

Н.М. Немирович-Данченко, В.Н. Стегний

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ДНК ХРОМОЦЕНТРА *DROSOPHILA ORENA* НА ХРОМОСОМАХ «ПСЕВДОПИТАЮЩИХ» КЛЕТОК И КЛЕТОК СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Работа выполнена при финансовой поддержке: РФФИ (грант №07-04-01484), гранта Президента Российской Федерации по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации № НШ-2027.2008.4

Аннотация. Изучена локализация ДНК хромосомы *Drosophila oreana* на политенных хромосомах *Drosophila melanogaster*. Обнаружено, что ДНК хромосомы *Drosophila oreana* диспергирована у *Drosophila melanogaster* по всей длине хромосом. При этом анализ распределения ДНК хромосомы *Drosophila oreana* на хромосомах из «псевдопитающих» клеток яичников и клеток слюнных желез *Drosophila melanogaster* позволил выявить как общие, так и тканеспецифичные места её локализации.

Ключевые слова: *Drosophila oreana*, *Drosophila melanogaster*, политенные хромосомы, мутация *otu*¹¹, «псевдопитающие» клетки, клетки слюнных желез.

К настоящему времени сформировалось представление о гетерохроматине как наиболее изменчивой части генома. По содержанию и распределению гетерохроматина могут сильно различаться близкородственные виды и даже разные популяции одного вида [1, 2]. Кроме того, может значительно варьировать представленность гетерохроматических районов в разных тканях одного организма, что обусловлено разной реплицированностью соответствующих последовательностей [3, 4]. В нашем исследовании изучали распределение ДНК, взятой из хромосомы *Drosophila oreana*, на хромосомах *Drosophila melanogaster*, причём исследовались хромосомы двух типов клеток: «псевдопитающие» клетки яичников и клетки слюнных желез.

Материалы и методы

Материалом исследований служили мухи *Drosophila melanogaster*. Для работы использовали мух дикого типа (линия Canton's) и мух, гомозиготных по мутации *otu*¹¹ (линия *y w otu*¹¹ *sn*³).

Цитологические препараты. Для приготовления препаратов политенных хромосом для гибридизации *in situ* использовались яичники самок, гомозиготных по мутации *otu*¹¹, а также слюнные железы личинок из линии Canton's. Яичники и слюнные железы выделяли в 0,7% растворе NaCl и фиксировали в упрощенном растворе Карнуа (этанол и ледяная уксусная кислота 3:1), затем яичники инкубировали в 45% уксусной кислоте в течение 5 мин, накрывали покровным стеклом и раздавливали. Препараты замораживали в жидком азоте, удаляли покровные стёкла при помощи лезвия бритвы, затем

проводили по батарее спиртов (этанол) увеличивающейся концентрации (50% – при -20°C 5 мин, 70, 100% – при -4°C по 5 мин), инкубировали в растворе Карнуа при -4°C 5 мин, высушивали на воздухе в течение 5 мин, ополаскивали в 100% спирте и снова высушивали.

Введение метки в ДНК микродиссекционных ДНК-библиотек. В работе использовалась библиотека ДНК хромосомы *Drosophila orena* Dore1, полученная ранее в нашей лаборатории [5]. ДНК метили в 20 циклах полимеразной цепной реакции (амплификатор фирмы Eppendorf (Mastercycler® personal), температура крышки – 105°C). 1 мкл DOP-библиотеки добавляли к 20 мкл ПЦР-смеси: 1×ПЦР – буфер, 0,2 мМ дАТФ, дЦТФ, дГТФ и 0,15 мМ дТТФ и 0,1 мМ Tamra-5'-dUTP, 1 мкМ DOP-праймера, 1 мМ MgCl_2 и 2,5 ед. ДНК-полимеразы. ПЦР проводили в режиме: денатурация при 94°C – 1 мин; отжиг при 56°C – 1,5 мин; элонгация цепей при 72°C – 2 мин; с завершающей элонгацией цепей при 72°C – 8 мин.

Флуоресцентная *in situ* гибридизация. Полученный ДНК-зонд использовали для проведения флуоресцентной *in situ* гибридизации на хромосомы «псевдопитающих» клеток яичников и клеток слюнных желез.

1. Приготовление гибридизационной смеси. К 10 мкл ДНК-зонда добавляли 1 мкл 5М NaCl и 10 мкл спермальной ДНК лосося (10 мг/мл). Полученную смесь перемешивали на вортексе, затем к ней добавляли 300 мкл 96% этанола и оставляли на ночь. На следующее утро смесь центрифугировали 30 мин при 13,2 тыс. об/мин. Потом 96% этанол заменяли на такой же объём 70% этанола и снова центрифугировали 30 мин при 13,2 тыс. об/мин. 70% этанол сливали, а осадок высушивали 20 мин при 50°C . К осаждённому ДНК-зонду добавляли гибридизационную смесь в расчёте 12 мкл на препарат (50% деионизованного формамида, 10% декстрансульфата, 1% Tween 20, в $2\times\text{SSC}$, pH = 7). ДНК-зонд растворяли в гибридизационной смеси 2 ч, перемешивая на вортексе.

2. Предгибризационные обработки и гибридизация. Препараты хромосом промывали в $2\times\text{SSC}$ при 37°C 3 раза по 5 мин, проводили по батарее спиртов (70, 80, 96% по 5 мин в каждом) при комнатной температуре. Затем их высушивали при 37°C 10 мин, обрабатывали пепсином (0,2 мг пепсина на 1 мл 10% 1 М HCl) при 37°C 10 мин, отмывали от пепсина в $1\times\text{PBS}$ 2 раза по 5 мин при комнатной температуре и снова проводили по батарее спиртов при комнатной температуре. Потом препаратам давали высохнуть, после чего на них наносили гибридизационную смесь с ДНК-зондом по 10 мкл на препарат, накрывали покровными стёклами и выдерживали 5 мин при 75°C (денатурация ДНК-зонда и ДНК хромосом) и 18 ч при 37°C (гибридизация).

3. Постгибризационные обработки и окрашивание хромосом. С препаратов удаляли покровные стёкла, после чего их промывали в 50% деионизованном формамиде (в $2\times\text{SSC}$) при 45°C 3 раза по 5 мин, в $2\times\text{SSC}$ при 45°C 5 мин, в $2\times\text{SSC}$ с добавлением 1 капли Tween 20 при 45°C 5 мин, в $0,2\times\text{SSC}$ при 45°C 2 раза по 5 мин и в $0,1\times\text{SSC}$ при 60°C 5 мин. Препараты проводили по батарее спиртов и высушивали. Для окрашивания хромосом на препараты наносили смесь DAPI – VECTASHIELD и накрывали покровными стёклами.

Анализ и регистрацию результатов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss AxioImager (Zeiss, Германия), CCD-камеры AxioCam и программного обеспечения AxioVision LE Rel. 4.5.

Результаты

Ранее была проведена гибридизация зонда Dore1 на первичные политенные хромосомы трофоцитов *Drosophila melanogaster* [5]. В этом исследовании ДНК, гомологичная последовательностям зонда, была обнаружена только в прицентромерных районах. Первичные политенные хромосомы трофоцитов у *Drosophila* отличаются от обычных политенных хромосом укороченностью и сильной уплотнённой структуры. Поэтому мы предположили, что какие-то районы, содержащие исследуемую ДНК, могли быть не выявлены из-за их трудной доступности для зонда. Мутация *otu¹¹* была выбрана нами в связи с тем, что в трофоцитах яичников гомозиготных по ней самок (в так называемых «псевдопитающих» клетках) образуются политенные хромосомы с хорошо развитой дисковой исчерченностью. Гибридизация зонда Dore 1 на хромосомы «псевдопитающих» клеток мутантов *otu¹¹* и на хромосомы слюнных желез позволила выявить многочисленные сайты связывания по всей длине хромосом (рис. 1, 2). Нами были идентифицированы районы хромосом, гибридизующиеся с зондом Dore1. При изучении хромосом «псевдопитающих» клеток мы основывались на работе Н.И. Мальцевой и др. [6], в которой авторы картировали политенные хромосомы «псевдопитающих» клеток, сопоставляя их дисковую исчерченность с таковой хромосом слюнных желез. Сравнение распределения метки на хромосомах исследуемых тканей позволило выявить как общие, так и тканеспецифичные места локализации (табл. 1, 2).

Обсуждение

Как показывают наши данные, ДНК хромоцентра *Drosophila oreana* у *Drosophila melanogaster* распределена по всей длине хромосом, локализуясь не только в прицентромерных, но и в интеркалярных районах. *Drosophila oreana*, по всей видимости, является предком для видов подгрупп *melanogaster* и *yakuba*, в том числе и для *Drosophila melanogaster*. Об этом говорят комплексные данные по хромосомным инверсиям и последовательностям ДНК [7], а также проведённый в нашей лаборатории сравнительный анализ архитектуры ядер трофоцитов [8]. Схема эволюционных отношений в подгруппах *melanogaster* и *yakuba* дана на рис. 3, там же показано, как в филогенезе изменялась архитектура ядер трофоцитов. Для *Drosophila oreana* характерно объединение прицентромерных районов всех хромосом в локальный хромоцентр. У дочерних видов хромоцентр становится более диффузным или исчезает совсем, как у *Drosophila melanogaster*.

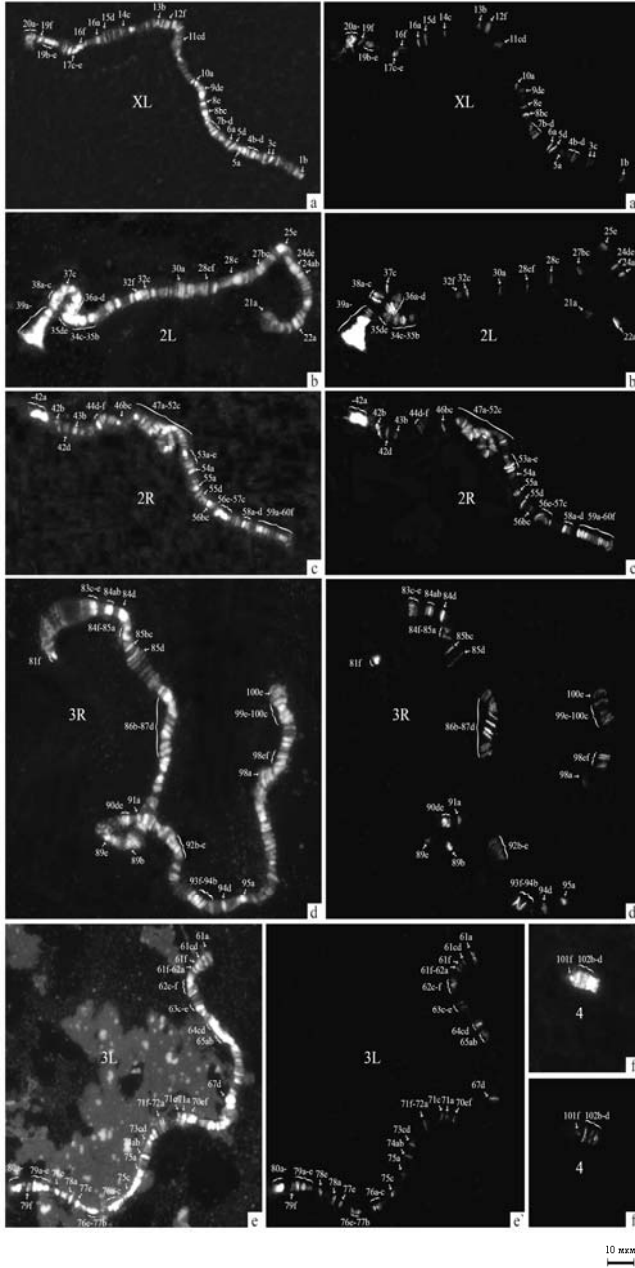


Рис. 1. FISH Dore1 на хромосомы клеток слюнных желез *Drosophila melanogaster* (линия Canton's): a, b, c, d, e, f – окраска DAPI; a', b', c', d', e', f' – Dore1, меченная Tamra-5'-dUTP; XL, 2L, 2R, 3L, 3R, 4 – плечи хромосом; стрелками и скобками обозначены районы, в которых произошла гибридизация с зондом

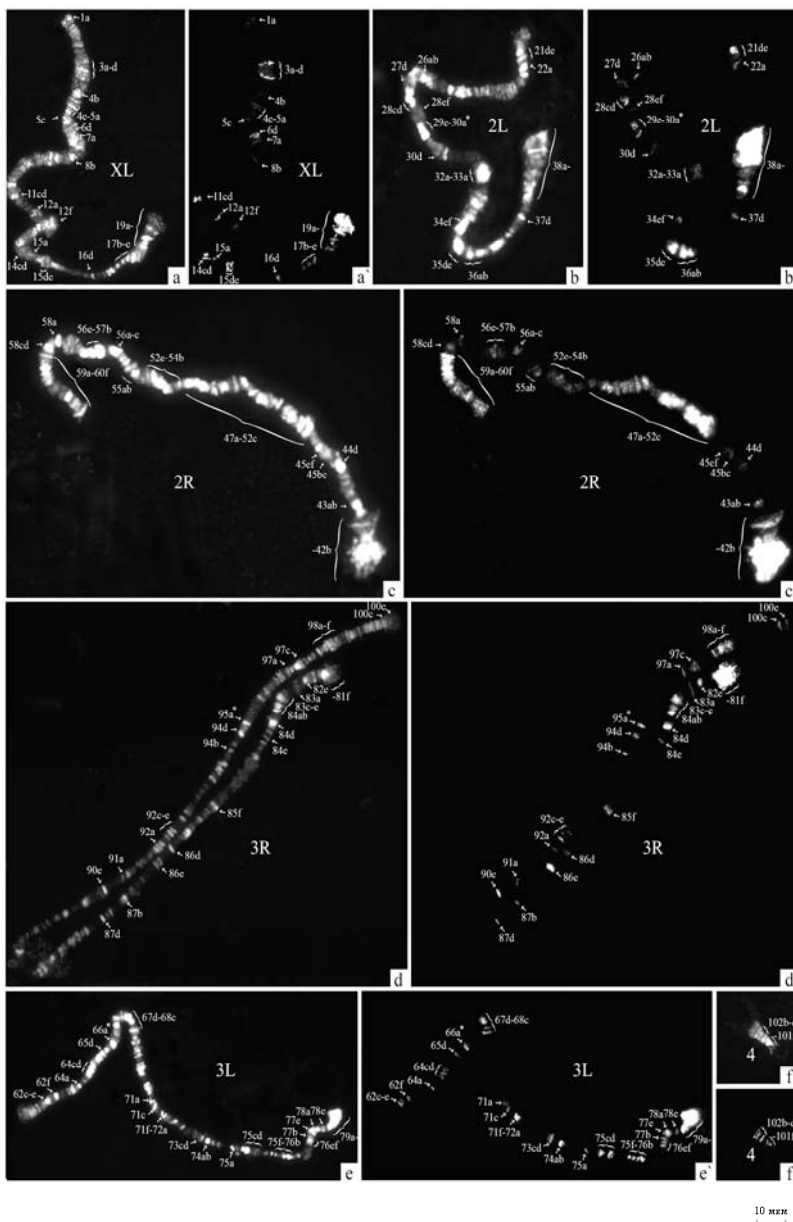


Рис. 2. FISH Dore1 на хромосомы «псевдопитающих» клеток *Drosophila melanogaster* (мутация *otu¹¹*): a, b, c, d, e, f – окраска DAPI; a', b', c', d', e', f' – Dore1, меченная Tamra-5'-dUTP; XL, 2L, 2R, 3L, 3R, 4 – плечи хромосом; стрелками и скобками обозначены районы, в которых произошла гибридизация с зондом (в работе Мальцевой и др. [6. Т. 3. С. 191] не было найдено сходства с хромосомами слюнных желез в районах 30 a – b, 66 a – b и 95 a – f. Поэтому определение локализации зонда в этих районах может быть неточным (30 a, 66 a и 95 a обозначены звездочками))

Таблица 1

Локализация ДНК хромосомы *Drosophila oreana* на хромосомах «псевдопитающих» клеток яичников и клеток слюнных желез *Drosophila melanogaster*. Хромосомы X и 2

Р а й о н	XL		Р а й о н	2L		Р а й о н	2R		Р а й о н	2R	
	Псевдопитающие клетки	Клетки слюнных желез		Псевдопитающие клетки	Клетки слюнных желез		Псевдопитающие клетки	Клетки слюнных желез		Псевдопитающие клетки	Клетки слюнных желез
1a	+	-	21a	-	+	- 41f	+	+	53b	+	+
1b	-	+	21d	+	-	42a	+	+	53c	+	+
3a	+	-	21e	+	-	42b	+	+	53d	+	+
3b	+	-	22a	+	+	42d	-	+	53e	+	+
3c	+	+	24ab	-	+	43a	+	-	53f	+	-
3d	+	-	24de	-	+	43b	+	+	54a	+	+
4b	+	+	25e	-	+	44d	+	+	54b	+	-
4c	-	+	26ab	+	-	44ef	-	+	55a	+	+
4d	-	+	27bc	-	+	45bc	+	-	55b	+	-
4e	+	-	27d	+	-	45ef	+	-	55d	-	+
4f	+	-	28c	+	+	46bc	-	+	56a	+	-
5a	+	+	28d	+	-	47a	+	+	56b	+	+
5c	+	-	28ef	+	+	47b	+	+	56c	+	+
5d	-	+	29e	+	-	47c	+	+	56e	+	+
6a	-	+	29f	+	-	47d	+	+	56f	+	+
6d	+	-	30a	+	+	47e	+	+	57a	+	+
7a	+	-	30d	+	-	47f	+	+	57b	+	+
7b	-	+	32a	+	-	48a	+	+	57c	-	+
7c	-	+	32b	+	-	48b	+	+	58a	+	+
7d	-	+	32c	+	+	48c	+	+	58b	-	+
8b	+	+	32d	+	-	48d	+	+	58c	+	+
8c	-	+	32e	+	-	48e	+	+	58d	+	+
8e	-	+	32f	+	+	48f	+	+	59a	+	+
9de	-	+	33a	+	-	49a	+	+	59b	+	+
10a	-	+	34c	-	+	49b	+	+	59c	+	+
11cd	+	+	34d	-	+	49c	+	+	59d	+	+
12a	+	-	34e	+	+	49d	+	+	59e	+	+
12f	+	+	34f	+	+	49e	+	+	59f	+	+
13b	-	+	35a	-	+	49f	+	+	60a	+	+
14c	+	+	35b	-	+	50a	+	+	60b	+	+
14d	+	-	35d	+	+	50b	+	+	60c	+	+
15a	+	-	35e	+	+	50c	+	+	60d	+	+
15d	+	+	36a	+	+	50d	+	+	60e	+	+
15e	+	-	36b	+	+	50e	+	+	60f	+	+
16a	-	+	36c	-	+	50f	+	+			
16d	+	-	36d	-	+	51a	+	+			
16f	-	+	37c	-	+	51b	+	+			
17b	+	-	37d	+	-	51c	+	+			
17c	+	+	38a	+	+	51d	+	+			
17de	+	+	38b	+	+	51e	+	+			
19a	+	-	38c	+	+	51f	+	+			
19b	+	+	38d	+	-	52a	+	+			
19c	+	+	38e	+	-	52b	+	+			
19d	+	+	38f	+	-	52c	+	+			
19e	+	+	39a -	+	+	52e	+	-			
19f	+	+				52f	+	-			
20a -	+	+				53a	+	+			

Примечание. XL, 2L, 2R – плечи хромосом.

Таблица 2

Локализация ДНК хромосомы *Drosophila oreana* на хромосомах «псевдопитающих»
клеток яичников и клеток слюнных желез *Drosophila melanogaster*.
Хромосомы 3 и 4

Р а з м е р	3L		Р а з м е р	3R		Р а з м е р	4	
	Псевдо-питающие клетки	Клетки слюнных желез		Псевдо-питающие клетки	Клетки слюнных желез		Псевдо-питающие клетки	Клетки слюнных желез
61a	-	+	81f	+	+	101f	+	+
61cd	-	+	82e	+	-	102b	+	+
61f	-	+	83a	+	-	102c	+	+
61f – 62a	-	+	83c	+	+	102d	+	+
62c	+	+	83d	+	+			
62d	+	+	83e	+	+			
62e	+	+	84a	+	+			
62f	+	+	84b	+	+			
63c	-	+	84d	+	+			
63de	-	-	84e	+	-			
64a	+	-	84f	-	+			
64c	+	+	85a	-	+			
64d	+	+	85bc	-	+			
65a	-	+	85d	-	+			
65b	-	+	85f	+	-			
65d	+	-	86b	-	+			
66a	+	-	86c	-	+			
67d	+	+	86d	+	+			
67e	+	-	86e	+	+			
67f	+	-	86f	-	+			
68a	+	-	87a	-	+			
68bc	+	-	87b	+	+			
70ef	-	+	87c	-	+			
71a	+	+	87d	+	+			
71c	+	+	89b	-	+			
71f	+	+	89e	-	+			
72a	+	+	90d	-	+			
73cd	+	+	90e	+	+			
74a	+	+	91a	+	+			
74b	+	+	92a	+	-			
75a	+	+	92b	-	+			
75c	+	+	92c	+	+			
75d	+	-	92d	+	+			
75f	+	-	92e	+	+			
76a	+	+	93f	-	+			
76b	+	+	94a	-	+			
76c	-	+	94b	+	+			
76e	+	+	94d	+	+			
76f	+	+	95a	+	+			
77a	-	+	97a	+	-			
77b	+	+	97c	+	-			
77e	+	+	98a	+	+			
78a	+	+	98b	+	-			
78e	+	+	98c	+	-			
79a	+	+	98d	+	-			
79b	+	+	98e	+	+			
79c	+	+	98f	+	+			
79d	+	+	99ef	-	+			
79e	+	+	100ab	-	+			
79f	+	+	100c	+	+			
80a –	+	+	100e	+	+			

Примечание. 3L, 3R, 4 – плечи хромосом.

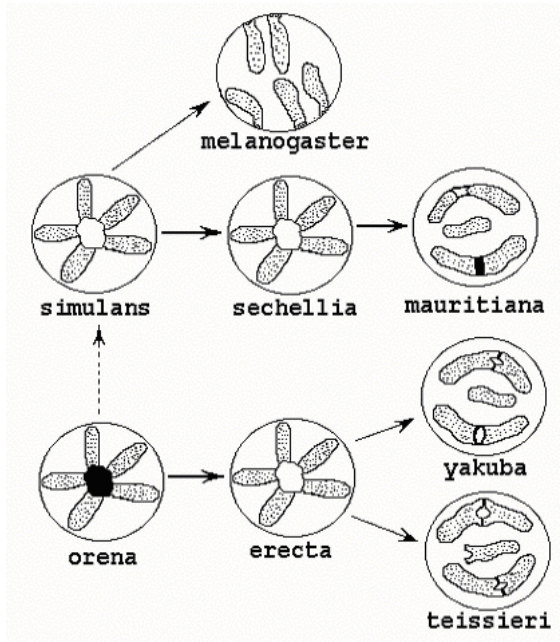


Рис. 3. Схема видообразования подгруппы *melanogaster* и *yakuba* [8]

Уменьшение способности прицентромерных районов к эктопической конъюгации могло быть связано с тем, что значительная часть участвовавшего в ней прицентромерного гетерохроматина распределилась по плечам хромосом. Такая реорганизация могла быть связана с повышением активности мобильных элементов генома, которые, распространяясь из прицентромерных районов в интеркалярные, захватывали с собой блоки гетерохроматина. Заметим, что у *Drosophila melanogaster*, самого молодого вида в подгруппе, имеется значительно больше копий мобильных элементов, чем у предковых видов [9]. Это согласуется с рассматриваемой гипотезой, поскольку передвижение мобильных элементов может быть сопряжено с их дупликацией [10]. Правильность приведённых выше рассуждений подтверждают также данные о распределении копий мобильных элементов на хромосомах *Drosophila orena* и *Drosophila melanogaster*. У *Drosophila melanogaster* они обнаружены как в прицентромерных, так и в интеркалярных районах хромосом, тогда как у *Drosophila orena* – только в прицентромерных [9]. Наблюдаемое нами распределение зонда Dorel по плечам хромосом *Drosophila melanogaster*, по всей видимости, является свидетельством происходившего в филогенезе перераспределения гетерохроматина. Выявленные в ходе сравнительного анализа различия по локализации метки между хромосомами «псевдопитающих» клеток мутантов *otu*¹¹ и клеток слюнных желез линии Canton's могут объясняться как разным распределением исследуемой ДНК в этих линиях, так и её разной реплицированностью в исследованных тканях. Дальнейший анализ распределения разных классов ДНК *Drosophila orena* на политенных хромо-

сомах «псевдопитающих» клеток и клеток слюнных желез *Drosophila melanogaster* позволит более детально выявить характер эволюционных преобразований гетерохроматина в подгруппе *Drosophila melanogaster*.

Авторы выражают искреннюю благодарность Т.А. Шелковниковой и К.Е. Усову за предоставление библиотеки Dorel и И.Ф. Жимулёву за предоставление линии у w otu¹¹ sn³.

Литература

1. Yoon J.S., Richardson R.H. Evolution in Hawaiian *Drosophilidae* // Evolution. 1978b. Vol. 32, № 3. P. 475–484.
2. Ananiev E.V., Gvozdev V.A., Ilyin Y.V. Reiterated genes with varying location in intercalary polytene chromosomes // Chromosoma. 1978. Vol. 70, № 1. P. 1–17.
3. Endow S.A., Gall J.G. Differential replication of satellite DNA in polyploidy tissues of *Drosophila virilis* // Chromosoma. 1975. Vol. 50, № 2. P. 175–192.
4. Lozovskaya E.R., Slesinger S.I., Prokofieva-Belgovskaya A.A. Comparative study of human chromosome replication in primary cultures of embryonic fibroblasts and in cultures of peripheral blood leucocytes. III. Distribution of AT and GC-nucleotide pairs along length of chromosomes 1, 2, 3 and 16 in the two types of human cells // Chromosoma. 1977. Vol. 60, № 1. P. 69–79.
5. Усов К.Е., Шелковникова Т.А., Вассерлауф И.Э., Стегний В.Н. Молекулярно-цитогенетический анализ прицентромерного гетерохроматина хромосом трофоцитов яичников у видов подгруппы *melanogaster* рода *Drosophila* // Цитология. 2008. Т. 50, № 12. С. 1043–1047.
6. Mal'ceva N.I., Gyurkovics H., Zhimulev I.F. General characteristics of the polytene chromosomes from ovarian pseudonurse cells of the *Drosophila melanogaster* otu 11 and fs(2)B mutants // Chromosome Research. 1995. Vol. 3, № 3. P. 191–200.
7. O'Grady P.M., Baker R.H., Durando C.M. et al. Polytene chromosomes as indicators of phylogeny in several species groups of *Drosophila* // Evolutionary Biology. 2001. Vol. 1, № 1. P. 6–11.
8. Стегний В.Н., Вассерлауф И.Э. Видовая архитектура хромосом генеративной ткани и проблемы филогенетических отношений в подгруппе *melanogaster* рода *Drosophila* (*Sophophora*) // Генетика. 1994. Т. 30, № 4. С. 478–483.
9. Biemont C., Cizeron G. Distribution of transposable elements in *Drosophila* species // Genetica. 1999. Vol. 105, № 1. С. 43–62.
10. Galas D.J., Chandler M. On the molecular mechanisms of transposition // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1981. Vol. 78, № 8. P. 4858–4862.