процесса ядрышкового доминирования. Интересно и важно, что в интерфазном ядре у аллотетраплоида *Z. pisidica* родительские геномы пространственно разобщены и находятся в разных районах интерфазного ядра. У аллогексаплоида *Z. kochii* явление менее выражено, но также наблюдается. Компарментализация родительских геномов в интерфазе у аллополиплоидов – новое явление для интерфазной цитогенетики, механизмы которого требуют специального исследования и обсуждения.

У двуххромосомного злака *Z. biebersteiniana* с помощью воздействия холодом (наши данные) и 7-аминоакридином (данные О.В. Муравенко, Т.Е. Саматадзе и А.В. Зеленина) можно выявить сегментацию хромосом, внешне похожую на G-исчерченность хромосом млекопитающих. G-подобный рисунок контрастен, но нестабилен (изменчив) – даже однозначно разложить две пары хромосом попарно трудно. При этом после Q-окрашивания плечи хромосом флуоресцируют равномерно. Не может ли G-подобная исчерченность хромосом цингерии быть индикатором особенностей их скэффолда, следствием недавнего происхождения этих хромосом в результате хромосомных слияний?

ХРОМОСОМНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ В ОТРЯДЕ ГРЫЗУНОВ

*Романенко С.А.¹, Лемская Н.А.¹, Беклемишева В.Р.¹, Гладких О.Л.¹, Сердюкова Н.А.¹,
Перельман П.Л.¹, Трифонов В.А.¹, Фергюсон-Смит М.А.², Янг Ф.³, Графодатский А.С.¹*

¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, gosa@mcb.nsc.ru

²Центр ветеринарии, Кэмбридж, Великобритания

³Институт Сэнгера, Кэмбридж, Великобритания

В настоящее время изучение кладогенетических событий проводится учеными на разных объектах и различными методами. Отряд грызунов (Rodentia) представляет собой одну из наиболее удачных моделей для исследования процессов, сопровождавших формирование современных видов, на хромосомном уровне.

Грызуны являются самым многочисленным отрядом среди млекопитающих и объединяют около 42% ныне живущих видов, кариотипы которых существенно различаются по таким характеристикам, как значение диплоидных чисел хромосом, число плеч хромосом, количество и распределение блоков гетерохроматина, наличие/отсутствие В-хромосом и пр. На данный момент для каждого из пяти подотрядов, выделяемых в таксоне, определены вероятные скорости преобразований кариотипов и основные типы перестроек хромосом. Однако филогенетические отношения внутри отряда даже на уровне крупных таксонов до сих пор однозначно не установлены.

Выделение подотряда Sciuromorpha (белкообразные) в качестве базального ответвления от ствола грызунов подтверждается современными молекулярными данными. Наличие общих синтений хромосом человека сближает белкообразных с представителями отряда Lagomorpha (зайцеобразные) и также подтверждает базальное положение подотряда на древе грызунов. Кариотипы белкообразных достаточно консервативны, но характеризуются существенными вариациями по количеству и распределению блоков гетерохроматина.

Филогенетические позиции остальных подотрядов остаются спорными, а степень исследования отношений между видами внутри более мелких таксонов различна.

К настоящему времени из подотрядов Anomaluromorpha и Castorimorpha современными молекулярно-цитогенетическими методами исследовано только по одному представителю, и полученные результаты позволяют предположить более высокие по сравнению с белкообразными темпы реорганизации геномов в этих группах. Данные для представителей подотряда Hystricomorpha крайне скудны.

Подотряд Muomorpha (мышьеобразные грызуны) вовлечен в сравнительные исследования наиболее полно. Невозможность использования набора пэйнтинг-проб

человека для изучения кариотипов мышеобразных грызунов накладывает существенные ограничения на дальнейшее сравнение полученных результатов с результатами, полученными для других подотрядов. Изучение кариотипов представителей подотряда *Muomorpha* ведется преимущественно с использованием пэйнтинг-проб домовой мыши у представителей семейства *Muridae* (мышиные) и с использованием пэйнтинг-проб золотистого хомячка у представителей подсемейства *Cricetidae* (хомяковые).

На основании полученных данных и в совокупности с ранее опубликованными результатами нами реконструирован предковый кариотип надсемейства *Muroidea* (АМК), с $2n=52$. Предложена наиболее вероятная последовательность перестроек хромосом, которая привела к образованию кариотипов современных представителей таксона.

Установлено, что кариотипическая эволюция от АМК до предковых кариотипов семейств *Muridae* и *Cricetidae* сопровождалась низким числом перестроек хромосом, однако позже в некоторых ветвях произошло существенное увеличение скорости фиксации перестроек. Так, внутри подсемейства *Arvicolinae* (полевковые: *Cricetidae*) определены виды, кариотипы которых, по данным пэйнтинга, идентичны кариотипу предка всего подсемейства: *Clethrionomys rutilus*, *Chionomys gud*, *Ondatra zibethicus* и др. В то же время только внутри рода *Microtus* кариотипы различных видов характеризуются значительными различиями, вызванными преимущественно перестройками Робертсоновского типа. Подобная ситуация обнаружена в родах *Ellobius* (*Arvicolinae*), *Phodopus* (*Cricetinae*), *Mus* (*Murinae*).

Изучение хромосом видов из ключевых семейств грызунов в экспериментах по сравнительному хромосомному пэйнтингу позволило проследить эволюцию кариотипов на уровне низких таксонов (отдельных родов, подсемейств) и отчасти на уровне таксонов более высокого ранга. Сейчас не вызывает сомнения, что грызуны представляют собой сильно дивергировавшую группу с высоко реорганизованными геномами, однако не выявлено единой тенденции, определившей формирование кариотипов современных представителей отряда. Информация о различных скоростях преобразований геномов (от крайне низких у белкообразных до невероятно высоких у некоторых мышеобразных) позволяет предположить наличие различных механизмов, детерминировавших процесс кладогенеза у грызунов.

Исследование частично поддержано грантами РФФИ, исследовательским проектом СО РАН “Молекулярная и клеточная биология”, Интеграционной программой СО РАН.

В-ХРОМОСОМЫ ВОСТОЧНОАЗИАТСКОЙ МЫШИ *APODEMUS PENINSULAE* (RODENTIA) ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА: ИЗМЕНЧИВОСТЬ, МОЗАИЦИЗМ И МОРФОТИПЫ

Рослик Г.В., Картавцева И.В.

Биолого-почвенный институт ДВО РАН, г. Владивосток, roslik_g@mail.ru

Теоретическая ценность исследований кариотипов животных с добавочными (В-) хромосомами важна для понимания существования и роли «лишней» ДНК в организме исследуемого вида. Восточноазиатская мышь *Apodemus peninsulae* Thomas, 1906 является уникальным модельным объектом исследования добавочных хромосом млекопитающих. Во-первых, в ее кариотипах, помимо 48 акроцентрических хромосом основного набора, выявлена сложная система В-хромосом (Kartavtseva, Roslik, 2004). При этом числовые вариации В-хромосом имеют пределы: от 0 до 30 – в популяциях Сибири (Борисов и др., 2010) и от 0 до 7 – в популяциях Дальнего Востока России (Рослик, Картавцева, 2009). Во-вторых, В-хромосомы *A. peninsulae* отличаются наибольшим разнообразием морфотипов, в сравнении с другими млекопитающими. Так, для этого вида описаны вариации В-хромосом по размерам - от макро хромосом, несколько превышающих первую пару аутосом (Kartavtseva et al., 2000), до едва видимых точечных микро В-хромосом (Волобуев, 1979; Раджабли, Борисов, 1979) и разнообразие по морфологии – от мета- до акроцентрической. В-третьих, для *A. peninsulae* характерен внутритканевой мозаицизм (варьирование числа хромосом в клетках одной особи) по В-хромосомам. Животные со стабильным кариотипом имеют один клон клеток, а особи-мозаики - два или более.

Ранее нами были изучены разные уровни числовой изменчивости В-хромосом этого вида в популяциях Дальнего Востока России – меж- и внутрипопуляционный, а также внутрииндивидуальный (мозаицизм) и показаны: преимущественная встречаемость особей-мозаиков. Причем, отмечено непостоянство в разных выборках частоты встречаемости животных с В-хромосомами равно как и особей-мозаиков. Также были отмечены более широкие спектры изменчивости числа В-хромосом у особей-мозаиков (от 0 до 7), по сравнению с животными со стабильным кариотипом (от 0 до 4) (Рослик, Картавцева, 2009).

В продолжение работы нами исследован полиморфизм морфотипов В-хромосом в природных популяциях восточноазиатской мыши *Apodemus peninsulae* (n = 367) Дальнего Востока России. По размерным и морфологическим параметрам выделено 6 групп морфотипов В-хромосом. На основе их сочетаний выявлено 78 клеточных клонов, 23 из которых обнаружены у животных со стабильным кариотипом и 76 – у особей-мозаиков. Особи-мозаики также имели более многообразные и уникальные сочетания морфотипов В-

хромосом. Между географическими и локальными популяциями не найдено различий по исследованным характеристикам. Однородный состав ДНК В-хромосом этого вида на территории Дальнего Востока России, показанный ранее методами FISH-анализа (Rubtsov et al., 2004) позволил объединить числовые и размерные данные для каждого клона клеток, введя условное «количество массы» (индекс mB) В-хромосом (Рослик, Картавцева, 2011). Предположена ведущая роль естественного отбора в формировании «критической» массы добавочных хромосом у особей со стабильным кариотипом и ослабление его роли – у особей-мозаиков. Дальнейшее изучение индекса массы В-хромосом, вероятно, может оказаться перспективным в исследовании механизма возникновения «критической» массы хромосом этого вида.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМОСОМ В-ГЕНОМА И ЭВОЛЮЦИЯ АЛЛОПОЛИПЛОИДНЫХ ПШЕНИЦ

Салина Е.А.¹, Сергеева Е.М.¹, Добровольская О.Б.¹, Адонина И.Г.¹, Щербань А.Б.¹, Шалуб Б.², Сурдий П.², Бернард М.²

¹Институт цитологии и генетики Российской академии наук, Новосибирск 630090,
salina@bionet.nsc.ru

²Национальный институт сельскохозяйственных исследований Франции, Клермонт-
Ферранд 63100, Франция

Можно выделить три ключевых периода, которые сопровождалась существенной реорганизацией В-гена пшеницы и его предшественника. Первый период - с момента расхождения диплоидных видов *Triticum* and *Aegilops* от общего предшественника (2.5-6 млн лет назад) до образования тетраплоида *T. dicoccoides* (около 500 тыс. лет назад). Существенные геномные перестройки у диплоидного предшественника В-гена – *Ae. speltoides* (геном SS) были связаны с высоким уровнем амплификации повторяющихся последовательностей ДНК, приведшим к увеличению числа гетерохроматиновых блоков на хромосомах относительно других диплоидных видов *Aegilops* and *Triticum*. Проведенный нами анализ показал, что в этот период наиболее интенсивно амплифицировали повторы *Spelt1*, происходила пролиферация ряда мобильных элементов, в том числе геном-специфичных элементов *gypsy* LTR-retrotransposon *Fatima* and *CASPA* DNA-transposon *Caspar*. Второй ключевой период в эволюции В генома приходится на момент образования тетраплоида (геном ВВАА) и его последующей эволюции. Третье важное событие, приведшее в очередной раз к реорганизации В-гена, произошло сравнительно недавно 7000-9500 лет при образовании гексаплоидной пшеницы с геномной формулой ВВААDD. В процессе эволюции В/S генома имели место межгеномные и внутригеномные транслокации и инверсии хромосом. В настоящий момент описано 5 транслокаций и других перестроек, в которые были вовлечены хромосомы В генома. Основные реорганизационные события происходили при образовании и эволюции тетраплоидных форм. Проведенное нами картирование хромосом S-гена и сравнение с хромосомными картами В-гена показало, что отдельные перестройки происходили еще у *Ae. speltoides* - диплоидного предшественника В-гена.

Более детальное изучение реорганизации хромосом В генома в процессе образования и эволюции аллополиплоидного ядра пшеницы станет возможным после завершения проекта по секвенированию генома пшеницы, в котором за нашей группой исследователей закреплена хромосома 5В. Данная хромосома имеет протяженность около 870 млн.п.н.

(5BL = 580 млн.п.н. и 5BS = 290 млн.п.н.). В настоящий момент на хромосоме 5B локализовано более 30 генов, контролирующих ряд морфологических и количественных признаков, устойчивость к абиотическим и биотическим факторам внешней среды и поведение хромосом в мейозе. Транслокации и инверсии хромосомы 5B\5S, которые могли бы иметь место в процессе эволюции *Ae. speltoides* и аллополиплоидных пшениц, на настоящий момент нами не выявлены методами генетического картирования. В то же на хромосоме 5B, в силу пока неизвестных механизмов, произошли изменения, приведшие к образованию локуса *Ph1*, без которого правильное прохождение процессов митоза и мейоза невозможно в аллополиплоидном ядре. Изучение первичной структуры ген-обогащенных районов хромосомы 5B является предметом дальнейших исследований.

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ХРОМОСОМ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Саматадзе Т.Е.^{1,2}, Амосова А.В.¹, Земцова Л.В., Суслина С.Н.², Быков В.А.^{2,3}, Зеленин А.В.¹,
Муравенко О.В.¹

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва,
tsamatadze@gmail.com

²Российский университет дружбы народов, Москва

³Всероссийский институт лекарственных и ароматических растений, Москва

В настоящее время большое значение приобретает поиск перспективных форм лекарственных растений с высоким содержанием биологически активных веществ и выведение новых сортов. Применение современных цитогенетических методов хромосомного анализа для исследования ценных лекарственных растений дает возможность находить наиболее простые и эффективные пути их селекции. При исследовании хромосом был применен комплексный подход, разработанный для изучения мелкохромосомных видов растений (Муравенко, Зеленин, 2009).

Проведено сравнительное цитогенетическое изучение трех видов маклеи: сердцевидной *M. cordata* (Willd.) R. Br. ($2n=20$), мелкоплодной - *Makleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde ($2n=20$), кьюской - *Makleaya kewensis* Turrill ($2n=20$), двух форм тетраплоидной ромашки естественного и искусственного происхождения: аптечной - *Matricaria chamomilla* L. (= syn. *Matricaria recutita* L.) сорт Подмосковная ($2n=36$) и непахучей или трехреберник непахучий - *Matricaria inodora* L. ($2n=36$), а также 13 сортов рапса (*Brassica napus* L.) российской и белорусской селекции.

Выявлено, что в кариотипе у *M. kewensis* обычно наблюдаются более крупные прицентромерные С-бэнды, чем у кариотипов *M. cordata* и *M. microcarpa*. Теломерные интеркалярные и прилегающие к вторичным перетяжкам С-бэнды были высокополиморфными у всех трех видов маклеи. FISH-метод выявил сходное расположение сайтов 5S рДНК в хромосомах маклеи у всех трех видов. Сайт 5S рДНК локализован в середине длинного плеча хромосомы 4. Крупного размера сайт 26S локализован в области вторичной перетяжки хромосомы 1 у всех трех видов маклеи, среднего размера сайт 26S локализован на 6-спутничной хромосоме в кариотипах *M. microcarpa* и *M. kewensis*. Установлено высокое превышение содержания С-ГХ в профазных ядрах у донецкой формы маклеи по сравнению с московской формой. Сравнительное исследование показало, что кариотипы *M. microcarpa* и *M. kewensis* больше схожи между собой, чем с *M. cordata*. Анализ мейотических хромосом свидетельствует о генетической стабильности геномов маклеи.

Рисунки DAPI/С бэндинга в кариотипах у видов ромашек подтвердили автополиплоидное происхождение видов, однако были обнаружены незначительные различия в рисунке 2, 6 и 7 гомологичных хромосом в двух M^{ch} -геномах кариотипа сорта

Подмосковная. FISH-анализ выявил сходное расположение сигналов 26S рДНК в районах вторичных перетяжек на 4 парах ядрышкообразующих хромосом 8, 9 и 17, 18 в геномах ромашек. Минорных сайтов 26S рДНК не обнаружено. На 4 парах спутничных хромосом выявлена колоколизация 26S рДНК с 5S рДНК. Дополнительно выявлены минорные сайты 5S рДНК в теломерной части коротких плеч субметацентрических 7 и 16 хромосомы. В геноме *M. inodora* сайты 26S рДНК и 5S рДНК колоколизированы в области вторичной перетяжки 4 спутничных хромосом в обоих субгеномах вида. Минорных сайтов 26S рДНК и 5S рДНК не обнаружено. Выявлено, что у тетраплоидных форм ромашки мейоз происходит в основном по «диплоидному» типу, а незначительное число нарушений нормального расхождения хромосом в анафазе не оказывало существенного влияния на фертильность пыльцы.

Изучение рисунков С-дифференциального окрашивания хромосом рапса позволило провести их идентификацию и разделить их на 4 группы в соответствии с положением центромеры. У озимых сортов рапса как российской, так и белорусской селекции на 3 и 6 парах хромосом локализован более крупный прицентромерный гетерохроматин в группе метацентрических хромосом, 8, 10, 11 в группе субметацентрических, 15, 17, 18 для субтелоцентрических хромосомах 14-18 и на 19 телоцентрической хромосоме. У яровых сортов гетерохроматин крупного размера был локализован на 2 и 11 хромосоме, а также на 19 телоцентрической хромосоме, которая легко идентифицируется. По рисунку С-окраски выявлены межсортовые различия в кариотипах всех сортов рапса. FISH-анализ показал, что сайты 26S и 5S рДНК выявлялись на хромосомах в перичентромерных и терминальных районах хромосом, а также в области спутника и вторичной перетяжки на спутничных хромосомах 14 и 15. Причем наблюдались как отдельная локализация этих зондов, так и их колокализация. Наблюдался внутривидовой полиморфизм по распределению сайтов рибосомных генов. У яровых российских сортов Луговской и Грант на 16 хромосоме отсутствуют сигналы 26S рДНК, в отличие от озимых сортов Мартин и Северянин, а у ярового белорусского сорта Гермес на этой хромосоме сигнал очень маленький. У озимого сорта Северянин сигнал 26 S рДНК на этой хромосоме отличается крупными размерами. У яровых Луговской, Грант и Гермес на 10 хромосоме в теломере колокализированы сигналы 5S и 26S рДНК, что в других сортах не наблюдалось.

На основании компьютерного хромосомного анализа построены обобщенные видовые идиограммы - «хромосомный паспорт» видов с учетом всех вариантов рисунков DAPI/C - бэндинга и указанием расположения 26S и 5S рДНК для маклеи: *M. cordata*, *M. microcarpa*, *M. kewensis*, ромашек: *M. chamomilla* и *M. inodora* и рапса (*Brassica napus* L.).

Работа поддержана грантами № 11-08-00716, 12-04-90046; Программой фундаментальных исследований РАН «Динамика генофондов растений, животных и человека» и проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации ГК 16.512.11.2224; ГК 14.740.11.1376.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МИТОТИЧЕСКОГО КАРИОТИПА И КАРИОТИПА СИНАПТОНЕМНЫХ КОМПЛЕКСОВ СОБОЛЯ, *MARTES ZIBELLINA*

Сафронова Л.Д.¹, Черепанова Е.В.¹, Сергеев Е.Г.², Орлов В.Н.¹

¹Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, г. Москва,
safronova@sevin.ru

²НИИ пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева, г. Москва,
seg008@rambler.ru

ANALYSIS OF MITOTIC KARYOTYPE AND SYNAPTONEMAL COMPLEX KARYOTYPE OF THE SABLE, *MARTES ZIBELLINA*

Safronova L.D.¹, Cherepanova E.V.¹, Sergeev E.G.², Orlov V.N.¹

¹A.N. Severtzov Institute of Ecology and Evolution of Russian Academy of Science, Moscow,
safronova@sevin.ru

²V.A. Afanasiev Scientific Research Institute НИИ of fur animal and rabbit breeding, Moscow,
NIPZK, seg008@rambler.ru

Характеристики хромосом на ранней стадии деления мейоза (профаза: пахитена) в последнее время используются для кариологического описания видов наряду с традиционным изучением митотических хромосом. Электронно-микроскопический анализ синаптонемных комплексов (СК) позволяет визуализировать микроабerrации, неразличимые при световом анализе митотических хромосом. В данном сообщении впервые представлены митотический и СК-кариотип сибирского соболя *Martes zibellina*.

Митотический кариотип соболя включает 36 аутосом и половые хромосомы ($2n=38$, $NFa=66$). Аутосомный набор хромосом, по классификации Орлова и Малыгина (1969), состоит из 5 пар метацентриков, 10 пар субметацентриков и 3 пар акроцентриков. Первые четыре пары аутосом заметно крупнее других. Из них две пары метацентрических и две пары субметацентрических. Среди остальных аутосом, размеры которых плавно уменьшаются, метацентрическими являются три последние пары, №№ 16, 17 и 18, субметацентрическими - восемь пар и акроцентрическими - три пары. Хромосома X – субметацентрик среднего размера, её длина сопоставима с аутосомой № 5; хромосома Y – самый мелкий акроцентрик в кариотипе. Такой же кариотип сибирского соболя был описан ранее (Графодатский, Раджабли, 1988; Iwasa, Hosoda, 2002).

СК- кариотип у изученных особей *M. zibellina* состоит из 18 СК бивалентов аутосом, постепенно убывающих по длине, и полового бивалента (Рис. 1). Длина оси хромосомы X сопоставима по длине с СК бивалентом № 8 (ранняя пахитена) или 7 (средняя пахитена);

ось хромосомы Y в 3 раза меньше по длине чем ось хромосомы X. Оси половых хромосом у исследованных нами особей *M. zibellina* на стадии средней пахитены синаптируют практически по всей длине хромосомы Y.

Полученные результаты согласуются с данными о соотношении длин митотических аутосом *M. zibellina*. Единственное несоответствие СК-кариотипа с митотическим кариотипом - это относительная длина половых хромосом. Ось хромосомы X соответствует по длине СК 7-й пары, а длина этой хромосомы в митозе сопоставима с аутосомой 5-й пары. Несоответствие длины половых хромосом в митозе и мейозе, наблюдается и у других млекопитающих: соотношение длин СК аутосом и половых хромосом значительно меняется от ранней к поздней пахитене (Koykul, Basrur, 1995; Basheva et al., 2008; Сафронова и др., 2010).

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ДНК В ПРОЦЕССЕ СТАНОВЛЕНИЯ ТЕПЛОКРОВНЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ

Сизова Т.В.

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва, olonare@mail.ru

Изохоры - протяженные, достаточно гомогенные по GC-составу участки хромосом, тесно связанные с рядом основных биологических свойств: плотностью генов, временем начала репликации, частотами рекомбинации, распределением сайтов метилирования и мобильных генетических элементов. Они являются основой цитогенетического хромосомного бэндинга. Геномы холоднокровных позвоночных состоят из двух GC-бедных семейств изохор: L1 и L2, геномы теплокровных позвоночных включают в себя от двух до четырех GC-богатых H1, H2, H3 и H4. Показано, что при происхождении позвоночных животных GC-богатые изохоры возникли в результате увеличения состава оснований более GC-богатой изохоры холоднокровного предка. Синаптонемный комплекс - субъядерная структура, возникающая в профазе первого деления мейоза и объединяющая гомологичные хромосомы в биваленты. Молекулы ДНК гомологичных хромосом на этой стадии организованы в фибриллы хроматина, которые в виде петель прикреплены к боковым элементам СК. СКАР ДНК - семейство последовательностей геномной ДНК, лежащих в основаниях петель, обладающих рядом специфических свойств и обогащенных консервативными последовательностями. Изохорные композиционные фракции геномов человека, золотистого хомячка и цыпленка использовались в качестве зондов для ДНК-ДНК – гибридизации с последовательностями СКАР ДНК, ранее выявленными в геноме золотистого хомячка. Синаптонемные комплексы, образующиеся в ядрах сперматоцитов золотистого хомячка, являются наиболее удобными для выделения. Выявленная нами ранее эволюционная консервативность СКАР ДНК позволила использовать в качестве зондов геномную ДНК не только золотистого хомячка, но и других позвоночных. Определена плотность распределения последовательностей СКАР ДНК в разных изохорных компартаментах геномов золотистого хомячка, человека и цыпленка. Она обратно пропорциональна длинам петель ДНК, прикрепляющихся к СК. Сделан вывод о том, что в разных изохорных компартаментах геномов человека, цыпленка и золотистого хомячка длины петель ДНК, прикрепляющихся к СК, различны и изменяются сходным образом. Оценено количество генов в петлях ДНК. Предложена модель образования GC-богатых изохор в процессе становления теплокровных позвоночных, согласно которой происходило не только увеличение GC-состава, но и сокращение длин некодирующих и не значимых функционально участков ДНК, а также хромосомные перестройки, приводящие к объединению сокращающихся изохор.

МНОЖЕСТВЕННЫЕ ХРОМОСОМНЫЕ АБЕРРАЦИИ В ТКАНЯХ СОСУДОВ С АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ

Скрябин Н.А.¹, Назаренко М.С.¹, Олюшина Д.И.², Лебедев И.Н.¹

¹ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН, г. Томск, nukulay@gmail.com

²Томский государственный университет, г. Томск

В последнее время интенсивно накапливаются данные, свидетельствующие о заметном вкладе соматической мутационной изменчивости в этиологию не только злокачественных новообразований, но и пороков развития, а также моногенных и широко распространенных заболеваний человека. Все более очевидным становится тезис о том, что некоторые болезни, имеющие генетическую основу, не обязательно являются наследственными (Happle, 2009; Limaye et al., 2009; Kurek et al., 2012). Очевидно, что соматические изменения могут быть зарегистрированы на самых разнообразных уровнях структурно-функциональной организации генома, и могут быть представлены генными, хромосомными и геномными мутациями, а также aberrантными эпигенетическими модификациями. Однако структура соматической мутационной изменчивости при различных формах патологий пока остается неясной.

Наиболее частой причиной инвалидизации и смертности населения являются сердечно-сосудистые заболевания, в основе патогенеза большинства из которых лежит атеросклероз. Атеросклероз – это системное хроническое заболевание, поражающее сосуды эластического и мышечно-эластического типа (крупные артерии). Проявляется данное заболевание липидной инфильтрацией стенки сосудов и разрастанием в ней соединительной ткани, что приводит к появлению атеросклеротических бляшек. На настоящий момент проводится достаточно много исследований в области молекулярной генетики атеросклероза, в то же время наблюдается значительный дефицит знаний о цитогенетических особенностях развития данного патологического процесса. В литературе имеются отдельные данные о хромосомных aberrациях в тканях сосудов с атеросклеротическими изменениями, полученные с использованием методов классической цитогенетики (Vanni et al., 1990; Casalone et al., 1991) и FISH-метода (Maturri et al., 2001). В настоящей работе впервые был использован метод сравнительной геномной гибридизации (CGH), особенностью которого является полногеномный анализ всех числовых и структурных несбалансированных хромосомных аномалий. Также к достоинствам данного метода можно отнести то, что он не требует культивирования исследуемых клеток, что исключает появления артефактов, связанных с процессом культивирования.

Материал для исследования был получен у трех индивидов с атеросклерозом: два образца атеросклеротических бляшек (сонная артерия и аорта) и два образца макроскопически неизмененных сосудов (сонная артерия и общая подкожная вена). У одного индивида были получены парные образцы сонной артерии, один из которых был с атеросклеротическими изменениями, второй образец был представлен сосудистой стенкой без макроскопических изменений. Мечение тестируемой и референсной ДНК осуществляли методом ник-трансляции. Гибридизация меченных ДНК-библиотек на метафазных препаратах, полученных из лимфоцитов периферической крови здорового индивида мужского пола, проводилась с супрессией 50-кратным избытком C_{0t-1} ДНК. Для компьютерной обработки полученных данных использовался программный продукт «CGHView» («Applied Spectral Imaging», США) с опцией «CGH высокого разрешения» (High Resolution CGH, HR-CGH).

В образце, полученном из общей подкожной вены, цитогенетических аномалий обнаружено не было. В макроскопически неизменной сонной артерии была выявлена одна амплификация (ish cgh amp(22)(q13)). Напротив, в образцах атеросклеротических бляшек были выявлены множественные хромосомные aberrации. В ткани аорты цитогенетические аномалии были представлены амплификациями (n=14): ish cgh amp(1)(p36.1), amp(2)(p21), amp(4)(p12p15.1), amp(7)(p21p22)(q21q31), amp(11)(p11.2p15)(q12q14), amp(11)(q22q23), amp(15)(q21q23), amp(16)(q12.1q22), amp(17)(q23q24), amp(19)(p13.1p13.3)(q13.1q13.3), amp(21)(q21q22), в то время как в сонной артерии с атеросклеротическими изменениями были выявлены делеции (n=14): ish cgh del(1)(p21p22), del(2)(q14.1q14.2)(q32q33), del(3)(p23p24)(q24q26.1), del(4)(p15.1p15.2)(q21q22)(q31.1q31.3), del(5)(q13q23), del(6)(q16q26), del(7)(q31q35), del(9)(q32q33), del(10)(q25), del(13)(q21).

Исходя из полученных первых данных, можно высказать предположение о заметной роли соматических хромосомных aberrаций в патогенезе атеросклероза. Однако пока остается открытым вопрос о превалировании определенных типов аномалий в различных сосудах. В дальнейшем нами планируется более детальное исследование данного вопроса на большей выборке с использованием биологических микрочипов (array-CGH).

Настоящее исследование поддержано грантом для коллективов научно-образовательных центров ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 гг» (соглашение № 12.740.11.0186).

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА *NANOG* ПОЛЁВКИ

Сорокин М.А., Елисафенко Е.А.

Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, antares@bionet.nsc.ru

Ген *Nanog* является одним из ключевых регуляторов плюрипотентного состояния клеток млекопитающих. В данной работе мы клонировали и секвенировали регуляторную область гена *Nanog* восточноевропейской полёвки в пределах 4.7 т.п.н. от точки старта транскрипции. Сравнение полученной последовательности с гомологичными последовательностями других видов млекопитающих показало наличие в ней трех консервативных областей, разделённых участками низкой гомологии и блоками повторов. Один консервативный участок совпадает с минимальным промотором, другой - с дистальным энхансером, и еще один имеет промежуточное положение. Для выяснения связи транскрипции *Nanog* полёвки с CpG-метилированием ДНК мы изучили метилирование в трех типах *Nanog*-негативных клеток экстраэмбриональных и эмбриональной линий. Область минимального промотора *Nanog* имеет средний уровень метилирования (~ 50%) во всех изученных клетках. Единственный в исследуемом районе CpG-островок, расположенный в первом интроне, гиперметилирован (70-90%) в клетках экстраэмбриональных линий, но не в клетках эмбриональной линии. Потенциальные сайты связывания транскрипционных факторов были картированы в регуляторной области *Nanog* полёвки. После сопоставления всех полученных данных регуляторная область была разделена на участки, трансактивирующую способность которых затем изучили методом репортёрных конструкций. Минимальный промотор *Nanog* полёвки демонстрирует трансактивирующую способность независимую от статуса плюрипотентности клетки. В то же время более дистальные области, включая область энхансера, специфично усиливают транскрипцию только в плюрипотентных клетках.

ДИНАМИКА УПАКОВКИ ПРОТЯЖЕННЫХ УЧАСТКОВ ХРОМАТИНА В ЯДРАХ СПЕРМАТОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В ПРОФАЗЕ I МЕЙОЗА

Спангенберг В.Е., Коломиец О.Л., Дадашев С.Я., Богданов Ю.Ф.

Институт общей генетики им Н.И. Вавилова РАН, Москва, vspangenberg@gmail.com

Ранее нами проведено исследование динамики изменения петли хроматина в профазе I мейоза с помощью метода FISH с использованием RA11-зонда к участку хромосомы 17 человека, длиной 160 т.п.н. Исследование было проведено на препаратах распластанных ядер сперматоцитов. Синаптонемный комплекс (СК) идентифицировали с помощью антител к мажорному белку СК - SCP3.

Впервые было установлено, что по мере продвижения клеток от зиготены к диплотены, участок хроматина, выявленный с помощью FISH, постепенно меняет свою конфигурацию (Богданов и др., 2012). На ранних стадиях профазы I мейоза этот участок хроматина имеет глобулярную структуру, позже приобретает вид двух стержней, расположенных перпендикулярно или под углом к СК. Это позволяет предполагать, что на данном этапе по каждую сторону от СК лежат сплетенные вместе две петли хроматина. Однако, остается неясным сплетены вместе петли сестринских хроматид или петли двух гомологов. В пользу последнего предположения свидетельствует тот факт, что эти стержневые структуры пересекают центральное пространство (ЦП) СК. Если бы между собой были связаны петли сестринских хроматид, то стержневидные структуры, выявленные с помощью FISH, лежали бы по обе стороны от СК и не пересекали ЦП. Следует отметить, что именно такая стержневая или «палочковидная» конфигурация хроматина была описана и Pigozzi (2007) в мейоцитах курицы. Позже, начиная со стадии ранней диплотены, меченые участки хромосом разворачиваются в четыре петли, что соответствует петлям четырех хроматид мейотического бивалента.

Целью настоящего исследования было изучение динамики упаковки более длинного участка хроматина в профазе I мейоза, теоретически превышающего длину одной петли хроматина в сперматоцитах человека. Основной вопрос заключался в следующем: участок ДНК длиной 487 991 н.п. формирует одну или несколько петель хроматина? Второй вопрос: возможно ли смещение определенного участка хроматина относительно СК при изменении длины петель и длины самого СК?

В качестве ДНК-зондов были использованы три коммерческие локус-специфичные пробы ДНК к трем tandemно расположенным локусам хромосомы 1 человека, общей длиной 487 991 н.п. Зонды получены из геномной библиотеки RPCI-11 human BAC library,

Empire Genomics, США). С целью идентификации разных участков хроматина три разных зонда были конъюгированы с разными флуорохромами.

На препаратах распластанных ядер сперматоцитов человека было выявлено три гибридационных сигнала, расположенных тандемно в пределах одной петли хроматина хромосомы 1. Нами были обнаружены как сжатые глобулярные хроматиновые структуры, так и длинные развернутые участки меченого хроматина.

Следует подчеркнуть, что при исследовании участка хромосомы 17, идентифицированного с помощью относительно короткого зонда 160кб (RAI1), наблюдалась связь меченого участка хроматина с СК. При использовании длинного зонда к трем тандемно расположенным участкам хромосомы 1, нами получены результаты, свидетельствующие о том, что выбранный участок ДНК лежит в составе длинной петли хроматина (одной, если рассматривать одну хроматиду) на некотором расстоянии от области её прикрепления к СК.

Богданов Ю.Ф., Спангенберг В.Е., Дадашев С.Я., Витязева И.И., Боголюбов С.В., Коломиец О.Л. 2012. Морфологическое проявление в профазе I мейоза человека уникального сегмента ДНК// Цитология. 54 (8): 603-608.

Pigozzi M.I. 2007. Localization of single-copy sequences on chicken synaptonemal complex spreads using fluorescence in situ hybridization (FISH)// Cytogenet. Genome Res. 119 (1-2): 105-112.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 10-04-00666-а

МАКРОЭВОЛЮЦИОННАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ЭУКАРИОТ. ПАРАМЕТРЫ ЭВОЛЮЦИОННО ЛАБИЛЬНОГО И ЭВОЛЮЦИОННО КОНСЕРВАТИВНОГО ВИДОВОГО ГЕНОМА

Стегний В.Н.

Томский государственный университет, г. Томск, stegniy@res.tsu.ru

Изучение генетических аспектов видообразования и адаптации, проводимое мной около 40 лет позволило выявить ряд генетических параметров, различающих виды, эволюционно лабильные (генераторы видообразования) и виды, эволюционно консервативные (терминальные звенья филогенетических цепей). Подобное разделение видов оценивалось на основе реконструкции филогенеза видовых комплексов в основном по фиксированным хромосомным инверсиям (единственно надежного подхода при анализе направления видообразования). Эволюционно лабильные виды (стволовые) биологи относят к малоспециализированным, а эволюционно консервативные – к высокоспециализированным, что имеет доказательную базу и соответствует правилу Э. Копа (1896) о мало- (или) неспециализированных предках и правилу Ш. Депере (1876) о возрастающей специализации в ходе адаптивной эволюции таксона. Первые виды порождают кластеры дочерних, среди которых образуются широко адаптированные (эврибионтные), часто хромосомно-полиморфные (или полиплоидные) виды, терминирующие филогенетические цепи (Стегний, 1982). Отличия геномных характеристик эволюционно лабильных и консервативных видов вскрытые в настоящей работе касаются таксономических группировок разного уровня. Для семейств преобладают показатели числа и морфологии хромосом, для триб – показатели уровня рекомбинации, для родов и близкородственных видов – дубликации генома, различия по фиксированным хромосомным перестройкам, гетерохроматиновые модификации и хромосомно-мембранные отношения. Выявленные параметры структурно-функциональной организации генома у видов-генераторов видообразования и видов – инертных (консервативных) в плане видообразования характеризуют эволюционную гетеропотенцию видовых геномов и неравнозначность видов по отношению к естественному отбору. Первые – генерируют кластеры дочерних видов, вторые – создают видовую систему генетической адаптации (полиморфизма) и обычно терминируют филогенетические цепи. Эволюционно лабильные виды имеют сравнительно малые ареалы и узкую экологическую нишу (стенобионты), а эволюционно консервативные виды – большие ареалы (эврибионты). В нижеприведенной таблице отражены эволюционно значимые принципы организации видовых геномов, при

этом степень отличий оценивается в сравнительном плане для конкретной группы родственных таксонов.

Параметры (показатели) геномной системы	Эволюционно лабильные видовые геномы	Эволюционно консервативные видовые геномы
Число и морфология хромосом	Большое число хромосом, преобладание акроцентриков	Меньшее число хромосом (редукция посредством робертсоновских слияний, преобладание мета- и субметацентриков)
Плоидность (уровень дубликации геномов)	Низкая	Высокая
Уровень рекомбинации	Высокий	Низкий
Количество межвидовых (фиксированных) хромосомных перестроек	Малое	Большое
Хромосомный (внутривидовой) полиморфизм по инверсиям, транслокациям, В-хромосомам	Низкий	Высокий
Гетерохроматин (организация и количество)	Локальный (концентрированный в хромоцентре, микрохромосомах, половых хромосомах), большое количество	Диспергированный по длине хромосом, малое количество (редукция)
Хромосомно-мембранные связи	Локально распределенные по ядру (наличие локального хромоцентра)	Распределение связей по оболочке ядра (диффузные хромоцентры)
Аллельный (генный) полиморфизм	Высокий	Низкий
Мобильные генетические элементы	Локализованы в микрохромосомах, половых хромосомах и центромерных районах	Диспергированы по длине хромосомных плеч

Таким образом, при эволюционном развитии таксона в горизонтальном направлении (кладогенез или адаптивная радиация) признаки малоспециализированности эволюционно лабильных видовых геномов при каждом шаге видообразования постепенно замещаются в процессе прогрессирующей специализации на признаки альтернативные (эволюционно консервативные), достигающие своего максимального выражения у терминальных видов: снижение числа акроцентриков (робертсоновские слияния), полиплоидизация, «диспергирование» гетерохроматина, резкое ограничение рекомбинации при образовании адаптивного инверсионного полиморфизма, расширение зон прикрепления хромосом к ядерной оболочке.

ИЗУЧЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИИ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ АГРЕССИВНОГО ПОВЕДЕНИЯ У МУЖЧИН АФРИКАНСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ ХАДЗА И ДАТОГА

Суходольская Е.М.¹, Васильев В.А.¹, Шибалев Д.В.¹, Буркова В.Н.², Мабула А.³,
Бутовская М.Л.², Рысков А.П.¹

¹Институт биологии гена РАН, Россия, Москва, j.suchodolskaya@gmail.com

²Институт этнологии и антропологии им. Н.Н. Миклухо-Маклая РАН, Россия, Москва

³Дар-эс-Саламский университет, Танзания

Изучение полиморфизмов в системе генов, участвующих в регуляции важных поведенческих признаков, связанных с девиантным поведением, представляет большой интерес с точки зрения когнитивной биологии, поведенческой и популяционной генетики. Агрессивное поведение является сложным и многофакторным признаком. Согласно результатам психогенетических исследований наследственный компонент по агрессивному поведению у человека составляет от 44% до 72%. В индустриально развитых странах разнообразные стрессовые воздействия и фрустрации не позволяют объективно определить взаимосвязь генетических и поведенческих факторов агрессии. Данные антропологии позволяют предполагать, что агрессивное поведение человека сформировалось в процессе эволюции и контролировалось отбором в доиндустриальных обществах на протяжении тысяч лет. Поэтому несомненный интерес при изучении девиантного поведения представляют доиндустриальные традиционные племенные общества, характеризующиеся разным уровнем культурно допустимой агрессии, в частности хадза и датога, проживающие на севере Танзании и существующие в настоящее время практически вне контактов с западной цивилизацией.

В данной работе в рамках комплексного междисциплинарного проекта по изучению кандидатных генов, ассоциированных с девиантным агрессивным поведением, было проведено изучение аллельного полиморфизма трех генов серотонинергической системы – рецепторов *HTR1A* и *HTR2A*, а также второго интрона серотонинового транспортера *Stin2* у мужчин хадза, эгалитарных охотников-собирателей, и датога, военизированных полуоседлых скотоводов. Ранее в промоторной области генов *HTR1A* и *HTR2A* были обнаружены функционально значимые нуклеотидные замены: G1019C и A1438G, соответственно, а во втором интроне серотонинового транспортера описан несовершенный минисателлитный кластер, содержащий от 10 до 12 повторов. Нами использовалась геномная ДНК хадза (n=125) и датога (n=140), выделенная из образцов буккального

эпителия. Анализ полиморфизма проводили с помощью локус-специфичной ПЦР и последующей обработки амплификатов *HTR1A* и *HTR2A* рестриктазами *Bse* GI и *Msp* I, соответственно. Сравнение частот распределения аллелей и генотипов по локусу *HTR2A* не выявило достоверных отличий в исследуемых популяциях. Однако анализ данных по локусу *HTR1A* показал, что у хадза значительно чаще встречается G-аллель с высокой транскрипционной активностью. Кроме того в популяции хадза слабо экспрессирующийся генотип *HTR1A* C/C представлен с очень низкой частотой (0,020), в то время как у датога он встречается в 16 раз чаще (0,320). И наоборот, высоко экспрессирующийся генотип *HTR1A* G/G в популяции датога встречается с частотой (0,230), что в три раза меньше, чем у хадза (0,690). Анализ частот распределения генотипов *Stin2* 12/12 и *Stin2* 10/10 в исследуемых популяциях также показал достоверные различия: у хадза – 0,490 и 0,112; у датога – 0,580 и 0,042, соответственно. Гомозиготы *Stin2* 12/12, содержащие аллель с высокой транскрипционной активностью, достоверно чаще встречались у представителей датога, в то время как гомозиготы *Stin2* 10/10, с низким уровнем экспрессии, - у хадза. Для изучения ассоциаций генетических вариантов *HTR1A*, *HTR2A* и *Stin2* с различными формами девиантного агрессивного поведения был проведен регрессионный анализ, который выявил тенденцию к снижению показателей физической агрессии у носителей генотипов *HTR2A* A/A как у хадза, так и у датога. Регрессионный анализ данных по локусу *HTR1A* показал наличие достоверной положительной ассоциации между высокими показателями гнева, физической агрессии и генотипами *HTR1A* G/G в популяции датога. По локусу *Stin2* регрессионный анализ выявил тенденцию к снижению показателей физической агрессии у носителей гомозиготных генотипов *Stin2* 12/12 в популяции датога. Проведенный многофакторный регрессионный анализ показал корреляцию между аллельными вариантами локусов *HTR1A* x *HTR2A* и показателями вербальной агрессии, а также между аллельными вариантами локусов *HTR1A* x *Stin2* и показателями физической агрессии.

Работа выполнена при поддержке ФЦП Кадры (ГК № 16.740.11.0172), Программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” и гранта Президента РФ (НШ-5233.2012.4).

ЗАГАДКИ ЭВОЛЮЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНА ЦИТОХРОМА Б ГОЛОМЯНОК БАЙКАЛА

Тетерина В.И., Суханова Л.В., Мамонтов А.М., Кирильчик С.В.

Учреждение Российской академии наук Лимнологический институт Сибирского отделения РАН, Иркутск 664033, kir@lin.irk.ru

Изучение дивергенции симпатрических форм животных является одной из сложных и интересных проблем в эволюционных исследованиях. В отличие от аллопатрических или парапатрических процессов зачастую бывает очень сложно выявить причины или ключевые механизмы образования таких групп, особенно на ранних стадиях их расхождения. Одним из ярких примеров «загадочной» симпатрической дивергенции можно считать две генетические группы байкальской большой голомянки (Teterina et al., 2010).

Большая голомянка (БГ) (*Comephorus baicalensis* Pallas, 1776), вместе с другим близкородственным видом - малой голомянкой (МГ) (*C.dybowski* Korotneff, 1905) являются единственными представителями эндемичного рода *Comephorus* и семейства *Comephoridae* рогатковидных рыб оз. Байкал. Голомянки глубоко адаптированы к пелагическому образу жизни в условиях открытого Байкала. Оптимальная температура воды для этих видов около 4 градусов Цельсия, повышение в экспериментах температуры до 8 градусов приводило к немедленной гибели рыб (Талиев, 1953).

Анализ внутривидового генетического полиморфизма митохондриального гена цитохрома Б голомянок выявил две генетические группы БГ. Одна из групп оказалась предковой (БГпр) по отношению к другой - парафилетичной (БГпа). При этом, отличий по ядерному геному и морфологии половозрелых рыб БГпр и БГпа выявлено не было. Для исследований этих групп нами была разработана система выявления точечных мутаций. Предложенная методика позволила в кратчайшие сроки увеличить анализируемую выборку большой голомянки, рассчитать соотношение особей, принадлежащих к разным генетическим группам и собранных из разных районов Байкала, а также провести анализ личинок, рожденных в разное время в течение года. В результате исследований выяснилось, что представители обеих групп не имеют заметных морфологических отличий, а их соотношение во пределах разных возрастных групп по акватории озера приблизительно равно 50/50.

Анализ GC состава, а также мутаций, влияющих на GC состав ДНК с учетом их направленности от центральных гаплотипов к периферийным в пределах каждой группы выявил достоверные отличия между группами БГ, а также группой БГпр и МГ. Направление замен в пределах БГпр показали строгий уклон от А или Т к G или С

(A/T→G/C). В группе БГпа преимущество направления A/T→G/C значительно слабее. Для МГ превалировали мутации G/C→A/T.

Влияние единичных синонимичных замен на биологическую успешность вида (fitness) является одним из широко обсуждаемых вопросов в настоящее время. Последние исследования показывают значительную роль в этих процессах посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, связанной, в частности, с изменением вторичной структуры мРНК. Для проверки влияния замен на укладку мРНК цитохрома Б голомянок была смоделирована вторичная структура мРНК цитохрома Б основных гаплотипов БГпр, БГпа и МГ. Результаты показали, что основные гаплотипы БГпр и МГ имеют очень сходные структуры, в то время как структура для БГпа сильно отличалась от них. Аналогичные результаты были получены и при построении филогенетического дерева с использованием генетических расстояний, полученных на основе вторичных структур мРНК (программа RNAdistance). Гаплотипы БГпр и МГ были в значительной степени перемешаны, в то время, как представители БГпа, за небольшим исключением, расположены более компактно, образуя три монофилетичные группы.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том что, представители разных генетических групп большой голомянки распределены в пределах озера равномерно и не образуют географически разобщенных стад. В процессах разделения голомянок одну из ключевых ролей могли сыграть факторы молекулярно-адаптивного характера. Косвенным подтверждением этому служат результаты, полученные нами с использованием нескольких методических подходов. Генетический полиморфизм в синонимичных сайтах цитохрома Б исследуемых групп мог быть сформирован, в некоторой степени, в результате влияния отбора, сила и направление которого отличались в каждой группе. Полиморфизм в группе БГпр, возможно, был сформирован под действием отбора который был направленным относительно типа мутаций (против A/T нуклеотидов). В пределах МГ действовали обратные силы (против G/C нуклеотидов). В БГпа, возможно, действовал стабилизирующий отбор поддерживающий определенную структуру мРНК.

Работа проведена при финансовой поддержке РФФИ (08-04-01434-а, 08-04-10123-к, 01-04-48939-а).

НАРУШЕНИЯ КОНДЕНСАЦИИ ХРОМАТИНА РЖИ *SECALE CEREALE* L. У МУТАНТОВ С ДЕФЕКТАМИ СИНАПСИСА И РЕКОМБИНАЦИИ

Толкачева А.В.¹, Михайлова Е.И.^{1,2}, Соснихина С.П.²

¹Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им Н.И. Вавилова РАН

²Кафедра генетики Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, alex1982@lovcus.ru

Оригинальная «Петергофская» коллекция спонтанных мейотических мутантов ржи *Secale cereale* L. лаборатории генетики растений СПбГУ, а также мутанты *ph1b* ржано-пшеничных дополненных линий использованы для изучения компактизации мейотических хромосом.

В нормальном мейозе, по-видимому, существует генетический контроль, который запрещает синапсис между гомологичными последовательностями ДНК в эктопических положениях и это нормализует сегрегацию гомологов в мейозе и предохраняет геном от перестроек. Механизм действия генов, ответственных за осуществление такого контроля, неясен (Leu et al., 1998; Gerecke, Zolan, 2000). Можно предполагать, что он осуществляется поэтапно. На ранних стадиях спаривания хромосом, вероятно, узнаются все гомологичные последовательности даже в неаллельных положениях, а затем происходит коррекция под воздействием генов, контролирующей строгость гомологичного синапсиса. Возможно, так работает ген *sy10*, мутация в котором у ржи приводит к индискриминантному синапсису и негомологичной рекомбинации. Именно так, по предположению некоторых авторов, мог бы действовать и локус *Ph1* у полиплоидной пшеницы, имеющей гомеологичные геномы (Riley, 1960; Holm 1986; Holm and Wang 1988; , Jenkins, 1992; Feldman, 1993; Luo et al., 1996).

Для объяснения характера действия *Ph1* на поведение хромосом в мейозе было предложено несколько гипотез, большинство из которых основывалось на предположениях, касающихся организации хромосом на предмейотических и ранних стадиях мейоза. В данном исследовании мы использовали линии пшеницы *Triticum aestivum* L., у которых гексаплоидный набор хромосом дополнен одной или двумя хромосомами ржи, телосомами 5RL. Вовлечение в анализ линий, имеющих и не имеющих локус *Ph1*, позволило выяснить в чем заключается влияние этого локуса на спаривание телосом 5RL. Используемый нами метод GISH (Scherthan et al., 1992; Schwarzacher, Heslop-Harrison, 1995; Benavente et al., 1996; Aragón-Alcaide et al., 1997a, b; Bass et al., 1997) дал возможность проанализировать расположение как одиночной хромосомы ржи, без гомологичного партнера, так и пары хромосом ржи у дополненных линий пшеницы на

стадии интерфазы в ядрах питающих мейоциты клетках тапетума и в будущих мейоцитах, а также в профазе I (PI) и метафазе I (MI). Конденсация одиночных добавочных хромосом была нарушена на ранних стадиях мейоза у контрольных растений, имеющих локус *Ph1*, что говорило о сопряженности процессов спаривания и хромосомной компактизации. Нами выявлено четыре основных эффекта генотипа *ph1bph1b*. Во-первых – это нарушение конденсации хроматина. Это касалось не только телосом ржи, но распространялось и на хроматин пшеницы, насколько можно было судить на основании анализа ядер мейоцитов, окрашенных красителями PI/DAPI. Во-вторых, нами показано, что хроматин подвержен изменениям не только в PI, но также и в немейотических ядрах, о чем можно было судить по морфологическим особенностям телосом 5RL ржи в ядрах клеток тапетума дополненной линии. В третьих, спаривание хромосом было нарушено, что можно было заключить на основании изучения выявленных с помощью GISH пар добавочных телосом 5RL на протяжении PI. Четвертым эффектом *ph1b* было нарушение узнавания гомологичными хромосомами друг друга в предмейотической интерфазе. Аномалии синапсиса и рекомбинации могут быть следствием частичной деконденсации хроматина на стадиях пред-мейотической интерфазы - PI, которая отмечена в случае центромерных доменов хромосом у асинаптического мутанта ржи *sy1*, участков плечей хромосом, связанных хиазмами у десинаптического мутанта *sy10*.

**ПРОСТРАНСТВЕННО ВРЕМЕННАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ARG-X
ПРОТЕАЗОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ САЙТОВ В СУПРАСТРУКТУРАХ ХРОМОСОМЫ
В ЖИЗНЕННОМ ЦИКЛЕ ПОПУЛЯЦИИ *ESCHERICHIA COLI***

Тропынина Т.С., Иванова Э.А., Вафина Г.Х., Иванов Р.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии УНЦ
РАН, г. Уфа, evilina@anrb.ru

Изучение молекулярных и надмолекулярных структур способно углубить наши представления о пространственно-временной и функциональной организации прокариотической клетки. По мнению А. Бюллера, надмолекулярные описания формообразовательных процессов ценны тем, что в них уже интегрированы взаимодействия многих макромолекул, вдоль линейных структур которых могут передаваться сигналы за счёт ассоциации и диссоциации молекул. Сборка этих структур контролируется внутриклеточными условиями, где важную роль играют специальные белки шаперонины, некоторые из которых выполняют протеолитические функции. В настоящее время в литературе широко дискутируется роль аргинина (*Arg*) в динамике протеома жизненного цикла. Известно, что белки входящие в организацию хроматина богаты аргинином, имеющим относительно длинную боковую цепь в виде гуанидиновой группы на поверхности надмолекулярных белковых комплексов. Роль гуанидиновых групп заключается в восприятии как внутренних, так и внешних сигналов поступающих из окружающей среды. То есть, имеет место движение сигналов по надмолекулярным структурам. В связи с тем, что линейные гетерополимеры обладают определенной пространственно-временной организацией на уровне нуклеоида прокариотической клетки, мы решили провести экспериментальную работу по анализу локализации сайтов *Arg-X* протеазочувствительности в отдельных надмолекулярных структурах к экзогенному субстрату – протамину.

Целью нашей работы было исследование локализации *Arg-X* протеазочувствительных зон на разных надмолекулярных уровнях структурной организации прокариотической клетки в периоды активного роста, замедления и стационарной фаз на примере популяции бактериальных клеток *E. coli*.

Объектом исследования служил штамм *E. coli* JC-158 (любезно предоставленный нашими коллегами И.В. Ступак и Е.Э. Ступак). Клетки *E. coli* выращивали на богатой питательной среде LB (Лурия-Бертани) Из популяции бактериальных клеток выделяли препаративные количества надмолекулярных структур: бактериоплазмы, структур непочно- и прочносвязанных с клеточным остатком, а также клеточного остатка по

способу, подробно описанному в патенте (Иванова, Вафина, Тропынина, 2011; патент № 2410428). *Arg-X* протеазоактивность оценивали по расщеплению *Arg-X* связей в аргининбогатом белке – протамине – Salmine-A-I («Merk») (молекула которого состоит из 33 аминокислот, 22 из которых *Arg*).

Динамика роста популяции *E. coli* выявила фазы ее роста и показала, что *Arg-X* протеазочувствительность локализуется в надмолекулярных структурах бактериоплазмы стационарной фазы роста *E. coli*. Мы предполагаем, что в этот период происходят существенные изменения в ремоделировании инициации и регуляции трансляционной системы. Освобождаемые в результате *Arg-X* протеолиза белки, вероятно, используются для синтеза новых белков, а также полиаминов, пептидов, содействующих пролиферации и в некоторых случаях ингибирующих апоптоз. Вполне возможно, что в этот период образуются и биогенные амины, например, из аргинина – агматин. Глобальные изменения в экспрессии генов при переходе клеток в стационарную фазу роста происходят на каждой стадии экспрессии генов и включают изменения конформации нуклеоида, аппарата транскрипции и трансляции. Модуляция нуклеоида играет существенную роль в сохранении ДНК в клетках, находящихся в условиях голодания и истощения источника энергии, а также в репрессии большинства генов, возможно поэтому в этот период отмечается проявление *Arg-X* протеолиза в надмолекулярных структурах непрочно- и прочносвязанных с клеточным остатком, и в клеточном остатке.

Таким образом, в прокариотической клетке *E. coli* *Arg-X* протеазочувствительность к экзогенному субстрату протамину проявляется наиболее активно циклически в бактериоплазме в период замедления и перехода к остановке роста популяции. Возможно, это период формирования какого-то определенного сигнала, когда отдельные бактериальные клетки начинают погибать, а ее элементы снова используются для продолжения или поддержания жизнедеятельности, которая требует новых ферментов и на другом надмолекулярном уровне организации, что отражается на циклах фракций - надмолекулярных структур непрочно- и прочносвязанных с клеточным остатком и фракции самого клеточного остатка.

ОБ ЭВОЛЮЦИОННОМ ХАРАКТЕРЕ СВЯЗЕЙ 9-Й И Y-ХРОМОСОМЫ

Тюняев А.А.

Институт новых медицинских технологий, г. Тула, dazzle@ropnet.ru

В 9-й хромосоме локализован ген, управляющий системой групп крови АВ0. Исследования частот распределения аллелей этого гена лежат в основе изучения эволюции человеческих популяций и генетических связей между ними. Тренды отдельных групп установлены: 0 (I) – Америка (до 1.0), Европа и Австралия (до 0.5), минимум в Африке, в Восточной Индии и Юго-Восточной Азии; А (II) – Европа (до 0.5) и спад во всех направлениях; В (III) и АВ (IV) – в Восточной Индии и в Юго-Восточной Азии (до 0.38) и спад во всех направлениях.

В Y-хромосоме содержится около 50 миллионов нуклеотидов – аденина, гуанина, тимина и цитозина: всего – 27 генов, остальная часть – не кодирующая. Находящиеся в ней множественные повторы нуклеотидных цепочек выбраны в качестве гаплотипов для ДНК-генеалогии. Копирование, или репликацию ДНК выполняет ДНК-зависимая ДНК-полимераза (в составе большого комплекса, реплисомы), при этом возникают ошибки (мутации). С помощью специальной компьютерной программы серию гаплотипов рассортировывают и представляют в виде круговой или линейной диаграммы – дерева гаплотипов, в котором совокупность ветвей гаплотипов соответствует их предполагаемым ДНК-генеалогическим линиям. Совокупность гаплотипов – гаплогруппа – объединена «групповой» необратимой мутацией, присущей определённому человеческому роду. В настоящее время классификация включает 20 основных гаплогрупп, от А до Т в алфавитном порядке, и сотни «нисходящих» гаплогрупп и субкладов.

Снип, «гаплогруппо-образующая мутация» (от англ. SNP – Single Nucleotide Polymorphism), практически необратима, происходит, как правило, на одном нуклеotide, превращая один нуклеотид в другой. Это событие является своеобразной «меткой», которая практически навсегда наследуется потомками и служит надёжным и количественным отличием одного рода от другого. Первая буква обозначения снипа показывает, в каком научном коллективе снип идентифицирован: М – Stanford University (США); Р – University of Arizona (США); S – Edinburgh University (Шотландия); L – Family Tree DNA's Genomics Research Center (США); U – университет центральной Флориды и университет Gonzaga; V – университет La Sapienza (Рим, Италия); N – лаборатория биоинформатики, Институт биофизики КАН, Пекин (Китай). В сводке данных ISOGG дано дерево гаплогрупп (см. рис.).

- Y**
- **A0** V148, V149, V154, V164, V166, V172
- **A1** L985, L989, L990, L1002, V161, V168, V171, V174
- **BT** SRY1532.1/SRY10831.1, M42, M91, M94, P97, V29, V31, V202
- • **B** M60, M181, P85, P90
- • **CT** M168, M294, P9.1
- • • **DE** M1/YAP, M145, M203, P144, P153, P165, P167, P183
- • • • **D** M174, IMS-JST021355
- • • • **E** L339, M40, M96, P29, P150, P152, P154
- • • **CF** P143
- • • • **C** M130, M216, P184, P255, P260
- • • • **F** M89, M213/P137, M235, P14, P133
- • • • • **G** L116, L154, L204, M201, P257, U2, U3
- • • • • **H** M69, M370
- • • • • **IJK** L15/M523/S137, L16/M522/S138
- • • • • • **IJ** M429, P123, P124, P126, P127, S2
- • • • • • **I** L41, M170, M258, P19, U179
- • • • • • **J** 12f2.1, L134, M304, P209, S6, S34
- • • • • • **K** M9, P128, P131, P132
- • • • • • • **LT** L298/P326, L811
- • • • • • • • **L** M11, M20, M61, M185, L855
- • • • • • • • **T** L206, M184, M193, M272
- • • • • • • **K(xLT)** M526
- • • • • • • • **M** P256, Page93/S322
- • • • • • • • **NO** M214, P188, P192, P193
- • • • • • • • • **N** M231, Page91
- • • • • • • • • **O** M175, P186, P191, P196
- • • • • • • • • **P** 92R7, L138, L268, M45, M74
- • • • • • • • • • **Q** M242
- • • • • • • • • • **R** M207, P224, P227, P229, S4, S9
- • • • • • • • • • **S** M230, P202, P204

Рис. Филогенетическое дерево гаплогрупп Y-хромосомы, 2012 год.

Часть гаплогрупп к настоящему времени удалось идентифицировать с тем или иным этносом. Так, носители гаплогруппы Q1a3a (95%) индейцы Южной и Центральной Америки имеют первую группу крови (~99%) и их «двоюродные» родственники – эскимосы Гренландии (N1b~70%) имеют ту же группу крови (91%). А «родные братья» эскимосов по гаплогруппе (O~70%) японцы и китайцы имеют разные группы крови (O~31%; A~33%; B~26%; AB~10%). Расчётный возраст появления гаплогрупп N и O примерно 20 – 15 тыс. лет назад, а их расхождение с гаплогруппой Q датируют 32 тыс. лет назад. При этом гаплогруппа K – (из IJK ок. 40 тыс. лет назад), потомками которой являются N, O, Q, встречается только у незначительного числа жителей Южной Азии, Малайского архипелага, Океании и Австралии (O~54%, A~40%, B~4%).

Аналогичные картины несоответствий фиксируются по разным гаплогруппам и по разным народам с разными частотами антигенов АВ0. Но на данный момент постулировано, что и групповые факторы крови являются наследственным признаком – по 9-й хромосоме, и гаплотипы являются наследственным признаком (но уже по Y-хромосоме). При этом, та или иная группа крови передаётся одной соответствующей аллелью, распределённой на весь спектр популяций с разными гаплогруппами и непонятным образом, без дополнительных мутаций, в этом спектре чередующейся с другими аллелями.

Исходя из сказанного, следует предположить, что либо групповые факторы крови имеют не совсем наследственную природу, а устанавливаются влиянием среды, либо методика установления наследственности по Y-хромосоме не достаточно корректна.

СОДЕРЖАНИЕ ДНК В ЯДРАХ КЛЕТОК ГРАНУЛЕМ МЫШЕЙ Balb/c В КУЛЬТУРЕ EX VIVO НА ЛАТЕНТНОЙ СТАДИИ РАЗВИТИЯ VCG-ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Уфимцева Е.Г.¹, Дубатолова Т.Д.²

¹ФГБУ НИИ биохимии СО РАМН, г. Новосибирск

²ФГБУ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск,

ufim1@ngs.ru

Туберкулез - одно из распространенных инфекционных заболеваний человека, уносящее ежегодно до 2 миллионов жизней. Треть населения Земли инфицирована патогенными микобактериями, способными вызывать как острую болезнь человека и животных, так и бессимптомную латентную инфекцию. В основе развития туберкулеза лежит внутриклеточная персистенция микобактерий в хронических воспалительных образованиях, называемых гранулемами. Гранулемы – это структурные скопления иммунных клеток разных типов, прежде всего макрофагов (Mφ), ограничивающие диссеминацию инфекции и обеспечивающие ее латентное состояние с возможностью последующей реактивации (Flynn et al., 2011). Неспособность Mφ разрушать микобактерии лежит в основе риска развития туберкулезного процесса (Behr et al., 2010). Исследование механизмов, с помощью которых микобактерии устанавливают латентное состояние инфекции в обход иммунного надзора со стороны организма-хозяина, является высоко приоритетным для создания новых вакцин, средств и методов лечения туберкулеза.

При различных патологических состояниях (воспалении, онкологии) количество ДНК в ядрах клеток может увеличиваться, этот процесс часто сопровождается образованием двуядерных клеток (D'Assoro et al., 2002). Показано, что перекись водорода влияет на появление большого количества двуядерных клеток в культуре *in vitro* (Chae et al., 2005). Как известно, одними из основных средств борьбы клеток иммунной системы с инфекционными агентами, в том числе микобактериями, служат активированные кислородные метаболиты (Klebanoff, 1992; Meena and Rajni, 2010). Избыточное накопление свободных радикалов способно повреждать ДНК клеток с последующей их гибелью по механизмам апоптоза (Глазунова, Штиль, 2008; Arkin et al., 1997). Апоптотная гибель гранулемных Mφ с микобактериями считается основным способом борьбы зараженного организма с туберкулезной инфекцией (Behar et al., 2011). Можно предположить, что увеличение содержания ДНК в клетках гранулем на латентном этапе развития туберкулезного процесса будет повышать устойчивость клеток к действию провоспалительных факторов и индукторов апоптоза и, следовательно, способствовать длительной персистенции микобактерий в клетках этих воспалительных образований.

Для проверки выдвинутого предположения исследовали количество ДНК в ядрах клеток гранулем на латентной стадии туберкулезной инфекции. Гранулемы выделяли из селезенки мышей Balb/c спустя 1 и 2 месяца после инфицирования *in vivo* вакциной VCG (bacillus Calmette-Guérin, аттенуированный штамм *M. bovis*, ООО «Аллерген», г. Ставрополь) и культивировали *ex vivo*. В разработанных условиях культивирования были получены монослойные культуры распластанных на подложке клеток, мигрировавших из индивидуальных гранулем мышей и соответствовавших отдельному гранулематозному образованию. Созданная модельная система позволила проанализировать как точный клеточный состав каждой гранулемы, так и содержание ими кислотоустойчивых VCG-

микобактерий (Ufimtseva, in print). Клетки мышинных гранулем исследовали на различные мембранные и цитоплазматические маркеры с использованием метода двухцветной иммунофлуоресценции с визуализацией ядер клеток флуорохромным красителем DAPI. После регистрации серийных Z-срезов флуоресцентно-окрашенных клеток гранулем на конфокальных микроскопах LSM 510 и LSM 780 (Zeiss) в ЦКП по микроскопическому анализу биологических объектов ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск) препараты перекрасили по методике Циль-Нильсена на выявление кислотоустойчивых VCG-микобактерий. Далее клетки гранулем проанализировали на количество ДНК в ядрах и содержание функционально активных VCG-микобактерий с неповрежденной клеточной стенкой в цитоплазме Mph и дендритных клеток. Количество ДНК определяли методом, основанным на суммировании сигнала флуоресценции окрашенных DAPI ядер по оптическим Z-срезам с последующим анализом их цифровых изображений в программе LSM Image Browser (Zeiss). Флуоресцентный сигнал интегрировали по объему в ранее разработанной программе (Омельянчук и др., 2007; Лебедева и др., 2011). Наблюдали варьирование в интенсивности окрашивания DAPI ядер клеток на разных препаратах гранулем мышей, следовательно, содержание ДНК в ядрах Mph и многоядерных гигантских клеток Пирогова-Лангханса оценивали в относительных единицах, взяв за основу количество ДНК в ядрах лимфоцитов, одновременно проанализированных на тех же Z-срезах клеток. Контролем служили перитонеальные Mph интактных мышей.

Количество двуядерных Mph в гранулемах разных мышей на латентном этапе VCG-инфекции варьировало как между гранулемами одной мыши, так и между гранулемами разных мышей, однако в среднем этот показатель не отличался от числа, выявленного для перитонеальных Mph контрольных мышей ($2,45 \pm 0,1\%$, 24 мыши, и $2,65 \pm 0,24\%$, 3 мыши, соответственно). Содержание ДНК в ядрах Mph по сравнению с количеством ДНК в ядрах лимфоцитов, равным для всех исследованных на одном препарате клеток, различалось между разными макрофагами в одних и тех же гранулемах, часто превышая показатели лимфоцитов в 1,5-4 раза. В среднем оно составило для одноядерных и двуядерных Mph, не имевших VCG-микобактерий, $1,57 \pm 0,1$ ($n=47$, 10 мышей) и $1,59 \pm 0,1$ ($n=12$, 4 мыши), соответственно, и для одноядерных Mph с одной-тремя VCG-микобактериями в клетках $1,78 \pm 0,26$ ($n=13$, 6 мышей) относительно количества ДНК в ядрах лимфоцитов. Параметры количества ДНК в ядрах Mph гранулем статистически значимо не отличались как между собой, так и от значений, выявленных для контрольных Mph интактных мышей ($1,77 \pm 0,15$, $n=8$, 2 мыши). Среднее количество ДНК в ядрах гигантских клеток Пирогова-Лангханса составило $1,51 \pm 0,04$ ($n=2$, 8 и 10 ядер, 2 мыши), не отличаясь от показателей, наблюдаемых для Mph мышей. Интересно, что содержание ДНК в ядрах клеток Пирогова-Лангханса варьировало от 1,2 до 1,9, тогда как в двуядерных Mph гранулем количество ДНК было одинаковым для обоих ядер. Вероятно, это могло отражать разные процессы формирования клеток: слиянием Mph (клетки Пирогова-Лангханса) и/или делением ядер с редуцированной ДНК без цитокинеза (некоторая часть двуядерных Mph). В целом, не выявили различий в среднем содержании ДНК в ядрах Mph гранулем с микобактериями или без них. Повышенное содержание ДНК в ядрах некоторых Mph по сравнению с ядрами лимфоцитов, вероятно, указывало на использование Mph ядерного материала фагоцитированных ими лимфоцитов с морфологическими признаками апоптозной гибели клеток. В гранулемах процесс разрушения Mph поглощенных лимфоцитов наблюдался параллельно с неспособностью Mph уничтожить VCG-микобактерии в тех же клетках.

ХРОМОСОМНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ *CHIRONOMUS ENTIS* (DIPTERA *CHIRONOMIDAE*) УРАЛЬСКИХ ОЗЕР

Филинкова Т.Н.

Уральский государственный педагогический университет, г. Екатеринбург, 620017,
пр. Космонавтов, 26, filink_57@mail.ru

CHROMOSOMAL POLYMORPHISM OF *CHIRONOMUS ENTIS* (DIPTERA *CHIRONOMIDAE*) OF LAKES OF URAL

Filinkova T.N.

Исследован геномный и хромосомный полиморфизм видов рода *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) из более, чем 20 водоемов Урала. Материал собирался общепринятыми гидробиологическими методами, личинок на кариологический анализ фиксировали спирт-уксусной смесью (3:1), при окрашивании политенных хромосом использовали общепринятую этил-орсеиновую методику, картирование хромосом проводили по стандартным цитофотокартам.

Ch. entis Shobanov (1989) отмечен в 9 водоемах, во всех водоемах *Ch. entis* обитал симпатрично с *Ch. plumosus* Linnaeus (1758). В Бакряжском пруду совместно с *Ch. plumosus* и *Ch. entis* отмечен еще один близкородственный им вид *Ch. curabilis* Beljanina et al. (1990). В озере Силач совместно с *Ch. plumosus* и *Ch. entis* отмечен вид рода *Chironomus* группы *plumosus* *Ch. borokensis* Kerkis et al. (1988). На Среднем Урале *Ch. entis* встретился в 2 из 10 обследованных нами водоемов, на Южном Урале в 4 из 5 обследованных водоемов и в Южном Зауралье во всех 3 обследованных водоемах. Следует отметить, что в изученных нами североуральских популяциях, *Ch. entis* обнаружен не был. Доля личинок *Ch. entis* от всех личинок рода *Chironomus* в водоемах Среднего Урала составила 2,5-8,2%, в водоемах Южного Урала - 9,7-26,4% и Южного Зауралья его доля 26,7-59,6%. Таким образом, для *Ch. entis* характерна приуроченность к более южных водоемам.

В наших исследованиях у *Ch. entis* отмечено пять типов инверсий в гетерозиготном состоянии в хромосомном плече А и один тип гетерозиготной инверсии в хромосомном плече С. Остальные хромосомные плечи *Ch. entis* в обследованных нами популяциях оказались мономорфными. Число гетерозиготных инверсий на особь у *Ch. entis* в южноуральских популяциях изменялось от 0,16 до 0,33 на особь, в южнозауральских популяциях число гетерозиготных инверсий на особь изменялось от 0,35 до 0,47. В популяциях Среднего Урала число гетерозиготных инверсий на особь нами не подсчитывалось в связи с небольшим количеством исследованных особей *Ch. entis*.

Результаты по инверсионному полиморфизму *Ch. entis*, полученные нами, близки к литературным данным по другим популяциям *Ch. entis* Южного Зауралья, а именно в озере в окрестностях г. Юргамыш - 0,5 гетерозиготных инверсий на особь, в озере из окрестностей с. Кызылбай – 0,3 гетерозиготных инверсии на особь (Кикнадзе и др., 1991). По данным Беяниной С.И. с соавторами (1992) на Южном Урале число гетерозиготных инверсий на особь у *Ch. entis* составляет 0,66 и на Среднем Урале - 0,63. Следует указать, что уровень гетерозиготности в популяциях *Ch. entis* может колебаться в достаточно широких пределах - от 0,15 до 1,6 гетерозиготных инверсий на особь (Керкис и др., 1989; Петрова, Клишко, 2005).

У *Ch. entis* в двух водоемах Южного Зауралья нами отмечены В-хромосомы, количество особей с В-хромосомой составило 2,6-2,9%, при этом не было отмечено сочетания в одном кариотипе В-хромосомы и гетерозиготных инверсий. Таким образом, по нашим данным уровень генотипической изменчивости *Ch. entis* несколько выше в популяциях Южного Зауралья и разнообразие кариофонда данного вида в основном обеспечивается хромосомными перестройками в плече А.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ СПЕЦИАЛИЗАЦИЯ ДУПЛИЦИРОВАННЫХ КОПИЙ ГЕНОВ В ГЕНОМЕ ПШЕНИЦЫ

Хлесткина Е.К., Терещенко О.Ю.

Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

e-mail: khlest@bionet.nsc.ru

Дубликация гена, предшествующая возникновению гена с новой функцией, считается одной из основных направляющих сил эволюции. Дублицированные копии генов могут возникать вследствие дубликации всего генома (так появляются гомеологичные копии) или отдельных сегментов хромосом (паралогичные копии). Нами было установлено, что в геноме пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L., $2n=6x=42$, genome BBAADD) присутствуют как гомеологи, так и паралогии регуляторного гена *Мус* (кодирующего MYC-подобный фактор регуляции транскрипции структурных генов биосинтеза флавоноидов) и структурного гена *F3h* (кодирующего один из ключевых ферментов данного метаболического пути). Выделение нуклеотидных последовательностей пяти копий гена *Мус* (3 гомеологичных и 2 паралогичных) и сравнительный анализ их транскрипционной активности в различных тканях позволил идентифицировать одну активную копию данного гена у некоторых генотипов пшеницы. Функционально активный аллель данного гена неспецифически экспрессируется во всех тканях, но только в перикарпе зерна его экспрессия приводит к биосинтезу флавоноидных пигментов антоцианов, вследствие чего зерно приобретает редкую для пшеницы фиолетовую окраску. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гомеологичных и паралогичных копий гена *Мус* показал, что остальные четыре копии не обнаруживают тенденции к псевдогенизации; их функции в геноме пшеницы еще предстоит исследовать.

Ген *F3h* присутствует в геноме пшеницы мягкой в виде трех гомеологов и одной паралогичной копии – *F3h-B2* (в хромосоме 2В на расстоянии около 40сМ от ‘основной’ копии). В отличие от паралогичных копий гена *Мус*, образовавшихся уже после диверсификации предковых геномов А, В и D, составляющих аллополиплоидный геном пшеницы, паралог *F3h-2* возник у общего предка всей трибы Triticeae, включающей, помимо пшеницы, ячмень, рожь и различные виды эгилопсов. Анализ около 100 образцов 24 видов Triticeae показал наличие *F3h-2* лишь в двух группах: 1) у видов, несущих геном В или близкородственные ему геномы G и S; 2) у ржи (геном R). Псевдогенизация *F3h-2* у большинства видов Triticeae и в то же время сохранение его в узкой группе видов свидетельствует о функциональной значимости данного гена у последних. Действительно, структурно-функциональный анализ гена *F3h-B2* пшеницы показал его функциональную

активность и вместе с тем значимую функциональную диверсификацию по сравнению с 'основным' геном – *F3h-1*. В то время как *F3h-1* (все три гомеологичные копии) экспрессируется в эндосперме проростков пшеницы и в окрашенных антоцианами тканях наземной части растений, *F3h-B2* не активен в перечисленных выше тканях, но специфически экспрессируется в корнях. В структуре предсказанной аминокислотной последовательности клонированного нами гена *F3h-B2* идентифицированы все консервативные остатки, необходимые для правильной укладки фермента F3H и образования активных центров, но вместе с тем выявлены замены по сравнению с *F3h-1* в некоторых субстрат-специфичных сайтах. Кроме того, найдены существенные отличия в промоторной области гена *F3h-B2* по сравнению с *F3h-1*.

Мы предполагаем, что именно благодаря функциональной диверсификации дублированных копий гена *F3h*, у В/G/S- и R-геномных видов Triticeae сохранились обе копии *F3h-1* и *F3h-2*. Между гомеологичными копиями *F3h-A1*, *F3h-B1* и *F3h-D1* пшеницы существенных функциональных различий не наблюдается, они отличаются лишь некоторыми синонимичными заменами и характеризуются высоко идентичной структурой промоторов. У функционально активного регуляторного гена *Mus*, напротив, гомеологов со схожей функцией не выявлено. Можно предположить, что диверсификация гомеологичных копий регуляторных генов осуществляется в аллополиплоидном геноме пшеницы быстрее, чем диверсификация гомеологичных структурных генов. Это наблюдение согласуется с известными данными о том, что регуляторные гены биосинтеза флавоноидов растений эволюционируют быстрее структурных генов данного метаболического пути.

Мы благодарим Генералову Г.В. за помощь в работе и фонд РФФИ (11-04-92707) за финансовую поддержку.

ВЛИЯНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО АКТИВАТОРА И ПОВЫШЕННОГО АЦЕТИЛИРОВАНИЯ ГИСТОНОВ НА ПОЛОЖЕНИЕ РАЙОНОВ ХРОСОМОМ ОТНОСИТЕЛЬНО ЯДЕРНОЙ ПЕРИФЕРИИ

Целебровский М.В., Федотова А.А., Ненашева В.В., Михалева Е.А., Шевелев Ю.Я.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук, г. Москва, shevelev@img.ras.ru

Известно, что районы хромосом, содержащие «молчащие» гены, расположены в ядре в основном вблизи ядерной периферии и находятся в преимущественном контакте с ядерной ламиной. В ходе дифференцировки те генные локусы, которые начинают активно экспрессироваться, как правило утрачивают контакт с ядерной ламиной (Peric-Hupkes et al, 2010) и перемещаются внутрь ядра (Kosak et al, 2002; Zink et al, 2004; Williams et al, 2006; Shevelyov et al, 2009). Ряд литературных данных указывал на возможную роль гистондеацетилаз в удержании хроматиновой нити на периферии ядра и на уровень ацетилирования хроматина как определяющего фактора в процессе смещения хроматиновой нити внутрь ядра.

Было показано, что хроматин в местах контакта хромосом с ядерной ламиной является гипoaцетилированным (Pickersgill et al, 2006). Гипoaцетилированное состояние хроматина, находящегося вблизи ядерной периферии (Sadoni et al, 1999), могло свидетельствовать о высокой активности гистондеацетилаз в этом компартменте ядра. И действительно, фракция гистондеацетилазы HDAC3 была обнаружена у млекопитающих в едином белковом комплексе с интегральными LEM-доменными белками ядерной мембраны (Somech et al, 2005; Holaska and Wilson, 2007). Ингибирование гистондеацетилаз трихостатином А с одной стороны вызывало увеличение степени ацетилирования гистонов на периферии ядра в клетках человека (Bartova et al, 2005), а с другой – приводило к смещению хромосомных районов от периферии к центру ядра в клетках млекопитающих (Zink et al, 2004; Strašák et al, 2009) и к утрате контактов между ацетилированным хроматином и ламиной у дрозофилы (Pickersgill et al, 2006). Более того, HDAC3 в комплексе с Lap2 β и cKrox определяли периферийное положение хромосомных районов в клетках млекопитающих (Zullo et al, 2012). Оставались неясными движущие силы, которые вызывали перемещение хромосомных районов от периферии внутрь ядра. Достаточно ли для этого связывания транскрипционного активатора или повышенного ацетилирования гистонов?

Проведенный нами биоинформатический анализ показал, что удаленность хромосомных районов от ядерной оболочки в клетках Кс дрозофилы положительно коррелирует на мегабазных интервалах как с долей активного хроматина, так и с массой транскриптов, синтезированных в этих районах.

Чтобы ответить на вопрос, приводит ли связывание транскрипционного активатора с хромосомным локусом к удалению этого локуса от ядерной оболочки, мы использовали

линию дрозофилы с искусственным транспозоном, встроенным в ламина-ассоциированный район 60D (в интрон гена *CG13579*) и несущим UAS-сайты связывания активатора GAL4. Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH), выявляющая РНК-РНК-гибриды, показала, что в ядрах слюнных желез в присутствии активатора GAL4 генерируется значительное количество транскриптов в интроне гена *CG13579*. Анализ кратчайших расстояний в объеме ядер между ДНК-FISH-сигналами и окрашенной антителами ламиной показал, что примерно в 10% политенных ядер связывание активатора приводит к удалению района 60D от ядерной оболочки. В то же время, не наблюдалось каких-либо различий между положением района 60D относительно ядерной периферии в диплоидных клетках крыловых имагинальных дисков, экспрессирующих и не экспрессирующих активатор GAL4. Таким образом, для политенных, но не для диплоидных хромосом была продемонстрирована причинно-следственная связь между посадкой транскрипционного активатора на промотор и удалением хромосомного района, связавшего активатор, от ядерной периферии.

Для экспериментальной проверки гипотезы, согласно которой гистондеацетилазы HDAC1 и HDAC3 дрозофилы, находясь в комплексе с ядерной ламиной и деацетилируя контактирующий с ней хроматин, определяют периферийное положение ламина-ассоциированных районов хромосом, мы проводили РНКи «нокдауны» генов гистондеацетилаз *HDAC1* и *HDAC3* в клетках S2 и выясняли, приводит ли это к изменению внутриядерного положения двух хромосомных районов (22A и 60D). Вестерн-анализ с использованием антител к гистондеацетилазе HDAC1 показал заметное снижение количества этого фермента в клетках S2 после РНКи «нокдауна» гена *HDAC1* или совместного «нокдауна» генов *HDAC1* и *HDAC3*. При этом количество ацетилированных гистонов (AcK9H3 и AcK5H4) существенно возросло. При «нокдауне» гена *HDAC3* уровень ацетилирования гистонов практически не менялся. Иммуноокрашивание клеток S2 антителами к AcK9H3 также выявило усиление ацетилирования гистонов при «нокдауне» гена *HDAC1*, но не *HDAC3*.

Анализ расстояний между FISH-сигналами и ядерной ламиной в клетках S2 показал снижение доли сигналов в периферическом слое ядер толщиной 0.4 μm для района 60D (но не 22A) при совместном «нокдауне» генов *HDAC1* и *HDAC3*, либо при «нокдауне» гена *HDAC3*. В то же время, при «нокдауне» гена *HDAC1*, кодирующего основной деацетилирующий гистоны фермент, неожиданно наблюдалось наоборот приближение районов к ядерной оболочке.

Таким образом, у дрозофилы как и у млекопитающих гистондеацетилаза HDAC3 определяет локализацию неактивных участков хромосом на периферии ядер. В то же время, увеличение степени ацетилирования гистонов, как оказалось, не является достаточным для существенного смещения районов с периферии внутрь ядер.

УСЛОВНЫЕ МУТАЦИИ У *D. MELANOGASTER*: ОСОБЕННОСТИ ЛОКАЛИЗАЦИИ И ВТОРИЧНОГО МУТИРОВАНИЯ

Чадов Б.Ф., Федорова Н.Б., Чадова Е.В.

Институт Цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия

Условные мутации – особый класс мутаций: мутация проявляется в одном генотипе и не проявляется - в другом [1]. На дрозофиле разработано несколько способов выделения условных мутаций и создана коллекция мутантов. Предполагается, что в виде условных мутаций проявляются мутации регуляторных генов, ответственных за образование признаков внутривидового сходства [2].

Условные мутации обладают комплексом свойств, не присущих мутациям обычных (менделевских) генов. Это: 1) доминантный характер проявления; 2) зависимость проявления от наличия перестроек в геноме; 3) индукция нестабильности генома (потеря хромосом, вторичный мутагенез, нарушения онтогенеза в виде морфозов, образование модификаций и др.); 4) родительский эффект в наследовании; 5) изменение энергетики организма [3].

В данной работе сообщается ещё о двух особенностях условных мутаций. Первая выявилась в процессе локализации полученных мутаций на карте политенных хромосом. Вторая – при наблюдении за процессом спонтанного вторичного мутирования в лабораторных культурах мутантов.

Феномен многолокусного дефекта. При помощи стандартной процедуры делеционного картирования определили расположение на карте политенных хромосом 12 условных мутаций. Наряду с мутациями, показавшими привычное монолокусное расположение (дефект одного района), было выявлено несколько мутаций с полилокусным расположением (дефект нескольких районов). Так из девяти картированных мутаций пять показывали наличие дефекта в одном из районов, а четыре имели более одной точки локализации: две мутации – по три точки и две мутации по две точки. Феномен «полилокальности» наблюдали в прямом и обратном скрещиваниях и подтвердили в повторных экспериментах.

Для трех условных мутаций, полученных в одном опыте, взаимодействие с делециями хромосомы 2 оказалась более сложным. Кроме типичного взаимодействия типа полного отсутствия класса Cu^+ (гибель гетерозиготы «мутация/делеция») появились два других типа взаимодействия. Первый – резкое снижение относительной численности класса Cu^+ , варьирующее в зависимости от направления скрещивания. Второй – замена

класса Su^+ классом с неустойчивым фенотипическим проявлением, также зависящим по численности от направления скрещивания.

Феномен сочетанного мутирования. Условные мутации в X-хромосоме были летальными. Их поддерживали в культурах, содержащих в гетерозиготе инверсию Меллер-5. Типичное потомство состояло из дочерей М-5/М-5 и М-5/мутация, а также сыновей М-5 и сыновей «+», содержащих мутацию. Дочери $+/+$ в потомстве отсутствовали из-за гомозиготности по летали. У сыновей «+», по условиям опыта, летальная мутация не проявлялась. Спонтанный вторичный мутагенез в линиях с условными мутациями характеризовался появлением нового мутантного фенотипа. Оказалось, что новые мутации возникали только в классах потомков, не содержащих М-5. Как правило, это были самки $+/+$. Иными словами, появление мутации в новом локусе сопровождалось исчезновением летального проявления исходной мутации. Феномен образования новой мутации, сочетающейся с потерей летальности исходной мутации, наблюдали и для условных мутаций в хромосоме 2.

Необычную феноменологию объясняем принадлежностью условных мутаций к классу мутаций регуляторных генов. «Полилокальность» условных мутаций является мнимой и вызвана летальным взаимодействием условных мутаций с делециями, использованными при картировании. Те и другие взаимодействуют между собой в гетерозиготе, не являясь оппозитными друг другу. Потерю летальности условной мутации под действием мутации в другом районе также объясняем спецификой проявления регуляторного гена. Его проявление зависит от регуляторных продуктов, вырабатываемых другими генами, находящимися в этом же регуляторном пути. Оба феномена обусловлены одной причиной и дополняют друг друга. Обнаруженная особенность мутагенеза по регуляторным генам демонстрирует возможность закрепления в популяции мутации регуляторного гена в необычной форме, под видом другой мутации.

Литература

1. Чадов Б.Ф., Чадова Е.В., Копыл С.А., Федорова Н.Б. Новый класс мутаций у *Drosophila melanogaster*// Доклады РАН, 2000, Т.373, N5, С.714-717.
2. Чадов Б.Ф., Е.В. Чадова, С.А. Копыл, Е.В. Артемова, Е.А. Хоцкина, Н.Б. Федорова. От генетики внутривидовых отличий к генетике внутривидового сходства. Генетика, 2004. Т.40. №9. С. 1157-1172.
3. Chadov B.F., N.B. Fedorova, E.V. Chadova, E.A. Khotkina. Conditional mutations in *Drosophila*. J. Life Sciences (USA), 2011. V.5, N3, P. 224-240.

ПАРАНЕМИЧЕСКАЯ СПИРАЛИЗАЦИЯ ХРОМАТИД В МЕЙОЗЕ.

СПИРАЛИЗАЦИЯ БЕЗ ЗАКРУЧИВАНИЯ

Чубыкин В.Л., Коломиец О.Л.

Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова, Москва 119991, chubykin@vigg.ru

Для успешной сегрегации во время деления клеток хромосомы претерпевают ряд структурных изменений, приводящих к их упаковке, при этом митотические и мейотические хромосомы индивидуальны и мобильны. Можно выделить ранний нуклеосомный этап упаковки ДНК, средний этап – формирование петлевых структур на основе S/MARs повторяющихся палиндромных последовательностей с использованием конденсинов. Именно на этих уровнях укладки происходят репликация, транскрипция, репарация и рекомбинация ДНК и хромосом. Для позднего этапа упаковки эукариотических хромосом перед их сегрегацией универсальным способом является формирование спиральных структур. В отличие от плектонемической спирали двойной нити ДНК, которая функционально «расплетается» на ограниченном хромосомном участке, хромосомные спирали должны быть паранемическими, т.е. не препятствовать их сегрегации и не нарушать их целостности. Особенно наглядно необходимость этого условия должна выполняться при спирализации тесно связанных когезинами сестринских хроматид гомологов в мейозе, которые беспрепятственно расходятся к противоположным полюсам деления во втором делении мейоза.

Очевидно, что спирали хроматид возникают не в процессе их «наматывания» на некий каркас, а в ходе укладки уже имеющегося каркаса (осевого элемента) протяженной хромосомной структуры в виде спирали с использованием конденсинового механизма. Необходимым условием такой укладки является наличие в исходной структуре регулярных участков взаимодействующих с конденсинами. Такие участки были выявлены в ходе изучения естественной реорганизации структуры синаптонемного комплекса (СК) в диплотене мейоза. После деградации центрального элемента СК, в процессе деградации латеральных элементов СК формируется два единых осевых элемента для каждой двух сестринских хроматид гомологичных хромосом в виде волнообразных фигур. Остаточные латеральные элементы СК в виде плотных участков наблюдаются на вершинах «волн» соответственно только слева или справа. В дальнейшем появляются спиральные структуры без обособления сестринских хроматид.

Предполагаемый механизм упаковки заключается в последовательном образовании конденсиновых связей между параллельно ориентированными и развернутыми в одном направлении «остатками латеральных элементов СК». При этом связанные когезинами

сестринские хроматиды в образовавшемся витке претерпевают два разнонаправленных разворота на 180° , в результате чего суммарное напряжение в каждом витке и в хромосоме в целом отсутствует. После исчезновения когезиновых связей между сестринскими хроматидами они свободно расходятся во втором делении мейоза, оставаясь уложенными в виде спирали. Предложенный механизм упаковки связанных когезинами сестринских хроматид в паранемическую спираль, может быть применим и к митотической спирализации. Основное преимущество такого механизма – принцип самосборки и отсутствие напряжения в хромосомной спирали.

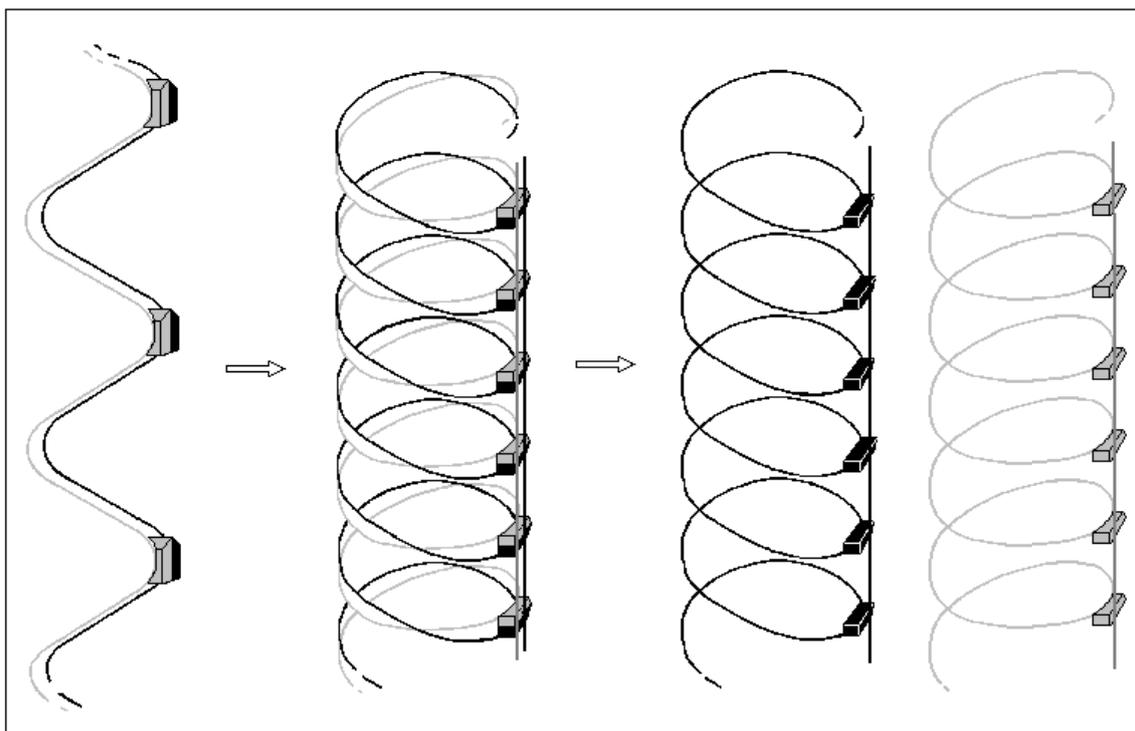


Рис. Механизм упаковки хромосом в паранемическую спираль (пояснения в тексте).

ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИЙ РАЗЛИЧНЫХ ДОМЕНОВ БЕЛКА CHROMATOR НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Шаповалов И.С., Головнин А.К.

Учреждение Российской академии наук Институт биологии гена РАН, Москва,

igor.shapovalov.193.5@gmail.com

Регуляция транскрипции – один из важнейших процессов, обеспечивающих правильную работу генов. Эффективная экспрессия обеспечивается работой ряда регуляторных элементов, таких как сайленсеры, энхансеры и инсуляторы. Одним из известных компонентов Su(Hw)- и dCTCF-зависимых инсуляторов является белок CP190. При поиске партнёров CP190 методом двугибридной дрожжевой системы был обнаружен ранее описанный белок Chromator (Chriz), коиммунопреципитирующийся с белком Z4, участвующим в поддержании бэндов политенных хромосом и регуляции транскрипции.

Методом двугибридной дрожжевой системы были определены участки белка Chromator, взаимодействующие с белком Z4, а также с инсуляторными белками CP190 и Mod67.2; установлена роль С-концевых доменов белка Chromator во взаимодействии с CP190. Chromator коиммунопреципитируется с инсуляторными белками Su(Hw), Mod67.2 и CP190. На политенных хромосомах Chromator колокализуется с белком CP190, в нескольких сайтах – с Mod67.2 (маркер Su(Hw)-зависимых инсуляторов), а также в половине сайтов – с dCTCF (основной компонент dCTCF-зависимых инсуляторов).

Получены генетические конструкции для экспрессии в *Drosophila melanogaster* гена *Chromator* с делециями различных доменов. Было установлено, что линии мух с интегрированной конструкцией, содержащей полноразмерную кДНК *Chromator*, выживают при отсутствии эндогенного белка. Делеция домена, отвечающего за взаимодействие с Z4, приводит к сильному снижению выживаемости: практически все особи погибают на куколочной стадии. Делеция домена, обеспечивающего взаимодействие с белками CP190 и Mod67.2, незначительно снижает выживаемость. Планируется оценка изменения уровня экспрессии генов, промоторы которых связывают Chromator, на фоне делеции различных доменов белка.

НОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ И ИХ РОЛЬ В ВОЗНИКНОВЕНИИ И ЭВОЛЮЦИИ РОДА *НОМО*

Шематорова Е.К., Шпаковский Д.Г., Долудин Ю.В., Шпаковский Г.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, г. Москва, gvs@ibch.ru

Важным источником эволюционных инноваций являются хромосомные перестройки. Исследования последних лет показали, что важнейшую роль в эволюции сложных, уже сложившихся высокоорганизованных геномов играют сегментные дубликации, способствующие возникновению новых генных семейств и, как следствие, ускорению эволюционного процесса. Среди такого рода перестроек наиболее частыми и ценными являются внутрехромосомные дубликации целых генов или их протяжённых фрагментов. С позиций антропогенеза наибольший интерес представляют относительно недавние, специфичные для высших приматов, дубликации.

Мы изучили молекулярную эволюцию генов *POLR2J* системы транскрипции и *PMS2* системы репарации MMR и показали, что появление и совершенствование генетической структуры обоих этих генных семейств чётко коррелируют с основными этапами биологической эволюции высших приматов. Это позволяет рассматривать семейства генов *PMS2* и *POLR2J* в качестве удобных и достоверных молекулярных маркеров антропогенеза (*Генетика*, 2010, **46**: 1254-1257). Для того, чтобы понять роль новых генов РНК-полимеразного хозяйства *POLR2J2* и *POLR2J3* в дивергенции систем регуляции генной экспрессии у человека мы с помощью генетического (дрожжевая двухгибридная система) и биохимических (соосаждения белков из клеточных лизатов, иммунопреципитация) подходов провели поиск белков-партнёров целого ряда специфических для человека белков (hRPB11b α , hRPB11b β и hRPB11c α , hRPB11c β), продуцируемых в результате экспрессии этих эволюционно молодых генов в нервной (эмбриональный мозг) и иммунной (клеточная линия Jurkat) тканях *Homo sapiens*.

Наличие среди партнёров близкородственных белков hRPB11b α и hRPB11c α (115 а.о.) ряда субъединиц ядерных РНК-полимераз (hRPB3, hRPB6, hRPC40), общих и специализированных факторов транскрипции (ATF4, COMMD4d, ART-27, BTF3), а также белков, связанных с хроматином и РНК (Cullin 4a, POLA1, гистон с «макро»-доменом H2A1, L1-ORF1p) указывает на то, что эти белки являются минорными изоформами субъединицы РНК-полимеразы II hRPB11 и входят в состав специфических РНК-полимеразных комплексов. Впервые обнаружены взаимодействия hRPB11b α и hRPB11c α сразу с несколькими субъединицами фактора инициации трансляции hEIF3 (eIF3a, eIF3i, eIF3m α и

eIF3m β), что указывают на существование у *Homo sapiens* нового типа координации транскрипции с последующими этапами генной экспрессии (транспорт мРНК из ядра в цитоплазму к транслирующим рибосомам) и на возможное существование ядерных субкомплексов hEIF3 (*Биохимия*, 2011, **76**: 1195-1200). Такие субкомплексы, вероятно, могут участвовать в «защите» и транспортировке из ядра в цитоплазму тех мРНК, которые транскрибируются РНК-полимеразой II, содержащей минорные изоформы hRPB11b α или hRPB11c α в своем составе.

Среди белков-партнёров сходных между собой изоформ hRPB11b β и hRPB11c β (116 а.о.) нами обнаружены субъединица РНК-полимеразы II hRPB6, новый, ранее не описанный вариант ядерной рибонуклеазы III DROSHA, коровый компонент белкового комплекса экзонных сочленений EJC (Exon-exon Junction Complex) Y14 (RBM8A), а также белки DCAF и EIF6. Наличие в этом списке особого варианта иницирующей нуклеазы процессинга микроРНК (miRNAs) DROSHA и участвующих в биогенезе и регуляции функционирования микроРНК белков EIF6 и Y14 (RBM8A) указывает на новый тип сопряжения процессов транскрипции и РНК-интерференции у *Homo sapiens*.

Поскольку ряд обнаруженных нами среди партнёров минорных субъединиц РНК-полимеразы II человека белков, например eIF3m β и COMMD4d (см. выше), оказались новыми, ранее не описанными компонентами протеома человека, мы провели поиск партнёров и этих белков. Среди таких партнёров оказались субъединица eIF3f фактора инициации трансляции hEIF3, предшественник двух нейропептидов preproGAL (препрогаланин), важные регуляторы клеточного цикла E2F1, 14-3-3 и ING5, а также ряд белков шапероновых комплексов, прежде всего TRiC (TCP1 ring complex). Интересно, что один из шаперонинов этого комплекса, белок CCT4 (SRB), взаимодействует и с eIF3m β , и с COMMD4d. Обнаруженное перекрывание спектров взаимодействий у этих впервые обнаруженных компонентов протеома человека, которые являются белками-партнёрами изучаемых нами минорных изоформ РНК-полимеразы II *Homo sapiens*, служит добавочным аргументом в пользу существования у представителей нашего рода особых, сформированных в ходе эволюции транскрипционных комплексов с новыми свойствами.

Начат поиск генов *Homo sapiens*, которые транскрибируются РНК-полимеразой II, содержащей минорную изоформу hRPB11b α в своем составе. С помощью метода ПЦР в реальном времени и других подходов найдены первые мРНК, считываемые такими новыми транскрипционными комплексами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 10-04-01100) и программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (направление «Функциональная геномика»).

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

Akhtar W.	7	Vershinin A.V.	11
Albert F.W.	9	Von Stetina J.R.	18
Alexander J.	18	Wessels L.	7
Archiadiacono N.	24	Xia A.	21
Babenko V.N.	8	Zakharenko L.P.	26
Bell G.W.	18	Zhou Z.	14
Bosso G.S.	10	Адонин Л.С.	28
Bulatova N.Sh.	16	Адонина И.Г.	171
Burla R.	20	Ажикина Т.Л.	42
Cagan A.	9	Амосова А.В.	173
Cenci G.	10, 20	Ананьина Т.В.	118
Ciapponi L.	20	Андреева Е.Н.	30
Cipressa F.	10	Андреев О.В.	86
de Jong J.	7	Андреев Н.Г.	110
deBruyn B.S.	23	Анохин Б.А.	130
Dorogova N.V.	26	Артемов Г.Н.	32, 34, 54
Duca E.	13	Ахмерова Л.Г.	68
Elisafenko E.A.	11	Ацаева М.М.	36, 157
Evtushenko E.V.	11	Баклушинская И.Ю.	38
Fedorova S.A.	26	Беклемишева В.Р.	40, 167
Ferguson-Smith M.	25	Беломестных Т.В.	42
Gatti M.	20	Беляева Е.С.	93, 110, 117
Giovannotti M.	25	Белякин С.Н.	44, 117, 126, 133
Graphodatsky A.	15, 25	Беляков В.К.	45
Heck M.M.S.	13	Белянина С.И.	47
Janiszewski M.M.	13	Бернард М.	171
Kamali M.	21	Билтуева Л.С.	49
Kashevsky H.	18	Бисултанова З.И.	50
Kichigin I.G.	25	Богданов Ю.Ф.	52, 181
Kinney N.A.	22	Болдырева Л.В.	93, 110
Kokoza V.A.	14	Бондаренко С.М.	54
Kosyakova N.	15	Борисов Ю.М.	56
Kratochvil L.	25	Брошков А.Д.	84
Lavrenchenko L.A.	16	Бугров А.Г.	58
Levitsky V.G.	11	Булатова Н.Ш.	60, 155, 157
Liehr T.	15, 17	Буренкова Н.Н.	68
Mkrtchyan H.	15	Буркова В.Н.	185
Morciano P.	10	Бутовская М.Л.	185
Nadjafova R.S.	16	Быков В.А.	173
Nelson B.	13	Быченко О.С.	42
Nordman J.	18	Василевская Е.В.	120
O'Brien P.	25	Васильев В.А.	185
Onufriev A.V.	22	Вассерлауф И.Э.	62
Orr-Weaver T.L.	18	Васькова Е.А.	64
Paabo S.	9	Вафина Г.Х.	98, 191
Pagie L.	7	Вебер-Лотфи Ф.	139
Pindyurin A.V.	7, 19	Величко А.К.	65
Plyusnina I.	9	Вершинин А.В.	115, 128
Pokorna M.	25	Вершинина А.О.	66
Raffa G.D.	10, 20	Веряскина Ю.А.	68
Raikhel A.S.	14	Войцицкий В.Е.	68
Rao S.G.	13	Волкова Е.И.	86
Rens W.	25	Вольдгорн Я.И.	70
Rocch M.	24	Воробьева Н.В.	49
Saggio I.	20	Воробьева Н.Е.	71, 122, 131
Schoneberg T.	9	Гаврилов А.А.	73
Severson D.W.	23	Гагинская Е.Р.	124
Sharakhov I.V.	21, 22, 23	Гайнер Т.А.	75
Sharakhova M.V.	23	Георгиева С.Г.	71, 114
Sher N.	18	Гладких О.Л.	167
Shin S.W.	14	Глазков М.В.	77
Stanyon R.	24	Головнин А.К.	208
Timoshevskiy V.A.	23	Гольгина В.В.	79, 84
Trifonov V.A.	15, 25	Гончаров Ф.П.	93, 110
Trut L.	9	Гончарова А.А.	86
Tu Z.	21	Гохман В.Е.	80
van Lohuizen M.	7	Графодатский А.С.	38, 40, 123, 167
van Steensel B.	7, 19	Григорьева Е.В.	64, 96

Гришаева Т.М.	82	Коханенко А.А.	118
Гуляева Л.Ф.	68	Коцербуба В.В.	165
Гундерина Л.И.	84	Красикова А.В.	120
Гурский Д.Я.	114	Краснов А.Н.	71, 122, 131
Гущанская Е.С.	73	Кузнецов А.Б.	45
Дадашев С.Я.	36, 181	Кузнецова В.Г.	130
Демаков С.А.	86, 93	Кулемзина А.И.	123
Демакова О.В.	93	Куликова Т.В.	124
Дементьева Е.В.	64	Кулинченко М.В.	139
Демин С.Ю.	28	Лавров А.В.	70
Джаст В.	38	Лактионов П.П.	44, 126, 139
Диетриш А.	139	Лебедев В.С.	137
Добровольская О.Б.	171	Лебедев И.Н.	104, 151, 178
Долудин Ю.В.	209	Левицкий В.Г.	128
Драскович И.	91, 141	Лемская Н.А.	167
Дружкова А.С.	88	Лондоно А.	91, 141
Дубатолова Т.Д.	90, 135, 196	Лукина Н.А.	147
Евтушенко Е.В.	115	Лухтанов В.А.	66, 130
Елисафенко Е.А.	180	Ляпунова Е.А.	38
Ермолаева О.В.	84	Мабула А.	185
Жданова Н.С.	91, 141	Мазина М.Ю.	122, 131
Жимулёв И.Ф.	68, 93, 110, 117	Макасе А.А.	112, 132
Загоскина Т.П.	149	Максимов Д.А.	44, 117, 126, 133
Задесенец К.С.	94	Максимова Н.В.	115
Закиян С.М.	64, 96	Макунин А.И.	134
Захарова И.С.	96	Малахова А.А.	96
Зверева М.Э.	91	Малыгин В.М.	137
Зеленин А.В.	173	Мамонтов А.М.	187
Земцова Л.В.	173	Мантурова Н.Е.	45
Злотина А.М.	120	Марилловцева Е.В.	135
Зыкова Т.Ю.	86, 93, 110	Маслова А.В.	120
Ибрагим Н.	139	Матвеевский С.Н.	38, 137, 157
Иванов М.К.	68	Метельская Д.Н.	112
Иванов Р.С.	98, 191	Милешина Д.В.	139
Иванов Ю.Н.	100	Минина Ю.М.	91, 141
Иванова Э.А.	98, 191	Михайлова Е.И.	143, 189
Игнатьева М.А.	112	Михалева Е.А.	202
Йоффе Б.	106	Монахова М.А.	45
Кайгородова И.А.	145	Мордвинов В.А.	94
Кангидзе О.Л.	65	Морозова К.Н.	106
Карамышева Т.В.	91, 94, 141	Муравенко О.В.	173
Каримова О.Г.	75	Набирочкина Е.Н.	71
Карпова Л.М.	98	Назаренко Л.П.	104
Картавцева И.В.	103, 169	Назаренко М.С.	178
Катохин А.В.	94	Найден А.В.	28
Катышев А.И.	139	Натяганова А.В.	145
Кашеварова А.А.	104	Некрасова А.А.	147
Кикнадзе И.И.	79, 84	Ненашева В.В.	202
Ким Е.С.	165	Ни В.	40
Киреев И.И.	73	Николаев Д.А.	86
Кирильчик С.В.	42, 115, 187	Николенко Ю.В.	71
Киселева Е.В.	106	Ново К.	91
Клименко Е.С.	139	Носов Н.Н.	165
Клименков И.В.	108	Овсепян В.А.	149
Козлов В.В.	68	Олюшина Д.И.	151, 178
Колесников Н.Н.	68	Омельянчук Л.В.	90, 135
Колесникова Т.Д.	110	Орлов В.Н.	153, 175
Коломиец О.Л.	36, 38, 137, 157, 181, 206	Павлова С.В.	64, 155, 157
Конев А.Ю.	112, 132	Пастухов М.В.	108
Конева Н.Д.	147	Перельман П.Л.	40, 167
Константинов Ю.М.	139	Петрина Т.Н.	40
Копыл С.А.	90, 135	Петрова Н.В.	65
Копытова Д.В.	114	Подгорная О.И.	28
Корноухова А.Г.	36	Покровский Д.К.	112
Коробицына К.В.	103	Полторадня Ю.А.	112
Королева А.Г.	115	Поплавская Н.С.	137
Коряков Д.Е.	44, 117	Попова Д.А.	120
Косицын Н.С.	108	Похолкова Г.В.	117
Котлованова Л.В.	112	Праздников Д.В.	159
Котова А.В.	28	Пунина Е.О.	165

Разин С.В.	65, 73	Черникова В.В.	139
Райдер О.А.	123	Чечеткина Н.Н.	104
Раутиан М.С.	161	Чубыкин В.Л.	206
Рафаилов А.М.	163	Шалуб Б.	171
Рафаилова М.А.	163	Шаповал Н.А.	130
Родионов А.В.	165	Шаповалов И.С.	208
Рожнов В.В.	40	Шевелев Ю.Я.	202
Романенко С.А.	38, 155, 167	Шевченко А.И.	64, 96
Росин В.А.	149	Шематорова Е.К.	209
Рослик Г.В.	169	Шибалев Д.В.	185
Рубцов Н.Б.	91, 94, 141	Шидловский Ю.В.	71
Рысков А.П.	185	Шлома В.В.	30
Саженова Е.А.	104, 151	Шмаков В.Н.	139
Салина Е.А.	171	Шпаковский Г.В.	209
Салюкова О.А.	104	Шпаковский Д.Г.	209
Саматадзе Т.Е.	173	Щербань А.Б.	171
Сапунов Г.А.	32, 34	Юдкин Д.В.	40
Саруханян М.С.	62	Янг Ф.	40, 123, 167
Сафронова Л.Д.	175	Яровая О.В.	73
Семешин В.Ф.	86		
Сергеев Е.Г.	175		
Сергеева Е.М.	171		
Сердюкова Н.А.	155, 167		
Сидоров И.А.	42		
Сидоров С.В.	68		
Сизова Т.В.	177		
Ситникова Т.Я.	115		
Скворцов Д.А.	91		
Скоров В.В.	42		
Скрябин Н.А.	104, 151, 178		
Скуридина Е.Г.	106		
Сметанина М.А.	96		
Смирнов А.Ф.	147		
Соловей И.	106		
Сорокин М.А.	180		
Сороковикова Н.В.	145		
Соснихина С.П.	189		
Спангенберг В.Е.	181		
Стегний В.Н.	32, 34, 54, 62, 118, 183		
Судаков Н.П.	108		
Сурдий П.	171		
Суров А.В.	137		
Суслина С.Н.	173		
Суханова Л.В.	42, 187		
Суходольская Е.М.	185		
Сычева В.Б.	153		
Тагирова М.К.	45		
Терещенко О.Ю.	200		
Тетерина В.И.	187		
Тимошкин О.А.	115		
Титов С.Е.	68		
Толкачева А.В.	189		
Толмачёва Е.Н.	104, 151		
Трифонов В.А.	123, 167		
Тропынина Т.С.	191		
Трухина А.В.	147		
Тюняев А.А.	193		
Усов К.Е.	62		
Уфимцева Е.Г.	196		
Федорова Н.Б.	204		
Федотова А.А.	202		
Фергюсон-Смит М.А.	123, 167		
Филинкова Т.Н.	198		
Хлесткина Е.К.	200		
Хорошко В.А.	93		
Целебровский М.В.	202		
Чадов Б.Ф.	204		
Чадова Е.В.	204		
Черемных А.Д.	104		
Черепанова Е.В.	175		