

Хромосома линии половых клеток зебровой амадины: анализ повторяющихся последовательностей

Давидьян А.^{1*}, Володькина В.¹, Комиссаров А.², Галкина С.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

² Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

* e-mail: asya.davidian@gmail.com

Хромосомы на стадии ламповых щеток

Хромосома линии половых клеток (GRC)

- ✓ Присутствует в ооцитах
- ✓ Отсутствует в соматических клетках
- ✓ Элиминируется из сперматоцитов



Цели и Задачи

1. Идентифицировать хромосому линии половых клеток (GRC) на стадии ламповых щеток методом FISH с GRC-специфичным зондом;
2. Выполнить первичное морфологическое описание GRC на стадии ламповых щеток: охарактеризовать цитологические маркеры, распределение хиазм, оценить общий уровень транскрипции;
3. Выполнить детальный анализ характерных конденсированных участков GRC - "поясков" с помощью методов микродиссекции и полногеномного секвенирования;

Введение

В гаметах зебровой амадины кроме обычных аутосом и половых хромосом ZW ($2n=80$) обязательно присутствует хромосома линии половых клеток (germline-restricted chromosome, GRC). GRC отсутствует во всех соматических клетках, элиминируется при созревании сперматозоидов и, как следствие, передаётся только по женской линии. В состав GRC входит >10% генома (~150 млн.п.н.).

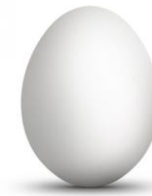
Детального представления о ее роли, поведении в мейозе и эмбриогенезе до сих пор нет. С целью изучения функционирования GRC в оогенезе мы идентифицировали эту хромосому на стадии ламповых щеток (ЛЩ) и выполнили детальный анализ гетерохроматиновых "поясков" - характерных конденсированных участков без боковых петель.



Зебровая амадина
Taeniopygia guttata
(Aves, Passeriformes,
Estrildidae)

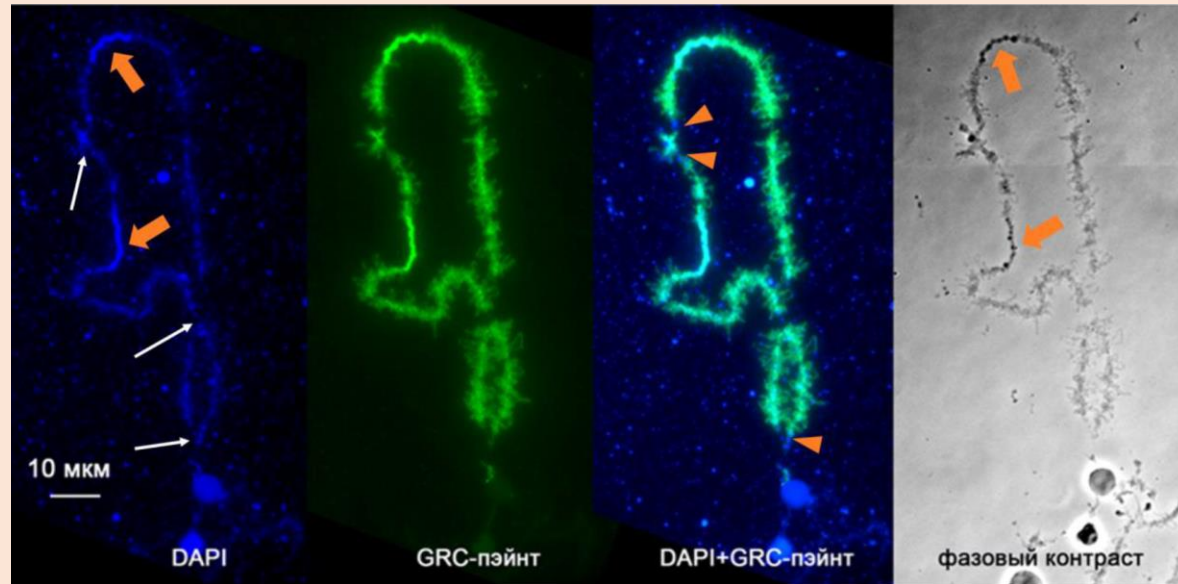
Материалы и Методы

- Подготовка препаратов хромосом ЛЩ
- Иммуноцитохимия
 - Флуоресцентная гибридизация *in situ*
 - Микродиссекция
 - Секвенирование и биоинформатический анализ



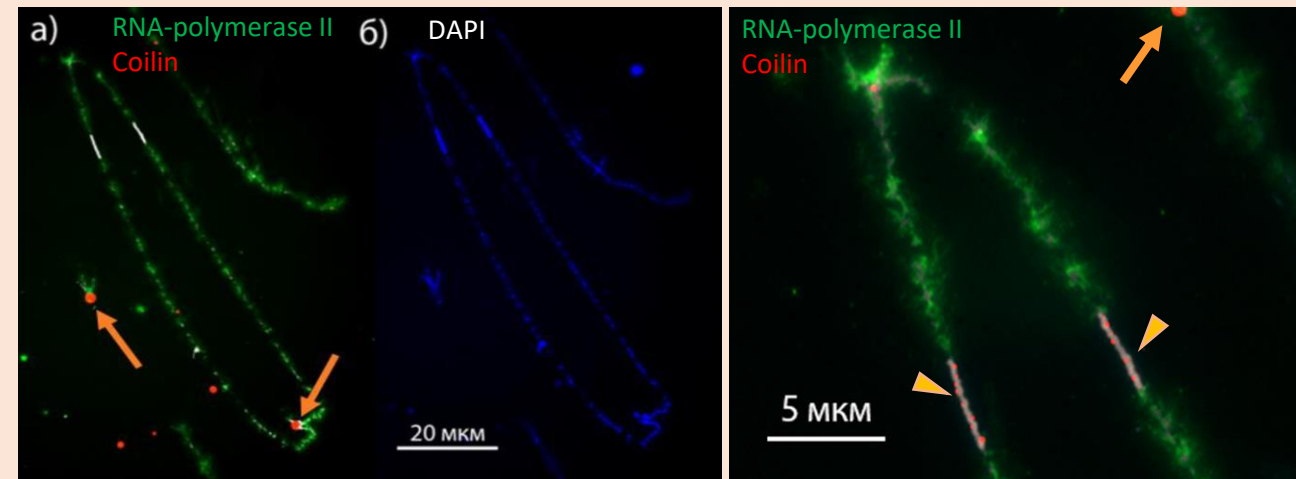
Результаты

1. Идентификация GRC на стадии ЛЩ методом FISH с микродиссектированным зондом к целой хромосоме.



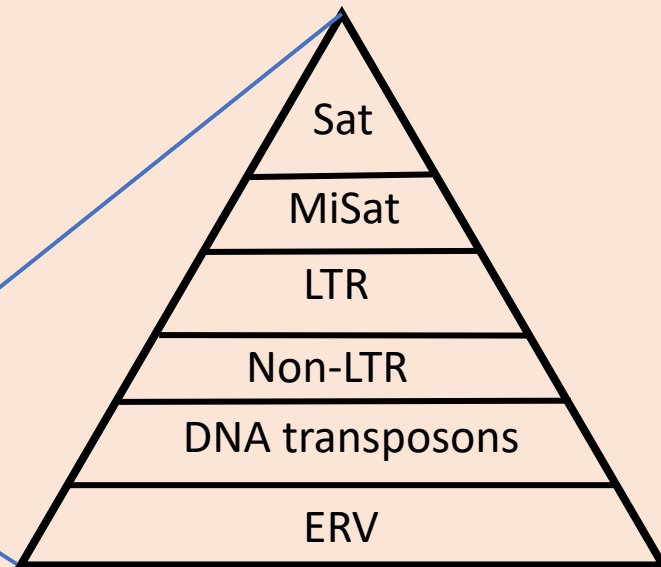
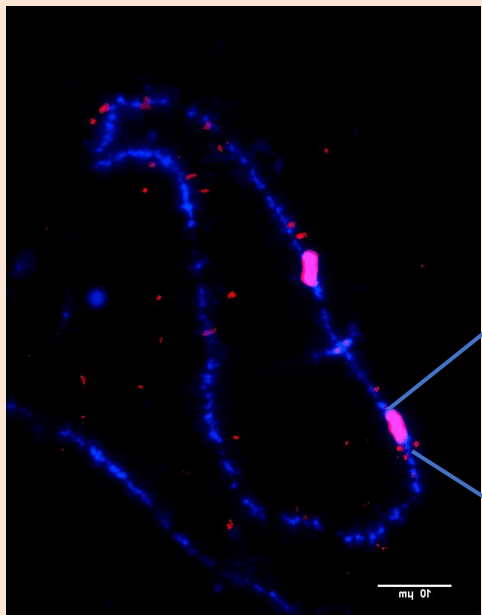
Белые стрелки - места расположения хиазм, оранжевые - "пояски" конденсированного хроматина - маркеры GRC-ЛЩ. Оранжевые треугольники - локусы, с которыми зонд не гибридизовался.

2. Исследование организации хромосомы GRC методом иммуноцитохимии с антителами к фосфорилированной форме РНК-полимеразы II (зеленая флуоресценция) и антителами к коилину (красная флуоресценция).



Треугольники указывают на маленькие коилин-положительные тельца, ассоциированные с "поясками" конденсированного хроматина GRC, стрелки - на крупные коилин-содержащие тельца.

3. Гибридизация микродиссекционного зонда и анализ последовательностей, входящих в состав “поясков” GRC



Хроматин беспетлевых “поясков” GRC был микродиссектирован и амплифицирован методом WGA. На основе полученного материала был приготовлен зонд для гибридизации *in situ*. FISH эксперименты подтвердили, что эти участки уникальны, т.к. зонд равномерно гибридизовался только с тем участком, из которого был взят материал.

Выводы

1. Хромосомы линии половых клеток (GRC) в диплотенных ооцитах зебровой амадины на стадии ЛЩ образуют макробивалент, в котором гомологи объединены двумя-тремя хиазмами.
2. GRC на стадии ЛЩ транскрипционно активна: ДНК многочисленных «простых» боковых петель на биваленте GRC активно транскрибируется с помощью РНК полимеразы II.
3. Отличительная черта GRC на стадии ламповых щеток – интерстициальный массивный блок конденсированного хроматина («поясок»), ДНК которого содержит как уникальные последовательности, так и повторы разных классов; с блоком конденсированного хроматина ассоциированы коилиновые тельца неизвестной функции.



Авторы выражают благодарность

проф. Н.Б. Рубцову (ИЦИГ СО РАН)

РЦ «ЦКП Хромас» СПбГУ

РЦ «Геномика» ИЦИГ СО РАН

РФФИ # 20-04-00967a