

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЯДЕР ЦИСТОЦИТОВ *CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA* MG. (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)

Д.А. Федоришин, Т.В. Ананьина

Научный руководитель: к.б.н. Т.В. Ананьина

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: strix187@yandex.ru

SPATIAL ORGANIZATION OF CYSTOCYTES NUCLEUS IN *CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA* MG. (DIPTERA: CALLIPHORIDAE).

D.A. Fedorishin, T.V. Anan'ina

Scientific Supervisor: PhD T.V. Anan'ina

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: strix187@yandex.ru

Annotation. We have carried out the analysis of areas of condensed chromatin in the nuclei of the cystocytes in *Calliphora erythrocephala* Mg. (Diptera: Calliphoridae). The differences in their morphology and location has been shown. We have researched the location and morphology of the territory of the nucleolar chromosome 6 and the nucleolus.

Пространственная организация ядер стволовых и делящихся клеток является начальным шаблоном, из которого формируется пространственная организация ядер дифференцированных клеток. У двукрылых насекомых с политрофным мероистическим типом оогенеза ооцит формируется в результате функционирования группы клеток (цисты). Ооцит и связанные с ним питающие клетки происходят от одного предшественника – стволовой клетки, в результате серии митотических делений. На начальных стадиях формирования цисты недифференцированные диплоидные клетки (цистоциты) имеют схожую морфологию ядер. В процессе дифференцировки хроматин ооцита конденсируется в кариосферу, а хромосомы питающих клеток многократно редуцируются. Наше исследование было посвящено изучению пространственной организации ядер цистоцитов. Понимание пространственной организации недифференцированных клеток является предпосылкой к пониманию механизмов становления пространственной организации хроматина в процессе дифференцировки. Целью исследования было изучение пространственной локализации внутриядерных структур. Для достижения цели решались следующие задачи: 1. выявить области конденсированного хроматина; 2. изучить морфологию и локализацию в ядре ядрышкообразующей хромосомы и ядрышка. Объектом исследования были клетки яичников мухи *Calliphora erythrocephala* Mg. (Diptera: Calliphoridae).

Изучались ядра цистоцитов – клеток, формирующихся в яичниках в передней части овариолы – гермарию. В зависимости от стадии формирования цисты гермарию разделяют на регионы (Рис. 1А). В регионе 1 находятся стволовые клетки и происходят митотические деления клеток, в результате которых формируются цисты. После окончания митотических делений цисты смещаются в регион 2а. Затем

происходит изменение формы цисты и она смещается в регион 2b. В регионе 3 будущий ооцит выдвигается вперед, трофоциты группируются за ним, циста приобретает форму грозди и отпочковывается как новая яйцевая камера [1].

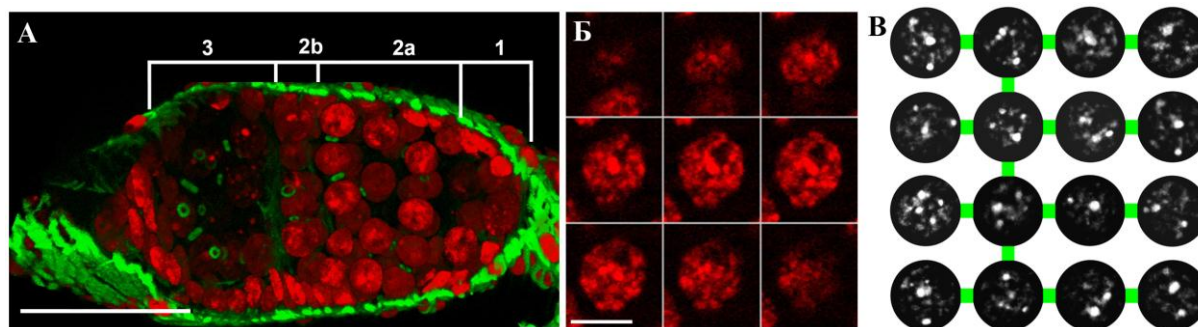


Рис. 1. Ядра цистоцитов из гермария *C. erythrocephala*. Хроматин окрашен DAPI (красный); F-актин окрашен фаллоидином-FITC (зеленый).

A – гермарий *C. erythrocephala* 1, 2a, 2b, 3 – регионы гермария. Масштаб – 40 мкм;

B – галерея оптических срезов ядра цистоцита из региона 2a гермария. Масштаб – 5 мкм;

B' – реконструкция связей цистоцитов в цисте из региона 2a и морфология их ядер после программной коррекции интенсивности сигнала DAPI. Масштаб – 5 мкм.

Одним из методов выявления конденсированного хроматина является окраска флуоресцентным красителем DAPI, который окрашивает весь хроматин, но особо интенсивно окрашиваются АТ-богатые районы хромосом. Хроматин в интерфазных ядрах цистоцитов *C. erythrocephala* представлен рыхлыми скоплениями, заполняющими все пространство ядра (Рис. 1B). После программной (AxioVision 4.7) коррекции интенсивности сигнала DAPI в ядрах проявляются интенсивно окрашенные, плотные и компактные районы конденсированного хроматина (гетерохроматиновые области). Методом 3D-реконструкций ядер цистоцитов было показано, что клетки отличаются количеством, размером и расположением гетерохроматиновых областей внутри ядра. Чтобы ответить на вопрос, отличаются ли по этому признаку клетки в пределах одной цисты, нам было необходимо реконструировать связи между клетками цист. Для этого гермарии окрашивали фаллоидином-FITC, который специфично связывается с фибриллярным актином (F-актином). F-актин присутствует в кольцевых каналах – структурах, которые формируются в области перетяжки во время неполного цитокинеза клеток цисты. Окрашивая кольцевые каналы, мы получаем возможность реконструировать связи между клетками цисты и определять, к какой цисте относится та или иная клетка. Была проведена реконструкция 20 цист и проанализирована морфология ядер цистоцитов. Оказалось, что даже соседние (произошедшие в результате одного митоза) клетки в цисте отличаются количеством, размером и расположением гетерохроматиновых областей (Рис. 1B).

Хромосома 6 *C. erythrocephala* является ядрышкообразующей [2]. Мы изучали расположение хромосомы 6 *C. erythrocephala* в ядрах диплоидных цистоцитов из региона 2 гермария. Для визуализации хромосомы 6 был использован метод FISH зонда из ДНК-библиотеки хромосомы 6 на ядра цистоцитов. Были проанализированы 100 ядер. В 89 ядрах хромосомные территории гомологичных шестых хромосом были представлены одной локальной, компактной областью в центральной части ядра (Рис. 2A). В 12-ти ядрах выявилось две контактирующие между собой области гибридизации ДНК-зонда (Рис. 2B).

Для визуализации ядрышка был использован метод иммунофлуоресцентного окрашивания антителами, имеющими сродство к белку ядрышка – фибрилларину [3].

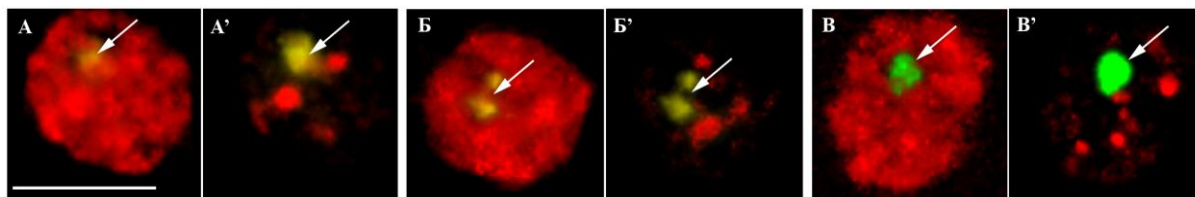


Рис. 2. Ядрышкообразующая хромосома 6 и ядрышко цистоцита. Масштаб – 5 мкм. Красный – хроматин (окрашен DAPI); желтый – хромосома 6, зеленый – ядрышко (указаны стрелками).

A – одиночная область гибридизации зонда с хромосомой 6;

B – двойная область гибридизации зонда с хромосомой 6;

V – ядрышко цистоцита.

A', B', V' – Соответствующие ядра после программной коррекции интенсивности сигнала DAPI.

Было показано, что в цистоцитах *C. erythrocephala* имеется одно ядрышко, которое имеет близкую к сферической форму и расположено в центральной области ядра (Рис. 2В).

Митотические циклы цистоцитов во время формирования цисты синхронизированы [4]. Различия в количестве и расположении гетерохроматиновых областей в ядрах цистоцитов, относящихся к одной цисте, вероятно, является результатом некоторой рассинхронизации синтетических процессов, протекающих в этих ядрах во время интерфазы. Выявлено, что в диплоидных цистоцитах на стадии интерфазы хромосомные территории гомологичных ядрышкообразующих хромосом объединены или располагаются рядом в центральной области ядра. Такое объединение сохраняется после начала политенизации хромосом питающих клеток на последующих стадиях оогенеза [5].

Исследование проводилось при финансовой поддержке Программы «Научный фонд им. Д.И. Менделеева Томского государственного университета» и частичной поддержке гранта Президента РФ НШ-1279.2014.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ананьина Т.В., Ведерников А.Е., Ходжанов А.Э., Стегний В.Н. Развитие овариол и структур цитоскелета трофоцитов *Calliphora erythrocephala* Mg. (Diptera: Calliphoridae) // Цитология. – 2010. – Т. 52, № 2. – С. 110–116.
2. Kokhanenko A.A., Anan'ina T.V., Stegnyy V.N. Localization of rRNA genes in the nuclear space of *Calliphora erythrocephala* Mg. nurse cells during polytenization // Protoplasma. – 2014. – Vol. 251. – P. 93–101.
3. Sharakhova M.V., George P., Brusentsova I.V. et al. Genome mapping and characterization of the *Anopheles gambiae* heterochromatin // BMC Genomics. – 2010. – Vol. 11. – P. 459.
4. Огиенко А.А., Федорова С.А., Баричева Э.М. Основные аспекты развития половой системы самок *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 10. – С. 1341–1357.
5. Kokhanenko A.A., Anan'ina T.V., Stegnyy V.N. The changes in chromosome 6 spatial organization during chromatin polytenization in the *Calliphora erythrocephala* Mg. (Diptera: Calliphoridae) nurse cells // Protoplasma. – 2013. – Vol. 250. – P. 141–149.