

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

проф., д-р биол. наук

В. Н. Стегний

« 11 » 06 2021 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

ПОЛИМОРФИЗМЫ РАЗМЕРОВ БЛОКА ПРИЦЕНТРОМЕРНОГО
ГЕТЕРОХРОМАТИНА ХРОМОСОМЫ 2 МАЛЯРИЙНОГО КОМАРА *ANOPHELES*
MESSEAE

по основной образовательной программе подготовки магистра
направление подготовки 06.04.01 - Биология

Кириленко Кирилл Михайлович

Руководитель ВКР

канд. биол. наук, доцент

Г. Н. Артёмов

подпись

« 11 » 06 2021 г.

Автор работы

студент группы № 011921

К. М. Кириленко

подпись

Томск – 2021

АННОТАЦИЯ

Тема данной диссертации – полиморфизм размеров блока прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 малярийного комара *Anopheles messeae*.

Объем магистерской диссертации 64 страницы, для написания диссертации использовалось 114 источников литературы, в том числе 9 русскоязычных, 104 англоязычных и 1 немецкоязычный. Работа содержит 17 рисунок и 4 таблицы. Также работа содержит 4 приложения с рисунками и таблицами.

Диссертация состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов, заключения, списка использованной литературы и источников.

Ключевые слова: гетерохроматин, полиморфизм гетерохроматина, хроматин, хромосомы, малярийные комары, *Anopheles*, *Anopheles messeae*, полиморфизм размеров блока.

Во введении определена актуальность изучаемой проблемы, она заключается в том, что комары рода *Anopheles* являются переносчиками малярийного плазмодия (*Plasmodium falciparum*), всестороннее изучение вектора малярийного плазмодия способствует поиску новых средств для борьбы с малярией.

Цель работы: изучить полиморфизм природных популяций малярийного комара *Anopheles messeae* по размеру блоков прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 и разработать метод определения размеров блоков прицентромерного гетерохроматина у самцов.

Были поставлены следующие задачи:

1. Провести анализ частоты встречаемости размерных вариантов ПГХ2 в природных популяциях *An. messeae* Томской области.

2. Разработать метод оценки полиморфизма размеров блоков прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 с использованием метафазных хромосом.

3. Разработать метод оценки полиморфизма размеров блоков прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 на основе дот-блот гибридизации.

Вторая глава была посвящена описанию объектов и методов исследования. Объектами исследования послужили тела имаго и личинок комаров из села Дзержинское (Томская область), села Чаинск (Томская область), села Тегульдет (Томская область), деревни Малое Нестерово (Томская область).

В третьей главе описываются и обсуждаются результаты, полученные в ходе проведенных исследований. В ходе работы было проанализировано 4 популяции комаров *An. messeae* по размеру блоков прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 из села Дзержинское (Томская область), села Чаинск (Томская область), села Тегульдет (Томская область), деревни Малое Нестерово (Томская область). Был проведен статистический межпопуляционный анализ, не показавший различий между южными и северными популяциями.

Было определено, что на препаратах митотических хромосом из имагинальных дисков личинок с последующим FISH с микродиссекционной пробой Sb2 полиморфизмов блоков прицентромерного гетерохроматина не обнаруживается.

Разработана методика оценки размеров блоков прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *An. messeae*, основанная на дот-блот гибридизации с микродиссекционными пробами Sb2, 14Mes. Определено, что гены из гетерохроматина не подходят в качестве гибридизующей пробы для дот-блот гибридизации. Картирован ген AATE006345 в геноме *An. messeae*, он фланкирует блок гетерохроматина на 15A районе 2L хромосомы.

ОГЛАВЛЕНИЕ

1	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1	Общие представления о гетерохроматине.....	8
1.1.1	История изучения гетерохроматина	8
1.1.2	Типы гетерохроматина и их образование.....	9
1.1.3	Характеристики гетерохроматина.....	11
1.1.4	Хроматин в современном представлении.....	15
1.1.5	Расположение гетерохроматина в клеточном ядре	17
1.1.6	Строение гетерохроматина	18
1.1.7	Функции гетерохроматина	20
1.2	Полиморфизмы гетерохроматина	22
1.2.1	Общие сведения	22
1.2.2	Полиморфизмы прицентромерного гетерохроматина у представителей рода <i>Anopheles</i>	24
2	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	27
2.1	Приготовление препаратов хромосом	27
2.1.1	Препараты политенных хромосом	27
2.1.2	Препараты митотических хромосом	27
2.1.3	Приготовление сухо-воздушных препаратов.....	28
2.2	Микроскопирование и измерение размера блока	28
2.2.1	Световая микроскопия.....	28
2.2.2	Измерения блока прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 <i>An. messeae</i>	29
2.2.3	Флуоресцентное микроскопирование.....	30
2.3	Получение меченного зонда	30
2.4	Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH)	31
2.5	Выделение ДНК.....	32
2.6	Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	33

2.6.1	Амплификация ДНК	33
2.6.2	Гель-электрофорез ПЦР-продукта	34
2.6.3	Переосаждение ПЦР-продукта	34
2.7	Дот-блот гибридизация.....	34
2.8	Статистическая обработка результатов	36
3	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	38
3.1	Анализ частот встречаемости размерных вариантов блоков прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 в популяциях <i>Ap. messeae</i>	38
3.2	Оценка полиморфизма блока прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 <i>Ap. messeae</i> на митотических хромосомах	42
3.3	Оценка полиморфизма блока прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 <i>Ap. messeae</i> дот-блот гибридизацией	44
	ВЫВОДЫ	50
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	51
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ И ЛИТЕРАТУРЫ.....	53
	ПРИЛОЖЕНИЕ А	65
	ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	67
	ПРИЛОЖЕНИЕ В	69
	ПРИЛОЖЕНИЕ Г.....	72

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

г – грамм

л – литр

мкг – микрограмм

мкл – микролитр

мл – миллилитр

мм – миллиметр

мМ – миллимоль

п.н – пар нуклеотидов

КТ – комнатная температура

МГЭ – мобильные генетические элементы

ПГХ – прицентромерный гетерохроматин

ПГХ2 – прицентромерный гетерохроматин хромосомы 2

ПЦР – полимеразная цепная реакция

FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*

Mb – миллион пар нуклеотидов

ВВЕДЕНИЕ

Хроматин эукариот подразделен на структурно и функциональное независимые участки – эухроматин и гетерохроматин. Первоначально эти две формы отличали цитологически по степени окрашивания: гетерохроматин окрашивается интенсивно в отличие от эухроматина. Долгое время гетерохроматин считался функционально неактивной областью хромосом, так как в нем понижен уровень транскрипции или полностью отсутствует, он обеднен генами. Также был известен феномен эффекта положения гена, который сегодня связывают с тем, что при переносе гена из эухроматиновой области в гетерохроматиновую, этот ген инактивируется, все это указывало на то, что гетерохроматин является неактивной частью хроматина [1, 2]. Однако со временем накапливались сведения, что в гетерохроматине располагаются гены «домашнего хозяйства», он участвует в структурной организации хромосом, в поддержании хромосом в интерфазе клеточного цикла, в т.ч. в креплении хромосом к ламине клеточного ядра, играет немаловажную роль в репликации, регуляции экспрессии генов, в мейотическом спаривании и во многих других функциях, необходимых для нормального клеточного функционирования [3, 4, 5].

Сегодня считается, что гетерохроматин является неотъемлемой структурной частью хромосом эукариот. Выделяют 3 области гетерохроматина: прицентромерный, теломерный, интеркалярный, эти области визуально хорошо различимы при просмотре в световой микроскоп митотических хромосом при их селективном окрашивании. Гетерохроматин окрашивается методами G-окрашивания по Романовскому-Гимзе и при C-окрашивании, при котором выявляется конститутивный гетерохроматин, и другими специфическими методами окрашивания [6]. Наряду с конститутивным существует факультативный гетерохроматин, например, гетерохроматизированные гены, которые могут находиться в таком состоянии только в данной клетке или ткани, тогда как в других тканях этот ген будет

активным [3]. Часто области ПГХ сцепляются между собой и образуют структуру, называемую хромоцентром, хромоцентр хорошо заметен на препаратах политенных хромосом насекомых [1].

Самые быстро эволюционирующие части генома, в основном, расположены в гетерохроматине в связи с чем большее количество полиморфных участков наблюдаются именно в нём [7, 8]. К полиморфизмам гетерохроматина относят такие структурные изменения хромосом как: транслокации, инверсии, дупликации, делеции, SNP, которые являются характеристикой гетерохроматина вообще. Структурные изменения гетерохроматина приводят к видообразованию [9, 10, 11, 12]. Чаше других выявляются полиморфные участки в ПГХ.

Полиморфизмы гетерохроматина традиционно изучаются на представителях двукрылых насекомых, в том числе, на комарах рода *Anopheles* [13]. Представители комаров рода *Anopheles* являются хорошо исследованной модельной группой организмов. Изучение структурных особенностей организации хромосом комаров данного рода удобно по причине наличия структурированных политенных хромосом в разных тканях, в том числе, в тканях генеративной системы – в трофоцитах.

Ранее было показано, что комары *Anopheles messeae* обладают разными полиморфизмами в гетерохроматине и особенно примечательными полиморфизмами размеров блоков ПГХ хромосомы 2 [14]. Так, было показано, что разные особи одной и той же популяции комаров могут обладать размерными вариантами ПГХ2 [14, 15].

До сих пор единственный способ анализа размеров полиморфизмов ПГХ2 *Anopheles messeae* был визуальный способ оценки размеров блоков на препаратах политенных хромосом. Поэтому актуальным остается вопрос создания новых маркеров для оценки размеров блоков прицентромерного гетерохроматина, изучение функционального значения данного типа полиморфизмов у *Anopheles messeae*. Также всестороннее изучение комаров рода *Anopheles* способствует поиску новых средств борьбы с малярией.

Цель работы: изучить полиморфизм природных популяций малярийного комара *Anopheles messeae* по размеру блоков прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 и разработать метод определения размеров блоков прицентромерного гетерохроматина у самцов.

Были поставлены следующие задачи:

4. Провести анализ частоты встречаемости размерных вариантов ПГХ2 в природных популяциях *An. messeae* Томской области.

5. Разработать метод оценки полиморфизма размеров блоков прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 с использованием метафазных хромосом.

6. Разработать метод оценки полиморфизма размеров блоков прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 на основе дот-блот гибридизации.

Работа выполнена на базе лаборатории экологии, генетики и охраны окружающей среды НИИ биологии и биофизики Томского государственного университета под руководством кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Артемова Глеба Николаевича.

1 Обзор литературы

1.1 Общие представления о гетерохроматине

1.1.1 История изучения гетерохроматина

Впервые термин «гетерохроматин» наряду с термином «эухроматин» ввел ботаник немецкого происхождения Эмиль Хайц [16]. Э. Хайц придумал термин «гетерохроматин», чтобы отличать области, которые оставались сильно окрашенными в течение клеточного цикла, от тех, которые становились невидимы во время интерфазы. Из-за сильно уплотненного состояния гетерохроматина Э.Хайц предположил, что зоны гетерохроматина генетически неактивные, заложив основы для изучения связей между уплотнениями хроматина и уровнем экспрессии генов [17]. Однако еще на рубеже XIX-XX столетий некоторыми исследователями были обнаружены структуры, поведение которых соответствовало описанию Э. Хайца. В ряде работ, написанных до введения терминов эухроматин и гетерохроматин, можно встретить термины изопикноз (isopycnosis) и гетеропикноз (heteropycnosis) соответственно.

Первые связи между сайленсингом генов и гетерохроматиной формацией возникли из наблюдений Генри Джозефа Мёллера из серии работ, сделанных им на *Drosophila melanogaster*. Г. Д. Мёллер индуцировал хромосомные перестройки в геноме *D.melanogaster* потоком рентгеновских лучей, которые вызывали пестрый фенотип пигментации глаз мух из-за инактивации экспрессии гена white без изменения его первичной последовательности [18, 19]. Джек Шульц позже продемонстрировал, что инактивация гена white является результатом перемещения гена в близость к гетерохроматиновой области, предполагая, что гетерохроматин может влиять на активность гена, такое поведение стали называть мозаичным эффектом положения (position-effect variegation, PEV) [20].

Еще Э.Хайцем было замечено, что гетерохроматин имеет гетерогенное распространение внутри и между хромосомами в разных клетках

D.melanogaster. Фактически Хайц заметил, что гетерохроматин часто связан с половыми хромосомами, и что некоторые хромосомные области окрашиваются только в определенных типах клеток [21]. Позже стало понятно, что Хайц наблюдал конститутивный гетерохроматин и факультативный соответственно.

Исследования последующих лет были сосредоточены на строение гетерохроматина, так было показано, что гетерохроматин богат МГЭ, которые были первыми генетическими элементами, обнаруженными в гетерохроматине [22]. Позже в гетерохроматине были обнаружены сателлитные последовательности разной сложности [23, 24].

Молекулярно гетерохроматин характеризуется гипоацетилированием гистонов, что приводит к высокой компактизации хроматина.

К настоящему времени накоплено много информации о строении, функциях, эволюционной роли гетерохроматина вообще. За столетие с начала изучения гетерохроматина парадигма о молчащей мусорной области генома сменилась парадигмой об обязательном компартменте всех геномов эукариот, отвечающем за многие жизненно необходимые функции организма, так и за эволюционные преобразования на уровне вида и более высоких таксономических групп.

1.1.2 Типы гетерохроматина и их образование

Как было сказано выше еще Э.Хайц наблюдал, что гетерохроматин проявляется по-разному в разных тканях, так были выделены области конститутивного гетерохроматина, присутствующего во всех клетках организма, и факультативного, который можно наблюдать только в определенных группах клеток.

Конститутивный гетерохроматин наблюдается в конденсированных областях хромосом, которые находятся в таком состоянии во всех типах клеток организма и включает прицентромерный и теломерный

гетерохроматин, некоторые транспозоны и обедненные генами участки хромосом. Молекулярно конститутивный гетерохроматин определяется наличием паттернов H3K9me_{2/3} (дважды или трижды метилированные гистоны третьего типа по 9 остатку лизина), осуществляется такая модификация гистоновыми метилтрансферазами Suv39h у млекопитающих и Su(var)3-9 у *D.melanogaster* и у других представителей *Diptera* и Clr4 в дрожжах [25, 26]. Эти метилтрансферазы способны к самораспространению гетерохроматина, поскольку они распознают H3K9me₃ и метилируют соседние нуклеосомы [27, 28]. Белок гетерохроматина HP1a у *D.melanogaster* и его ортолог у млекопитающих (HP1 α), *S.pombe* (Swi6) состоят из двух доменов, разделенных шарнирной областью: N-концевого хромомена, связывающегося с H3K9me₃ и C-концевого хромомена, который служит платформой для связывания большого количества хроматин-модифицирующих белков и белков оболочки ядра, что приводит к распространению гетерохроматина на большие домены [29, 30].

Факультативный гетерохроматин состоит из гетерохроматиновых регионов, специфичных для определенного типа клеток, которые сохраняют свой потенциал к переходу в эухроматизированное состояние при определенных условиях. В факультативном гетерохроматине повышен уровень белков комплекса Polycomb1 и Polycomb2, которые, в том числе, отвечают за нанесение гистоновой метки H3K27me₃, связанной с гетерохроматином, другая гистоновая метка, часто встречающаяся в факультативном гетерохроматине – H2AK119ub (убиквитинирование по 119 остатку лизина гистона H2A), в случае инактивированной X-хромосомы у млекопитающих, которая также находится в факультативном гетерохроматине наблюдается замена гистона H2A на macroH2A [31].

Гетерохроматин считается репрессивным компартментом хромосом, однако уровень РНК, экспрессируемый с гетерохроматина не равен нулю, более того, для нормальной формации гетерохроматина необходимы некоторые молекулы РНК. Так, малые интерферирующие РНК (siRNA),

синтезированные в ПГХ *S.pombe*, Xist-РНК из X-хромосомы млекопитающих, необходимы для формирования гетерохроматина в определенных случаях [32, 33]. пиРНК (piwiRNA) и другие малые некодирующие РНК, участвующие в пострансляционной регуляции экспрессии генов, возникают из кластеров повторяющихся элементов, встроенных в ДНК гетерохроматина [34]. Обработка гетерохроматина РНКазой гетерохроматина способна разрушать его [35]. Также само присутствие сателлитных повторов может модулировать образование гетерохроматина [36].

Помимо классификации гетерохроматина на факультативный и конститутивный, также гетерохроматин классифицируется в зависимости от локализации на хромосомах, выделяют 3 типа локализации: прицентромерный и теломерный, которые всегда являются конститутивными и интеркалярный, который может быть как конститутивным, так и факультативным в зависимости от типа клеток.

1.1.3 Характеристики гетерохроматина

Среди черт, характерных для гетерохроматина можно выделить следующие:

1. В отличие от эухроматина гетерохроматин находится в более компактном состоянии во время интерфазы. Эта особенность являлась ключевой при разбиении хроматина на 2 компартмента (глава 1.1.1).
2. Гетерохроматин содержит большое количество tandemных повторов, прежде всего, сателлитной ДНК разной длины [38].
3. Содержание генов в гетерохроматине на порядок ниже, чем в эухроматине. Транскрипция с имеющихся в гетерохроматине генов остается на низком уровне.
4. Гетерохроматин может распространяться. Такое распространение во многом не зависит от последовательности ДНК, на которой закладывается гетерохроматин. Классический пример – эффект положения мозаичного типа

у *D.melanogaster* [39]. Такой феномен наблюдается, когда некоторые хромосомные перестройки приводят к сближению гетерохроматина и эухроматина, в таком случае гетерохроматин может распространяться на большие участки эухроматина.

5. Распространение гетерохроматина ограничено. Поскольку гетерохроматин может самопроизвольно распространяться, приводя к снижению экспрессии целых участков, существуют механизмы, ограничивающие это распространение. Среди механизмов, ограничивающих распространение гетерохроматина выделяют следующие: наличие областей с ограниченным количеством нуклеосом, удаление уже собранных нуклеосом, работа факторов, снижающих сайленсинг (например, факторы транскрипции) и др. [37].

6. Гетерохроматин может передаваться по наследству. При репликации ДНК дочерние хромосомы случайно получают наборы тетрамеров H3-H4. Гистоновая метка H3K9me на данном тетрамере является сигналом к привлечению лизин-метилтрансферазы (KMT), этот фермент способен распространять гетерохроматин далее вне зависимости от последовательности ДНК. Этот процесс позволяет наследовать гетерохроматин за счет репликации в дочерние клетки, такой процесс называется «цис-наследованием состояния гетерохроматина» [37].

7. Гетерохроматин защищает геном от разных повторяющихся последовательностей. Повторяющиеся последовательности ДНК представляют угрозу для стабильности генома за счет внедрения в ключевые для стабильности области. Гетерохроматин играет основную роль в подавлении негативного воздействия этих последовательностей [40].

8. Гетерохроматин участвует в функциональности центромер. В большинстве эукариотических клеток центромерные регионы богаты тандемными повторами, которые являются частью гетерохроматина (ПГХ), обогащенного аналогом H3 – центромерным белком A (CENP-A), более того,

ДНК этих повторов сильно метилирована. CENP-A играет ключевую роль в сборке кинетохора, в спаривании сестринских хромосом [41].

9. Гетерохроматин участвует в дифференциации клеток. Известным подтверждением данного феномена является подавлением гетерохроматином двух генных кассет *S.pombe* – *mat2P* и *mat3M*, контролирующих развитие организма в определенный тип спаривания: в зависимости от того, какая кассета помещается в гетерохроматин, клетка дрожжей развивается в один из двух типов спаривания – минус (M) или плюс (P) [42].

10. Совместное действие читателей и писателей хроматина (reader-writing coupling). Посттрансляционные модификации гистонов контролируют связывание определенных белков с нуклеосомами посредством взаимодействия с определенными белковыми доменами, известными как «считывающие» домены (reader domains). Одновременно со считывающими доменами многие белки-модификаторы хроматина содержат «пишущие» домены (writer domains), которые способны модифицировать гистоны посредством добавления определенной гистоновой метки, или домены-стиратели (eraser domains), которые стирают гистоновые метки (рисунок 1) [43].

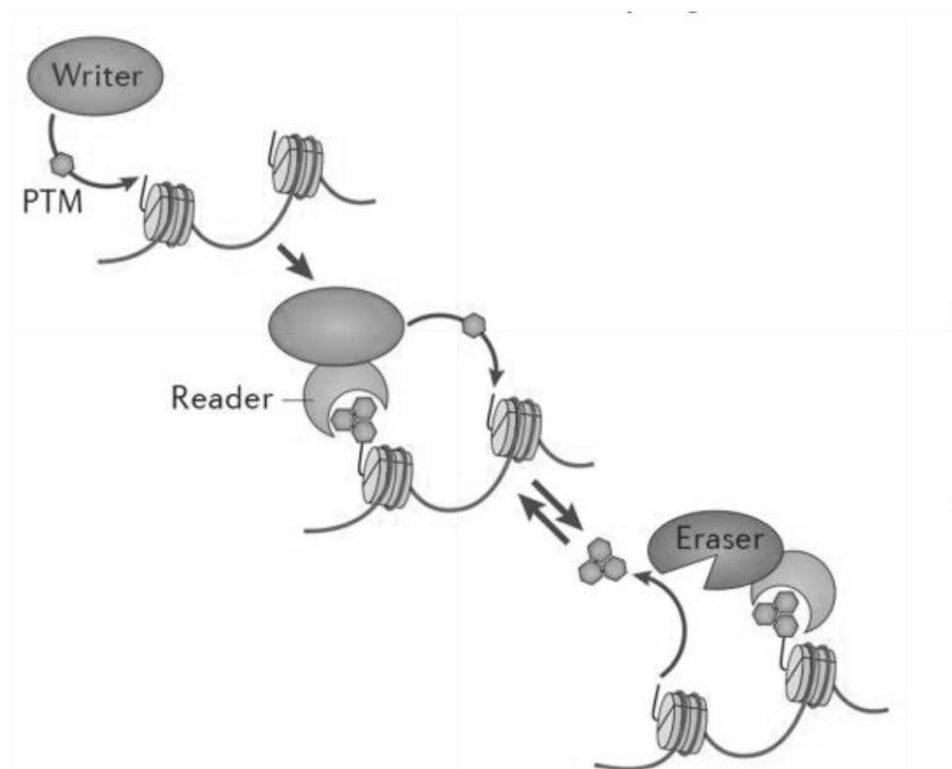


Рисунок 1 – Сборка и разборка гетерохроматина связыванием читающего домена и модификаторов (по Allshire R. C. et al 2018)

11. Различие между установлением и поддержанием хроматина в гетерохроматизованном состоянии. Для установления гетерохроматина и его дальнейшего поддержания в определенном локусе используются разные сигналы и факторы. Например, миРНК играют важную роль в установлении гетерохроматина у *S.pombe*. В отсутствии миРНК H3K9me не может быть установлен на центромерных повторах, однако для дальнейшего поддержания ПГХ миРНК не является обязательным [44].

12. Рекрутирование гетерохроматином некодирующих РНК. Несмотря на то, что гетерохроматин является сайленсной частью генома, многие некодирующие РНК транскрибируются именно с гетерохроматина [45, 46]. Одна из функций такой транскрипции является привлечение факторов сайленсинга к гетерохроматину, которые связываются с вновь синтезированными транскриптами [47].

Вышеприведенные черты не исчерпывают текущие представления о гетерохроматине, а отражают лишь более общие из них. В зависимости от типа, локализации гетерохроматина особенности его строения и функционирования будут разными.

1.1.4 Хроматин в современном представлении

Как было сказано выше, классически геном эукариот разбивался на 2 компартмента: эухроматин и гетерохроматин. Однако со временем накопилось достаточно сведений для более детальной классификации хроматина. Пионерные работы в этой области проведены Filion et al [48]. Авторами предложено разбиение хроматина на 5 основных компартментов: жёлтый, красный, зеленый, черный и синий на основе связывания разных областей генома с разными белками из 53 предложенных в работе, методом определения связывания белков служил DamID (идентификация ДНК-аденин-метилтрансферазы). Так, зелёным хроматином авторы предложили обозначать область хроматина, богатую гистоновой меткой H3K9me_{2/3}, белком, связывающимся с хроматином HP1 и метилтрансферазой SU(VAR)3-9 (эти области и есть конститутивный гетерохроматин), а области, обогащенные гистоновыми метками H3K27me₃ и белками Polycomb – синим хроматином (факультативный). Третий тип гетерохроматина, который был выделен Filion et al было предложено называть черным, который покрывает более половины генома *D.melanogaster* (модельный объект в работе). Черный хроматин характеризуется связыванием с белками группы SuUR (супрессоры недорепликации), белками ламины. Характеризуется черный хроматин тем, что поздно реплицируется, в целом, очень похож на конститутивный гетерохроматин, несмотря на низкое содержание гистоновой метки H3K9me_{2/3} [49, 50]. В более поздних работах хроматин эукариот подразделялся на 9 состояний в зависимости от наличия или отсутствия 18

различных гистоновых модификаций, на 16 состояний также в зависимости от 8 различных гистоновых модификаций [51, 52].

Такое различное количество состояний хроматина, выделенное разными авторами, объясняется использованием, во-первых, разными белками и/или гистоновыми модификациями, на основе которых производилась дифференциация, во-вторых, различными методами по обнаружению связывания белков с хроматином. Так Filion et al использовали метод DamID, а авторы, заключившие о существовании 9 и 16 разных состояний хроматина, использовали метод ChiP (иммунопреципитация хроматина).

Термин хроматин был впервые введен Вальтером Флеммингом в 1882 году, как структура клеток, способная к интенсивному окрашиванию [53]. Долгое время хроматин подразделяли на 2 больших компартмента: эухроматин и гетерохроматин, однако со временем накапливались сведения, что, как гетеро- так и эухроматин можно дифференцировать на различные подкомпартменты. Сегодня хроматин рассматривается, как сложноустроенная структура эукариотического ядра, разбитая на множество разных подструктур, количество которых может варьировать в разных работах, так как оно зависит от способа дифференциации, которые основаны на разных белках, связывающихся с хроматином и разных гистоновых метках, присутствующих в хроматине.

В том числе разбиение на различные подкомпартменты сегодня претерпевает гетерохроматин, таким образом, структура, функции, строение гетерохроматина зависит от состояния, в котором он находится, а таких состояний может быть более двух классических (конститутивное и факультативное). Наименьшее количество состояний гетерохроматина, которые сегодня выделяют авторы в разных работах равно трем и называется: синим, зеленым и черным [48].

1.1.5 Расположение гетерохроматина в клеточном ядре

С развитием электронной микроскопии возникли предположения о неравномерном распределении гетерохроматина внутри ядра, он формирует большие компартменты, занимающие строгие положения особенно по периферии ядра и вокруг ядрышка, такие участки были названы LADs (ламин ассоциированные домены) и NADs (домены, ассоциированные с ядрышком) соответственно [54, 55]. LADs определяются как домены хроматина, связанные с компонентами внутренней мембраны, таким образом, привязывая их к периферии ядра. Эти участки богаты гистоновой меткой H3K9me_{2/3}, в случае факультативного гетерохроматина – H3K27me₃, обеднены генами, слабо экспрессируются [56]. В клетках млекопитающих LADs представлены во всех хромосомах и занимают до 30 % генома [57]. Механизмы образования LADs до сих пор остаются неясными, по-видимому, их образование зависит от связывания адаптерных белков, связывающихся с H3K9me_{2/3}, и взаимодействующих с ламинной. Например, HP1α у млекопитающих способен связываться с LBR белком ламин (рецептор Б ламин) и также с белками ламин типа А и В [58]. У *C.elegans* белок SEC-4 локализуется в ламине и связывается с H3K9me_{2/3}. Также предложены некоторые другие механизмы образования LADs [59].

Расположение гетерохроматина в ядре во время интерфазы зависит от расположения хромосом во время клеточного деления. Центромерные и теломерные участки группируются на противоположных сторонах периферии ядра у растений, дрожжей и *Drosophila* [60]. Такое распределение называется конфигурацией Рабля, оно зависит от ассоциации между центромерами и микротрубочками, и сохраняет ориентацию хромосом, наблюдаемую в анафазе митоза [61, 62].

Важно, что распределение гетерохроматина по периферии ядра приводит к обычному интерфазному распределению эухроматина и гетерохроматина, таким образом, образование LADs само по себе приводит

к формированию интерфазного хроматина. Палочки сетчатки глаза ночных млекопитающих имеют инвертированное состояние интерфазного хроматина: эухроматин находится по периферии ядра, а гетерохроматин смещен к центру [63]. Так, у мышей такое необычное состояние интерфазного хроматина объясняется подавлением экспрессии LBR белком ламины на 14 день эмбрионального развития и отсутствием экспрессии ламина А и С, трансгенная экспрессия LBR белка ламины приводит к нормальному распределению хроматина в интерфазе [63, 64]. Таким образом, белки, участвующие в связывании HP1α с ламиной являются ключевыми в локализации гетерохроматина в ядре, более того, само правильное образование гетерохроматина в ядре приводит к правильному образованию всего хроматина, следовательно, правильная формация гетерохроматина является достаточным условием для организации хроматина до некоторой степени.

NADs образуются в районе ядрышка, отличаются меньшей протяженностью в отличие от LADs, богаты сателлитными повторами, генами рибосомальной ДНК, репрессированными генами с меткой H3K9me3 и некоторыми генами развития с меткой H3K27me3 [65]. Показано, что некоторые последовательности из ядрышка могут переходить из NADs в LADs и обратно, если компартмент нарушен, чтобы поддерживать гены в супрессированном состоянии [66].

1.1.6 Строение гетерохроматина

Под строением гетерохроматина подразумевается, как первичная последовательность ДНК, составляющая его, так и другие молекулы (белки, РНК), образующие его. В целом, для факультативного гетерохроматина выполняется правило, что ДНК, составляющая его, будет консервативной и уникальной, тогда как в конститутивном гетерохроматине ДНК не будет уникальной, содержит большое количество повторов разного происхождения,

большое количество полиморфизмов. В настоящей подглаве рассмотрены особенности строения конститутивного гетерохроматина.

Размеры tandemных повторов, которые составляют конститутивный гетерохроматин варьируют от 5 до нескольких сотен нуклеотидов [67]. В большинстве клеток эуметазои теломеры образованы повторяющейся консенсусной последовательностью: 5'-TTAGGG-3', обогащены гистоновой меткой H3K9me3 [68]. Теломеры связаны с консервативным белковым комплексом, обеспечивающим их защиту.

В отличие от теломерного гетерохроматина ПГХ не обладает столь консервативной структурой, его последовательности отличаются даже внутри одного вида, что говорит о том, что его функции зависят не столько от первичной последовательности ДНК, сколько от дополнительных факторов, таких как: наличие разных гистоновых меток, связывание белков. На уровне последовательности для ПГХ характерно наличие разных tandemных повторов, среди которых встречаются: простые повторы (длина 5-200 п.н), последовательности ДНК-транспозонов (длина около 1000 п.н), последовательности ретровирусов (длина до 10 тысяч п.н), LINE-элементы (длина около 6 тысяч п.н), SINE-элементы (длина до 500 п.н) [68]. Также ДНК в ПГХ сильно метилирована в отличие от остальной геномной ДНК [68]. Количество белков, связанных с ПГХ у *D.melanogaster* составляет около 50, включая гистоны, транскрипционные факторы, ДНК-метилазы, белки, связывающиеся с хроматином и др. [69]. HP1 является основной меткой ПГХ, он способен к распространению гетерохроматина, регулирует репликацию, подавление экспрессии генов, когезию хроматина [68]. Метилирование гистонов – одна из ключевых особенностей ПГХ, H3K9me2/3 – ключевая метка конститутивного гетерохроматина, однако в ПГХ также встречается H3K27-, H3K20-метилирование [70]. Другая особенность ПГХ – замена канонических гистонов на такие варианты, как H3.3, H2A.Z [71, 72]. В ПГХ находятся молекулы миРНК, которые участвуют в поддержании ПГХ в

конденсированном состоянии, в ПГХ также находятся кластеры генов пиРНК [73, 74].

Таким образом, молекулярно конститутивный теломерный гетерохроматин отличается от конститутивного прицентромерного, также оба отличны от факультативного, общими свойствами которого является только гистоновые метки H3K27me3, H2AK119ub, белки Polycomb комплекса. Тогда как последовательность ДНК в факультативном гетерохроматине уникальна, не несет повышенный уровень метилирования или других модификаций в общем случае.

1.1.7 Функции гетерохроматина

Как было сказано выше, гетерохроматин больше не рассматривается, как часть хроматина, просто обедненная генами и не имеющая никакой функциональности в геномах эукариот. Более справедливое определение для гетерохроматина в свете современных представлений о нём – плотно упакованный компартмент хроматина, функции которого зависят от его расположения и могут варьировать вовсе от отсутствия до ключевых в поддержании стабильности генома. В настоящей главе представлена лишь часть функций гетерохроматина.

Основная функция факультативного гетерохроматина – сайленсинг генов, не необходимых данной клетке. В среднем, в каждой клетке *H.sapiens* работает лишь около 10-20 % генов из возможных, экспрессия остальных же подавлена, они находятся в факультативном гетерохроматине [75]. Более того, многие гены, например, НОХ-гены, принимающие участие в процессах раннего эмбрионального развития, не используются клетками взрослого организма, они также помещаются в факультативный гетерохроматин во всех клетках, такой механизм называется «долгосрочный сайленсинг» [75]. Также в клетках млекопитающих в состоянии факультативного гетерохроматина находится одна из двух X-хромосом по механизму дозовой компенсации [76].

Из-за большого содержания повторов (транспозонов и сателлитной ДНК, рибосомальной ДНК), расположения в теломерных и прицентромерных областях хромосом считается, что конститутивный гетерохроматин играет роль в поддержании стабильности генома. Так, мутанты по генам, связанным с конститутивным гетерохроматином, например, HP1 у *D.melanogaster* или Swi6 у *S.cerevisiae* вызывают мутантные фенотипы с сросшимися теломерами, нарушенной длины теломер или с возможностью к теломерной рекомбинации [77, 78]. Такие мутации также приводят к потере прицентромерного гетерохроматина, который вместе с CENP-A составляют функциональные центромеры, что приводит к неправильной сегрегации хромосом при делении и, как следствие, к утрате или приобретению лишней хромосомы [79, 80]. Конститутивный гетерохроматин защищает геном, подавляя рекомбинацию и транскрипцию повторяющихся элементов [79]. Повторяющиеся последовательности в разных областях хромосомы изолированы друг от друга доменами интеркалярного конститутивного гетерохроматина, чтобы предотвратить их эктопическую рекомбинацию, которая может привести к делециям, транслокациям или инсерциям, тем самым, нарушая стабильность хромосом [81, 82]. Подавление активности МГЭ реализуется с помощью малых РНК и белков семейства Argonaut, которые либо уничтожают транскрипт МГЭ, либо опосредуют образование конститутивного гетерохроматина в месте нахождения ретротранспозонов или транспозонов [7]. Более того миРНК, пиРНК транскрибируются именно с областей прицентромерного гетерохроматина [83]. Известно, что гетерохроматин заметно реорганизуется в ответ на повреждение ДНК, важен в пространственно-временном исправлении двуцепочечных разрывов, изменения в модификациях гистонов в гетерохроматине также могут непосредственно влиять на процесс репарации, привлекая белки репарации к месту повреждения [84].

Одна из моделей старения, названная «потеря гетерохроматина» («loss of heterochromatin») была предложена в 1997 году Villeponteau et al [85].

Модель предполагает, что паттерны гетерохроматина, заложенные в эмбриогенезе со старением, претерпевают реорганизацию, разрушаются, что приводит к нарушению экспрессии генов, репрессированных в гетерохроматине, как следствие, клетка теряет свою функциональность, может претерпевать малигнизацию. Так, мутации в ламинах, участвующих в образовании LADs (глава 1.1.5) приводит к развитию прогерии Хатчинсона-Гилфорда.

1.2 Полиморфизмы гетерохроматина

Полиморфизмами называются последовательности ДНК, отличающиеся внутри одного вида. Известно, что один человек отличается от другого примерно 1 нуклеотидом на 1000 [86]. Наиболее частый вариант полиморфизмов – SNP или однонуклеотидный полиморфизм, также полиморфизмы могут быть в результате разных хромосомных перестроек: делеций, транслокаций, инверсий, дупликаций.

Конститутивный гетерохроматин, в основном, обеднен уникальными последовательностями, следовательно, высоко полиморфен.

1.2.1 Общие сведения

Геномные последовательности, встроенные в конститутивный гетерохроматин, – это, в основном, МГЭ или сателлитные последовательности, имеющие высокую тенденцию к полиморфии. От части это объясняется мутагенным действием метилирования ДНК в районах внутри гетерохроматина, где CpG-островки имеют более высокий уровень перехода в TpG путём окислительного дезаминирования [87]. Повторяющиеся последовательности также могут претерпевать проскальзывающую репликацию (slipped strand mispairing), приводящую к недорепликации дочерней цепи, и, следовательно, к дупликации или делеции фрагмента [88].

Другой механизм мутаций в конститутивном гетерохроматине – неравный кроссинговер, который также приводит к делециям или дупликациям [89]. Кроме того, компактная структура гетерохроматина препятствует свободному взаимодействию с комплексом ДНК-репарации. В дополнение к вышеизложенным механизмам следует добавить механизм очищающего естественного отбора, который слабее действует на последовательности внутри конститутивного гетерохроматина, который состоит, в основном, из мусорной ДНК и эволюционирует благодаря дрейфу генов, хотя и новые данные говорят о регуляторной роли МГЭ и сателлитной ДНК во многих случаях [90, 91].

Доказательства о большой внутри- и межвидовой изменчивости гетерохроматина получены в результате обширных исследований на растениях, *D.melanogaster*, птицах, млекопитающих [92-96]. Исследования на оболочниках показали, что из-за МГЭ геном близкородственных видов может отличаться по размеру в 12 раз [97]. На хромосомном уровне полиморфизмы гетерохроматина хорошо прослеживаются на точечных хромосомах *Drosophila* и Y-хромосоме млекопитающих. Точечные хромосомы *D.melanogaster* в длине примерно 5 Mb, когда у близкородственного вида *D.ananassae* – 14 Mb благодаря экспансии МГЭ [98]. Y-хромосома *H.sapiens* содержит 23 Mb эухроматина и 40 Mb гетерохроматина, эухроматин содержит область, которая переместилась из X-хромосомы после дивергенции человека и шимпанзе. Гетерохроматин человека на Y-хромосоме является общим для людей и горилл, однако отсутствует у шимпанзе [99, 100]. Вопреки ожиданиям, Y-хромосомы *M.musculus* содержат всего 5 % гетерохроматина [101]. Половые хромосомы ассоциировали с гетерохроматином, как только он был открыт, поскольку Y- и X-хромосомы (или Z- и W-хромосомы у птиц и бабочек) большинства видов более гетерохроматизованы, чем аутосомы [102, 103]. Это связано с тем, что эволюция половых хромосом направлена на подавление рекомбинации между ними [104]. Наибольшие трудности в изучении половых хромосом заключаются в большом количестве

гетерохроматина в них, содержащего сателлитную ДНК и МГЭ в большом количестве, что затрудняет секвенирование, сборку, картирование генома.

1.2.2 Полиморфизмы прицентромерного гетерохроматина у представителей рода *Anopheles*

Как было сказано выше, конститутивный гетерохроматин по определению является полиморфным. Строго говоря, полиморфизмом в гетерохроматине следует называть хромосомные перестройки, такие как: инверсии, делеции, дупликации, транслокации, тогда как SNP является характеристикой гетерохроматина вообще. Так, полиморфизм гетерохроматина может проявляться, как увеличение или уменьшение его размера за счет, например дупликации, возникшей внутри одной из популяций.

Многие представители отряда насекомых Diptera (двукрылые) имеют политенные хромосомы, которые являются удобным объектом исследований гетерохроматина, в частности полиморфизмов гетерохроматина за счет своего большого размера [1]. Более того, разносторонний анализ гетерохроматина как на политенных, так и на митотических и мейотических хромосомах у особей одного вида позволяет детальнее изучить гетерохроматин. У комаров *An. gambiae* и *An. arabiensis* X-хромосома внутри популяций различается по размерам гетерохроматиновых блоков, что было продемонстрировано на митотических хромосомах [105]. Так же у *An. gambiae* наблюдаются внутривидовые полиморфизмы по размеру теломерного гетерохроматина в хромосоме 2L [106]. Группа исследователей Baïmai V. et al обнаружили разные размерные варианты ПГХ у 8 популяций *An. willmori* на митотических хромосомах [107]. На препаратах мейотических и митотических с С-окрашиванием было показано, что *An. darlingi* и близкий вид *An. nuneztovari* отличаются друг от друга X-хромосомами, а именно расположением гетерохроматина на них, также выявлены внутривидовые полиморфизмы в

гетерохроматине внутри популяций этих двух видов [108]. Был предположен механизм, согласно которому у видов близнецов *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. merus* и *An. quadriannulatus* полиморфизмы в гетерохроматине X-хромосомы возникают за счет многократной амплификации сателлитной ДНК в гетерохроматине [109].

У комара *Anopheles messeae*, занимающего обширный ареал в Евразии и являющегося потенциальным переносчиком *Plasmodium falciparum*, вызывающего малярию, были обнаружены разные размерные варианты блоков ПГХ2, которые стали называть одинарным, двойным, тройным и четверным в зависимости от размера, который вычисляли, как соотношение размера блока ПГХ2, деленного на неpolиморфный блок теломерного гетерохроматина с хромосомы 2L, размер которого не меняется внутри вида, также было обнаружено, что северные популяции обладают большими размерами блока ПГХ, чем южные [14, 110].

У комаров рода *Anopheles* выделяют 2 структурно различных компартмента гетерохроматина – α-гетерохроматин и β-гетерохроматин, которые визуально отличаются друг от друга степенью окраски дисков и формой на политенных хромосомах [111]. α-гетерохроматин образует блоки, содержит большое количество МГЭ, находится в прицентромерном регионе и внутренних районах плеч хромосом, когда β-гетерохроматин более диффузный, содержит меньшее количество повторяющихся последовательностей, участвует в прикреплении хромосом к ламине ядра [112]. Считается, что именно β-гетерохроматин участвует в образовании структуры, называемой хромоцентром, который предоставляет из себя слившиеся блоки гетерохроматина разных хромосом. Хромоцентр хорошо заметен на препаратах слюнных желёз *An. messeae* под световым микроскопом, что делает невозможным оценку размера блока ПГХ2 на таких препаратах, так как гетерохроматин с разных хромосом слит воедино. Другой способ оценки размеров блока ПГХ2 на политенных хромосомах – просмотр препаратов питающих клеток яичников (трофоцитов) под световым

микроскопом, однако такой метод доступен для анализа только у самок комаров, так как трофоциты есть только у них. Сегодня в распоряжении исследователей нет другого метода оценки размеров блоков, их копийности, кроме как микроскопии, в том числе FISH с пробой из ПГХ2, которые также позволяет оценить размер блока только у самок. Новые методы секвенирования (нанопоровое секвенирование), несмотря на быстрое развитие технологии, до сих пор не позволяют качественно секвенировать гетерохроматин из-за большого количества повторов в нём, также они являются не всегда доступными, сложными в использовании, дорогостоящими для того, чтобы быстро и качественно оценить размерность блока гетерохроматина.

Остается актуальной проблема поиска новых методов оценки размеров блоков гетерохроматина, в частности, блока ПГХ2 *An. messeae*. Такие методы могут позволить провести анализ размера блока ПГХ2 как у самок, так и у самцов малярийных комаров, так как будут неспецифичны по полу, также могут позволить оценить природу возникновения полиморфизмов в ПГХ2, которые могут появляться по разным причинам, например, многократной амплификации сателлитной ДНК, содержащейся в нём, минуя прямые методы секвенирования.

Разработанные методы оценки размеров блока ПГХ2 могли бы позволить изучить наследуемость ПГХ2 в поколениях *An. messeae* стандартными методами скрещиваний, так как позволили бы с одинаковым успехом оценивать размеры блоков, как у самцов, так и самок.

2 Материалы и методы исследования

Материалом исследования служили малярийные комары *An. messeae*. Сборы комаров производились в селе Дзержинское (Томская область) 2018 год, селе Чаинск (Томская область) 2019 год, селе Тегульдет (Томская область) 2019 год, деревне Малое Нестерово (Томская область) 2020 год.

2.1 Приготовление препаратов хромосом

2.1.1 Препараты политенных хромосом

Политенные хромосомы для анализа в световом микроскопе готовили из питающих клеток яичников самок – трофоцитов. Яичники самок фиксировали в растворе Карнуа (96 % этиловый спирт и ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1) для хранения. Трофоциты яичников комара отделяли от тела, выдерживали на предметном стекле в 50 % пропионовой кислоте в течение 3–5 минут, препарат раздавливали и накрывали покровным стеклом (18x18 мм) [113]. Готовый препарат сразу же использовался для анализа в световом микроскопе AxioImager.A1 (Carl Zeiss, Германия). Для последующего проведения FISH препараты переводились в сухо-воздушные.

2.1.2 Препараты митотических хромосом

Митотические хромосомы из имагинальных дисков выделялись из личинок III–IV стадий созревания. Тела личинок хранились в растворе Карнуа (96 % этиловый спирт и ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1). Торакс личинки отделялся от остального тела, помещался на предметное стекло, добавлялся гипотонический раствор KCl (0,01 %), где удерживался в течение 10 минут. Торакс разрезался, добавлялся раствор Карнуа, имагинальные диски отделялись от остальных тканей. К имагинальным дискам добавлялась капля 50 % пропионовой кислоты, препарат накрывался покровным стеклом, просматривался под световым микроскоп AxioImager.A1 (Carl Zeiss,

Германия). Для последующего проведения FISH препараты переводились в сухо-воздушные.

2.1.3 Приготовление сухо-воздушных препаратов

Готовые препараты митотических или политенных хромосом для хранения с последующим выполнением FISH на этих препаратах переводились в сухо-воздушные. Для приготовления сухо-воздушных препаратов, готовые свежие препараты помещались в жидкий азот, бритвой сдвигалось покровное стекло, сразу же помещались в серию спиртов: 50 % при -20 °C в течении 5 минут, 70 % при -20 °C в течении 5 минут, 80 % при -20 °C в течении 5 минут, 96 % при -20 °C в течении 10 минут. Препараты высушивались при КТ в течение суток, складывались в коробку для хранения препаратов для дальнейшего использования.

2.2 Микроскопирование и измерение размера блока

2.2.1 Световая микроскопия

Анализ размеров блоков ПГХ2 производился на препаратах политенных хромосом из трофоцитов яичников с помощью светового микроскопа AxioImager.A1 (Carl Zeiss, Германия). Предметное стекло помещалось на предметный стол микроскопа, для нахождения хромосомы 2 хорошего качества выставлялся объектив 10X (100 кратное увеличение), в случае нахождения необходимой хромосомы, объектив сменялся на 40X (400 кратное увеличение) или 100X (1000 кратное увеличение) с иммерсионным маслом (Immersol, Carl Zeiss) для заснятия в программе AxioVision Rel 4.8 (Carl Zeiss).

2.2.2 Измерения блока прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *An. messeae*

Измерения блока ПГХ2 проводились в программе AxioVision Rel 4.8 (Carl Zeiss). Блоки прицентромерного гетерохроматина измерялись относительного размера референсного блока теломерного гетерохроматина, имеющего постоянные размеры внутри вида *An. messeae* (рисунок 2). Отдельно вычислялась длина каждого из гомологов. Измерения проводились при 400-кратном (40X объектив) увеличении или 1000-кратном (100X объектив) увеличении с каплей иммерсионного масла (Immersol, Carl Zeiss) с помощью стандартного набора инструментов программы AxioVision (length, line). Количество измерений по каждому из гомологов у одной особи – не менее 6.

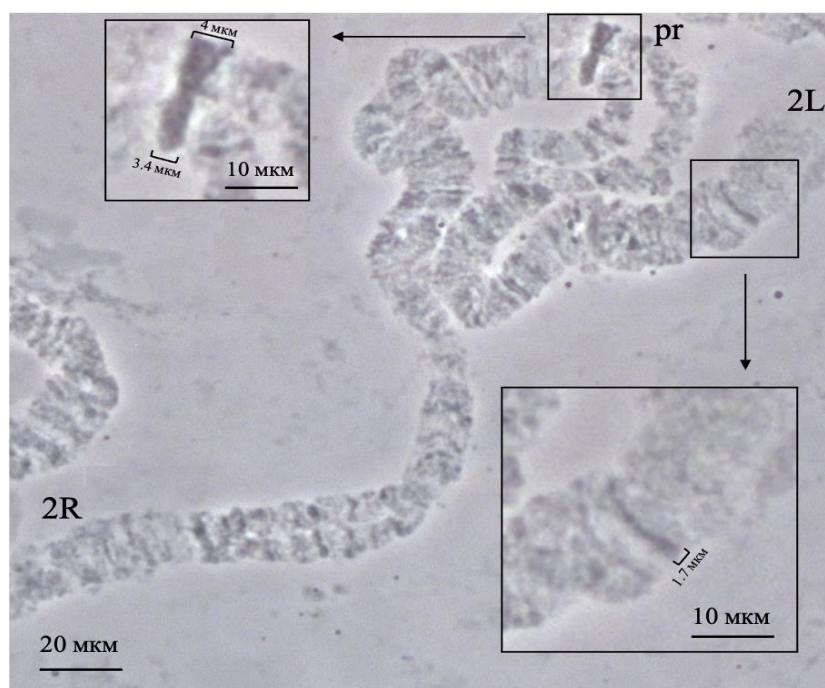


Рисунок 2 – измерение блока ПГХ2 на политенных хромосомах трофоцитов яичников. Размер блока рассчитывался как отношение длин блока на каждом гомологе к длине референсного блока теломерного гетерохроматина

Обозначения:

pr – прицентромерный участок, 2L, 2R – плечи 2 хромосомы

2.2.3 Флуоресцентное микроскопирование

Просмотр результатов FISH проводился в флуоресцентном микроскопе AxioImager.Z1 (Carl Zeiss, Германия). Нахождения и просмотр препарата производились при 400- и/или 1000-кратным увеличением с каплей эмерсионного масла (Immersion Oil, Carl Zeiss). Фотографирование и измерения блоков ПГХ2 на митотических хромосомах производилось в программе AxioVision Rel 4.8 (Carl Zeiss).

2.3 Получение меченного зонда

До выполнения основного протокола: ПЦР-смесь интересующего фрагмента для FISH центрифугировалась 20 минут при скорости 13900 оборотов/минута при температуре 4 °C, отбирался супернатант от пеллеты, добавлялся 70 % этиловый спирт 100 мкл, смесь центрифугировалась 20 минут при скорости 13900 оборотов/минута при температуре 4 °C, отбирался супернатант, супернатант высушивался от спирта в вакуумном испарителе (Eppendorf Concentrator plus) в течении 5 минут, к высушенной ДНК добавлялась бидистиллированная H₂O. Оценка качества и количества ДНК производилась на спектрофотометре (Thermo Scientific NanoDrop). Добивались концентрации 50 нг/мкл в случае большей концентрации в образце.

Меченный зонд для последующего проведения FISH или дот-блоттинга получался по следующему протоколу: замешивались буфер Кленова – 1X, праймеры случайной последовательности – 1,1 мг, требуемая ДНК – 50 нг, объем доводился до 12 мкл автоклавированной H₂O. Готовая смесь ставилась в амплификатор (Eppendorf Mastercycle Gradient) на 5 минут при температуре 96 °C на денатурацию. После денатурации пробирка помещалась в лёд на 3 минуты и продолжалось замешивание смеси для мечения: смесь нуклеотидов дАТФ, дЦТФ, дГТФ – 1мМ, дТТФ – 0,3мМ, TAMRA-dUTP или Biotin-11-UTP

– 1мМ, фрагмент Клёнова – 5 нг, объем доводился до 25 мкл автоклавированной H₂O. Смесь помещалась в амплификатор (Eppendorf Mastercycle Gradient) на инкубацию при 37 °С 12-18 часов.

Меченная ДНК-проба переосаждалась в спирте с добавлением к ней следующих реагентов: ацетат натрия 3 М в отношении 1:10 к объему смеси, спермальная ДНК лосося – 50 мкг, 96 % этиловый спирт – в отношении 2:3 к объему смеси.

Готовый ДНК-зонд хранили в холодильнике при температуре -20 °С до дальнейшего использования.

2.4 Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH)

В настоящей работе FISH использовался для определения локализации интересующих генов или микродиссекционных проб на поличенных и митотических хромосомах.

Перед проведением протокола FISH ДНК-проба центрифугировалась при скорости 1200 оборотов/минута при 4 °С в течении 15 минут, удалялся супернатант, добавлялось 100 мкл 70 % этилового спирта, проба со спиртом вновь центрифугировалась при скорости 1200 оборотов/минута при 4 °С в течении 20 минут, отбирался супернатант, удалялась жидкость в вакуумной центрифуге (Eppendorf Concentrator plus), к осадку добавлялась гибридизационная смесь (50 % формамид, 10 % декстрансульфат натрия, 1 % Tween 20, 2X SSC).

Сухо-воздушные препараты промывались в 1X PBS 20 минут при КТ, переносились в 4 % формамид в 1X PBS в течении 1 минуты при КТ, препараты промывались от формамида в 1X PBS на 5 секунд, проводились по серии этиловых спиртов возрастающей концентрации (50 %, 70 %, 80 %, 96 %) в течении 5 минут в каждом при КТ, на 2 минуты помещались в 70 % формамид в 1X SSC при 72 °С в водяной бане, помещались в ледяной (-20 °С) 70 % этиловый спирт на 2 минуты, затем отмывались в 80 % этиловом спирте

при КТ 5 минут и в 96 % этиловом спирте 10 минут при КТ. На предметные стекла помещался 8 мкл ДНК-зонда, растворенного в гибридизационной смеси, стекла покрывались покровными стеклами (22x22 мм). Препараты ставились на гибридизацию в гибридизационную камеру (Thermobrite STATSPIN) на протокол денатурации (96 °С 10 минут) с последующей гибридизацией (37 °С 10-16 часов). После гибридизации производилась отмывка в 0.2X SSC 20 минут при 39 °С, менялся раствор на свежий и отмывался в течение 20 минут при КТ. На отмытый препарат помещалась капля DAPI 8 мкл, препарат покрывался покровным стеклом (22x22 мм). Готовые препараты просматривались в флюоресцентном микроскопе AxioImager.Z1 (Carl Zeiss, Германия).

2.5 Выделение ДНК

ДНК выделялась из комаров, фиксированных в 96 % этаноле или растворе Карнуа. Тело комара предварительно промывалось в дистиллированной воде от спирта/раствора Карнуа, высушивалось от влаги, высушенное тело помещалось в 1.5 мл пробирку и замораживалось в жидком азоте, затем растиралось в пробирке пестиком до порошкообразного состояния, в пробирку с телом комара добавлялся лизис-буфер: 20мМ EDTA, 10мМ NaCl, 500 мМ гуанидин гидрохлорид, 10мМ Tris, 1 % Triton X-100, 1 мкг РНКазы, и 120 мкг Протеиназы К, объем доводился до 300 мкл бидистиллированной H₂O. Производился лизис в течении 2 часов при 37 °С. Лизат центрифугировался при скорости 12000 оборотов/минута 10 минут при 4 °С, супернатант переносился в чистую пробирку, к супернатанту добавлялся равный объем смеси фенола и хлороформа в соотношении 1:1, раствор центрифугировался при скорости 12000 оборотов/минута при 4°С 10 минут, повторялась процедура сбора супернатанта и добавления фенола с хлороформом в соотношении 1:1 с последующем центрифугированием, отбирался супернатант и добавлялся равный ему объем смеси хлороформа и

изоамилового спирта в соотношении 24:1, производилось центрифугирование смеси при скорости 12000 оборотов/минута при 4 °С 10 минут, чистый супернатант переносился в пробирку, к нему добавлялась уксусная кислота в соотношении 1 объем уксусной кислоты к 10 объемам супернатанта и добавлялся холодный 96 % этанол в соотношении 5 объемов этанола к 2 объемам супернатанта, такой раствор помещался в морозильную камеру на - 20 °С на ночь, на следующие сутки раствор центрифугировался при скорости 12000 оборотов/минута при 4°С 30 минут, после центрифугирования супернатант заменялся на равный объем 70 % этанол, вновь центрифугировался при 12000 оборотов/минута при 4°С 10 минут, супернатант удалялся, осадок (пеллета) высушивался в вакуумной центрифуге (Eppendorf Concentrator plus) в течение 6 минут и растворялся в бидистиллированной воде. Оценка количества и качества выделенного продукта производилась на спектрофотометре (Thermo Scientific NanoDrop).

2.6 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

2.6.1 Амплификация ДНК

Разработанные праймеры генов ПГХ2 разводились до концентрации 100 мМ, или использовались готовые DOP-праймеры для неспецифической амплификации, готовые концентрации для ПЦР содержали 10 мМ праймеров. ПЦР проводилась в ламинаре с обдувом с предварительной обработкой ультрафиолетом поверхностей ламинара во избежание контаминации. ПЦР-смесь замешивалась в 200 мкл пробирках для амплификатора, смесь содержала: 1X ПЦР-буффер для Taq-полимеразы, 1X дНТФ, праймер гена forward – 10 мМ, праймер гена reverse – 10 мМ, или DOP-праймер – 20 мМ, ДНК *An. messeae* или *An. atroparvus* (в зависимости от эксперимента) – 50 нг, Taq-полимераза – 0.5 единиц, бидистиллированная H₂O – до 20 мкл (общий объем ПЦР-смеси). Готовая смесь помещалась в амплификатор (Eppendorf Mastercycle Gradient) в режиме 25 циклов, в зависимости от специфичности

праймеров программа, а именно, температура элонгации, подбиралась индивидуально, для DOP-праймеров протокол выглядел следующим образом: 95 °C – 6 минут, 94 °C – 1 минута, 56 °C – 1 минута, 72 °C – 1 минута, и так 25 циклов. После прохождения всех циклов а амплификаторе ПЦР-продукт анализировался на наличие ДНК необходимого размера на геле-электрофорезе.

2.6.2 Гель-электрофорез ПЦР-продукта

После амплификации ПЦР-продукт анализировался на подвижность в электрическом поле методом электрофореза. Электрофорез проводился в агарозном геле (1.5 % агароза в TAE), окрашенном SYBR Green 10000X. В лунки загружался ПЦР-продукт 1 мкл, смешанный с красителем Gel Red 3x 1мкл, также в лунки загружалась кило- или мегабазная линейка (2.5 мкл) в зависимости от ожидаемой длины фрагмента для оценки длины. Просмотр электрофореза проводился под ультрафиолетовым транс-иллюминатором (VILBER LOURMAT).

2.6.3 Переосаждение ПЦР-продукта

Готовый ПЦР-продукт переосаждали в 96 % этаноле (2/3 от общего объема) и ацетате натрия (3М, 1/10 от общего объема). Готовый амплифицированный ген хранился при -20 ° C до проведения последующих экспериментов (FISH, дот-блот).

2.7 Дот-блот гибридизация

Метод дот-блоттинга используется для выявления нуклеиновых кислот или белков в минимальных концентрациях. Метод основан на гибридизации нуклеиновой кислоты или белка, пришитых к матрице-нитроцеллюлозной

бумаге, с другой нуклеиновой кислотой или антителом соответственно, меченными биотином. В зависимости от силы гибридизации, на которую влияет как количество, так и качество образца, сила свечения пятна на нитроцеллюлозной бумаге имеет разную интенсивность при помещении матрицы в раствор со стрептавидином, пришитым к АР-конъюгату, который окрашивает образец в темноте

Интенсивность проявления пятен говорит о степени гибридизации. Протокол дот-блот гибридизации разбит на 2 части: гибридизация интересующих фрагментов ДНК на нитроцеллюлозной бумаге, детекция гибридизации. Протокол гибридизации выполнялся следующим образом: 50 нг ДНК (ДНК образцов и ДНК контрольных групп) наносилось на нитроцеллюлозную мембрану, мембрана высушивалась при КТ в течении 40 минут, помещалась под УФ-трансиллюминатор (VILBER LOURMAT) на 5 минут для закрепления образца на мембране. Мембрана помещалась в 20 мл предгибризационной смеси, состоящей из 50 % формамида, 0,5 % SDS, 5х раствора Денхарда, 6х SSC (объем смеси рассчитывался из расчета 0,2 мл на см² мембраны). Смесь предварительно нагревалась до 42 °С. Перед внесением мембраны в раствор к предгибризационной смеси добавлялась денатурированная спермальная ДНК лосося из расчета 50 мкг на см² мембраны, предгибридизация проводилась в термостате при 42°С с постоянным умеренном покачивании 50 оборотов/минута в течении 3 часов, предгибризационная смесь сменялась на гибридизационную схожего состава, за исключением того, что вместо спермальной ДНК лосося использовался денатурированный ДНК-зонд из расчета 100 нг/мл смеси, гибридизация осуществлялась при 42°С с покачиванием 50 оборотов/минута 12-36 часов. Отмывка мембраны проводилась при температуре в 2х SSC с 0,1 % SDS дважды по 5 минут, затем в 0,1 % SDS и 0,1х SSC дважды по 20 минут. Мембрана сушилась на фильтровальной бумаге в течение 10 секунд и проводилась детекция сигнала набором Biotin Chromogenic Detection kit (Thermofisher scientific).

Набор Biotin Chromogenic Detection kit основан на сильном нековалентном взаимодействии биотина, которым мечены пробы в ходе ПЦР, и стрептавидина, конъюгированного со щелочной фосфатазой в составе набора. Щелочная фосфатаза расщепляет субстрат BCIP-T (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, p-toluidine salt) из набора с образованием нерастворимых видимых синих преципитатов на мембране. На рисунке 3 изображена модель работы дот-блоттинга.

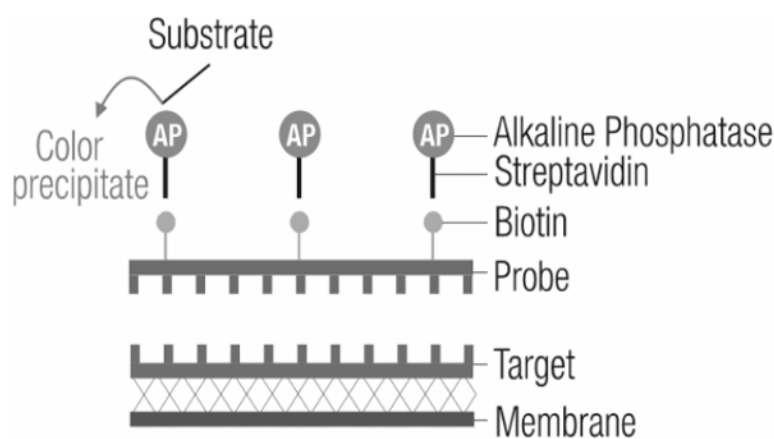


Рисунок 3 – Модель работы дот-блоттинга. К мембране (Membrane) пришивается интересующая ДНК (Target), взаимодействующая с биотинилированной пробой (Probe), которая проявляется набором Biotin Chromogenic Detection kit (Thermofisher scientific)

2.8 Статистическая обработка результатов

Отдельно для каждой популяции *An. messeae* высчитывалось среднее значение популяции – μ , за величину, отражающую полиморфность популяции в целом по длине блока ПГХ2 была принята величина стандартного отклонения – sd .

Для межпопуляционного анализа популяций *An. messeae*, для визуализации данных использовались пакеты Numpy, SciPy, Pandas, Matplotlib, Seaborn языка программирования Python. В качестве критериев

сравнения использовались непараметрические критерии такие как: Краскела-Уоллиса и Манна-Уитни так как часть данных не имеет нормального распределение (проверялось критерием Шапиро-Уилка), и объем выборок сравниваемых данных в части случаев не равны.

3 Результаты и обсуждение

3.1 Анализ частот встречаемости размерных вариантов блоков прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 в популяциях *An. messeae*

Частоты встречаемости размеров блока ПГХ2 у 4 популяций *An. messeae* из села Дзержинское, села Чаинск, села Тегульдет и деревни Малое Нестерово вычислялись на основе измерений политенных хромосом из трофоцитов яичников у самок. Для каждой из популяций были высчитаны средние значения по популяции (μ) и стандартное отклонение (sd), отражающие полиморфию популяции по размеру блока ПГХ2, количество особей, у которых производились измерения (n).

Так, было обнаружено, что для популяции комаров *An. messeae* из села Дзержинское $\mu = 1,9$, $sd = 0,8$, $n = 10$. Результаты измерений блоков прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 популяции *An. messeae* из села Дзержинское представлены в Приложении А.

Для популяции *An. messeae* из села Чаинск $\mu = 2,3$, $sd = 0,5$, $n = 10$. Также в популяции имеются гетерозиготы по размеру блока ПГХ2. Результаты измерений блоков прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 популяции *An. messeae* из села Чаинск представлены в Приложении Б.

Популяция комаров *An. messeae* из деревни Малое Нестерово характеризуется $\mu = 1,4$, $sd = 0,5$, $n = 20$. Является наиболее полно проанализированной популяцией комаров. Результаты измерений блоков прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 популяции *An. messeae* из деревни Малое Нестерово представлены в Приложении В.

Популяции *An. messeae* из села Тегульдет характеризуется $\mu = 2,1$, $sd = 0,7$, $n = 8$. Имеются гетерозиготы по размеру блока ПГХ2. Результаты измерений блоков прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 популяции *An. messeae* из села Тегульдет представлены в Приложении Г.

Проанализированы 4 популяции комаров *An. messeae*, три из которых представляют северные популяции: популяции сел Тегульдет и Чаинск, популяция из деревни Малое Нестерово, и одна южная популяция из села Дзержинское. Для большинства проанализированных комаров гомологи оказывались примерно равны по размеру друг другу.

В первой части статистической обработки результатов для сравнения всех популяций был использован непараметрический критерий Краскела-Уоллиса, который позволил отвергнуть H_0 о том, что все популяции принадлежат одной генеральной совокупности $p\text{-value} < 0,05$ (рисунок 4). Однако парное сравнение популяций критерием Манна-Уитни позволяет заключить, что значение ПГХ2 только в популяции *An. messeae* из деревни Малое Нестерово значительно отличается от всех остальных популяций $p\text{-value} < 0,05$.

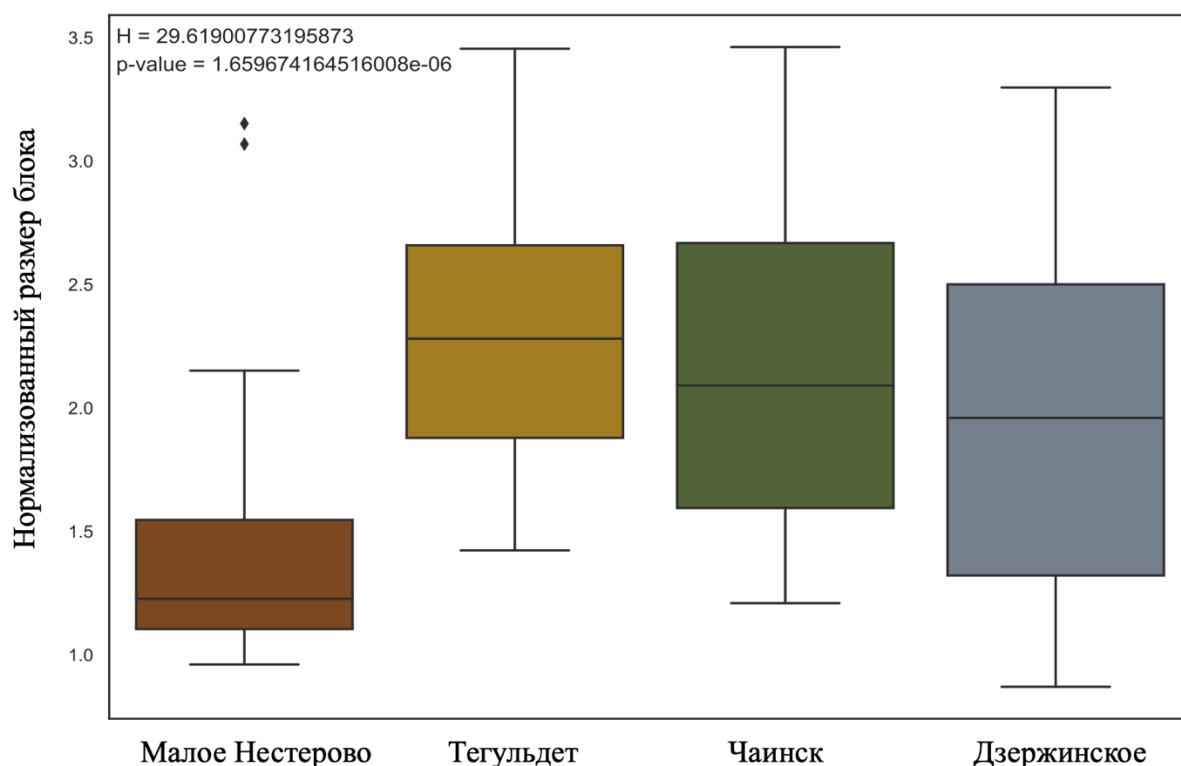


Рисунок 4 – Значения размеров блоков ПГХ2 с размахом в 4 популяция *An. messeae*. H – значение критерия Краскела-Уоллиса, $p\text{-value}$ – уровень значимости ниже 0,05

В следующей части статистического анализа проверялась гипотеза, что северные популяции комаров *An. messeae* имеют размер блока ПГХ2 больший, чем южные [15]. Для этого популяции *An. messeae* разбивались на северную группу, в которую включились популяции *An. messeae* из села Тегульдет, села Чаинск и деревни Малое Нестерово и южную группу – популяция комаров из села Держинское.

Так как тест Шапиро-Уилка для северной популяции позволяет отвергнуть H_0 о том, что распределение внутри северной популяции подчиняется нормальному ($p\text{-value} < 0,05$), было предложено использовать непараметрический U-критерий Манна-Уитни для проверки гипотезы о том, что северная и южная популяции отражают одну и ту же генеральную совокупность. Однако проведенный U-тест не дает обоснований считать, что популяции принадлежат разным генеральным совокупностям по размеру блока ПГХ2 ($p > 0,05$) (рисунок 5).

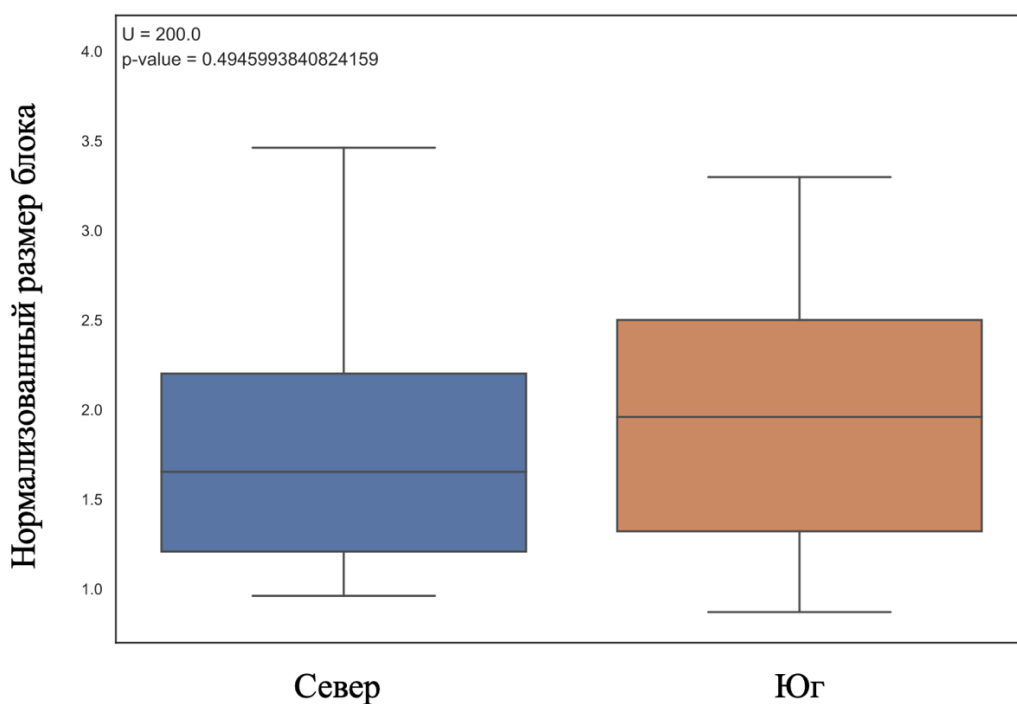


Рисунок 5 – Значение размеров блока ПГХ2 у северных и южной популяции с размахом. U – значение критерия Манна-Уитни, $p\text{-value}$ – уровень значимости больше 0,05

Таким образом, в настоящей работе не удалось показать, что северные популяции *An. messeae* обладают большим размером ПГХ2, чем южные. Однако это противоречит многочисленным работам и наблюдениям [14, 111]. Такие результаты могут объясняться недостаточным количеством проанализированных комаров, разным количеством популяций, отнесенных к южным и северным (1 и 3 популяции соответственно), не менее вероятно то, что к северной группе были отнесены географически разные популяции, такие как: популяции *An. messeae* из села Тегульдэт (57° 18' с.ш и 88° 10' в.д), деревни Малое Нестерово (58° 39' с.ш и 81° 34' в.д) и села Чаинск (57° 55' с.ш и 82° 35' в.д). Однако, даже если отбросить из анализа популяцию комаров *An. messeae* из села Тегульдэт, которая наиболее удалена от двух других северных популяций наиболее маленькое среднее значение блока ПГХ2 наблюдается у более северной из проанализированных популяций – у популяции из деревни Малое Нестерово ($\mu = 1,4$). Для дальнейшего подтверждения гипотезы о том, что северные популяции обладают большим размером ПГХ2 нужны дальнейшие более полные работы.

Другое важное заключение проделанной работы – не обнаружено, что комары имеют дискретные значения размеров блоков ПГХ2, а именно, одинарные, двойные, тройные и четверные, как предполагалось ранее [14, 15]. Наоборот, значения размеров блоков ПГХ2 имеют непрерывное распределение внутри вида *An. messeae*. Вероятнее всего, это объясняется самой природой блоков ПГХ2, а именно тем, что они содержат большое количество сателлитной ДНК, поведение которой, во-многом, независимо, распространение одной части сателлитной ДНК не влияет на соседние области, то есть, амплификация (многократная дупликация) происходит локальная, затрагивая только один или несколько сателлитов [109]. Если бы размеры ПГХ2 были дискретны, это могло объясняться полной дупликацией гетерохроматина внутри блока, однако известно, что ПГХ *An.messeae* составлен из ДНК разной природы.

Окончательное заключение о природе гетерохроматина внутри блока ПГХ2 может дать только дальнейшее полное секвенирование этого участка.

3.2 Оценка полиморфизма блока прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *An. messeae* на митотических хромосомах

Впервые полиморфизмы блоков ПГХ2 были описаны в 1997 году Шарахова М. В. и др. на препаратах политенных хромосом из трофоцитов яичников самок [14]. Как было показано выше, анализ размеров блоков ПГХ2 *An. messeae* на политенных хромосомах возможно осуществить только у самок, так как политенные хромосомы малярийных комаров с заметным блоком ПГХ2 видно только на препаратах трофоцитов яичников. Актуальным является поиск методов анализа размеров блоков ПГХ2 у самцов.

Для этих целей был предложен широко применяемый метод анализа полиморфизмов на препаратах митотических хромосом [107, 108]. Суть метода заключается в визуальной оценке полиморфных вариантов на препаратах митотических хромосом, получаемых из имагинальных дисков личинок комаров и проведение FISH с пробой, которая метит ПГХ2.

В настоящей работе использовалась проба Sb2 для мечения блока ПГХ2, представляющая собой микродиссекционную пробу с политенных хромосом *An. messeae*, включающую в себя одинарный блок ПГХ2. Проба Sb2 специфично метит весь блок ПГХ2 на препаратах политенных хромосом. Таким образом, можно было ожидать, что на препаратах митотических хромосом полиморфизмы в блоках ПГХ2 также будут обнаружены путем мечения пробой Sb2. Эксперимент заключался в мечении пробой Sb2 митотических хромосом имагинальных дисков личинок, принадлежащих популяции комаров *An. messeae* из села Дзержинское (Томская область) с последующим просмотром под микроскопом.

Было приготовлено 10 препаратов митотических хромосом из имагинальных дисков личинок и проведен в дальнейшем FISH с меченной красителем TAMRA пробой Sb2. Проба Sb2 метила блок ПГХ2 на митотических хромосомах, однако на всех препаратах размер блока был одинаковый внутри популяции из села Дзержинское (рисунок 6). Не удалось показать, что полиморфизмы блоков ПГХ2 *An. messeae* заметны на митотических хромосомах путем мечения блоков пробой Sb2.

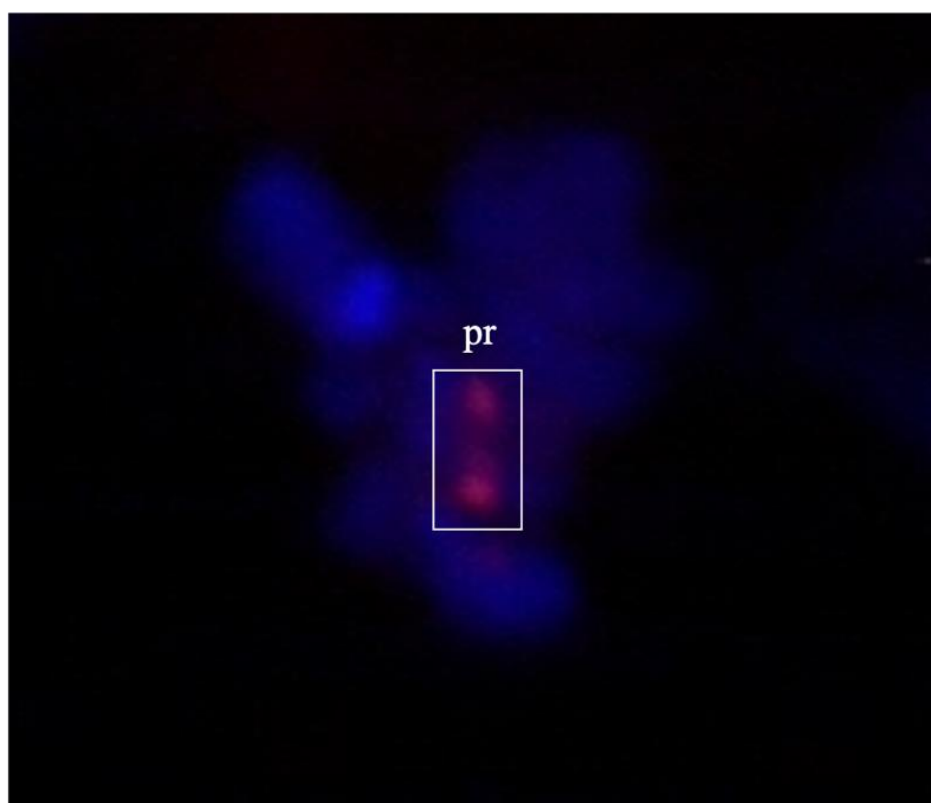


Рисунок 6 – FISH на митотических хромосомах из имагинальных дисков с пробой Sb2. Проба гибридизуется с ПГХ2, значения длины всегда постоянно

Обозначения: pr – прицентромерный участок

Можно заключить, что все отобранные 10 особей комаров *An. messeae* из села Дзержинское обладают одинаковым размером блока. Однако, как было показано выше, популяция *An. messeae* из села Дзержинское сильно полиморфна по размеру блока ПГХ2, и вероятность того, что все 10 особей

имеют одинаковый размер блока ПГХ2 очень низка ($p\text{-value} < 0,05$). $p\text{-value}$ считалось критерием Манна-Уитни.

3.3 Оценка полиморфизма блока прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *An. messeae* дот-блот гибридизацией

В настоящей работе исходное предположение заключалось в том, что размер блока ПГХ2 изменяется за счет копийности участков, входящих в него. За счет такого свойства блоков ПГХ2 представляется возможным провести дот-блоттинг и тем самым определить размерность блока ПГХ2: особи, имеющие больший размер блока ПГХ2, при гибридизации с подходящей пробой имеют более сильное свечение, чем особи с меньшим размером блока ПГХ2. Метод не позволяет определить разность в размерах у гомологов, так как ДНК-матрица – геномная.

Эксперимент заключался в обнаружении комаров *An. messeae* с разными размерами блоков ПГХ2 на политенных хромосомах трофоцитов яичников, выделении ДНК из таких комаров, проведении дот-блоттинга. Как один из возможных зондов для гибридизации была предложена микродиссекционная проба Sb2 (рисунок 7).

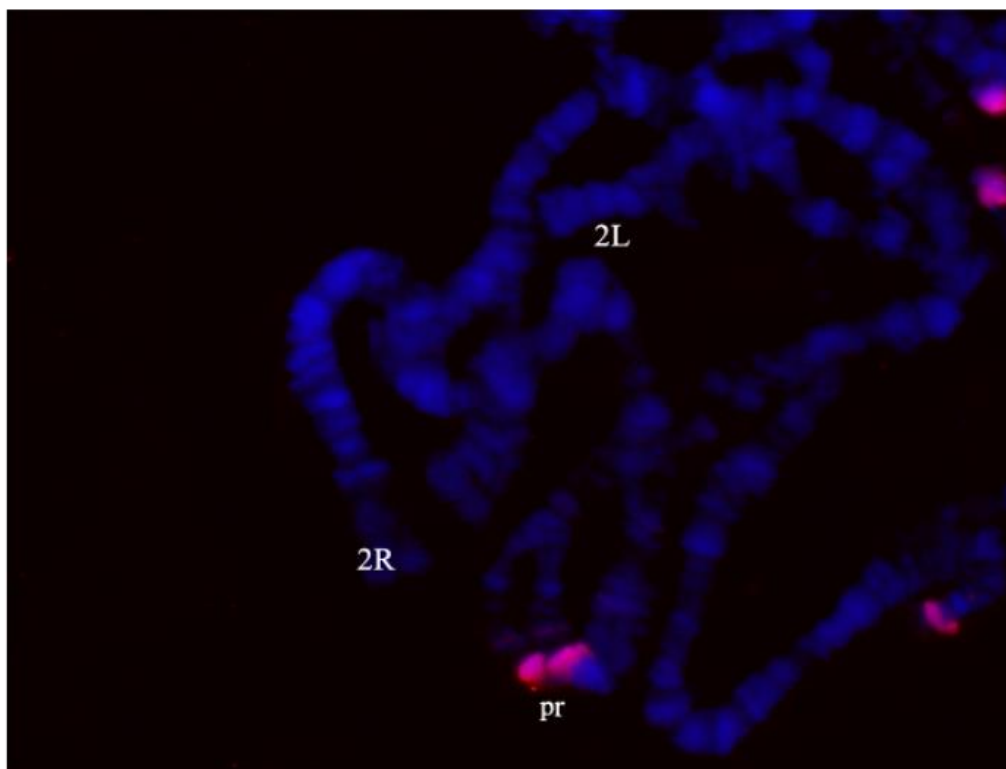


Рисунок 7 – FISH на политенных хромосомах из трофоцитов яичников с пробой Sb2

Обозначения: pr – прицентромерный участок, 2R, 2L – плечи 2 хромосомы

Популяция комаров, с которой проводился дот-блоттинг с пробой Sb2 – популяция из села Дзержинское. Выделялось ДНК из комаров средний размер блоков которых составлял: 0,9, 1,0, 1,4, 1,9, 2,0, 2,4, 2,5, 3,3 соответственно. В качестве контроля использовался зонд, меченный биотином и зонд, не меченный биотином (рисунок 8).

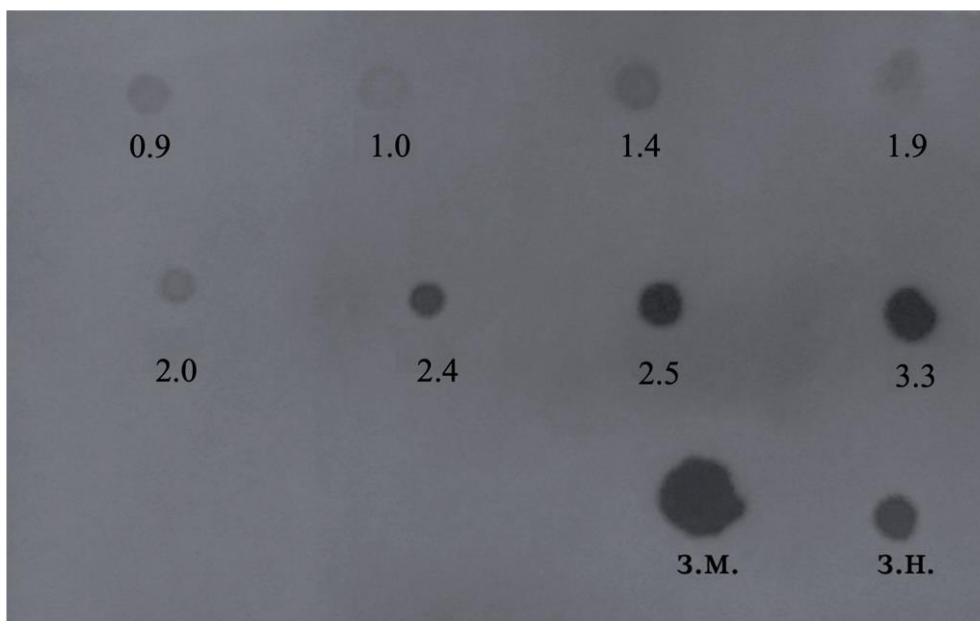


Рисунок 8 – дот-блоттинг с микродиссекционной пробой Sb2. Каждая точка – 50 нг геномной ДНК *An. messeae* с разными значениями длин ПГХ2 (помечены числами возле точек)

Обозначения: з.м. – зонд меченный, з.н. – зонд не меченный (два контроля)

Как видно из рисунка 8, дот-блоттинг с пробой Sb2 дал положительные результаты по определению размеров блоков у комаров *An. messeae*, имеющих разные размерные варианты блоков ПГХ2. Такой же опыт с положительными результатами был проделан для микродиссекционной пробы 14Mes, представляющую собой вырезанный участок с района 14 политенных хромосом *An. messeae*.

Так как дот-блоттинг оказался подходящим методом, позволяющий определять размеры блоков ПГХ2 молекулярными методами, минуя микроскопию, что может позволить определять размеры блоков как у самцов, так и у самок, было предложено разработать более подходящие пробы для проведения дот-блоттинга. Проба Sb2, как было сказано выше, – микродиссекционная проба одинарного блока ПГХ2 с политенных хромосом трофоцитов яичников. Такая проба на FISH с политенными хромосомами

гибридизуется не только с блоком ПГХ2, а также с другими участками хромосом, что не делает ее специфичной по отношению к блокам ПГХ2 (рисунок 7). На характер свечения пятен при дот-блот гибридизации с пробой Sb2 может влиять также её способность гибридизоваться с другими участками хромосом. Специфическая проба для ПГХ2 – гены, содержащиеся внутри блоков ПГХ2. Если верна гипотеза о локальной амплификации ПГХ2, что и является причиной полиморфизмов в нем, то гены, содержащиеся в блоках ПГХ2, могут также быть амплифицированы, что может повлиять на характер свечения пятен на дот-блоттинге при проведении его с пробой-геном из ПГХ2.

Так как геном *An. messeae* на сегодняшний день не секвенирован. праймеры на гены *An. messeae* традиционно разрабатываются на гены близкого вида *An. atroparvus* ввиду генной ортологии. Однако геном *An. atroparvus* собран не полностью, многие гены не картированы, в том числе, многие гены вблизи и из гетерохроматина. Таким образом, для разработки праймеров на гены, находящиеся в ПГХ2, которые могли бы выступать в качестве пробы для дот-блоттинга, гены картировались через более собранный геном *An. gambiae* также на основе генной ортологии, и праймеры заказывались уже на гены *An. atroparvus*, которые по предположению должны находиться в прицентромерном районе *An. atroparvus* и также в ПГХ2 *An. messeae*. Таким способом было отобрано 2 гена и разработаны на них праймеры, гены: ААТЕ003012 и ААТЕ006345, которые являются ортологами генов AGAP004780 и AGAP004782 соответственно *An. gambiae*.

Последующий FISH на гены ААТЕ003012 и ААТЕ006345 с политенными хромосомами *An. messeae* показал, что ген ААТЕ006345 фланкирует блок ПГХ2 со стороны 2L хромосомы 15А районе, когда ген ААТЕ003012 не гибридизовался с геномом *An. messeae* (рисунок 9).

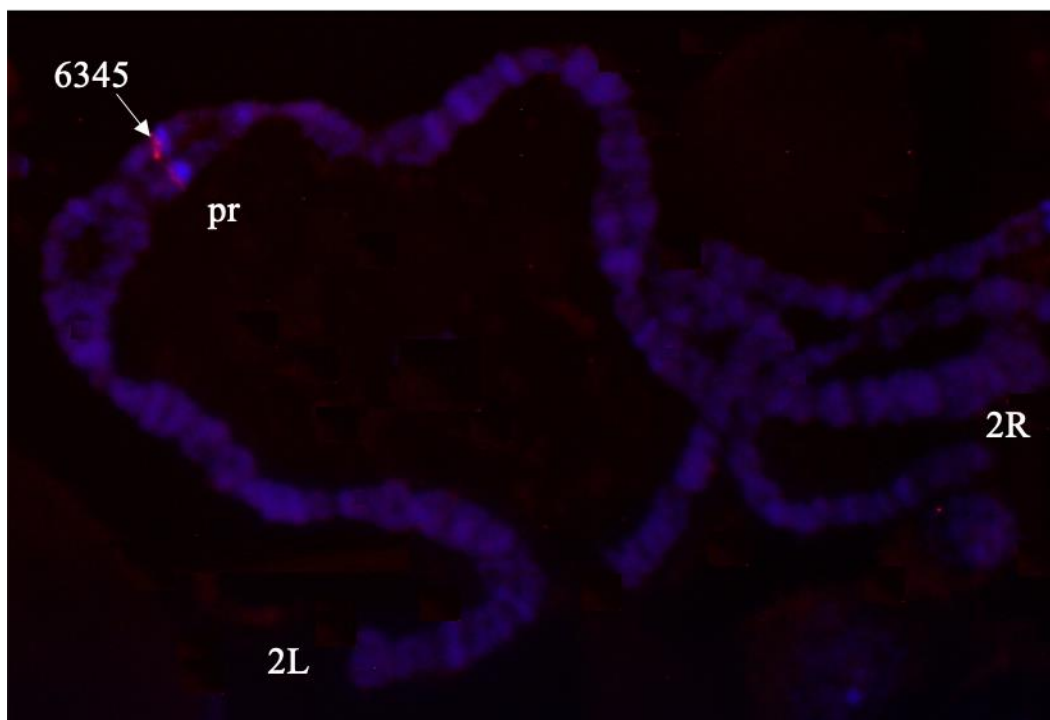


Рисунок 9 – FISH на политенных хромосомах из трофоцитов яичников с пробой гена ААТЕ006345. Проба гибридизуется на границе ПГХ2 со стороны 2L хромосомы в 15А районе

Обозначения: pr – прицентромерный участок, 2R, 2L – плечи 2 хромосомы

Дот-блоттинг с использованием гена ААТЕ006345 в качестве меченой пробы показан на рисунке 10. На рисунке каждая точка (не гибридизовалась) – 50 нг геномной ДНК *An. messeae* с разными значениями длин ПГХ2. Два контроля гибридизовались, следовательно, протокол выполнен корректно.

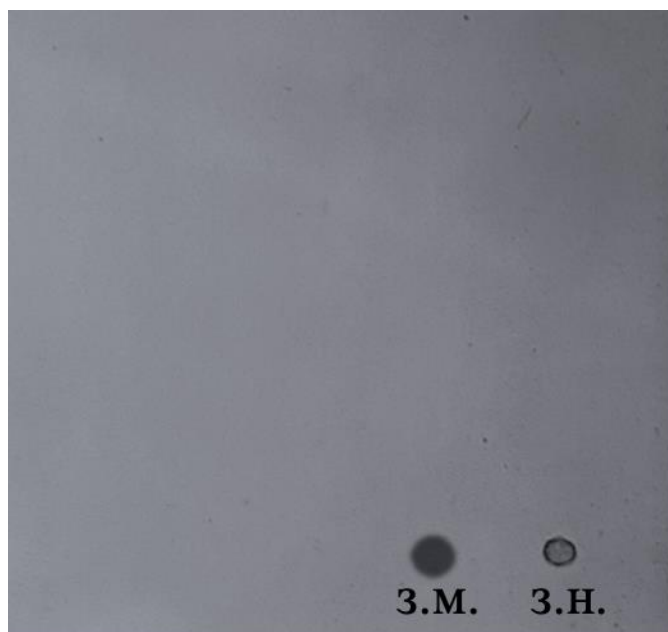


Рисунок 10 – дот-блоттинг с пробой гена ААТЕ006345

Обозначения: з.м. – зонд меченный, з.н. – зонд не меченный

Как следует из рисунка 10, дот-блоттинг с использованием гена в качестве пробы не дает положительных результатов. Такой результат может объясняться короткой длиной гена для гибридизации в методе дот-блоттинга. Более того, прошедшая гибридизация при дот-блоттинге с пробой гена ААТЕ006345, не могла бы указывать на различия в размере блоков ПГХ2, так как ген не находится внутри блока ПГХ2.

ВЫВОДЫ

1. Анализ четырех природных популяций малярийного комара *An. messeae* показал статистически значимое отличие популяции с. Малое Нестерово по размеру блоков прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 у самок.
2. Оценка полиморфизма размеров блоков прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 с использованием метафазных хромосом и флуоресцентной *in situ* гибридизации микродиссекционной ДНК-пробы блока прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 (Sb2) является неинформативным в связи с малыми размерами блоков метафазных хромосом.
3. Оценка полиморфизма размеров блоков прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 с помощью дот-блот гибридизации микродиссекционных ДНК-проб блока прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 (sb2 и 14Mes) может быть использована для изучения полиморфизма популяций самцов *An. messeae*.
4. Ген *An. messeae*, ортологичный AATE006345 *An. atroparvus* расположен вне блоков прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 и поэтому ДНК-проба, разработанная на его основе, не может быть использована в качестве маркера для определения размеров блоков методом дот-блот гибридизации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе изучены полиморфизмы размеров блоков прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *An. messeae*. При анализе размерных вариантов блоков ПГХ2 в 4 природных популяциях *An. messeae* обнаружены популяции с разной степенью полиморфизмов внутри них, также популяции отличаются между собой как по степени полиморфности (показатель – стандартное отклонение), так и по среднему значению длин блоков. Популяцией с наименьшей средней длиной блока оказалась наиболее северная популяция из деревни Малое Нестерово (Томская область), что не подтверждает высказанные ранее гипотезы о том, что северные популяции *An. messeae* имеют большие размеры блоков, чем южные. Также в настоящем исследовании обнаружено непрерывное распределение длин блоков ПГХ2, когда ранее предполагалось, что длины блоков имеют дискретное распределение, а именно, бывают одно-, дву-, трёх-, четырехблочными, такие результаты говорят скорее о локальной амплификации гетерохроматина внутри блоков, чем о полной амплификации всего блока.

На препаратах митотических хромосом не удалось обнаружить полиморфизмов блоков прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *An. messeae* с пробой Sb2, которая полностью гибридизуется с блоком ПГХ2 на FISH с политенными хромосомами.

Предприняты попытки создания маркера оценки размера блока ПГХ2 молекулярно-генетическими методами на основе дот-блоттинга. Показано, что метод дот-блоттинга с такими микродиссекционными пробами как Sb2, 14Mes дает положительные результаты при гибридизации с геномной ДНК комаров, содержащих полиморфные варианты размеров блоков ПГХ2. При разработке более подходящей пробы для гибридизации при дот-блоттинге было предложено использовать 2 гена AATE006345 и AATE003012 *An. atroparvus*. Однако методом FISH с этими генами на политенных хромосомах

An. messeae не удалось показать, что ортологи этих генов находятся в блоке ПГХ2 *An. messeae* и, таким образом, не подходят для дот-блоттинга.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ И ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коряков Д. Е., Жимулев И. Ф. Хромосомы. Структура и функции / Под ред. д.б.н. Л. В. Высоцкой. — Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2009. — 258 с. — ISBN 978-8-7692-1045-7. — С. 51—60.
2. Sturtevant A. H. The effects of unequal crossing over at the bar locus in *Drosophila* // *Genetics*. — 1925. — Т. 10. — №. 2. — С. 117.
3. Swedlow J. R., Lamond A. I. Nuclear dynamics: where genes are and how they got there // *Genome biology*. — 2001. — Т. 2. — №. 3. — С. reviews0002.
4. Bernard P. et al. Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres // *Science*. — 2001. — Т. 294. — №. 5551. — С. 2539-2542.
5. Dernburg A. F., Sedat J. W., Hawley R. S. Direct evidence of a role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation // *Cell*. — 1996. — Т. 86. — №. 1. — С. 135-146.
6. Зошук Н. В., Бадаева Е. Д., Зеленин А. В. История современного хромосомного анализа. Дифференциальное окрашивание хромосом // *Онтогенез*. — 2003. — Т. 34. — №. 1. — С. 5-18.
7. Liu J., Ali M., Zhou Q. Establishment and evolution of heterochromatin // *Annals of the New York Academy of Sciences*. — 2020. — Т. 1476. — №. 1. — С. 59.
8. Penagos-Puig A., Furlan-Magaril M. Heterochromatin as an important driver of genome organization // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. — 2020. — Т. 8. — С. 982.
9. Стегний В.Н. Популяционная генетика и эволюция малярийных комаров. // Томск: Изд-во Том. ун-та. — 1991. — с. 136.
10. Rovatsos M. T. et al. Extensive sex chromosome polymorphism of *Microtus thomasi*/*Microtus atticus* species complex associated with cryptic chromosomal rearrangements and independent accumulation of heterochromatin // *Cytogenetic and genome research*. — 2017. — Т. 151. — №. 4. — С. 198-207.

11. Feliciello I. et al. Satellite DNA as a driver of population divergence in the red flour beetle *Tribolium castaneum* //Genome biology and evolution. – 2014. – Т. 7. – №. 1. – С. 228-239.
12. Craddock E. M., Gall J. G., Jonas M. Hawaiian *Drosophila* genomes: size variation and evolutionary expansions //Genetica. – 2016. – Т. 144. – №. 1. – С. 107-124.
13. Прокофьева-Бельговская А.А. Гетерохроматические районы хромосом. // М.: Наука. – 1986. – с. 431.
14. Шарахова М. В., Стегний В. Н., Тимофеева О. В. Полиморфизм прицентромерного гетерохроматина политенных хромосом трофоцитов яичников в природных популяциях малярийного комара *Anopheles messeae* Fall //Генетика. – 1997. – Т. 33. – №. 2. – С. 281-283.
15. Шарахова М.В., Стегний В.Н., Брагинец О.П. Межвидовые различия структуры прицентромерного гетерохроматина трофоцитов яичников и эволюция малярийных 58 комаров комплекса *Anopheles maculipennis* // Генетика. – 1997. – Т. 33, No 12. – с. 1640-1648.
16. Heitz E. Heterochromatin, chromocentren, chromomeren. – Komm. Fischer, 1929.
17. Berger F. Emil Heitz, a true epigenetics pioneer //Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2019. – Т. 20. – №. 10. – С. 572-572.
18. Muller H. J. Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila* //Journal of genetics. – 1930. – Т. 22. – №. 3. – С. 299-334.
19. Muller H. J., Altenburg E. The frequency of translocations produced by X-rays in *Drosophila* //Genetics. – 1930. – Т. 15. – №. 4. – С. 283.]
20. Schultz J. Variegation in *Drosophila* and the inert chromosome regions //Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1936. – Т. 22. – №. 1. – С. 27.
21. Heitz E. Die somatische Heteropyknose bei *Drosophila melanogaster* und ihre genetische Bedeutung //Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie. – 1933. – Т. 20. – №. 1. – С. 237-287.

22. McClintock B. Chromosome organization and genic expression //Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1951. – T. 16. – C. 13-47.
23. Britten R. J., Kohne D. E. Repeated sequences in DNA //Science. – 1968. – T. 161. – №. 3841. – C. 529-540.
24. Jones K. W. Chromosomal and nuclear location of mouse satellite DNA in individual cells //Nature. – 1970. – T. 225. – №. 5236. – C. 912-915.
25. Jenuwein T. et al. SET domain proteins modulate chromatin domains in eu-and heterochromatin //Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. – 1998. – T. 54. – №. 1. – C. 80-93.
26. Peters A. H. F. M. et al. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability //Cell. – 2001. – T. 107. – №. 3. – C. 323-337.
27. Al-Sady B., Madhani H. D., Narlikar G. J. Division of labor between the chromodomains of HP1 and Suv39 methylase enables coordination of heterochromatin spread //Molecular cell. – 2013. – T. 51. – №. 1. – C. 80-91.
28. Müller M. M. et al. A two-state activation mechanism controls the histone methyltransferase Suv39h1 //Nature chemical biology. – 2016. – T. 12. – №. 3. – C. 188-193.
29. Kwon S. H., Workman J. L. The heterochromatin protein 1 (HP1) family: put away a bias toward HP1 //Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV). – 2008. – T. 26. – №. 3.
30. Eissenberg J. C., Elgin S. C. R. HP1a: a structural chromosomal protein regulating transcription //Trends in Genetics. – 2014. – T. 30. – №. 3. – C. 103-110.
31. Cao R. et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing //Science. – 2002. – T. 298. – №. 5595. – C. 1039-1043.
32. Volpe T. A. et al. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi //science. – 2002. – T. 297. – №. 5588. – C. 1833-1837.

33. Chu C. et al. Systematic discovery of Xist RNA binding proteins //Cell. – 2015. – T. 161. – №. 2. – C. 404-416.
34. Aravin A. A. et al. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice //Molecular cell. – 2008. – T. 31. – №. 6. – C. 785-799.
35. Thakur J. et al. Architectural RNA is required for heterochromatin organization //bioRxiv. – 2019. – C. 784835.
36. Novo C. L. et al. Satellite repeat transcripts modulate heterochromatin condensates and safeguard chromosome stability in mouse embryonic stem cells //bioRxiv. – 2020.
37. Allshire R. C., Madhani H. D. Ten principles of heterochromatin formation and function //Nature reviews Molecular cell biology. – 2018. – T. 19. – №. 4. – C. 229.
38. Lohe A. R., Hilliker A. J., Roberts P. A. Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster* //Genetics. – 1993. – T. 134. – №. 4. – C. 1149-1174.
39. Elgin S. C. R., Reuter G. Position-effect variegation, heterochromatin formation, and gene silencing in *Drosophila* //Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2013. – T. 5. – №. 8. – C. a017780.
40. Kuramochi-Miyagawa S. et al. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes //Genes & development. – 2008. – T. 22. – №. 7. – C. 908-917.
41. McKinley KL & Cheeseman IM The molecular basis for centromere identity and function. Nat. Rev Mol. Cell. Biol 17, 16–29 (2016)
42. Klar A. J. S., Ishikawa K., Moore S. A unique DNA recombination mechanism of the mating/cell-type switching of fission yeasts: a review //Mobile DNA III. – 2015. – C. 515-528.
43. Torres I. O., Fujimori D. G. Functional coupling between writers, erasers and readers of histone and DNA methylation //Current opinion in structural biology. – 2015. – T. 35. – C. 68-75.

44. Marina D. B. et al. A conserved ncRNA-binding protein recruits silencing factors to heterochromatin through an RNAi-independent mechanism //Genes & development. – 2013. – T. 27. – №. 17. – C. 1851-1856.
45. Lehnertz B. et al. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin //Current Biology. – 2003. – T. 13. – №. 14. – C. 1192-1200.
46. Volpe T. A. et al. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi //science. – 2002. – T. 297. – №. 5588. – C. 1833-1837.
47. Reinhart B. J., Bartel D. P. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats //Science. – 2002.
48. Filion G. J. et al. Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in Drosophila cells //Cell. – 2010. – T. 143. – №. 2. – C. 212-224.
49. Koryakov D. E. et al. The SUUR protein is involved in binding of SU (VAR) 3–9 and methylation of H3K9 and H3K27 in chromosomes of Drosophila melanogaster //Chromosome research. – 2011. – T. 19. – №. 2. – C. 235-249.
50. Zhimulev I. et al. Influence of the SuUR gene on intercalary heterochromatin in Drosophila melanogaster polytene chromosomes //Chromosoma. – 2003. – T. 111. – №. 6. – C. 377-398.
51. Kharchenko P. V. et al. Comprehensive analysis of the chromatin landscape in Drosophila melanogaster //Nature. – 2011. – T. 471. – №. 7339. – C. 480-485.
52. Ho J. W. K. et al. Comparative analysis of metazoan chromatin organization //Nature. – 2014. – T. 512. – №. 7515. – C. 449-452.
53. Flemming W. Zellsubstanz, kern und zelltheilung. – Vogel, 1882.
54. Vertii A. et al. Two contrasting classes of nucleolus-associated domains in mouse fibroblast heterochromatin //Genome research. – 2019. – T. 29. – №. 8. – C. 1235-1249.

55. Van Steensel B., Belmont A. S. Lamina-associated domains: links with chromosome architecture, heterochromatin, and gene repression //Cell. – 2017. – T. 169. – №. 5. – C. 780-791.
56. Guelen L. et al. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions //Nature. – 2008. – T. 453. – №. 7197. – C. 948-951.
57. Meuleman W. et al. Constitutive nuclear lamina–genome interactions are highly conserved and associated with A/T-rich sequence //Genome research. – 2013. – T. 23. – №. 2. – C. 270-280
58. Ye Q., Worman H. J. Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to Drosophila HP1 //Journal of Biological Chemistry. – 1996. – T. 271. – №. 25. – C. 14653-14656.
59. Penagos-Puig A., Furlan-Magaril M. Heterochromatin as an important driver of genome organization //Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2020. – T. 8. – C. 982
60. Cowan C. R., Carlton P. M., Cande W. Z. The polar arrangement of telomeres in interphase and meiosis. Rabl organization and the bouquet //Plant Physiology. – 2001. – T. 125. – №. 2. – C. 532-538.
61. Jin Q. W., Fuchs J., Loidl J. Centromere clustering is a major determinant of yeast interphase nuclear organization //Journal of cell science. – 2000. – T. 113. – №. 11. – C. 1903-1912.
62. Therizols P. et al. Chromosome arm length and nuclear constraints determine the dynamic relationship of yeast subtelomeres //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – T. 107. – №. 5. – C. 2025-2030.
63. Solovei I. et al. Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution //Cell. – 2009. – T. 137. – №. 2. – C. 356-368.
64. Solovei I. et al. LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation //Cell. – 2013. – T. 152. – №. 3. – C. 584-598.

65. Vertii A. et al. Two contrasting classes of nucleolus-associated domains in mouse fibroblast heterochromatin //Genome research. – 2019. – T. 29. – №. 8. – C. 1235-1249.
66. van Koningsbruggen S. et al. High-resolution whole-genome sequencing reveals that specific chromatin domains from most human chromosomes associate with nucleoli //Molecular biology of the cell. – 2010. – T. 21. – №. 21. – C. 3735-3748.
67. Eymery A., Callanan M., Vourc'h C. The secret message of heterochromatin: new insights into the mechanisms and function of centromeric and pericentric repeat sequence transcription //International Journal of Developmental Biology. – 2009. – T. 53. – №. 2-3. – C. 259-268.
68. Saksouk N., Simboeck E., Déjardin J. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals //Epigenetics & chromatin. – 2015. – T. 8. – №. 1. – C. 1-17.
69. Birchler J. A., Bhadra M. P., Bhadra U. Making noise about silence: repression of repeated genes in animals //Current opinion in genetics & development. – 2000. – T. 10. – №. 2. – C. 211-216.
70. Greer E. L., Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance //Nature Reviews Genetics. – 2012. – T. 13. – №. 5. – C. 343-357.
71. Santenard A. et al. Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3.3 //Nature cell biology. – 2010. – T. 12. – №. 9. – C. 853-862.
72. Fan J. Y. et al. H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1 α -mediated chromatin fiber folding //Molecular cell. – 2004. – T. 16. – №. 4. – C. 655-661.
73. Hsieh C. L. et al. WDHD1 modulates the post-transcriptional step of the centromeric silencing pathway //Nucleic acids research. – 2011. – T. 39. – №. 10. – C. 4048-4062.

74. Rangan P. et al. piRNA production requires heterochromatin formation in *Drosophila* //Current Biology. – 2011. – T. 21. – №. 16. – C. 1373-1379.
75. Trojer P., Reinberg D. Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? //Molecular cell. – 2007. – T. 28. – №. 1. – C. 1-13.
76. Gartler S. M., Riggs A. D. Mammalian X-chromosome inactivation //Annual review of genetics. – 1983. – T. 17. – №. 1. – C. 155-190.
77. Fanti L., Pimpinelli S. HP1: a functionally multifaceted protein //Current opinion in genetics & development. – 2008. – T. 18. – №. 2. – C. 169-174.
78. Bisht K. K. et al. Role of heterochromatin in suppressing subtelomeric recombination in fission yeast //Yeast. – 2008. – T. 25. – №. 8. – C. 537-548.
79. Allshire R. C., Ekwall K. Epigenetic regulation of chromatin states in *Schizosaccharomyces pombe* //Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2015. – T. 7. – №. 7. – C. a018770.
80. Pidoux A. L., Allshire R. C. The role of heterochromatin in centromere function //Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2005. – T. 360. – №. 1455. – C. 569-579.
81. Peng J. C., Karpen G. H. H3K9 methylation and RNA interference regulate nucleolar organization and repeated DNA stability //Nature cell biology. – 2007. – T. 9. – №. 1. – C. 25-35.
82. Peng J. C., Karpen G. H. Heterochromatic genome stability requires regulators of histone H3 K9 methylation //PLoS Genet. – 2009. – T. 5. – №. 3. – C. e1000435.
83. Allshire R. C., Ekwall K. Epigenetic regulation of chromatin states in *Schizosaccharomyces pombe* //Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2015. – T. 7. – №. 7. – C. a018770.

84. Janssen A., Colmenares S. U., Karpen G. H. Heterochromatin: guardian of the genome //Annual review of cell and developmental biology. – 2018. – T. 34. – C. 265-288. 68
85. Villeponteau B. The heterochromatin loss model of aging //Experimental gerontology. – 1997. – T. 32. – №. 4-5. – C. 383-394.
86. Conneally P. M. Human genetic polymorphisms //Developments in biological standardization. – 1994. – T. 83. – C. 107-110.
87. Makova K. D., Hardison R. C. The effects of chromatin organization on variation in mutation rates in the genome //Nature Reviews Genetics. – 2015. – T. 16. – №. 4. – C. 213-223.
88. Levinson G., Gutman G. A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution //Molecular biology and evolution. – 1987. – T. 4. – №. 3. – C. 203-221.
89. Roeder G. S. Unequal crossing-over between yeast transposable elements //Molecular and General Genetics MGG. – 1983. – T. 190. – №. 1. – C. 117-121.
90. Chuong E. B., Elde N. C., Feschotte C. Regulatory activities of transposable elements: from conflicts to benefits //Nature Reviews Genetics. – 2017. – T. 18. – №. 2. – C. 71.
91. Bourque G. et al. Ten things you should know about transposable elements //Genome biology. – 2018. – T. 19. – №. 1. – C. 1-12.
92. Sharma S., Raina S. N. Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes //Cytogenetic and genome research. – 2005. – T. 109. – №. 1-3. – C. 15-26.
93. Wei K. H. C. et al. Variable rates of simple satellite gains across the Drosophila phylogeny //Molecular biology and evolution. – 2018. – T. 35. – №. 4. – C. 925-941.
94. Jagannathan M. et al. Comparative analysis of satellite DNA in the Drosophila melanogaster species complex //G3: Genes, Genomes, Genetics. – 2017. – T. 7. – №. 2. – C. 693-704.

95. Kapusta A., Suh A. Evolution of bird genomes—a transposon's-eye view //Annals of the New York Academy of Sciences. – 2017. – T. 1389. – №. 1. – C. 164-185.
96. Cechova M. et al. High satellite repeat turnover in great apes studied with short-and long-read technologies //Molecular biology and evolution. – 2019. – T. 36. – №. 11. – C. 2415-2431.
97. Naville M. et al. Massive changes of genome size driven by expansions of non-autonomous transposable elements //Current Biology. – 2019. – T. 29. – №. 7. – C. 1161-1168. e6.
98. Leung W. et al. Retrotransposons are the major contributors to the expansion of the *Drosophila ananassae* Muller F element //G3: Genes, Genomes, Genetics. – 2017. – T. 7. – №. 8. – C. 2439-2460.
99. Skaletsky H. et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes //Nature. – 2003. – T. 423. – №. 6942. – C. 825-837.
100. Hughes J. F. et al. Chimpanzee and human Y chromosomes are remarkably divergent in structure and gene content //Nature. – 2010. – T. 463. – №. 7280. – C. 536-539.
101. Soh Y. Q. S. et al. Sequencing the mouse Y chromosome reveals convergent gene acquisition and amplification on both sex chromosomes //Cell. – 2014. – T. 159. – №. 4. – C. 800-813.
102. McClung C. E. The accessory chromosome—sex determinant? //The Biological Bulletin. – 1902. – T. 3. – №. 1-2. – C. 43-84.
103. Sutton W. S. On the morphology of the chromoso group in *Brachystola magna* //The Biological Bulletin. – 1902. – T. 4. – №. 1. – C. 24-39.
104. Bachtrog D. Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration //Nature Reviews Genetics. – 2013. – T. 14. – №. 2. – C. 113-124.

105. Bonaccorsi S. et al. Intraspecific polymorphism of sex chromosome heterochromatin in two species of the *Anopheles gambiae* complex // *Chromosoma*. – 1980. – Т. 76. – №. 1. – С. 57-64.
106. Biessmann H. et al. DNA organization and length polymorphism at the 2L telomeric region of *Anopheles gambiae* // *Insect molecular biology*. – 1998. – Т. 7. – №. 1. – С. 83-93.
107. Baimai V., Treesucon A., Kijchalao U. Heterochromatin variation in chromosome X in a natural population of *Anopheles willmori* (Diptera: Culicidae) of Thailand // *Genetica*. – 1996. – Т. 97. – №. 2. – С. 235-23.
108. Rafael M. S., Tadei W. P. Heterochromatin variation in chromosomes of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root and *A.(N.) nuneztovari* Gabaldón (Diptera: Culicidae) // *Genetics and Molecular Biology*. – 2000. – Т. 23. – №. 1. – С. 67-70.
109. Sharma A. et al. Structural variation of the X chromosome heterochromatin in the *Anopheles gambiae* Complex // *Genes*. – 2020. – Т. 11. – №. 3. – С. 327.
110. Стегний В.Н. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция. // Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та. – 1993. – с. 110.
111. Шарахова М. В. и др. Полиморфизм прицентромерного гетерохроматина в природных популяциях *Anopheles maculipennis* Mg. // *Цитология*. – 1999. – Т. 41, № 6. – с. 485 – 487.
112. Шарахова М.В. и др. Прицентромерный и интеркалярный α -гетерохроматин политемных хромосом малярийных комаров // *Генетика*. – 2000. – Т. 36. – №. 2. – С. 175-181.
113. Kumar V., Cornel A. J., Mukabayire O. In situ hybridization to *Anopheles* polytene chromosomes // *The Molecular Biology of Insect Disease Vectors*. – Springer Netherlands, 1996. – p. 337-345.).
114. Unger R. E. et al. Comparison of dot-blot and Northern blot hybridizations in the determination of genetic relatedness of United States

bluetongue virus serotypes //Journal of virological methods. – 1988. – T. 22. – №. 2-3. – С. 273-282.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Измерение блока прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 популяции из села Дзержинское

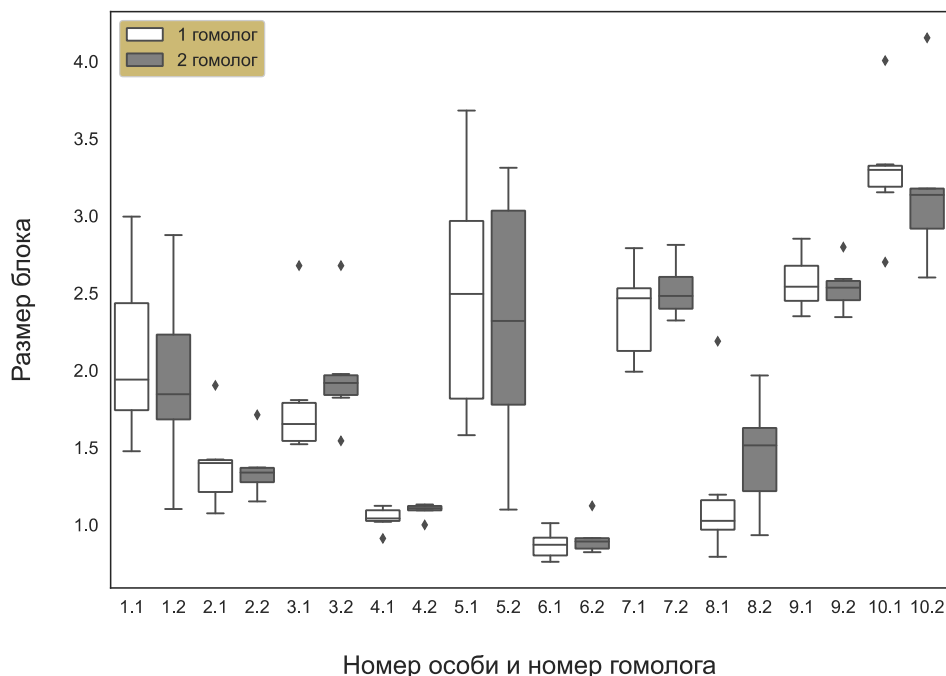


Рисунок А.1– Значения длин блоков ПГХ2 с размахом у 10 особей из села Дзержинское. Для каждой особи показана длина каждого гомолога

Таблица А.1 –Длины блока ПГХ2 у популяции комаров *An. messeae* из села Дзержинское

№ комара	№ гомолога	Среднее отношение длин блока ПГХ2/теломерного блока
1	1	2,1
	2	1,9
2	1	1,4
	2	1,4
3	1	1,8
	2	2,0
4	1	1,0
	2	1,0
5	1	2,5
	2	2,3
6	1	0,8
	2	0,9
7	1	2,4
	2	2,5

Окончание таблицы А.1

8	1	1,2
	2	1,5
9	1	2,6
	2	2,5
10	1	3,3
	2	3,2

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

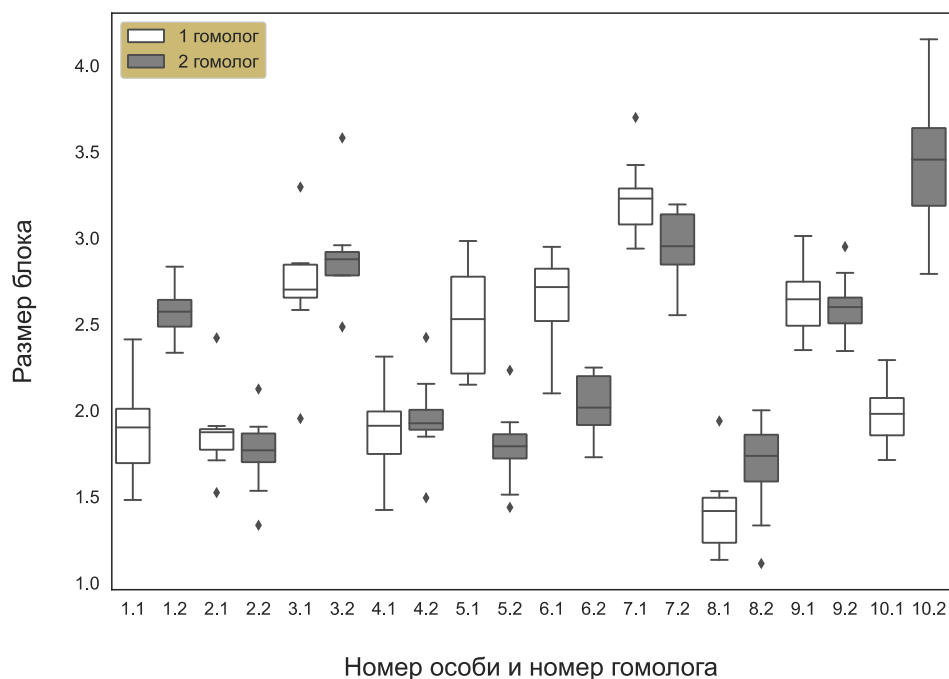


Рисунок Б.1 – Значения длин блоков ПГХ2 с размахом у 10 особей из села Чаинск. Для каждой особи показана длина каждого гомолога

Таблица Б.1 – Длины блока ПГХ2 у популяции комаров *An. messeae* из села Чаинск

№ комара	№ гомолога	Среднее отношение длин блока ПГХ2/теломерного блока
1	1	1,9
	2	2,6
2	1	1,9
	2	1,7
3	1	2,7
	2	2,9
4	1	1,9
	2	2,0
5	1	2,5
	2	1,8
6	1	2,6
	2	2,0
7	1	3,2
	2	2,9
8	1	1,4
	2	1,6
9	1	2,6

Окончание таблицы Б.1

	2	2,6
10	1	1,9
	2	3,4

ПРИЛОЖЕНИЕ В

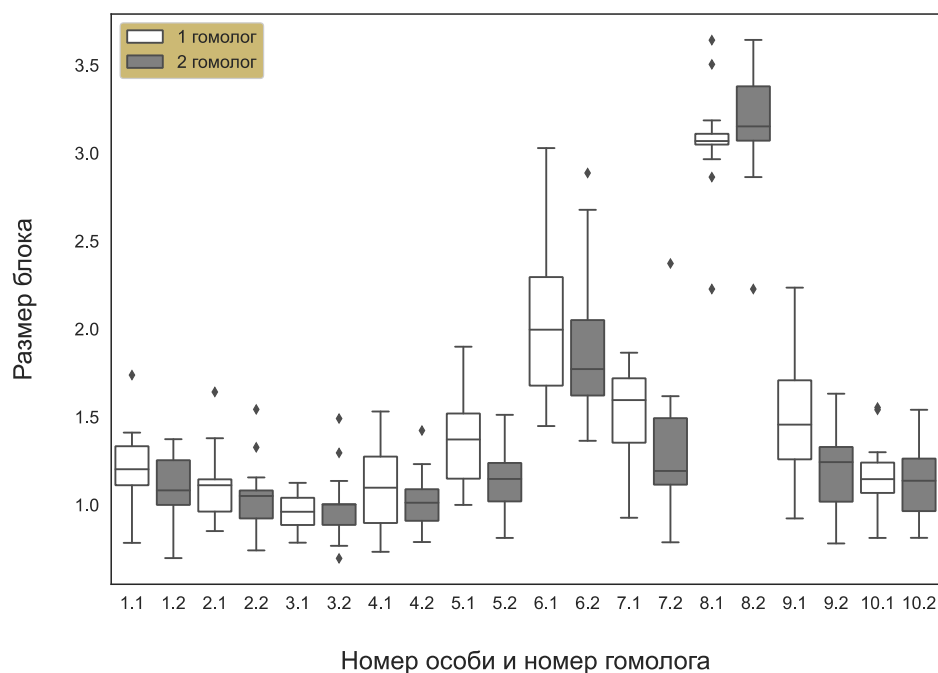


Рисунок В.1 – Значения длин блоков ПГХ2 с размахом у первых 10 особей из деревни Малое Нестерово. Для каждой особи показана длина каждого гомолога

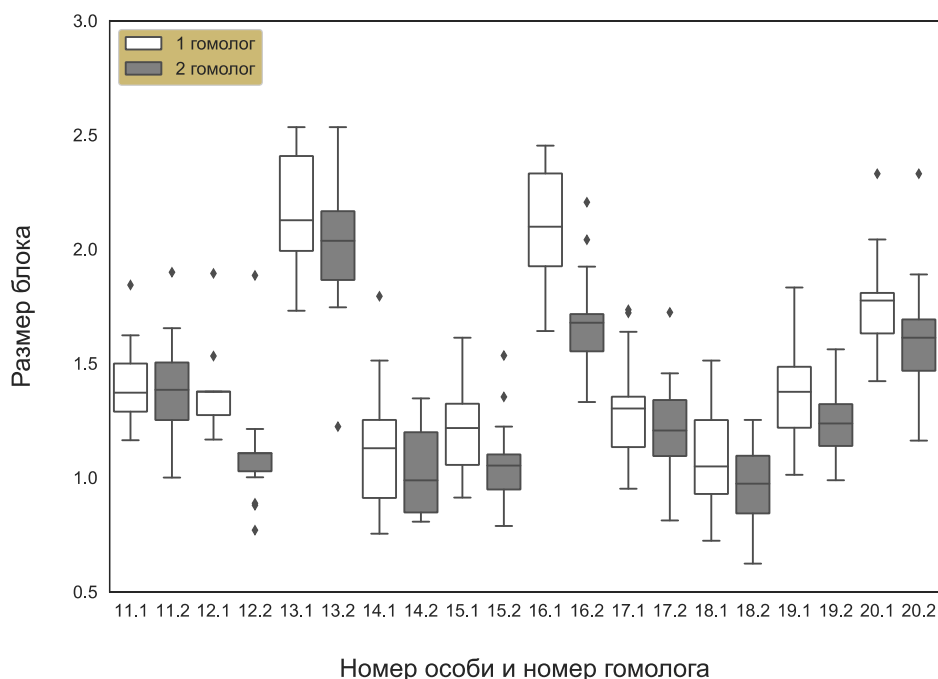


Рисунок В.2 – Значения длин блоков ПГХ2 с размахом у вторых 10 особей из деревни Малое Нестерово. Для каждой особи показана длина каждого гомолога

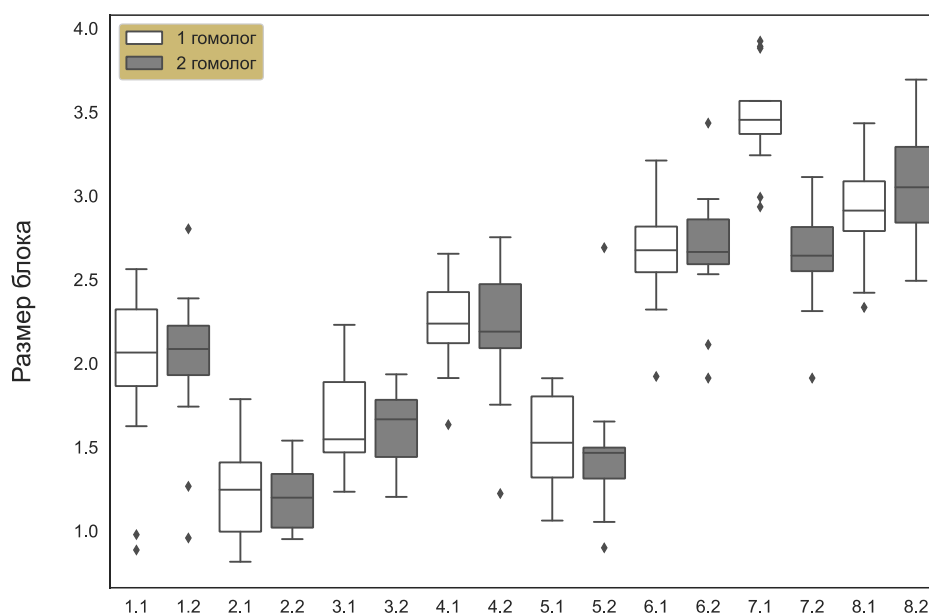
Таблица В.1 –Длины блока ПГХ2 у популяции комаров *An. messeae* из деревни Малое Нестерово

№ комара	№ гомолога	Среднее отношение длин блока ПГХ2/теломерного блока
1	1	1,2
	2	1,1
2	1	1,1
	2	1,0
3	1	0,9
	2	1,0
4	1	1,0
	2	1,0
5	1	1,4
	2	1,2
6	1	2,0
	2	1,9
7	1	1,5
	2	1,3
8	1	3,0
	2	3,2
9	1	1,5
	2	1,2
10	1	1,1
	2	1,1
11	1	1,4
	2	1,4
12	1	1,4
	2	1,1
13	1	2,1
	2	2,0
14	1	1,1
	2	1,0
15	1	1,2
	2	1,1
16	1	2,1
	2	1,7
17	1	1,3
	2	1,2
18	1	1,1
	2	1,0
19	1	1,4
	2	1,2

Окончание таблицы В.1

20	1	1,8
	2	1,6

ПРИЛОЖЕНИЕ Г



Номер особи и номер гомолога

Рисунок Г.1 – Значения длин блоков ПГХ2 с размахом у 8 особей из села Тегульдэг. Для каждой особи показана длина каждого гомолога

Таблица Г.1 – Длины блока ПГХ2 у популяции комаров *An. messeae* из села Тегульдэг

№ комара	№ гомолога	Среднее отношение длин блока ПГХ2/теломерного блока
1	1	1,9
	2	2,0
2	1	1,2
	2	1,2
3	1	1,6
	2	1,6
4	1	2,2
	2	2,2
5	1	1,5
	2	1,5
6	1	2,7
	2	2,7
7	1	3,4
	2	2,6
8	1	2,9
	2	3,0

Отчет о проверке на заимствования №1



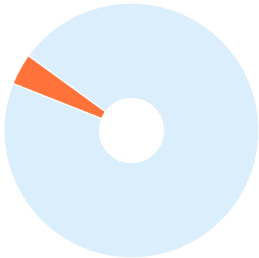
Автор: Кириленко Кирилл
Проверяющий: Кириленко Кирилл (kirillkirilenko.tomsk@gmail.com / ID: 5500289)
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - users.antiplagiat.ru

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 8
Начало загрузки: 22.05.2021 11:27:50
Длительность загрузки: 00:00:03
Имя исходного файла:
Кирилл_магистерская.pdf
Название документа: Кирилл_магистерская
Размер текста: 81 кБ
Символов в тексте: 83068
Слов в тексте: 10021
Число предложений: 1048

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Начало проверки: 22.05.2021 11:27:53
Длительность проверки: 00:00:06
Комментарии: не указано
Модули поиска: Интернет



ЗАИМСТВОВАНИЯ	САМОЦИТИРОВАНИЯ	ЦИТИРОВАНИЯ	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ
3,82%	0%	0%	96,18%

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 нормативно-правовой 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.

№	Доля в отчете	Доля в тексте	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте
[01]	2,32%	2,32%	H3K9me is dispensable for C. elegans development but essential for genome integrity https://edoc.unibas.ch	14 Авг 2019	Интернет	18	18
[02]	0,88%	1,4%	Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals https://doi.org	24 Авг 2019	Интернет	7	11
[03]	0,62%	0,71%	[Advances in Genetics] Volume 37 Polytene Chromosomes, Heterochromatin, and Position Effect Variegation https://doi.org	12 Сен 2019	Интернет	7	8