

Метод сверхраспластывания ядер в профазе I мейоза. Исследование хромосом млекопитающих и рептилий.

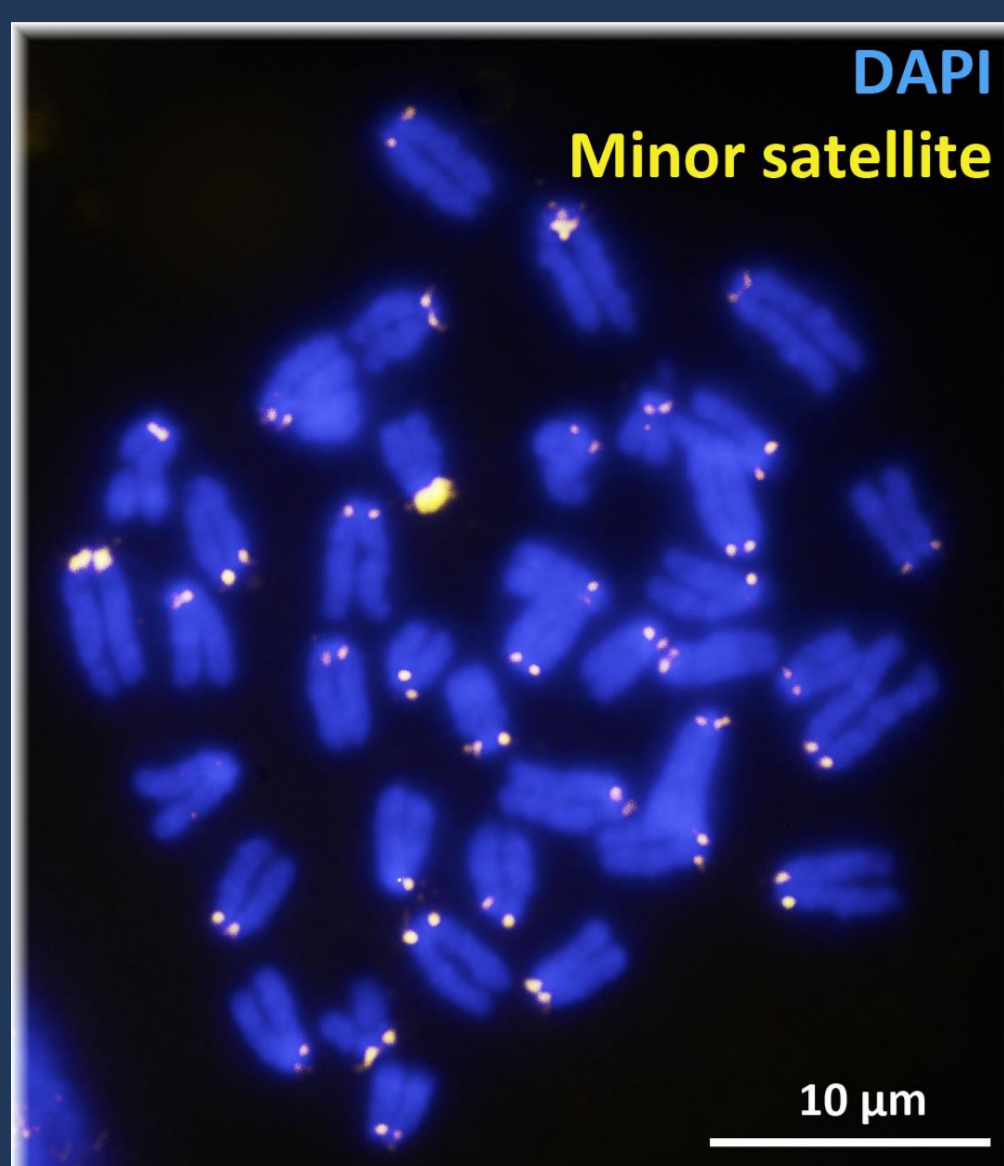
Лосев М.И.¹ и Никитин П.А.¹, Спангенберг В.Е.²

¹ Специализированный учебно-научный центр — факультет МГУ имени М. В. Ломоносова, школа имени А. Н. Колмогорова

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН



Хромосомы в метафазе митоза



Метафазные хромосомы мыши *Mus musculus* с визуализацией прицентромерной сателлитной ДНК (минорный ДНК-сателлит).

Для исследования кариотипов человека и животных обычно используются цитогенетические методы с применением препаратов митотических метафазных хромосом. Хромосомы на этой стадии клеточного цикла максимально компактны и хорошо подходят для выявления больших перестроек (делеций, дупликаций и т.д.), затрагивающих значительные фрагменты хромосом.

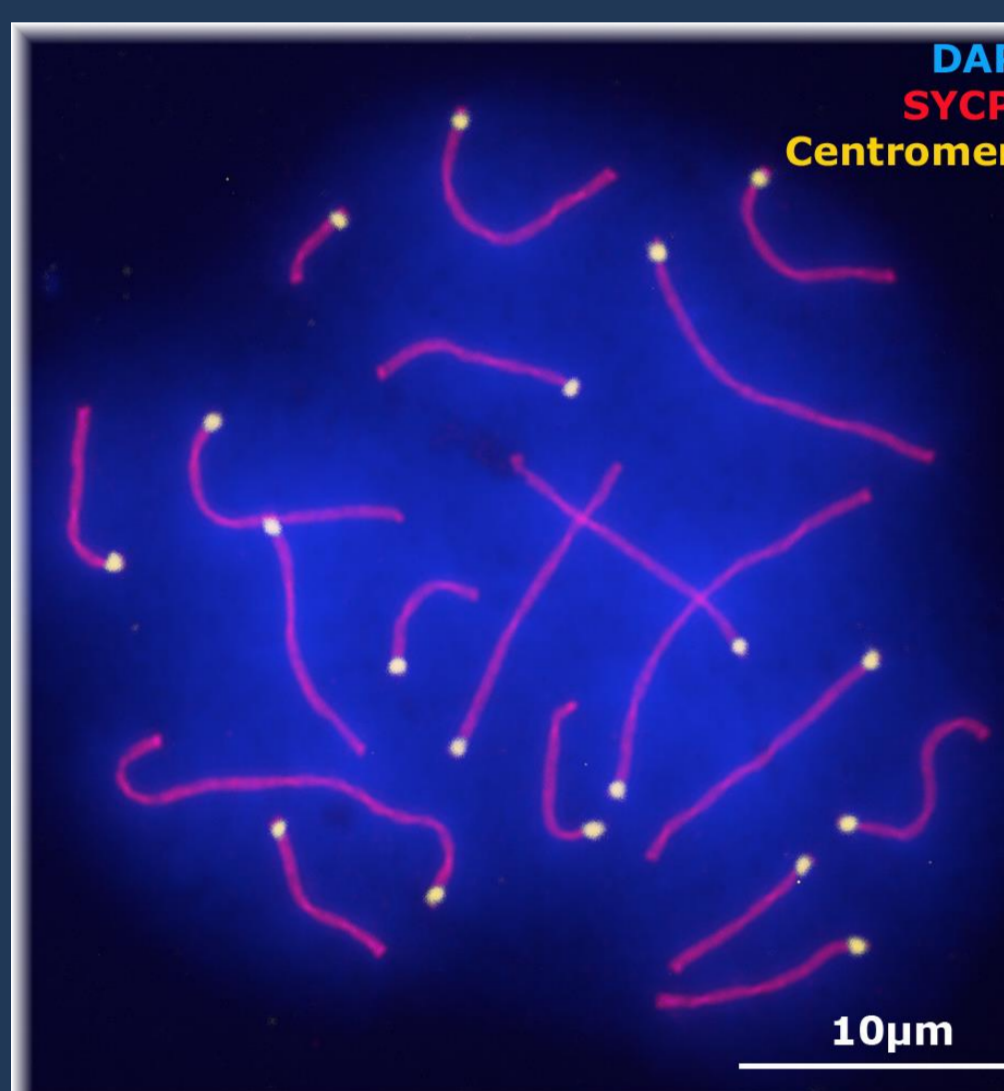
Однако современная медицина и сравнительная цитогенетика животных ставит все более сложные задачи исследования тонкой организации хромосом:

- Микроделеции, небольшие перестройки
- аномалии организации центромер, их дупликация
- эпигенетические модификации хроматина.

Уже существуют ДНК FISH-зонды, при помощи которых исследователи могут визуализировать любой фрагмент генома человека или животного, существуют антитела для исследования локализации нужного белка в структуре хромосом. Для этих задач применима флуоресцентная микроскопия.

Однако исследования на препаратах чрезвычайно компактных метафазных хромосом не обладают большой разрешающей способностью.

Хромосомы в профазе I мейоза

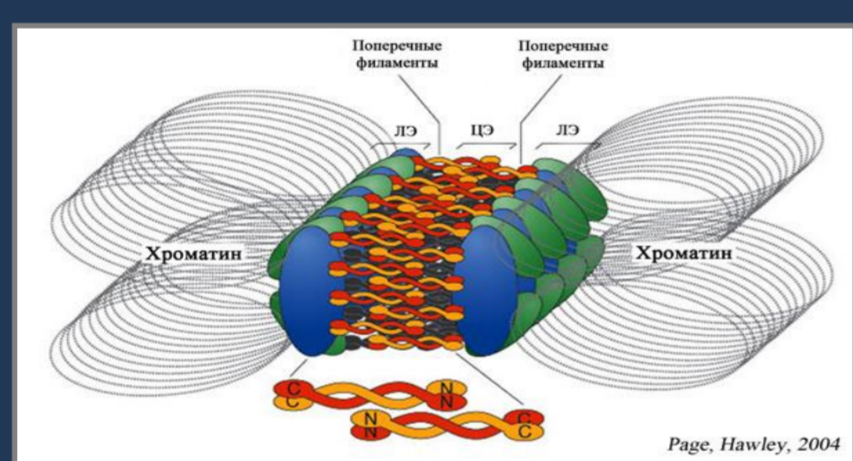


Препарат распластанного ядра сперматоцита I скальной ящерицы. Иммуноокрашивание SCP3 – белка осевых элементов синаптонемных комплексов (красный) и центромерных белков (желтый).

Для более детального исследования хромосом применимы препараты мейотических хромосом - распластанные биваленты на стадии профазы I мейоза.

Линейные размеры хромосом в пахтене профазы I мейоза примерно в 3-10 раз больше чем в метафазе митоза (в зависимости от стадии профазы). Такие препараты используются для изучения структуры отдельных хромосом и динамики профазы I мейоза с помощью оптической флуоресцентной микроскопии. С помощью специфических антител к белку SCP3, меченных флуорофорами мы визуализировали осевые элементы синаптонемных комплексов – «каркаса» мейотических хромосом.

Таким образом, применение метода распластывания мейотических хромосом позволяет более детально исследовать каждую хромосому в кариотипе.



Модель строения синаптонемного комплекса (СК). Схематично показаны петли хроматина от 4 хроматид.

Основная идея исследования

1. Метафазные митотические хромосомы обычно имеют стабильные размеры и плохо поддаются растяжению при приготовлении метафазных пластинок.
2. Известно, что мейотические хромосомы значительно меняют длину в течение профазы I мейоза от лептотены до диплотены. Эта особенность осевых структур (пластичность) мейотических хромосом послужила идеей нашего исследования и разработки метода сверхраспластывания хромосом.

Нами были исследованы различные варианты растяжения мейотических хромосом в процессе приготовления препаратов распластанных ядер сперматоцитов. Таким образом, разработан метод получения сверхраспластанных препаратов пахтенных ядер, позволяющий повысить разрешающую способность в исследованиях хромосом животных методами флуоресцентной микроскопии.

Ранее такая детализация была доступна только при использовании электронной микроскопии. Однако приготовление препаратов для электронной микроскопии сопряжено с необратимыми изменениями белков и ДНК, часть методов иммуноокрашивания значительно усложняется или невозможна.

	Способ распластывания	Степень распластывания	Фрагментация осей хромосом	Сохранность архитектуры ядра	Чистота препарата
1	Наслаивание на каплю 0.2M сахаразы	2	1	3	3
2	Наслаивание на каплю 0.2M сахаразы с Tween 20	2	1	2	1
3	Наслаивание на дистиллированную воду	3	3	1	2
4	Сливание двух капель	2	1	3	3
5	Последовательное слияние капель	3	2	2	1
6	«Протягивание» суспензии между стеклами	3	2	2	3
7	Варианты 5 + 6	3	2	2	3

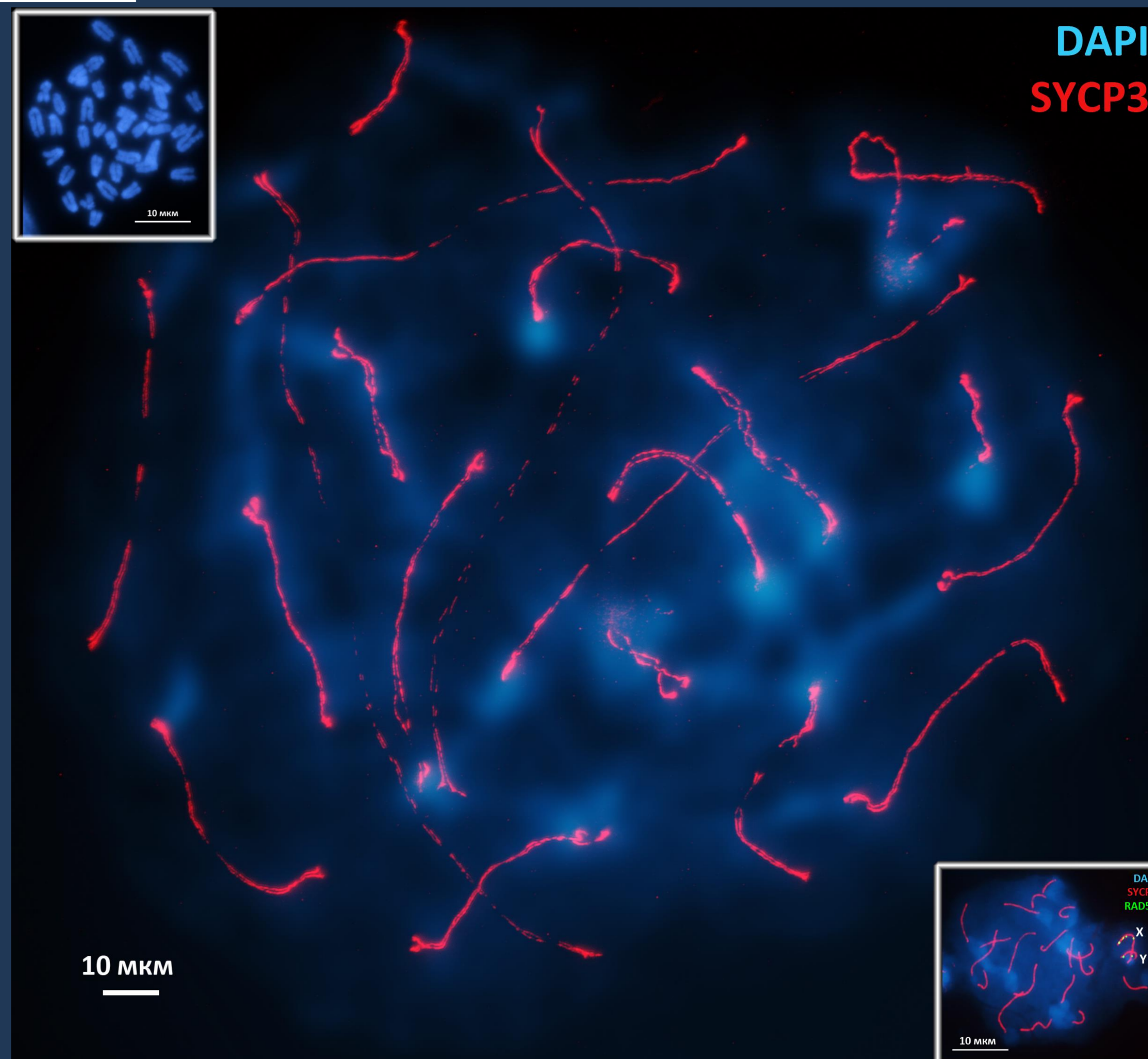
Таблица сравнения физических воздействий на хромосомы в процессе приготовления препаратов мейотических хромосом. Гипотонический шок и использование слабых детергентов в сочетании с различными манипуляциями при приготовлении распластанных препаратов синаптонемных комплексов.

Цель: разработать метод сверхраспластывания мейотических хромосом млекопитающих и рептилий и исследовать белковые маркеры мейоза.

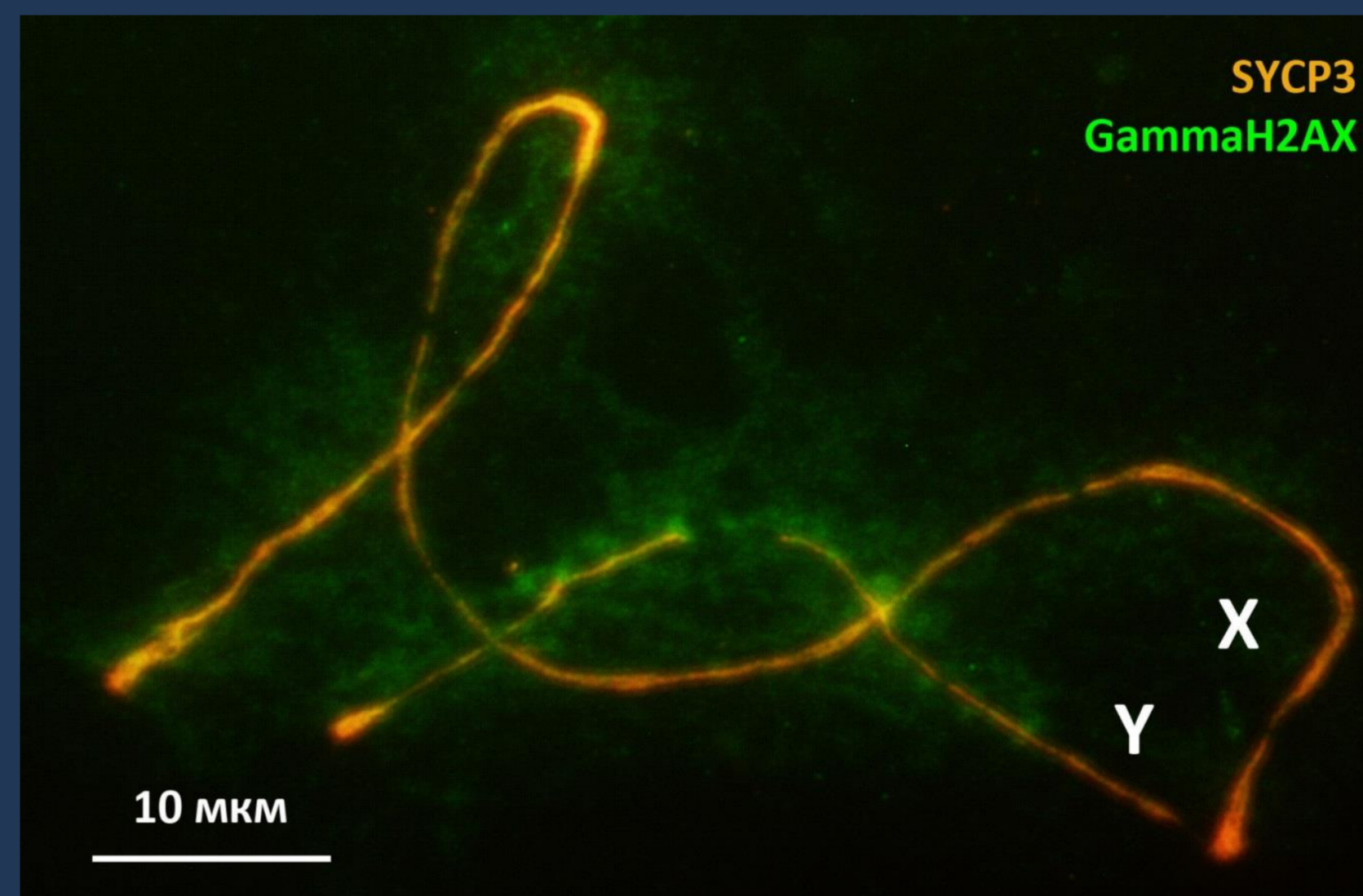
Задачи:

1. Освоение стандартного метода распластывания мейотических хромосом.
2. Модификация метода для получения сверхраспластанных мейотических хромосом мыши и скальной ящерицы.
3. Иммуноокрашивание мейоз-специфических белков для проверки пригодности полученных препаратов для иммуноцитохимических исследований.
4. Детальное исследование дицентрических хромосом скальной ящерицы *Darevskia raddei* на сверхраспластанных препаратах.

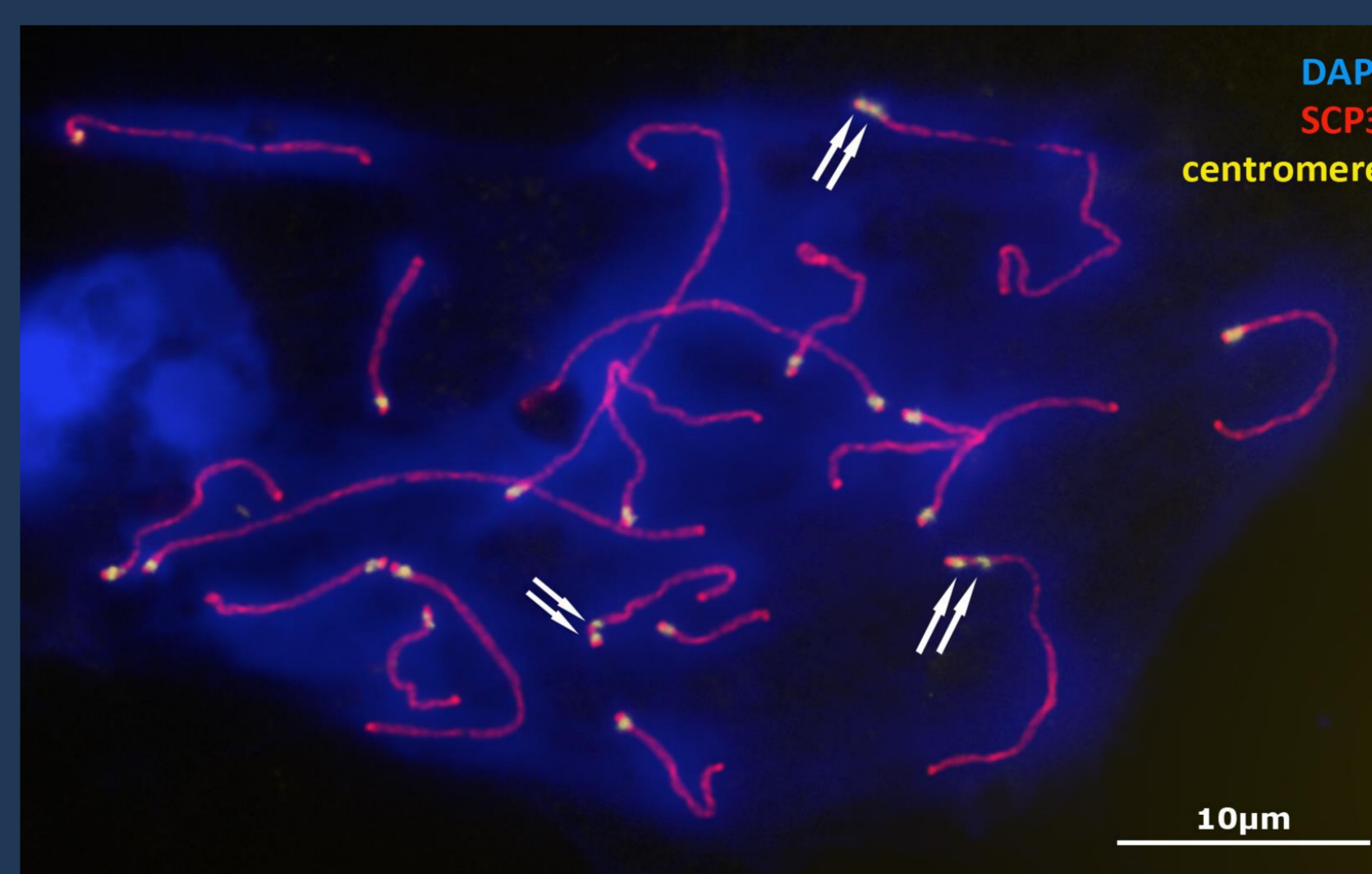
Результаты:



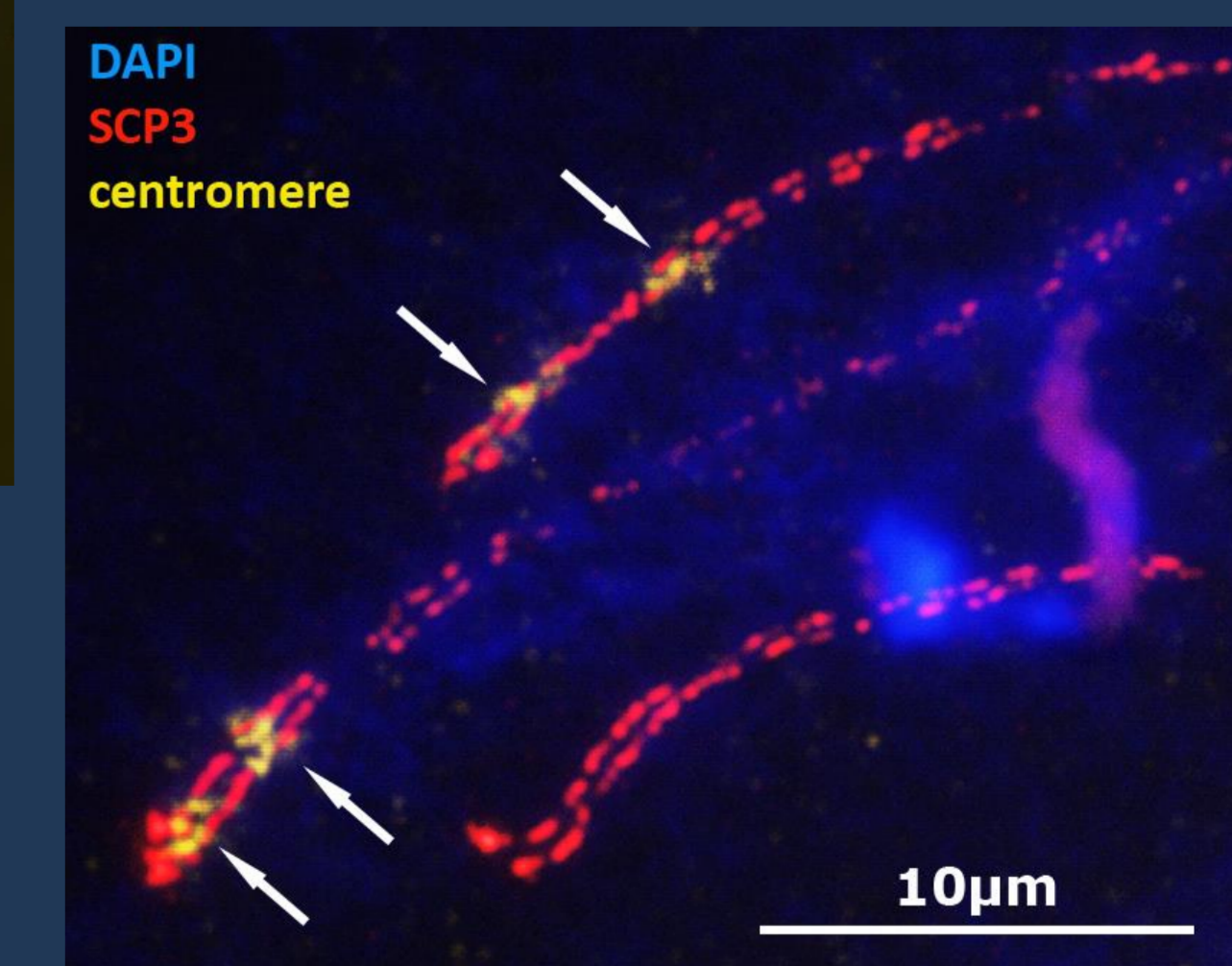
Сверхраспластанное ядро сперматоцита I мыши. Иммуноокрашивание осевых элементов антителами к белку SCP3 (красный). Для масштаба представлены: стандартная метафазная пластинка (слева сверху) и стандартный препарат распластанных хромосом в мейозе (справа внизу).



Сверхраспластанный половой бивалент (XY) мыши. Иммуноокрашивание осевых элементов (SCP3) и белка инактивации хроматина gammaH2AX. Различимы осевые структуры сестринских хроматид, ранее видимые только с использованием электронной микроскопии. Препараты сверхраспластанных хромосом пригодны для детальных исследований и даже для иммуноокрашивания маркеров модификаций хроматина.



Сверхраспластанное ядро сперматоцита I скальной ящерицы *D. raddei*. Иммуноокрашивание центромер в дицентрических хромосомах обозначено стрелками. Двойные сигналы центромер (нативная и неоцентромера) у скальных ящериц были обнаружены впервые с использованием метода сверхраспластывания в 2018r. (Spangenberg et al., 2018)



Сверхраспластанное ядро сперматоцита I скальной ящерицы *D. raddei*. Иммуноокрашивание центромер в дицентрических хромосомах обозначено стрелками.

Выводы:

1. Разработан новый метод приготовления сверхраспластанных тотальных препаратов синаптонемных комплексов, применимый для исследования млекопитающих и рептилий, который значительно повышает разрешающую способность в исследованиях хромосом.
2. Доказана возможность использования методов иммуноокрашивания на сверхраспластанных препаратах синаптонемных комплексов.
3. На сверхраспластанных препаратах мейотических хромосом скальной ящерицы *D. raddei* визуализированы детали организации дицентрических хромосом.