

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМОСОМ В МЕЙОЗЕ

© Т. М. Гришаева, В. Е. Спангенберг, О. Л. Коломиец,
С. Я. Дадашев, Ю. Ф. Богданов

Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва;
электронный адрес: grishaeva@vigg.ru

Мейотические и митотические хромосомы имеют комплекс различий. 1. В ранней профазе I мейоза хромосомы приобретают белковые осевые элементы (ОЭ), которых не было в митозе; ОЭ содержат в дополнение к соматическим когезинам мейоз-специфичные когезины REC8, SMC1 β и STAG3. 2. В средней профазе I на основе ОЭ формируются белковые латеральные элементы (ЛЭ) синаптонемных комплексов (СК). Белки ЛЭ не консервативны, но у *Saccharomyces cerevisiae* и *Arabidopsis thaliana* они содержат функциональные домены с консервативной вторичной структурой. Среди почти 679 тыс. белков примитивных эукариот, изученных нами методами биоинформатики, у зеленых и бурых водорослей, некоторых низших грибов и у кишечнополостных животных обнаружены белки или функциональные домены, сходные с белками СК. 3. В ходе стадий пахитены и диплотены мейоза хромосомы сперматоцитов и материнских клеток пыльцы приобретают структуру, в миниатюре напоминающую структуру типа ламповых щеток, характерную для хромосом ооцитов амфибий и птиц. В сперматоцитах человека на стадии диплотены наблюдаются латеральные петли хроматид размером в 90, 160 и даже более 480 т. п. н. Все вместе эти наблюдения подтверждают весьма высокую консервативность схемы молекулярной и ultraструктурной организации мейотических хромосом у широкого ряда эукариотических организмов.

Ключевые слова: мейоз, когезины, синаптонемные комплексы, белки, латеральные петли хроматид.

Морфологическая структура хромосом в мейозе по многим признакам отличается от структуры хромосом в соматическом митозе у тех же организмов. Еще в 1935 г. супруги Сакс (Sax, Sax, 1935) сообщили, что у лилии *Lilium regale* средняя длина хромосом в профазе I мейоза составляет 83 мкм, а в профазе митоза (в кончиках корней) — лишь 35 мкм. Электронная микроскопия позволила выявить причину столь большой длины мейотических хромосом в профазе I (и соответственно их малой конденсации и малой толщины). Причиной служит появление белковых осевых элементов (ОЭ) — «сердечников» — вдоль всей длины хромосомы во время лептотены и зиготены (рис. 1). ОЭ формируются на основе белков-когезинов, соединяющих сестринские хроматиды (Revenkova, Jessberger, 2005).

В дополнение к соматическим когезинам RAD21, SMC1 и STAG1/2 в премейотической интерфазе, а затем на стадиях лептотены и пахитены в хромосомах появляются их ортологи, мейоз-специфичные когезины REC8, SMC1 β и STAG3 соответственно (Parisi et al., 1999; Pezzi et al., 2000; Revenkova et al., 2001). Появление новых когезинов в составе ОЭ млекопитающих происходит в таком порядке: Rec8 + SMC1 β + STAG3 (Pezzi et al., 2000; Eijpe et al., 2003). На стадии зиготены ОЭ служит основой для построения латеральных элементов (ЛЭ) синаптонемного комплекса (Revenkova, Jessberger, 2005). Мажорные белки ЛЭ у млекопитающих (SYCP2 и SYCP3) не имеют гомологии с белками ЛЭ синаптонемных комплексов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Hop1 и Red1) и растения *Arabidopsis thaliana* (ASY1 и ASY2). Однако у белков, формирующих центральный элемент СК, наблю-

дается сходство вторичной структуры (Heyting, 1996; Богданов и др., 2002, 2008; Page, Hawley, 2004; Bogdanov et al., 2007; Богданов, 2008).

Длина хромосом в профазе I мейоза зависит от присутствия когезинов, специфичных для мейоза. Хромосомы мыши, лишенные белка SMC1 β в результате нокаута гена *Smc1 β* , становятся в 2 раза короче, чем у дикого типа (Revenkova, Jessberger, 2006). Этот эксперимент служит доказательством растягивания профазных мейотических хромосом за счет добавления к ним новых когезиновых колец, содержащих мейотический когезин SMC1 β .

Мейотические хромосомы имеют петельно-осевую структуру. Размер петель хроматина в сперматоцитах человека может варьировать от 100 до 800 т. п. н. (Zickler, Kleckner, 1999; Kleckner, 2006). Однако динамика структуры петель хроматина в профазе I мейоза долго оставалась неизвестной.

В настоящей работе мы кратко излагаем результаты наших исследований, относящихся к эволюционным аспектам структуры белков, формирующих синаптонемные комплексы, и к организации латеральных петель хроматина в профазных мейотических хромосомах.

Материал и методика

Методами *in silico* со были исследованы практически все известные к настоящему времени белки синаптонемного комплекса (СК) семи модельных видов эукариот от дрожжей до мыши (кроме белков человека, всего

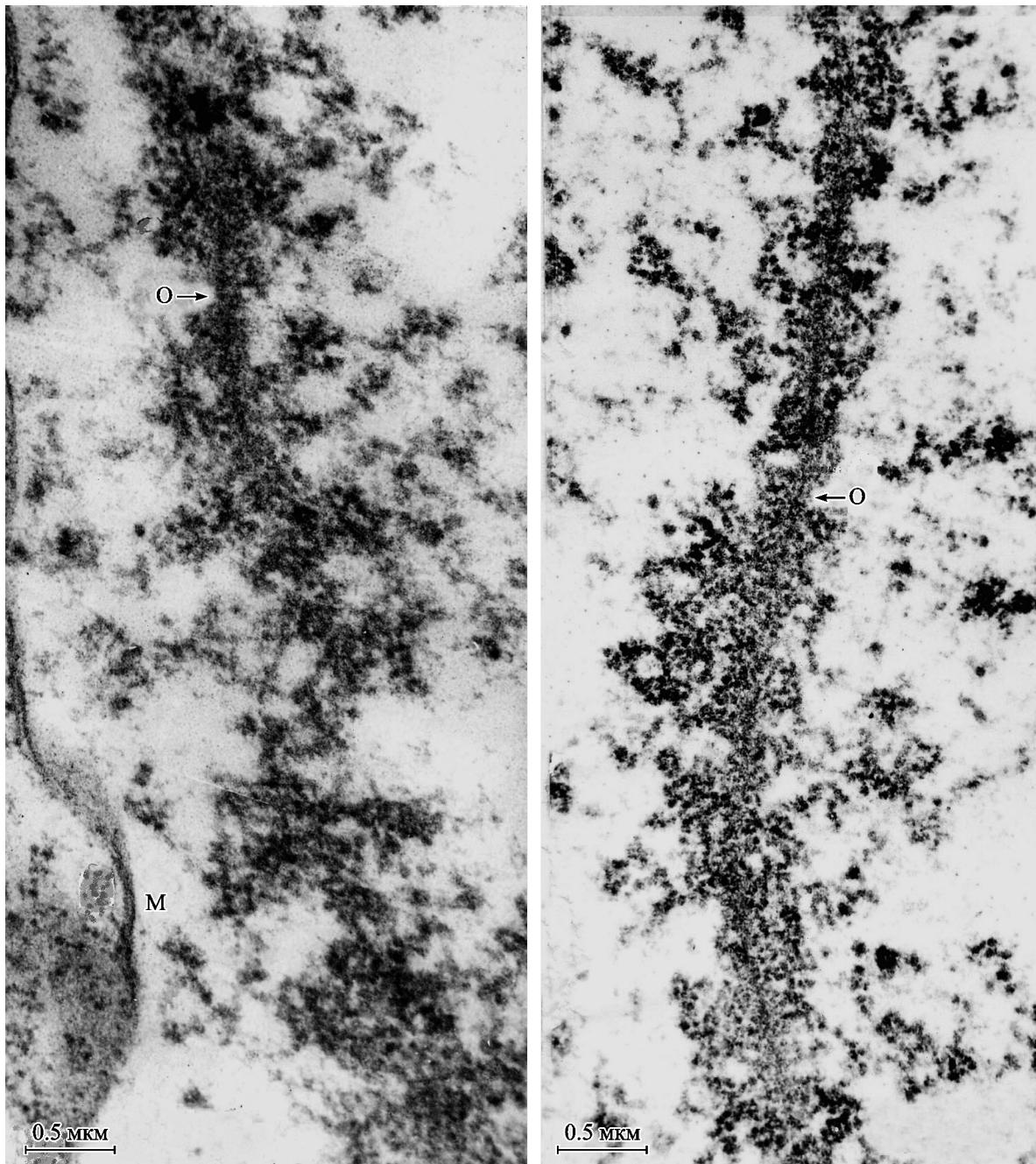


Рис. 1. Электронно-микроскопические фотографии двух ультратонких срезов микроспороцитов лилии *Lilium candidum*, на которых видны осевые элементы (О) хромосом на стадии зиготены мейоза.
М — ядерная оболочка.

33 белка). Аминокислотные последовательности белков СК искали в базах данных NCBI и UniProtKB/TrEMBL. В качестве контроля использовали случайные аминокислотные последовательности, генерированные из оригинальных белков программой RandSeq. С помощью программы Protein BLAST (NCBI) вели поиск сходных последовательностей в протеомах водорослей, низших грибов, простейших и кишечнополосстых животных. Результатом работы программы BLAST является интегральный показатель сходства Score, учитывающий три параметра: количество совпадающих аминокислот, количество аминокислот одного типа и количество gaps (пропусков в одной из сравниваемых последовательностей).

Семенные каналцы получали с помощью микрохирургической биопсии яичка пациентов (совместно с врачами Эндокринологического научного центра Минздравсоцразвития РФ). Работу проводили на распластанных ядрах сперматоцитов I порядка человека (подробнее см.: Богданов и др., 2012). Для флуоресцентной гибридизации (FISH) в качестве ДНК-зондов были использованы три коммерческие локус-специфичные пробы ДНК к трем локусам хромосомы 1 человека, расположенные последовательно одна за другой, общей длиной 487 991 н. п. Зонды получены из геномной библиотеки RPCI-11 human BAC library, Empire Genomics, США. С целью идентификации разных участков хроматина эти три зонда были конъюги-

рованы с разными флуорохромами. Для иммунофлуоресцентного окрашивания ЛЭ СК использовали антитела к белку SYCP3 (Abcam, Cambridge, США).

Результаты и обсуждение

Белки синаптонемных комплексов. Нами установлено, что наибольшим сходством с известными белками синаптонемного комплекса обладают белки, несущие общие с ними функциональные домены. Прежде всего это белки с доменом HORMA, узнающим состояние хроматина и рекрутирующим другие белки (у бурых и зеленых водорослей, некоторых низших грибов и кишечнополостных животных). Они проявили сходство с такими белками СК, как Hop1 дрожжей (максимальный Score составляет 106), HIM-3 нематоды (68), ASY1 и ASY2 арабидопсиса (наивысшие показатели — 163 и 117 соответственно). Видимо, такие белки имеют широкое распространение у всех эукариот.

Меньшим сходством с белками примитивных эукариот обладают белки СК, несущие домены SMC, Smc и SYCP, отвечающие за взаимодействие с хроматином. Это белки C(3)G дрозофилы, Zip1 дрожжей, ZYP1a, ZYP1b *A. thaliana* и SYCP1 мыши и рыбы *Danio* (максимальная величина Score от 50 до 65).

Стабильно высоким сходством с белками примитивных эукариот и кишечнополостных животных обладает компонент СК — фермент FKBP6, аннотированный в качестве компонента СК пока лишь у мыши (максимальный Score 194 для кишечнополостных). Он имеет дальних родственников даже в протеомах прокариот — эубактерий и архей (максимальные показатели сходства 77 и 41 соответственно; наши данные).

Наиболее интересным результатом является обнаружение у кишечнополостных животных белков, сходных с белками латеральных элементов СК высших эукариот — SYCP3 мыши и рыбы *Danio* (Score: 143—148), белками SC65 мыши и рыбы (Score: 100—105), аннотированными просто как белки СК, и в меньшей степени — с белками SYCE2 мыши и рыбы *Danio*, входящими в состав центрального элемента СК (Score: 52—63).

Интересен также обнаруженный нами факт, что в протеомах хоанофлагеллят, считающихся ближайшими родственниками Metazoa среди одноклеточных животных (King et al., 2008), нет белков, имеющих высокую степень сходства с каким-либо известным белком СК. Это свидетельствует о том, что белки СК появились у более высокоорганизованных эукариот.

Таким образом, белки синаптонемных комплексов модельных для исследования мейоза организмов имеют родственные белки среди бурых и зеленых водорослей, некоторых низших грибов и кишечнополостных животных. Эти сравнительные исследования будут продолжены в интересах изучения эволюции мейоза.

Морфология фибрill хроматина в мейозе. Мы предполагали, что в связи с изменением длины СК в мейозе у человека должна меняться и длина петель хроматина. Это предположение возникло на основании того, что у самцов млекопитающих СК короче, а петли хроматина длиннее, чем у самок (Revenkova, Jessberger, 2006). При использовании зондов к расположенным друг за другом фрагментам ДНК хромосомы 1 человека мы наблюдали длинные меченные участки, явно принадлежащие к одной петле хроматина (рис. 2). Однако мы не видели

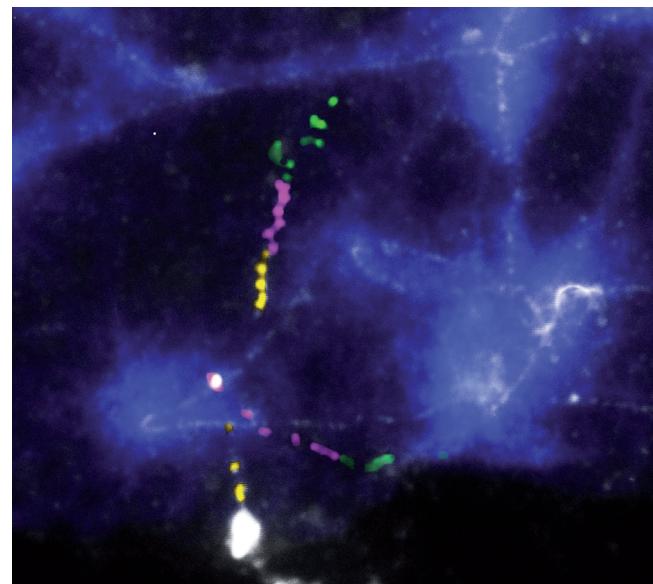


Рис. 2. Распластанное ядро сперматоцитов человека, стадия пахитены.

Хроматин окрашен красителем DAPI. Белые линии — синаптонемные комплексы, окрашенные антителами к белку SYCP3. In situ-гибридизация с тремя ДНК-зондами к расположенным друг за другом последовательностям нуклеотидов хромосомы 1 — желтый, фиолетовый и зеленый флуоресцентные сигналы (см. текст).

петли, меченный целиком, метился лишь участок петли. На ранних стадиях профазы I мейоза гибридизационные сигналы от 3 зондов располагались либо друг за другом на одной линии, представляя как бы одну ветвь петли (восходящую или нисходящую), либо имели вид сжатых глобул. Удивительно, что сигнал всегда находился на удалении от СК. Следовательно, мы не смогли пометить район петли, контактирующий с СК. На основании этих наблюдений мы заключаем: 1) длина петли хроматина в мейозе у человека может достигать как минимум двойной длины нашего зонда — около 1 млн н. п.; 2) мы подтверждаем наблюдения других авторов о том, что организация хромосом по типу ламповых щеток — общий принцип организации профазных хромосом в мейозе не только в оогенезе, но и во время сперматогенеза.

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

Список литературы

- Богданов Ю. Ф. 1983. Ультраструктура хромосом и синаптонемного комплекса в профазе I мейоза у лилии. Цитология. 25 (1) : 17—24.
- Богданов Ю. Ф. 2008. Эволюция мейоза одноклеточных и многоклеточных эукариот. Ароморфоз на клеточном уровне. Журн. общей биол. 62 (2) : 102—117.
- Богданов Ю. Ф., Гришаева Т. М., Карпова О. И., Пенкина М. В. 2008. Роль специфических белков в эволюции мейоза. В кн.: Современные проблемы биологической эволюции: труды конференции. К 100-летию Государственного Дарвиновского музея. 17—20 сентября 2007. М.: Изд-во ГДМ. 7—30.
- Богданов Ю. Ф., Дадашев С. Я., Гришаева Т. М. 2002. Сравнительная геномика и протеомика дрозофилы, нематоды

Бреннера и арабидописса. Идентификация функционально сходных генов синаптосома мейотических хромосом. Генетика. 38 (8) : 1078—1089.

Богданов Ю. Ф., Спэнгелберг В. Е., Дадашев С. Я., Витязева И. И., Боголюбов С. В., Коломиец О. Л. 2012. Морфологическое проявление в профазе I мейоза человека уникального сегмента ДНК. Цитология. 54 (8) : 603—608.

Bogdanov Y. F., Grishaeva T. M., Dadashev S. Y. 2007. Similarity of the domain structure of proteins as a basis for the conservation of meiosis. Int. Rev. Cytol. 257 : 83—142.

Eijpe M., Offenberg H., Jessberger R., Revenkova E., Heyting C. 2003. Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1 and SMC3. J. Cell Biol. 160 : 657—670.

Heyting C. 1996. Synaptonemal complex: structure and function. Curr. Opin. Cell Biol. 8 : 389—396.

King N., Westbrook M. J., Young S. L., Kuo A., Abedin M., Chapman J., Fairclough S., Hellsten U., Isogai Y., Letunic I., Marr M., Pincus D., Putnam N., Rokas A., Wright K. J., Zuzow R., Dirks W., Good M., Goodstein D., Lemons D., Li W., Lyons J. B., Morris A., Nichols S., Richter D. J., Salamov A., Sequencing J. G., Bork P., Lim W. A., Manning G., Miller W. T., McGinnis W., Shapiro H., Tjian R., Grigoriev I. V., Rokhsar D. 2008. The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. Nature. 451 : 783—788.

Kleckner N. 2006. Chiasma formation: chromatin/axis interplay and the role(s) of the synaptonemal complex. Chromosoma. 115 : 175—194.

Page S. L., Hawley R. S. 2004. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. Annu. Rev. Cell Develop. Biol. 20 : 525—558.

Parisi S., McKay M. J., Molnar M., Thompson M. A., van der Spek P. J., van Drunen-Schoenmaker E., Kanaar R., Lehmann E., Hoeijmakers J. H., Kohli J. 1999. Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the Rad21p family conserved from fission yeast to humans. Mol. Cell. Biol. 19 : 3515—3528.

Pezzi N., Prieto I., Kremer L., Jurado L. A. P., Valero C., del Mazo J., Martinez A. C., Barbero J. L. 2000. STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams—Beuren syndrome deletion. FASEB J. 14 : 581—592.

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., Jessberger R. 2005. Keeping sister chromatids together: cohesins in meiosis. Reproduction. 130 : 783—790.

Revenkova E., Jessberger R. 2006. Shaping meiotic prophase chromosomes: cohesins and synaptonemal complex proteins. Chromosoma. 115 : 235—240.

Sax H. J., Sax K. 1935. Chromosome structure and behavior in mitosis and meiosis. J. Arn. Arboretum. 16 : 423—439.

Zickler D., Kleckner N. 1999. Meiotic chromosomes: integrating structure and function. Ann. Rev. Genet. 33 : 603—754.

Поступила 26 XI 2012

THE PECULIARITIES OF THE CHROMOSOME ORGANIZATION IN MEIOSIS

T. M. Grishaeva, V. E. Spangenberg, O. L. Kolomiets, S. Ya. Dadashev, Yu. F. Bogdanov

N. I. Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow; e-mail: grishaeva@vigg.ru

Meiotic and mitotic chromosomes differ in a number of features. 1. At the early prophase I of meiosis, chromosomes acquire proteinaceous axial elements (AEs) which were absent at mitosis. In addition to somatic cohesins, AEs contain meiosis-specific cohesins REC8, SMC1 β , STAG3. 2. At the middle prophase I, proteinaceous lateral elements (LEs) of synaptonemal complexes (SC) are shaped on a basis of AEs. Proteins of LEs are not conserved, but in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana* they contain functional domains with conserved secondary structure. Proteins or functional domains similar to SC proteins have been found in green and brown algae, some of lower fungi and in Coelenterata amongs about 679 hundreds of proteins of primitive eukaryotes studied with bioinformatic methods. 3. During the pachytene and diplotene stages of meiosis, chromosomes of spermatocytes and mother pollen cells acquire the structure resembling in miniature the structure of amphibian and avian lamp brush chromosomes. Lateral chromatin loops of 90, 160 and more than 480 Kb in size are observed in human spermatocytes during the diplotene stage. Taken together, these findings support the idea of considerable conservation of the scheme of molecular and ultrastructural organization of meiotic chromosomes in a variety of eukaryotic organisms.

Key words: meiosis, cohesins, synaptonemal complexes, proteins, lateral chromatid loops.