

## **КАРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НА ПРИМЕРЕ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ ХИРОНОМИД**

### **Сценарий учебного видеофильма из видеокомплекса «Видеопрактика по цитологии в НГУ»**

**В. В. Голыгина, О. В. Ермолаева, А. Д. Брошков**

#### **Аннотация.**

Фильм «Кариологический анализ на примере политенных хромосом хирономид» является частью видеокомплекса «Видеопрактика по цитологии в НГУ». Он состоит из 3 частей, общей продолжительностью 20 минут.

Первая часть - теоретическая - знакомит с кариотипами различных организмов и основами кариологического анализа в общем. Обосновывается выбор объекта и предмета исследования, в частности, личинки двукрылых насекомых и их политенные хромосомы. *Длительность 3 мин. 35 с.*

Во второй части подробно описывается структура политенных хромосом, ее зависимость от степени политении, рассказывается о видоспецифичности рисунка дисков политенных хромосом. *Длительность 6 мин. 25 с.*

Третья часть посвящена хромосомному полиморфизму. Представлены основные хромосомные перестройки с помощью пластилиновых моделей и фотографий кариотипов. Используются видеосъемка и элементы анимации. Особое внимание уделено инверсиям: простым, сложным, пара- и перичентрическим. Рассмотрены разные варианты взаимного расположения гомологов в норме и при перестройках, в зависимости от случайной фиксации политенных хромосом на стекле при изготовлении препарата. *Длительность 10 мин. 15 с.*

Методические материалы «Учебный видеокурс» подготовлен в рамках реализации Программы развития НИУ-НГУ.

## Сценарий .

### **Часть 1. Знакомство с кариотипами различных организмов.**

Метод кариологического анализа широко используется в современной клеточной биологии. В основе метода лежит характеристика и анализ кариотипов эукариотических клеток — хромосомных наборов организмов. При описании кариотипа отмечают количество хромосом, их размеры, соотношение длин плеч, наличие перетяжек, сходство гомологов, распределение районов с более плотной упаковкой ДНК. Для кариологического анализа используют, как правило, метафазные хромосомы из митотически или мейотически делящихся клеток с использованием дифференциального окрашивания, а также политенные хромосомы у тех видов, у которых они есть.

Иногда при сравнительном анализе удобно строить идиограммы - схематическое изображение гаплоидного набора хромосом (Новашин, 1921).

Все хромосомы набора пронумерованы. Для каждого вида принята своя система обозначения хромосом. Но существует общее правило: нумерация начинается с самых крупных хромосом и далее идёт в порядке убывания. Хромосомы одинакового размера объединяют в группы. Внутри групп хромосомы различают по морфологии. На хромосомах отмечают первичную перетяжку, или центромерный район, а в хромосомах с ядрышковым оргнизатором — также и вторичную перетяжку. По положению центромерного района или соотношению длин плеч все хромосомы делятся на метоцентрики, субметоцентрики, акроцентрики и телоцентрики.

Поскольку рутинное окрашивание хромосом относительно малоинформативно и часто не позволяет различить хромосомы со сходными размерами и морфологией, в настоящее время активно используются разнообразные методы дифференциального окрашивания и гибридизации *in situ*. Методы дифференциальной окраски выявляют особенности химического состава хроматина в разных районах хромосомы, что проявляется в изменении интенсивности окраски разных районов и приводит к появлению специфической исчерченности. Гибридизация *in situ* позволяет локализовать на хромосомах отдельные последовательности ДНК. Однако у каждого метода есть свои ограничения. Ещё большие ограничения для решения поставленной задачи накладывает выбор объекта.

Так, геномы прямокрылообразных насекомых, таких как саранчёвые и тараканы, богаты повторами и их геном в сотню раз больше, чем у дрозофилы. Поэтому их метафазные хромосомы крупные и удобные для кариологического анализа. Очень крупные хромосомы у лилейных. А вот метафазные хромосомы хирономид чрезвычайно мелкие. Их используют при необходимости установить точное число хромосом и, если возможно, их морфологию. На этом рисунке представлены метафазные хромосомы разных видов в сравнении.

В то же время у хирономид (как и большинства личинок двукрылых насекомых и некоторых других животных) имеются политенные хромосомы, позволяющие проводить анализ кариотипов с точностью, недостижимой при использовании метафазных хромосом.

## **Часть 2. Организация политенной хромосомы. Структура кариотипов хирономид.**

Впервые политенные хромосомы были обнаружены в 1881 году французским эмбриологом Э. Бальбиани в виде цилиндрических жгутов в ядре клеток слюнных желез комара *C. plumosus*. Термин политенные хромосомы предложил Коллер в 1935 году, а окончательно ввел в науку С. Дарлингтон в 1937 году.

Политенные хромосомы еще называют гигантскими за их невероятные размеры по сравнению с метафазными хромосомами. Чем же обусловлены такие размеры?

Во-первых, политенные хромосомы — это интерфазные хромосомы, поэтому они являются идеальной моделью для изучения активности хромосом в интерфазе, когда в обычных клетках хромосомы не видны. Например, политенные хромосомы *Drosophila melanogaster* в 70-110 раз длиннее митотических, причем увеличение хромосомы в длину происходит в линейной зависимости от степени политении. В то же время следует отметить, что на состояние растянутости влияет не только степень политении, но и внутренние условия в клетке. Так, политенные хромосомы из разных тканей: мальпигиевых сосудов, средней кишки, задней кишки, слюнных желез, имеют одинаковую длину, хотя степень политении в хромосомах слюнных желёз намного выше, чем в остальных тканях. Кроме того, уровень компактизации политенных хромосом слюнных желёз может зависеть и от внешних факторов. Например, у личинок хирономид хромосомы в зимне-весенний период намного длиннее, чем летне-осенний, и имеют гораздо более чёткую дисковую структуру.

Во-вторых, политенные хромосомы значительно толще метафазных. Увеличение размеров в ширину происходит за счет

накопления числа хроматид (нитей ДНК) в ходе целого ряда эндомитозов. После редупликации отдельные хромосомы не расходятся, а остаются соединенными вместе. Увеличение числа хроматид и создает многонитчатую или политенную структуру этих хромосом. Было показано, что хромосомы в слюнных железах состоят из перевитых между собой попарно пучков хроматид. Так, самые крупные политенные хромосомы в клетках слюнных желез личинок последнего возраста дрозофилы имеют плоидность до  $1024n$ , что соответствует  $2^6$ - $2^8$  циклам редупликаций. А у отдельных видов хирономид плоидность может достигать  $32000n$ , что соответствует  $2^{13}$ - $2^{15}$  числу редупликаций.

Форма политенной хромосомы существенно меняется в зависимости от числа нитей в ней. В начале развития хромосом они имеют вид плоской ленты - меандра. На препаратах такие хромосомы выглядят как закрученный серпантин. Такие хромосомы обнаруживают в мальпигиевых сосудах. На поздних стадиях политенизации хромосомы приобретают цилиндрическую форму. Такие хромосомы наиболее пригодны для анализа и имеют четкую поперечную исчерченность. Поперечная исчерченность характерна для так называемых классических политенных хромосом. В них каждая хроматида плотно конъюгирует по всей длине с другими хроматидами той же хромосомы. Но степень конъюгации хроматид может быть разной, соответственно, и форма хромосом может варьировать. По этому признаку их можно разделить на три основных типа: классические, «помпоны» и имеющие скрытую политенцию. В «помпоноподобных хромосомах» хроматиды плотно конъюгируют лишь в некоторых местах. При скрытой политении конъюгации почти нет, поэтому четких хромосом не видно, выявляют только более или менее гомогенную массу хроматина.

Для политенных хромосом классического типа характерна поперечная исчерченность, или хромомерная организация. Она становится заметной после достижения хромосомами политении в  $64$ - $128n$ . Каждая нить, входящая в состав хромосомы, имеет разную плотность хроматина по длине, но участки с высокой и низкой плотностями совпадают у всех хроматид одной хромосомы. В результате при синапсисе хроматид районы с высокой плотностью образуют темные полосы. Их называют хромомерами, или дисками. Между ними располагаются светлые промежутки с низкой плотностью. Их называют межхромомеры, или междиски. Вместе они формируют уникальный дисковый рисунок, специфичный для каждой хромосомы.

В-третьих, помимо конъюгации хроматид одной хромосомы между собой, гомологичные хромосомы каждой пары обычно также конъюгируют между собой. Это явление называется соматической конъюгацией, или соматическим синапсисом. В результате в клетках с

политенными хромосомами видимое число хромосом - гаплоидное. Наличие синапсиса не является обязательным. Он может быть частичным или отсутствовать вовсе. Так, у *Sympotthastia repentina* синапсис наблюдается только в части хромосомных районов, а отличительной чертой кариотипа *Chironomus plumosus* является отсутствие синапсиса гомологов четвёртой хромосомы.

Благодаря наличию соматической конъюгации легко можно выявлять гетерозиготные хромосомные перестройки, такие как инверсии и транслокации, поскольку их наличие приводит к образованию петле- и крестообразных структур, а уникальный рисунок хромосом позволяет точно определять границы этих перестроек.

### **Часть 3. Хромосомные перестройки и хромосомный полиморфизм.**

Хромосомные перестройки были открыты генетически у дрозофил. Позже их существование было доказано цитологически на митотических хромосомах. Хромосомные перестройки принято разделять на четыре основных типа: инверсии, транслокации, делеции и дупликации.

Какие перестройки бывают и какие из них встречаются в кариотипах хирономид?

Делеция — это потеря части хромосомы. Делеции не бывают длинными и почти все летальны в гомозиготе, поэтому выживают, как правило, лишь особи с очень короткими гетерозиготными делециями. Крупные гетерозиготные делеции, захватывающие несколько дисков, можно обнаружить на цитологических препаратах как характерные нарушения конъюгации гомологов, при котором нормальная хромосома образует петлю на участке, соответствующем делеции. Хотя в природных популяциях хирономид были описаны отдельные случаи гетерозиготных делеций, надёжность этих данных остаётся под вопросом.

Дупликация — это появление дополнительной копии участка хромосом. Дупликации, при которых происходит многократное повторение района хромосомы, называют амплификациями. Дупликации могут происходить как в пределах одной и той же хромосомы, так и сопровождаться переносом копии участка генетического материала на другую хромосому, в этом случае они называются транспозициями. У хирономид наиболее распространённым видом дупликаций является амплификация центромерного

гетерохроматина. У некоторых видов также встречаются случаи амплификации отдельных дисков.

Транслокация — это перенос участка одной хромосомы на другую. Различают нерасцепные — простой перенос участка с одной хромосомы на другую,— и расцепные транслокации, при которых происходит обмен участками между негомологичными хромосомами. В транслокационных событиях могут быть задействованы как отдельные участки хромосом, так и целые хромосомные плечи. Особый вид транслокаций представляют собой центрические слияния, называемые также Робертсоновскими транслокациями. Это слияние двух акроцентрических хромосом, в результате которого образуется одна двухплечая хромосома — метацентрическая или субметацентрическая. В результате уменьшается число хромосом в наборе. Этот тип перестроек является важным механизмом в эволюции кариотипов многих организмов. У хирономид расцепные транслокации целых хромосомных плеч лежат в основе формирования цитологических комплексов. В природных популяциях некоторых видов хирономид описаны случаи обнаружения единичных особей с расцепными транслокациями, затрагивающими как целые плечи хромосом, так и участки хромосомных плеч.

Инверсия — это поворот участка хромосомы на  $180^\circ$ . В зависимости от расположения границ инверсии по отношению к центромере инверсии делят на парацентрические и перичцентрические. У парацентрических инверсий точки разрывов расположены в одном плече хромосомы и не включают центромеру в инвертированный участок, а у перичцентрических — в разных плечах хромосомы, из-за чего происходит изменение положения центромеры. Наряду с простыми инверсиями в хромосомах могут встречаться также сложные инверсии, образованные за счёт двух или более инверсионных событий. Среди сложных инверсий по характеру распределения точек разрывов на хромосоме можно выделить включённые инверсии, когда точки разрыва второй инверсии находятся в пределах первой, и перекрывающиеся инверсии, при которых только одна из точек разрывов второй инверсии находится в границах первой инверсии.

Инверсии — наиболее часто встречаемая перестройка в кариотипах большинства организмов. Они играют огромную роль в повышении генетического разнообразия, адаптации, в генетической изоляции популяций одного вида и, следовательно, в видообразовании. На препаратах полетенных хромосом гетерозиготные инверсии выглядят как расконъюгированные участки, а также как петли разнообразной конфигурации.

Для большинства видов хирономид характерен высокий уровень инверсионного полиморфизма, причём многие инверсии встречаются как в гетеро-, так и в гомозиготном состоянии.

Присутствие в кариотипе гомозиготных инверсии можно определить только при сравнении последовательностей дисков хромосом со стандартным кариотипом.

Гетерозиготные инверсии выявляются по нарушению нормальной конъюгации гомологов.

#### *Парацентрические инверсии.*

Короткие инверсии в гетерозиготе приводят к нарушению конъюгации гомологов, что выражается обычно в их расхождении.

Протяженные простые инверсии в классическом случае выглядят как петли на хромосоме, однако в зависимости от того, как произошло распластывание хромосом при приготовлении препарата, они могут образовывать «восьмёрку» или выглядеть как расхождения гомологов, но с изменённым порядком дисков в районе инвертированного участка.

В случае сложных парацентрических инверсий на препаратах будут обнаруживаться разнообразные конфигурации: сложные петли, смещения и прочее.

Давайте рассмотрим возможные сочетания инверсий и их последствия на препаратах.

Включенные инверсии образуются, когда точки разрывов второй инверсии лежат в пределах первой.

У перекрывающихся инверсий одна точка разрыва лежит в пределах первой инверсии, а вторая — за ее пределами.

Сочетание включенных и перекрывающихся инверсий на разных гомологах может давать очень сложные конфигурации хромосом.

#### *Перицентрические инверсии*

Как уже было сказано выше, перицентрические инверсии затрагивают центромерный район, а потому часто приводят к изменению морфологии хромосомы, например превращают акроцентрическую хромосому в метацентрическую или наоборот.

Как и парацентрические инверсии, в зависимости от размера и сложности гетерозиготы перицентрические инверсии могут

выглядеть как расхождения гомологов, петли, «восьмёрки» и более сложные структуры.

Большинство хромосомных перестроек не проходят бесследно для организма. Они могут вызывать видимые изменения фенотипа, нарушать развитие, либо приводить к гибели организма.

### **Заключение.**

Выбирая политенные хромосомы в качестве экспериментальной модели следует помнить об ее ограничениях. Политенные хромосомы — это частный случай интерфазной хромосомы. Все ткани, в которых обнаружены политенные хромосомы, несмотря на множество отличий, имеют ряд схожих черт. Все они являются дифференцированными и активно секреторными. Они потеряли способность к делению, у них упрощена и ускорена репликация ДНК.