

## МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ В ПРОФАЗЕ I МЕЙОЗА ЧЕЛОВЕКА УНИКАЛЬНОГО СЕГМЕНТА ДНК

© Ю. Ф. Богданов,<sup>1</sup> В. Е. Спангенберг,<sup>1</sup> С. Я. Дадашев,<sup>1</sup> И. И. Витязева,<sup>2</sup>  
С. В. Боголюбов,<sup>2</sup> О. Л. Коломиец<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН

и <sup>2</sup> ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России, Москва;

\* электронный адрес: [olkolomiets@mail.ru](mailto:olkolomiets@mail.ru)

Для исследования способа прикрепления ДНК к латеральным элементам синаптонемного комплекса (СК) в сперматоцитах человека был использован коммерческий образец ДНК. Он представлял собой фрагмент длиной в 160 т. п. н. из района 17p11.2 и содержал ген *RAI1* и маркер D17S620 (зонд на делецию в хромосоме 17, вызывающую синдром Smith—Magenis). Методом FISH мы установили, что этот сегмент ДНК образует латеральное тельце хроматина на СК хромосомы 17, окрашенном флуоресцентными антителами к белку SYCP3. В зависимости от субстадии профазы I мейоза конфигурация этого латерального тельца хроматина была различной. Во время зиготены флуоресцентный сигнал зонда формировал по одной палочке длиной около 6 мкм, перпендикулярной продольной оси СК на обеих его сторонах. В ранней пахитене каждая палочка трансформировалась в глобулу, снова по обе стороны СК. В поздней пахитене каждая глобула превращалась в две рыхлые глобулы, содержащие клубки нитей. В диплотене глобулы, наконец, превращались в тонкие петли ДНК (хроматина), длина которых от основания до вершины петли составляла приблизительно 10 мкм, с периодическими утолщениями (бусинами) по длине нити этой петли. В результате этих динамических превращений по каждую сторону от СК хромосомы 17 возникали по две петли хроматина. Наиболее вероятно, что они являлись петлями сестринских хроматид. Следовательно, в данном сайте бивалента хромосомы 17 наблюдались четыре петли полного набора четырех хроматид.

Таким образом, мы впервые наблюдали истинные открытые латеральные петли хроматина в профазе I мужского мейоза у человека вместо традиционно постулируемых «петель» в тех публикациях, где исследователи наблюдали конденсированные палочковидные или шетинковидные «выросты» хроматина на латеральных элементах синаптонемных комплексов. Открытые конфигурации петель хроматина предположительно зависят от активации транскрипции во время поздней пахитены и диплотены и напоминают в миниатюре петли хромосом «ламповых щеток».

Ключевые слова: мейоз, профазы I, синаптонемный комплекс, флуоресцентная гибридизация *in situ*, иммунофлуоресценция, латеральные петли хроматина.

Принятые сокращения: СК — синаптонемный комплекс, FISH — флуоресцентная гибридизация *in situ*, т. п. н. — тысяча пар нуклеотидов, м. п. н. — миллион пар нуклеотидов.

Во время клеточного деления, митоза или мейоза хромосомы находятся в максимально компактном состоянии. Максимальная упаковка нужна для защиты ДНК от повреждений при разделении и транспортировке хроматид или гомологичных хромосом в дочерние клетки во время клеточного деления. Однако морфология хромосом в митозе и мейозе различается. Это обусловлено задачами, которые решаются в ходе этих клеточных делений. Если в ходе митоза происходит только транспортировка «упакованной» ДНК, то во время мейоза происходят попарное соединение (конъюгация) гомологичных хромосом и кроссинговер (генетическая рекомбинация) несестринских хроматид. Для выполнения рекомбинации гомологичным хромосомам приходится выстраиваться и выравниваться параллельно, а также сохранять вступающие в синапс сайты в состоянии «открытого» хроматина доступными для рекомбинации гомологичных локусов

ДНК. Эти специфические особенности мейотических хромосом проявляются во время профазы I мейоза и обеспечиваются специфической для мейоза петельно-осевой организацией хромосом во время стадий зиготены и пахитены.

В первом делении мейоза профазные хромосомы приобретают белковые оси («axial elements»), и из них формируются синаптонемные комплексы (СК). Хроматин присоединяется к этим осям в виде латеральных петель. Совокупность этих петель формирует хроматин, окружающий индивидуальные хромосомы и биваленты хромосом, и в английской литературе обозначается термином «chromatin agau». Представление о такой организации хромосом в профазе I мейоза основано на наблюдениях, выполненных с помощью как светового, так и электронного микроскопов, и описано в обзорах (Богданов, 1975; Zickler, Kleckner, 1999). Сделаны выводы о том, что

в пределах биологических видов длина индивидуальных петель хроматина, выраженная в т. п. н., варьирует не более чем в 2 раза, и не было обнаружено различия в длине этих петель между районами G- и R-дисков хромосом (согласно морфологии метафазных хромосом). На препаратах, приготовленных по методу распластывания клеток на поверхности гипотонического раствора, видны места прикрепления хроматина к оси хромосом (Rattner et al., 1981). Однако остаются нерешенными существенные вопросы: 1) с помощью каких молекулярных взаимодействий происходит присоединение хроматина к осевым элементам хромосом и латеральным элементам СК, состоящим в основном из белков, и 2) каковы «якорные» последовательности нуклеотидов ДНК, контактирующие с латеральными элементами СК?

Попытки ответить на эти вопросы уже предпринимались в нашей лаборатории (Спангенберг и др., 2010, 2011). Однако определенных ответов на них пока нет.

В данной работе мы поставили перед собой задачу выяснить, как меняется морфология индивидуальной латеральной петли хроматина в ходе профазы I мейоза, т. е. при изменении морфологии хромосомы от лептотены к диплотене. Как известно, к концу стадии диплотены хромосомы теряют остатки СК. Предполагаемые изменения в морфологии латеральных петель могут быть связаны с функционированием отдельных локусов или целых хромосом.

В последние два десятилетия для выяснения организации мейотических профазных хромосом использована флуоресцентная микроскопия меченных флуорохромами ДНК-зондов и флуоресцентных антител к белкам СК. Эти исследования выполнялись в основном на пахитенных хромосомах, и при этом флуоресцентный сигнал ДНК-зондов, как правило, выглядел в виде палочки, перпендикулярной оси хромосомы, и мало напоминал петлю, похожую, например, на петлю хромосомы типа «ламповой щетки» (Heng et al., 1994; Heng, Tsui, 1998; Froenicke et al., 2002; Pigozzi, 2007). Мы предположили, что для обнаружения структур, действительно напоминающих петлю, необходимо исследовать морфологию хромосом в широком диапазоне: от стадии лептотены до стадии диплотены.

Для проведения таких наблюдений мы решили использовать протяженные ДНК-зонды с известной последовательностью нуклеотидов, известными местами локализации этих последовательностей на метафазных хромосомах и известной генетической характеристикой этих элементов генома, а именно зонды, содержащие однокопийные гены. Для этого в качестве проб для FISH были использованы коммерческие образцы ДНК (флуоресцентномеченные ДНК-зонды) хромосомы 17 человека.

Мы поставили перед собой задачи выяснить, контактируют ли эти последовательности с СК, меняется или остается неизменной микроскопическая морфология этих ДНК-зондов (в состоянии, когда они интегрированы в хромосому) в ходе длительной профазы I, подразделенной на субстадии, и можно ли связать эти изменения с функциональным состоянием хромосом, характерным для тех или иных субстадий профазы I.

## Материал и методика

**Материал.** Для получения семенных канальцев использовали микрохирургическую биопсию яичка (microdissection TESE) в программе экстракорпорального опло-

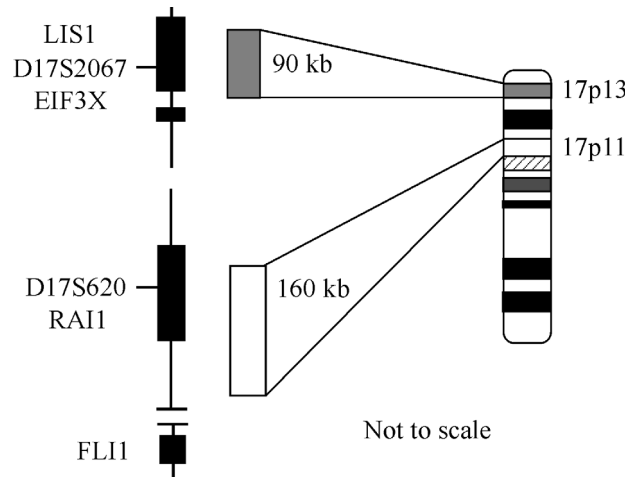


Рис. 1. Схема ДНК FISH-пробы для выявления микроделеций на хромосоме 17 человека: XL RAI1 — тест на синдром Smith—Magenis, XLLIS-1 (PAFAN1B1) — тест на синдром Miller—Dieker.

Косая штриховка — зонд 160 т. п. н., черная заливка — зонд 90 т. п. н.

дотворения у мужчин с азооспермией. Особенности данной манипуляции являются необходимость выведения яичка в операционную рану и вскрытие белочной оболочки в бессосудистой зоне, что дает возможность получить доступ к паренхиме яичка. Последующее интраоперационное использование микроскопа с увеличением до 30× позволяет визуализировать расширенные семенные канальцы, которые могут содержать сперматозоиды, и выполнить микродиссекцию этих участков. Преимуществами данной технологии являются малая инвазивность и высокая результативность в получении сперматозоидов в программах ЭКО. Для данной работы использовали сперматоциты, лежащие в стенках семенных канальцев. Все пациенты подписывали информированное согласие на выполнение данной манипуляции, в том числе и для проведения гистологического и цитогенетического исследования тестикулярных биоптатов.

Тотальные препараты синаптонемных комплексов. Ткань семенного канальца 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 5—6 капель 0.2 М сахарозы (каждая капля — по 6 мкл) и на каждую каплю сахарозы помещали по 1 капле суспензии клеток объемом 2 мкл. Через 2 мин поверхности каплей 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. После фиксации параформальдегидом препараты трижды отмывали в 0.04%-ном растворе фотофлю.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). В качестве зондов использованы локус-специфичные микроделеционные пробы на хромосому 17 человека (XL RAI1 — тест на синдром Smith—Magenis и XLLIS1 (PAFAN1B1) — тест на синдром Miller—Dieker, <http://www.metasystems-international.com>). Проба (рис. 1)

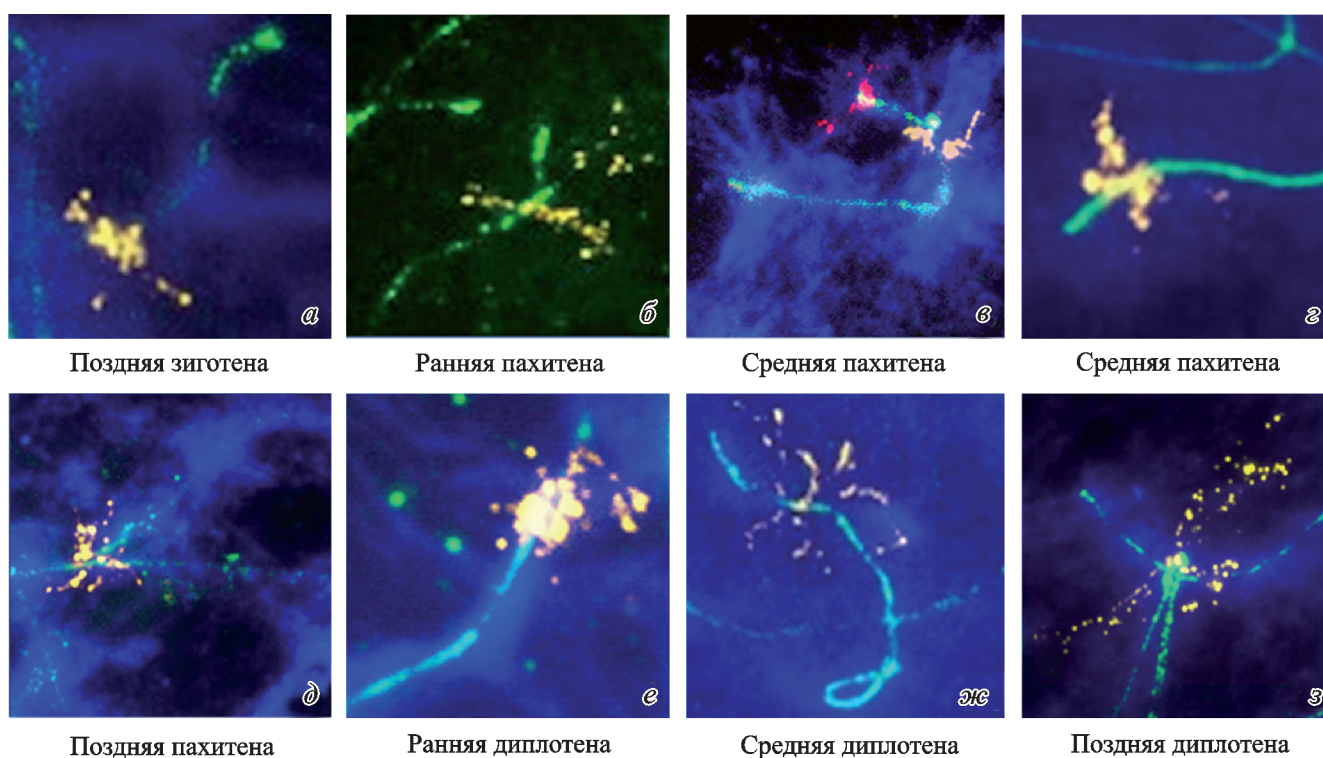


Рис. 2. Результат FISH-анализа с ДНК-зондами размерами 160 и 90 т. п. н. на хромосоме 17 человека на препаратах распластаных сперматоцитов в течение профазы I мейоза.

*a, б* — поздняя зиготена, ранняя пахитена (гибридизационный сигнал в виде полосы); *в, г* — средняя пахитена (гибридизационный сигнал в виде глобулы); поздняя пахитена—ранняя диплотена (гибридизационный сигнал в виде более раздробленных глобул); *д* — поздняя пахитена, *е* — ранняя диплотена; *ж, з* — средняя диплотена, поздняя диплотена (гибридизационный сигнал в виде длинных тонких петель). Окрашивание DAPI — синий сигнал, антитела к SCYP3 — зеленый сигнал, гибридизация с ДНК-зондом 160 т. п. н. — желтый сигнал, гибридизация с ДНК-зондом 90 т. п. н. — красный сигнал.

содержала флуоресцентномеченные ДНК-зонды к двум локусам хромосомы 17 длиной 160 т. п. н. (желтый) и 90 т. п. н. (красный). Перед началом работы тотальные препараты (спреды) синаптонемных комплексов промывали дважды в бидистиллированной воде, наносили 10 мкл гибридационной смеси с пробой, накрывали чистыми покровными стеклами, герметизировали резиновым клеем. Денатурацию проводили при 72 °C в течение 2 мин, затем инкубировали в течение ночи при 37 °C во влажной камере. Аккуратно снимали покровное стекло, отмывали согласно протоколу фирмы-производителя (Metasystems.com, Германия): 3 мин в 0.4× SSC. Препарат высушивали на воздухе при комнатной температуре, заключали в среду для микроскопии Vectashield с красителем DAPI (Vector Laboratories, США) и накрывали покровным стеклом. Препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axioimager D1 (Carl Zeiss, Германия) с наборами фильтров для DAPI (Zeiss Filter set 1), для FITC (Zeiss Filter set 38HE) и для Texas Red (Zeiss Filter set 43HE), оснащенного камерой Axioacam HRm (программное обеспечение Axiovision rel. 4.6, Германия).

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 °C. Препараты трижды отмывали в PBS по 5 мин и инкубировали 2 ч при 37 °C с козьими антикроличьими антителами, конъюгированными с FITC (Abcam, Cambridge, США). Отмывали препараты так же, как по-

сле обработки первыми антителами, и заключали в среду Vectashield с DAPI. Результаты оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axioimager D1 (Carl Zeiss, ФРГ) с наборами фильтров для DAPI (Zeiss Filter set 1) и для FITC (Zeiss Filter set 38HE), оснащенного камерой Axioacam HRm (Carl Zeiss, ФРГ).

Для идентификации субстадий профазы I мейоза (от лептотены до поздней диплотены) мы использовали критерий, предложенный Солари (Solari, 1980) для сперматоцитов мыши, а именно на основе ультраструктуры и конфигурации осевых элементов гетероморфного XY-бивалента, постепенного превращения его в «половой пузырек» и «выселения» на периферию ядра сперматоцита. Эти критерии и этапы процесса можно также найти в главе 16 монографии Богданова и Коломиец (2007).

## Результаты

Флуоресцентные антитела к белку SYCP3 выявляли и окрашивали осевые элементы (axial elements) и синаптонемные комплексы на всех субстадиях профазы I мейоза. Эти субстадии от лептотены до поздней диплотены у человека мы довольно уверенно различали на основе критериев, предложенных Солари (Solari, 1980) для сперматоцитов человека, а именно на основе конфигурации гетероморфного XY-бивалента.

Оба зонда сформировали латеральные морфологические структуры хроматина, контактирующие с осевыми элементами (axial elements) и с СК. Наблюдались различ-

ные морфологические конфигурации этих латеральных структур. Они зависели от субстадий профазы I.

В зиготене оба зонда формировали по две палочки длиной примерно 3 и 6 мкм соответственно, перпендикулярные длинной оси СК, и по одной палочке с каждой стороны от СК (рис. 2, а). На последующих субстадиях наиболее четкие картины мы наблюдали для зонда длиной 160 т. п. н., и дальнейшее описание сделано на основе картин, полученных для этого зонда. Возможно, зонд 90 т. п. н. оказался недостаточно длинным для того, чтобы выявлять протяженные конфигурации хроматина.

В средней пахитене каждый сигнал FISH зонда 160 т. п. н. трансформировался в глобулу, по одной глобуле с каждой стороны СК (рис. 2, в, з). В поздней пахитене — ранней диплотене каждая глобула превращалась в две раздробленные (рыхлые) глобулы, которые содержали короткие нити и глыбки хроматина (рис. 2, д, е). В средней и поздней диплотене глобулы, наконец, превращались в тонкие петли ДНК (хроматина), имевшие длину (от основания до вершины) до 10 мкм, с периодическими утолщениями (бусинами) вдоль их длины (рис. 2, ж, з). В результате этой динамики по каждую сторону от СК хромосомы 17 формировались две петли хроматина с бусинами. Эти петли, наиболее вероятно, являются петлями сестринских хроматид. В каждом сайте СК (бивалента) наблюдались четыре хроматиды, точнее две пары.

Петли хроматина наиболее четко видны на стадии ранней диплотены. Их можно проследить по обе стороны от СК. Интенсивность сигнала на протяжении длины петель неодинакова, могут наблюдаться усиления или, наоборот, ослабления или бреши. Это может объясняться особенностью метода FISH. Гибридизационная смесь содержит кроме зонда также и немеченую Cot I-ДНК, которая гибридизуется в хроматине с множеством повторяющихся последовательностей во избежание неспецифического связывания зонда с последними.

## Обсуждение

В результате проведенного нами подробного наблюдения всех последовательных субстадий профазы I в сперматоцитах человека мы можем создать представление о последовательности морфологических изменений хроматина, прикрепляющегося к СК. Наблюдавшиеся нами микроскопические картины хромосом (бивалентов) в профазе I, сочетающие флуоресцентно окрашенные синаптонемные комплексы и флуоресцирующие протяженные ДНК-зонды, в целом соответствуют наблюдениям предшествующих авторов (Heng et al., 1994; Heng, Tsui, 1998; Froenicke et al., 2002; Pigozzi, 2007), за исключением того, что никто из этих авторов не описывал в сперматоцитах млекопитающих расправленных петель, напоминающих петли ламповых щеток ооцитов. Начиная с ранней публикации Е. Е. Погосянц (1971) на препаратах пахитенных хромосом хомячка, окрашенных ацетокармином, и заканчивая статьями цитированных выше авторов, в сперматоцитах млекопитающих наблюдались картины пахитенных хромосом в виде щеточек или «ершиков».

В исследованиях способа присоединения к синаптонемным комплексам сегментов ДНК, гибридизованных с флуоресцентными зондами (Heng et al., 1994; Heng, Tsui, 1998; Froenicke et al., 2002; Pigozzi, 2007), те или иные длинные (порядка десятков т. п. н.) последовательности нуклеотидов ДНК, выявляемые с помощью FISH, всегда

наблюдались как латеральные суперскрученные структуры хроматина, и четких картин именно петель хроматина выявлено не было. Тем не менее во всех моделях (рисунках) СК (Nebel, Coulon, 1962; Zickler, Kleckner, 1999; Stack, Anderson, 2001) фигурирует организация хроматина в виде расправленных петель, прикрепленных к латеральным элементам СК. Наше наблюдение латеральных петель хроматина хорошо соответствует картинам, которые Небель и Кулон смоделировали в результате 3D-реконструкции ультратонких срезов пахитенных сперматозоидов голубя (Nebel, Coulon, 1962). Таким образом, расправленные петли хроматина в профазе I мейоза у человека нами визуализированы впервые.

Были предприняты попытки выяснить результат введения в хромосому 4 мыши большой вставки гетерологичной ДНК, превышающей размеры латеральных петель хроматина на стадии пахитены (Heng et al., 1994). Эти авторы обнаружили, что такая вставка, содержащая 1.8 м.п.н. ДНК фага  $\lambda$  и 11.4 м.п.н. бактериальных и мышечных ДНК-повторов, оказалась неспособной формировать регулярные латеральные петли хроматина в контакте с латеральными элементами СК на стадии пахитены. Таким образом, должно существовать определенное ограничение длины «вставки» ДНК в хромосому, которое не позволяет исказить нормальную морфологию хромосомы.

В противоположность этому те эксперименты, в которых в качестве ДНК-зондов использовали собственные сегменты ДНК, гомологичные последовательностям изучаемых хромосом, наблюдали одинаковые картины: флуоресцирующий ДНК-зонд выглядел как более или менее прямая «палочка», перпендикулярная оси пахитенного бивалента. Структуры, похожей на латеральную петлю, не наблюдалось (Froenicke et al., 2002; Pigozzi, 2007).

Вполне возможно, что разрыхлению или деконденсации суперскрученных петель хроматина в поздней пахитене и диплотене способствуют условия гипотонии, применяемой при спредировании сперматозоидов.

Наши наблюдения постепенного разворачивания компактных структур (сигналов FISH) в рыхлые глобулы, а затем в петли вполне соответствует той активности, которую хромосомы проявляют во время профазы I мейоза. Эта стадия соответствует большому росту сперматозоидов. У млекопитающих он выражен не так сильно, как например у насекомых, однако в обоих случаях профазы I характеризуется двухфазным изменением многих признаков ядра и цитоплазмы (Ляпунова, Богданов, 1975). Синтез РНК на хромосомах заметен на стадии лептотены, затем он снижается и возрастает вновь, начиная с поздней пахитены и на протяжении диплотены. Также двухфазно происходят увеличение объема ядра и прирост сухой массы ядра, измеряемой методом количественной интерференционной микроскопии (Liapunova, Vabadjanian, 1973). Таким образом, разворачивание компактного (вероятно, суперспирализованного) меченного флуорохромом сегмента ДНК в рыхлые петли на стадиях поздней пахитены и диплотены согласуется с теоретически ожидаемым увеличением транскрипционной активности пахитенных и диплотенных хромосом.

Согласно исследованиям дифференциальной экспрессии клеток (анализ профиля мРНК) зародышевой линии мыши (Shima et al., 2004), наибольшие изменения в экспрессии генома клеток зародышевой линии происходят после инициации мейоза и появления сперматозоидов, затем после появления сперматид. Во многом это связано с большим количеством уникальных генов, необходимых

для начала и поддержания мейоза и в конечном итоге дифференцировки зрелых сперматозоидов. Авторы отмечают, что именно через 14 сут post partum, т. е. в период, когда сперматоцитов больше, чем сперматид, выявляются наиболее значительные изменения транскриптома. Многие из этих генов, казалось бы, могут быть экспрессированы и транслированы гораздо позже, в конце сперматогенеза. Но вместо этого их активная транскрипция начинается почти на 20 сут раньше срока появления зрелых сперматозоидов. Авторы отмечают, что многие из морфологических и биохимических характеристик сперматозоидов инициируются экспрессией специфических генов именно во время мейоза, а не после завершения обоих мейотических делений.

В работе (Waldman Ben-Asher et al., 2010) была исследована транскрипционная активность 790 различных генов мыши по стадиям мейоза. На стадии перехода от поздней зиготены к ранней пахитене обнаружена смена транскрипционной программы. Результаты, полученные авторами, позволяют предположить, что кульминационное событие физического обмена генетическим материалом между гомологичными хромосомами, которое происходит в ранней пахитене, требует очень точного и уникального транскриптома. Клетки готовятся к этому событию, активизируя конкретные гены, и временно супрессируют любые гены, которые могут помешать (например, гены, связываемые с апоптозом, супрессируются в период образования двойных разрывов ДНК). Стадию ранней пахитены авторы называют ключевой и бурной с точки зрения транскрипционной активности (Waldman Ben-Asher et al., 2010). В отличие от этого мы наблюдали, что выбранный нами локус с маркером в хромосоме 17 человека по визуальным морфологическим признакам максимально активируется на стадии поздней пахитены. В пересчете на абсолютное время эта разница может составлять несколько часов по сравнению со средним временем максимальной массовой активации генов в мейозе у мыши. На фоне примерно 2-недельной длительности мейоза и 6-часовой длительности стадии пахитены в сперматоцитах мыши (Ляпунова, Богданов, 1975) наблюдавшееся нами расхождение в максимумах активации 1 локуса и 790 локусов, специфически активирующихся во время профазы мейоза, невелико, и наши наблюдения скорее совпадают с общей картиной, чем противоречат ей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00666-а).

## Список литературы

- Богданов Ю. Ф. 1975. Ультраструктура хромосом в мейозе и синаптонемный комплекс. В кн.: Цитология и генетика мейоза. М.: Наука. 58—95.
- Богданов Ю. Ф., Коломиец О. Л. 2007. Синаптонемный комплекс — индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом. М.: Товарищество научных изданий КМК. 358 с.
- Ляпунова Н. А., Богданов Ю. Ф. 1975. Физиология, цитохимия и биохимия мейоза. В кн.: Цитология и генетика мейоза. М.: Наука. 138—183.
- Погосянц Е. Е. 1971. О некоторых особенностях мейоза у млекопитающих. Цитология. 13 (4) : 447—453.
- Спангенберг В. Е., Дадашев С. Я., Коломиец О. Л., Богданов Ю. Ф. 2011. Повторяющиеся последовательности ДНК могут принимать участие в формировании синаптонемных комплексов. Цитология. 53 (3) : 235—241.
- Спангенберг В. Е., Дадашев С. Я., Матвеевский С. Н., Коломиец О. Л., Богданов Ю. Ф. 2010. Каким образом хромосомы прикрепляются к синаптонемным комплексам? Генетика. 46 (10) : 1363—1366.
- Froenicke L., Anderson L. K., Wienberg J., Ashley T. 2002. Male mouse recombination maps for each autosome identified by chromosome painting. Amer. J. Hum. Genet. 71 : 1353—1368.
- Heng H. H., Tsui L. C. 1998. High resolution free chromatin/DNA fiber fluorescent *in situ* hybridization. J. Chromatogr. A. 806 : 219—229.
- Heng H. H., Tsui L. C., Moens P. B. 1994. Organization of heterologous DNA inserts on the mouse meiotic chromosome core. Chromosoma. 103 : 401—407.
- Liapunova N. A., Babadjanian D. P. 1973. A quantitative study of histones in meiocytes. Investigation of the histone amount in cricket spermatogenesis by interference microscopy. Chromosoma. 40 : 387—399.
- Nebel B. R., Coulon E. M. 1962. The fine structure of chromosomes in pigeon spermatocytes. Chromosoma. 13 : 272—291.
- Pigozzi M. I. 2007. Localization of single-copy sequences on chicken synaptonemal complex spreads using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Cytogenet. Genome Res. 119 : 105—112.
- Rattner J. B., Goldsmith M. R., Hamcalo B. A. 1981. Chromosome organization during male meiosis in *Bombyx mori*. Chromosoma (Berl.). 82 : 341—351.
- Shima J. E., McLean D. J., McCarrey J. R., Griswold M. D. 2004. The murine testicular transcriptome: characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis. Biol. Reprod. 71 : 319—330.
- Solari A. J. 1980. Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. Chromosoma. 81 : 315—337.
- Stack S. M., Anderson L. K. 2001. A model for chromosome structure during the mitotic and meiotic cell cycles. Chromosome Res. 9 : 175—198.
- Waldman Ben-Asher H., Shahar I., Yitzchak A., Mehr R., Don J. 2010. Expression and chromosomal organization of mouse meiotic genes. Mol. Reprod. Develop. 77 : 241—248.
- Zickler D., Kleckner N. 1999. Meiotic chromosomes: integrating structure and function. Ann. Rev. Genet. 33 : 603—754.

Поступила 26 I 2012

MORPHOLOGICAL MANIFESTATION OF A UNIQUE DNA SEGMENT  
IN HUMAN MEIOTIC PROPHASE I

Yu. F. Bogdanov,<sup>1</sup> V. E. Spangenberg,<sup>1</sup> S. Ya. Dadashev,<sup>1</sup> I. I. Vitiyazeva,<sup>2</sup>  
S. V. Bogolyubov,<sup>2</sup> O. L. Kolomiets<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> N. I. Vavilov Institute of General Genetics RAS and <sup>2</sup> Endocrinology Research Centre, Moscow;  
\* e-mail: olkolomiets@mail.ru

The commercial sample of human DNA fragment from the chromosome 17 was used as the probe for FISH to study of the mode of its attachment to the lateral elements of synaptonemal complex (SC) in human spermatocytes. It was a 160 kb probe from the band 17p1.2, containing RAI1 gene with D17S620 marker (the probe for deletion causing Smith—Magenis syndrome). The probe made lateral chromatin protrusions, contacting with SC stained with anti-SYCP3. Different morphological configuration of lateral chromatin protrusions were observed. They depended on substages of meiotic prophase I. At zygotene, FISH probe form two sticks, c. a. 6  $\mu$  long, which was perpendicular to SC longitudinal axe, one stick at each SC side. At early pachytene, each stick transforms into a globule, one globule at each SC side again. At late pachytene each globule transformed into two crumbly globules containing short threads and clumps. At diplotene, globules finally transformed into thin DNA (chromatin) loops up to 10  $\mu$  long from the base to top with periodical thickenings (beads) along their length. As the result of this dynamics of transformation, two chromatin loops with beads were found on each side of SC of the chromosome 17. These loops most probably were the loops of sister chromatides, the full set of chromatide loops at the particular SC (bivalent) site being four in number, i. e. representing of two pair of chromatides. This study is the first one in which lateral chromatin loops in human male meiotic prophase I are visualized as true open loop instead of that usually postulated «loops» after observation of condensed rod-like or brush-like chromatin protrusion attached to the lateral elements of synaptonemal complexes. Open configuration of the loops, presumably, depends on activation of transcription during late pachytene-early diplotene. They resemble lateral loops of mini lampbrush chromosomes.

**Key words:** meiosis, prophase I, synaptonemal complex, fluorescent hybridization *in situ*, lateral chromatin loops.