

# ДИНАМИКА СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПЕТЕЛЬ ХРОМАТИНА В ПРОФАЗЕ I МЕЙОЗА ЧЕЛОВЕКА

Коломиец О.Л., Спангенберг В.Е.

ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

[v.spangenberg@gmail.com](mailto:v.spangenberg@gmail.com)

*Предложена модель взаимодействия петель сестринских и несестринских хроматид на ранних стадиях профазы I мейоза, возможно, связанного с репарацией двунитевых разрывов ДНК. Предполагается, что в обеспечении контактов несестринских петель хроматина может играть роль «твист» - взаимное перекручивание латеральных элементов СК, а также особенности строения молекул белков синаптонемного комплекса – SCP3 и SCP1, участки которых скручены в спираль.*

## Введение

Начиная с премейотической интерфазы и на протяжении лептотены, происходит ряд процессов, обеспечивающих сближение и точное спаривание гомологов. На стадии ранней лептотены под действием специфических для мейоза эндонуклеаз (главным образом Spo11), возникают множественные двунитевые разрывы молекул ДНК (double-strand breaks, DSBs). Одновременно происходит взаимное узнавание отдельных локусов гомологичных хромосом и их попарное соединение (pairing). Формирование DSBs – это первый шаг многоэтапного процесса генетической рекомбинации, которая завершается лишь к концу стадии пахитены. Формирование СК идет параллельно с процессингом DSBs. В частности, параллельно с формированием структур Холлидея, в котором участвуют RecA-подобные белки-ферменты Rad51 и Dmc. Эти белки локализируются в специальных компартментах СК, так называемых ранних мейотических узелках (Kleckner, 2006).

Известна последовательность включения белков в осевой элемент каждой хромосомы. Р. Моенс назвал формирование «букета» началом «романтических» отношений между гомологичными хромосомами (Moens et al., 1989).

Однако тесный контакт собственно петель хроматина двух гомологов визуально не наблюдал никто. Не описана динамика структурных изменений петель хроматина на разных стадиях профазы I мейоза. FISH на препаратах распластанных ядер сперматоцитов I проводят, как правило, с целью локализации определенных генов в структуре мейотических хромосом (Peterson, 1999; Belonogova et al., 2006; Pigozzi et al., 2007) или локализации повторяющихся последовательностей ДНК (Hernández-Hernández et al., 2008, 2010).

Визуализировать с помощью FISH четыре петли хроматина в соответствии с четырьмя хроматидами, объединенными с помощью СК в один профазный бивалент, до сих пор не удавалось. Вместе с тем, попытки визуализировать отдельные петли хроматина на разных стадиях мейоза предпринимались некоторыми авторами. Так, Барлоу и Халтен (Barlow & Hulten, 1996, 1998) использовали комбинацию нескольких методов для исследования хроматина ооцитов и сперматоцитов человека при гибридизации с разными ДНК-зондами и после пейнтинга хромосомы 18. Этим авторам не удалось идентифицировать отдельные петли хроматина. Хроматин формировал гранулированное «гало» вокруг СК. Уникальная ДНК-космидная проба длиной 55кб (21q22.3) после FISH выявлялась как точки снаружи от СК. FISH-сигналы имели гранулированный вид, что, вероятно, является отражением конденсации хроматина целевой ДНК, а, возможно, и фиксации препаратов параформальдегидом. Хенг с соавторами (Heng et al., 1996) при использовании протяженных зондов на основе ВАС-клонов размером от 30 до 160 т.п.н. на распластанных сперматоцитах мыши показали, что гибридизационный сигнал выглядит как единственная линия, перпендикулярная к латеральному элементу.

Пигоцци (Pigozzi, 2007) продемонстрировал в распластанных ядрах ооцитов цыпленка гибридационный сигнал в виде одной утолщенной нити, поперек пересекающей СК. Пигоцци комментирует этот результат так: «sister loops are held together», подчеркивая, что сестринские петли хроматина не отделены друг от друга.

При использовании протяженных зондов на основе ВАС-клонов на распластанных сперматоцитах мыши было показано, что гибридационный сигнал выглядит как 2 линии, перпендикулярно отходящие от ЛЭ СК (Froenicke et al., 2002). Как и Пигоцци, эти авторы предполагают тесную связь петель сестринских хроматид каждого гомолога: «sister chromatids have not separated».

Изредка наблюдалось некоторое раздвоение этих линейных сигналов на концах (Froenicke et al., 2002). На препаратах ооцитов цыпленка раздвоение единой линии также наблюдали на периферии петель мейотической хромосомы, на удалении от СК (Pigozzi, 2007). Сцепление петель сестринских хроматид когезиновыми комплексами лишь отчасти объясняет наблюдаемую картину.

В целом, в исследованиях фрагментов ДНК, гибридованных с флуоресцентными зондами (Heng et al., 1994; Heng & Tsui, 1998; Froenicke et al., 2002; Pigozzi, 2007), те или иные длинные (порядка 50-200 т.п.н.) ДНК FISH-зонды давали похожие морфологические структуры. Гибридационные сигналы наблюдались как латеральные нитевидные структуры хроматина. Чётких картин именно петель хроматина выявлено не было ни в одной работе. Тем не менее, во всех моделях СК (Nebel and Coulon, 1962; Zickler, Kleckner, 1999; Stack, Anderson, 2001) фигурирует организация хроматина в виде распластанных петель, прикрепленных к латеральным элементам СК.

## Материалы и методы

**1. Объектом исследования** служили сперматоциты I порядка человека, полученные с информированного согласия пациентов, проходивших процедуру микродиссекции ТЕСЕ в ФГБУ ЭНЦ Минздрава РФ с целью получения зрелых сперматозоидов для ЭКО. Нами использованы семенные каналцы, оставшиеся после изъятия сперматозоидов

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

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

4. Метод флуоресцентной гибридизация in situ (FISH). В качестве ДНК-зондов к хромосоме 17 человека использованы две локус-специфичные микроделеционные пробы (XL RAI1 – тест на синдром Miller-Dieker и PFAH1B1 – тест на синдром Smith-Magenis, <http://www.metasystems-international.com>). Препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axioimager D1 (Carl Zeiss, Германия) с наборами фильтров для DAPI (Zeiss Filter set 1), для FITC (Zeiss Filter set 38HE) и для Texas Red (Zeiss Filter set 43HE), оснащенного камерой AxioCam HRm (программное обеспечение Axiovision rel. 4.6, Германия).

## Результаты и обсуждение

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

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

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

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

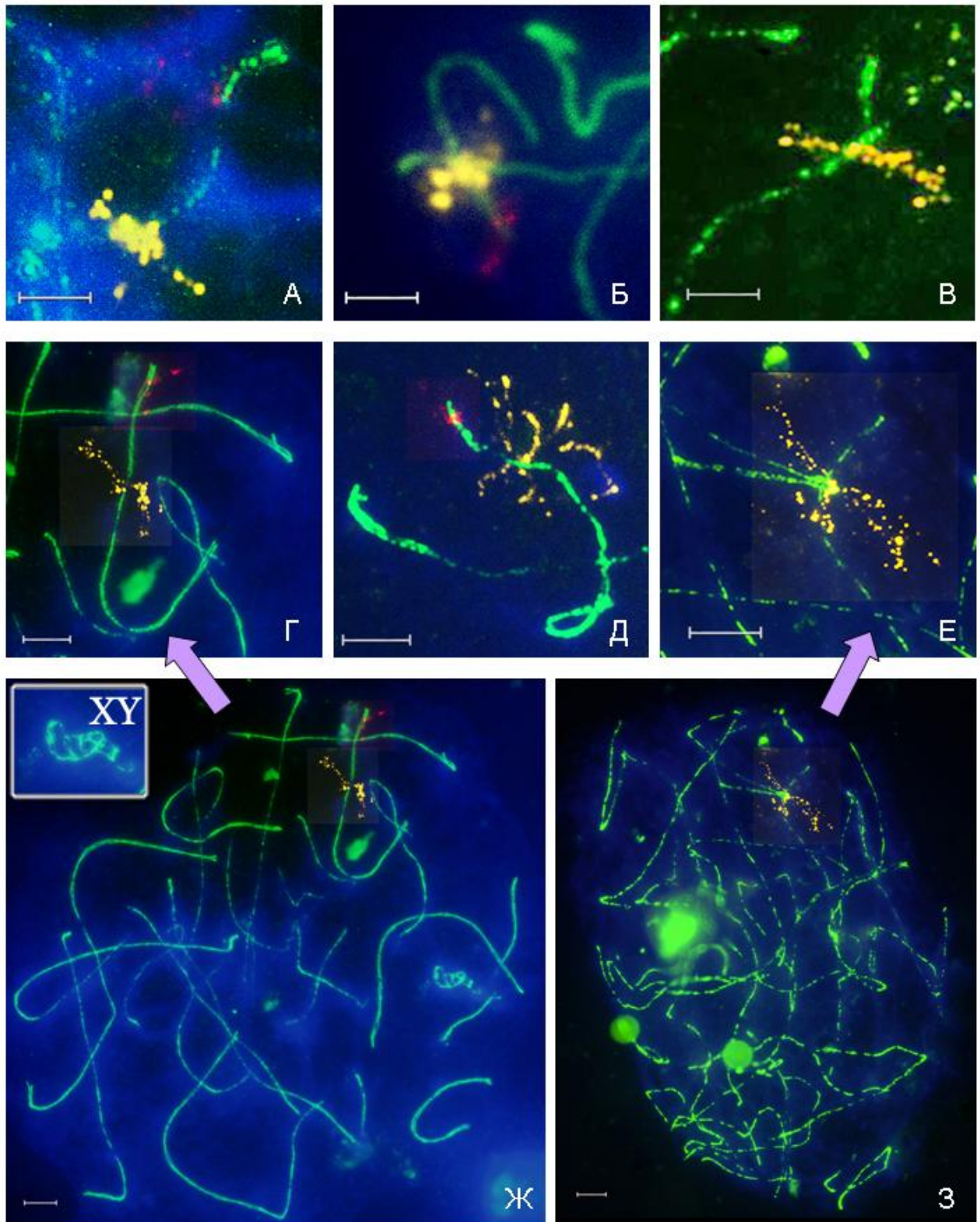


Рисунок 1. Динамика структурной организации фрагментов петель хроматина. Ядра сперматоцитов человека распластаны на разных стадиях профазы I мейоза. FISH-анализ с ДНК-зондами к уникальным фрагментам хромосомы 17 длиной 160 т.п.н. и 90 т.п.н. Окрашивание DAPI (синий), СК (зеленый); FISH с ДНК-зондом 160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



бивалент; 3 — тотальный препарат СК, поздняя диплота. Подробное описание динамики структуры петель хроматина в ядрах сперматоцитов см. в тексте (стр. 7). Bar — 5 мкм.

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

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

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

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

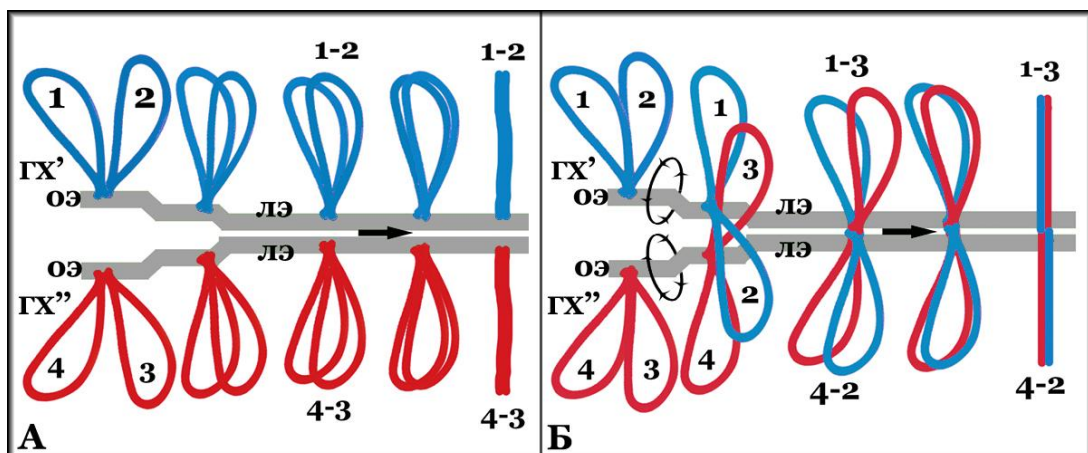


Рисунок 2. Модель взаимодействия сестринских и несестринских петель хроматина в профазе I мейоза. 1, 2 - сестринские петли гомолога GX'; 3, 4 - сестринские петли гомолога GX''.

*ГХ''*; *ОЭ* – осевые элементы гомологов *ГХ'* и *ГХ''*; *ЛЭ* – латеральные элементы СК.

Стрелками показано возможное движение осевых элементов хромосом.

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

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

Нами предложена собственная модель взаимодействия петель сестринских и несестринских хроматид на ранних стадиях профазы I мейоза, возможно, связанного с репарацией двунитевых разрывов ДНК (Рисунок 2). Предполагается, что в обеспечении контактов несестринских петель хроматина может играть роль «твистинг» - взаимное перекручивание латеральных элементов СК, а также особенности строения молекул белков синаптонемного комплекса – SCP3 и SCP1, участки которых скручены в спираль (Seo et al., 2013; Meuwissen et al., 1992).

Предложенная нами модель дополняет модель Page & Hawley (Page & Hawley, 2001), акцентируя внимание на взаимодействии как сестринских (Рисунок 2, А), так и несестринских (Рисунок 2, Б) петель хроматина в ранней профазе I мейоза.

Постепенная декомпактизация и разворачивание петель хроматина происходят на стадиях средней пахитены - ранней диплотены. По времени это явление совпадает со временем активации транскрипции нескольких сотен генов в мейозе у самцов млекопитающих (Waldman Ben-Asher et al., 2010). Эта активация обусловлена необходимостью обеспечения постмейотической дифференцировки половых клеток. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-02-071а.

## Литература

1. Barlow Al. Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I human // *Chromosome Res.* – 1996. – 4. – 8. – P.562–73.
2. Belonogova, N. M. Identification of all pachytene bivalents in the common shrew using DAPI-staining of synaptonemal complex spreads // *Chromosome Research.* – 2006. –14. – P.673– 679.
3. Fedotova, Yu. S. Synaptonemal complex transformations in rye microsporocytes at diplotene stage of meiosis // *Genome.* –1989. – V.32. – №5. – P.816–823
4. Froenicke, L. Male mouse recombination maps for each autosome identified by chromosome painting // *Amer. J. Hum. Genet.* – 2002. – 71. – P.1353—1368.
5. Heng, H. Organization of heterologous DNA inserts on the mouse meiotic chromosome core // *Chromosoma.* – 1994. – 103. – P.401—407.
6. Heng, H. H. High resolution free chromatin/ DNA fiber fluorescent in situ hybridization // *J. Chromatogr. A.* – 1998. – 806. – P. 219—229.
7. Hernandez–Hernandez, A. Differential distribution and association of repeat DNA sequences in the lateral element of the synaptonemal complex in rat spermatocytes // *Chromosoma.* – 2008. – 1171. – P.77–87.
8. Moens, P. B. Satellite DNA I in chromatin loops of rat pachytene chromosomes and in spermatids // *Chromosoma.* – 1989. – 98. – 4. – P.287–294.
9. Kleckner, N. Chiasma formation: chromatin axis interplay and the role(s) of the synaptonemal complex // *Chromosoma.* – 2006. – 115. – P.175–194.
10. Meuwissen R. L., Offenbergh H. H., Dietrich A. J., Riesewijk A., van Iersel M., Heyting, C. (). A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J.* – 1992., – 11. – P. 5091–5100.

11. *Nebel B. R.* The fine structure of chromosomes in pigeon spermatocytes // *Chromosoma*. – 1962. – 13. – P.272—291.
12. *Peterson D.G.*, Localization of single- and low-copy sequences on tomato synaptonemal complex spreads using fluorescence in situ hybridization (FISH) // *Genetics Society of America*. – 1999. – Vol. 152. – P.427–439.
13. *Pigozzi, M. I.* Localization of single-copy sequences on chicken synaptonemal complex spreads using fluorescence in situ hybridization (FISH // *Cytogenetic and genome research*. – 2007. – 119. – 1–2. – P.105–112.
14. *Seo E. K., Kim T. W., Park H.H.* Expression, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of SCP3 coiled-coil domain // *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. – 2013. – № 69 – (Pt 11) – P. 1281-1283.
15. *Stack, S. M.* A model for chromosome structure during the mitotic and meiotic cell cycles // *Chromosome*. – 2001. – Res. 9. – P.175–198.
16. *Waldman Ben-Asher, H.* Expression and chromosomal organization of mouse meiotic genes // *Mol. Reprod. Develop.* – 2010. – 77. – P.241—248.
17. *Zickler, D.* Meiotic chromosomes: integrating structure and function // *Annu. Rev. Genet.* – 1999. – 33. – P.603–754.
18. *Коломиец, О.Л.* Естественная деградация синаптонемных комплексов на стадии диплотены мейоза позволяет анализировать организацию его ультраструктурных компонентов // *Биологические мембраны*. – 2001. – Т. – 18. – С.230–249.