

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МАКРО-, МИДИ- И МИКРОХРОСОМ В ТРАНСКРИПЦИОННО-АКТИВНЫХ ЯДРАХ РАСТУЩИХ ООЦИТОВ ПТИЦ ОТРЯДА GALLIFORMES

© А. В. Маслова, А. В. Красикова¹

Лаборатория структуры и функции хромосом С.-Петербургского государственного университета;

¹ электронный адрес: spbchromas@gmail.com

Трехмерная организация генома в пространстве клеточного ядра отражает особенности его функционирования и представляет собой один из уровней регуляции экспрессии генов. Это определяет необходимость детального изучения взаимосвязи пространственной организации и функционирования генетического аппарата в ядре клетки. В настоящей работе проведен детальный анализ трехмерной организации генома в растущих ооцитах птиц отряда Galliformes, гигантские транскрипционно-активные ядра которых в отличие от интерфазных ядер соматических клеток практически полным отсутствием структурных ограничений в деконденсации хромосом. Радиальное распределение трех дифференцированных по размеру и генной плотности групп хромосом в ядрах ооцитов домашней курицы и японского перепела было охарактеризовано с помощью методов конфокальной лазерной сканирующей микроскопии и анализа трехмерных реконструкций. Положение индивидуальной хромосомы относительно центра ядра оценивали по ее принадлежности к определенной радиальной зоне ядра и по расстоянию от центра ядра до терминальных районов и центра масс хромосомы. Установлено, что в растущих ооцитах птиц хромосомы расположены на значительном расстоянии от ядерной оболочки, причем обогащенные генами микрохромосомы не имеют предпочтительного положения ближе к центру ядра, а локализируются преимущественно на периферии области, занятой всеми хромосомами набора. Таким образом, радиальное распределение хромосом в ядрах ооцитов на стадии ламповых щеток не подчиняется характерной для интерфазных ядер соматических клеток закономерности, согласно которой богатые генами хромосомы локализируются в центральной части клеточного ядра, а обедненные генами — на его периферии. С помощью трехмерной визуализации хромосом типа ламповых щеток в интактном недеформированном ядре ооцита подтверждены существование сил отталкивания между латеральными петлями полубивалентов и отсутствие взаимодействий между участками гетерохроматина разных бивалентов на этой стадии оогенеза.

Ключевые слова: архитектура генома, domestцированные виды птиц, клеточное ядро, оогенез птиц, теломеры, транскрипция, трехмерная реконструкция, хромосомы типа ламповых щеток.

Принятые сокращения: КЛСМ — конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, ЛЩ — ламповые щетки, FISH — fluorescent *in situ* hybridization.

Архитектура ядра представляет собой один из уровней в иерархии механизмов регуляции функций генома (Van Driel et al., 2003; Razin, 2006; Razin et al., 2007). Распределение хромосом в пространстве клеточного ядра все чаще используется исследователями для характеристики связи между крупномасштабной структурой генома и особенностями его функционирования (Lanctôt et al., 2007; Mateos-Langerak et al., 2007).

Согласно общепринятой теории, в интерфазном ядре хромосомы занимают отдельные области, практически не перекрывающиеся между собой (Cremer et al., 2000; Albiuez et al., 2006). В соматических клетках близость хромосомы к центру ядра, как правило, коррелирует с количеством содержащихся в ней генов и их транскрипционной активностью. Обогащенные генами хромосомные территории обнаруживаются преимущественно в центральной зоне ядра, тогда как хромосомы с меньшим числом кодирующих последовательностей локализируются на его пери-

ферии (Croft et al., 1999; Boyle et al., 2001; Küpper et al., 2007); такое радиальное распределение хромосомных территорий в ядрах соматических клеток имеет эволюционно консервативный характер (Tanabe et al., 2002). Анализ трехмерного распределения хромосомных территорий в пролиферирующих и покоящихся фибробластах человека показал, что радиальное распределение хромосом также непосредственно зависит от их размера, а именно: в неделящихся фибробластах меньшие по размеру хромосомы независимо от плотности кодирующих последовательностей располагаются значительно ближе к центру ядра, чем большие хромосомы (Bolzer et al., 2005).

Вместе с тем хромосомные территории представляют собой динамичный ядерный компартмент. Так, положение хромосом относительно друг друга в популяции клеток одного типа значительно варьирует. Предполагается, что существующий в интерфазном ядре характерный «хромосомный ландшафт» устанавливается на ранних

стадиях фазы G₁ клеточного цикла и, вероятно, является отображением распределения хромосом в метафазе митоза (Sun et al., 2000; Habermann et al., 2001; Bolzer et al., 2005). Динамика проявляется также в изменении организации территорий хромосом, изменении положения хромосомных сегментов или отдельных локусов по отношению к видимой границе территории в ответ на различные внешние воздействия, при возникновении некоторых злобоявлений и в процессе дифференцировки клетки (Volpi et al., 2000; Mahy et al., 2002; Stadler et al., 2004).

Несмотря на многочисленные открытия в этой области, вопрос о взаимосвязи пространственного распределения хромосом и регуляции функций генома остается неизвестным. Основная сложность, с которой сталкиваются исследователи данной проблемы, состоит в недостатке экспериментальных средств манипулирования функциональной компартиментализацией ядра (Van Driel et al., 2003). Другое ограничение связано со сложностью определения структурно-функциональных взаимодействий внутри ядра, постулируемых моделью самоорганизации ядерных компартиментов (Misteli, 2007). В этом направлении весьма плодотворным представляется изучение ядер дифференцирующихся клеток. Клеточная дифференцировка сопровождается закономерным переключением экспрессии генов, что делает такие системы перспективным объектом для анализа регуляции функционирования генома на уровне изменений в его архитектуре (Bartova, Kozubek, 2006; Schofer, Weipoltshammer, 2008).

Хорошо известно, что гаметогенез сопровождается изменением пространственного распределения хромосом (Solovei et al., 1998; Foster et al., 2005). В недавнем исследовании сперматогенеза свиней было показано, что половые хромосомы меняли свое положение с периферического на внутреннее по мере превращения первичных сперматоцитов в сперматиды (Foster et al., 2005). Изучение распределения хромосом в ходе гаметогенеза является первым шагом к пониманию механизмов реорганизации и регуляции генома на ранних этапах развития эмбриона. Поэтому закономерности и механизм изменения топологии хромосом в период развития мейоцитов нуждаются в углубленном исследовании.

В настоящей работе в качестве модельной системы для анализа пространственной организации генома в половых клетках были выбраны растущие ооциты птиц (отряд Galliformes). Несомненные преимущества этой системы заключаются в следующем. Растущие ооциты птиц на диплотенной стадии профазы первого мейотического деления характеризуются высокой транскрипционной активностью (Gaginskaia et al., 2009). На этой стадии гомологичные хромосомы, формирующие биваленты, в ооцитах птиц имеют характерную форму ламповых щеток (ЛЩ). В среднем длина хромосом-ЛЩ увеличивается по сравнению с метафазными хромосомами в 30 раз (Хутинаева и др., 1989; Чельшева и др., 1990; Rodionov and Chechik, 2002; Saifitdinova et al., 2003; Derjusheva et al., 2003), а размер ядра ооцита (зародышевого пузырька) превышает размеры ядра соматической клетки в несколько десятков раз. В таких гигантских хромосомах многочисленные транскрипционные единицы локализуются на парных боковых петлях, достигающих в длину нескольких десятков микрон (Callan, 1986; Morgan, 2002; Gaginskaia et al., 2009). Исследование ЛЩ дает возможность увидеть более тонкие детали в организации хромосом благодаря их частично деконденсированному состоянию и вносит вклад в понимание структуры хроматина в

транскрипционно-активном ядре. Удобство данной модели для изучения архитектуры генома определяется также отсутствием в растущих ооцитах половозрелых птиц как хромосомных, так и амплифицированных экстрахромосомных ядрышек (Гагинская, Грузова, 1969, 1975).

Представители отряда Galliformes, такие как домашняя курица (*Gallus gallus domesticus*) и японский перепел (*Coturnix coturnix japonica*), занимают особое место в сельском хозяйстве и широко используются в качестве модельных организмов в исследованиях по биологии развития и вирусологии. Кариотипы этих видов птиц морфологически дифференцированы: хромосомный набор состоит из 6 пар макрохромосом, включая половые хромосомы Z и W, 5 пар мидихромосом и 28 пар микрохромосом (Burt, 2002). При этом, микрохромосомы обогащены GC-парами, содержат много CpG-островков, реплицируются в ранней S-фазе клеточного цикла и содержат большую часть генов. Так, рассчитано, что у домашней курицы, микрохромосомы, заключая в себе около 25 % генома, содержат более 45 % генов (Rodionov, 1996; Smith et al., 2000; Burt, 2002; ICGSC, 2004). Таким образом, этот объект чрезвычайно удобен для изучения особенностей распределения в ядре хромосом разных размеров, причем богатые генами хромосомы в кариотипе можно определять на морфологическом уровне.

В настоящей работе впервые проведен детальный анализ трехмерного распределения макро-, миди- и микрохромосом в ядре растущего ооцита на стадии ЛЩ у половозрелых самок домашней курицы и японского перепела.

Материалы и методы

Приготовление препаратов интактных ядер из растущих ооцитов птиц. Объектом исследования служили изолированные по стандартному протоколу (Solovei et al., 1993) ядра ооцитов домашней курицы *Gallus gallus domesticus* и японского перепела *Coturnix coturnix japonica* (2n = 78). Ооциты диаметром 0.5—1.5 мм помещали в среду «5 : 1 + фосфаты» (83.0 mM KCl, 17.0 mM NaCl, 6.5 mM Na₂HPO₄, 3.5 mM KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂ и 1 mM дитиотреитол), ядра выделяли с помощью тонких вольфрамовых игл под стереомикроскопом Leica MZ16. Изолированные и очищенные от желтка ядра окрашивали в течение 5 мин специфичным к нуклеиновым кислотам флуоресцентным красителем Sytox Green (Molecular Probes), который добавляли к среде «5 : 1 + фосфаты» в концентрации 0.07 мкМ (Krasikova et al., 2009). Затем интактные ядра микродозатором переносили в заполненную той же средой лунку, которая представляла собой камеру размером 18×18×2 мм с отверстием 6 мм в диаметре, приклеенную с помощью смеси парафина с вазелином (в соотношении 1:1) к стеклу 24×50××(0.16—0.19) мм, (Deckgläser, Menzel-glaser). Препараты окрашенных ядер (32 из ооцитов японского перепела, 28 из ооцитов домашней курицы) анализировали при помощи конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

Конфокальную лазерную сканирующую микроскопию (КЛСМ) проводили с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5, функционирующего на базе инвертированного микроскопа Leica DMI 6000 CS. Для сканирования объектов по осям XYZ использовали аргоновый лазер (496 нм), объектив HC PL APO 20× и программу LAS AF (Leica-Microsystems, Germany). Конфокальные изображения форматом 1024×1024

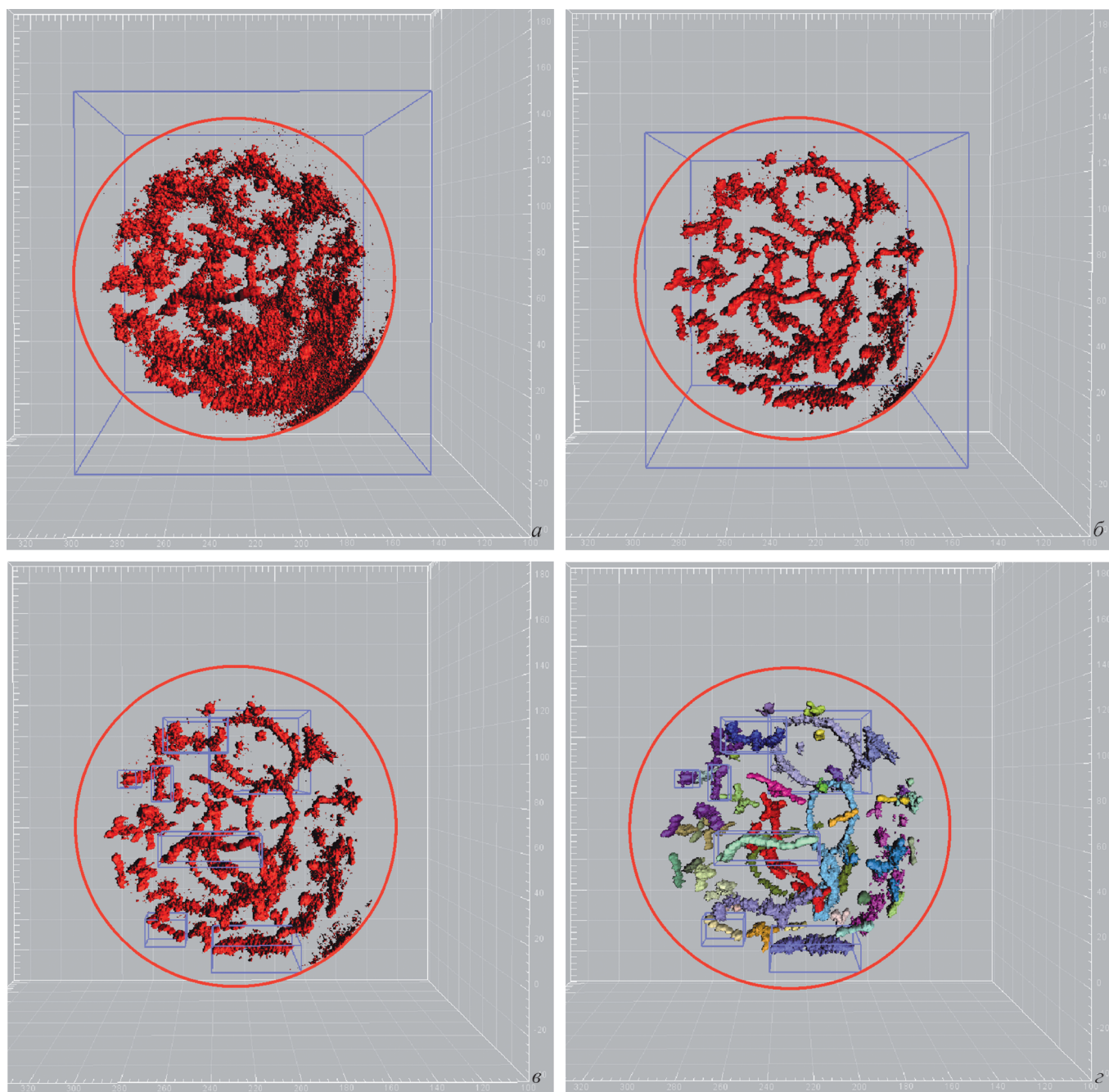


Рис. 1. Последовательные этапы 3D-реконструкции ядра ооцита японского перепела из серии оптических срезов, полученных с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

а — создание изоповерхности ядра с определенным уровнем флуоресцентного сигнала; *б* — эмпирический подбор значения нижнего порога интенсивности сигнала, при котором на изоповерхности ядра различимы отдельные биваленты; *в* — расщепление изоповерхности на отдельные объекты, соответствующие бивалентам; *г* — реконструкция ядра с 39 мейотическими бивалентами, которым присвоены индивидуальные псевдоцвета. Красными окружностями показаны контуры ядра, синими рамками обозначены примеры изоповерхностей.

пикселей получали при частоте сканирования 400—700 Гц с применением цифрового увеличения и программных средств подавления шумов; шаг по оси Z при получении серии оптических срезов ядер составлял 1.3—1.5 мкм. Общий вид ядра формировали из серии оптических срезов применением функции «Максимальная проекция» (Max projection) в программе LAS AF. С целью последующей обработки полученные данные конвертировали из формата *.lif в формат *.tiff.

Анализ положения хромосом относительно центра ядра. Для лучшей визуализации отдельных

хромосом внутри ядра использовали компьютерную обработку трехмерных изображений с помощью программ Imaris 5.0.1 (Bitplane, AG) и ImageJ. При необходимости улучшить качество изображения на 3D-реконструкции ядра применяли автоматические программные фильтры «Гауссово размытие» и «Удаление фона». Радиус области, занимаемой в ядре хромосомами, вычисляли по разности координат по оси Z первого (z_1) и последнего (z_2) срезов с детектируемым флуоресцентным сигналом от хромосом, а именно $R = \frac{(z_1 - z_2)}{2}$.

Использование программного модуля «Изоповерхности» (Isosurface), дающего возможность построения трехмерной поверхности по контуру объектов с определенной интенсивностью флуоресценции, позволило получить трехмерные графические реконструкции изоповерхностей ядер ооцитов (рис. 1, а, б). Путем изменения параметров порога интенсивности сигнала, используемого для построения изоповерхности, достигали такого результата, при котором в трехмерной изоповерхности ядра были различимы все хромосомы набора (рис. 1, б), при этом сигналы наименьшей интенсивности, соответствующие фоновой флуоресценции, отсекались. Применение инструмента «Расщепление» (Split) позволило разбить построенную общую изоповерхность на отдельные объекты, соответствующие индивидуальным бивалентам, что дало возможность их независимого морфометрического анализа (рис. 1, в).

Дифференциацию макро-, миди- и микробивалентов осуществляли визуально, в том числе и после задействования функции «Сортировка по размеру» (Sort). Использование функции «Цвет» (Color) позволило присвоить каждому из 39 бивалентов разные псевдоцвета (рис. 1, г). Координаты центра масс тела, ограниченного изоповерхностью, построенной вокруг бивалента, подсчитывали с помощью программы Imaris 5.0.1 (вкладка «Статистика»). Вычисление расстояния от центра ядра до центра масс объекта проводили по формуле $L = \sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2 + (z_1 - z_2)^2}$, где x_1, y_1 и z_1 — координаты центра ядра, а x_2, y_2 и z_2 — координаты центра масс объекта (Roberts et al., 2005).

Определение центра ядра является первоначальным этапом для проведения пространственных измерений. Поскольку ядро ооцита на стадии диплотены имеет сферическую форму, центральным срезом объекта признается тот, в котором ядро имеет максимальный диаметр. Для определения латеральных координат центра по контуру ядра на центральном по оси Z срезе описывали окружность и, применив автоматическое определение координат центра (в программе Corel Draw 12.0.0.458), ставили метку размером 2×2 пикселя. После импорта серии оптических срезов с «меченым» центральным срезом в программу Imaris получали действительные значения координат центра ядра x_1, y_1 и z_1 с учетом физических характеристик конфокальных изображений (действительно-го размера вокселя).

Деконволюцию конфокальных изображений проводили методом «слепой» 3D-деконволюции (используются адаптивные значения функции рассеяния точки (англ. — point spread function) и физические параметры получения данных, а именно: размеры вокселя, числовая апертура объектива, индекс преломления и максимум спектра испускания флуорохрома), с применением программ AutoDeblur v.9.3 и AutoVizualize v.9.3 (AutoQuant Imaging, Inc.).

Результаты

Пространственная организация хромосом типа ламповых щеток в интактных ядрах. Использование возможностей конфокальной микроскопии позволило подтвердить ряд высказывавшихся ранее предположений о функциональной организации генома на стадии ЛЩ и получить новые данные об архитектуре и компартиментализации зародышевых пузырьков у птиц.

Микрохирургически изолированные из растущих ооцитов домашней курицы и японского перепела ядра обрабатывали флуорохромом Sytox green и сканировали при помощи лазерного конфокального микроскопа. Полученные конфокальные изображения отчетливо демонстрируют отсутствие в зародышевом пузырьке связи хромосом с ядерной оболочкой (рис. 2, а, в). Хромосомы лежат в центре зародышевого пузырька и отделены от ядерной оболочки широкой зоной нуклеоплазмы (рис. 2, а, в). Теломерные районы хромосом-ЛЩ не ассоциированы с внутренней мембраной ядерной оболочки или ядерной ламиной. Анализ последовательных оптических срезов в сериях конфокальных изображений подтвердил также, что на стадии ЛЩ хромосомы курицы и японского перепела не имеют контакта друг с другом и хромосомные субдомены не образуют характерных для интерфазных ядер соматических клеток хромоцентров (рис. 2, а, в).

Описанный подход к анализу строения ЛЩ в ядре, сохранившем структурную целостность, дает возможность свести к минимуму различные артефакты, возникающие при микрохирургическом выделении хромосом типа ЛЩ из зародышевого пузырька. Это позволило нам впервые дать детальное описание хромосом-ЛЩ в интактном, недеформированном ядре. На трехмерных изображениях ЛЩ хорошо видно, что их латеральные петли направлены во все стороны от хромосомной оси и хромосомы действительно напоминают хозяйственные «ершики» (рис. 3, а). При этом, отталкиваясь друг от друга, латеральные петли хромосом придают бивалентам, имеющим две терминальные хиазмы, эллипсоидную или кольцевидную конфигурацию (рис. 3, в). В случае бивалентов с большим числом хиазм плоскости, проходящие через части гомологов, ограниченные соседними хиазмами бивалента, располагаются в пространстве ядра под углом друг к другу (рис. 3, а). Интересно отметить, что так называемые двойные петлевые мосты (англ. — double loop bridges), которые представляют собой участки сестринских хроматид, соответствующие несоединенным в основании боковым петлям (Morgan, 2002), хорошо видны в некоторых бивалентах внутри интактного ядра как петли, исходящие из одного хромомера и входящие в соседний хромомер (рис. 3, б, в).

Положение макро-, миди- и микрохромосом относительно центра ядра. Как правило, для характеристики пространственной локализации хромосомы в интерфазном ядре используются два показателя — радиальное положение хромосомной территории и положение данной хромосомы относительно других хромосом кариотипа. В рамках настоящего исследования было проанализировано радиальное распределение хромосом внутри зародышевых пузырьков, так как оно наиболее полно характеризует крупномасштабную архитектуру генома в ооците.

Очевидно, что наибольшую информативность дает сочетание нескольких методов анализа радиального распределения хромосом. После создания объемных реконструкций ядер и определения координат центра ядра пространственное распределение полного хромосомного набора в зародышевых пузырьках птиц оценивали тремя способами: 1) подсчетом количества макро-, миди- и микрохромосом в трех зонах, условно выделенных на 3D-реконструкциях ядер; 2) измерением расстояния от центра ядра до теломерных районов бивалентов с помощью инструмента «3D-микрометр» в режиме просмотра оптических срезов; 3) вычислением расстояния от центра ядра

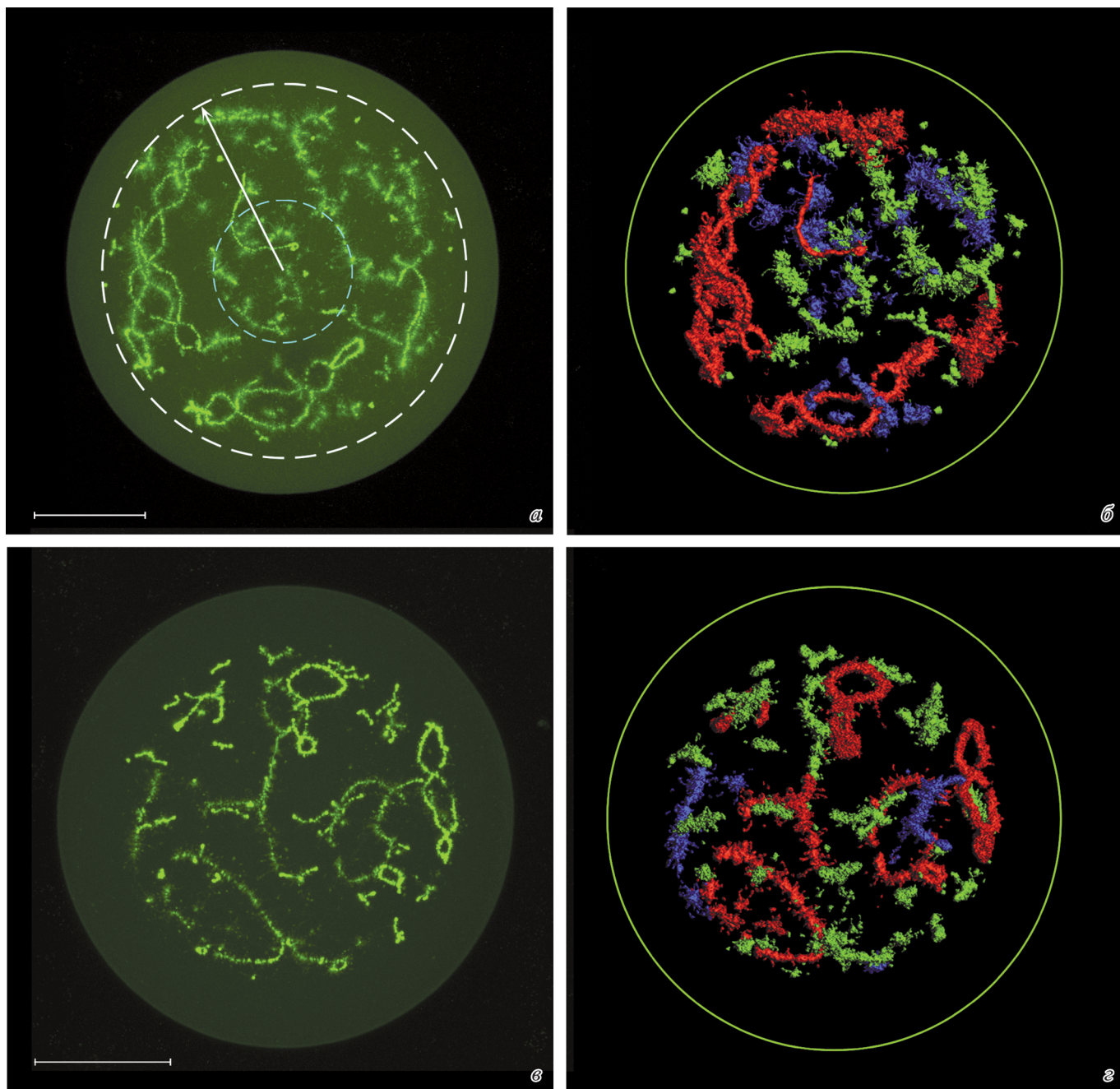


Рис. 2. XY-проекции ядер ооцитов домашней курицы (а, б) и японского перепела (в, г).

а, в — максимальные проекции ядер ооцитов курицы (а) и перепела (в), окрашенных НК-специфичным красителем Sytox Green; зелеными окружностями показаны контуры ядер, штриховыми линиями — границы зон, в которых проводился подсчет хромосом; б, г — проекции 3D-реконструкций тех же ядер с присвоением изоповерхностям макро-, миди- и микрохромосом красного, синего и зеленого псевдоцветов соответственно. Масштабные отрезки — 50 мкм.

до центра масс тела, ограниченного изоповерхностью, построенной вокруг индивидуального бивалента. Результаты применения каждого из этих подходов представлены ниже.

Подсчет бивалентов разных морфологических групп в трех зонах, визуально выделенных на 3D-реконструкциях ядер. В интерфазных ядрах положение занимающих значительный объем и тесно контактирующих друг с другом хромосомных территорий с трудом поддается оценке без привлечения специальных методов идентификации хромосом. Напротив, первичный анализ радиального распределения четко различимых и обособленных друг от друга гигантских

хромосом типа ЛЩ возможен путем визуального анализа объемных реконструкций ядер. Найденное ранее соответствие между митотическими хромосомами и мейотическими бивалентами курицы (Derjusheva et al., 2003; Krasikova et al., 2006), а также построенные цитологические карты макрохромосом-ЛЩ курицы и перепела (Schmid et al., 2005; Galkina et al., 2006) делают возможной идентификацию некоторых хромосом-ЛЩ этих видов и без использования трудоемкой процедуры хромосомспецифичной флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

Общее число бивалентов в ядре ооцита как у курицы, так и у перепела составляет 38 аутомсомных бивалентов и

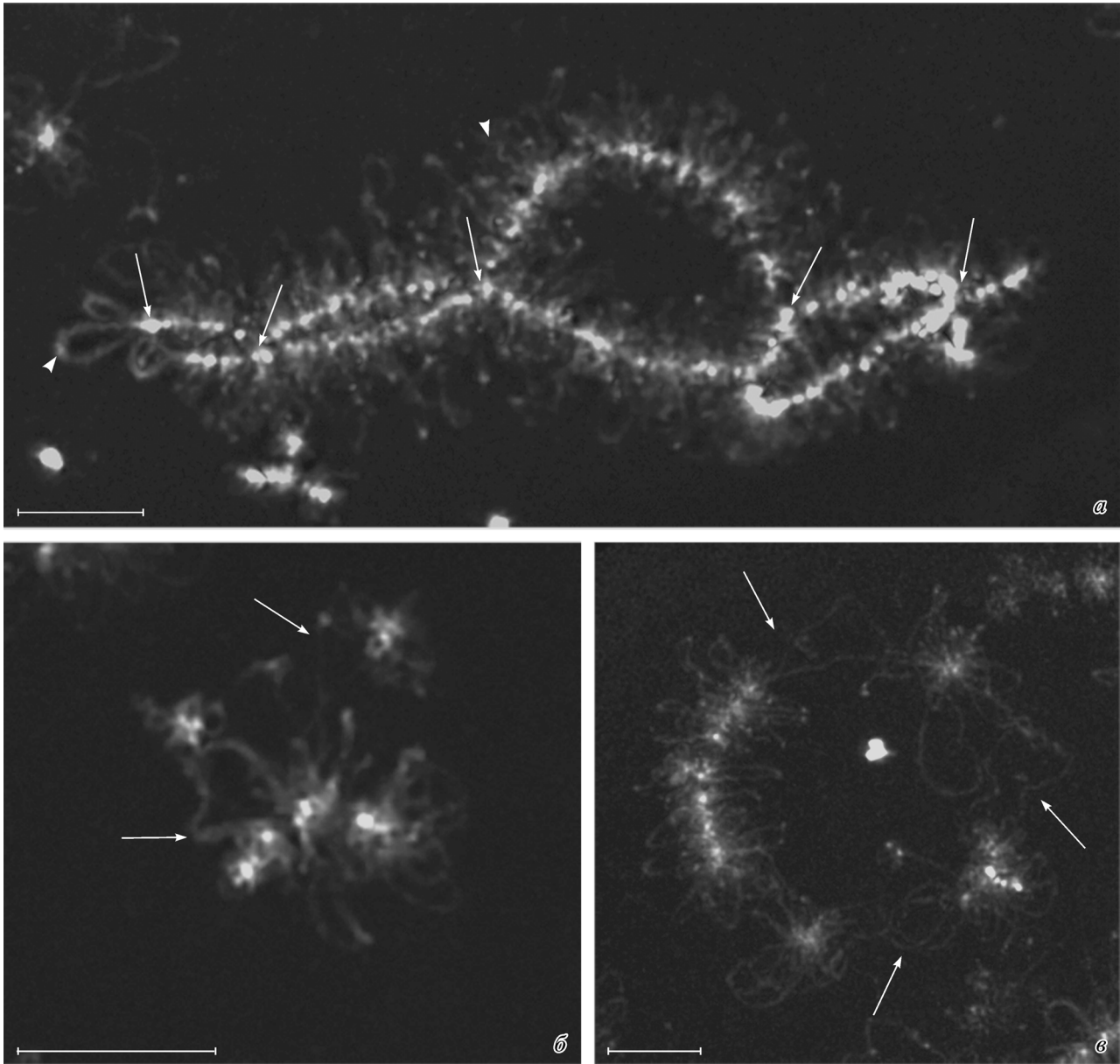


Рис. 3. Хромосомы типа ламповых щеток домашней курицы в интактном ядре.

a — бивалент 3 курицы, максимальная XY-проекция 72 оптических срезов после деконволюции сигнала; *стрелками* показаны хиазмы; *головки стрелок* указывают на некоторые боковые петли; *б, в* — двухнитевые петлевые мосты (*стрелки*) в хромосомах типа ламповых щеток курицы; *б* — микрохромосома, максимальная проекция 22 оптических срезов после деконволюции сигнала; *в* — миди-хромосома, максимальная проекция 54 оптических срезов после деконволюции сигнала. *Масштабные отрезки* — 10 мкм.

1 половой бивалент (ZW). В большинстве случаев макро-, миди- и микробиваленты отличали друг от друга по размеру. Помимо этого, высокий уровень разрешения конфокальных изображений ядер позволил при делении хромосом на группы идентифицировать отдельные макро- и миди-хромосомы по характерному для каждой из них уникальному хромомерно-петлевому рисунку и маркерным структурам (рис. 3). Примеры 3D-реконструкций ядер ооцитов домашней курицы и японского перепела с присвоением макро-, миди- и микрохромосомам красного, синего и зеленого псевдоцветов соответственно приведены на рис. 2, *б, г*.

Для визуального анализа распределения хромосом в зародышевых пузырьках курицы и японского перепела на 3D-реконструкциях оптических срезов ядер были выделе-

ны 3 зоны: центральная (область, ограниченная сферой радиуса, равной 1/3 радиуса ядра), периферическая (область под ядерной оболочкой, которая представляет собой полую сферу с внешним радиусом, равным радиусу ядра, и внутренним радиусом, равным радиусу области, в которой детектируются флуоресцирующие объекты, т. е. хромосомы) и промежуточная (область между центральной и периферической зонами). Схематическое соотношение зон показано на максимальной XY-проекции зародышевого пузырька курицы (рис. 2, *а*). Для каждого бивалента определяли его принадлежность к той или иной из выделенных зон.

Поскольку хромосомы-ЛПЦ не контактируют с ядерной оболочкой, периферическая зона ядра ооцита на стадии ЛПЦ представляет собой область нуклеоплазмы, сво-

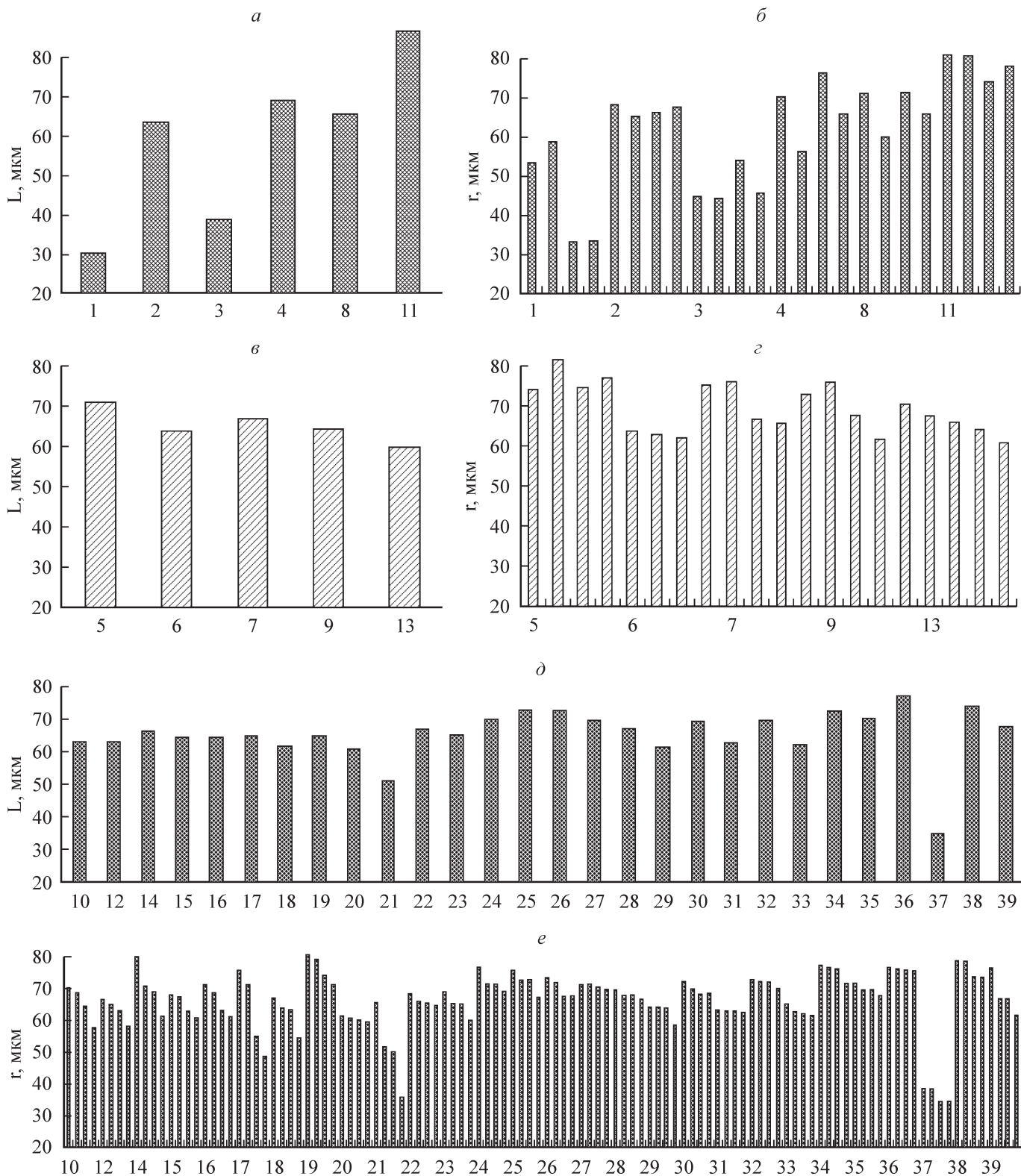


Рис. 4. Радиальное распределение хромосом в ядре ооцита японского перепела.

а, в, д — гистограммы положения центров масс тел, ограниченных изоповерхностями, представляющими собой макро-, миди- и микрохромосомы соответственно; *б, г, е* — гистограммы положения терминальных районов макро-, миди- и микрохромосом соответственно; по горизонтали приведены номера изоповерхностей мейотических бивалентов, присвоенные при программной трехмерной реконструкции ядра (от 1 до 39); по вертикали приведены расстояния от центра ядра до центра масс тела, ограниченного изоповерхностью (L), и терминальных районов (r) бивалента. Общий вид 3D-реконструкции этого ядра из ооцита перепела приведен на рис. 1, г. Радиус ядра — 86 мкм.

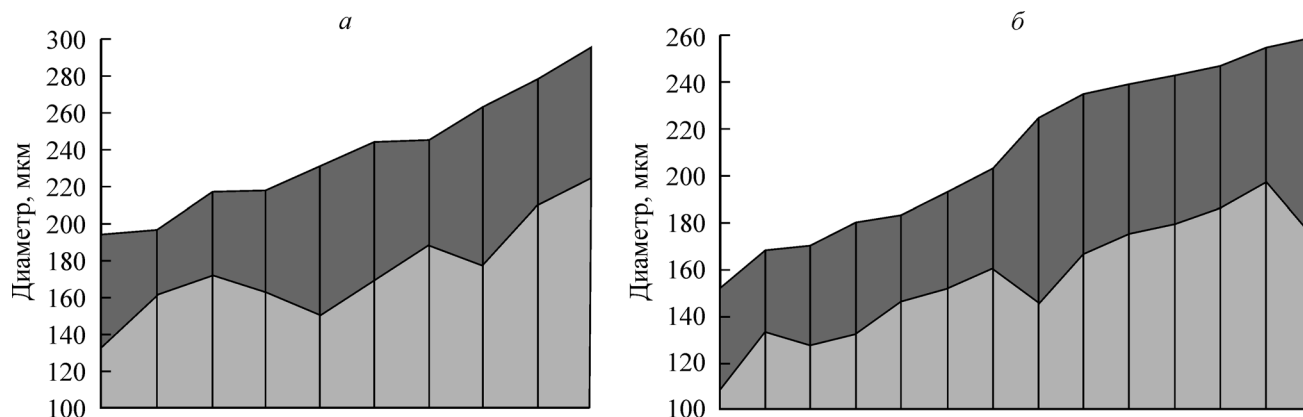


Рис. 5. Соотношение диаметров ядра ооцита и области, занимаемой хромосомами, на стадии ламповых щеток у домашней курицы (а) и японского перепела (б).

а — графики построены на основании измерений параметров 10 изолированных ядер; верхняя граница темной области представляет собой график зависимости диаметра ядра от стадии роста ооцита, верхняя граница светлой области представляет собой график зависимости диаметра занимаемой хромосомами части тех же ядер от стадии роста ооцита.

бодной от хромосом (рис. 2, а, в). В целом на стадии роста ооцита, когда на латеральных петлях ЛЩ происходит активная транскрипция, а хромосомы занимают большую часть объема ядра, диаметр занимаемой ими области линейно возрастает пропорционально увеличению диаметра ядра (рис. 5). При этом общий характер распределения хромосом-ЛЩ внутри занимаемой ими области ядра существенных изменений в этот период не претерпевает.

В ооците хромосомы-ЛЩ занимают центральную и промежуточную зоны ядра, но распределены в них неравномерно. Подсчет макро-, миди- и микрохромосом в этих двух условно выделенных зонах показал, что как у курицы, так и у перепела в зародышевых пузырьках большинство микробивалентов (как правило, более 20) локализуется вблизи внешней границы промежуточной зоны. В центральной зоне количество микрохромосом, как правило, варьировало от 1 до 7, в некоторых случаях эта зона была вообще свободна от хромосом. Макро- и миди-хромосомы, общее число которых в кариотипах обоих видов птиц приблизительно в 3 раза меньше, чем число микрохромосом, распределялись между выделенными зонами ядра также неравномерно: крупные биваленты могли находиться как в промежуточной, так и в центральной зонах ядра, но в центральной зоне — значительно реже (рис. 2).

Анализ радиального распределения терминальных хромомеров хромосом. Визуальная оценка характера распределения в ядре бивалентов разных групп имеет свои недостатки. Например, размер некоторых макробивалентов сопоставим с радиусом области ядра, занимаемой хромосомами, поэтому когда бивалент расположен под углом к сферической поверхности, бывает трудно однозначно определить его принадлежность к той или иной зоне и в таких случаях приходится руководствоваться дополнительными, как правило субъективными, критериями.

Для более точной оценки характера распределения хромосом в ядрах ооцитов птиц был проведен анализ радиального положения теломерных районов хромосом в зародышевых пузырьках самок перепела, ЛЩ которых характеризуются отсутствием крупных терминальных петель. Расстояние измеряли от маркированного нами центра ядра до оптического среза, в котором интенсивность

флуоресценции терминального хромомера хромосомы была максимальной. Следует отметить, что терминальные хромомеры гомологов в каждом биваленте, как правило, хорошо различимы. Однако при наличии терминальных хиазм, когда концевые хромомеры гомологичных хромосом неразличимы, локализованные терминальные хромомеры рассматривали как один объект. Гистограммы распределения терминальных районов макро-, миди- и микрохромосом в ядре одного из ооцитов перепела приведены на рис. 4, б, г, е.

Для сравнения данных, полученных для ядер разного размера, и стандартизации условий измерений мы рассчитывали отношение расстояния от центра ядра до концевого хромомера к радиусу области ядра, занимаемой хромосомами (R) (рис. 2, а). Необходимость введения относительных величин определяется тем, что в ооцитах стадии ЛЩ отношение радиуса области, занимаемой хромосомами, к радиусу ядра несколько варьирует: от 0.65 до 0.82 у домашней курицы (среднее 0.73 ± 0.05) и от 0.65 до 0.80 у японского перепела (среднее 0.74 ± 0.05) (рассчитано из данных, представленных на рис. 5).

Было установлено, что большая часть концевых хромомеров хромосом локализуется в объеме ядра от 0.8R до 1R, т. е. в промежуточной зоне и на ее внешней границе. В этой области сосредоточено от 56.5 до 72.7 % терминальных хромомеров макробивалентов, от 78.9 до 85 % терминальных хромомеров мидибивалентов и от 78.0 до 82.6 % терминальных хромомеров микробивалентов. В целом характер распределения теломерных районов хромосом разного размера в разных радиальных зонах зародышевых пузырьков соответствует характеру распределения бивалентов при их визуальном подсчете на 3D-реконструкциях.

Несмотря на то что преимущества использования точных измерений координат теломерных районов хромосом очевидны, радиальное положение хромосомы необходимо оценивать не только на основе установленного положения в пространстве некоторых ее отдельных сегментов, но и с учетом положения остальных участков хромосомы. Использование еще одного подхода к определению пространственного положения объекта в ядре помогает решить эту задачу.

Анализ радиального распределения центров масс бивалентов. Основу метода составляет

построение компьютерных 3D-реконструкций и изоповерхностей содержимого ядер, и последующее разбиение этих изоповерхностей на отдельные объекты, соответствующие бивалентам (см. Материалы и методы) (рис. 1). Контур изоповерхностей для всех бивалентов определяет выбранный порог уровня интенсивности флуоресцентного сигнала (рис. 1, а, б). Пространственные координаты центра масс плотного тела, ограниченного изоповерхностью, построенной вокруг бивалента, зависят от формы этого объекта (Roberts et al., 2005). Пример гистограмм радиального распределения центров масс макро-, миди- и микробивалентов относительно установленного центра ядра приведен для того же зародышевого пузырька перепела (рис. 4, а, в, д), что и в случае анализа распределения терминальных хромомеров хромосом (рис. 4, б, г, е). Профили гистограмм радиального положения теломерных районов хромосом и центров масс тел, ограниченных изоповерхностью, для одного и того же зародышевого пузырька практически идентичны. В общем случае, у бивалентов с более периферическим положением центра масс одна или обе пары терминальных хромомеров также расположены ближе к периферии ядра. При этом, одна пара терминальных хромомеров бивалента чаще находится на том же расстоянии от центра, что и вторая пара его терминальных хромомеров (рис. 4, б, г, е); лишь у некоторых отдельных бивалентов терминальные хромомеры могут располагаться в разных радиальных зонах ядра (например, бивалент с номером изоповерхности 1 на рис. 4, б).

Установлено, что центры масс объектов, соответствующих практически всем макробивалентам (5.5 ± 0.6 из 6), включая половые хромосомы, и практически всем мидибивалентам (4.5 ± 0.6 из 5), находятся в области ядра от $0.4R$ до $1R$. Центры масс тел, ограниченных изоповерхностями, построенными вокруг микробивалентов, локализируются главным образом в области ядра от $0.8R$ до $1R$, на которую приходится в среднем 24.7 ± 2.2 центров масс микробивалентов. Ближе к центру ядра, в области, занимающей объем от $0.4R$ до $0.8R$, микробиваленты встречаются реже (в среднем 4.2 ± 1.6 микробивалента). В центральной части ядра, ограниченной $0.1R$ — $0.4R$, локализуется наименьшее число макро-, миди- и микрохромосом; в проанализированных ядрах общее число центров масс бивалентов в этой области варьирует от 0 до 2.

Рассматривая в целом данные о радиальном распределении ЛЩ разного размера в зародышевых пузырьках из ооцитов домашней курицы и японского перепела, полученные с помощью трех разных способов оценки положения отдельного бивалента относительно центра ядра, можно сделать вывод о существовании общего принципа пространственной организации хромосом в ооцитах птиц. В транскрипционно-активных ооцитах птиц хромосомы расположены в определенной области ядра на значительном расстоянии от ядерной оболочки, причем обогащенные генами микрохромосомы не имеют предпочтительно положения ближе к центру ядра, а локализируются преимущественно на периферии области, занятой всеми хромосомами набора. С другой стороны, макро- и миди-хромосомы, часто обнаруживаемые в промежуточной зоне ядра ооцита, также могут находиться и в центральной его части.

Обсуждение

Хромосомы типа ЛЩ из ооцитов амфибий и птиц представляют собой объект классических цитологических, молекулярных и цитогенетических исследований (Morgan, 2002; Gaginskaya et al., 2009). Большинство исследований проводится на ЛЩ, изолированных из ядер ооцитов, после диспергирования и фиксации их на стеклах (Morgan, 2008; Gall, Wu, 2010). В настоящей работе, используя возможности КЛСМ и цифровой обработки серий оптических срезов окрашенных ядер (Ronneberger et al, 2008), мы впервые получили трехмерные изображения отдельных ЛЩ птиц в интактном ядре, т. е. в их естественном микроокружении. Это позволило наиболее полно охарактеризовать особенности их пространственной морфологии, в частности однозначно продемонстрировать существование в хромосомах-ЛЩ так называемых двойных петлевых мостов.

Первоначально двойные петлевые мосты были обнаружены на ЛЩ амфибий и считались артефактом механического растяжения хромосом в результате манипуляций с ядерной оболочкой и содержимым ядра. Так, в экспериментах по вытягиванию хромосом наблюдали искусственное формирование двойных мостов, что сыграло немаловажную роль в понимании деталей строения и структурной целостности мейотических полубивалентов (Callan, 1986; Morgan, 2002). Однако наряду с описанием механически образованных двойных мостов были получены свидетельства в пользу существования в ЛЩ «естественных» двойных мостов, например на ЛЩ гребенчатого тритона *Triturus cristatus cristatus* в районе особых маркерных структур — гигантских слившихся петель (Callan, 1986). По мнению автора, в гигантских слившихся петлях гребенчатого тритона накапливается глыбчатый матрикс с упругой структурой, который, вероятно, мешает объединению хроматина в основании этой сложной петли.

Мы обнаружили, что в интактных недеформированных ядрах ооцитов птиц двойные мосты на хромосомах-ЛЩ присутствуют и в районах простых латеральных петель. Такие двойные петлевые мосты чаще всего формируются в определенных районах ЛЩ птиц, например на препаратах изолированных ЛЩ курицы их часто наблюдали в середине длинного плеча хромосомы 4 (Челышева и др., 1990; Schmid et al., 2005). Недавно была высказана гипотеза, предполагающая, что появление двухнитевых мостов в ЛЩ связано с особенностями распределения в осях хромосом белков группы SMC (structural maintenance of chromosomes), входящих в состав комплексов конденсин и когезин и участвующих в организации хроматина в хромомере (Krasikova et al, 2005; Gaginskaya et al., 2009).

Некоторые особенности пространственной морфологии ЛЩ в зародышевых пузырьках могут быть объяснены с позиции полимерной модели мейотических хромосом (Marko, Siggia, 1997). Эта модель рассматривает физические свойства хромосом типа ЛЩ, в общем виде представленными центральной осью полимера, с которой связаны относительно короткие полимерные нити. Основываясь на результатах моделирования структуры ЛЩ с учетом жесткости, радиуса и аксиального напряжения между щетками при различных экспериментальных параметрах, авторы предсказали, что «хроматиновое давление», т. е. силы отталкивания, возникающие между латеральными петлями (щетинками) полубивалентов, будет придавать овальную форму участкам бивалента между

соседними хиазмами, а также направлять плоскости этих участков взаимоперпендикулярно, так чтобы петли перекрывались минимально (Marko, Siggia, 1997). Именно такие особенности пространственной организации бивалентов на стадии ЛЩ мы действительно наблюдали в изолированных ядрах ооцитов птиц. Предложенная полимерная модель не дает сведений о величине сил, действующих между целыми бивалентами (Marko, Siggia, 1997). Однако, наблюдаемый факт, что все хромосомы-ЛЩ в ядре ооцита расположены в нуклеоплазме таким образом, чтобы минимально взаимодействовать друг с другом, позволяет, по аналогии, говорить о существовании сил отталкивания между целыми бивалентами. Именно поэтому центральная зона ядра в ооцитах исследованных видов птиц, как правило, содержит минимальное число бивалентов.

Область ядра ооцита, занятую хромосомой вместе с ее боковыми петлями, можно определить как хромосомную территорию ЛЩ. Гипотетически в интерфазном ядре тонкая структура хромосомной территории представлена компактными доменами хроматина, содержащими около 1 млн п. н. (Stadler et al., 2004; Albiez et al., 2006; Cremer et al., 2006). При этом, транскрипционно-активный хроматин, имеющий, как полагают, вид вытянутых петель, располагается на «поверхности» компактных доменов размером порядка 1 млн п. н., в местах контакта хроматина с интерхроматиновым пространством ядра. Размер и оцениваемое количество ДНК в структурных доменах хромосомных территорий сопоставимы с размерами хромомеров хромосом-ЛЩ. Так, среднее количество ДНК, приходящееся на один хромомер в макрохромосомах-ЛЩ домашней курицы составляет 1.5—2.0 млн п. н. (Galkina et al., 2006). В связи с возможным тождеством хромомеров ЛЩ и доменов размером 1 млн п. н. в хромосомных территориях кажется перспективным распространить хромомерно-петлевую модель организации хромосомы на стадии ЛЩ на интерфазные хромосомы. В случае ЛЩ выраженная хромомерно-петлевая морфология хромосомы, по-видимому, определяется значительно большими размерами транскрипционных единиц (Morgan, 2002; Gaginska et al., 2009).

В представленной работе, используя несколько количественных подходов к оценке положения хромосомы относительно центра ядра, мы охарактеризовали радиальную организацию генома в ядрах ооцитов домашней курицы и японского перепела в период наиболее высокой транскрипционной активности (на стадии большого роста ооцита). Сравнение данных, полученных в результате анализа распределения теломерных районов, центров масс и целых бивалентов в объеме ядра, свидетельствует в пользу неупорядоченного радиального распределения макро-, миди- и микрохромосом внутри занятой хромосомами области зародышевых пузырьков домашней курицы и японского перепела. Недифференцированное положение обедненных генами макрохромосом и обогащенных генами микрохромосом отличается от упорядоченного радиального распределения хромосомных территорий в интерфазных ядрах соматических клеток. Так, показано, что в ядрах нейронов и пролиферирующих фибробластов курицы группа из 19 микрохромосом занимает центральную часть ядра, в то время как территории крупных (хромосомы 1—5 и Z) и средних (хромосомы 6—10) хромосом, содержащих меньшее число генов, наоборот, располагаются преимущественно на его периферии (Habermann et al., 2001). Установлено также, что как и у млекопитаю-

щих, у курицы в ядрах соматических клеток рано реплицирующиеся сегменты хромосом имеют тенденцию располагаться во внутренних частях ядра, а поздно реплицирующиеся районы чаще связаны с периферией. Некоторые сведения подтверждают эволюционный консерватизм распределения хромосомных территорий у новонебных птиц в зависимости от размера хромосом (Skinner et al., 2009) и содержания в них GC-пар (Federico et al., 2005). Поскольку домашняя курица и японский перепел характеризуются большим сходством кариотипов, можно ожидать, что в интерфазных ядрах перепела распределение макро-, миди- и микрохромосом будет таким же, как и в интерфазных ядрах курицы.

В рамках обсуждаемой проблемы интересно отметить, что в компьютерной модели, симулирующей статистическое распределение хромосомных территорий курицы в эллиптическом ядре, характерном для фибробластов, наблюдалось обратное распределение хромосомных территорий — с большинством микрохромосом на периферии ядра (Habermann et al., 2001). В полном соответствии с этой моделью, учитывающей только геометрические ограничения, мы наблюдали аналогичный смоделированному вид распределения микрохромосом в зародышевых пузырьках курицы.

Пространственная организация генома в интерфазном ядре на уровне хромосомных территорий и их отдельных доменов подчиняется общему для клеточного ядра принципу функциональной компартиментализации (Sadoni et al., 1999; O'Brien et al., 2003). В соответствии с моделью самоорганизации, ядерные компартменты представляют собой высокодинамичные функциональные ансамбли, сборка которых определяется основными внутриядерными процессами и в которых создается необходимое микроокружение для усиления, синхронизации и регуляции выполняемых ими функций. Переосмысление связи между структурой и функцией клеточного ядра в рамках этой модели приводит к представлению о том, что установление стационарного трехмерного состояния генома происходит под влиянием множества факторов, в том числе постоянного взаимодействия геномной ДНК с молекулами нуклеоплазмы, самоорганизации и разборки ядерных доменов, их функционального взаимодействия друг с другом и мобильности внутриядерных структур (O'Brien et al., 2003; Misteli, 2007). Сложное взаимодействие этого множества факторов определяет положение хромосомной территории в ядре, вместе с тем радиальная организация генома сама по себе не несет функциональной нагрузки (van Driel et al., 2003; Fedorova, Zink, 2008).

Превителлогенный ооцит является примером терминально-дефференцированной, высокоспециализированной клетки. Особенность функционирования генома на данном этапе оогенеза состоит в его высоком транскрипционном статусе. Выявленное нами неупорядоченное, случайное радиальное распределение хромосом-ЛЩ в таком транскрипционно-активном ядре, вероятно, является прямым следствием отсутствия ряда структурных ограничений, определяющих закономерную организацию хромосомных территорий в интерфазном ядре.

Так, для ядер ооцитов стадии ЛЩ характерно как полное отсутствие связи хромосом с периферией ядра, так и отсутствие хромоцентров, объединяющих гетерохроматиновые районы негомологичных хромосом. В том числе поэтому ближайшие «соседи» отдельно взятого бивалента подбираются случайным образом. Напротив, в интерфазных ядрах связь хромосом с ядерной ламинной и друг с

другом прежде всего обеспечивается районами конститутивного гетерохроматина, которые в совокупности создают репрессивный ядерный компартмент. Важно подчеркнуть, что на стадии ЛЩ формирующие гетерохроматиновые районы хромосом сателлитные последовательности ДНК демонстрируют высокий уровень транскрипционной активности. Так, значительную долю транскрибирующихся на ЛЩ птиц последовательностей ДНК составляют прицентромерные, субтеломерные и интерсперсные тандемные повторы и некодирующие спейсеры, хотя транскрипция кодирующих последовательностей также обнаружена (Gaginskaya et al., 2009). Длина и плотность транскрипционных единиц даже несколько выше у обедненных генами макрохромосом-ЛЩ, чем у содержащих большее число генов микрохромосом-ЛЩ. Исключение составляет половая хромосома W, которая и в ядре ооцита сохраняет относительно конденсированное состояние (Solovei et al., 1993).

Определенную роль в наблюдаемом случайном распределении хромосом также, безусловно, играют гигантский размер зародышевого пузырька и объем свободной нуклеоплазмы, в которой обладающие хромомерно-петлевой морфологией ЛЩ принимают наиболее выгодную пространственную конформацию, сводящую к минимуму взаимодействие соседних бивалентов и их латеральных петель. Подобная уникальная архитектура ядра ооцита у некоторых видов животных может иметь функциональное значение как для созревания яйца, так и при последующем его оплодотворении и формировании зиготы.

Работа выполнена при поддержке совета по грантам президента РФ (№ МК-1677.2009.4), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (ГК № П1367 от 2 сентября 2009 г. и ГК № 14.740.11.0737 от 12 октября 2010 г.), Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 08-04-90733-моб_ст), Комитета по науке и высшей школе г. Санкт-Петербурга и при технической поддержке ЦКП «ХРОМАС» С.-Петербургского государственного университета.

Список литературы

- Гагинская Е., Грузова М. 1969. Особенности оогенеза яблони. Цитология. 11 (10) : 1241—1251.
- Гагинская Е., Грузова М. 1975. Выявление амплифицированной рДНК в клетках яичников некоторых насекомых и птиц методом гибридизации нуклеиновых кислот на препаратах. Цитология. 17 (10) : 1132—1137.
- Хутинаева М. А., Кропотова Е. В., Гачинская Е. Р. 1989. Особенности морфофункциональной организации хромосом типа ламповых щеток из ооцитов сизого голубя. Цитология. 31 (10) : 1185—1192.
- Чельшева Л. А., Соловей И. В., Родионов А. В., Яковлев А. Ф., Гагинская Е. Р. 1990. Хромосомы-ламповые щетки курицы. Цитологические карты макробивалентов. Цитология. 32 (4) : 303—316.
- Albiez H., Cremer M., Tiberi C., Vecchio L., Schermelleh L., Dittrich S., Kupper K., Joffe B., Thormeyer T., von Hase J., Yang S., Rohr K., Leonhardt H., Solovei I., Cremer C., Fakan S., Cremer T. 2006. Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks. *Chromosome Res.* 14 : 707—733.
- Bartova E., Kozubek S. 2006. Nuclear architecture in the light of gene expression and cell differentiation studies. *Biol. Cell.* 98 : 323—336.

Bolzer A., Kreth G., Solovei I., Koehler D., Saracoglu K., Fauth C., Muller S., Eils R., Cremer C., Speicher M., Cremer T. 2005. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol.* 3 (5) : 826—842.

Boyle S., Gilchrist S., Bridger J., Mahy N., Ellis J., Bickmore W. 2001. The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum. Mol. Genet.* 10 : 211—219.

Burt D. 2002. Origin and evolution of avian microchromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 96 (1—4) : 97—112.

Callan H. G. 1986. Lampbrush chromosomes. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* 36 : 1—254.

Cremer T., Cremer M., Dietzel S., Muller S., Solovei I., Fakan S. 2006. Chromosome territories — a functional nuclear landscape. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 18 : 307—316.

Cremer T., Kreth G., Koester H., Fink R.H., Heintzmann R., Cremer M., Solovei I., Zink D., Cremer C. 2000. Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Ex.* 10 (2) : 179—212.

Croft J., Bridger J., Boyle S., Perry P., Teague P., Bickmore W. 1999. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J. Cell Biol.* 145 : 1119—1131.

Derjusheva S., Kurganova A., Krasikova A., Saifitdinova A., Habermann F., Gaginskaya E. 2003. Precise identification of chicken chromosomes in the lampbrush form using chromosome painting probes. *Chromosome Res.* 11 : 749—757.

Federico C., Cantarella C., Scavo C., Saccone S., Bed'Hom B., Bernardi G. 2005. Avian genomes: different karyotypes but a similar distribution of the GC-richest chromosome regions at interphase. *Chromosome Res.* 13 : 785—793.

Fedorova E., Zink D. 2008. Nuclear architecture and gene regulation. *Biochim. biophys. acta.* 1783 : 2174—2184.

Foster H., Abeydeera L., Griffin D., Bridger J. 2005. Non-random positioning in mammalian sperm nuclei, with migration of the sex chromosomes during late spermatogenesis. *J. Cell Sci.* 118 : 1811—1820.

Gaginskaya E., Kulikova T., Krasikova A. 2009. Avian lampbrush chromosomes: a powerful tool for exploration of genome expression. *Cytogenet. Genome Res.* 124 : 251—267.

Galkina S., Deryusheva S., Fillon V., Vignal A., Crooijmans R., Groenen M., Rodionov A., Gaginskaya E. 2006. FISH on avian lampbrush chromosomes produces higher resolution gene mapping. *Genetica.* 128 : 241—251.

Gall J., Wu Z. 2010. Examining the contents of isolated Xenopus germinal vesicles. *Methods.* 51 : 45—51.

Habermann F., Cremer M., Walter J., Kreth G., von Hase J., Bauer K., Wienberg J., Cremer C., Cremer T., Solovei I. 2001. Arrangement of macro- and microchromosomes in chicken cells. *Chromosome Res.* 9 : 569—584.

ICGSC (International Chicken Genome Sequencing Consortium). 2004. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature.* 432 : 695—716.

Krasikova A., Barbero J., Gaginskaya E. 2005. Cohesion proteins are present in centromere protein bodies associated with avian lampbrush chromosomes. *Chromosome Res.* 13 : 675—685.

Krasikova A., Daks A., Zlotina A., Gaginskaya E. 2009. Polymorphic heterochromatic segments in Japanese quail microchromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 126 : 148—155.

Krasikova A., Deryusheva S., Galkina S., Kurganova A., Eytsev A., Gaginskaya E. 2006. On the positions of centromeres in chicken lampbrush chromosomes. *Chromosome Res.* 14 : 777—789.

Kupper K., Kölbl A., Biener D., Dittrich S., von Hase J., Thormeyer T., Fiegler H., Carter N., Speicher M., Cremer T., Cremer M. 2007. Radial chromatin positioning is shaped by local gene density, not by gene expression. *Chromosoma.* 116 : 285—306.

Lañcôt C., Cheutin T., Cremer M., Cavalli G., Cremer T. 2007. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat. Rev. Genet.* 8 : 104—115.

- Mahy N., Perry P., Bickmore W. 2002. Gene density and transcription influence the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH. *J. Cell Biol.* 159 : 753—763.
- Marko J., Siggia E. 1997. Polymer models of meiotic and mitotic chromosomes. *Mol. Biol. Cell.* 8 : 2217—2231.
- Mateos-Langerak J., Goetze S., Leonhardt H., Cremer T., van Driel R., Lanctot C. 2007. Nuclear architecture: Is it important for genome function and can we prove it? *J. Cell. Biochem.* 102 : 1067—1075.
- Misteli T. 2007. Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell.* 128 : 787—800.
- Morgan G. 2002. Lampbrush chromosomes and associated bodies: new insights into principles of nuclear structure and function. *Chromosome Res.* 10: 177—200.
- Morgan G. 2008. Working with oocyte nuclei: cytological preparations of active chromatin and nuclear bodies from amphibian germinal vesicles. *Methods. Mol. Biol.* 463 : 55—66.
- O'Brien T. P., Bult C. J., Cremer C., Grunze M., Knowles B. B., Langowski J., McNally J., Pederson T., Politz J. C., Pombo A., Schmahl G., Spatz J. P., van Driel R. 2003. Genome function and nuclear architecture: from gene expression to nanoscience. *Genome Res.* 13 : 1029—1041.
- Razin S. 2006. Spatial organization of the eukaryotic genome and the action of epigenetic mechanisms. *Genetika.* 42 : 1605—1614.
- Razin S., Iarovaia O., Sjakste N., Sjakste T., Bagdoniene L., Rynditch A., Eivazova E., Lipinski M., Vassetzky Y. 2007. Chromatin domains and regulation of transcription. *J. Mol. Biol.* 369 : 597—607.
- Roberts R., Iatropoulou A., Cianciar D., Stark J., Becker D., Franks S., Hardy K. 2005. Follicle-stimulating hormone affects metaphase I chromosome alignment and increases aneuploidy in mouse oocytes matured *in vitro*. *Biol. Reprod.* 72 : 107—118.
- Rodionov A. 1996. Micro vs. macro: structural-functional organization of avian micro- and macrochromosomes. *Genetika.* 32 : 597—608.
- Rodionov A., Chechik M. 2002. Lampbrush chromosomes in the Japanese quail *Coturnix coturnix japonica*: cytological maps of macro chromosomes and meiotic crossover frequency in females. *Genetika.* 38 : 1246—1251.
- Ronneberger O., Baddeley D., Scheipl F., Vermeer P., Burkhardt H., Cremer C., Fahrmeir L., Cremer T., Joffe B. 2008. Spatial quantitative analysis of fluorescently labeled nuclear structures: problems, methods, pitfalls. *Chromosome Res.* 16 : 523—562.
- Sadoni N., Langer S., Fauth C., Bernardi G., Cremer T., Turner B., Zink D. 1999. Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J. Cell. Biol.* 146 : 1211—1226.
- Saifitdinova A., Derjusheva S., Krasikova A., Gaginskaya E. 2003. Lampbrush chromosomes of the chaffinch (*Fringilla coelebs* L.). *Chromosome Res.* 11 : 99—113.
- Schmid M., Nanda I., Hoehn H., Schartl M., Haaf T., Buerstedde J. M., Arakawa H., Caldwell R. B., Weigend S., Burt D. W., Smith J., Griffin D. K., Masabanda J. S., Groenen M. A., Crooijmans R. P., Vignal A., Fillon V., Morisson M., Pitel F., Vignoles M., Garrigues A., Gellin J., Rodionov A. V., Galkina S. A., Lukina N. A., Ben-Ari G., Blum S., Hittel J., Twito T., Lavi U., David L., Feldman M. W., Delany M. E., Conley C. A., Fowler V. M., Hedges S. B., Godbout R., Katyal S., Smith C., Hudson Q., Sinclair A., Mizuno S. 2005. Second report on chicken genes and chromosomes 2005. *Cytogenet. Genome Res.* 109 : 415—479.
- Schofer C., Weipoltshammer K. 2008. Gene dynamics and nuclear architecture during differentiation. *Differentiation.* 76 : 41—56.
- Skinner B., Volker M., Ellis M., Griffin D. 2009. An appraisal of nuclear organisation in interphase embryonic fibroblasts of chicken, turkey and duck. *Cytogenet. Genome Res.* 126 : 156—164.
- Smith J., Bruley C., Paton I., Dunn I., Jones C., Windsor D., Morrice D., Law A., Masabanda J., Sazanov A., Waddington D., Fries R., Burt D. 2000. Differences in gene density on chicken macrochromosomes and microchromosomes. *Anim. Genet.* 31 : 96—103.
- Solovei I., Gaginskaya E., Hutchison N., Macgregor H. 1993. Avian sex chromosomes in the lampbrush form: the ZW lampbrush bivalents from six species of bird. *Chromosome Res.* 1 : 153—166.
- Solovei I., Joffe B., Hori T. 1998. Unordered arrangement of chromosomes in the nuclei of chicken spermatozoa. *Chromosoma.* 107 : 184—188.
- Stadler S., Schnapp V., Mayer R., Stein S., Cremer C., Bonifer C., Cremer T., Dietzel S. 2004. The architecture of chicken chromosome territories changes during differentiation. *BMC Cell Biol.* 5 : 44. doi: 10.1186/1471-2121-5-44.
- Sun H., Shen J., Yokota H. 2000. Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys. J.* 79 : 184—190.
- Tanabe H., Habermann F., Solovei I., Cremer M., Cremer T. 2002. Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications. *Mutat. Res.* 504 : 37—45.
- Van Driel R., Fransz P., Verschure P. 2003. The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J. Cell Sci.* 116 : 4067—4075.
- Volpi E., Chevret E., Jones T., Vatcheva R., Williamson J., Beck S., Campbell R., Goldsworthy M., Powis S., Ragoussis J., Trowsdale J., Sheer D. 2000. Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *J. Cell Sci.* 113 : 1565—1576.

Поступила 28 VI 2010

SPATIAL ARRANGEMENT OF MACRO-, MIDI- AND MICROCHROMOSOMES
IN TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE NUCLEI OF GROWING OOCYTES IN BIRDS
OF THE ORDER GALLIFORMES

A. V. Maslova, A. V. Krasikova¹

Laboratory of Chromosome Structure and Function, St. Petersburg State University;

¹ e-mail: spbchromas@gmail.com

Three-dimensional genome organization in the cell nucleus reflects its functional state and is one of the regulatory levels of gene expression. Thus, a detailed exploration of the interrelations between the genome spatial organization and functioning is essential. In this work, three-dimensional genome organization in growing oocytes of Galliform birds, with giant transcriptionally active nucleus characterized by nearly absolute lack of structural constraints on chromosome decondensation, is analyzed in detail. Radial distribution of three groups of chromosomes with different size and gene density in the nuclei of chicken and Japanese quail oocytes was analyzed using confocal laser scanning microscopy followed by the 3D-reconstruction. The chromosome position

relative to the nuclear center was estimated by analyzing its localization in the certain radial zones of the nucleus and direct distance measurements from the centre of the nucleus to the terminal regions and the center of gravity of the chromosome. It has been shown that, in the transcriptionally active nuclei of avian oocytes, chromosomes are located at a significant distance from the nuclear envelope and the gene-rich microchromosomes have no preferential location close to the center of the nucleus and are localized mainly at the periphery of the region occupied by the whole chromosome set. Therefore the radial distribution of lampbrush chromosomes in the oocyte nucleus does not obey the regularity of the spatial arrangement of chromosomes in the interphase nucleus according to which the gene-rich chromosome territories are located at the nuclear center and the gene-poor ones are at the nuclear periphery. With the help of visualization of 3D-preserved lampbrush chromosomes in the intact nucleus, we have confirmed the presence of the repulsion forces between the lateral loops of lampbrush half-bivalents and the lack of interactions between the heterochromatic segments of different bivalents at the lampbrush stage of oogenesis.

Key words: avian oogenesis, cell nucleus, domestic animals, genome architecture, lampbrush chromosomes, telomeres, transcription, three-dimensional reconstruction.
