

МАТВЕЕВСКИЙ С.Н.¹, БАКЛУШИНСКАЯ И.Ю.², ЛЯПУНОВА Е.А.², КОЛОМИЕЦ О.Л.¹

¹ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
Россия, 119991, Москва, ул. Губкина, д.3, e-mail: sergey8585@mail.ru

²ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
Россия, 119334, Москва, ул. Вавилова, д.26

МЕЙОТИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ХРОМАТИНА В СПЕРМАТОЦИТАХ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ СЛЕПУШОНОК РОДА *ELLOBIUS*

Необходимым условием успешного прохождения мейоза у самцов млекопитающих является синапсис, рекомбинация гомологов в профазе I мейоза и равноценная сегрегация гомологов на стадии метафазы. Сперматоциты, в которых эти процессы нарушены, подвергаются селекции [14]. Основными контрольно-пропускными пунктами мейоза считают пахитенный, который осуществляет блок мейоза в ядрах с нарушением синапсиса хромосом и веретенный, который ответственен за точную сегрегацию гомологов. Как известно, синапсис и рекомбинация – два взаимосвязанных процесса и нарушение синапсиса приводит к нарушению рекомбинации. Участки хромосом, не вступившие в синапсис (асинаптированные участки хроматина) подвергаются транскрипционному сайленсингу (MSUC – *meiotic silencing of unsynapsed chromatin*) [15]. У самцов большинства видов млекопитающих половые (XY) хромосомы гетероморфны, синаптируют лишь в псевдоаутосомных областях. Обязательным условием нормального прохождения мейоза у самцов млекопитающих является формирование полового тельца, которое образовано половыми хромосомами, подверженными транскрипционному сайленсингу (MSCI – *meiotic sex chromosome inactivation*) [7, 10].

Молекулярными маркерами процессов

Материалы и методы

Межвидовые гибриды F₁ от скрещивания *E. talpinus* (2n=NF=54) с *E. tancrei* (2n=32; NF=56) получены и кариотипированы в лаб. цитогенетики ИБР РАН.

В лаборатории цитогенетики ИОГен РАН получены распластанные препараты синаптомных комплексов (СК), проведен их иммуноцитохимический анализ. Осевые элементы хромосом и латеральные элементы СК идентифицировали с помощью антител против белка SCP3. Центромеры выявляли с помощью антител против белка кинетохора CENP-A или поли-

MSUC и MSCI служит большая группа белков, в частности, BRCA1, участвующий в репарации разрывов ДНК; ATR и другие. Одним из основных маркеров транскрипционного сайленсинга хроматина является гистон γ H2AX, который выявляется на асинаптированных участках хромосом, начиная со стадии лептотены, и остается на них вплоть до поздней диплотены, если синапсис хромосом не завершен [13, 15].

Настоящее исследование посвящено анализу особенностей синапсиса и мейотической инактивации хромосом на стадии профазы I мейоза в ядрах сперматоцитов стерильных межвидовых гибридов, полученных от скрещивания *Ellobius talpinus* (2n=NF=54) с *Ellobius tancrei* (2n=32; NF=56). Эти гибриды гетерозиготны по одиннадцати робертсоновским (Rb) транслокациям.

Род *Ellobius* – уникальная группа роющих грызунов, включающая 5 видов. Три вида слепушонок – обыкновенная *E. talpinus* (2n=NF=54), восточная *E. tancrei* (2n=54-30, NF=56) и алайская *E. alaicus* (2n=52-50, NF=56) – виды-двойники, в кариотипах и самок, и самцов этих видов выявлена пара половых (XX) хромосом, идентичных по расположению G-полос. К тому же для видов *E. tancrei* и *E. alaicus* описана широкая изменчивость по числу Rb-транслокаций [1, 2, 12].

клональными антицентромерными антителами АСА. Участки транскрипционного сайленсинга хроматина выявляли с помощью антител к гистону γ H2AX. Проведение процедур получения распластных препаратов СК и иммуноцитохимического окрашивания препаратов детально описано нами ранее [9]. Также проведен светомикроскопический анализ суспензий клеток семенников и гистологическое исследование срезов ткани семенников гибридов, фиксированных по Буэну и окрашенных гематоксилин-эозином.

Результаты и обсуждение

Анализ суспензии клеток и гистологиче-

ское исследование семенников исследованных

гибридов не выявил в них ни сперматид, ни сперматозоидов, что коррелирует с данными об их стерильности.

Кариотипы самцов межвидовых гибридов ($2n=43, XX$) включали 41 аутосому (12 метацентриков, 29 акроцентриков) и акроцентрический половой (XX) бивалент. Длинные плечи 22 акроцентриков гомологичны по G-бэндам плечам 11 Rb-метацентриков.

В ядрах, распластанных на стадии лепто-тены (до начала синапсиса хромосом), весь хроматин связывается с антителами к белку $\gamma H2AX$. По мере продвижения синапсиса хромосом на

стадии зиготены–пахитены интенсивность окрашивания хроматина антителами к гистону $\gamma H2AX$ постепенно снижается. Первыми синаптируют короткие биваленты. Следует отметить, что в структуре одного из СК-бивалентов, образованном акроцентриком 7-ой пары *E. talpinus* и гомологичным ему по G-бэндам субметацентриком *E. tancrei*, центромеры расположены на разных уровнях. Это явление мы объяснили ранее тем, что в процессе дивергенции этих видов произошло формирование нецентромеры у *E. tancrei* [4, 6].

Рис. 1. Схема. Мейотический сайленсинг хроматина в сперматоцитах межвидовых гибридов слепушо-



нок. Стрелкой отмечен «медленный» СК-тривалент, головка стрелки указывает на «быстрый» СК-тривалент, звездочка – СК-бивалент. *a*. На стадии зиготены половой (XX) бивалент имеет типичное строение, но еще не выселен на периферию мейотического ядра. Уже в середине зиготены часть СК-тривалентов сформированы («быстрые» СК-триваленты). В некоторых тривалентах синапсис запаздывает вплоть до поздней пахитены («медленные» СК-триваленты). Как правило, $\gamma H2AX$ неравномерно распределен по ядру и локализован в зонах асинапсиса мейотических хромосом. Лишь «быстрые» СК-триваленты и синаптированные участки некоторых аутосом не окружены $\gamma H2AX$; *б*. На стадии пахитены половой (XX) бивалент смещается к периферии ядра. Облако $\gamma H2AX$ сохраняется в асинаптических зонах полового бивалента и «медленных» СК-тривалентов; *в*. На стадии диплотены половой бивалент окончательно выселяется на периферию ядра и формирует клубок, который полностью окружен $\gamma H2AX$. В десинаптирующих «медленных» СК-тривалентах гистон $\gamma H2AX$ окутывает только лишь короткие участки, ранее подверженных мейотической инактивации

Синапсис СК-тривалентов, формирующихся между длинными плечами двух акроцентриков и плечами метацентрика начинается с дистальных участков хромосом и продвигается к их центромерным участкам. При этом формируются не только свободные СК-триваленты, но и цепочки СК-тривалентов, связанные посредством фрагментов СК между короткими плечами негомологичных акроцентриков, входящих в состав разных тривалентов. В большинстве ядер не удается провести СК-кариотипирование, так как в структуре осевых элементов растянутых

хромосом формируются брешы (рис. 1а) и оси некоторых хромосом вступают в интерлокинг.

По мере продвижения пахитены количество СК-тривалентов в цепочках уменьшается – они распадаются на отдельные СК-триваленты. Даже свободные СК-триваленты долго остаются открытыми, иногда вплоть до поздней пахитены-диплотены. В зоне асинапсиса некоторых (но не всех) «медленных» тривалентов визуализируется облако гистона $\gamma H2AX$ (рис. 1б, в).

Половые (XX) хромосомы в ядрах гибридов, как и у самцов родительских форм синап-

тировали с обоих теломерных концов – там формировались короткие СК, а в центральной части половых бивалентов сохранялась обширная зона асинопсиса. Т.о. XX-хромосомы не синаптировали полностью, что косвенно свидетельствует о различиях между ними [9, 11].

В 62% пахитенных сперматоцитов половое тельце не было сформировано [5]. При окрашивании поликлональными антицентромерными антителами (АСА) выявлялось их неспецифичное связывание с ядрышко-подобным тельцем (ЯПТ), расположенном на одном из осевых элементов полового бивалента. ЯПТ отчетливо идентифицируются и электронно-микроскопически в препаратах распластанных СК, контрастированных водным раствором азотнокислого серебра. В некоторых сперматоцитах с половым бивалентом ассоциировали асиноптированные участки аутосом, что является косвенным признаком включения механизма пахитенного ареста. По мере продвижения пахитены количество Rb-тривалентов в цепочках уменьшается.

Вокруг полового (XX) бивалента γ H2AX выявляется в виде компактного облака (в ряде случаев – только в зоне асинопсиса) и ассоциированных с ним асиноптированных участков аутосом. Однако на стадии диплотены в большинстве ядер формируется нормальное половое тельце, плотно одетое облаком γ H2AX. Т.о. арест мейоза на стадии пахитены если и происходит, то не во всех ядрах гибрида.

Согласно полученным нами результатам, формирование цепочек СК-тривалентов у гетерозигот по множественным Rb-транслокациям, формирование цепочек СК-мультивалентов сопровождается сохранением протяженных зон

Выводы

По-видимому, у исследованных нами стерильных гибридов второй этап селекции сперматоцитов происходит на стадии метафазы I. Таким образом, цитогенетические механизмы обеспечивают дивергенцию двух видов слепу-

Работа выполнена при поддержке РФФИ №12-04-31425-мол_a и Программы №.30 фундаментальных исследований Президиума РАН "Живая природа" (подпрограмма "Динамика и сохранение генофондов").

Литература

1. Ляпунова Е.А., Ивницкий С.Б., Кораблев В.П., Янина И.Ю. Полный Робертсоновский веер хромосомных форм слепушонок надвида *Ellobius talpinus* // ДАН СССР. – 1984. – Т. 274, №5. – С. 1209–1213.
2. Ляпунова Е.А., Баклушинская И.Ю., Саидов А.С., Саидов К.Х. Динамика хромосомной изменчивости слепушонок *Ellobius tancrei* (Mammalia, Rodentia) в Памиро-Алае за период с 1982 по 2008 гг. // Генетика. – 2010. – Т. 46, №5. – С. 645–651.

асинапсиса в прицентромерных участках как акроцентриков, так и метацентриков. Вместе с тем известно, что асиноптированные участки хроматина должны подвергаться транскрипционной инактивации, что собственно и приводит к блоку (аресту) мейоза, так как может служить сигналом КПП мейоза о потере части генома [8].

Признаки транскрипционной инактивации хроматина в зонах асинопсиса хромосом с участием белков γ H2AX, ATR, SUMO1 и XMR были ранее выявлены у мышей, гетерозиготным по 8 Rb-транслокациям, что также не приводило к нарушению формирования полового тельца в большинстве ядер таких сперматоцитов. Вместе с тем, апоптоз части сперматоцитов наблюдался у таких гибридов на стадии метафазы, что объясняется активностью веретенного КПП. Именно низкая эффективность работы пахитенного контрольно-пропускного пункта по отношению к Rb-транслокациям, по мнению авторов, определяет возможность циркуляции Rb-метацентриков в природных популяциях и их роль в эволюции кариотипов [13].

Нельзя исключить и того, что причиной лояльности пахитенного КПП по отношению к участкам хроматина, подверженного сайленсингу на стадии пахитены, кроется в низкой генетической значимости прицентромерных районов хроматина в СК-тривалентах и цепочках СК. Кроме того, у самцов слепушонок, как гибридов, так и их родительских форм (*E. talpinus* и *E. tancrei*) половые (XX) хромосомы формируют закрытый половой бивалент, что в свою очередь может снижать способность его ассоциации с асиноптированными аутосомами.

шенок и делают маловероятным формирование гибридной зоны в районах контакта ареалов этих видов-двойников.

3. Баклушинская И.Ю., Ляпунова Е.А. Номенклатура хромосом восточной слепушонки *Ellobius tancrei* // Цитология, 1990. – Т. 32, №4. – С. 378 – 383.
4. Матвеевский С.Н. Неоцентромеры в структуре неробертсоновской субметацентрической пары хромосом *Ellobius tancrei* // Материалы XVIII междунар. конф. студ., асп. мол. уч. «Ломоносов – 2011». Секция «Генетика» / Отв. ред. А.И. Андреев, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, М.В. Чистякова. – М. – 2011. – С. 94.
5. Матвеевский С.Н., Баклушинская И.Ю., Ляпунова Е.А., Коломиец О.Л. Нарушение мейоза у гибридов F₁ от скрещивания видов-двойников слепушонок (*Ellobius*, Rodentia) // Материалы междунар. конф. "Целостность вида у млекопитающих изолирующие барьеры и гибридизация". – Петергоф. – 2010. – С. 58.
6. Bakloushinskaya I.Yu., Matveevsky S.N., Romanenko S.A., Serdukova N.A., Kolomiets O.L., Spangenberg V.E., Lyapunova E.A., Graphodatsky A.S. A comparative analysis of the mole vole sibling species *Ellobius tancrei* and *E. talpinus* (Cricetidae, Rodentia) through chromosome painting and examination of synaptonemal complex structures in hybrids // Cytogenet Genome Res. – 2012. – Vol. 3. – P. 1–9.
7. Burgoyne P.S., Mahadevaiah S.K., Turner J.M. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis // Nature Rev Genet. – 2009. – Vol. 10. – P. 207–216.
8. Oliver–Bonet M., Ko E., Martina R.H. Male infertility in reciprocal translocation carriers: the sex body affair // Cytogenet. Genome Res. – 2005. – Vol. 1. – P. 343–346.
9. Kolomiets O.L., Matveevsky S.N., Bakloushinskaya I.Yu. Sexual dimorphism in prophase I of meiosis in mole vole (*Ellobius talpinus* Pallas) with isomorphic (XX) chromosomes in males and females // Compar. Cytogenet. – 2010. – Vol. 4, №1. – P. 55–66.
10. Forejt J. X–inactivation and its role in male sterility // Chromosomes Today. – 1984. – Vol. 8. – P. 17–22.
11. Kolomiets O.L., Vorontsov N.N., Lyapunova E.A., Mazurova T.F. Ultrastructure, meiotic behaviour, and evolution of sex chromosomes of the genus *Ellobius* // Genetica. – 1991. – Vol. 847, №3. – P. 179–189.
12. Lyapunova E.A., Vorontsov N.N., Korobitsina K.V., Ivanitskaya E.Yu., Borisov Yu.M., Yakimenko L.V., Dovgal V.Y. A Robertsonian fan in *Ellobius talpinus* // Genetica. – 1980. – Vol. 52–53. – P. 239–247.
13. Manterola M., Page J., Vasco C., Berrios S., Parra M., Viera A., Rufas J., Zuccotti M., Garagna S., Fernández–Donoso R. A high incidence of meiotic silencing of unsynapsed chromatin is not associated with substantial pachytene loss in heterozygous male mice carrying multiple simple robertsonian translocations // PLoS Genet. – 2009. – №8. – P.1–14.
14. Schimenti J. Synapsis or silence // Nature Genetics. – 2005. – Vol. 37, №1. – P. 11–13.
15. Turner J.M.A., Mahadevaiah S.K., Ellis P.J.I., Mitchell M.J., Burgoyne P.S. Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids // Develop. Cell. – 2006. – Vol. 10, №4. – P. 521–529.

MATVEEVSKY S.N.¹, BAKLOUSHINSKAYA I.Yu.², LYAPUNOVA E.A.², KOLOMIETS O.L.¹

¹*Vavilov Institute of General Genetics RAS, Russia, 119991, Moscow, 3 Gubkina str.*

²*Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Russia, 119334, Moscow, 26 Vavilova str.*

MEIOTIC INACTIVATION OF CHROMATIN IN SPERMATOCYTES OF INTERSPECIFIC HYBRIDS OF MOLE-VOLES ELLOBIUS

Aims: Analysis of synapsis and meiotic inactivation of chromosomes in the prophase I nuclei of spermatocytes of sterile interspecific hybrids of mole-voles. **Methods.** We used a surface-spreading and immunocytochemical techniques to visualize the process of chromosome synapsis with antibodies to protein SCP3 and for analysis of MSUC (*meiotic silencing of unsynapsed chromatin*) with antibodies to γ H2AX.

Results. The meiotic chromosome synapsis and silencing of unsynapsed chromatin of autosomes and sex chromosomes have been examined in spermatocytes of interspecific hybrid *E. talpinus* (2n=NF=54) and *E. tancrei* (2n=32; NF=56), heterozygous for eleven Robertsonian (Rb) translocations. The pachytene spermatocytes had normal bivalents; open and close SC trivalents, chains of chromosomes with lengthy unsynapsed regions. Chromatin of unsynapsed regions associated with extensive clouds of γ H2AX. However, they are not eliminated during pachytene and most of them proceed into diplotene. The sex bivalent formed sex body in many nucleus and associated with γ H2AX. So, synapsis defects in most pachytene cells did not trigger a pachytene arrest. Analysis of suspension of testicular cell and histological study of testicular tissue hasn't revealed any spermatids or spermatozooids. **Conclusions.** The spermatocytes heterozygous for eleven Robertsonian translocations overcame pachytene and were exposed to arrest at later stages of spermatogenesis. These results serve as one more explanation of a wide circulation of Rb-translocations in populations of many animal species.

Key words: Rb translocation, *Ellobius*, synaptonemal complex, γ H2AX, interspecific hybrids, sterility.