

ОСОБЕННОСТИ ЛОКАЛИЗАЦИИ ПОВТОРЕННЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК В ПРИЦЕНТРОМЕРНОМ ГЕТЕРОХРОМАТИНЕ МАЛЯРИЙНЫХ КОМАРОВ КОМПЛЕКСА «*ANOPHELES MACULIPENNIS*»

© О. Г. Грушко,¹ А. М. Русакова,^{1, 2, *} М. В. Шарахова¹
И. В. Шарахов,^{1, 2} В. Н. Стегний^{1, 2}

¹ Научно-исследовательский институт биологии и биофизики при Томском государственном университете
и ² Кафедра цитологии и генетики Томского государственного университета;

* электронный адрес: gene@res.tsu.ru

С помощью *in situ*-гибридизации изучено распределение восьми консервативных повторенных последовательностей ДНК из прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *Anopheles atroparvus* на политенных хромосомах *An. atroparvus* и *An. messeae*. Обнаружено, что гетерохроматиновые районы всех хромосом *An. atroparvus* и *An. messeae* различаются по спектрам консервативных повторов. Одни повторы выявлены только в прицентромерном гетерохроматине хромосомы 2 (клоны Atr2R-46a, Atr2R-73 и Atr2R-85a у *An. atroparvus* и Atr2R-25b у *An. messeae*). Другие повторы содержатся в двух (клоны Atr2R-25a и Atr2R-90 у *An. atroparvus* и Atr2R-25a у *An. messeae*) и более (клоны Atr2R-118 и Atr2R-136 у *An. atroparvus* и Atr2R-73 у *An. messeae*) гетерохроматиновых районах хромосом. Показано, что состав ДНК прицентромерных гетерохроматиновых районов хромосом у видов комплекса «*Anopheles maculipennis*» видо- и хромосомоспецифичен, в частности благодаря различному содержанию консервативных повторов.

Ключевые слова: политенные хромосомы, прицентромерный гетерохроматин, консервативные повторы, комплекс «*Anopheles maculipennis*».

Несмотря на небольшое количество генов и обилие некодирующих повторяющихся последовательностей ДНК, конститутивный гетерохроматин признан генетически значимой частью генома эукариот. По-видимому, роль гетерохроматина важна и при видообразовании, поскольку у целого ряда организмов наблюдаются межвидовые различия его структуры. В политенных ядрах некоторых двукрылых насекомых эти различия проявляются наиболее четко (Стегний, 1979; Стегний, Вассерлауф, 1994; Стегний и др., 1996; Шарахова и др., 1997; Чубарева и др., 2003). Так, у восьми видов малярийных комаров комплекса «*Anopheles maculipennis*» обнаружены межвидовые и межхромосомные различия в структуре прицентромерного гетерохроматина политенных хромосом трофоцитов яичников и в степени его прикрепления к ядерной оболочке (Стегний, 1979; Шарахова и др., 1997). С одной стороны, детальные исследования молекулярных генетических процессов, сопровождающих видообразование, особенно важны в данной группе эпидемически опасных насекомых. Кроме того, механизмы формирования гетерохроматина различной структуры в политенных ядрах до конца неясны, и их изучение само по себе является интереснейшей задачей цитогенетики.

Различия в структуре прицентромерного гетерохроматина и силе его взаимодействий с ядерной оболочкой скорее всего обусловлены различиями в составе ДНК. Это подтверждается, в частности, при межвидовых скрещиваниях в комплексе «*Anopheles maculipennis*», при ко-

торых гомеологичные хромосомы у гибридов вне зависимости от направления скрещивания всегда наследуют структуру и материнского, и отцовского видов (Стегний, 1987). Следовательно, различные по структуре гетерохроматиновые районы должны различаться по составу ДНК. Однако *in situ*-гибридизация смеси фрагментов ДНК, полученной в результате микродиссекции прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *An. atroparvus*, показала присутствие гомологичных последовательностей ДНК в составе каждого района прицентромерного гетерохроматина хромосом X, 2 и 3 как у *An. atroparvus*, так и у *An. messeae* (Грушко и др., 2004). Иными словами, состав ДНК всех прицентромерных гетерохроматиновых районов, совершенно различных по структуре, у видов *An. atroparvus* и *An. messeae* в какой-то степени сходен. Для определения степени этого сходства в первую очередь было необходимо сравнить районы прицентромерного гетерохроматина хромосом *An. atroparvus* и *An. messeae* по их основному содержанию — высокоповторенной ДНК. Поскольку речь идет о межвидовых различиях, для такого сравнения можно использовать только присутствующие у обоих видов консервативные повторы.

Высокоповторенные последовательности ДНК были выявлены с помощью Саузерн-блот-гибридизации с меченой геномной ДНК *An. atroparvus* в составе плазмидной районспецифичной ДНК-библиотеки диффузного прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *An. at-*

roparvus, полученной методом микродиссекции политемных хромосом (Грушко и др., 2004). Среди повторов были выявлены консервативные повторы в комплексе «*Anopheles maculipennis*» с помощью Саузерн-блот-гибридизации с меченой геномной ДНК *An. messeae* (Грушко и др., 2004).

В настоящей работе проведено сравнение состава ДНК районов прицентромерного гетерохроматина *An. atroparvus* и *An. messeae* по содержанию восьми консервативных повторяющихся последовательностей ДНК — клонов Atr2R-25a, Atr2R-25b, Atr2R-46a, Atr2R-73, Atr2R-85a, Atr2R-90, Atr2R-118 и Atr2R-136 с целью оценить уровень межхромосомных и межвидовых различий в составе ДНК у видов комплекса «*Anopheles maculipennis*».

Материал и методика

Для приготовления препаратов политемных хромосом по стандартной методике (Kumar et al., 1997) использовали яйцники, фиксированные в растворе Карнуа (96%-ный этанол и ледяная уксусная кислота в объемном соотношении 3 : 1), на стадии активного созревания трофоцитов (Шарахова и др., 1997). Яйцники выделяли из самок *An. atroparvus* лабораторной популяции и самок *An. messeae*, отловленных в природе (Томская обл., пос. Коларово). Для получения зондов ДНК клонированные фрагменты Atr2R-25a, Atr2R-25b, Atr2R-46a, Atr2R-73, Atr2R-85a, Atr2R-90, Atr2R-118 и Atr2R-136 были амплифицированы в ходе ПЦР (95 °C/5 мин, 25 циклов: 94 °C/30 с, 70 °C/2 мин и 68 °C/3 мин) в присутствии 1 пикомоль праймеров Т3 и Т7 и рекомбинантных плазмидных клонов в качестве матричных ДНК. Биотинилирование зондов ДНК, их гибридизацию и детекцию на препаратах политемных хромосом проводили согласно рекомендованным протоколам с использованием соответственно GIBCO BRL BioPrime DNA labeling system, GIBCO BRL *In situ* Hybridization and Detection system (Invitrogen/Life Technologies, США) и Rhodamin-Avidin/Biotinylated Anti-Avidin (Vector Laboratories, США). Хромосомы окрашивали флуоресцентным красителем YOYO-1 (Sigma-Aldrich, США) и заключали в DABCO antifade solution (Sigma—Aldrich, США). Регистрацию результатов осуществляли на конфокальном микроскопе Bio-Rad MRC 1024 Scanning Confocal (2 channel/LaserSharp 3.2 program/networked) System (Center for Tropical Disease Research and Training, University of Notre Dame, США).

Результаты и обсуждение

В настоящем исследовании мы сравнили состав ДНК районов прицентромерного гетерохроматина *An. atroparvus* и *An. messeae* по содержанию консервативных повторов, гомологичных клонам Atr2R-25a, Atr2R-25b, Atr2R-46a, Atr2R-73, Atr2R-85a, Atr2R-90, Atr2R-118 и Atr2R-136.

In situ-гибридизация на политемных хромосомах *An. atroparvus* показала, что хромосомы этого вида различаются по содержанию повторенных последовательностей ДНК в прицентромерном гетерохроматине (рис. 1, 2). Фрагменты Atr2R-46a, Atr2R-73 и Atr2R-85a обнаружены только в прицентромерном гетерохроматине правого плеча хромосомы 2 *An. atroparvus* (район 14c—15d), т. е. являются районо- или хромосомоспеци-

фичными. Фрагменты Atr2R-25a и Atr2R-90 содержатся в гетерохроматиновых районах двух хромосом *An. atroparvus*: в районах прицентромерного гетерохроматина хромосом X (район 5b) и 2 (район 14c—15d). Фрагмент Atr2R-136 обнаружен во всех гетерохроматиновых районах трех хромосом. Фрагмент Atr2R-118 также содержится в районах прицентромерного гетерохроматина трех хромосом, но в отличие от фрагмента Atr2R-136 отсутствует в прицентромерном гетерохроматине левого плеча хромосомы 3 (район 33c). Подобные результаты были получены при *in situ*-гибридизации клонированных фрагментов Atr2R-25a, Atr2R-25b, Atr2R-46a, Atr2R-73, Atr2R-85a, Atr2R-90, Atr2R-118 и Atr2R-136 с политемными хромосомами *An. messeae*. Выявлены межхромосомные различия по содержанию повторов гомологичных гибридным клонам. Так, обнаружено, что блочный гетерохроматин всех хромосом *An. messeae* содержит клон Atr2R-73 (районы 5b, 15d и 35d), тогда как клон Atr2R-25a содержится только в прицентромерном гетерохроматине двух хромосом — 2 (районы 14c-15d) и 3 (район 32d), а клон Atr2R-25b — только в блоках прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 (район 15d). Таким образом, каждый район гетерохроматина отличается от всех других по содержанию. Поскольку районы прицентромерного гетерохроматина изученных видов различаются даже по содержанию своего основного компонента — высокоповторенных последовательностей, можно сделать заключение о существенных различиях состава их ДНК в целом.

При *in situ*-гибридизации с политемными хромосомами *An. messeae* обнаружены и межвидовые различия между *An. messeae* и *An. atroparvus* по распределению в районах прицентромерного гетерохроматина каждой из изученных консервативных повторенных последовательностей ДНК (рис. 2).

Во-первых, несмотря на присутствие в геномах обоих видов каждого из восьми изученных фрагментов ДНК (Грушко и др., 2004), один фрагмент (Atr2R-25b) не выявлен при *in situ*-гибридизации в составе хромосом *An. atroparvus*, а целый ряд фрагментов (Atr2R-46a, Atr2R-85a, Atr2R-90, Atr2R-118 и Atr2R-136) — в составе хромосом *An. messeae*, по-видимому из-за небольшого числа их копий либо из-за недостаточной представленности в политемной хромосоме. Таким образом, несмотря на консерватизм первичных последовательностей изученных повторов, число их копий и (или) их представленность в политемных хромосомах различны у видов *An. atroparvus* и *An. messeae*. Можно сделать вывод о том, что каждый район прицентромерного гетерохроматина как у *An. atroparvus*, так и у *An. messeae* обладает неповторимым сочетанием высокоповторенных последовательностей ДНК.

Во-вторых, фрагменты Atr2R-25a и Atr2R-73, которые гибридизовались на хромосомах обоих видов, все же оказались локализованными в разных районах прицентромерного гетерохроматина. У *An. messeae* фрагмент Atr2R-25a был локализован в диффузном прицентромерном гетерохроматине хромосомы 2 и в диффузном прицентромерном гетерохроматине правого плеча хромосомы 3, тогда как у *An. atroparvus* клон Atr2R-25a выявлен в блочном и в диффузном прицентромерном гетерохроматине хромосом X и 2. Клон Atr2R-73 был локализован в блоках прицентромерного гетерохроматина хромосом X, 2 и в блоках правого плеча хромосомы 3 у *An. messeae*. Однако у *An. atroparvus* клон Atr2R-73 обнаружен только в одном районе — в диффузном гетерохроматине хромосомы 2.

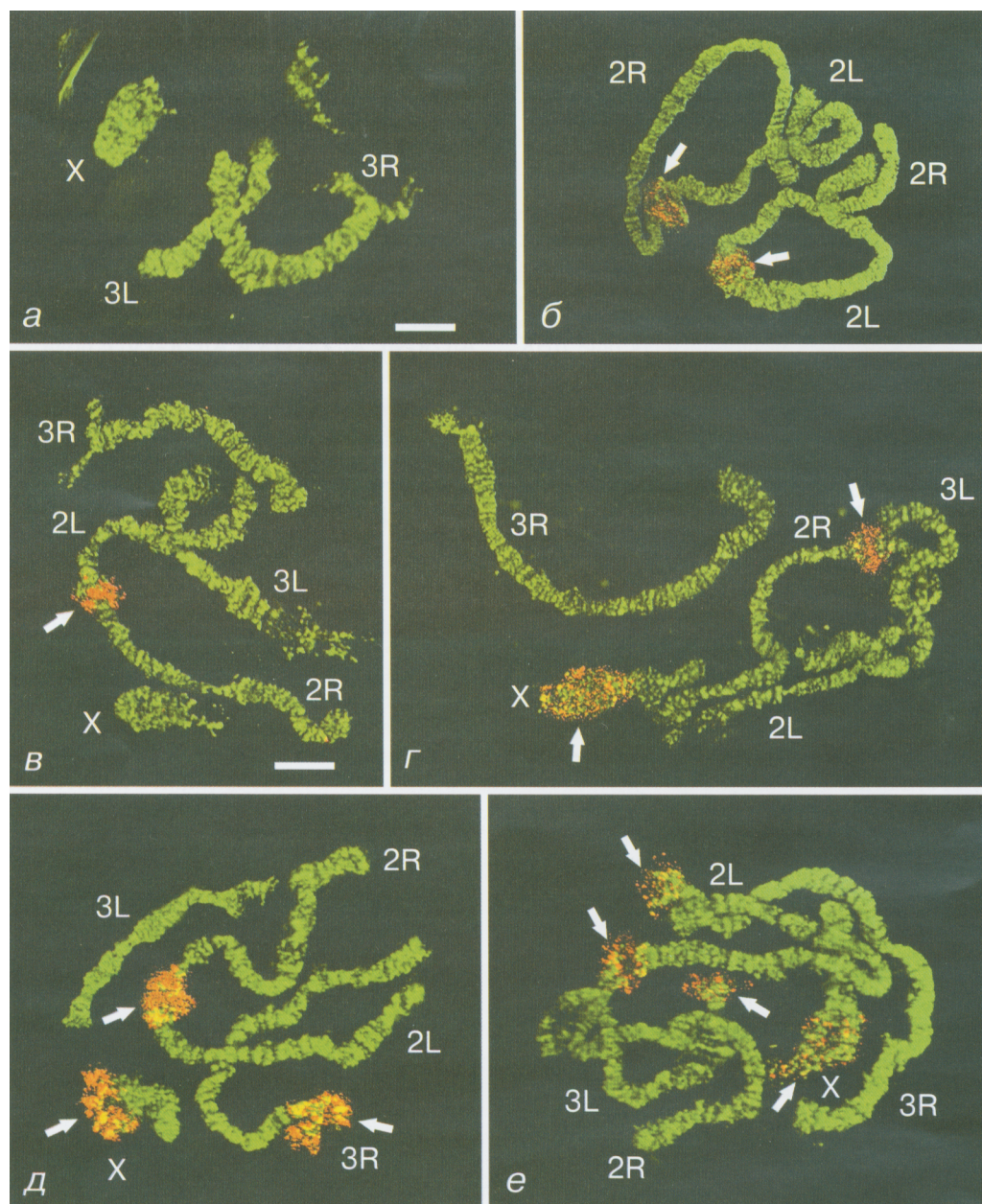


Рис. 1. Локализация повторенных последовательностей ДНК клонов Atr2R-85a, Atr2R-46a, Atr2R-90, Atr2R-118 и Atr2R-136 в районах прицентромерного гетерохроматина политенных хромосом *Anopheles atroparvus*.

a, б — клон Atr2R-85a; в — клон Atr2R-46a; г — клон Atr2R-90; д — клон Atr2R-118; е — клон Atr2R-136. Стрелки указывают на меченые районы хромосом. X, 2L, 2R, 3L и 3R — плечи хромосом. Шкала — 10 мкм.

Fig. 1. Localization of repetitive DNA sequences of clones Atr2R-85a, Atr2R-46a, Atr2R-90, Atr2R-118 and Atr2R-136 in regions of pericentromeric heterochromatin of polytene chromosomes of *Anopheles atroparvus*.

a, б — clone Atr2R-85a; в — clone Atr2R-46a; г — clone Atr2R-90; д — clone Atr2R-118; е — clone Atr2R-136. Arrows — labeled regions of chromosomes. X, 2L, 2R, 3L and 3R — chromosomal arms. Scale — 10 μ m.

Таким образом, в настоящем исследовании показано, что распределение консервативных повторенных последовательностей ДНК районспецифичной библиотеки прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 (клонов Atr2R-25a, Atr2R-25b, Atr2R-46a, Atr2R-73, Atr2R-85a, Atr2R-90, Atr2R-118 и Atr2R-136) у *An. atroparvus* и *An. messeae* неоднородно как между хромосомами, так и между видами. По всей вероятности, от сложившегося в каждом конкретном районе прицентромерного гетерохроматина сочетания повторов с различными

цитохимическими свойствами зависит его способность к формированию блочных или диффузных структур, а также к связыванию с оболочкой ядра. Как было показано ранее (Грушко и др., 2004), фрагменты ДНК районспецифичной библиотеки прицентромерного диффузного гетерохроматина хромосомы 2 *An. atroparvus* отличаются друг от друга по способности к связыванию с различными белковыми структурами ядра. Изученные фрагменты также отличаются друг от друга. Так, клоны Atr2R-25a и Atr2R-118 не обладают способностью к

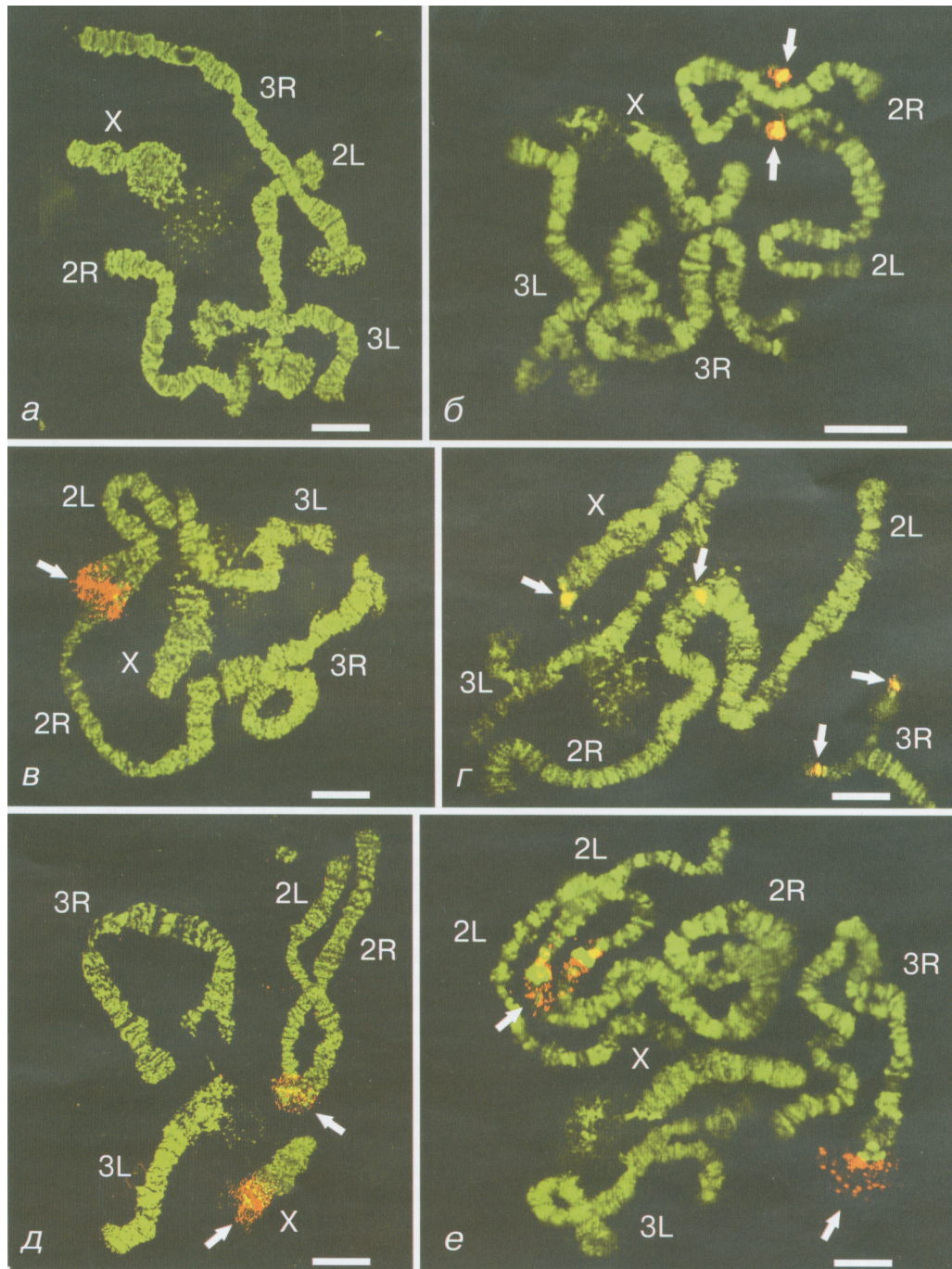


Рис. 2. Сравнение локализации консервативных повторенных последовательностей ДНК клонов Atr2R-25b, Atr2R-73 и Atr2R-25a в прицентромерном гетерохроматине политенных хромосом *Anopheles atroparvus* и *An. messeae*.

a — клон Atr2R-25b на хромосомах *An. atroparvus*; б — клон Atr2R-25b на хромосомах *An. messeae*; в — клон Atr2R-73 на хромосомах *An. atroparvus*; г — клон Atr2R-73 на хромосомах *An. messeae*; д — клон Atr2R-25a на хромосомах *An. atroparvus*; е — клон Atr2R-25a на хромосомах *An. messeae*. Стрелки указывают на меченые районы хромосом. X, 2L, 2R, 3L и 3R — плечи хромосом. Шкала — 10 мкм.

Fig. 2. Comparison of localization of conserved repetitive DNA sequences of clones Atr2R-25b, Atr2R-73 and Atr2R-25a in pericentromeric heterochromatin of polytene chromosomes of *Anopheles atroparvus* and *Anopheles messeae*.

a — clone Atr2R-25b on *An. atroparvus* chromosomes; б — clone Atr2R-25b on *An. messeae* chromosomes; в — clone Atr2R-73 on *An. atroparvus* chromosomes; г — clone Atr2R-73 on *An. messeae* chromosomes; д — clone Atr2R-25a on *An. atroparvus* chromosomes; е — clone Atr2R-25a on *An. messeae* chromosomes. Arrows — labeled regions of chromosomes. X, 2L, 2R and 3R — chromosomal arms. Scale — 10 μm.

взаимодействию с белковыми структурами ядра, тогда как клоны Atr2R-25b, Atr2R-90 и Atr2R-136 классифицированы как ДНК синаптонемного комплекса, а клоны Atr2R-46a, Atr2R-73 и Atr2R-85a — как ДНК ядерного матрикса (Грушко и др., 2004). На наш взгляд, выявленные различия между районами прицентромерного гетерохроматина в содержании консервативных повторенных последовательностей ДНК могут быть достаточным основанием для их разграничения по структуре и способности к прикреплению к ядерной оболочке.

По литературным данным, независимая амплификация одних и утрата других консервативных повторенных последовательностей ДНК, согласно гипотезе «библиотек» (Ugarkovic, Plohl, 2002), происходили в прицентромерном гетерохроматине в самых различных группах организмов: и у растений (King et al., 1995; Vershinin et al., 1996), и у животных — грызунов (Slamovits et al., 2001) и насекомых (Ross et al., 1997; Mestrovic et al., 1998). Среди различных эволюционных событий, происходящих с повторяющимися последовательностями ДНК, на наш взгляд, именно амплификации и делеции множеств повторов, согласно гипотезе «библиотек», ответственны за быстрые изменения состава прицентромерного гетерохроматина у малярийных комаров комплекса «*Anopheles maculipennis*».

Авторы выражают глубокую признательность проф. Н. Дж. Безански (N. J. Besansky; Center for Tropical Disease Research and Training, University of Notre Dame, США) за предоставление оборудования и реактивов, Э. М. Баричевой, Т. В. Карамышевой и А. И. Шевченко (Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск) за поддержку и участие в планировании экспериментов, а также Н. Н. Мельниковой (Научно-исследовательский институт биологии и биофизики при Томском государственном университете) за помощь в работе с лабораторной культурой *An. atroparvus*.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президента РФ для поддержки ведущих научных школ (НШ-15.2003.4), Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-48175) и Федеральной целевой программы «Интеграция» (Э0371 + Э0206).

Список литературы

Грушко О. Г., Шарахова М. В., Шевченко А. И., Карагодин Д. А., Карамышева Т. В., Рубцов Н. Б., Стегний В. Н. 2004. Характеристика и сравнительный анализ ДНК из прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *Anopheles atroparvus* V. Tiel (Culicidae, Diptera). Генетика. 40 (10) : 1085—1094.

Стегний В. Н. 1979. Реорганизация структуры интерфазных ядер в онто- и филогенезе малярийных комаров. ДАН СССР. 249 (5) : 1231—1234.

Стегний В. Н. 1987. Системная реорганизация архитектуры политемных хромосом в онто- и филогенезе малярийных комаров. Сообщение II. Видоспецифичность в характере взаимоотношений хромосом с ядерной оболочкой в питающих клетках яичников. Генетика. 23 (7) : 821—827.

Стегний В. Н. 1993. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция. Новосибирск: Изд-во Новосибирского ун-та. 110 с.

Стегний В. Н., Ананьина Т. В., Вассерлауф И. Г. 1996. Организация первичных политемных хромосом трофоцитов яичников у 12 видов группы virilis рода *Drosophila*. Генетика. 32 (6) : 750—754.

Стегний В. Н., Вассерлауф И. Э. 1994. Видовая архитектура хромосом генеративной ткани и проблемы филогенетических отношений в подгруппе melanogaster рода *Drosophila* (Sophophora). Генетика. 30 (4) : 478—483.

Чубарева Л. А., Петрова Н. А., Качворян Э. А. 2003. Морфологическое разнообразие центромерных районов политемных хромосом кровососущих мошек (Diptera, Simuliidae). Цитология. 45 (4) : 368—376.

Шарахова М. В., Стегний В. Н., Брагинцев О. П. 1997. Межвидовые различия в структуре прицентромерного гетерохроматина трофоцитов яичников и эволюция малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis*. Генетика. 33 (12) : 1640—1648.

King K., Jobst J., Hemleben V. 1995. Differential homogenization and amplification of two satellite DNAs in the genus Cucurbita (Cucurbitaceae). J. Mol. Evol. 41 : 996—1005.

Kumar V., Cornel A. J., Mukabayire O. 1997. In situ hybridization to *Anopheles* polytene chromosomes. In: Molecular biology of insect disease vectors: a methods manual. London: Chapman and Hall. 337—345.

Mestrovic N., Plohl M., Mravinac B., Ugarkovic D. 1998. Evolution of satellite DNAs from the genus Palorus — experimental evidence for the «library» hypothesis. Mol. Biol. Evol. 15 : 1062—1068.

Ross R., Hankeln T., Schmidt E. R. 1997. Complex evolution of tandem-repetitive DNA in the *Chironomus thummi* species group. J. Mol. Evol. : 321—326.

Slamovits C. H., Cook J. A., Lessa E. P., Rossi M. S. 2001. Recurrent amplifications and deletions of satellite DNA accompanied chromosomal diversification in South American tuco-tucos (genus Ctenomys, Rodentia: Octodontidae): a phylogenetic approach. Mol. Biol. Evol. 18 : 1708—1719.

Ugarkovic D., Plohl M. 2002. Variation in satellite DNA profiles — causes and effects. EMBO J. 21 : 5955—5959.

Vershinin A. V., Alkhimova E. G., Heslop-Harrison J. S. 1996. Molecular diversification of tandemly organized sequences and heterochromatic chromosome regions in some Triticeae species. Chromosome Res. 4 : 517—525.

Поступила 27 I 2005

PECULIARITIES OF REPETITIVE DNA LOCALIZATION IN PERICENTROMERIC HETEROCHROMATIN OF MALARIAL MOSQUITOES OF THE «ANOPHELES MACULIPENNIS» COMPLEX

© O. G. Grushko,¹ A. M. Rusakova,^{1, 2, *} M. V. Sharakhova,¹ I. V. Sharakhov,^{1, 2} V. N. Stegnyi^{1, 2}

¹ Research Institute of Biology and Biophysics, Tomsk State University, and ² Chair of Cytology and Genetics, Tomsk State University; * e-mail: gene@res.tsu.ru

Distribution of eight fragments of conserved repetitive DNA from pericentromeric heterochromatin of chromosome 2 of *Anopheles atroparvus* has been investigated by *in situ* hybridization on polytene chromosomes of *An. atroparvus* and *An. messeae*. We have shown that heterochromatic regions of all chromosomes both

in *An. atroparvus* and *An. messeae* vary in combinations of, at least, conserved repeats. Some repeats have been found only in pericentromeric heterochromatic regions of chromosomes 2 (clones Atr2R-46a, Atr2R-73, Atr2R-85a in *An. atroparvus* and Atr2R-25 in *An. messeae*). Others have been found in two (clones Atr2R-25a and Atr2R-90 in *An. atroparvus*, Atr2R-25a in *An. messeae*) and more (clones Atr2R-118, Atr2R-136 in *An. atroparvus*, Atr2R-73 in *An. messeae*) pericentromeric heterochromatic regions of chromosomes. DNA comparison of pericentromeric heterochromatic regions of chromosomes in species of the «*Anopheles maculipennis*» complex is species- and chromosome-specific, due, in particular, to different maintenance of conserved repeats.

Key words: polytene chromosomes, pericentromeric heterochromatin, conserved repetitive DNA, «*Anopheles maculipennis*» complex.
