

# Микроскопический анализ биологических объектов. Инфраструктура

## Межинститутский центр коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов

Руководитель к.б.н. С.И. Байборodin  
Институт цитологии и генетики СО РАН  
Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10  
e-mail: bai@bionet.nsc.ru

### История создания

В настоящее время невозможно проводить качественные научные исследования без применения современного научного оборудования. Для более эффективного использования уникальных научных приборов в 1999 г. на базе лаборатории морфологии и функции клеточных структур Института цитологии и генетики СО РАН был создан Центр микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

В деятельности ЦКП на договорной основе принимают участие Институт химической биологии

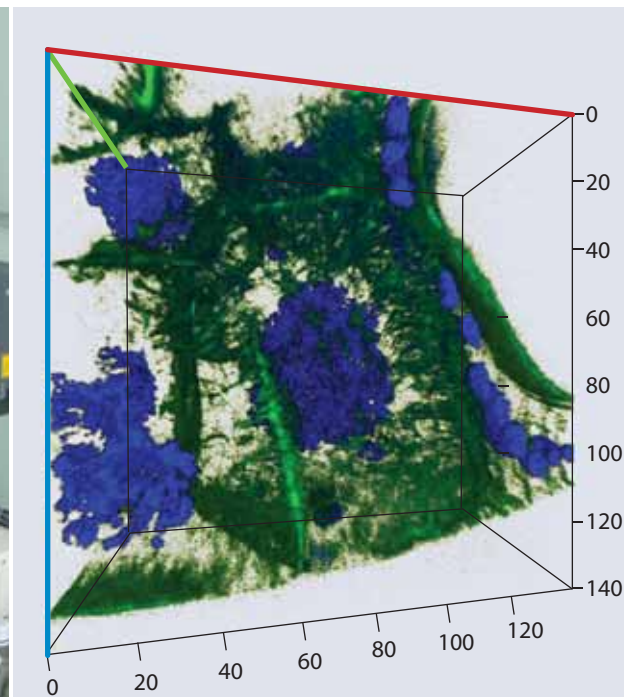
и фундаментальной медицины, Институт химической кинетики и горения, Институт систематики и экологии животных СО РАН, а также Новосибирский государственный университет.

### Материально-техническая база

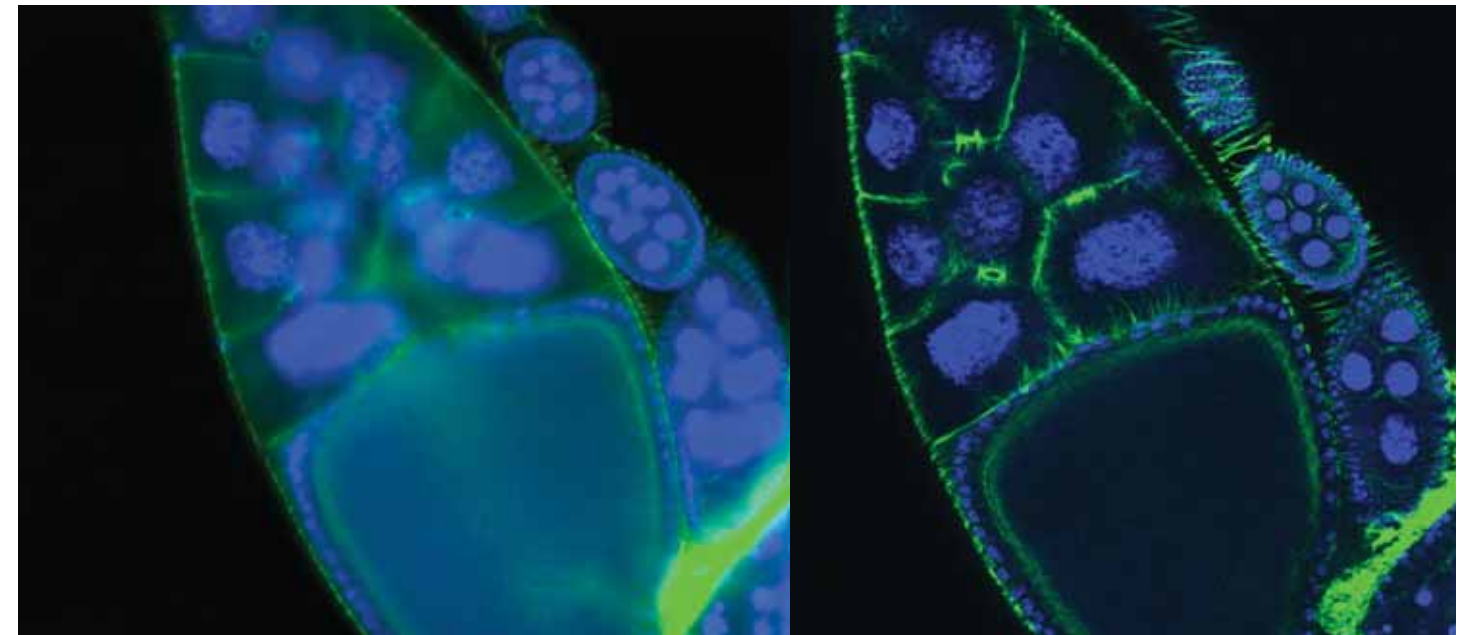
Благодаря тесному взаимодействию с ведущими фирмами, производящими оборудование для современной микроскопии, ЦКП комплектуется современным оборудованием, что позволяет улучшить качество проводимых исследований.



Лазерный сканирующий микроскоп LSM 510 META (Zeiss).



3D-реконструкция питающей клетки эмбриональной камеры дрозофилы (актиновые филаменты – фаллоидин-FITC, ядра – DAPI).



Эмбриональная камера дрозофилы (актиновые филаменты – фаллоидин-FITC, ядра – DAPI) – люминесцентная микроскопия.

Эмбриональная камера дрозофилы (актиновые филаменты – фаллоидин-FITC, ядра – DAPI) – люминесцентная микроскопия + АРОТОМЕ.

В ЦКП есть и активно используются три рабочие люминесцентные станции на базе микроскопов Axioplan (Zeiss), AxioImager (Zeiss) и Axioscop (Zeiss) с полным комплектом объективов и фильтров и программного обеспечения для обработки полученных изображений. Такой подход к комплектации приборов позволяет выполнять цитологические и цитогенетические исследования на высоком профессиональном уровне.

Лазерный сканирующий микроскоп LSM 510 META (Zeiss) с 4 лазерными линиями позволяет выявлять практически весь набор люминесцентных меток, используемых в биологических исследованиях, и создавать на основе полученных оптических срезов 3D реконструкции исследованных образцов.

Наличие приставки Apotome (Zeiss) на микроскопе AxioImager (Zeiss) позволяет получать оптические срезы на люминесцентных микроскопах с лучшим разрешением даже на толстых образцах.

Приобретен и установлен лазерный микродиссектор PALM MicroBeam (Zeiss; PALM), дающий возможность бесконтактно переносить образцы с цитологических препаратов для дальнейших молекулярно-биологических исследований (выделение ДНК, РНК и т. д.) и живые клетки.

Электронный микроскоп LIBRA 120 (Zeiss) дает возможность выполнять цитологические исследования клеток животных и растений на ультраструктурном уровне и проводить исследования макромолекул. Новейшая разработка фирмы OMEGA – фильтр – позволяет получать высококонтрастные изображения даже неокрашенных срезов.

ЦКП обладает практически полным набором приборов для подготовки образцов: микротомом, криомикротомом, вибротомом, ультрамикротомом. Современное оборудо-



Ультрамикротом.

вание ведущих фирм (Zeiss, Leica) дает возможность подготовить образцы для микроскопии на качественно новом уровне.

### Востребованность ЦКП

Услугами ЦКП пользуются многие подразделения ИЦиГ СО РАН:

- лаборатория рекомбинационного и сегрегационного анализа;

- лаборатория функциональной нейрогеномики;
- лаборатория генетики развития;
- лаборатория биоинженерии растений;
- лаборатория генной инженерии;
- лаборатория эволюционной биологии клетки;
- лаборатория молекулярной биологии клетки;
- лаборатория эпигенетики развития;
- лаборатория генетики клеточного цикла;
- лаборатория молекулярных биотехнологий;
- лаборатория морфологии и функции клеточных структур;
- сектор экспериментального моделирования эволюционных процессов;
- сектор геномной и постгеномной фармакологии, а также институты СО РАН, СО РАМН, НГУ, ТГУ и институты других городов.



Автоматический микротом.

Сотрудники ЦКП являются высокопрофессиональными специалистами, прекрасно владеющими современными методами цитологического анализа, знающими современное оборудование и, самое главное, способными оказать помощь в обучении или выполнении работ коллегам из других лабораторий ИЦиГ или институтов. Сотрудники ЦКП регулярно участвуют в выставках, школах-семинарах, презентациях, проводимых ведущими фирмами, производящими оборудование для современной микроскопии.

#### Организация деятельности ЦКП

- Текущая деятельность ЦКП определяется правилами внутреннего распорядка ИЦиГ СО РАН.
- Время работы на оборудовании ЦКП выделяется по предварительной заявке.
- Обязательными условиями проведения исследований с использованием оборудования и реактивов ЦКП являются обязательства учреждений – пользователей ЦКП по компенсации возможного ущерба, причиненного их сотрудниками при выполнении работ.
- Проведение исследований в ЦКП сотрудниками организаций, не указанных в разделе «История создания ЦКП», осуществляется в порядке очередности после заключения договоров на выполнение работ.

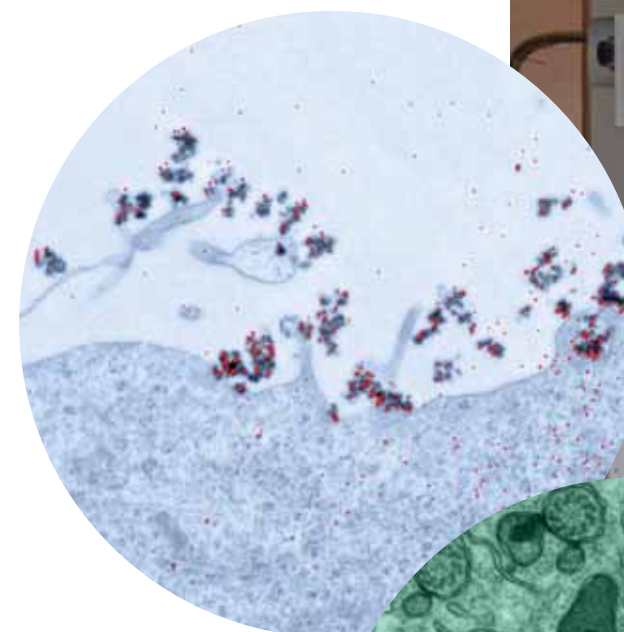


Микротом-вибротом.

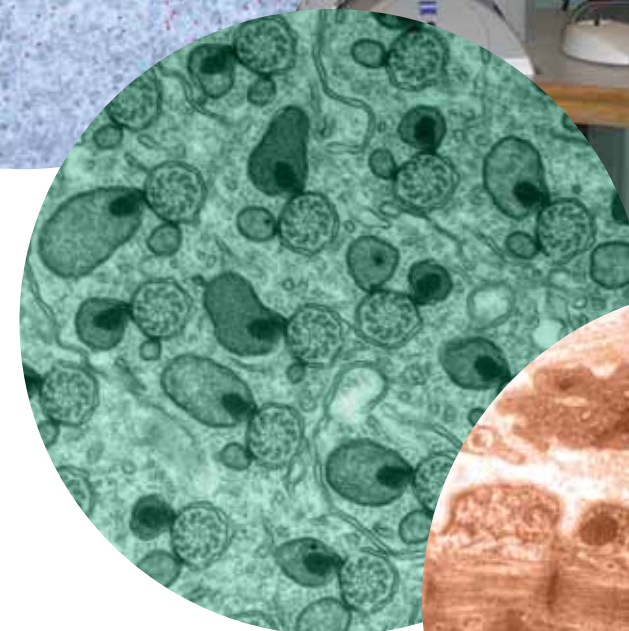
Микротом-криотом.



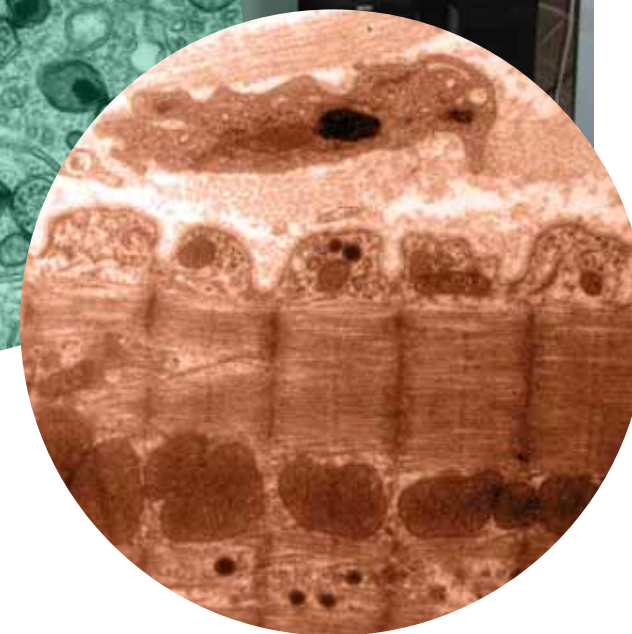
Электронный микроскоп LIBRA 120 (Zeiss).



Выявление наночастиц двуокиси титана (элементный анализ) на поверхности клеток, растущих в культуре (отмечены красным цветом).



Семенники дрозофилы, неокрашенный ультратонкий срез. OMEGA- фильтр.



Скелетная мышца дрозофилы, неокрашенный ультратонкий срез. OMEGA- фильтр.

- Персоналом ЦКП формируется инструктивный материал по эксплуатации оборудования и аппаратуры, выполнению методик и безопасным методам осуществления работ, специфичных для ЦКП. Введение инструкций в действие производится в соответствии с правилами Института цитологии и генетики СО РАН.

# Микроскопический анализ биологических объектов. Научные результаты

## Изучение закономерностей дивергенции центромерной ДНК у комаров-звонцов сем. Chironomidae

В.В. Голыгина<sup>1,2</sup>, А.Д. Брошков<sup>1,2</sup>, О.В. Ермолаева<sup>1,2</sup>, Т.В. Карамышева<sup>1</sup>, Н.Б. Рубцов<sup>1</sup>, И.И. Кикнадзе<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Центромеры являются одной из важнейших хромосомных структур в геноме эукариот, обеспечивающих корректную сегрегацию хромосом в митозе и мейозе. С учетом высокой скорости дивергенции центромерной ДНК и того, что изменения ее структуры приводят к нарушениям сегрегации хромосом, было выдвинуто предположение о том, что дивергенция центромерной ДНК может играть значительную роль в видообразовании. Одним из перспективных направлений исследований для решения этих вопросов является изучение строения центромерной ДНК у близкородственных видов.

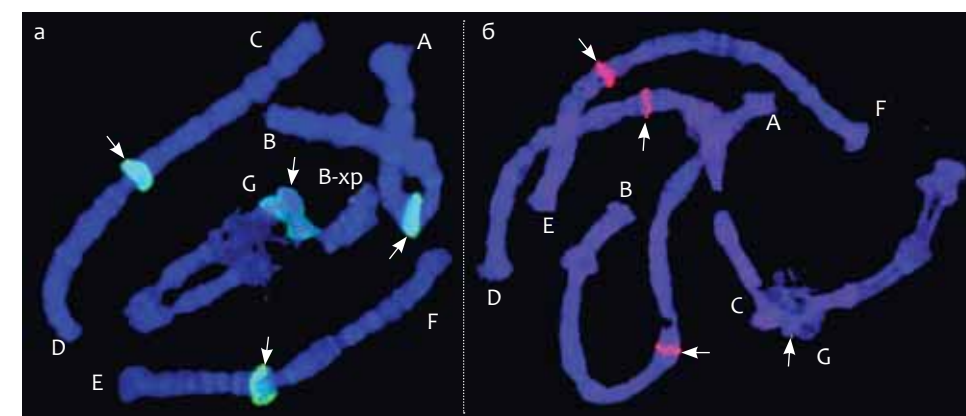
Использование методов микродиссекции позволило создать ДНК-пробы из центромерных районов хромосом нескольких видов-близнецов из группы *Chironomus plumosus*. С помощью гибридизации *in situ* ДНК-проб на хромосомы изучаемых видов было установлено, что у 7 видов состав центромерной

ДНК сходен во всех хромосомах кариотипа, поскольку ДНК-проба из центромерного района хромосомы EF гибридизовалась с центромерными районами всех других хромосом (рис. 1, а), в то же время у двух видов – *C. entis* и *C. muratensis* – произошла дивергенция центромерной ДНК в трех больших хромосомах (AB, CD, EF) и короткой хромосоме G (рис. 1, б).

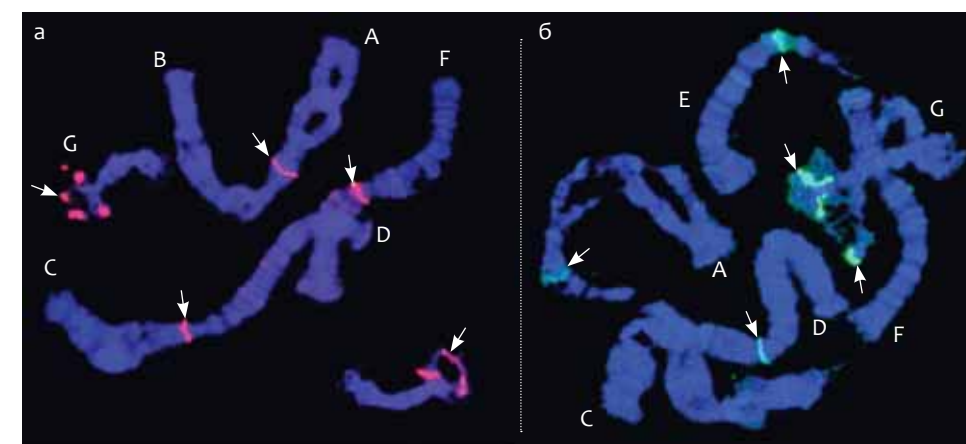
FISH ДНК-проб центромерных районов одного вида на хромосомы остальных изученных видов позволила установить, что у *C. entis* и *C. muratensis* ДНК центромерных районов хромосомы G гомологична центромерной ДНК *C. borokensis* и некоторых других видов группы (рис. 2, а), в то время как состав центромерных районов трех больших хромосом значительно дивергировал (рис. 2, б).

Проведенное нами клонирование ДНК-библиотек позволило выделить последовательности, специфичные для центромерных районов изучаемых видов.

**Рис. 1.** FISH ДНК-проб центромерного района хромосомы EF *C. borokensis* (а) и *C. muratensis* (б). Зеленый сигнал – ДНК проба центромерного района хромосомы EF *C. borokensis*, красный сигнал – ДНК проба центромерного района хромосомы EF *C. muratensis*. Стрелками обозначены центромерные районы, буквами – плечи хромосом, В-хр – добавочная хромосома.



**Рис. 2.** FISH ДНК-проб центромерного района хромосомы EF *C. borokensis* на хромосомы *C. plumosus* (а, красный сигнал) и *C. entis* (б, зеленый сигнал). Обозначения, как на рис. 1.



## Теломеры у двух видов бурозубок *Sorex granarius* и *Sorex araneus*

Н.С. Жданова<sup>1</sup>, Ю.М. Минина<sup>1</sup>, Т.В. Карамышева<sup>1</sup>, А. Лондоно-Валехо<sup>2</sup>, Р. Lansdorp<sup>3</sup>, Н.Б. Рубцов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup> Институт Кюри, Париж, Франция

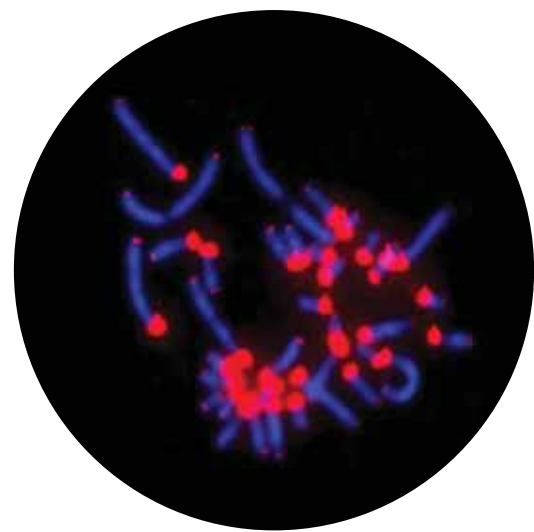
<sup>3</sup> Центр исследования рака, Ванкувер, Канада

Теломеры представляют собой нуклеопротеиновые структуры, локализованные на концах хромосом и предохраняющие их от деградации и слияний в конец. Несмотря на то что теломеры играют важную роль в реализации многих клеточных функций, очень немного известно об их биологии у других видов млекопитающих, нежели человек и мышь.

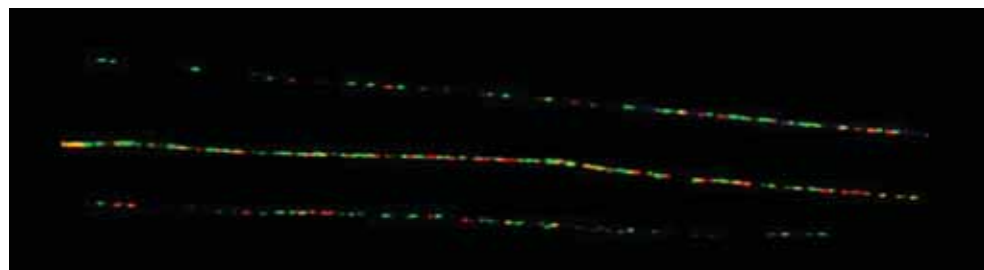
*Sorex granarius* и *Sorex araneus* – это близкородственные виды, их кариотипы составлены практически из идентичных хромосомных плеч, но отличаются Робертсоновскими перестройками. Определение размера теломер у *S. granarius* с помощью количественной FISH показало, что на проксимальных концах всех 32 акроцентриков локализованы гипердлиннные теломеры, содержащие  $213 \pm 5,8$  т.п.н. теломерного повтора, а на остальных концах хромосом –

короткие теломеры ( $3,8 \pm 0,2$  т.п.н.) (рис. 1). Кроме того, по крайней мере часть гипердлиннных теломер у этого вида являются прерывистыми: в них теломерные повторы перемежаются с рибосомными (рис. 2). У *S. araneus* размер теломер, определенный с помощью модифицированной FISH, на всех концах хромосом, в том числе и на проксимальных концах акроцентриков, составлял 6,8–15,2 т.п.н. Были исследованы томская и Cordon расы, различающиеся по числу двуплечих хромосом.

Таким образом, размер теломер у обыкновенной бурозубки оказался схож с размером теломер человека, тогда как бурозубка иберийская обладает двумя типами хромосом: короткими и гипердлиннными с нехарактерной или редко встречающейся у млекопитающих структурой. До сих пор прерывистые теломеры были описаны лишь у неплацентарных млекопитающих (Nuno *et al.*, 2011).



**Рис. 1.** Метафазная пластинка из первичной культуры фибробластов *S. granarius* после FISH с PNA теломерной пробой Су3-(СССТАА)3. Хромосомы окрашены DAPI.



**Рис. 2.** Двухцветный FISH на фибриллах, полученных из первичных фибробластов *S. granarius*, с меченой биотином рибосомной пробой (зеленый) и PNA теломерной пробой Су3-(СССТАА)3 (красный).

## Цитогенетика эмбриональных стволовых клеток человека и локализация нормальных и перестроенных хромосом в интерфазном ядре эмбриональных стволовых клеток человека

Н.Б. Рубцов<sup>1</sup>, М.А. Прохорович<sup>1</sup>, М.А. Лагарькова<sup>2</sup>, Т.В. Карамышева<sup>1</sup>, С.Л. Киселев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

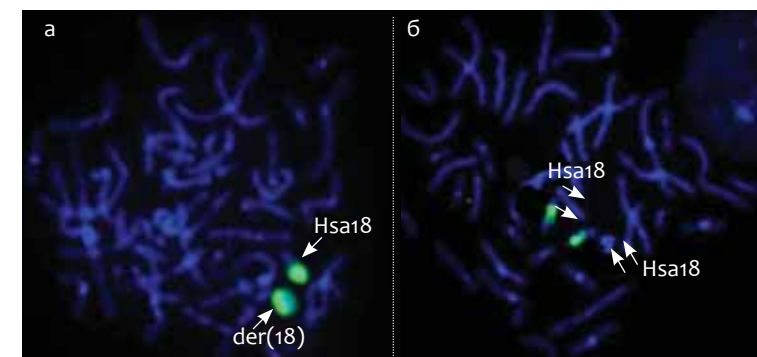
Проблема нестабильности генома эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека является одной из наиболее острых при рассмотрении возможности их практического использования.

Проведен анализ кариотипа и трехмерной организации интерфазных ядер ряда линий ЭСК. Цитогенетический и молекулярно-цитогенетический мониторинг состояния кариотипов ЭСК на протяжении десятков пассажей показал, что изученные линии способны к сохранению нормального кариотипа в ходе длительного культивирования. Были получены две сублинии ЭСК с хромосомными перестройками (рис. 1), указывающими на клональное происхождение этих линий. Кариотип клеток сублинии hESM01r18 представлял

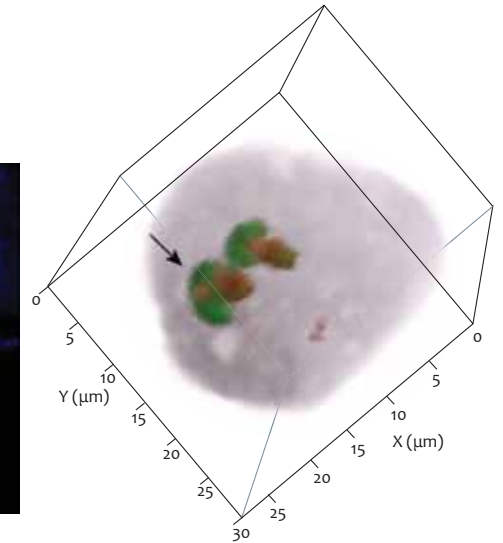
собой 46,XX,r(18)(:p11.31→q21.2::q21.2→p11.31::), а кариотип линии hESM03der9 как 46,XX,del(4)(q25q31.1),dup(9)(q12q33).

Показано влияние хромосомных перестроек на положение хромосом в интерфазном ядре (рис. 2).

Предлагается использование линий ЭСК человека для изучения роли конкретных хромосомных районов в поддержании плюрипотентности и определении направления дифференцировки. Также показана возможность использования данных, полученных при изучении хромосомной изменчивости ЭСК, для оценки предрасположенности соответствующих генотипов к формированию хромосомных аномалий.



**Рис. 1.** FISH микродиссекционной ДНК-пробы полученной хромосомы der(18) клеток линии hESM01r18 с метафазными хромосомами клетки этой линии (а) и хромосомами лейкоцитов здорового донора (б). Зеленый сигнал – сигнал FISH микродиссекционной ДНК-пробы, синий сигнал – общая окраска хромосом красителем DAPI. Стрелки указывают на точки разрывов в хромосоме 18 при возникновении r(18).



**Рис. 2.** Трехмерная реконструкция хромосомы 9 и der(9) (слева) в интерфазном ядре клетки линии hESM03der9. Зеленый сигнал – эухроматиновые районы хромосом 9 и der(9); красный сигнал – районы, содержащие ДНК, гомологичную ДНК прицентромерного района хромосомы 9; серый сигнал – общая окраска ДНК красителем DAPI.

## Отцовская X-хромосома преинактивирована на ранних стадиях импринтированной инактивации у грызунов

Е.А. Васькова, Е.В. Дементьева, А.И. Шевченко, С.В. Павлова, С.М. Закиян  
Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

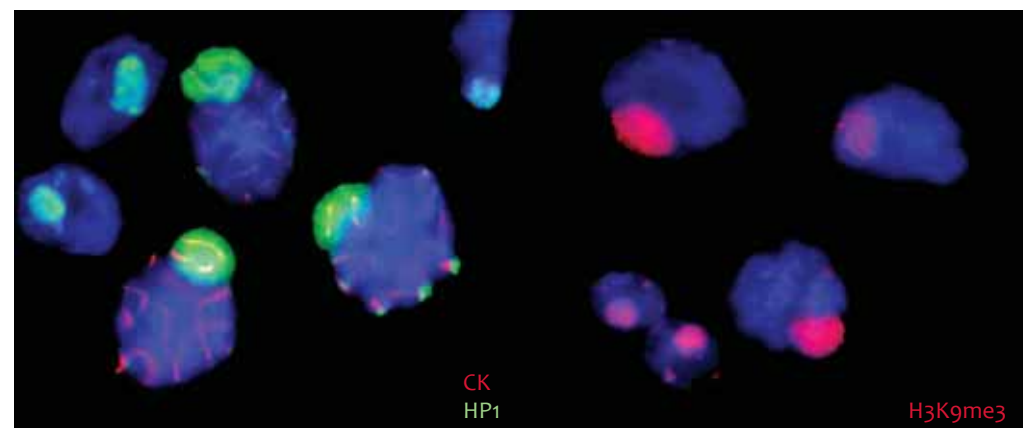
В раннем развитии самок некоторых плацентарных млекопитающих (например, грызунов) инактивации подвергается преимущественно X-хромосома, унаследованная от отца. Однако природа импринта, лежащего в основе этого явления, до сих пор не известна. Согласно одной из гипотез, отцовская X-хромосома попадает в зиготу уже в преинактивированном состоянии за счет модификаций хроматина, которые устанавливаются во время мейотической инактивации половых хромосом в сперматогенезе и могут сохраняться на постмейотических стадиях. Для того чтобы проверить эту гипотезу, мы исследовали динамику модификаций транскрипционно неактивного хроматина в сперматогенезе и трофобластных стволовых (ТС) клетках самок, которые соответствуют ранним стадиям импринтированной инактивации. Были изучены два вида грызунов: мышь и обыкновенная полевка *Microtus rossiaemeridionalis*.

В мейозе самцов обыкновенных полевок X-хромосома ассоциирована с убиквитинированным гистон H2A (uH2A), гетерохроматиновым белком HP1 и гистон H3, триметилированным по лизину в 9-м положении (H3K9me3), что согласуется с мейотической инактивацией половых хромосом. После мейоза X-хромосома утрачивает uH2A, но сохраняет H3K9me3 и HP1 (рис. 1). В недифферен-

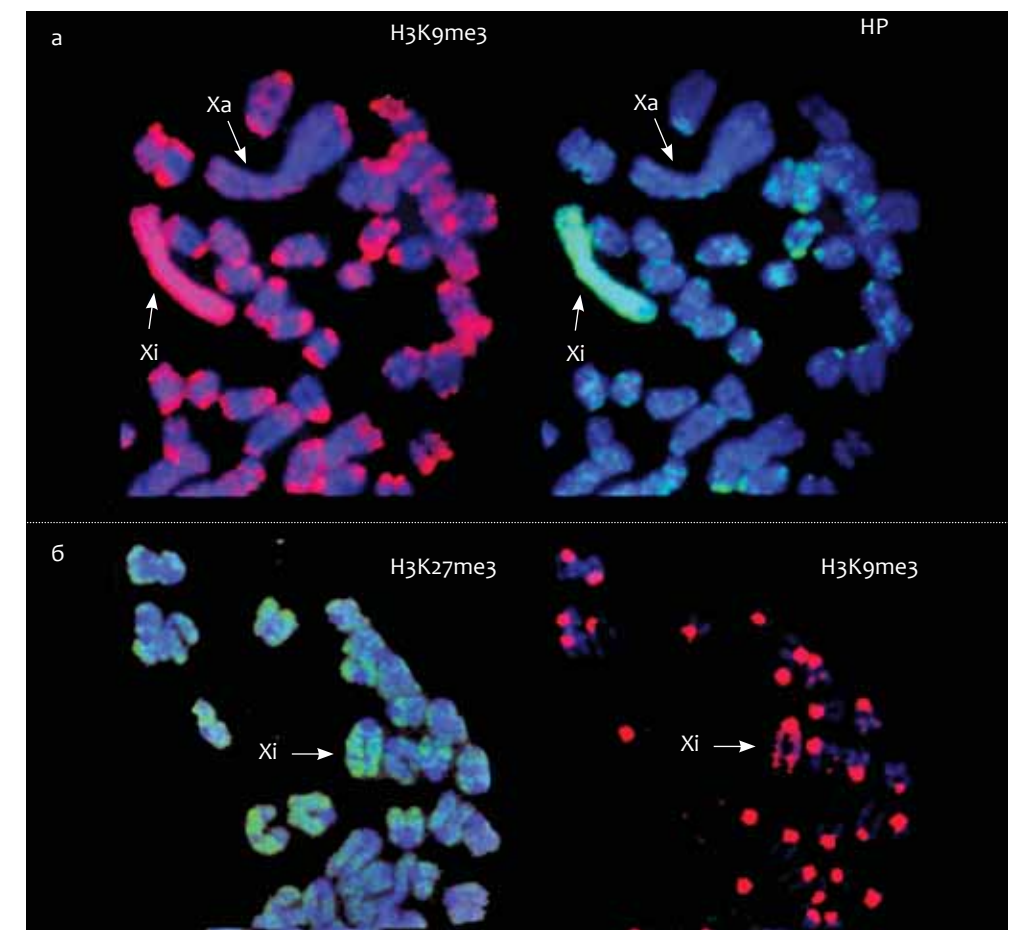
цированных ТС клетках самок обыкновенных полевок неактивное состояние X-хромосомы также обеспечивается H3K9me3, HP1 и uH2A (рис. 2, а).

Однако на неактивной X-хромосоме в ТС клетках не был выявлен гистон H3, триметилированный по лизину в 27-м положении (H3K27me3), наличие которого характерно как для случайной, так и для импринтированной инактивации X-хромосомы у мыши и зависит от экспрессии гена *Xist*. Анализ модификаций хроматина в ТС клетках самок мыши позволил подтвердить обогащение H3K27me3 на неактивной X-хромосоме, а также установить, что около 10% метафазных пластинок имеют солокализацию H3K27me3 и H3K9me3 (рис. 2, б). У обыкновенных полевок H3K27me3 появляется на неактивной X-хромосоме в ТС клетках только на 4-й день их дифференцировки, причем установление данной модификации сопровождается потерей H3K9me3 и HP1.

Таким образом, механизм сайленсинга, связанный с H3K9me3 и HP1, обеспечивает неактивное состояние X-хромосомы на постмейотических стадиях сперматогенеза и ранних стадиях импринтированной инактивации, подтверждая гипотезу о преинактивации отцовской X-хромосомы. На более поздних стадиях импринтированной инактивации эта система сайленсинга замещается *Xist*-зависимой системой, ассоциированной с H3K27me3.



**Рис. 1.** Динамика модификаций хроматина в ходе сперматогенеза обыкновенных полевок.  
СК – синаптонемный комплекс.



**Рис. 2.** Модификации хроматина неактивной X-хромосомы на ранних стадиях импринтированной инактивации.  
а – недифференцированные трофобластные стволовые клетки самок обыкновенных полевок; б – трофобластные стволовые клетки мыши на ранних пассажах. Xa – активная X-хромосома, Xi – неактивная X-хромосома.

## Экспрессия родительских геномов в гетерокарионах как индикатор первых стадий перепрограммирования

М.М. Гридина, О.А. Серов

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

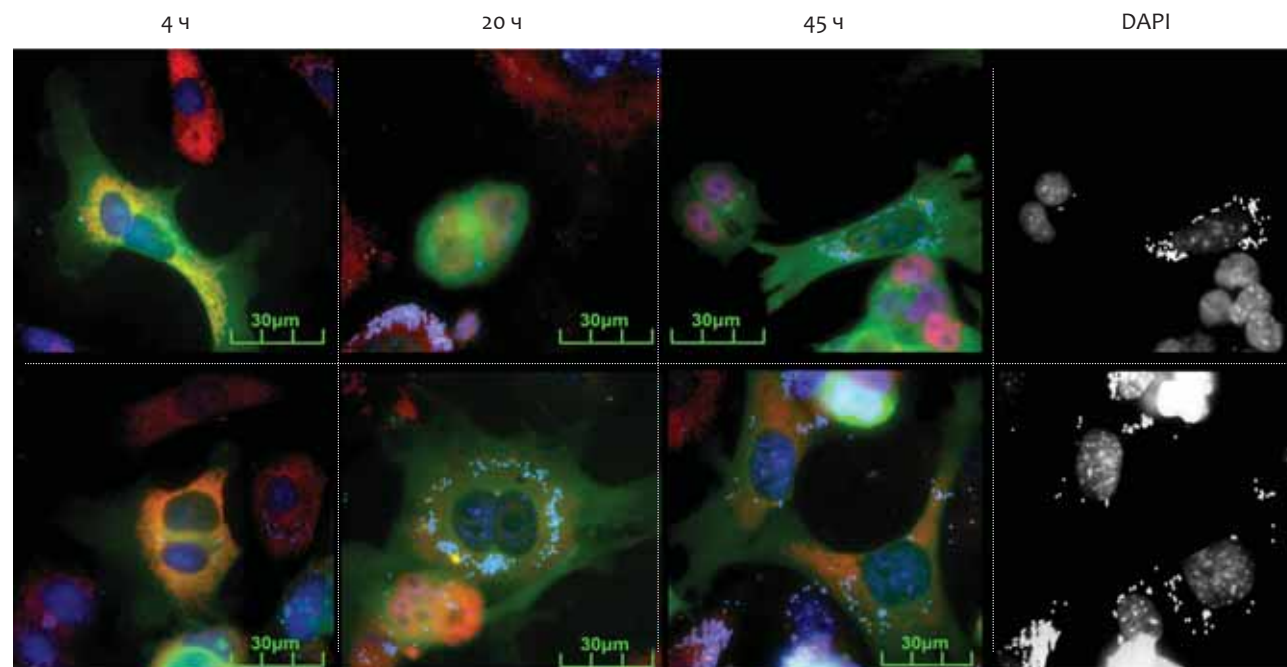
Известно, что при слиянии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) с соматическими клетками образуются гибридные клетки с фенотипом и многими свойствами, сходными или идентичными с ЭСК. Наиболее ярко доминирование генома ЭСК в гибридных клетках проявляется в способности последних генерировать развитие химер. Более того, показано, что потомки гибридных клеток, меченных GFP, выявляются в большинстве органов и тканей химерных эмбрионов и взрослых животных. Околотетраплоидный кариотип гибридных клеток типа ЭСК-соматическая клетка сохраняется в ходе развития химер.

Однако остается неясным, в какой момент после слияния ЭСК и соматических клеток формируется доминантный фенотип. Проведен детальный иммунофлуоресцентный анализ маркеров, характерных для родительских геномов, с первых часов после слияния мышечных ЭСК и мышечных фибробластов. На стадии гетерокариона родительские ядра ЭСК и фибробласта находятся в общей цитоплазме. Идентификация гетерокарионов была проведена по присутствию голубых гранул, привнесенных фибробластами, и зеленому свечению GFP, исходящему от присутствия ядра ЭСК. На рис. 1 приведены

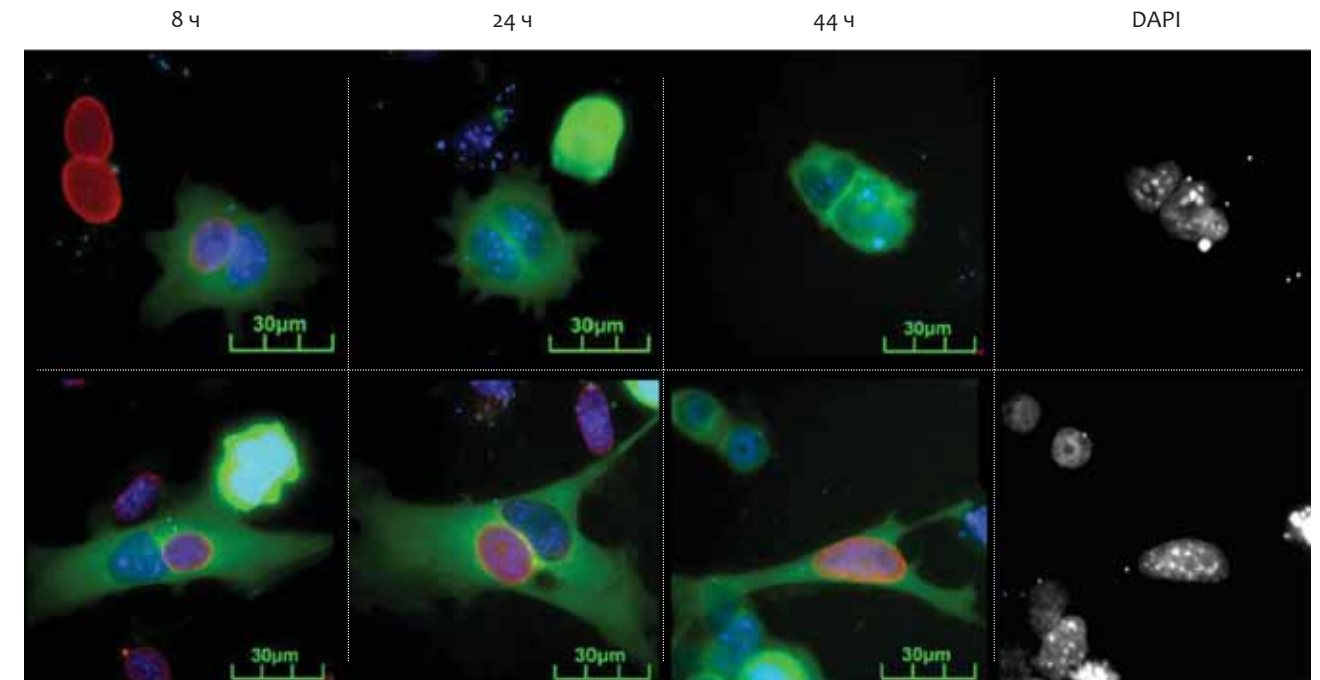
данные по присутствию белка Nanog (маркер ЭСК генома) и коллагена (маркер фибробластного генома). Видно, что среди гетерокарионов встречаются два типа: один – сходный с ЭСК (ядра позитивные по Nanog, а в цитоплазме отсутствует коллаген) и другой – с фибробластом (негативный по Nanog, позитивный по присутствию коллагена). Сходные данные были получены при анализе пары Oct4 (маркер ЭСК) и коллаген.

Рис. 2 иллюстрирует присутствие маркера дифференцированных клеток – ламина А/С в одном ядре гетерокарионов с фибробластным фенотипом и через 4 и 8 часов после слияния и отсутствие этого маркера в гетерокарионах и гибридных клетках с фенотипом ЭСК.

Полученные данные с использованием дополнительных других маркеров, характерных для родительских клеток, показали, что на стадии гетерокариона происходит двустороннее альтернативное перепрограммирование геномов либо по типу ЭСК, либо по типу фибробласта. «Фиксация» альтернативного доминирования родительских геномов осуществляется в течение 4–5 дней и завершается формированием колоний гибридных клеток двух альтернативных фенотипов.



**Рис. 1.** Иммуногистохимическое окрашивание Nanog и type I collagen в гетерокарионах через 4 ч и 20 ч и гибридных клетках через 45 ч после слияния ЭСК и фибробластов. Пурпурная окраска Nanog над ядрами, красная окраска коллагена в цитоплазме, ядра подкрашены DAPI (голубые).



**Рис. 2.** Иммуногистохимическое окрашивание LaminA/C в гетерокарионах через 8 ч и 24 ч и гибридных клетках через 44 ч после слияния ЭСК и фибробластов. Пурпурная окраска LaminA/C над ядрами, красная окраска коллагена в цитоплазме, гранулы и ядра окрашены голубым (DAPI).

## Организация хромосом описторхид

К.С. Задесенец, А.В. Катохин, В.А. Мордвинов, Н.Б. Рубцов  
Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Кариотипы большинства исследованных видов описторхид (*Opisthorchis felineus*, *Metorchis xanthosomus*, *Metorchis bilis*, *Clonorchis sinensis*) состоят из 7 пар хромосом ( $2n = 14$ ). Исключением является выверровая двуустка *Opisthorchis viverrini*, кариотип которой представлен 6 парами хромосом ( $2n = 12$ ). Хромосомы описторхид имеют сходную морфологию: две пары крупных хромосом (мета-, субметацентрики) и 5 пар маленьких хромосом (мета-, субмета-, акроцентрики), за исключением выверровой двуустки, у которой помимо крупных и мелких хромосом есть одна пара хромосом среднего размера.

Проведен анализ организации хромосом этих видов с использованием методов дифференциального окрашивания хромосом, создания разнообразных ДНК-проб и флуоресцентной гибридизации *in situ*. Выявлены и локализованы блоки конститутивного гетерохроматина, кластеры 18S и 5,8S рДНК трематод. Описано распределение кластеров теломерных повторов (TTAGGG) (рис. 1) и диспергированных повторов последовательностей (рис. 2). Получены ДНК-библиотеки из 1-й и 2-й хромосом *O. felineus* и *M. xanthosomus* (рис. 2).

Выполненное молекулярно-цитогенетическое описание хромосом описторхид является необходимым элементом полноценного секвенирования их генома.

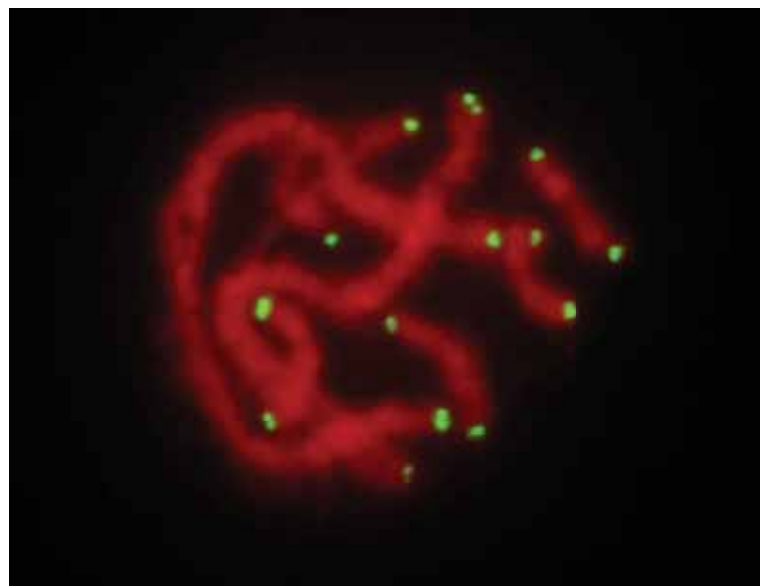


Рис. 1. FISH PNA-пробы с пахитенными хромосомами *Clonorchis sinensis* (зеленый – сигнал FISH; красный сигнал – окраска DAPI).

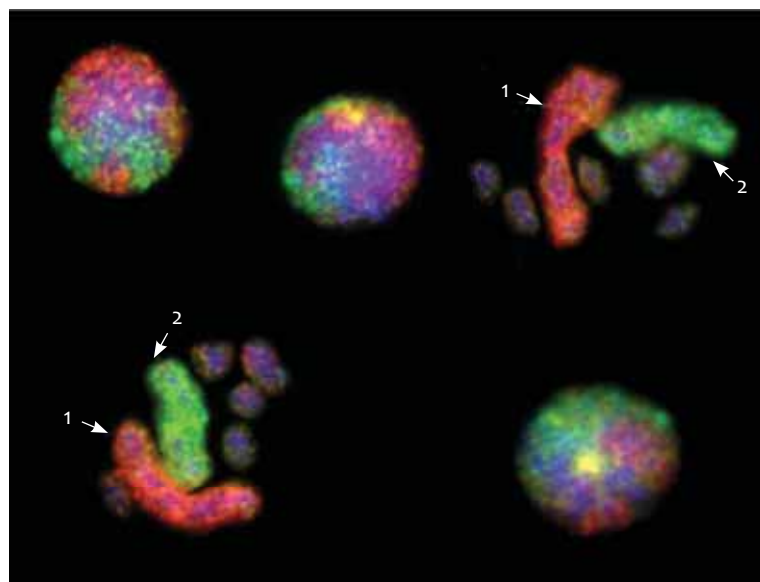


Рис. 2. Двухцветная FISH хромосомоспецифичных ДНК-проб, полученных из 1-й (красный сигнал) и 2-й (зеленый сигнал) хромосом *M. xanthosomus* с мейотическими хромосомами и интерфазными ядрами *M. xanthosomus*.

## Комплексный микроскопический анализ описторхид

К.С. Задесенец, М.Б. Дюкалова, С.И. Байбородин, А.В. Катохин, В.А. Мордвинов, Н.Б. Рубцов  
Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Детальное описание морфологии объекта исследований, его органов и тканей является необходимым элементом любого полноценного исследования. В связи с развитием работ, посвященных детальному изучению описторхид, были проведены комплексные микроскопические исследования марицы кошачьей двуустки *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884). Они были выполнены на различных уровнях разрешения с использованием микроскопии в светлом поле, люминесцентной микроскопии со структурированным освещением (ЛМСО) и лазерной сканирующей микроскопии (ЛСМ).

Результаты ЛСМ и ЛМСО использовали для формирования представлений о пространственной организации марицы и ее отдельных элементов.

Результаты трехмерной микроскопии дали представление о пространственном расположении различных элементов марицы, однако практически не давали информации об их составе. Для решения этой проблемы при изучении морфологии марицы кошачьей двуустки были получены физические срезы и проведено их гистологическое окрашивание для выявления в составе элементов разных систем (пищеварительной, репродуктивной, выделительной и т. д.) специфических белков, углеводов, нуклеиновых кислот (рис. 1, 2).

Комплексное использование светлопольной, флуоресцентной и конфокальной микроскопии позволило дать общее и детализированное описание морфологии и трехмерной организации исследуемого объекта.

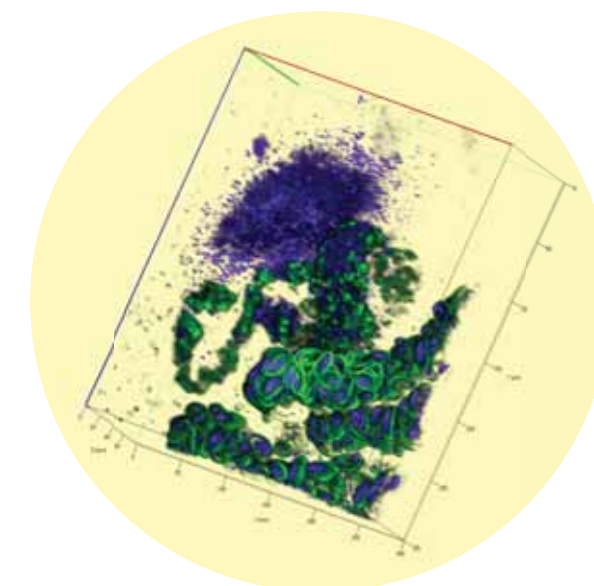


Рис. 1. Трехмерная реконструкция яичника и матки с яйцами *O. felineus*.

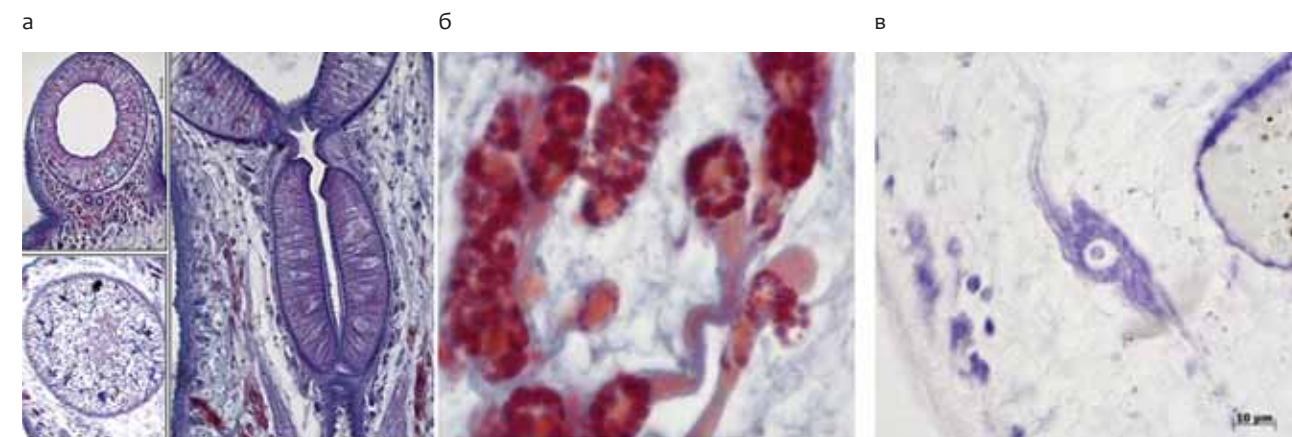


Рис. 2. Световая микроскопия срезов марицы, окрашенных гистохимическими красителями. а – ротовая присоска и мышечный жом (по Маллори); б – вителлиновые железы (по Маллори); в – нервная клетка в толще тела марицы (окрашивание толуидиновым синим).

## Нарушение формирования актинового цитоскелета в питающих клетках *TRL* мутантов *Drosophila melanogaster*

А.А. Огиенко<sup>1,2</sup>, В.В. Лашина<sup>1</sup>, С.И. Байбородин<sup>1</sup>, Э.М. Баричева<sup>1</sup>

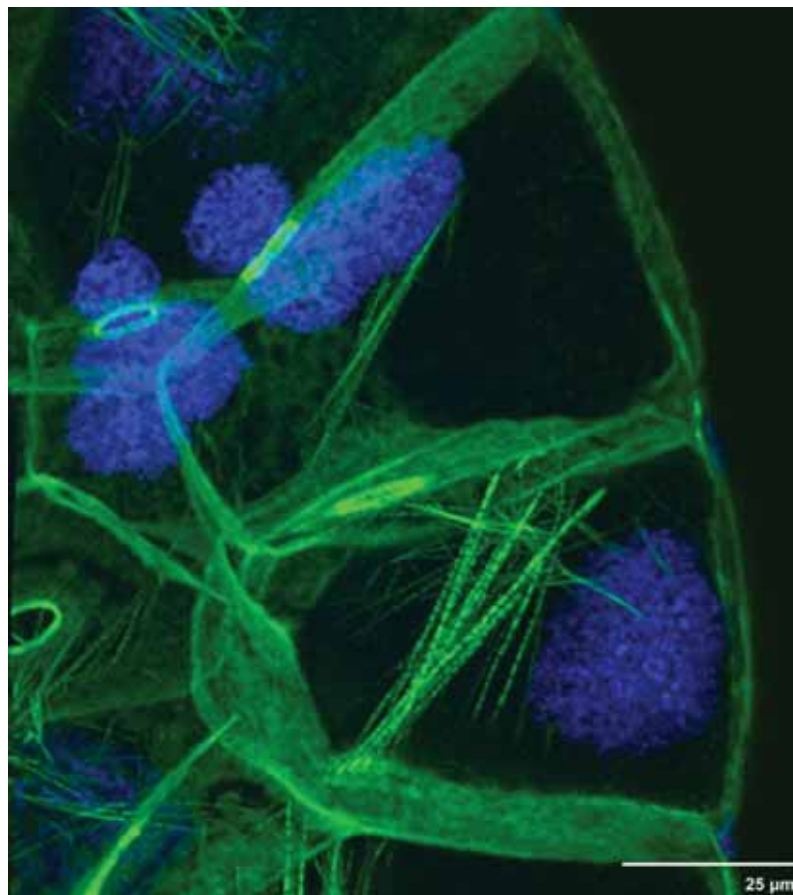
<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup> НОЦ «Молекулярный дизайн и экологически безопасные технологии» НГУ, Новосибирск

Формирование актиновых филаментов – один из основополагающих биологических процессов. Функции актиновых филаментов в клетках очень разнообразны. Как правило, актиновые филаменты с помощью ассоциированных белков образуют в клетках различные типы суперструктур, таких, как пучки параллельных филаментов, трехмерные и двухмерные сети, выполняющие разные функции, такие, как поддержание и изменение формы клеток, их миграция, формирование клеточных контактов, формирование клеточных выростов.

В половой системе самки *Drosophila melanogaster* есть большие питающие клетки, которые являются идеальной моделью для изучения по крайней мере трех различных видов актиновых филаментов: субкортикальный актиновый слой в непосредственной

близости от мембран клеток, актиновые филаменты, выстилающие кольцевые каналы, и, наконец, цитоплазматическая актиновая сеть. Получен ряд мутаций, затрагивающих формирование цитоплазматических актиновых филаментов. На микрофотографии (рис.) показана часть яйцевой камеры мутантной *Drosophila melanogaster*, окрашенная фаллоидином и DAPI. Фаллоидин, подобно антителам к актину, прочно связывает актиновые нити – филаменты. DAPI окрашивает ядра клеток. Актиновые филаменты (зеленые) в клетках практически полностью отсутствуют вследствие мутации. Это приводит к тому, что огромные полиплоидные ядра (синие) проходят через кольцевые каналы (ярко-зеленые овалы). В результате нарушается межклеточный транспорт в ооцит, происходит гибель яйцевой камеры и формируется неполноценное яйцо.



**Рис.** Проползание ядер через кольцевые каналы. На рисунке видно, что в клетках, где присутствуют актиновые филаменты (исчерченные зеленые нити), ядра (синие) удалены от кольцевых каналов (ярко-зеленые овалы). В клетках, где актиновых филаментов практически нет, ядра под давлением, вызванным сокращением кортикального актинового слоя питающих клеток, попадают в кольцевые каналы и блокируют дальнейший ток цитоплазмы из питающих клеток в ооцит.

## Амплификация LTR-ретротранспозонов и дивергенция геномов мягкой пшеницы

Е.М. Сергеева<sup>1</sup>, А.Б. Щербань<sup>1</sup>, И.Г. Адонина<sup>1</sup>, Б. Шалуб<sup>2</sup>, Е.А. Салина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

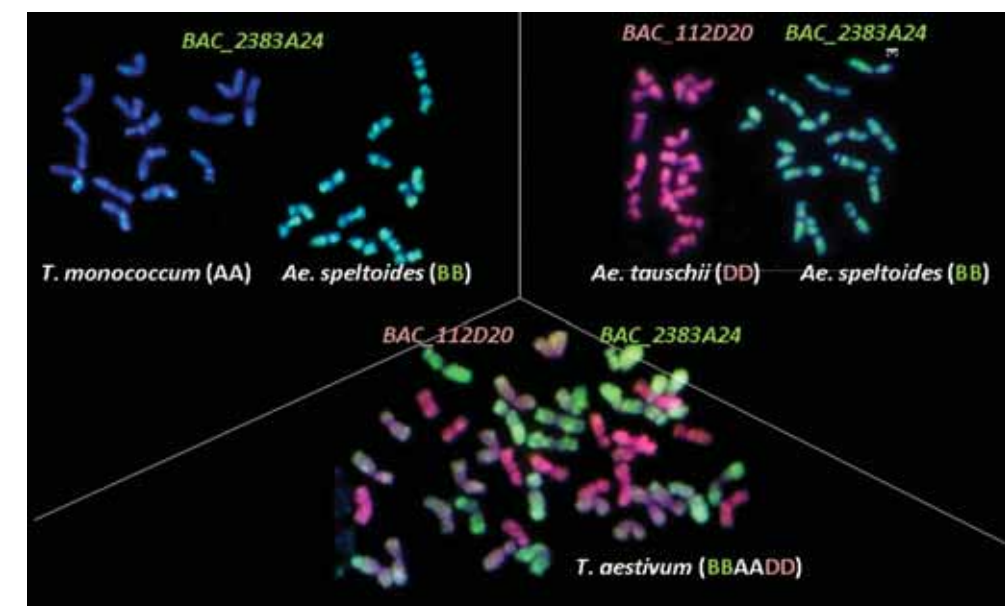
<sup>2</sup> URGV INRA, Evry, France

Аллополиплоидизация, или объединение геномов разных видов в одном ядре, сыграла ключевую роль в образовании многих растительных видов. Мягкая пшеница *Triticum aestivum* является естественным аллогексаплоидом ( $2n = 6x = 42$ , BBAADD), в образовании которого принимали участие диплоидные виды *Triticum* и *Aegilops*.

Одним из условий успешного функционирования аллогексаплоида является согласованное взаимодействие всех трех геномов в одном ядре на всех стадиях клеточного цикла. Дивергенция последовательностей геномов, вошедших в его состав, является одним из механизмов, обеспечивающих данный процесс. Дивергенции геномов эукариот активно способствуют мобильные элементы, их разнообразие, амплификация и распространение. Так как в настоящее время полная нуклеотидная последовательность 21 пары хромосом пшеницы неизвестна, то методом, дающим наиболее точное представление о распределении мобильных элементов на хромосомах мягкой пшеницы и их вкладе в дивергенцию геномов, является флуоресцентная гибридизация *in situ* – FISH (Fluorescent In Situ Hybridization).

В данной работе мы показали вклад амплификации LTR-ретротранспозонов в дивергенцию геномов В и D

мягкой пшеницы на примере двух семейств элементов *Fatima* и *Lila*. В качестве зондов для FISH мы использовали как BAC-клоны, так и рекомбинантные плазмиды, содержащие анализируемые элементы. В результате семейство *Fatima* показало локализацию на хромосомы генома В, а семейство *Lila* – на хромосомы генома D (рис.). Анализ геномных последовательностей пшеницы, представленных в базах данных, и филогенетический анализ показали, что геном-специфичный спектр гибридизации обусловлен, скорее, существованием специфичных групп LTR-ретротранспозонов, нежели различающимся содержанием элементов *Fatima* и *Lila* в геномах В и D. Оценка времени встройки LTR-ретротранспозонов в геном показала, что амплификация специфичных форм элементов произошла в геномах диплоидных предков пшеницы, т. е. до образования аллополиплоида. По всей видимости, процессы, связанные с амплификацией и распространением геном-специфичных вариантов мобильных элементов, более интенсивно происходили в геномах диплоидных видов, а не во время или после образования аллополиплоидных форм пшеницы.



**Рис.** FISH на хромосомы мягкой пшеницы *Triticum aestivum* и диплоидных видов – доноров геномов А, В и D. В качестве зондов использованы BAC-клоны, несущие мобильные элементы *Fatima* (2383A24) и *Lila* (112D20).



## Изучение цитомиксиса в микроспорогенезе табака

С.Р. Мурсалимов, Ю.В. Сидорчук, Е.В. Дейнеко

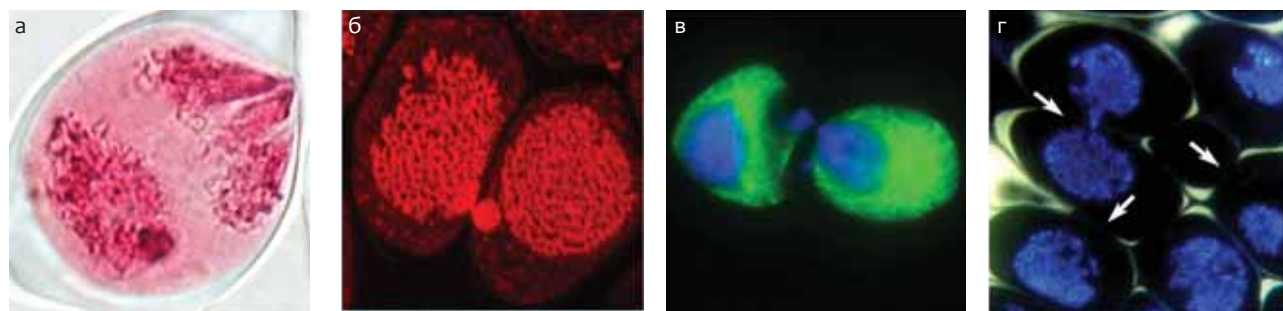
Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Цитомиксис – это процесс миграции ядер между растительными клетками (рис. 1) по прямым цитоплазматическим мостам (цитомиктическим каналам). Как правило, это явление обнаруживается с различной частотой в микроспорогенезе высших растений.

Создана коллекция мутантных линий табака, в микроспорогенезе которых цитомиксис встречается с постоянно высокой частотой, что позволило использовать эти линии в качестве моделей для детального анализа этого процесса (рис. 2). С помощью указанных линий удалось изучить процессы формирования и функционирования цитомиктических

каналов, а также выявить специфические органеллы, ответственные за образование каналов. Установлено, что межклеточное перемещение хроматина осуществляется в составе ядра, при этом не наблюдается признаков повреждения хроматина и ядерной оболочки. Показано, что ядро может мигрировать в другую клетку целиком, разделяясь на микроядра, либо в случае прямого контакта с ядром другой клетки через цитомиктический канал образовывать «ядерные мостики» (рис. 3).

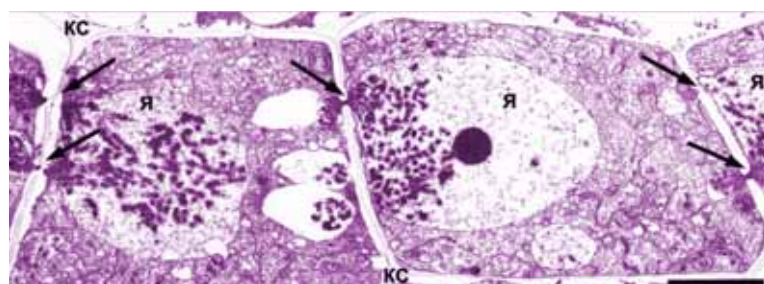
Полученные данные позволяют рассматривать цитомиксис как один из дополнительных путей увеличения генетического разнообразия гамет.



**Рис. 1.** Цитомиксис в материнских клетках пыльцы табака в профазе 1 мейоза.

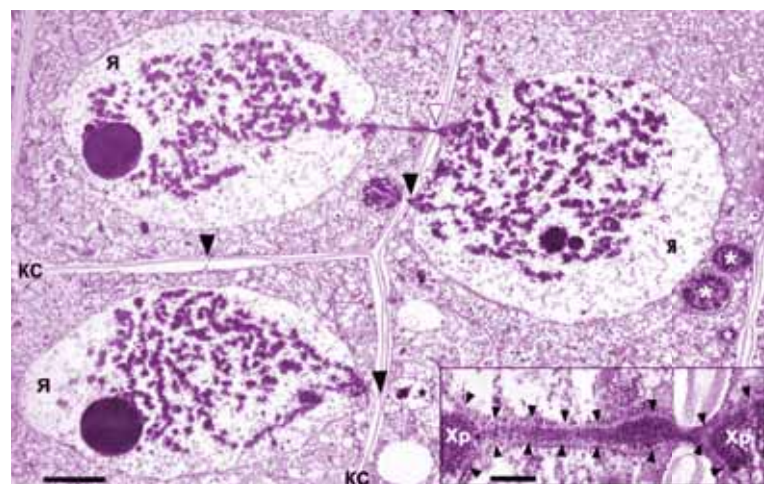
а – световая микроскопия; б–г – флуоресцентная микроскопия.

Обозначения: розовый цвет – окрашивание ядер ацетокарбином; красный цвет – окрашивание ядер родамином; зеленый цвет – визуализация цитоскелета с помощью антител на  $\alpha$ -тубулин; синий цвет – окрашивание ядер DAPI.



**Рис. 2.** Однонаправленная миграция ядер трех клеток по цитомиктическим каналам между микроспороцитами табака (указано стрелками).

я – ядро; кс – клеточная стенка. Шкала 5 мкм.



**Рис. 3.** Цитомиксис с образованием «ядерного мостика» на стадии пахитены

в микроспорогенезе табака контрольной линии SR1. Указаны цитомиктические каналы (черные стрелки), «ядерный мостик» (белая стрелка), микроядра (звездочки), я – ядро; кс – клеточная стенка. Шкала 2 мкм. На вставке «ядерный мостик», увеличено. Показано, что на протяжении «ядерного мостика» ядерная оболочка непрерывна (стрелки), Хр – хроматин. Шкала 500 нм.