Министерство науки и высшего образования Российской Федерации НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ) Институт биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства Кафедра генетики и клеточной биологии

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК

Руководитель ООП д-р биол. наук, дон. _____Д.С. Воробьев подпись «<u>11</u>» <u>06</u> 20<u>21</u>г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА БАКАЛАВРА

ВЗАИМОРАСПОЛОЖЕНИЕ ТОЧЕК РАЗРЫВА ПОЛИМОРФНОЙ ИНВЕРСИИ 2R1 В ПРОСТРАНСТВЕ ЯДЕР ТРОФОЦИТОВ *ANOPHELES MESSEAE*

по направлению подготовки 06.03.01 Биология

Пацкан Иван Андреевич

Руководители ВКР

канд.	биол.	наук,	доц.	каф.
генети	іки	И	клетс	чной
биоло	гии			
Ahonn	A	. А. Ко	ханен	ко
подписы	>			
« <u>11</u>	» <u> </u>	2	20 <u>21</u> г.	

Автор работы

студе	ент	группь	I № 01701
B		И	. А. Пацкан
подпи	СЪ		
« 11	>>	OB	20 <mark>2/</mark> г.

ОГЛАВЛЕНИЕ 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР......6 Инверсионный полиморфизм An. messeae s.l......6 1.1 1.1.2 Инверсионный полиморфизм у малярийных комаров Ап. 1.1.3 Морфологические признаки для верификации хромосом и типов их инверсий у An. messeae s.l. 12 Пространственная организация ядра.....13 1.2.3 Пространственная организация политенных хромосом у 2.12.2 Приготовление сухо-воздушных препаратов хромосом клеток 2.3 Метод микродиссекции политенных хромосом An. messeae s.l...27 2.6 Приготовление ДНК-зондов точек разрыва полиморфной 2.7 Двуцветная 3D флуоресцентная in situ гибридизация (3D FISH) ДНК-проб районов точек разрыва полиморфной инверсии 2R₁ An. messeae

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ 35

s.l. с политенными хромосомами клеток слюнных желез An. messeae s.l...31

3.	1 Приготовление	лактоаце	торсеиновы	ах препаратов	хромосом
слюнны	х желез An. messeae	e s.l			
3.2	2 Микродиссекци	я точек	разрыва	полиморфной	инверсии
хромосс	эмы 2R ₁ слюнных ж	елез Ап. т	esseae s.l		
3.	3 Флуоресцентная <i>і</i>	n situ (FISI	H) гибридиз	ация микродисс	екционных
ДНК-проб точек разрыва полиморфной инверсии 2R1 An. messeae s.l 39					
выводы	[46

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННО	Й ЛИТЕРАТУРЫ	47

введение

Двукрылые насекомые, принадлежащие к роду *Anopheles* (Diptera, Culicidae), постоянно приковывают к себе внимание биологов и медиков. Это обусловлено тем, что представители этого рода имеют очень хороший потенциал в качестве модельных объектов для изучения генетических механизмов микроэволюционных событий и изучения пространственной организации ядра клетки.

Пространственной организации ядра уделяется много внимания в последние несколько десятков лет [Стегний и др. 1979, 1987, 2007]. Особо значимым является изучение интерфазных ядер, когда расположение хромосом в ядре клетки имеет важную роль. Пространственная организация генетического материала в ядре интересна не только с точки зрения механизмов регуляции экспрессии генов, но и в исследовании функционирования тканей, органов и в эволюционном аспекте [Стегний и др., 2007; Cremer et al., 2010].

Клетки, содержащие политенные хромосомы, открывают больше возможностей для изучения хромосомных перестроек (инверсий), в том числе для изучения влияния пространственной организации ядра в период интерфазы на механизмы образования инверсий. Малярийные комары комплекса "*maculipennis*", имеют политенные хромосомы в клетках соматической и генеративной системы.

Для некоторых видов *Anopheles*, к настоящему моменту, показан широкий хромосомный полиморфизм [Стегний 1991]. Он обладает важным адаптивным значением. Хромосомные перестройки – инверсии – являются основой цитогенетической адаптации комаров к условиям обитания. Инверсии служат маркерами для определения последствий воздействия различных факторов среды на комаров.

Целью данной работы являлось изучение взаиморасположения точек разрыва полиморфной инверсии 2R₁ An. messeae s.l. в пространстве ядра.

Для достижения цели в рамках ВКР были поставлены следующие задачи работы:

1. Приготовить лактоацеторсеиновые препараты хромосом слюнных желез личинок комаров *An. messeae s.l.* Научиться определять хромосомы с генотипами $2R_{11}$ и $2R_{00}$ полиморфной инверсии $2R_1$ *An. messeae s.l.*

2. Приготовить сухо-воздушные препараты хромосом слюнных желез личинок комаров *An. messeae s.l.* для микродиссекции.

3. Получить микродиссекционные пробы, ключающие точки разрыва полиморфной инверсии 2R₁.

4. Верифицировать полученные ДНК-специфичные пробы, включающие точки разрыва полиморфной инверсии $2R_1$ на препаратах хромосом слюнных желез личинок комаров *An. messeae s.l.* с генотипами $2R_{11}$ и $2R_{00}$ полиморфной инверсии $2R_1$ методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH).

5. Провести двуцветную 3D флуоресцентную *in situ* гибридизацию (3D FISH) с полученными ДНК-пробами на ядрах клеток трофоцитов яичников *An. messeae s.l.* с генотипами 2R₀₀ и 2R₁₁.

6. Проанализировать результаты 3D FISH, оформить иллюстрации для выпускной квалификационной работы и сделать выводы о связи взаиморасположения точек разрыва полиморфной инверсии 2R₁ An. messeae s.l. и образованием инверсии 2R₁.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1Инверсионный полиморфизм An. messeae s.l.

1.1.1 Инверсии. Инверсионный полиморфизм

Инверсия – это тип хромосомных перестроек, который представляет из себя 180 градусов хромосомы. Выделяют поворот на участка перицентрические и парацентрические инверсии. В первом случае инвертированный участок хромосомы включает область центромеры. Во втором – располагается на одном из плечей хромосомы. Инверсии принято обозначать специальными символами. Например, In(I)BE означает, что инверсия «In» локализуется в первой хромосоме «I», инвертированный участок обозначается как «Ве». У особей, являющихся гомозиготными по хромосомах может возникнуть инверсионная петля. У инверсии, в гомозиготных по инверсии особей процесс кроссинговера, в отличие от гетерозигот, проходит нормально. Инверсионный полиморфизм в рамках популяции приводит к накоплению мутаций в инвертированных фрагментах хромосом [Жимулёв, 2007].

Появление инверсии происходит в результате ошибки репарации при повреждении ДНК. Разрывы двойной цепочки ДНК могут образовываться под действием экзогенных (ионизирующее излучение, химиотерапия) И эндогенных (образование свободных радикалов) факторов или быть запрограммированы при мейозе. Процесс репарации ДНК может быть представлен негомологичным соединением разрывов или гомологичной рекомбинацией [Pfeiffer и др., 2000]. В случае негомологичного соединения, инверсия может быть образована за счет ошибочного соединения двух внутрихромосомных разрывов и последующего разворота на 180 градусов участка, который находится между этими разрывами. Гомологичная

рекомбинация может привести к образованию инверсии, если произойдет ошибочный выбор последовательности ДНК, на основе которого происходит процесс репарации поврежденной нуклеиновой кислоты. Гомологичная последовательность в таком случае будет заменена на паралогичную последовательность на этой же хромосоме. В последнем случае необходимым условием для возникновения инверсии является образование двунитевого разрыва ДНК одной ИЗ повторяющихся последовательностей, В распологающихся на одной хромосоме в инвертированном положении по отношению друг к другу [Pfeiffer и др., 2000]. Мобильные генетические элементы, находящиеся в хромосомах, могут участвовать в образовании инверсий. Если в хромосоме располагаются два идентичных мобильных элемента, то между ними может произойти гомологичная рекомбинация, но при условии, что они являются противоположно ориентированными. В ЭТОГО образуется инверсия участка, находящегося результате между мобильными элементами. В зависимости от того, содержит этот фрагмент хромосомы центромеру или нет, инверсия будет перицентрической или парацентрической соответственно [Бородин, Торгашева, 2011].



Рисунок 1 – Схема образования инверсии путем рекомбинации в мобильных генетических элементах. Черным цветом обозначен участок инверсии, красным и желтым – мобильные генетические элементы в противоположной друг другу ориентации [Бородин, Торгашева, 2011]

В случае появления гетерозигот по инверсии, в мейотической клетке одновременно присутсвуют 2 варианта хромосомы: содержащая инверсию и

нормальная, не содержащая инверсию. Гомологичным участкам хромосомы в таком случае найти друг друга проблематично – этому мешает инверсия. В процессе формирования бивалента у гетерозигот по инверссии образуется петля – нелинейная конфигурация, инверсионная которая помогает нивелировать различия в хромосомах у гетерозигот. Для образования инверсионной петли необходимо, чтобы синапсис хромосом образовался как минимум в трех точках: в рамках инвертированного фрагмента и в районах точек разрыва инверсии (на концах участка инверсии). Шанс формирования петли тем выше, чем больше фрагмент хромосомы, подвергшийся инверсии. В случае, когда инверсионная петля не образуется, то появляются линейные биваленты, но с негомологично соединенным районом и сближение происходит с одной или с двух сторон инвертированного фрагмента, который впоследствии спариваются негомологично.



Рисунок 2 – Инверсионная петля, возникающая при полностью гомологичном синапсисе у гетерозигот по инверсии. Буквы обозначают положение гомологичных участков хромосом [Бородин, Торгашева, 2011]

Выявить инверсии можно посредством классического генетического анализа, цитологическим методом и на основе данных секвенирования полного генома [Kirkpatrick, 2010]. Цитологический метод является наиболее применяемым и распространенным.

Обнаружение инверсий впервые произошло в 1921 году Альфредом Стёрвантом, который использовал в качестве метода исследования генетический анализ. Стёрвант обнаружил инвертированный порядок идентичных генов у *Drosophila simulans* по сравнению с *Drosophila melanogaster* [Sturtevant, 1921]. Наличие инверсии можно предположить, если в скрещиваниях обнаруживается нерекомбинирующая часть генома, для этого метода необходимо предварительное генетическое картирование признаков.

Цитологический метод выявления инверсий впервые был применен при изучении политенных хромосом в клетках слюнных желез дрозофил. Двукрылые до сих пор сохраняют статус наиболее удобного объекта для изучения и наблюдения инверсий. Дифференциальная окраска позволяет обнаружить крупные инверсии в метафазных хромосомах у особей из других таксономических групп. Метод флуоресцентной *in situ* гибридизации позволяет анализировать известные варианты полиморфных инверсий.

Накопление определенных мутаций в популяциях происходит по причине инверсионного полиморфизма, при котором мутации накапливаются в инвертированных фрагментах хромосом. В 1936 г. Н. П. Дубинин, Н. Н. Соколов и Г. Г. Тиняков опубликовали результаты анализа хромосомной изменчивости в 20 популяциях *D. melanogaster* из разных регионов Советского Союза. Среди 34,5 тыс. изученных хромосом свыше 5% содержали инверсии. В то же время межхромосомные перестройки не встречались ни разу. Число различных инверсий было ограничено, и каждая из них занимала свой участок видового ареала. Аналогичные выводы одновременно были получены А. Стёртевантом и Ф. Г. Добржанским в популяциях *D. pseudoobscura.* Это указывало на то, что изменение порядка генов может иметь само по себе сильный генетический эффект, вплоть до видообразования. Работы по инверсионному полиморфизму проводятся на очень многих видах [Жимулев, 2007].

1.1.2 Инверсионный полиморфизм у малярийных комаров An. messeae s.l.

Малярийные комары рода являются одной из групп двукрылых насекомых, постоянно приковывающих к себе внимание биологов.

Представители этого рода являются прекрасными модельными объектами для изучения генетических механизмов микроэволюционных событий.

Полиморфизм по парацентрическим инверсиям очень распространен среди представителей отряда Diptera как форма хромосомного полиморфизма популяций [Keyl, 1962; Кабанова и др., 1972; Чубарева, 1974].

Для вида *An. messeae s.l.* к настоящему времени показан широкий хромосомный полиморфизм, имеющий важное адаптивное значение [Стегний, 1991]. На основе метода цитодиагностики ранее была разработана карта политенных хромосом этого вида [Стегний, 1991].

An. messeae *s.l*. _ самый распространенный ВИД комплекса «maculipennis», населяющий почти всю Палеарктику. Вид изучен в географически пунктах практически отдаленных ПО всему ареалу. Популяционный анализ выявил высокую инверсионного степень полиморфизма вида. Обнаружено 9 типов парацентрических инверсий, локализованных во всех трех хромосомах. Инверсии, как генетические маркеры, являются одним ИЗ инструментов выявления воздействия биотических и абиотических факторов на популяционную структуру этих насекомых [Разин и др., 2013].

Инверсии хромосомы 2 относятся к классу широко распространенных по ареалу в гетеро- и гомозиготных формах (рисунок 1). Инверсия по хромосоме 2 (локализована в правом плече) приурочена к центральным и северным популяциям вида. [Стегний, 1991]. В ходе изучения политенных хромосом был обнаружен иисследован инверсионный полиморфизм *An. messeae s.l.* и механизмы его поддержания в пространственно-временном аспекте [Плешкова и др. 1978].



Рисунок 3 – Хромосомные инверсии *An. messeae s.l* в гетеро- и гомозиготном состоянии: а – хромосомные генотипы по инверсиям XL₁, XL₂; б – хромосомные генотипы по инверсии 2R₁; в – хромосомные генотипы по инверсии 3R₁; г – хромосомные генотипы по инверсии 3L₁ [Стегний, 1991]

Межвидовое сравнение по второй хромосоме, опубликованное в исследованиях Стегния В.Н., показало следующее: левое плечо хромосомы идентично у всех изученных видов, по правому плечу второй хромосомы у палеарктических видов обнаружено три структурных типа (рисунок 4б) [Стегний, 1991].

1.1.3 Морфологические признаки для верификации хромосом и типов их инверсий у *An. messeae s.l.*

Ниже приведены основные критерии распознавания хромосом по дисковому рисунку:

1. Хромосома 2

-2R плечо: 2 больших блока (индикатор хромосомного плеча 2R), расширение на конце теломеры в виде шарика (рисунок 4б, 3б). Тип инверсии по 2R определяет относительная направленность и близость одного из 2-х блоков по отношению к теломере. Блоки неодинакового размера. В случае инверсионного типа $2R_{11}$ меньший блок располагается ближе к теломере правого плеча 2 хромосомы, а больший блок – наоборот, дальше. В случае инверсионного типа $2R_{00}$ наблюдается следующая картина: больший блок располагается ближе к теломере правого плеча 2 хромосомы, а меньший блок – наоборот, дальше (рисунок 3б);

-2L плечо: менее окрашенная (бледная) и удлиненная теломера (рисунок 4a);

2. Хромосома 3

-3R: «зебра» из 5 дисков на теломере, образование «птичий глаз», расположение которого относительно теломеры является индикатором типа инверсии (Рисунок 4в, 3в);

-3L: образование блок + «веер» на теломере, образование из скопления дисков в толще плеча хромосомы (рисунок 4г, 3г);

Хромосома X - самая маленькая и утолщенная хромосома (рисунок 4д, 3а).



Рисунок 4 – Хромосомы клеток слюнных желез личинок *An. messeae s.l.*, окрашенных лактоацеторсеином (х40)

Примечание – а – 2L плечо хромосомы 2; б – 2R плечо хромосомы 2; в – 3L плечо хромосомы 3; г – 3R плечо хромосомы 3; д – X-хромосома; 1 – бледная и удлиненная теломера 2L-плеча 2 хромосомы; 2 - два больших блока (индикатор хромосомного плеча 2R 2 хромосомы); 3 - «зебра» из 5 дисков на теломере 3R-плеча 3 хромосомы; 4 - образование блок + «веер» на теломере 3L-плеча 3 хромосомы.

Пространственная организация ядра

1.2.1 Хромосомные территории

Исследования, посвященные изучению пространственной организации хроматина в ядре, в последние десятилетия базируются на таких методах как флуоресцентная *in situ* гибридизации (FISH) и флуоресцентная микроскопия.

Именно ЭТИ методы позволяют качественно визуализировать пространственную структуру хромосом в интерфазном ядре. Было показано, что хромосомы на любом этапе клеточного цикла являются в большей или меньшей степени компактными структурами и занимают определенные, неперекрывающиеся между собой, области ядра, которые назвали «хромосомными территориями» [Cremer et al., 1982]. Наличие в ядре хромосомных территорий было подтверждено В исследованиях С применением молекулярно-биологических (метод Hi-C) и микроскопических (FISH) методов [Lieberman-Aiden et al., 2009; Баттулин и др., 2012].

Пространственная организация ядер у эукариотических организмов основывается на общем периферическом распределении интерфазных хромосом около ядерной оболочки с прикреплением к ней хромосомных [Peric-Hupkes, 2010]. Хромосомной районов территорией называют пространство, которое занимает каждая хромосома. Хромосомная территория – эквивалент конденсированной хромосомы в митозе [Коряков и др., 2009]. Хромосомные территории располагаются в пространстве ядра неслучайным образом [Ананьина, 2005]. Положение хромосом в интерфазном ядре не находится подчинении жестких закономерностей, HO, как правило, гомологичные хромосомы находятся на удаленном расстоянии. Хромосомы меньших размеров с большей вероятностью можно обнаружить в центральной части ядра. Хромосомы крупных размеров чаще находятся на периферии ядра, районы хромосом, обедненными генами. Районы, где расположены обогащенные генами, чаще находятся в центральной области ядра [Разин и др., 2013]. Химерные хромосомы, образованные транслокаций между хромосомами из разных слоев ядра, находятся в промежуточной позиции. Позиция каждой конкретной хромосомы в ядре обозначается путем указания среднего расстояния между центром ядра и центром хромосомной территории, выраженного в процентах радиуса ядра [Разин и др., 2013].

Исследования показали, что позиция гена в ядре может повлиять на активность транскрипции [Cremer et al., 2010]. Однако было показано, что в

некоторых клеточных типах организация хромосомных территорий в интерфазном ядре претерпевает значительные изменения. Так, у ночных млекопитающих в фоторецепторных клетках неактивные гетерохроматизированные районы хромосом перемещаются в центральную область ядра [Solovei et al., 2009].

Белки на внутренней поверхности ядерной оболочки: ламины, белки ядерного порового комплекса, ламин-ассоциированные белки – контактируют с хроматином и влияют на его расположение [Gay et al., 2015], обуславливая общую архитектонику ядра.

На пространственную организацию ядра косвенное влияние оказывают липиды ядерной мембраны. Текучесть мембраны зависит от состава липидов, что также влияет на процесс слияния мембран. От баланса глицеролипидов и глицерофосфолипидов зависят процессы сборки мембран и формирования митотического веретена при выравнивании хромосом в метафазе [Prudovsky et al., 2012].

Существует несколько принципов трехмерной архитектуры ядра:

1. Различные компоненты ядра передвигаются посредством влияния комбинации различных биохимических и биофизических взаимодействий;

2. Большая часть ДНК имеет хромомерную организацию с разной степенью уплотнения;

3. Контакты между далеко расположенными локусами в геноме являются чаще всего временными;

4. Связывание хроматина с регуляторными молекулами определяет организацию хромосом.

Эта информация позволяет сделать более понятными причины определенного (неслучайного) расположения хромосом в пространстве ядра, изучить механизмы прикрепления хромосом к ядерной оболочке.

В исследовании пространственной структуры генома эмбриональных стволовых клеток, фибробластов и нейронов коры головного мозга у мыши и человека методом Hi-C удалось достичь разрешения карты порядка 100 т.п.н.

[Dixon et al., 2012]. Десятикратное увеличение разрешения метода позволило авторам предложить модель фундаментальной организации генома соматических клеток – модель «топологических доменов». Авторы показали, что «элементарной частицей» генома является топологический домен – протяженный участок хромосомы порядка 0,8–1 м.п.н., большая часть внутрихромосомных контактов которого происходит внутри участка. Таким образом, топологический домен представляет собой плотно упакованный автономный участок хромосомы. По длине хромосомы топологические домены разделены районами «границ», для которых характерно малое количество внутрихромосомных контактов. Важным открытием стало то, что организация с помощью топологических доменов является эволюционно консервативной, т. е. гомологичные последовательности генома человека и мыши организованы в топологические домены одинаково. Кроме того, структура топологических доменов устойчиво сохраняется в таких разных типах клеток, как эмбриональные стволовые клетки, фибробласты и клетки коры головного мозга [Dixon et al., 2012; Баттулин и др., 2012].

При помощи многоцветного 3D FISH можно визуализировать и исследовать трехмерную структуру ядра и положение хромосом в пространстве ядра относительно друг друга. Посредством данного метода, к настоящему моменту времени, проведено множество исследований в сфере пространственной организации ядра. В частности, этот метод позволил разделить хроматин на активный и не активный при анализе компартментов, найденных при изучении контактных карт геномных взаимодействий [Усов и др., 2013; Разин, Гаврилов, 2018].

Данный метод является высокоуровневым и точным микроскопическим методом изучения пространственной организации политенных хромосом [Баттулин и др., 2012; Soloveva at al., 2002].

В разрезе исследований малярийных комаров *An. messeae*, метод 3D FISH активно используется для изучения точек прикрепления различных хромосом на оболочке ядра в клетках как соматической, так и генеративной систем

[Артемов и др., 2014], а также для изучения механизмов образования полиморфных инверсии в политенных хромосомах.

Существует несколько моделей, описывающих пространственную организацию ядра:

1. СТ-ІС-модель (Chromosome territories - Interchromatin compartment model) основана на отсутствии мест пересечений хромосомных территорий различных хромосом в пространстве ядра друг с другом. Интерхроматиновый компартмент разделяет хромосомные территории, сам же компартмент не содержит хроматина и представляет собой фибриллу, диаметром 30 нм. Фибриллы разделены на хроматиновые домены по функциональным и структурным особенностям. Домен имеет длину до 1 м.п.н. и представлен в виде петель длиной до 100 т.п.н.. Интерхроматиновае пространство является сетью каналов, которые проникают между хроматиновыми доменами и принимают участие в переносе транскрипционных факторов и продуктов транскрипции. Хроматиновые домены имеют петли, на вершинах которых расположены транскрипционно активные последовательности ДНК. Участки петель, содержащие эти последовательности, обращены в сторону интерхроматинового пространства, где они становятся более доступными агентов сплайсинга и транскрипции. Иногда, для образование гигантской петли в пределах хромосомного домена способствует переносу генов, которые находятся на этой петле, в другие хромосомные территории [Жимулев, 2007; Разин, Гаврилов, 2018; Закиян, Власов, Дементьева (ред.), 2012].



Рисунок 5 - Модель СТ-ІС. Красным цветом обозначены хромосомные территории/домены с транскрипционно активными (белые точки) и неактивными (черные точки) генами; зеленым цветом обозначено интерхроматиновое пространство с ферментативными комплексами (желтые точки) [Закиян, Власов, Дементьева (ред.), 2012]

2. ICN-модель (inter chromosome network model)

В рамках этой модели хромосомные территории, в зависимости от текущего функционального состояния, могут менять свое положение в пространстве ядра (перемещения на расстояние до 0,4 мкм, но в редких случаях могут и до 1,5 мкм). Эта способность должна подразумевать перекрытие соседних территорий (частичное). Перемещения хромосомных территорий способны возникать в том случае, если расстояния между ними в ядре незначительны [Жимулев, 2007; Разин, Гаврилов, 2018; Закиян, Власов, Дементьева (ред.), 2012]. Около 20% занимают области, В которых хромосомные ядра территории перекрываются. В местах перекрывания хромосомных территорий обнаружили большое количество транскрипционных факторов, а хроматин в этой области соответствует по своей конформации транскрипционно активному хроматину. Структура перекрывающихся участков может изменяться под воздействием ингибиторов транскрипции. ICN-модель показывает, что механизм транскрипции способен определять организацию хромосом в пространстве ядра и объясняет различие в распределении хромосом в ядерном пространстве в различных тканях [Жимулев, 2007; Разин, Гаврилов, 2018; Закиян, Власов, Дементьева (ред.), 2012].



Рисунок 6 – Модель ICN. Красным и зеленым цветами обозначены территории разных хромосом, синим — места, где аккумулируются ферментативные комплексы и образуются внутрихромосомные и межхромосомные контакты [Закиян, Власов, Дементьева (ред.), 2012]

3. Модель решетки

Данная модель базируется на данных, полученных методом электронной микроскопии. Хроматин образует в ядре фибриллы диаметром 10 нм и 30 нм, концентрация которых в ядре является неоднородной. Хроматиновых доменов электронно-микроскопическим методом не обнаружили, поэтому, в рамках модели решетки, считается, что их не существует. Фибриллы хроматина образуют решетчатую объясняет структуру. Модель решетки высокую диффузную способность макромолекул в ядре. Взаимодействие хромосомных собой происходит образом, территорий между таким что

интерхроматинового пространства не существует, а хроматин образует непрерывную сеть, распространяющуюся на все пространство ядра. Не исключено, что РНК-молекулы в интерхроматиновом пространстве на электронных фотографиях можно принять за нити хроматина, которые образуют решетчатую структуру. В таком случае модель решетки не будет иметь под собой никаких оснований [Жимулев, 2007; Закиян, Власов, Дементьева (ред.), 2012]



Рисунок 7 – Модель решетки. Синим и желтым цветом обозначены территории разных хромосом; тонкие нити — нуклеосомные нити; толстые нити — 30-нм фибриллы [Закиян, Власов, Дементьева (ред.), 2012]

1.2.2 Районы прикрепления к ядерной оболочке

Позиционирование хромосом в пространстве ядра происходит за счет взаимодействия хроматина с белками ядерного матрикса и, прежде всего, с белками ядерной ламины, которая расположена между внутренней ядерной мембраной И периферическим хроматином. С белками ЭТИМИ взаимодействуют как белки хроматина, так и ДНК. За контакт с белками отвечают последовательности SAR/MAR (scaffold ядерного матрикса associated region/matrix attached region) [Жимулев, 2007, Закиян, Власов, Дементьева (ред.), 2012].

Одними из наиболее давно известных пространственных структур ядра являются ламин-ассоциированные домены (ЛАД) – определенные участки хромосомсом, взаимодействующие с ядерной мембраной. Впервые выделить такие домены позволили данные о структуре эукариотического ядра, полученные при помощи электронной микроскопии. Считается, что взаимодействие хромосом и ядерной ламины представляет собой особый механизм регуляции экспрессии генов. Так, например, хорошо изучена связь подавления транскрипции в теломерном локусе дрожжей и его контактов с ядерной мембраной [Баттулин и др., 2012].

Ядерная ламина представляет собой структуру на периферии ядра в форме сети из фиброзного слоя оболочки ядра с поровыми комплексами. Ламина разделяет мембрану и нуклеоплазму и состоит из ламинов (фибриллярных белков) и белков ядерной мембраны, взаимодействующими с белками ламины [Gruenbaum, 2005]. Белки ламины – основные компоненты ядерной ламины. Они считаются предковыми для всех белков промежуточных филаментов, локализуются преимущественно на периферии ядра. Ламины образуют белковые комплексы с интегральными белками (встроенными в мембрану) внутренней ядерной мембраны, факторами транскрипции (белками, контролирующими процесс синтеза мРНК на матрице ДНК), гистонами и модификаторами хроматина [Melcer et al., 2007].

В состав ядерной ламины входят белки ламина А, В, С [Коряков и др., 2009]. сайт, Ламины В-типа содержат В себе отвечающий за фосфорилирование в ходе митоза, эту группу белков можно встретить во всех клетках [Stuurman, et al., 1998]. Ламины А-типа подвергаются экспрессии только в дифференцированных клетках и становятся растворимыми в ходе митоза. Ламины А- и В-типа имеют многочисленные сложные взаимодействия со многими белками нуклеоплазмы и белками внутренней мембраны ядра [Gruenbaum et al., 2005; Goldman, 2002]. Ламин С-типа у млекопитающих принимает участие в присоединении хроматина к специфическим белкам ядерной мембраны [Surdej et al., 1991].

Организация хроматина в пространстве ядра базируется на взаимодействии хроматина с белками оболочки ядра и внутриядерного матрикса. Специфические участки ДНК при помощи белков (LBR, HP1) определяют расположение хромосом в ядре и таким образом обеспечивают контакты [Belmont et al., 1993; Paddy, 1990; Sage, 2003]. В архитектонике как интерфазного ядра, так и отдельных хромосом, важная роль отводится гетерохроматину: гетерохроматиновые блоки были найдены в местах контакта хромосом с ядерной оболочкой через ламин-ассоциированные белки [Richards et al., 2002; Grewal et al., 2007; Губанова и др., 2007].

1.2.3 Пространственная организация политенных хромосом у малярийных комаров

Малярийные комары комплекса «*maculipennis*» имеют политенные хромосомы как в клетках соматической системы (слюнные железы, мальпигиевы сосуды), так и в генеративной системе (трофоциты яичников).

Политенные хромосомы – гигантские интерфазные хромосомы, возникающие в некоторых типах специализированных клеток в результате многократной репликации ДНК, не сопровождаемой делением клетки и боковой коньюгации хроматид. Принципиальным отличием от других типов хромосом является то, что политенные хромосомы являются интерфазными, тогда как все остальные можно наблюдать только во время митотического или мейотического деления клетки [Жимулев, 1997]. Политенные хромосомы имеют характерную поперечную исчерченность, обусловленную наличием участков более плотной спирализации - хромомер. В тёмных участках, представляющих собой хромомеры, располагается спирализованный неактивный хроматин, в то время как светлые полосы указывают на участок с повышенной транскрипционной активностью. Политенные хромосомы содержат большое копий генов, число ЧТО многократно усиляет

генную экспрессию. Это, в свою очередь, увеличивает производство необходимых белков [Жимулев, 1997].

Структурный анализ политенных хромосом и их сравнение у 7 видов малярийных комаров в трех клеточных системах – слюнных железах, мальпигиевых сосудах, трофоцитах яичников [Стегний, 1987, 1993] показал, что политенные хромосомы клеток слюнных желез и мальпигиевых сосудов сходны по морфологии каждой хромосомы и по количеству дисков. Различия заключаются в толщине дисков. Хромосомы из клеток половой системы отличаются от хромосом клеток соматической системы большей степенью уплотненности структуры при высокой степени политенизации. Важной особенностью трофоцитов яичников является политенных хромосом подверженность сильным морфологическим преобразованиям в ходе своего функционирования. По сравнению с хромосомами генеративных тканей, они выглядят более «обогащенными» дисками. Морфологические показатели хромосом соматических клеток (слюнных желез, мальпигиевых сосудов), в сравнении с другими тканями (генеративными), предположительно, вызваны функциональными особенностями этих клеток. Подобная структурная реорганизация политенных хромосом сочетается с принципами ИХ функциональной динамики [Кикнадзе, 1972].

Архитектоника в ядрах клеток слюнных желез имеет общие принципы у всех рассматриваемых в исследованиях 7 видов [Стегний, 1993]. Прицентромерные районы всех хромосом объединены в единый хромоцентр (рисунок 8а). Он располагается на периферии ядра рядом с ядерной оболочкой. Хромосомы располагаются радиально, вблизи ядерной мембраны.

Политенные хромосомы в ядрах мальпигиевых сосудов организованы подобно хромосомам ядер клеток слюнных желез (рисунок 8б). Они объединены в общий хромоцентр, который отличается жесткостью контакта и почти всегда сохраняется при приготовлении давленных препаратов, в отличие от политенных хромосом слюнных желез [Стегний, 1993].

Пространственная организация ядер в клетках соматической системы не идентична, но в общих чертах совпадает (объединение в хромоцентр).

Ядра трофоцитов (питающих клеток) яичников имеют отличительную пространственную организацию от клеток других тканей (рисунок 8в, 8г). Особенностями архитектоники хромосом трофоцитов являются: отсутствие объединение хромосом в общий хромоцентр (в отличии от хромосом ядер слюнных желез и мальпигиевых сосудов), отдельные хромосомы жестко прикреплены к ядерной оболочке прицентромерными районами. В ядрах трофоцитов хромосома 3 жестко прикреплена у всех семи изученных в исследовании видов [Стегний, 1993], хромосома 2 – у An. beklemishevi, Х-хромосома – у An. atroparvus и An. messeae s.l..



Рисунок 8 - Организация политенных хромосом в ядрах различных тканевых систем *An. messeae s.l.*: а - слюнные железы; б - мальпигиевы сосуды; в, г - трофоциты яичников [Стегний, 1993]

Примечание - XL - половая хромосома, 2R и 2L - плечи хромосомы 2; 3R и 3L - плечи хромосомы 3; с - центромерный участок; N - ядрышко; I -

гетерозиготные инверсии. Стрелками обозначены места прикрепления хромосом к ядерной оболочке.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1Объект исследования

Объектом исследования являлись личинки и имаго малярийного комара *Anopheles messeae s.l.*, отобранные из разных географических популяций Томской области летом 2018, 2019 и 2020 гг. Тогур (58°21'40" с. ш. 82°50'18" в. д.), Петрово (56°32'12" с. ш. 84°49'06" в. д.), Кривошеино (57°21' с. ш. 83°56 в. д.), Коларово (56°20'12" с. ш. 84°56'19" в. д.)).

2.2 Приготовление сухо-воздушных препаратов хромосом клеток слюнных желез личинок An. messeae s.l.

Для приготовления сухо-воздушных препаратов политенных хромосом использовали фиксированный в растворе Карнуа (этанол/уксусная кислота в соотношении 3:1) материал личинок малярийных комаров из разных популяций Томской области. Приготовление сухо-воздушных препаратов осуществляли по стандартной методике. На предметное стекло помещали личинку в капле Карнуа. С помощью препаровальных иголок выделяли слюнные железы. Далее слюнные железы выдерживали 20 минут в капле 45% уксусной кислоты. Затем материал накрывали покровным стеклом и стучали по покровному стеклу тыльной стороной иглы. Проводили анализ качества материала на микроскопе Axio imager A1 («Carl Zeiss», Германия). Далее

препарат опускали в жидкий азот до полного охлаждения и немедленно скалывали покровное стекло с помощью бритвы. Препарат проводили через батарею спиртов (50, 70, 96%) для дегидратации и высушивали на комнатной температуре.

2.3 Метод микродиссекции политенных хромосом An. messeae s.l.

Для получения ДНК-проб, включающей точки разрыва полиморфной инверсии 2R хромосомы Anopheles messeae s.l. был использован метод микродиссекции хромосом. Проба была получена с препарата хромосом слюнных желез с генотипом $2R_{00}$ полиморфной инверсии $2R_1$ Anopheles messeae s.l. из популяции село Петрово, Томская область (56°32'12" с. ш. 84°49'06" в. д.), собранной летом 2019 года. Метод основан на сборке хромосомного материала суховоздушного препарата С при помоши стеклянной иглы. Процедура микродиссекции проходила в стерильном боксе – это минимизировало вероятность загрязнения материала. Поиск хромосом, отвечающих необходимым параметрам (хорошая распластанность, четкий рисунок дисков, наличие $2R_{00}$ варианта инверсии $2R_1$) и процедура микродиссекции проводилась на микроскопе Axiovert 200 («Zeiss», Германия).

После сборки материала стеклянной иглой на препарате, кончик иглы скалывали в 0,5 мл пробирке, содержащей 30мкл Coldrop (100 мМ трис HCl, 100 мМ NaCl, 10x SDS, протеиназа К, H₂O). Пробирку с материалом ставили на 55°C в термостат на 2 часа. Добавляли в каждую пробирку по 100 мл 96% этанола и центрифугировали при 15000 грт на протяжении 15 минут. Спирт из пробирок отбирали дозаторами на 100 мл и 2,5 мл, после чего материал в пробирках сушили в термостате с открытой крышкой при 55°C 3 минуты.

Затем полученный хромосомный материал амплифицировали последовательно в серии низко- и высокотемпературных циклов. В состав 5 мкл ПЦР смеси для низкотемпературных циклов (LOTC) входили следующие

компоненты: H₂O, SeqBuf 5x (5-ти кратный Sequenase Buffer), 2,5mM dNTP, DOP 20mM. Режим низкотемпературных циклов ПЦР: программа LOTC. Каждый цикл, при достижении температуры 40°С, пробирки доставали из амплификатора, сбрасывали содержимое пробирок, разгоняя на центрифуге до 10000 грт, добавляли в каждый образец по 0,3 мкл заранее разведенной секвеназы в буфере (DIL buffer) в 8 раз. Каждый раз образец помещали обратно амплификатор для продолжения амплификации. Серию В высокотемпературных циклов ПЦР проводили в 55мкл смеси HiTC (H₂O, Stof. Buffer, AmpliTaq, 2,5 mM dNTP, 20 mM DOP, 2,5 mM MgCl₂), которую добавляли в смесь после LOTC амплификации. Режим высокотемпературных циклов ПЦР: программа НіТС. После этого смесь осаждали спиртом и растворяли осадок в воде.

2.4 Приготовление ДНК-зондов точек разрыва полиморфной инверсии 2R11 Anopheles messeae s.l.

ДНК-пробы районов, включающих точки разрыва инверсии амплифицировали с использованием частично вырожденного праймера (DOP) ПЦР. методом Зонды были приготовлены ДНК-проб, ИЗ микродиссектированных ИЗ районов точек разрыва инверсии, располагающихся ближе к теломере ($2R_0$ -tel.) и ближе к центромере ($2R_0$ -cen.).

Для приготовления ПЦР-смеси использовали 5хРСR buffer + MgCl₂, дАТФ 4 (млМ), Т (3 млМ), DOP (20 млМ), тетрамелилродамин (ТАМRА) или биотин (1 млМ), TaqDNA Pol. 5 ед. ДНК-проба исследуемого района, H₂O (дист.). Для амплификации с введением метки в ДНК проводили ПЦР в следующем режиме: начальная денатурация при 95°С – 3 мин; 25 циклов: денатурация при 95°С – 3 мин; отжиг при 56°С – 45 с; элонгация цепей при 72°С – 2 мин; завершающая элонгация цепей при 72°С – 8 мин.

После амплификации проводили осаждение ДНК-продуктов. Для этого смешали в пробирке 1/10 часть ацетата натрия, 1/5 часть спермальной ДНК

лосося, 1 часть ДНК зонда. Содержимое пробирки пипетировали, затем добавили 96% этиловый спирт в объеме, в 2,5 раза превышающем объем ДНКзонда. Полученную смесь оставили в морозильной камере при -20°С на 8-12 часов.

2.5 Флуоресцентная in situ гибридизация (FISH)

Метод флуоресцентной in situ гибридизации (FISH) применяется для определения локализации на хромосомах исследуемой последовательности ДНК. Исследуемую ДНК (ДНК-зонд) гибридизуют на сухо-воздушные препараты хромосом, распластанных на предметных стеклах. ДНК-зонд гибридизуется с ДНК хромосом по принципу комплиментарности и выявляется при анализе на флуоресцентном микроскопе Axio imager Z1 («Carl Zeiss», Германия). В качестве ДНК-зонда в работе использована ДНК, полученная с помощью микродиссекции района точки разрыва полиморфной инверсии 2R₁ генотипа 2R00 хромосом клеток слюнных желез личинок *An. messeae s.l.*. В работе использовали стандартный протокол FISH с модификациями.

Для проведения гибридизации препараты последовательно проводили через три смены 2xSSC (0,3M NaCl, 0,3M цитрата натрия в водном растворе) по 5 минут при комнатной температуре. Затем помещали препараты в подкисленный раствор 0,02% пепсина на десять минут при 37°C. Затем препараты последовательно помещали в две смены 1xPBS (водный раствор солей, содержащий 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄) по 5 минут при комнатной температуре. Далее осуществляли проводку препаратов в этиловом спирте с возрастающей концентрацией (70, 80,96%) по 5 мин при комнатной температуре для дегидратации и высушивали на комнатной температуре. ДНК-зонды центрифугировали при 13900 оборотов в минуту 20 минут при 4°C в Centrifuge 5417 R («Eppendorf», Германия), удаляли супернатант с помощью пипетки. Оставшийся осадок

промывали 70% раствором этанола и центрифугировали 20 минут при 13900 оборотов в минуту при 4°С. После удаления супернатанта пробирку с ДНКзондом помещали в вакуумный концентратор Contentration plus («Eppendorf», Германия) на 45°С для полного высушивания осадка. Добавляли к сухому осадку ДНК гибридизационную смесь и растворили осадок в вортексе Microspin FV-2400 («Biosan», Латвия). После растворения зондов производили денатурацию зонда при 96°С 5 минут в термостате ГНОМ («ДНК-Технология», Россия). Фиксацию денатурированных зондов проводили на льду в течении 5 минут. Готовые зонды наносили на препарат и накрывали покровным стеклом. Заклеивали края покровного стекла универсальным клеем Момент («Henkel», Германия), для сохранения герметичности. Гибридизацию проводили 20 часов при 72°С в гибридизационной камере Thermobrite S500-12 («StartSpin», США). После проведения гибридизации отделяли покровные стекла, немедленно помещая препараты В предподогретый раствор 0,2xSSC на 20 минут при 42°C, после переносили препараты на 20 минут в раствор 0,2xSSC при комнатной температуре в темноте для удаления неспецифического связывания ДНК-зонда. Для детекции ДНК-пробы меченной биотином на препарат наносили раствор avidin-FITC в разведении 1/200 от исходного раствора в блокирующем буфере (BSA, 20xSSC, Tween 20, H_2O) на 1 час. Далее препараты проводили через 2 смены отмывочного буфера (20xSSC, Tween 20, H2O) по 5 минут. Для окраски хроматина использовали раствор DAPI, который наносили пипеткой на препараты и накрывали покровными стеклом. Хранили препараты в холодильнике при 4°С. Готовые препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе Axio imager Z1 («Carl Zeiss», Германия).

2.6 Приготовление ДНК-зондов точек разрыва полиморфной инверсии 2R₁ Anopheles messeae s.l.

ДНК-пробы районов точек разрыва инверсии амплифицировали с использованием частично вырожденного праймера (DOP) методом ПЦР. Зонды были приготовлены из ДНК-проб, микродиссектированных из районов точек разрыва инверсии, располагающихся ближе к теломере (2R₀-tel.) и ближе к центромере (2R₀-cen.).

Для приготовления ПЦР-смеси использовали 5хРСR buffer + MgCl₂, дАТФ 4 (млМ), Т (3 млМ), DOP (20 млМ), тетрамелилродамин (TAMRA) или биотин (1 млМ), TaqDNA Pol. 5 ед. ДНК-проба исследуемого района, H₂O (дист.). Для амплификации с введением метки в ДНК проводили ПЦР в следующем режиме: начальная денатурация при 95°С – 3 мин; 25 циклов: денатурация при 95°С – 3 мин; отжиг при 56°С – 45 с; элонгация цепей при 72°С – 2 мин; завершающая элонгация цепей при 72°С– 8 мин.

После амплификации проводили осаждение ДНК-продуктов. Для этого смешали в пробирке 1/10 часть ацетата натрия, 1/5 часть спермальной ДНК лосося, 1 часть ДНК зонда. Содержимое пробирки пипетировали, затем добавили 96% этиловый спирт в объеме, в 2,5 раза превышающем объем ДНК-зонда. Полученную смесь оставили в морозильной камере при -20°C на 8-12 часов.

2.7 Двуцветная 3D флуоресцентная *in situ* гибридизация (3D FISH) ДНК-проб районов точек разрыва полиморфной инверсии 2R₁ *An. messeae s.l.* с политенными хромосомами клеток слюнных желез *An. messeae s.l.*

Основой методики 3D FISH послужил протокол с модификациями, описанный в литературе [A. A. Kokhanenko, 2013]. Все операции с тканью проводили в 1,5 мл центрифужных пробирках при постоянном помешивании в ротационном перемешивателе с частотой вращения 400-800 об./мин. На всех этапах объем раствора в центрифужных пробирках должен в 2 раза превышать объем материала. Перед каждой сменой раствора проводили мягкое центрифугирование около 1 минуты при 500 об./мин.

Фиксация ткани.

Материал выделяли в PBS (2mM KH₂PO₄; 10mM Na₂HPO₄; 137mM NaCl; 2,7mM KCl) и фиксировали в 4% параформальдегиде в PBT (0,1 % Tween 20 в PBS) в течение 20 минут при комнатной температуре.

Прегибридизация.

Ткань инкубировали в растворе РНК-азы А (100-200 мкг/мл) в РВТ в течении 2 часов при комнатной температуре. Далее ткань переносили в PBS-Tr (0,3% Triton X-100 в PBS) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем материал помещали в гибридизационную смесь (50% формамид, 10 % декстрансульфат, 1 % Tween 20 в 2×SSC (pH 7,0)), предварительно проведя через 3 раствора гибридизационную смесь: PBS-Tr в соотношении 1:5, 1:1, 5:1 последовательно по 20 мин в каждом.

Гибридизация.

ДНК-зонд растворяли в гибридизационной смеси, денатурировали при температуре 85°С 15 минут и переносили на лед. Денатурацию ДНК в клетках слюнных желез проводили в термомиксере в течение 20 минут при 80°С и постоянном покачивании с частотой 450 об./мин. После денатурации пробирки с тканью переносили на лед. В центрифужную пробирку с тканью добавляли денатурированные ДНК-зонды и проводили совместную денатурацию при 80°С и покачивании с частотой 450 об./мин в течение 15 минут. Гибридизацию проводили при 37°С и покачивании с частотой 450 об./мин в течение 14-17 часов.

Постгибридизационная отмывка.

Материал отмывали в отмывочных буферах по 20 мин в каждом при постоянном покачивании с частотой 800 об./мин. Отмывку проводили последовательно в растворе 1 (50% формамид; 2xSSC; 0,3% CHAPS) дважды, в растворе 2 (40% формамид; 2xSSC; 0,3% CHAPS), в растворе 3 (30% формамид в PBT), растворе 4 (20% формамид в PBT) при 37°C; отмывки в растворе 5 (10% формамид в PBT), растворе 6 (PBT) и растворе 7 (PBS-Tr) выполняли при комнатной температуре.

Детекция сигнала ДНК-зонда районов точек разрыва полиморфной инверсии 2R11 An. messeae s.l., меченных биотином.

Детекцию сигнала ДНК-зонда точек разрыва полиморфной инверсии 2R00, меченого биотином, проводили с помощью авидина, конъюгированного с FITC (Sigma). Материал инкубировали в блокирующем буфере (3% БСА, 0,05% Tween 20 в 2хSSC (pH 7,0)) при 37°C покачивании с частотой 600 об./мин в течение 15 минут. Далее материал помещали в раствор авидин-FITC в блокирующем буфере (разведение 1:200) и инкубировали при 37°C и покачивании с частотой 700 об./мин в течение 1 часа. Материал отмывали в двух сменах отмывочного буфера (0,25% Tween 20 в 2хSSC (pH 7,0)) по 15 минут в каждом на ротационном перемешивателе.

Усиление сигнала ДНК-зонда районов точек разрыва полиморфной инверсии 2R11 An. messeae s.l., меченных биотином.

Для усиления сигнала ДНК-зонда, меченного биотином использовали антитела к авидину, конъюгированные с FITC (Sigma). Материал инкубировали в растворе антител в блокирующем буфере (разведение 1:500). Затем материал отмывали в трех сменах отмывочного буфера (0,25% Tween 20 в 2×SSC (pH 7,0)) по 5 минут в каждом на ротационном перемешивателе.

Приготовление препаратов

В центрифужную пробирку с материалом добавляли каплю DAPI-Vectashield и инкубировали при комнатной температуре и постоянном покачивании в течение 12 часов. Затем помещали материал на предметное заключали камеру, образованную покровным стекло И В стеклом, приклеенным к предметному стеклу двусторонним скотчем и заполненную DAPI-Vectashield. Приготовленный подобным образом препарат предотвращает деформацию клеток и позволяет проводить микроскопию объемных ядер.

Готовые препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе Axio imager Z1 («Carl Zeiss», Германия). Анализ, получение и обработку фотографий, а также создание 3D-моделей ядер проводили с помощью программы AxioVision 4.8 («Carl Zeiss», Германия).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Приготовление лактоацеторсеиновых препаратов хромосом слюнных желез An. messeae s.l.

Приготовление лактоацеторсеиновых препаратов слюнных желез объекта исследования являлось подготовительной стадией для проведения процедуры микродиссекции районов точек разрыва полиморфной инверсии 2R₁ An. messeae s.l. Результат первого этапа – освоение и улучшение навыка получения давленных препаратов политенных хромосом и навыка определения полиморфной инверсии 2R₁ в хромосомах слюнных желез личинок An. messeae s.l.

Основные критерии распознавания хромосом по дисковому рисунку:

1. Хромосома 2

-2R плечо: 2 больших блока (индикатор хромосомного плеча 2R), расширение на конце теломеры в виде шарика. Вариант генотипа инверсии по 2R определяет относительная направленность и близость одного из 2-х блоков по отношению к теломере. Блоки неодинакового размера. В случае инверсионного генотипа 2R₁₁ меньший блок располагается ближе к теломере правого плеча 2 хромосомы, а больший блок – наоборот, дальше. В случае генотипа 2R₀₀ наблюдается следующая картина: больший блок располагается ближе к теломере правого плеча 2 хромосомы, а меньший блок – наоборот, дальше (рисунок 96, рисунок 10);

-2L плечо: менее окрашенная (бледная) и удлиненная теломера (Рисунок 9a);

2. Хромосома 3

-3R: «зебра» из 5 дисков на теломере, образование «птичий глаз», расположение которого относительно теломеры является индикатором варианта инверсии (Рисунок 9г);

-3L: образование блок + «веер» на теломере, образование из скопления дисков в толще плеча хромосомы (Рисунок 9в);

3. Хромосома X - самая маленькая и утолщенная хромосома (Рисунок 9д).



Рисунок 9 – Хромосомы клеток слюнных желез личинок An. messeae s.l., окрашенных лактоацеторсеином (х40)

Примечание – а – 2L плечо хромосомы 2; б – 2R плечо хромосомы 2; в – 3L плечо хромосомы 3; г – 3R плечо хромосомы 3; д – X-хромосома.

3.2 Микродиссекция точек разрыва полиморфной инверсии хромосомы 2R₁ слюнных желез *An. messeae s.l.*

Для проведения микродиссекции были приготовлены давленные суховоздушные препараты хромосом слюнных желез *An. messeae s.l.* хорошего качества: хромосомы на препаратах лежали отдельно друг от друга и обладали узнаваемым дисковым рисунком – это важные параметры для успешного определения микродиссектируемого участка и его вырезания.

Микродиссекцию точек разрыва полиморфной инверсии 2R1 проводили на инверсионном варианте генотипа $2R_{00}$. В результате были получены ДНКпробы следующих точек разрыва: $2R_0$ -tel. (участок хромосомы, включающий точку разрыва инверсии $2R_1$, располагающийся ближе к теломере); $2R_0$ -сеп. (участок хромосомы, включающий точку разрыва инверсии $2R_1$, располагающийся ближе к центромере) (Рисунок 10).



Рисунок 10 — Варианты генотипов $2R_{11}$ и $2R_{00}$ инверсии $2R_1$ в клетках слюнных желез *An. messeae s.l.* [Artemov et al., 2020]

Примечание – 1 – теломера 2R плеча; 2 – область микродиссектированной пробы 2R₀-tel. (ближе к теломере); 3 - область микродиссектированной пробы 2R₀-cen. (ближе к центромере).

3.3 Флуоресцентная *in situ* (FISH) гибридизация микродиссекционных ДНК-проб точек разрыва полиморфной инверсии 2R1 An. messeae s.l.

Для проверки эффективности микродиссекции был проведен анализ полученных проб с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). ДНК-пробы были помечены с помощью флуоресцентных красителей (Biotin и ТАМRА). Микродиссекционная ДНК-проба точки разрыва инверсии, располагающейся ближе к теломере (2R₀-tel.), была помечена Biotin – на изображении имеет зеленый цвет. ДНК-проба точки разрыва инверсии, располагающейся ближе к центромере (2R₀-cen.), была помечена TAMRA – на изображении имеет красный цвет. Флуоресцентный краситель DAPI (синий цвет на изображении) использовали для окраски хроматина.



Рисунок 11 - FISH микродиссекционных ДНК-проб $2R_0$ -tel и $2R_0$ -cen c 2R плечом 2-й хромосомы ядер слюнных желез *An. messeae s.l* с генотипом $2R_{00}$ (x40)

Примечание - ДНК-проба 2R₀-сеп. - ДНК-проба точки разрыва инверсии, располагающейся ближе к центромере (2R₀-сеп.), меченая ТАМRA; ДНК-

проба 2R₀-tel. - ДНК-проба точки разрыва инверсии, располагающейся ближе к теломере (2R₀-tel.), меченая Biotin.



Рисунок 12 - FISH микродиссекционных ДНК-проб $2R_0$ -tel и $2R_0$ -cen c 2R плечом 2-й хромосомы ядер слюнных желез *An. messeae s.l* с генотипом $2R_{11}$ (x40)

Примечание - ДНК-проба 2R₀-сеп. - ДНК-проба точки разрыва инверсии, располагающейся ближе к центромере (2R₀-сеп.), меченая TAMRA; ДНК-проба 2R₀-tel. - ДНК-проба точки разрыва инверсии, располагающейся ближе к теломере (2R₀-tel.), меченая Biotin.

Получены результаты гибридизации ДНК-проб $2R_0$ -tel, $2R_0$ -cen *An*. *messeae s.l.* с хромосомой 2 *An. messeae s.l.* с генотипами $2R_{11}$ и $2R_{00}$ (рисунок 11, 12). В ходе гибридизации проб на хромосому с вариантом генотипа $2R_{00}$, визуализировалось по одному сигналу каждой пробы (рисунок 11). На хромосоме с генотипом $2R_{00}$ при гибридизации визуализировались сигналы в, аналогичных месту микродиссекции ДНК-проб ($2R_0$ -tel/ $2R_0$ -cen), районах.

Наличие по два сигнала каждой пробы $2R_0$ -tel и $2R_0$ -cen, полученных в результате гибридизации ДНК-проб $2R_0$ -cen. и $2R_0$ -tel. с вариантом генотипа $2R_{11}$ *Ап. messeae s.l.* (рисунок 12), можно объяснить поворотом этого района

на 180° в результате инверсии и как следствие нарушение целостности маркированных ДНК-пробами районов и ожидалось нами. В этом случае, визуализировались по два сигнала каждой пробы, так как инверсия разделила их в точках разрыва. В результате на рисунке 6 мы видим шахматный порядок расположения сигналов: В области точек разрыва инверсии гибридизовались как ДНК-проба 2R₀-сеп, так и 2R₀-tel. (рисунок 12).

Таким образом, результаты FISH подтвердили эффективность и точность проведенной микродиссекции. Полученные ДНК-пробы точек разрыва полиморфной инверсии 2R₁ (2R₀-tel. и 2R₀-cen) подходят для изучения их взаиморасположения в пространстве ядра с помощью 3D FISH.

3.4 3D флуоресцентная in situ гибридизация микродиссекционных ДНК-проб точек разрыва полиморфной инверсии 2R₁ An. *messeae s.l.*

С целью определения в объеме клеточного ядра интересующих нас районов, был использован метод 3D FISH, который подразумевает проведение флуоресцентной *in situ* гибридизации на интактных ядрах клеток. Метод позволяет определить расположение микродиссекционных ДНК-проб в пространстве ядра.

Анализ взаиморасположения микродиссекционных проб точек разрыва полиморфной инверсии $2R_1$ ($2R_0$ -tel. и $2R_0$ -cen) проводился в трофоцитах яичников имаго малярийного комара *An. messeae s.l.*

На этапе получения ДНК-проб методом микродиссекции хромосом использовали ядра слюнных желез, так как хромосомы в клетках слюнных желез *An. messeae s.l.* имеют лучшую дисковую исчерченность. Это помогало легче картировать и вырезать точки разрывов инверсии. Однако, гибридизация полученных ДНК-проб была проведена на ядра трофоцитов яичников в связи с тем, что в ядрах слюнных желез хромосомы объединены общим хромоцентром. Эта особенность усложняет изучение трехмерной организации ядра. В ядрах трофоцитов яичников *An. messeae s.l.* хромосомы не объединены хромоцентром и материал, пригодный для анализа, можно получить легче.

Были получены препараты ядер трофоцитов яичников. В каждом ядре положение ДНК-районов точек разрыва инверсии 2R₀ определялось флуоресцентными сигналами (рис. 13). ДНК-проба точки разрыва инверсии, располагающейся ближе к центромере (2R₀-cen.), была помечена Biotin – на изображении имеет зеленый цвет. ДНК-проба точки разрыва инверсии, располагающейся ближе к теломере (2R₀-tel.), была помечена TAMRA – на изображении имеет красный цвет. Флуоресцентный краситель DAPI (синий цвет на изображении) использовали для окраски хроматина.

Всего было проанализировано 26 ядер трофоцитов яичников малярийного комара *An. messeae s.l.*, 16 с генотипом $2R_{11}$ полиморфной инверсии $2R_1$ (рис. 13), остальные 10 ядер с генотипом $2R_{00}$ полиморфной инверсии $2R_1$ (рис 14, 15).



Рисунок 13 – 3D FISH на ядрах трофоцитов *An. messeae s.l.* с генотипом 2R00 полиморфной инверсии 2R₁ (срез через половину ядра)

Примечание - синим цветом окрашен хроматин; зеленым цветом – участок, соответствующий ДНК-пробе 2R₀-сеп.; красным цветом – участок, соответствующий ДНК-пробе 2R₀-tel.; а – с визуализацией трех сигналов; b – без визуализации сигнала DAPI.



Рисунок 14 – 3D FISH на ядрах трофоцитах *An. messeae s.l.* с генотипом 2R₁₁ полиморфной инверсии 2R₁ (срез через половину ядра)

Примечание - синим цветом окрашен хроматин; зеленым цветом – участок, соответствующий ДНК-пробе 2R₀-сеп.; красным цветом – участок, соответствующий ДНК-пробе 2R₀-tel.; а – с визуализацией трех сигналов; b – без визуализации сигнала DAPI.



Рисунок 15 – 3D FISH на ядрах трофоцитах *An. messeae s.l.* с генотипом 2R₁₁ полиморфной инверсии 2R₁ (срез через половину ядра)

Примечание - синим цветом окрашен хроматин; зеленым цветом – участок, соответствующий ДНК-пробе 2R₀-сеп.; красным цветом – участок, соответствующий ДНК-пробе 2R₀-tel.; а – с визуализацией трех сигналов; b – без визуализации сигнала DAPI.

В 1 из 16 ядер с генотипом $2R_{11}$ точки разрыва инверсии сближены (рис. 14), в остальных 15 - располагаются удаленно друг от друга (рис. 15). Во всех 10 ядрах с генотипом $2R_{00}$ точки разрыва располагаются удаленно друг от друга (рис. 13).

В случае с ядрами, несущими генотип $2R_{00}$, во всех 10-ти случаях точки разрыва инверсии находились удаленно друг от друга. Однако, в случае с ядрами, несущими генотип $2R_{11}$, наблюдалась несколько другая картина: точки разрыва инверсии $2R_1$ располагаются как удаленно друг от друга, так и сближено. Изначально предполагалось, что тип образование инверсии может быть ассоциировано со сближенным расположением точек разрыва в пространстве ядра.

Как показали результаты исследования, в случае с обоими типами инверсий в проанализированных ядрах, преобладает удаленное расположение точек разрыва инверсии.

Мы предполагали, что возможно образование инверсии связано с тем, что в пространстве ядра эти участки находятся сближено относительно друг друга. Однако, в ходе проведенного исследования не удалось выявить четкой закономерности в сближенном расположении точек разрыва инверсии и образованием инверсии. Такой результат может быть связан с тем, что между взаиморасположением точек разрыва инверсий и образованием инверсии нет никакой взаимосвязи, либо с тем, что была взята слишком маленькая выборка.

Анализ большего количества ядер трофоцитов яичников обоих генотипов *Anopheles messeae s.l.* может позволить сделать более точные выводы о наличии или отсутствии взаимосвязи между сближенным взаиморасположением точек разрыва инверсии $2R_1$ *Anopheles messeae s.l.* в пространстве ядра и образованием полиморфной инверсии $2R_1$ *Anopheles messeae s.l.*

выводы

Методом микродиссекции хромосом получили ДНК-специфичные пробы точек разрыва инверсии 2R₁ An. messeae s.l. и подтвердили эффективность и точность проведенной микродиссекции.

С помощью метода 3D флуоресцентной *in situ* гибридизации (3D FISH) провели анализ взаиморасположения точек разрыва полиморфной инверсии 2R₁ An. messeae s.l. в ядрах трофоцитов яичников с генотипами 2R₁₁ и 2R₀₀.

В ядрах трофоцитов с генотипом $2R_{00}$ полиморфной инверсии $2R_1$ были выявлены два варианта взаиморасположения точек разрыва инверсии $2R_1$: удаленное и сближенное. В ядрах трофоцитов с генотипом $2R_{11}$ полиморфной инверсии $2R_1$ встречались только ядра с удаленным расположением точек разрыва инверсии $2R_1$.

Данные, полученные нами, показали, что в ядрах с генотипом $2R_{11}$ полиморфной инверсии $2R_1$ точки разрывов инверсии, в большинстве случаев, располагаются удаленно друг от друга, но встречаются ядра, в которых точки разрывов инверсии располагаются сближено. Во всех ядрах с генотипом 2R00 полиморфной инверсии $2R_1$ точки разрывов инверсий располагаются удаленно друг от друга. Следовательно, образование инверсии $2R_1$ не связано с пространственным расположением точек разрыва. Это заключение планируется проверить на большей выборке, для того, чтобы получить достоверный результат.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ананьина Т.В. Визуализация хромосомных территорий в интерфазных ядрах трофоцитов яичников Calliphora erythrocephala Mg (Diptera: Calliphoridae) / Т.В. Ананьина, А.Е. Ведерников, И.Э. Вассерлауф, Т.В. Карамышева, Н.Б. Рубцов, В.Н. Стегний // Генетика. - 2005. -Т 41. №10. - С.1106-1112.

2. Артемов Г. Н., Бондаренко С. М., Стегний В. Н. Взаиморасположение точек прикрепления XL и 3R хромосом на ядерной оболочке в клетках соматической и генеративной систем малярийного комара Anopheles messeae Fall. // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2014. № 1 (25). С. 121–131

3. Баттулин Н.Р., Фишман В.С., Орлов Ю.Л., Мензоров А.Г., Афонников Д.А., Серов О.Л. ЗС-методы в исследованиях пространственной организации генома. // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2012. - Т 16. - № 4/2. - с 872-878.

4. Бородин П. М., Торгашева А. А. Хромосомные инверсии в клетке и эволюции // Природа. – 2011. - № 1. – с. 19-26

5. Жимулёв И.Ф., Общая и молекулярная генетика: учеб. пособие для вузов / И.Ф. Жимулёв; под ред. Е.С. Беляева, А.П. Акифьева. - 4-е изд., стер.-Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2007. - 479 с. - ISBN 978-5-379-00375-3

 Жимулев И.Ф. Современные представления об организации и функционировании политенных хромосом // Соросовский Образовательный Журнал. — 1997. — Т. 11. — С. 2—7.

7. Закиян С.М., Власов В.В., Дементьева Е. В. (ред.) Эпигенетика. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. — 592 с. - ISBN 978-5-7692-1227-7

8. Кабанова В.М., Карташова Н.Н., Стегний В.Н. Кариологическое исследование природных популяций малярийного комара в Среднем Приобье.

Сообщение I. Характеристика кариотипа Anopheles maculipennis messeae // Цитология. 1972. Т. 14, № 5. С. 630–636.

9. Коряков Д. Е., Жимулев И. Ф. Хромосомы. Структура и функции. — Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2009. — 258 с. — ISBN 978-5-7692-1045-7.

10. Перевозкин В. П., Сайджафарова А. О. Динамика популяционновидовой структуры малярийных комаров Томской области // Вестник ТГПУ. 2006. №6.

11. Плешкова Г.Н., Стегний В.Н., Новиков Ю.М., Кабанова В.М. Инверсионный полиморфизм малярийного комара *Anopheles messeae*. III. Временная динамика концентрации инверсий в популяции центра ареала // Генетика. 1978. Т. 14. № 12. С. 2169 - 2176.

12. Разин С. В., Быстрицкий А. А. Хроматин: упакованный геном. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. — 172 с. — ISBN 978-5-9963-1611-3.

13. Разин С. В., Гаврилов А. А. Структурно-функциональные домены эукариотического генома // БИОХИМИЯ, 2018, том 83, вып. 4, с. 440 – 451

14. Стегний В. Н. Системная реорганизация архитектоники политенных хромосом в онто- и филогенезе малярийных комаров. П. Видоспецнфичность в характере взаимоотношений хромосом с ядерной оболочкой в питательных клетках яичников // Генетика. - 1987. - Т. 23, №7. - С. 1194.

15. Стегний В. Н., Шарахова М. В. Системная реорганизация архитектоники политенных хромосом в онто- и филогенезе малярийных комаров. Структурные особенности зон прикрепления хромосом к ядерной мембране / В. Н. Стегний, М. В. Шарахова // Генетика. - 1991. - Т. 27, №5. - С. 828.

16. Стегний В.Н. Популяционная генетика и эволюция малярийных комаров. Томск: Изд-во Том. ун-та. - 1991. - С. 137.

17. Стегний В.Н. Популяционная генетика и эволюция малярийных комаров – Томск: изд-во ТГУ. – 1991. – 136 с.

18. Стегний В. Н. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция. Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та. - 1993. – С. 111.

19. Усов К. Е., Вассерлауф И.Э., Коханенко А.А., Олюшина Д.И., Саруханян М.С., Стегний В.Н. Анализ трехмерной организации политенных хромосом в ядрах трофоцитов *Drosophila virilis* // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2013. № 1 (21). С. 173–183

20. Чубарева Л.А. Хромосомный полиморфизм в природных популяциях кровососущих мошек и некоторых других двукрылых насекомых // Цитология. 1974. Т. 6, № 3. С. 267–280.

21. Belmont A.S., Zhai Y., Thilenius A. Lamin B distribution and association with peripheral chromatin revealed by optical sectioning and electron microscopy tomography / A.S. Belmont, Y. Zhai, A. Thilenius // J. Cell Biol. - 1993. - Vol. 123, N_{2} 6. - P. 1671–1685.

22. Cremer C., Cremer T., Gray J.W. Induction of chromosome damage by ultraviolet light and caffeine: correlation of cytogenetic evaluation and flow karyotype // Cytometry. 1982. V. 2. P. 287–290.

23. Cremer T., Cremer M. Chromosome territories // Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2010. Vol. 2, no. 3. – P. 003889. – doi:10.1101/cshperspect.a003889. – PMID 20300217

24. Dixon J.R., Selvaraj S., Yue F. et al. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions // Nature. 2012. V. 485. P. 376–380.

25. Goldman R. D. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture /
R. D. Goldman, et al. // Genes Dev. – 2002. – Vol. 16. – P. 33–547.

26. Gruenbaum Y. The nuclear lamina comes of age / Y. Gruenbaum, et al. // Molecular Cell Biology. - 2005. - № 6. - P. 21–31.

27. Irina Soloveva, Antonio Cavallo, Lothar Schermelleh Spatial Preservation of Nuclear Chromatin Architecture during Three-Dimensional Fluorescence in Situ Hybridization (3D-FISH) // Experimental Cell Research 276, 10–23 (2002)

28. Keyl H.G. Chromosomenevolution bei Chironomus. Chromosomenumbauten und phulogenetishe Beriehungen der Arten // Chromosoma. 1962. Vol. 13. P. 464–495. 29. Kirkpatrick M. How and why chromosome inversions evolve // PLoS biology. — 2010. — Vol. 8, no. 9. — P. e1000501. — PMID 20927412

30. Kokhanenko A. A., Anan'ina TV, Stegniy VN. The changes in chromosome 6 spatial organization during chromatin polytenization in the Calliphora erythrocephala Mg. (Diptera: Calliphoridae) nurse cells. Protoplasma. 2013;250(1):141-149.

31. Lieberman-Aiden E., van Berkum N.L., Williams L. et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome // Science. 2009. V. 326. P. 289–293.

32. Melcer S. Invertebrate lamins / S. Melcer, Gruenbaum Y., Krohne G. // Exp. Cell Res. – 2007. – Vol. 313: - P. 2157–2166.

33. Paddy M.R. Interphase nuclear envelope lamins form a discontinuous network that interacts with only a fraction of the chromatin in the nuclear periphery / M. R. Paddy, et al. // Cell. - 1990. - Vol. 62, N_{2} 1. - P. 89–106.

34. Peric-Hupkes D. Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation / D. Peric-Hupkes, et al. // Mol Cell. – 2010. – Vol. 38. - P. 603–613.

35. Pfeiffer P., Goedecke W., Obe G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal abberations // Mutagenesis. - 2000. - Vol. 15, no. 4. - P. 289-302. - PMID 10887207

36. Sage B.T. Heterochromatic self-association, a determinant of nuclear organization, does not require sequence homology in Drosophila / B.T. Sage, A.K. Csink // Genetics. - 2003. - Vol. 165, № 3. - P. 1183–1193.

37. Sturtevant A.H. A case of rearrangement of genes in Drosophila // Proc Natl Acad Sci USA. — Vol. 7, no. 8. — P. 235—237. — PMID 16576597

38. Stuurman N. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions / N. Stuurman, S. Heins, U. Aebi // J. Struct. Biol. - 1998. - Vol. 122. - P. 42–66.



Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Пацкан Иван **Проверяющий:** Пацкан Иван (<u>patskanivan64@gmail.com</u> / ID: 7752954)

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <u>users.antiplagiat.ru</u>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ	ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ		
№ документа: 5 Начало загрузки: 15.06.2021 16:50:26 Длительность загрузки: 00:00:01 Имя исходного файла: ВКР_Пацкан_2021 (1)_removed.pdf Название документа: ВКР_Пацкан_2021 Размер текста: 65 кБ Тип документа: Выпускная квалификационная работа Символов в тексте: 66321 Слов в тексте: 8152 Число предложений: 887	Начало проверки: 15.06.2021 16:50:27 Длительность проверки: 00:00:17 Комментарии: не указано Модули поиска: Интернет	7	
ЗАИМСТВОВАНИЯ 0	САМОЦИТИРОВАНИЯ 0%	ЦИТИРОВАНИЯ 0%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ 91,83%

Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа. Самоцитирования — доля фрагментов текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа, по отношению к общему объему документа.

Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативноправовой документации.

Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.

Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.

Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.

Заимствования, самоцитирования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

N₂	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска
[01]	4,06%	ЗС-МЕТОДЫ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМА - PDF http://docplayer.ru	07 Мая 2018	Интернет
[02]	2,17%	Скачать полнотекстовую версию http://journals.tsu.ru	26 Ноя 2016	Интернет
[03]	1,95%	https://esu.citis.ru/ikrbs/NZCRHI7L3AUCN27EIE9JJ8GD https://esu.citis.ru	21 Map 2018	Интернет