

## ПОВТОРЯЮЩИЕСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК МОГУТ ПРИНИМАТЬ УЧАСТИЕ В ФОРМИРОВАНИИ СИНАПТОНЕМНЫХ КОМПЛЕКСОВ

© В. Е. Спангенберг,<sup>1</sup> С. Я. Дадашев, О. Л. Коломиец, Ю. Ф. Богданов

*Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва;*

<sup>1</sup> *электронный адрес: vspangenberg@gmail.com*

Синаптонемный комплекс (СК) — это внутриядерная структура, организующая продольный синапс гомологичных хромосом в мейозе. До сих пор не решен вопрос о том, какие последовательности нуклеотидов ДНК отвечают за прикрепление хроматина к латеральным элементам СК. Учитывая особенности диспергированных повторяющихся последовательностей (ПП), можно предположить их участие в структурно-функциональной организации мейотической хромосомы. Мы исследовали методами компьютерного анализа связь распределения ПП с распределением событий мейотической рекомбинации в хромосоме 1 мыши и методом гибридизации *in situ* расположение разных типов ПП относительно СК на препаратах (спредах) сперматоцитов мыши. Полученные данные позволяют построить модель организации мейотической хромосомы с участием ПП в качестве последовательностей, принимающих участие в прикреплении петель хроматина к СК.

Ключевые слова: синаптонемный комплекс, ДНК, организация хромосомы, мейоз, SINE, LINE.

Принятые сокращения: ЛЭ — латеральный элемент, ПП — повторяющиеся последовательности, СК — синаптонемный комплекс.

Синаптонемный комплекс (СК) — эволюционно консервативная специфичная для мейоза ядерная ультраструктура, которая во время первого деления мейоза принимает участие в синапсисе рекомбинации и сегрегации гомологичных хромосом (см. обзор: Богданов, Коломиец, 2007). У всех видов эукариот СК имеет единый план строения — два латеральных элемента (ЛЭ), разделенных центральным пространством, в котором есть поперечные филаменты, соединяющие ЛЭ и формирующие продольный центральный элемент. На центральном элементе, в локусах рекомбинации (хиазм), формируются рекомбинационные узелки, видимые в электронном микроскопе утолщения, состоящие из ферментов рекомбинации. Хроматин гомологичных хромосом организован в виде латеральных петель, которые прикрепляются к ЛЭ на их внешней поверхности. На стадии пахинемы мейоза два ЛЭ служат продольными осями двух гомологичных хромосом.

СК формируется в начале профазы I мейоза (на стадии зигонемы) и исчезает во второй половине этой фазы (на стадии диплономы). Таким образом, СК — это короткоживущая внутриядерная структура, «организующая» продольный синапсис гомологичных хромосом. До сих пор не решен вопрос о том, с помощью каких связей — ДНК-белковых или белок-белковых — хроматин прикрепляется к белковым латеральным элементам СК.

Наличие в геномах большинства эукариот многочисленных копий мобильных элементов и других диспергированных повторяющихся последовательностей (ПП) (около половины генома) позволяет предположить их участие в структурно-функциональной организации хро-

мосом. Можно допустить, что какие-то повторяющиеся последовательности ДНК служат «якорями», прикрепляющими петли хроматина к ЛЭ. «Якорная» роль ДНК-повторов весьма вероятна, если учесть, что строение латеральных элементов СК не имеет специфичности по отношению к генетическому содержанию локусов хромосом (Zickler, Kleckner, 1998). Ранее в нашей лаборатории было установлено, что остаточная ДНК, выделенная из изолированных СК мыши и золотистого хомячка, которые были обработаны ДНКазой II (СКАР ДНК), обогащена простыми повторами GT/CA, последовательностями В1 (Карпова и др., 1989, 1995) и последовательностями мини-сателлита (Дадашев и др., 1989). Другими исследователями было обнаружено обогащение СКАР ДНК крысы повторами SINE и LINE (Pearlman et al., 1992). Кроме того, методами биоинформатики (компьютерного анализа) были получены результаты, которые позволили предположить участие Alu-повторов в организации СК (Дадашев и др., 2005). Недавно методом иммунопреципитации хроматина было установлено, что с мажорным белком SYCP3 ЛЭ млекопитающих ассоциированы исключительно повторяющиеся последовательности ДНК всех основных классов (SINE, LINE, LTR, транспозоны). Предполагается, что они отвечают за прикрепление хроматина к ЛЭ СК (Hernandez-Hernandez et al., 2008). В то же время количество ДНК, входящей в состав СК, составляет около 0.5 % от геномной ДНК (Карпова и др., 1995). Значит, если в СК присутствуют лишь повторяющиеся последовательности, то только около 1 % ПП генома может принимать участие в прикреплении петель хроматина к ЛЭ СК. Таким образом, возникает вопрос: имеют ли какое-либо

отношение к формированию СК другие ПП из оставшихся 99 %. Поэтому задача данной работы состояла в том, чтобы исследовать расположение ПП хроматина относительно СК.

Для решения поставленной задачи были использованы два независимых подхода. Первый подход состоял в определении методами биоинформатики таких ПП ДНК, которые могло бы быть «якорными» последовательностями ДНК на латеральных элементах СК. Для этого мы сравнили расположение разных типов ПП в хромосоме 1 мыши с распределением событий мейотической рекомбинации вдоль этой хромосомы. Основанием для использования этого подхода были соображения о том, что частота встречаемости тех ПП ДНК, которые тяготеют к горячим точкам рекомбинации, должна положительно коррелировать с частотой событий мейотической рекомбинации в этих локусах по сравнению с другими локусами. Такие ПП мы назвали ПП первого типа. С другой стороны, в геноме человека есть такие ПП ДНК (ПП второго типа), распределение которых по геному отрицательно коррелирует с распределением горячих точек рекомбинации (Дадашев и др., 2005). На этом основании была построена модель, согласно которой ПП второго типа прикрепляют петли хроматина к латеральным элементам СК (в частности, взаимодействуют с когезинами), а ПП первого типа, находясь в латеральных петлях хроматина, могут инвагинировать в центральное пространство СК и участвовать в мейотической рекомбинации внутри рекомбинационных узлов (Дадашев и др., 2005). Исследование методами биоинформатики, представленное в данной статье, было предпринято для проверки этой модели на материале полностью секвенированной хромосомы 1 мыши.

Второй подход, использованный нами в данной работе, состоял в исследовании методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) распределения ПП на препаратах распластанных (спредированных) сперматоцитов мыши. Этот тип препаратов обычно используется для изучения СК и кариотипов мейотических клеток и позволяет наиболее отчетливо выявлять двумерную картину расположения хроматина по отношению к СК (Богданов, Коломиец, 2007).

### Материал и методика

В качестве объекта исследования использовали домовую мышь *Mus musculus* лабораторной линии C57BL.

Тотальные препараты синаптонемных комплексов. Семенники мыши освобождали от туники и гомогенизировали в среде Игла в течение 10 мин. Полученную суспензию клеток центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, осадок ресуспендировали в той же среде и помещали на лед. На предметное стекло, покрытое пленкой поли-L-лизина (Menzel Polysine, Германия), наносили по 6 мкл последовательно 5—6 капель 0.2 М сахарозы и на каждую каплю сахарозы помещали по 1 капле суспензии клеток объемом 2 мкл. Через 2 мин поверхности капель касались другим предметным стеклом, предварительно покрытым такой же пленкой. Оба стекла выдерживали в горизонтальном положении до высыхания. Далее препараты фиксировали добавлением 100 мкл 96%-ного спирта или 4%-ного раствора параформальдегида.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). Перед началом работы препараты синаптонем-

ных комплексов отмывали дважды в бидистиллированной воде. Денатурацию ДНК и гибридизацию *in situ* проводили в одном и том же буфере: 30 мкл гибридационной смеси, состоящей из 15 мкл формамида, 3 мкл 2×SSC, 10 мкл ДНК *E. coli* (1 мкг/мл), 1 мкл ДНК-зонда (30 мкг/мл) и 1 мкл воды. Наносили эту смесь на отмытый препарат, накрывали чистым покровным стеклом и герметизировали резиновым клеем. Препарат денатурировали при 85 °С в течение 5 мин, а затем проводили гибридизацию в течение ночи при 37 °С. Аккуратно снимали покровное стекло, отмывали при 37 °С 3 раза по 5 мин в растворе 10%-ном формамида в 2×SSC и 3 раза по 5 мин в 2×SSC, затем по 2 мин отмывали в 70%-ном этаноле при –20 °С, в 70%-ном этаноле при 0 °С и в 96%-ном этаноле при комнатной температуре. Препарат высушивали на воздухе при комнатной температуре, заключали в среду для микроскопии Vectashield с красителем DAPI (Vector Laboratories, США) и накрывали покровным стеклом. Препарат исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axioimager D1 (Carl Zeiss, Германия) с наборами фильтров для DAPI (Zeiss Filter set 1) и для TAMRA (Zeiss Filter set 43), оснащенного камерой Axioacam HRm (программное обеспечение Axiovision rel. 4.6). В качестве ДНК-зондов использовали искусственно синтезированные олигонуклеотиды (каждый длиной в 44 нуклеотида), меченные флуорохромом TAMRA, синтезированные фирмой «Синтол» (Россия).

Иммунофлуоресцентное окрашивание. После регистрации результатов FISH-анализа препараты отмывали 3 раза по 5 мин в фосфатно-солевом буфере (PBS), наносили первичные антитела к белку SYCP-3 (Abcam, Cambridge, США) и инкубировали в течение ночи при 4 °С. Препараты трижды отмывали в PBS по 5 мин и инкубировали 2 ч при 37 °С с козьими антикроличьими антителами, конъюгированными с FITC (Abcam, Cambridge, США). Отмывали препараты так же, как после обработки первыми антителами, и заключали в среду Vectashield с DAPI. Результаты оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axioimager D1 (Carl Zeiss, Германия) с наборами фильтров для DAPI (Zeiss Filter set 1) и для FITC (Zeiss Filter set 9), оснащенного камерой Axioacam HRm (Carl Zeiss, Германия).

Методы биоинформатики. Работа была проведена *in silico* на хромосоме 1 мыши. Информация о последовательности нуклеотидов ДНК была взята из базы данных NCBI, версия 37.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=10090&CHR=1>).

Для идентификации диспергированных повторов в анализируемых последовательностях ДНК была использована программа RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>). Данные о мейотической рекомбинации взяты из статьи (Cox et al., 2009). Обработку данных проводили с помощью программ Excel (Microsoft Office 2010) и Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., 2008; [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)). Для расчета корреляции распределения ПП ДНК и событий рекомбинации последовательность нуклеотидов ДНК хромосомы 1 мыши разбивали на фрагменты («окна») двумя способами: по 200 тпн и по 1 Мпн. Более мелкое фрагментирование было нецелесообразно, поскольку данные о мейотической рекомбинации недостаточно подробны и получены для фрагментов ДНК со средней длиной 230 тпн.

Использованные реактивы: среда Игла (ПанЭко, Россия), сахароза (Calbiochem, США), параформальдегид (Fluka, Швейцария), формамид (Merck, США), этанол (Рос-

спиртпром, Россия), олигонуклеотиды, меченные флуорохромом TAMRA (Синтол, Россия), антитела кроличьи к белку SCYP-3 (Abcam, Cambridge, США), антитела козы антикроличьи, конъюгированные с FITC (Abcam, Cambridge, США), среда Vectashield с DAPI (Vector Laboratories, США).

## Результаты

Исследование закономерностей распределения вдоль хромосомы 1 мыши основных семейств ПП и событий мейотической рекомбинации. Для изучения закономерностей распределения ПП вдоль хромосомы 1 мыши и совпадения или несовпадения их распределения с распределением сайтов рекомбинации были отобраны классы ПП, численность которых на хромосоме 1 была более 1000 копий. Это семейства повторов Simple repeat, LINE/L1, SINE/Alu и др. (табл. 1). Мы рассчитали распределение встречаемости выбранных ПП вдоль хромосомы 1 мыши при размерах «окна» для анализа 200 тпн и 1 Мпн и в этих же окнах определили частоту мейотической рекомбинации (см. раздел «Материал и методика») и провели корреляционный анализ этих двух величин. Полученные коэффициенты корреляции приведены в табл. 1. Положительный коэффициент корреляции интерпретируется нами как тенденция к совместной локализации ПП и сайтов мейотической рекомбинации, а отрицательный коэффициент — как пространственное разобщение событий мейотической рекомбинации и локализации ПП данного типа.

На основании проведенного исследования были отобраны ПП для FISH-анализа. При этом мы отбирали ПП, которые демонстрировали значительный коэффициент корреляции в отношении мейотической рекомбинации (т. е. были каким-то образом с ней связаны) или были достаточно многокопийными, для того чтобы дать заметный гибридизационный сигнал. Другим фактором, влияющим на выбор зонда, служили данные литературы об участии ПП в организации мейотической хромосомы или в мейотической рекомбинации. На этом основании нами были отобраны для дальнейшего исследования следующие многокопийные ПП: LTR/ERVL-MaLR и DNA/hAT-Charlie (наиболее многочисленное семейство элементов ДНК), SINE/B4, SINE/B1(Alu) и SINE/B2. Две последние ПП демонстрируют положительный коэффициент корреляции с МР. Семейство Simple repeat является самым многочисленным, но гетерогенным в отношении консенсусов составляющих его субсемейств. Нами было отобрано субсемейство (ГТ/ЦА)<sub>n</sub>, о котором, по данным литературы, известно, что оно связано с мейотической рекомбинацией (Pearlman et al., 1992). Из данных табл. 1 видно, что наиболее выраженный отрицательный коэффициент корреляции обнаружен для LINE/L1 ( $r_1 = -0.1896$  и  $r_2 = -0.3162$ ). Несмотря на значительную численность в геноме семейства «низкой сложности» (low complexity), мы его не исследовали из-за отсутствия определенного консенсуса для этих ПП.

Распределение сигналов флуоресцентных зондов ДНК в пахнемных ядрах. При иммуноцитохимических исследованиях мейотических хромосом обычно применяют фиксацию сшивающими агентами (параформальдегид) (Spyroulos, Moens, 1994; Anderson et al., 1999). Фиксация смесью спирта и уксусной кислоты широко распространена при работе методом

Таблица 1

**Численность повторяющихся последовательностей (ПП) на хромосоме 1 мыши и коэффициент корреляции между распределением ПП и событиями мейотической рекомбинации (МР) на этой хромосоме для окон размерами 200 тпн и 1 Мпн**

Семейство повторяющихся последовательностей <sup>a</sup>	Численность на хромосоме 1, шт.	Коэффициент корреляции Пирсона между распределением ПП и МР для окна размером	
		200 тпн $r_1$	1 Мпн $r_2$
LINE/L1*	63 767	-0.1896	-0.3162
Низкой сложности	30 344	-0.0473	-0.1763
LTR/ERVК	20 237	-0.1022	-0.1685
LTR/ERV1	3723	-0.024	-0.1083
OTHER	1064	0.0152	-0.0489
LTR/ERVL-MaLR*	30 726	0.1069	0.0631
SINE/B4*	26 928	0.089	0.0981
LTR/ERVL	7731	0.0419	0.1111
SINE/MIR	7578	0.1675	0.1435
DNA/hAT-Charlie*	688	0.1656	0.181
SINE/ID	3712	0.0933	0.186
LINE/L2	4779	0.1436	0.199
Simple repeat*	76 617	0.1793	0.2008
SINE/Alu*	33 195	0.0547	0.2021
SINE/B2*	22 845	0.078	0.2286
DNA/TcMar-Tigger	2016	0.1189	0.2315
Другие ПП, численность которых менее 1000 шт.	4998		
Все ПП на хромосоме 1	347 078	0.0721	0.0877

<sup>a</sup> Звездочкой отмечены ПП, которые были использованы нами как зонды.

FISH с препаратами метафазных хромосом (Ronne, 1989). Мы проверили оба типа фиксации (сшивающими и дегидратирующими агентами).

При фиксации параформальдегидом гибридизационные сигналы оказались диспергированными по хроматину, но их распределение отличалось от такового при окраске DAPI. Не наблюдалось связи сигнала гибридизации Alu-повторов с латеральными элементами СК, выявляемых антителами к белку SYCP3 (рис. 1, *a—z*). При использовании спирта в качестве фиксатора мы получили картину распределения гибридизационного сигнала B1(Alu)-повторов, сильно отличающуюся от таковой после фиксации параформальдегидом. Наблюдалось неравномерное распределение сигнала B1(Alu)-повторов преимущественно вокруг СК (рис. 1, *d—e*). Окрашенные B1(Alu)-повторы формировали «шубу» вокруг СК. Фиксирование спиртом делает структуру хроматина более грубой, он вызывает агрегацию фибрилл хроматина и тем самым может усиливать сигнал гибридизации. При этом спиртовая фиксация не должна существенно смещать фибриллы хроматина, ибо способ приготовления препаратов таков, что содержимое клеток и даже ядер, разрушенных гипотоническим шоком, прилипает к подложке, нанесенной на предметное стекло.

Аналогичным образом мы исследовали распределение в пахнемных ядрах мыши сигналов гибридизации in

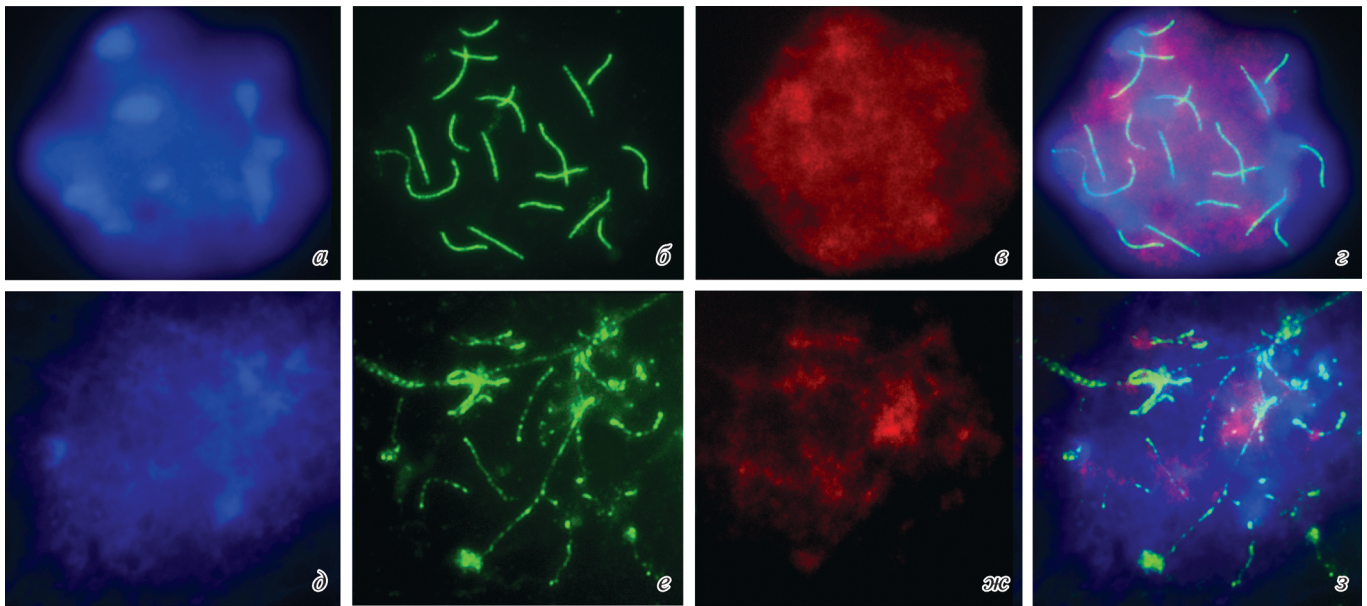


Рис. 1. Влияние способа фиксации на результат гибридизации *in situ* препарата распластанного сперматоцита мыши с зондом B1 (Alu).

*a—г* — фиксация параформальдегидом; *д—и* — фиксация этанолом; *a, д* — окрашивание DAPI (синий сигнал); *б, е* — окрашивание антителами к SYCP3 (зеленый); *в, ж* — гибридизация с зондом B1 (Alu) (красный); *г, з* — совмещение трех изображений.

*situ* с ДНК-зондами последовательностей MALR (LTR), DNA/HAT-CHARLIE (DNA-элемент) и (GT)<sub>22</sub>, B2, B4, а затем выявляли СК этих ядер антителами к белку SYCP3, меченными FITC. Расположение гибридизационного сигнала относительно оси мейотических бивалентов хромосом оказалось различным для разных ДНК-зондов.

Последовательности B4 (рис. 2, *и—м*), L1 (рис. 2, *н—р*) и (GT/CA)<sub>n</sub> (рис. 2, *д—з*) были широко распределены по ядру и не концентрировались в районах СК. В то же время B1(Alu)-повторы (рис. 1) и B2-повторы (рис. 2, *а—г*) помимо гибридизационного сигнала, диспергированного по хроматину мейотического ядра, дали значительно более интенсивные сигналы вокруг СК.

Таким образом, можно предположить, что по крайней мере часть B1(Alu)- и B2-повторов служит последовательностями ДНК, которые принимают участие в прикреплении хроматина к СК.

Повторы MALR (LTR) и DNA/HAT-CHARLIE (ДНК-элемент) не дали заметного гибридизационного сигнала (данные не приведены). Возможно, это связано с их недостаточной представленностью в геноме.

Ранее нами было показано обогащение ДНК тесно сцепленной с СК последовательностью мини-сателлита, поэтому мы исследовали его расположение также. Гибридизационный сигнал мини-сателлита располагался в виде хорошо заметных пятен на одном из концов каждого бивалента, что, видимо, соответствует расположению центромеры, в районе которой располагается мини-сателлит (рис. 3, *с—ф*).

### Обсуждение

Полученные нами результаты согласуются с моделью организации СК (Дадашев и др., 2005), которая построена на основе данных компьютерного исследования распределения горячих и холодных точек рекомбинации в геноме человека. Модель предсказывает, что Alu-повторы

генома человека (сходные с B1-повторами мыши) прикрепляют хроматин к латеральным элементам СК, в то время как простые повторы GT/CA локализуются в петлях хроматина и фланкируют горячие точки рекомбинации. На основе наших результатов нельзя утверждать, что повторы B1 и B2 играют роль «якорных» последовательностей хроматина на СК, но можно утверждать, что они располагаются в виде «шубы» или «чехла» вдоль хромосом.

Поскольку ранее нами было обнаружено обогащение СКАР-ДНК мыши последовательностью мини-сателлита, в настоящем исследовании нами был использован в качестве зонда олигонуклеотид, соответствующий части этого мини-сателлита. Сигнал гибридизации *in situ* наблюдался в проксимальном районе всех СК (рис. 3). Видно, что сигналы гибридизации окружены конденсированным хроматином, заметным по более интенсивному окрашиванию DAPI. Это соответствует локализации мини-сателлита в прицентромерном гетерохроматине акроцентрических хромосом мыши и совпадает с данными о гибридизации сателлита I на спредированных препаратах сперматоцитов крысы (Moens, Pearlman, 1989). По-видимому, в районах прицентромерного гетерохроматина роль «якорных» структур хроматина на латеральных элементах СК мыши играет мини-сателлит.

Доказательства, полученные в данной работе, не являются исчерпывающими. Необходимо исследовать аналогичным образом более широкий круг повторяющихся последовательностей нуклеотидов. Кроме того, все результаты близкого пространственного расположения сигналов гибридизации с латеральными элементами СК еще не служат доказательством физического контакта. Они лишь позволяют говорить о том, что та или иная последовательность нуклеотидов может служить кандидатом на роль «якорной» последовательности, прикрепляющей петли хроматина к СК. Для строгого доказательства более адекватным методом является иммунопреципитация хроматина с белками СК.

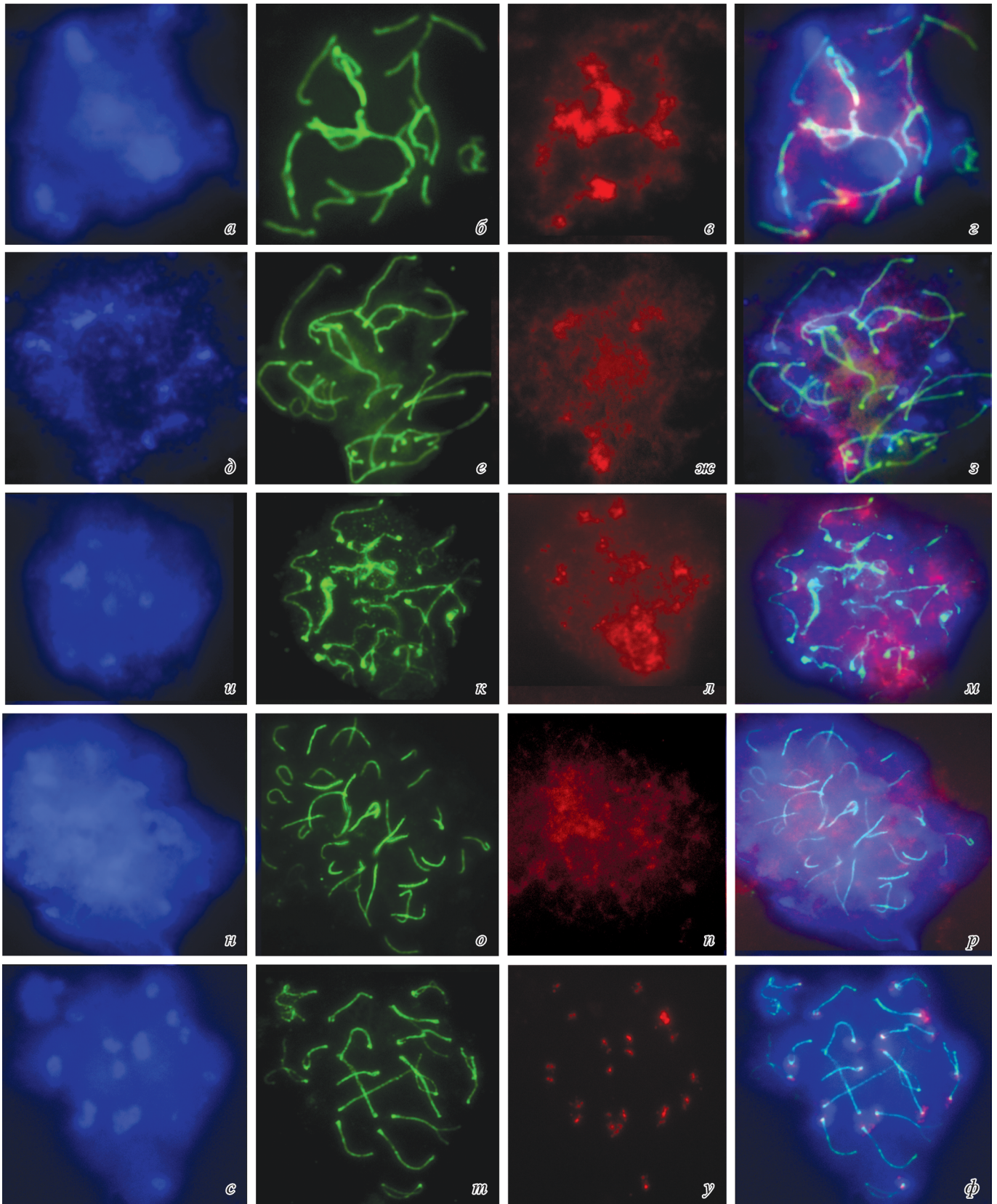


Рис. 2. Результат FISH-анализа зондов повторяющихся последовательностей ДНК на препаратах распланных сперматоцитов мыши.

Окрашивание DAPI — *синий сигнал*, антителами к SYCP3 — *зеленый*, гибридизация с ДНК-зондами — *красный*. *а—г* — зонд B2: видна связь сигнала гибридизации с сигналом белка SYCP3 латеральных элементов СК — «чехол» B2 вокруг СК; *д—з* — зонд  $(GT)_{22}$ : гибридизационный сигнал диспергирован по хроматину, нет связи зондов с белком SYCP3 латеральных элементов СК; *и—м* — зонд B4: гибридизационный сигнал диспергирован по хроматину, нет связи зондов с белком SYCP3; *н—р* — зонд L1: гибридизационный сигнал L1 диспергирован по хроматину, нет его связи с латеральными элементами СК; *с—ф* — зонд мини-сателлит: гибридизационный сигнал дает четкие фокусы в районе одного из концов каждого бивалента, что соответствует его расположению в районе центromеры акроцентрических хромосом мыши; *г, з, м, р, ф* — совмещение трех изображений.

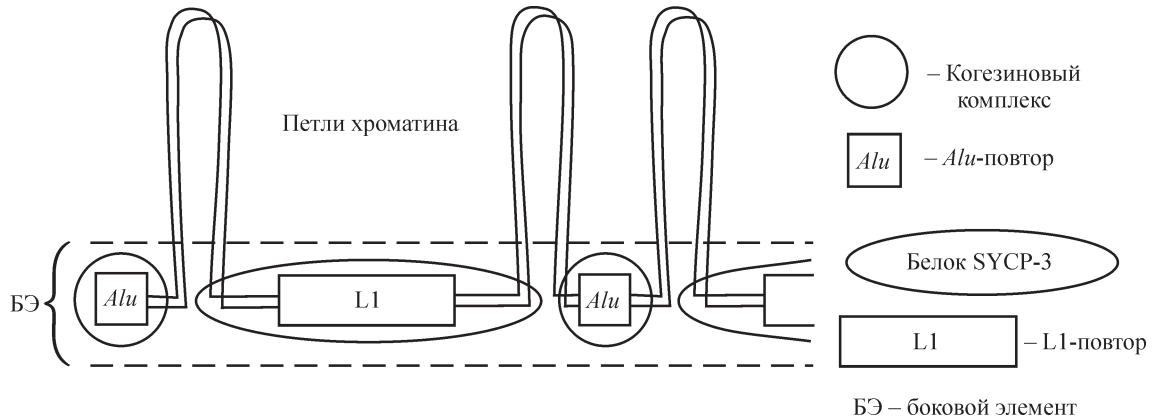


Рис. 3. Модель прикрепления петель хроматина к боковым элементам синаптонемного комплекса.

Для выяснения организации мейотической хромосомы кроме прямых цитологических и молекулярно-биохимических методов возможно применение методов, основанных на анализе распределения структурных и функциональных явлений вдоль хромосомы. В настоящем исследовании в качестве структурного явления мы использовали распределение ПП вдоль хромосомы, а функционального — распределение вдоль хромосомы событий мейотической рекомбинации. Наблюдаемые нами положительные корреляционные отношения могут быть как следствием прямого участия ПП в мейотической рекомбинации, так и следствием того, что оба явления — мейотическая рекомбинация и интеграция в хромосомы ПП (мобильных элементов) — требуют «открытого» хроматина, т.е. оба события коррелируют вследствие влияния на них одного и того же фактора. Так, отрицательный коэффициент корреляции между плотностью повторов L1 и уровнем мейотической реком-

бинации интерпретируется нами как пространственное разобщение этих событий и может быть объяснено тем, что повторы L1 принимают участие в прикреплении хроматина к ЛЭ СК. Свидетельством участия L1 в прикреплении хроматина к ЛЭ СК служат недавно опубликованные результаты (Hernandez-Hernandez et al., 2008). Кроме того, авторы выдвигают предположение о том, что в процессе прикрепления принимают участие все выявленные ими классы ПП. Однако мы полагаем, что результаты указанной выше работы приводят к несколько иным выводам. Так, доля последовательностей L1 среди клонов, полученных авторами из иммунопреципитата, составляет 39 %, а доля этих же последовательностей к общему числу ПП на хромосоме 1 крысы — 18.2 %. Таким образом, наблюдается обогащение последовательностей L1 во фракции ДНК, ассоциированной с белком ЛЭ СК (SYCP3). Доля других ПП в клонотеке, полученной данными авторами (Hernandez-Hernandez et al., 2008), близка к их доли в геноме или меньше ее (табл. 2). Это указывает на исключительную роль L1 во взаимодействии с белком ЛЭ SYCP3. В тоже время мы не наблюдали колокализации L1-повторов с СК в распластанных ядрах сперматоцитов мыши, что, возможно, связано с экранированием этих повторов в составе СК белками латеральных элементов.

Ранее было показано, что в состав СК входят два белковых компонента, способных формировать его независимо друг от друга, — когезиновый комплекс и белок SYCP3, что, возможно, свидетельствует о двух механизмах формирования СК. Когезиновый комплекс, формируемый с участием мейотической формы белка SMC1 $\beta$  (Revenkova et al., 2001), способен образовывать подобие ЛЭ даже в отсутствие белка SYCP3 (Revenkova et al., 2004; Novak et al., 2008). Белок SYCP3 также способен самостоятельно формировать ЛЭ в отсутствие когезинового комплекса (Revenkova et al., 2004; Novak et al., 2008). Результаты экспериментов *in vitro* (Akhmedov et al., 1998, 1999) и *in vivo* (Nakimi et al., 2002) показали, что позиционирование когезинового комплекса на ДНК осуществляется с участием Alu-повторов. Участие B1(Alu)- и B2-повторов в организации СК мыши нашими экспериментами подтверждается. Таким образом, мы можем уточнить модель прикрепления петель хроматина к ЛЭ СК. В этом процессе принимают участие два механизма: первый — связывание L1 повторов с белком SYCP3, второй — связывание Alu-повторов с мейотическим когезиновым комплексом. На основании этого мы предлагаем модель организации ЛЭ СК (рис. 3).

Таблица 2

**Сравнение численности повторяющихся последовательностей (ПП) в клонотеке (Hernandez-Hernandez et al., 2008) с их содержанием на хромосоме 1 крысы**

ПП, ассоциированные с SYCP3		Содержание ПП на хромосоме 1, %	Достоверность различия: двухсторонний <i>t</i> -критерий, <i>P</i>
субсемейства ПП <sup>а</sup>	доля, %		
LINE			
(Family L1) <sup>а*</sup>	39	18.2	0.0000
(Family L2)	0	0.9	0.3406
SINE			
(Family Alu)	8	6.75	0.6190
(Family ID)	1	3.5	0.1740
(Family MIR)	4	1.3	0.1685
(Family B2-B4)*	7	14.7	0.0298
LTR	22	18.8	0.4137
DNA transposons	6	3.5	0.1749
Simple sequences repeats			
Satellite*	3	0.9	0.0270
Simple repeat*	10	21.7	0.0046

<sup>а</sup> Звездочкой отмечены ПП, численность которых достоверно различается.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 08-04-01725-а и 10-04-00666-а).

### Список литературы

Богданов Ю. Ф., Коломиец О. Л. 2007. Синаптонемный комплекс — индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом. М.: Товарищество научных изданий КМК. 358 с.

Дадашев С. Я., Бакиров В. И., Белостоцкий Д. И., Мильшина Н. В., Карпова О. И., Богданов Ю. Ф. 1989. Специфические свойства ДНК из фракции изолированных синаптонемных комплексов мыши. ДАН СССР. 308 (2) : 490—493.

Дадашев С. Я., Гришаева Т. М., Богданов Ю. Ф. 2005. Идентификация и характеристика *in silico* последовательностей ДНК, функционирующих в мейозе (мейотической ДНК). II. AluJb, возможно, участвуют в прикреплении петель хроматина к синаптонемному комплексу. Генетика. 41 (12) : 1707—1713.

Карпова О. И., Пенкина М. В., Дадашев С. Я., Мильшина Н. В., Эрнандес Х., Радченко И. В., Богданов Ю. Ф. 1995. Особенности первичной структуры ДНК из синаптонемного комплекса золотистого хомячка. Молекуляр. биол. 29 (3) : 512—521.

Карпова О. И., Сафронов В. В., Зайцева С. П., Богданов Ю. Ф. 1989. Некоторые свойства ДНК из выделенной фракции синаптонемных комплексов мышей. Молекуляр. биол. 23 (2) : 571—579.

Akhmedov A. T., Frei C., Tsai-Pflugfelder M., Kemper B., Gasser S. M., Jessberger R. 1998. Structural maintenance of chromosomes protein C-terminal domains bind preferentially to DNA with secondary structure. J. Biol. Chem. 273 : 24 088—24 094.

Akhmedov, A. T., Gross B., Jessberger R. 1999. Mammalian SMC3 C-terminal and coiled-coil protein domains specifically bind palindromic DNA, do not block DNA ends, and prevent DNA bending. J. Biol. Chem. 274 : 38 216—38 224.

Anderson L. K., Reeves A., Webb L. M., Ashley T. 1999. Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. Genetics. 151 : 1569—1579.

Cox A., Ackert-Bicknell C. L., Dumont B. L., Ding Y., Bell J. T., Brockmann G. A., Wergedal J. E., Bult C., Paigen B., Flint J., Tsaih S. W., Churchill G. A., Broman K. W. 2009. A new standard genetic map for the laboratory mouse. Genetics. 182 : 1335—1344.

Hakimi M.-A., Bochar D. A., Schmiesing J. A., Dong, Barak O. G., Speicher D. W., Yokomori K., Shiekhattar R. 2002. A chromatin remodelling complex that loads cohesin onto human chromosomes. Nature. 418 : 994—998.

Hernandez-Hernandez A., Rincon-Arango H., Recillas-Targa F., Ortiz R., Valdes-Quezada C., Echeverria O. M., Benavente R., Vazquez-Nin G. H. 2008. Differential distribution and association of repeat DNA sequences in the lateral element of the synaptonemal complex in rat spermatocytes. Chromosoma. 117 : 77—87.

Moens P. B., Pearlman R. E. 1989. Satellite DNA I in chromatin loops of rat pachytene chromosomes and in spermatids. Chromosoma. 98 : 287—294.

Novak I., Wang H., Revenkova E., Jessberger R., Scherthan H., Hoog C. 2008. Cohesin Smc1beta determines meiotic chromatin axis loop organization. J. Cell Biol. 180 : 83—90.

Pearlman R. E., Tsao N., Moens P. B. 1992. Synaptonemal complexes from DNase-treated rat pachytene chromosomes contain GTn and LINE/SINE sequences. Genetics. 130 : 865—872.

Revenkova E., Eijpe M., Heyting C., Gross B., Jessberger R. 2001. Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1. Mol. Cell. Biol. 21 : 6984—6998.

Revenkova E., Eijpe M., Heyting C., Hodges C. A., Hunt P. A., Liebe B., Scherthan H., Jessberger R. 2004. Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics sister chromatid cohesion and DNA recombination. Nat. Cell Biol. 66 : 555—562.

Ronne M. J. 1989. Chromosome preparation and high resolution banding techniques. Dairy Sci. 72 : 1363—1377.

Spyropoulos B., Moens P. B. 1994. *In situ* hybridization of meiotic prophase chromosomes. Methods Mol. Biol. 33 : 131—139.

Zickler D., Kleckner N. 1998. The leptotene-zygotene transition of meiosis. Annu. Rev. Genet. 32 : 619—697.

Поступила 26 IX 2010

### DNA REPEATED SEQUENCES MAY BE INVOLVED IN THE SYNAPTONEMAL COMPLEXES FORMATION

V. E. Spangenberg,<sup>1</sup> S. Y. Dadashev, O. L. Kolomiets, Yu. F. Bogdanov

N. I. Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow;

<sup>1</sup> e-mail: vspangenberg@gmail.com

Synaptonemal complexes (SCs) are the intranuclear structures which facilitate reversible lateral synapsis of the homologous chromosomes in the course of meiosis. It is still unclear which DNA nucleotide sequences are responsible for the chromatin attachment to the SC lateral elements. Considering the features of the dispersed repeated sequences (RS) it is worth to assume their participation in the structure functional organization of the meiotic chromosome. Using numerical analysis we have investigated the relationship between RS and the distribution of events of the meiotic recombination in mouse chromosome 1. Using *in situ* hybridization on spread mouse spermatocytes, we have demonstrated the arrangement of different types of RS relative to SCs. Hybridization signals of B1(Alu), B2, and minisatellite probes were localizing predominantly in the SCs regions. Our results allow us to suggest the model of the meiotic chromosome organization with the RS as the sequences, participating in the attachment of chromatin loops and SCs.

Key words: synaptonemal complex, DNA, chromosome organization, meiosis, SINE, LINE.