

## ХРОМОСОМЫ ТИПА ЛАМПОВЫХ ЩЕТОК КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЛОКУСОВ ФОРМИРОВАНИЯ ЯДЕРНЫХ ДОМЕНОВ

© А. В. Красикова,<sup>1</sup> Т. В. Куликова, А. М. Злотина

*С.-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 198504;*

<sup>1</sup>электронный адрес: [alla.krasikova@gmail.com](mailto:alla.krasikova@gmail.com)

Ядерные домены можно подразделить на две основные группы: те, которые формируются свободно в нуклеоплазме, и те, которые образуются в определенных участках хромосом в результате их активности. Преимущества гигантских транскрипционно активных хромосом типа ламповых щеток для изучения ядерных телец, формирующихся в определенных локусах хромосом, были продемонстрированы в ряде работ. Мы предлагаем использовать две стратегии для анализа локусов формирования ядерных доменов на гигантских хромосомах типа ламповых щеток, характерных для ядер растущих ооцитов птиц и амфибий. Первый подход основан на последовательном картировании ВАС-клонов, содержащих фрагменты геномной ДНК с известной позицией на хромосомах, недалеко от места образования ядерных доменов. Второй подход основан на механической микродиссекции районов хромосом, прилежащих к определенной ядерной структуре. ДНК из диссектированного материала можно амплифицировать с помощью ПЦР с вырожденными праймерами и картировать с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) на препаратах изолированных хромосом. Перспективным представляется также использование высокопроизводительного секвенирования (next generation sequencing, NGS) для последующей расшивки последовательностей ДНК районов формирования ядерных структур. Секвенированные фрагменты могут быть выровнены против референсного генома, с тем чтобы точно определить локусы, ответственные за инициацию сборки ядерных доменов. В настоящем обзоре даны представления о возможностях применения двух взаимодополняющих стратегий для изучения ядерных доменов, ассоциированных с хромосомами типа ламповых щеток.

**Ключевые слова:** микродиссекция хромосом, тельце гистонового локуса, флуоресцентная гибридизация *in situ*, ядерное тельце.

**Принятые сокращения:** FISH — флуоресцентная гибридизация *in situ*, NGS — next generation sequencing, ПЦР — полимеразная цепная реакция.

Значительные усилия последних лет были направлены на установление механизмов формирования динамичных ядерных доменов. Внутриядерные домены, или тельца, обогащенные определенными наборами маркерных компонентов, можно подразделить на две основные группы. Существенная часть морфологически выраженных ядерных телец формируется свободно в нуклеоплазме (Spector, 2006; Ходюченко, Красикова, 2014). Другая часть ядерных доменов образуется в определенных локусах хромосом в результате их транскрипционной или иной функциональной активности (Shevtsov, Dundr, 2011; Dundr, 2012). Организация таких внутриядерных телец подчиняется общим принципам. Одним из наиболее ярких примеров ядерных телец, ассоциированных с хромосомами, может служить ядрышко, которое собирается в районе ядрышкового организатора в ответ на транскрипцию генов рибосомных РНК с помощью РНК полимеразы I. Вместе с тем локусы формирования значительной части ядерных доменов в настоящее время все еще остаются неизвестными. В связи с этим идентификация участков генома, ответственных за инициацию сборки ядерных доменов, представляется актуальной.

Благодаря внедрению новых методик исследования хромосомы типа ламповых щеток амфибий и птиц стали перспективными объектами для изучения структуры хромосом и ассоциированных с ними телец (Morgan, 2002; Gaginskaya et al., 2009). Преобразование хромосом в форму хромосом типа ламповых щеток сопровождается значительной интенсификацией транскрипции и деконденсацией хроматина. В результате хромосомы типа ламповых щеток становятся в 30—200 раз длиннее соответствующих метафазных хромосом (Callan, 1986; Derjusheva et al., 2003; Gaginskaya et al., 2009). Следует отметить, что гигантские хромосомы типа ламповых щеток могут быть микрохирургически освобождены из ядер растущих ооцитов.

Наши предыдущие исследования были сконцентрированы на хромосомах типа ламповых щеток амфибий и птиц. Результаты проведенных исследований показали, что хромосомы типа ламповых щеток из растущих ооцитов имеют целый ряд преимуществ для изучения спектра транскрибируемых последовательностей ДНК, механизмов регуляции транскрипции, процессинга и функционирования различных типов РНК. К таким преимуществам относятся возможность с высоким уровнем разреше-

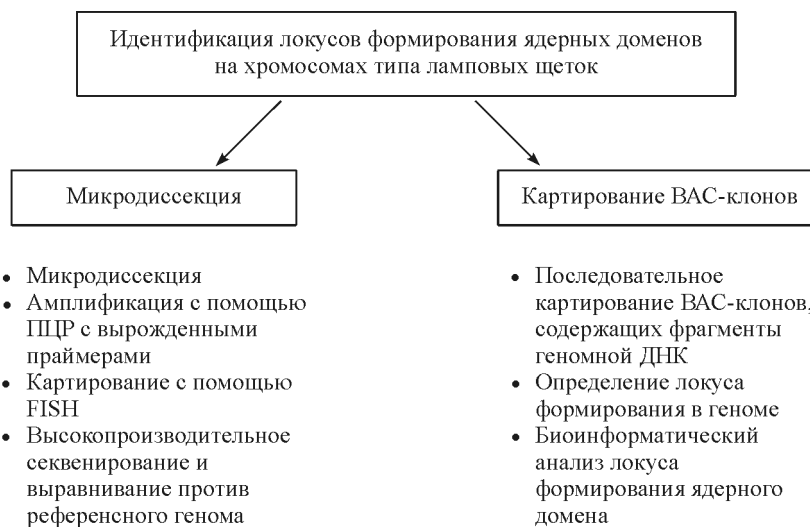


Рис. 1. Схема современных подходов к определению локусов формирования ядерных доменов с использованием в качестве модельного объекта хромосом типа ламповых щеток.

ния картировать транскрибируемые последовательности ДНК, проведение микродиссекции определенных участков хромосом, идентификация на цитологическом уровне отдельных транскрипционных единиц (Morgan, 2002; Gaginskaya et al., 2009). Кроме того, хромосомы типа ламповых щеток позволяют анализировать котранскрипционные этапы процессинга РНК, изучать динамику РНП- и белковых комплексов непосредственно в местах синтеза РНК и определять локусы формирования маркерных структур.

Преимущества хромосом типа ламповых щеток амфибий и птиц для изучения ядерных телец, формирующихся в определенных локусах хромосом, были продемонстрированы в ряде работ (Gall et al., 1981; Callan et al.,

1991; Solovei et al., 1992; Krasikova et al., 2004). Так, с использованием хромосом типа ламповых щеток амфибий в качестве модельного объекта были впервые охарактеризованы такие ядерные тельца, как тельца гистонового локуса и «жемчужины» (Nizami et al., 2010; Nizami, Gall, 2012). Различные маркерные структуры, формирующиеся на хромосомах типа ламповых щеток, включая ядрышки, коилинсодержащие тельца, сферические тельца неизвестной природы, разнообразные «сложные» петли с различной морфологией РНП-матрикса и гранулы, были нанесены на цитологические «рабочие карты» хромосом (Callan, Lloyd, 1975; Penrad-Mobayed et al., 2009; Dedukh et al., 2013). Важно подчеркнуть, что многие маркерные структуры на хромосомах типа ламповых щеток в действитель-

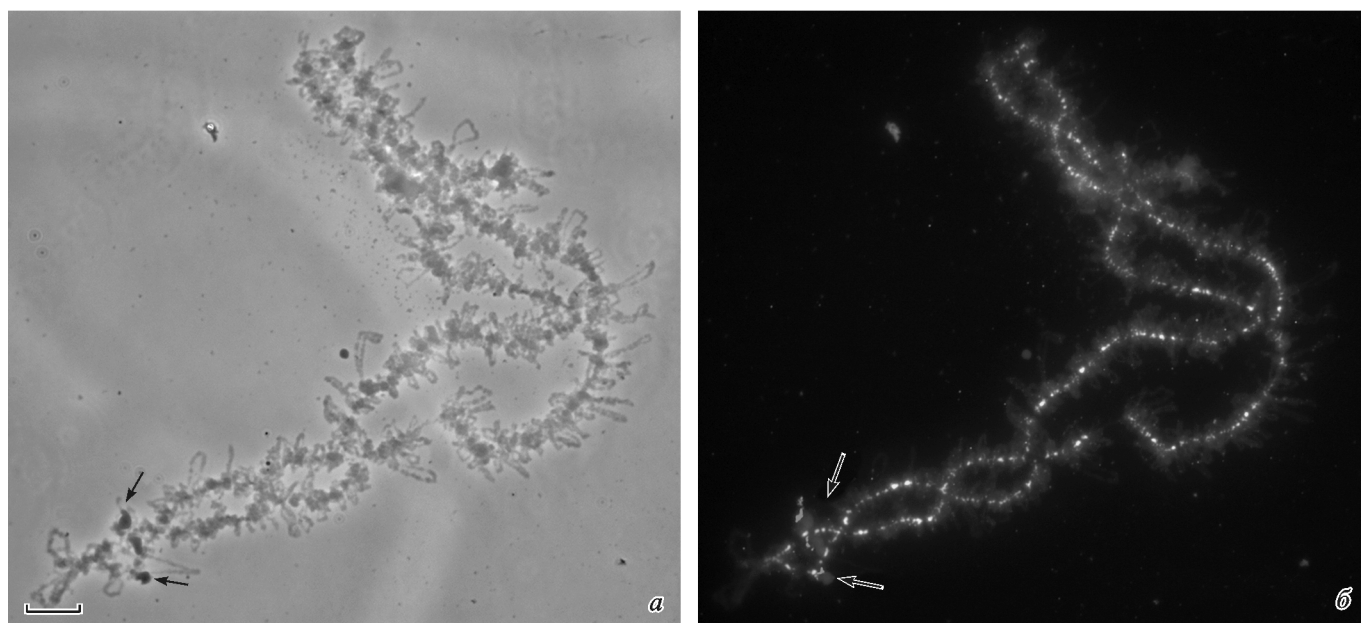


Рис. 2. Идентификация локуса формирования глыбчатых петель на хромосоме типа ламповых щеток 2 курицы с помощью высококоразрешающего цитогенетического картирования.

*a* — фазово-контрастное изображение; *б* — флуоресцентная *in situ*-гибридизация с ВАС-клоном WAG13J24 (положение на карте упорядоченных секвенированных последовательностей GGA2 : 142.26 млн п. н., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, номер GenBank CZ566934.1). Хромосома окрашена DAPI. Стрелки указывают на глыбчатые петли. Масштабный отрезок — 10 мкм.

ности представляют собой латеральные петли, исходящие из хромомерной оси хромосомы, и содержат ДНП-ось. К таким сложным петлям в том числе относят гранулярные, глыбчатые, вакуолизованные петли.

Мы предлагаем использовать две стратегии для анализа локусов формирования ядерных доменов на гигантских хромосомах типа ламповых щеток. Первый подход основан на последовательном FISH-картировании ВАС-клонов, содержащих фрагменты геномной ДНК с известной позицией в геноме, недалеко от места образования ядерных доменов, с тем чтобы сузить область последующего биоинформатического поиска и анализа локусов (рис. 1). Такой подход к определению локуса формирования ядерного домена был, в частности, применен для анализа района образования так называемых глыбчатых петель, которые характерны для хромосомы 2 курицы на стадии ламповых щеток (рис. 2) (Красикова и др., 2010). Глыбчатые петли ярко флуоресцируют при окрашивании РНК-специфичными флуоресцентными красителями, представляя собой единицу РНП-матрикса, обогащенную РНК.

С помощью последовательного картирования ряда ВАС-клонов, которые содержат фрагменты геномной ДНК курицы, мы определили, что глыбчатые петли на хромосоме 2 формируются в результате транскрипции нового идентифицированного биоинформатического тандемного повтора LL2R (Красикова и др., 2010). Мы также показали, что глыбчатые петли, формируемые транскриптами повтора LL2R, привлекают фактор сплайсинга SC35. В интактном ядре растущего ооцита курицы фактор сплайсинга SC35 концентрируется в ассоциированных с хромосомами ядерных структурах, таких как глыбчатые петли, формируя выраженные ядерные домены (Krasikova et al., 2012). При этом можно заключить, что формирование таких депо в ядрах ооцитов инициируется активной транскрипцией не кодирующих белки тандемных повторов ДНК, что подтверждает гипотезу сборки ядерных доменов на основе РНК. Таким образом, с использованием картирования ВАС-клонов на хромосомах типа ламповых щеток курицы и последующего биоинформатического анализа было показано, что синтез не кодирующих РНК тандемных повторов может приводить к формированию в ядре выраженных доменов, обогащенных различными РНП-комплексами.

Второй предлагаемый современный подход основан на механической микродиссекции районов хромосом, прилежащих к определенной ядерной структуре, с последующими *in vitro* амплификацией ДНК из диссектированного материала, FISH-картированием и секвенированием следующего поколения (next generation sequencing, NGS) полученных ДНК-проб (рис. 1). Известно, что ДНК из диссектированного материала метафазных хромосом можно амплифицировать с помощью ПЦР с выродженными праймерами и картировать с помощью FISH на препаратах хромосом (Senger et al., 1990; Weimer et al., 1990; Weise et al., 2010; Kosyakova et al., 2013).

Наши предварительные результаты показали, что микродиссекция хромосом типа ламповых щеток дает значительное преимущество при детальном исследовании ядерных структур или доменов, формирующихся в ассоциации с хромосомами. В ходе проведенных экспериментов была показана принципиальная возможность механической микродиссекции морфологически идентифицируемых небольших участков хромосом типа ламповых щеток, включая отдельные хромомеры размером

около 1 мкм (Zlotina et al., 2015). Главной мишенью отработки метода стало получение в диссектированном материале предельно малого количества нуклеиновых кислот, пригодного для последующей ПЦР-амплификации. Расчетное количество ДНК в одном хромомере макрохромосом курицы на стадии ламповых щеток оценивается в пределах 1.5—2.0 млн п. н. (Gaginskaya et al., 2009), что составляет тысячные доли пикограмма. FISH-картирование проб ДНК, полученных в результате микродиссекции отдельных хромомеров хромосом типа ламповых щеток курицы и последующей амплификации с помощью ПЦР с выродженными праймерами, показало на метафазных хромосомах удивительно высокую специфичность и яркость получаемых флуоресцентных зондов. Таким образом, микродиссекция представляет собой надежный метод, позволяющий получать образцы ДНК из отдельных маркерных структур, формирующихся в определенных локусах хромосом типа ламповых щеток птиц и амфибий.

Последующие расшифровка диссектированного материала хромосом типа ламповых щеток с помощью технологий секвенирования следующего поколения, получение и биоинформатический анализ библиотек секвенированных фрагментов ДНК представляются перспективными. Мы считаем важным подчеркнуть, что использование такого комплексного подхода позволит точно определять геномное положение локусов формирования различных ядерных доменов и впоследствии анализировать геномные и эпигенетические характеристики таких локусов. При этом большое значение должно уделяться последующему биоинформатическому и функциональному анализу идентифицированных локусов, в том числе в соматических клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-14-00131).

### Список литературы

- Красикова А. В., Василевская Е. В., Гагинская Е. Р. 2010. Хромосомы типа ламповых щеток домашней курицы: транскрипция тандемно повторяющихся последовательностей ДНК. *Генетика*. 46 (10): 1329—1334. (Krasikova A. V., Vasilevskaya E. V., Gaginskaya E. R. 2010. Chicken lampbrush chromosomes: transcription of tandemly repetitive DNA sequences. *Russian J. Genetics*. 46 (10): 1173—1177.)
- Ходюченко Т. А., Красикова А. В. 2014. Тельца Кахала и тельца гистонового локуса: молекулярный состав и функции. *Онтогенез*. 45 (6): 363—379. (Khodyuchenko T. A., Krasikova A. V. 2014. Cajal bodies and histone locus bodies: molecular composition and function. *Russian J. Develop. Biol.* 45: 297—312.)
- Callan H. G. 1986. Lampbrush chromosomes. In: *Molecular biology, biochemistry and biophysics*. Berlin: Springer-Verlag. 36: 1—254.
- Callan H. G., Gall J. G., Murphy C. 1991. Histone genes are located at the sphere loci of *Xenopus* lampbrush chromosomes. *Chromosoma*. 101: 245—251.
- Callan H. G., Lloyd L. 1975. Working maps of the lampbrush chromosomes of amphibia. In: *Handbook of genetics*. New York: Plenum Press. 55—77.
- Dedukh D., Mazepa G., Shabanov D., Rosanov J., Litvinchuk S., Borkin L., Saifitdinova A., Krasikova A. 2013. Cytological maps of lampbrush chromosomes of European water frogs (*Pelophylax esculentus* complex) from the Eastern Ukraine. *BMC Genetics*. 14: 26.
- Derjusheva S., Kurganova A., Krasikova A., Saifitdinova A., Habermann F. A., Gaginskaya E. 2003. Precise identification of

chicken chromosomes in the lampbrush form using chromosome painting probes. *Chromosome Res.* 11 : 749—757.

Dundr M. 2012. Nuclear bodies: multifunctional companions of the genome. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 24 : 415—422.

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

Gall J. G., Stephenson E. C., Erba H. P., Diaz M. O., Barsacchi-Pilone G. 1981. Histone genes are located at the sphere loci of new lampbrush chromosomes. *Chromosoma*. 84 : 159—171.

Kosyakova N., Hamid A. B., Chaveerach A., Pinthong K., Siriyasing P., Supiwong W., Romanenko S., Trifonov V., Fan X. 2013. Generation of multicolor banding probes for chromosomes of different species. *Mol. Cytogenet.* 6 : 6.

Krasikova A., Khodyuchenko T., Maslova A., Vasilevskaya E. 2012. Three-dimensional organisation of RNA-processing machinery in avian growing oocyte nucleus. *Chromosome Res.* 20 : 979—994.

Krasikova A., Kulikova T., Saifitdinova A., Derjusheva S., Gaginskaya E. 2004. Centromeric protein bodies on avian lampbrush chromosomes contain a protein detectable with an antibody against DNA topoisomerase II. *Chromosoma*. 113 : 316—323.

Morgan G. T. 2002. Lampbrush chromosomes and associated bodies: new insights into principles of nuclear structure and function. *Chromosome Res.* 10 : 177—200.

Nizami Z. F., Deryusheva S., Gall J. G. 2010. Cajal bodies and histone locus bodies in *Drosophila* and *Xenopus*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 75 : 313—320.

Nizami Z. F., Gall J. G. 2012. Pearls are novel Cajal body-like structures in the *Xenopus* germinal vesicle that are dependent on RNA pol III transcription. *Chromosome Res.* 20 : 953—969.

Penrad-Mobayed M., El Jamil A., Kanhoush R., Perrin C. 2009. Working map of the lampbrush chromosomes of *Xenopus tropicalis*: a new tool for cytogenetic analysis. *Develop. Dynamics*. 238 : 1492—1501.

Senger G., Ludecke H. J., Horsthemke B., Claussen U. 1990. Microdissection of banded human chromosomes. *Hum. Genet.* 84 : 507—511.

Shevtsov S. P., Dundr M. 2011. Nucleation of nuclear bodies by RNA. *Nat. Cell Biol.* 13 : 167—173.

Solovei I., Gaginskaya E., Allen T., Macgregor H. 1992. A novel structure associated with a lampbrush chromosome in the chicken, *Gallus domesticus*. *J. Cell Sci.* 101 : 759—772.

Spector D. L. 2006. SnapShot: Cellular bodies. *Cell*. 127 : 1071—1072.

Weimer J., Kiechle M., Senger G., Wiedemann U., Ovens-Raeder A., Schuierer S., Kautza M., Siebert R., Arnold N. 1999. An easy and reliable procedure of microdissection technique for the analysis of chromosomal breakpoints and marker chromosomes. *Chromosome Res.* 7 : 355—362.

Weise A., Timmermann B., Grabherr M., Werber M., Heyn P., Kosyakova N., Liehr T., Neitzel H., Konrat K., Bommer C., Dietrich C., Rajab A., Reinhardt R., Mundlos S., Lindner T. H., Hoffmann K. 2010. High-throughput sequencing of microdissected chromosomal regions. *Eur. J. Hum. Genet.* 18 : 457—462.

Zlotina A., Kosyakova N., Kulikova T., Liehr T., Krasikova A. 2015. Microdissection of chicken lampbrush chromosome regions for FISH-probes generation and highthroughput sequencing. *Chromosome Res.* 23(S1) : 125—126.

Поступила 1 XII 2015

#### LAMPBRUSH CHROMOSOMES AS A MODEL FOR EXPLORATION INTO LOCI OF NUCLEAR DOMAINS FORMATION

A. V. Krasikova,<sup>1</sup> T. V. Kulikova, A. M. Zlotina

St. Petersburg State University, St. Petersburg, 198504;

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

Nuclear domains can be divided into two major groups: those arising freely in nucleoplasm and those forming at specific chromosomal loci as a result of their activity. The advantages of giant transcriptionally active lampbrush chromosomes for the investigation of nuclear bodies formed in particular chromosomal regions have been demonstrated in a series of studies. We propose to use two strategies to analyze the loci of nuclear domains formation on lampbrush chromosomes typical for avian and amphibian oocytes. The first approach implies consecutive mapping of BAC-clones, containing the fragments of DNA assigned to genomic coordinates, in close proximity to the nuclear domains. The second approach is based on mechanical microdissection of chromosomal regions adjacent to a particular nuclear structure. DNA of dissected material can be amplified by PCR with degenerate primers and mapped by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) on chromosomal spreads. Utilization of high-throughput sequencing (next generation sequencing, NGS) technologies also proves to be prospective for subsequent deciphering of regions underlying nuclear structures formation. Deciphered fragments can be aligned against reference genome assembly to define precisely the loci responsible for nuclear domains assembly. In this review, the possibilities of using two complementary strategies for investigation of nuclear domains associated with lampbrush chromosomes are demonstrated.

**Key words:** chromosome microdissection, fluorescent *in situ* hybridization, histone locus body, nuclear body.