

На правах рукописи

УДК 576.315.42

**ПЕТРОВА НАТАЛЬЯ ВАЛЕНТИНОВНА**

**ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМОСОМНЫХ ТЕРРИТОРИЙ  
В ЯДРАХ НОРМАЛЬНЫХ И АНЕУПЛОИДНЫХ КЛЕТОК**

Специальность 03.00.03 - молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва

2007

Работа выполнена в лаборатории Структурно-функциональной организации хромосом  
Института биологии гена РАН

**Научный руководитель:** доктор биологических наук  
Яровая О.В.

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук  
Георгиева С.Г.

кандидат биологических наук  
Карпова О.И.

**Ведущая организация:** Институт биоорганической химии  
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Защита диссертации состоится \_\_\_\_\_ мая 2007 года в \_\_\_\_\_ час. на заседании  
Диссертационного совета Д 002.037.01 при Институте биологии гена РАН по адресу:  
119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ апреля 2007 года.

Ученый секретарь диссертационного совета  
канд. фарм. наук

Грабовская Л.С.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность проблемы.**

Хотя геном человека и целого ряда других организмов расшифрован, мы еще очень далеки от полного понимания того, как он функционирует. В последнее время фокус исследований, посвященных принципам регуляции экспрессии генов, смещается от детального анализа молекулярных механизмов, контролирующей активность отдельных генов, к глобальному изучению общей картины структурно-функциональной организации генома в пространственном и временном отношении. Становится все более и более очевидным, что слаженное и оперативное функционирование генома не может обеспечиваться только регуляторными элементами, присутствующими в ДНК. Огромную роль в регуляции экспрессии генов и реализации генетических программ играют эпигенетические механизмы (метилование ДНК, модификации гистонов, замещение нормальных гистонов на их варианты формы) и пространственная организация клеточного ядра. Активное развитие микроскопии и усовершенствование экспериментальных подходов позволили установить, что внутреннее пространство ядра – это не беспорядочная смесь различных составляющих, а четко структурированная система, отдельные компоненты которой связаны друг с другом сложными иерархическими взаимоотношениями.

Хромосомы на любой стадии клеточного цикла представляют собой более или менее компактные структуры, занимающие отдельные не перекрывающиеся друг с другом области ядерного пространства, получившие название хромосомных территорий (ХТ). Хромосомные территории – не просто способ компактной упаковки больших объемов хроматина в ограниченном ядерном пространстве, но и, главным образом, аппарат, приспособленный для обеспечения слаженного функционирования генома. Динамичная структура хромосомных территорий обеспечивает доставку нужных генов к системам транскрипции, репарации и сплайсинга, в то время как неактивные гены остаются компактно упакованными во внутреннем пространстве хромосомной территории. Локализация генов внутри хромосомной территории, взаимное расположение хромосомных территорий и позиционирование их относительно центра ядра имеют важное значение для проявления активности тех или иных генов.

Несмотря на то, что в последние 15 лет принципы организации хромосомных территорий очень активно изучались, многое еще остается непонятным. Установлены некоторые закономерности расположения и организации хромосом в интерфазе клеточного цикла. Так, согласно многочисленным наблюдениям локализация ХТ внутри ядра определенным образом связана с геной плотностью. Наблюдается тенденция, согласно

которой более активные участки генома располагаются ближе к центру ядра, а менее активные сдвинуты к периферии. Однако ядерные структуры, определяющие и поддерживающие такой порядок, все еще остаются не охарактеризованными. То же можно сказать и о значимости установленных закономерностей для правильного функционирования генома.

Все вышесказанное определяет актуальность темы настоящей диссертационной работы, которая посвящена изучению структур и механизмов, поддерживающих упорядоченную пространственную организацию хромосом в период интерфазы в ядрах фибробластов человека, а также изучению нарушений этой организации, возникающих при появлении дополнительных копий хромосом.

### **Цели и задачи исследования.**

Основной целью работы являлось выяснение роли ядерного матрикса в поддержании специфической пространственной организации хромосом в ядре, а также анализ изменений этой пространственной организации при полисомии по X-хромосоме. Для реализации поставленной цели были определены следующие экспериментальные задачи:

- проверить, сохраняются ли характерные позиции хромосомных территорий в ядре при удалении большей части хроматина и РНК;
- выяснить, занимают ли дополнительные копии X-хромосомы при полисомии XXXXY такие же позиции в ядрах анеуплоидных клеток, как единственная X-хромосома в ядрах нормальных мужских фибробластов;
- определить, влияет ли появление дополнительных копий X-хромосом на положение других хромосом на примере хромосомы 1.

### **Научная новизна и практическое значение работы.**

В работе впервые было показано, что характерные радиальные позиции центромерных участков хромосом, выбранных в качестве маркеров позиций целых хромосомных территорий, в ядрах первичных фибробластов человека не изменяются после удаления из них большей части хроматина. Более того, продемонстрировано, что дополнительное удаление из ядра РНК также не оказывает влияния на характер распределения хромосомных территорий внутри клеточного ядра. Полученные результаты позволили опровергнуть ранее существовавшую гипотезу о том, что простого электростатического отталкивания отрицательно заряженных хромосом достаточно для поддержания упорядоченной организации ядерного пространства, и продемонстрировать ключевую роль ядерного матрикса в поддержании специфических радиальных позиций хромосомных территорий.

При изучении положений хромосом в ядрах клеток с генотипом XXXXУ показано, что дополнительные копии X-хромосомы инактивированы, компактно упакованы и сдвинуты к периферии ядра. Кроме того, показано, что в клетках, содержащих три дополнительные копии X-хромосомы, изменяются позиции активной копии X-хромосомы и хромосомы 1, не затронутой полисомией, что может иметь определенное значение при развитии патологических эффектов, вызванных этим видом полисомии.

Результаты данной работы вносят существенный вклад в развитие представлений о пространственной организации ядра, обеспечивающей надлежащее функционирование генома. Кроме того, они позволяют по-новому взглянуть на причины возникновения наследственных заболеваний человека, связанных с появлением дополнительных копий хромосом.

### **Апробация работы.**

Результаты диссертационной работы были представлены на 6-ой международной конференции по молекулярной генетике соматических клеток (Звенигород, 2005) и на 10-ой международной конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века” (Пушино, 2006) (два сообщения).

### **Публикации.**

По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ. Из них статей - 2, материалов конференций - 3.

### **Структура и объем работы.**

Диссертация изложена на 96 страницах, содержит 14 рисунков и 1 таблицу и включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждения», «Выводы» и «Список литературы» (110 цитированных работ).

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### **Роль ядерного матрикса в поддержании специфической пространственной организации хромосом в период интерфазы.**

К настоящему времени установлено, что в интерфазном ядре хромосомы занимают ограниченные, не перекрывающиеся друг с другом области ядерного пространства, получившие названия хромосомных территорий (Schardin, 1985; Cremer, 1993). Хромосомные территории разных хромосом разделены так называемым межхроматиновым доменом (ICD, interchromatin domain compartment). Как было продемонстрировано в различных исследованиях, каждая хромосома в интерфазе занимает определенное радиальное положение относительно центра ядра. Так, хромосомы с большим количеством генов обычно располагаются ближе к центру ядра, в то время как для хромосом, содержащих относительно мало генов, характерны периферические позиции (Croft, 1999).

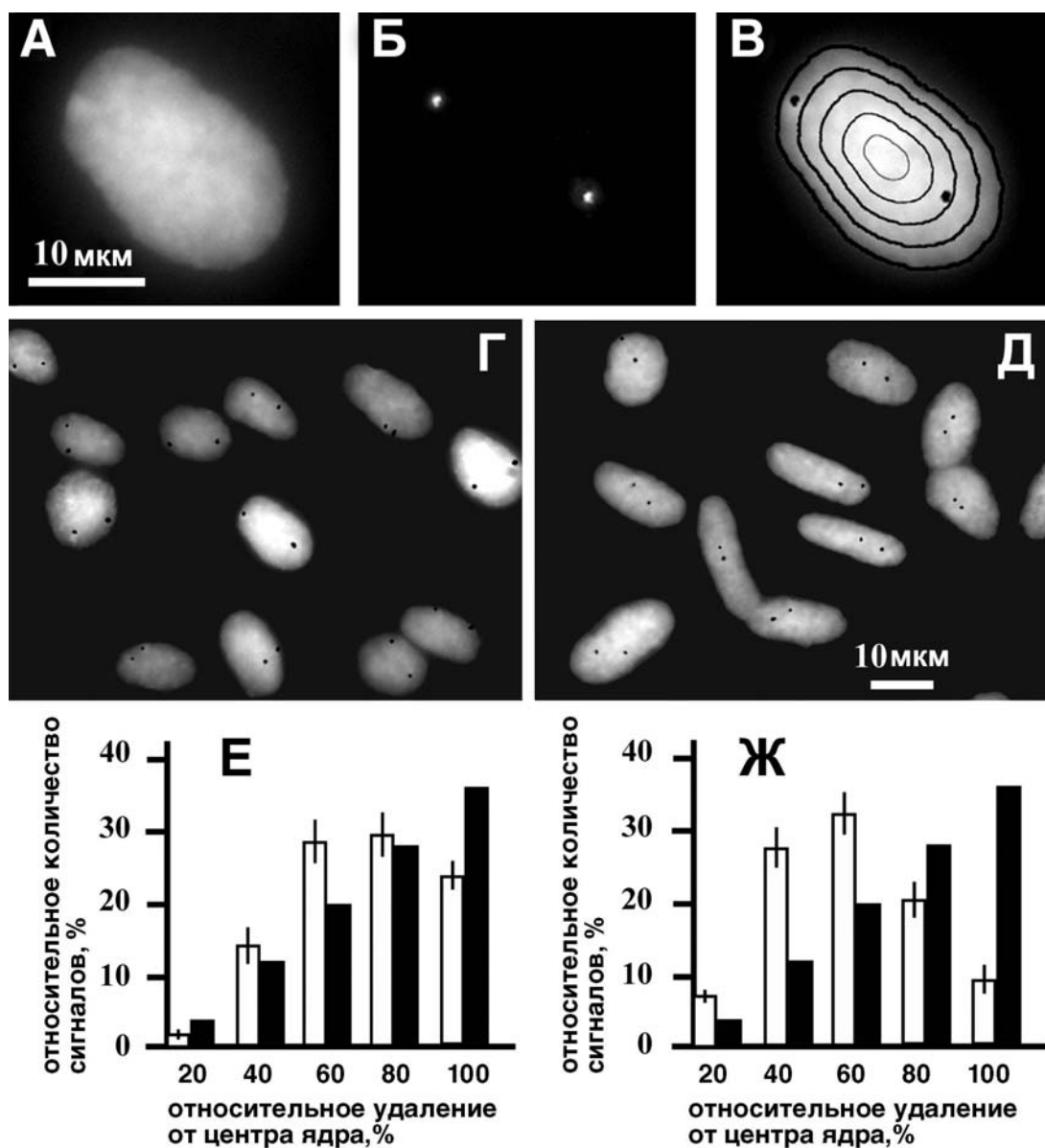
Однако до сих пор не выяснено, какими механизмами создается и поддерживается такая организация хромосом в интерфазе. Одно из предположений заключается в том, что простого электростатического отталкивания отрицательно заряженных хромосомных территорий достаточно для поддержания необходимого расстояния между ними и формирования таким образом межхроматинового домена (Cremer, 1993, 2000). Согласно альтернативной гипотезе целостная ядерная архитектура, включающая хромосомные территории и межхроматиновый домен, поддерживается ядерным матриксом (Razin, 1995; Ma, 1999). Чтобы выяснить, какая из этих гипотез верна, мы решили проверить, изменяется ли относительное расположение интерфазных хромосом после удаления из ядер первичных фибробластов человека большей части хроматина.

Поскольку сложно выявить остатки хромосомных территорий после удаления большей части ДНК, мы сравнивали относительные позиции центромер хромосом X и 19 в необработанных ядрах и ядрах, из которых была удалена большая часть хроматина. Были выбраны именно эти хромосомы, потому что, как сообщалось ранее, они располагаются в разных ядерных слоях. Хромосома X в ядрах первичных фибробластов занимает преимущественно периферическую позицию, в то время как хромосома 19 располагается ближе к центру ядра (Croft et al., 1999; Bolzer et al., 2005).

## ***1. Анализ расположения центромер хромосом X и 19 в ядрах первичных фибробластов человека.***

Чтобы проверить, отличаются ли радиальные позиции центромер хромосом X и 19 так же существенно, как позиции целых хромосомных территорий, мы проанализировали расположение этих центромер в ядрах первичных фибробластов человека. Центромеры выявлялись методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с пробами к альфоидным сателлитам, специфичным для хромосом X и 19 (рис. 1 Г, Д). Биотинилированная проба к альфоидному сателлиту, специфичному для хромосомы 19, была любезно предоставлена Ю.Б. Юровым. Фрагмент  $\alpha$ -сателлитного повтора, специфичного для X-хромосомы, размером примерно 1200 п.о., был получен путем ПЦР-амплификации соответствующего участка геномной ДНК человека и клонирован в векторе pGEM-T Easy (Promega). Этот фрагмент использовали для синтеза пробы, меченой дигоксигенином.

Распределение гибридизационных сигналов анализировалось на плоских препаратах, поскольку ранее было показано, что такой тип анализа адекватно отражает положение хромосомных территорий в относительно плоских и длинных ядрах фибробластов (Croft et al., 1999; Boyle et al., 2001). Площадь ядра была поделена на 5 концентрических зон с границами, находящимися на расстоянии равном 20, 40, 60 и 80% радиуса ядра (расстоянии от центра масс до границы ядра) (рис. 1 А-В). Распределение сигналов между этими зонами определялось не менее чем в 150 случайно выбранных клетках с помощью специально созданной для этого компьютерной программы Nucleus Marker, способной определять относительное удаление гибридизационного сигнала от центра ядра (в процентах от длины вектора, проведенного через сигнал от центра ядра до границы ядра). Результаты анализа, представленные в виде диаграммы, отражают долю сигналов, расположенных в каждой зоне (рис. 1 Е, Ж). Поскольку границы этих концентрических зон были установлены на равных расстояниях друг от друга, площадь зон линейно увеличивалась по направлению от центра к границе ядра. Если бы сигналы распределялись внутри ядра случайным образом, то их количество в каждой зоне определялось бы исключительно площадью зоны и, следовательно, линейно возрастало бы по мере удаления от центра ядра. Полученные распределения гибридизационных сигналов сравнивали с теоретически вычисленным случайным равномерным распределением. Очевидно, что распределение центромер хромосом X и 19 не является случайным. Значимость этого заключения была подтверждена путем статистического анализа с использованием критерия согласия  $\chi^2$ . Распределение внутри ядра как X-хромосомы, так и хромосомы 19 статистически значимо отличается от случайного равномерного. Уровень значимости  $p < 0,001$ . Это означает, что вероятность



**Рисунок 1. Анализ пространственного распределения центромер хромосом X и 19 в ядрах нормальных фибробластов человека.**

А-В: Экспериментальный подход, использованный для определения положения сигналов внутри ядра. (А) ядра, окрашенные DAPI; (Б) гибридизационные сигналы; (В) совмещение А и Б и разбиение площади ядра на 5 концентрических слоев. Г, Д: Ядра первичных фибробластов, в которых выявлено положение центромер хромосом X (Г) и 19 (Д); ядра окрашены DAPI, гибридизационные сигналы показаны черными точками. Е, Ж: Распределение центромер хромосом X (Е) и 19 (Ж) внутри ядра в сравнении со случайным равномерным распределением; белыми прямоугольниками показано наблюдаемое распределение сигналов между 5 зонами, упомянутыми выше; черные прямоугольники отражают теоретически вычисленное случайное распределение, SSD обозначено тонкими вертикальными линиями.



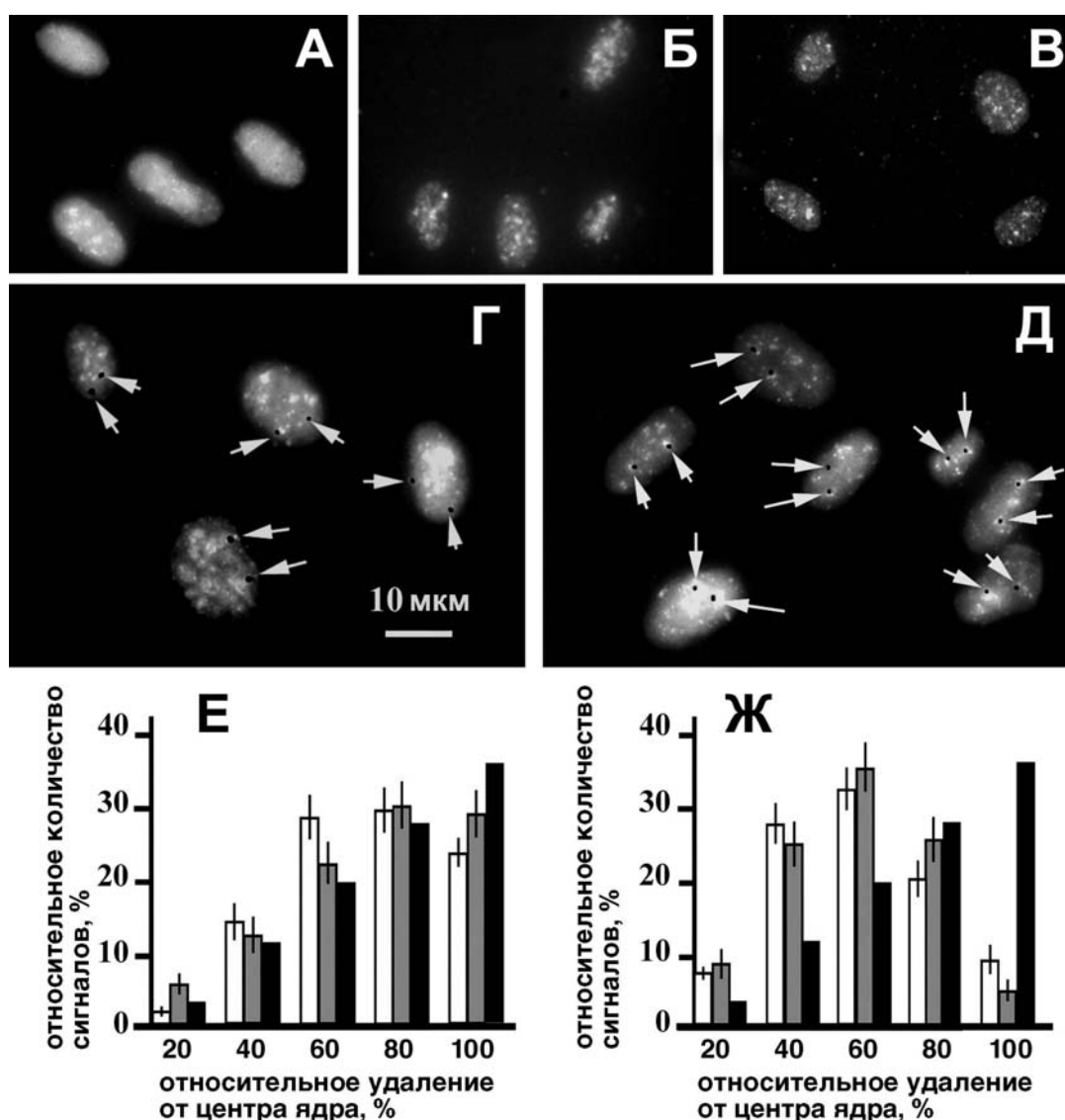
ошибки составляет менее 0,1%. Центромеры хромосомы 19 занимает более центральные позиции по сравнению с центромерами X-хромосомы. В среднем центромеры 19 и X-хромосомы удалены от центра ядра соответственно на 50.4% и 60.9% (относительно радиуса ядра). Эти результаты в целом согласуются с данными, полученными ранее другими авторами (Croft et al., 1999; Boyle et al., 2001; Bolzer et al., 2005).

## **2. Характерные радиальные позиции центромер хромосом X и 19 поддерживаются ядерным матриксом.**

Чтобы выяснить, зависит ли пространственная организация интерфазных хромосом от присутствия в ядре большого количества хроматина (то есть, существенно ли электростатическое отталкивание хромосомных территорий друг от друга для поддержания обнаруженной разницы в расположении центромер хромосом 19 и X), аналогичный анализ был проведен на препаратах *in situ* ядерных матриксов. Эти препараты были получены посредством обработки ДНКазой I или ДНКазой II пермеабелизованных клеток, предварительно выращенных на предметных стеклах, и последующей экстракции отщепившихся фрагментов хроматина 0,5М раствором NaCl. При такой экстракции удаляется гистон H1 (что обеспечивает возможность солюбилизации отщепившихся фрагментов хроматина), но гистоны нуклеосомного ядра остаются связанными с ДНК. Поэтому ассоциированная с матриксом ДНК остается организованной в нуклеосомы. Это обеспечивает сохранение на хроматине такого же электростатического потенциала, как и в интактных ядрах.

Количество оставшейся в ядре ДНК оценивали по понижению уровня флуоресценции DAPI (4'6-диамидо-2-фенилиндола), которым ядра окрашивались до и после расщепления и экстракции хроматина (рис. 2 А-В). Эти приблизительные оценки мы подтвердили, определив в дополнительных экспериментах относительное количество ДНК, оставшееся в кислотонерастворимой фракции после переваривания и экстракции отщепившегося хроматина из ядра. Для этого ДНК была помечена путем включения трития при культивировании клеток на среде с добавлением тимидина, меченого тритием, в течение 20-24 часов.

После интенсивной обработки ДНКазой примерно 60-80% ДНК удалялось из ядер при последующей экстракции 0,5 М раствором NaCl. Однако, несмотря на удаление значительной части ДНК, ядра сохранили свою форму и размеры. В приготовленных таким образом *in situ* ядерных матриксах выявляли центромеры хромосом 19 и X (методом



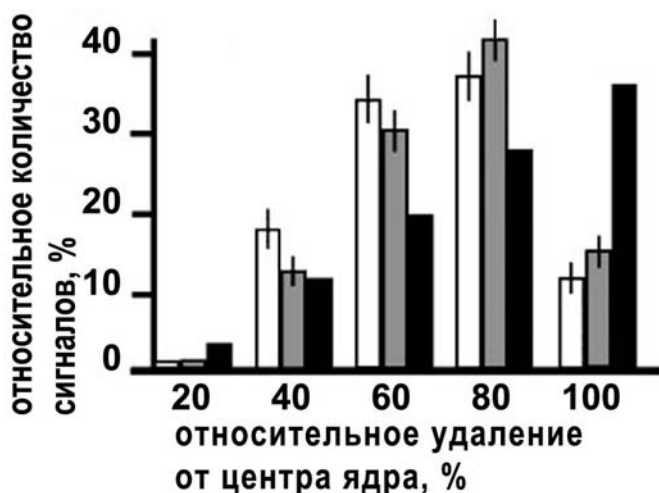
**Рисунок 2. Анализ пространственного распределения центромер хромосом X и 19 в ядрах фибробластов человека после удаления из них 60-80% хроматина.**

А-В: Кинетика удаления хроматина после обработки ДНКазой II (5, 50 и 75 мкг/мл) и последующей экстракции 0,5М раствором NaCl. Г, Д: Препараты ядерных матриксов, в которых выявлено положение центромер хромосом X (Г) и 19 (Д); гибридационные сигналы обозначены стрелками. Е, Ж: Распределение центромер хромосом X (Е) и 19 (Ж) в ядрах, из которых была удалена большая часть хроматина (серые прямоугольники), в сравнении с распределением в необработанных ядрах (белые прямоугольники) и со случайным равномерным распределением (черные прямоугольники). SSD обозначено тонкими вертикальными линиями.

иммунофлуоресцентной гибридизации с пробами, узнающими специфические для этих хромосом последовательности альфоидного сателлита) (рис. 2 Г, Д). После этого не менее чем в 150 случайно выбранных ядрах радиальные позиции этих центромер определялись таким же способом, как и в эксперименте с неэкстрагированными ядрами. Результаты этого анализа представлены на рис. 2 Е, Ж.

Центромеры хромосомы 19 сохранили свое более центральное расположение, по сравнению с центромерами X-хромосомы. Среднее расстояние от центромеры до центра ядра составило 48.3% для хромосомы 19 и 62.6% для X-хромосомы (относительно радиуса ядра). Эти значения и распределение центромер в целом очень сходны с данными, полученными на необработанных ядрах. Проведенный статистический анализ ( $\chi^2$ -тест) показал, что полученные экспериментальные данные не противоречат утверждению о том, что специфическое пространственное распределение центромер не изменилось после удаления ДНК, как для X-хромосомы, так и для хромосомы 19. Отсюда можно сделать вывод: характерные радиальные позиции центромерных районов как центральных (19), так и периферических (X) хромосом сохраняются даже после удаления большей части хроматина. Выбор между ДНКазой I и ДНКазой II в процессе приготовления препаратов ядерных матриксов не оказал никакого влияния на характер полученных распределений (данные не показаны). Особенно следует подчеркнуть, что выявленные распределения положений центромерных областей, характерные для каждой из исследуемых хромосом, не стали случайными в результате удаления значительного количества хроматина. Уровень статистической значимости ( $\chi^2$ -тест) этого утверждения достаточно высок (вероятность ошибки составляет менее 0,0001 для хромосомы 19 и 0,025 для X-хромосомы). Следовательно, электростатическое отталкивание хромосомных территорий друг от друга не может играть ключевую роль в поддержании пространственной организации хромосом в интерфазе.

Чтобы проверить справедливость сделанного заключения в отношении других хромосом, все вышеописанные эксперименты были проведены повторно с пробой к  $\alpha$ -сателлитным повторам, располагающимся в центромерной области хромосомы 1. Биотинилированная проба к альфоидному сателлиту, характерному для хромосомы 1, была любезно предоставлена Ю.Б. Юровым. Положение центромер хромосомы 1 было определено и проанализировано в ядрах первичных фибробластов человека до и после удаления из них 60–80% хроматина так же, как это было сделано в случае хромосом X и 19. Положение центромер этой хромосомы также не изменилось после удаления хроматина, и, что особенно важно, ни в контрольных ядрах, ни в препаратах ядерных матриксов распределение центромер этой хромосомы не было случайным, что было подтверждено статистическим



**Рисунок 3.** Радиальные позиции центромер хромосомы 1 в интактных ядрах фибробластов (белые столбцы) и в полученных из них *in situ* ядерных матриксах (серые столбцы). Так же как на предыдущих гистограммах, полученные нами распределения сравниваются со случайным равномерным (черные столбцы). Вертикальными линиями показано стандартное отклонение.

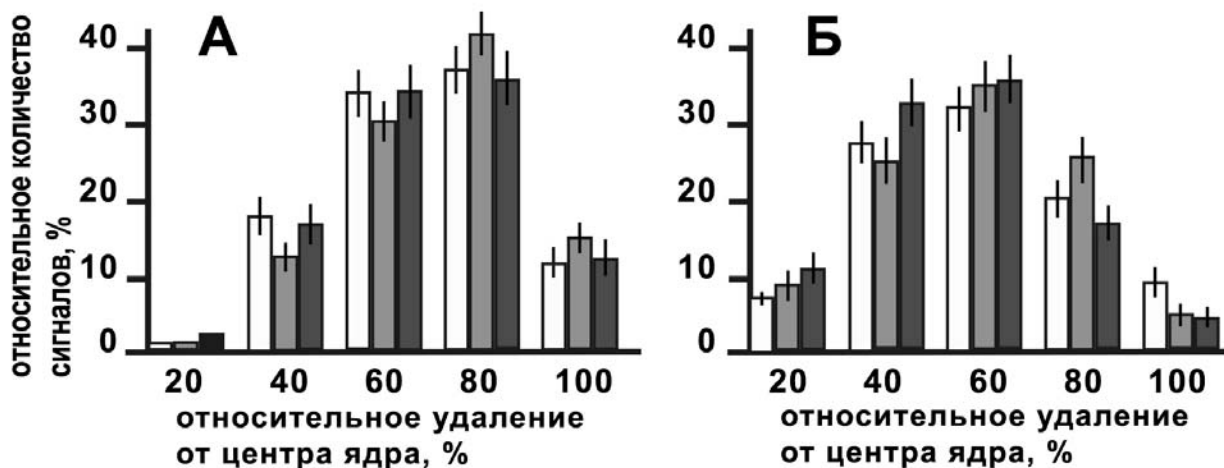
анализом ( $p < 0,0001$ ,  $\chi^2$ -тест). Результаты представлены на рис.3.

Полученные результаты позволяют говорить о том, что специфическая пространственная организация хромосом в интерфазном ядре поддерживается ядерным матриксом.

### ***3. Дополнительное удаление РНК не влияет на радиальные позиции центромерных участков в препаратах ядерного матрикса.***

Существует мнение, что ядерная РНК, являющаяся составной частью ядерного матрикса, играет важную роль в поддержании архитектуры ядра, и целостность матрикса зависит от сохранности этой РНК при удалении хроматина в процессе приготовления препаратов (Nickerson et al., 1989, 2001; Barboro et al., 2003). Более того, авторы еще одной работы по изучению взаимодействия хромосом с ядерным матриксом (Ma, 1999) сообщали, что целостные хромосомные территории, выявляемые с помощью набора уникальных специфических проб, разрушаются при обработке препаратов РНКазой А и последующей высокосолевым экстракцией 2М раствором NaCl. Однако этого не происходит, если высокосолевым экстракции не предшествует РНКазная обработка.

На следующем этапе работы мы решили проверить, играет ли ядерная РНК существенную роль в поддержании специфических радиальных позиций хромосомных территорий. Для этого положения центромерных областей хромосом 1 и 19 были выявлены и проанализированы в препаратах ядерных матриксов, полученных при совместной обработке ДНКазой и РНКазой. Предварительно мы убедились, что при такой обработке 90% РНК переходит в кислоторастворимую фракцию и, следовательно, удаляется из ядра. Результаты проведенного анализа, представленные на рис. 4, показали, что специфические радиальные



**Рисунок 4.**

Пространственное распределение центромер хромосом 1 (А) и 19 (Б) в необработанных ядрах (белые столбцы), после удаления 60-80% хроматина (светло-серые столбцы) и в ядерных матриксах, из которых дополнительно удалили РНК посредством одновременной обработки ядер РНКазой А и ДНКазой I (темно-серые столбцы). Тонкие вертикальные линии, как обычно, отражают стандартное отклонение

позиции центромер исследуемых хромосом не изменились после дополнительного удаления РНК и, в частности, их распределения статистически значимо отличаются от случайного равномерного ( $p < 0,0001$ ,  $\chi^2$ -тест). Таким образом, РНК, присутствующая в ядерном матриксе, не играет существенной роли в поддержании специфического пространственного распределения хромосомных территорий в ядре.

#### ***4. Альфоидные сателлиты, специфичные для хромосом X и 19, не являются участками прикрепления к ядерному матриксу.***

Полученные нами результаты можно объяснить двумя способами. Характерные позиции центромер могут оставаться неизменными при удалении основной части ДНК и РНК, потому что положение всей хромосомной территории поддерживается ядерным матриксом, а центромера просто является ее частью. Другая возможность состоит в том, что альфоидные сателлиты из центромерных областей сами по себе прикреплены к ядерному матриксу. Тогда они не могут служить адекватным маркером хромосомных территорий в рамках поставленной экспериментальной задачи.

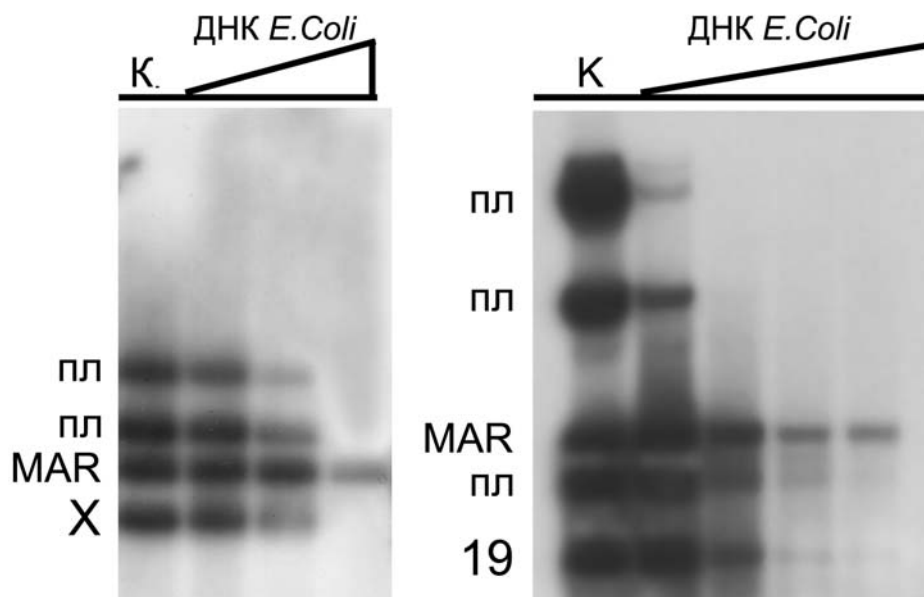
Чтобы проверить, какая из этих возможностей отражает реальную ситуацию, мы проанализировали способность  $\alpha$ -сателлитных повторов, специфичных для центромер хромосом X и 19 и использованных нами в качестве проб для FISH в этой работе,

связываться с ядерным матриксом *in vitro*, т.е выяснили, обладают ли они свойствами MAR-элементов (Matrix Attachment Regions – участки прикрепления к матриксу) (рис.5). Этот анализ был проведен согласно стандартной методике (Cockerill & Garrard, 1986; Cockerill et al., 1987). В два разных эксперимента брали смесь радиоактивно меченых фрагментов ДНК, состоящую из:

- фрагмента исследуемого  $\alpha$ -сателлитного повтора (специфичного для X-хромосомы, размером 1400 п.о., или специфичного для хромосомы 19, размером 670 п.н.);
- фрагмента гена гистона H4 дрозофилы, содержащего известный сильный MAR-элемент (Mirkovitch et al., 1984; Cockerill & Garrard, 1986); этот фрагмент (размером 1300 п.о. в эксперименте с сателлитом хромосомы 19 и 1800 п.о. в эксперименте с сателлитом X-хромосомы) использовался в качестве положительного контроля;
- двух или более фрагментов плазмидной ДНК (пл) в качестве отрицательного контроля.

Эта смесь (input) инкубировалась в течение двух часов с ядерным матриксом, выделенным отдельно путем исчерпывающей обработки пермеабилizованных клеток ДНКазой I и последующей экстракции 2М раствором NaCl. Для предотвращения неспецифического связывания инкубация проводилась в присутствии конкурента – геномной ДНК *E.coli* (средний размер около 1000 п.н.), взятой в различных концентрациях (0–1 мг/мл). После инкубации несвязавшиеся фрагменты отмывались, а фрагменты, ассоциировавшие с ядерным матриксом, были очищены от белковых компонентов и разделены с помощью электрофореза в агарозном геле, после чего высушенный гель был экспонирован с рентгеновской пленкой. Результаты этого эксперимента представлены на рисунке 5. Отчетливо видно, что обе сателлитные пробы вытесняются из матрикса таким же количеством неспецифического конкурента, как и контрольные фрагменты плазмидной ДНК. В то же время фрагмент, содержащий известный MAR-элемент, остается связанным с ядерным матриксом, даже когда берется 50-кратный избыток конкурента. Из этого эксперимента можно сделать вывод, что исследуемые фрагменты  $\alpha$ - сателлитных повторов, специфичных для центромер хромосом X и 19, не обладают свойствами MAR-элементов, так как они не способны связываться с ядерным матриксом *in vitro*.

Кроме того, ранее в нашей лаборатории было исследовано распределение пространственного положения альфоидных сателлитов, характерных для X-хромосомы, на препаратах ядерного гало, полученного с помощью высокосолевого экстракции ядер (Iagovaia et al., 2004). На таких препаратах проводилась иммунофлуоресцентная гибридизация (FISH) с пробой к этому сателлиту. Большая часть сигналов была обнаружена в короне петель ДНК.



**Рисунок 5. Анализ способности альфоидных сателлитов хромосом X и 19 связываться с ядерным матриксом *in vitro*.**

К – загрузочный контроль (input); «пл» - фрагменты плазмидной ДНК, в качестве отрицательного контроля; MAR - фрагмент гена гистона H4 дрозофилы, обладающий сильным сродством к ядерному матриксу; X, 19 – фрагменты альфоидных сателлитов соответствующих хромосом.

Это дополнительно подтверждает, исследованные сателлиты не связаны с остаточными структурами ядра – ядерным матриксом.

Таким образом, нет никаких экспериментальных доказательств, свидетельствующих, что специфические альфоидные сателлиты из центромерных участков хромосом, использованные нами как маркеры хромосомной территории соответствующих хромосом, прикреплены к ядерному матриксу самостоятельно. Мы можем исключить этот частный случай при интерпретации полученных результатов. А следовательно, можно утверждать, что позиции центромер сохраняются неизменными после удаления из ядер основной части нуклеиновых кислот, потому что являются частью хромосомной территории, положение которой поддерживается, по-видимому, белковыми компонентами ядерного матрикса. Можно даже сказать, что интерфазные хромосомы интегрированы в ядерный матрикс, поскольку внутренний матрикс и остов метафазных хромосом содержат много общих белков (Berrios et al., 1985; Earnshaw et al., 1985).

## **Анализ пространственного распределения хромосом в ядрах первичных фибробластов человека с полисомией по X-хромосоме.**

Нет никакого сомнения в том, что пространственная организация клеточного ядра является важнейшим фактором, определяющим эффективную и надежную реализацию генетической информации, заключенной в геномной ДНК. Однако непосредственная роль конкретных особенностей этой организации пока не выяснена. Вторая часть данной работы посвящена изучению функциональной значимости установленных к настоящему времени закономерностей пространственного положения хромосом для правильного функционирования генома.

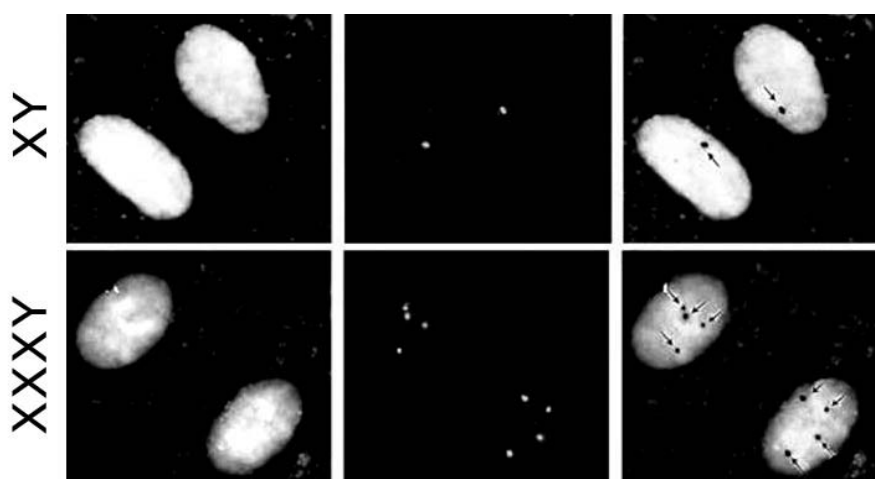
Как уже обсуждалось выше, хромосомные территории в ядерном пространстве расположены неслучайно относительно центра ядра. По крайней мере, в нормальных нетрансформированных клетках положение всех хромосом характеризуется строго определенными радиальными позициями (Boyle et al., 2001; Cremer and Cremer, 2001; Croft et al., 1999). Вероятнее всего, локализация хромосом в ядре связана с их функциональной активностью. Обнаружена тенденция, согласно которой, хромосомы с высокой плотностью генов расположены ближе к центру ядра, а хромосомы, несущие относительно мало генов, сдвинуты к периферии (Boyle et al., 2001; Cremer and Cremer, 2001). Эта закономерность обнаружена не только в клетках человека и приматов (Tanabe et al. 2002), но и в куриных клетках (Habermann et al. 2001) – т.е. у видов, разошедшихся в процессе эволюции более 300 миллионов лет назад. Механизмы, определяющие положение каждой хромосомной территории пока не установлены. Однако такая высокая консервативность основного принципа радиального расположения хромосом в зависимости от плотности генов дает основание полагать, что он имеет важное биологическое значение. Если это действительно так, то изменение характерного для нормальных клеток пространственного распределения хромосом в ядре клетки может коррелировать с нарушениями работы определенных регуляторных механизмов или даже быть причиной таких нарушений. В этой связи нам представлялось интересным выяснить, изменяются ли специфические радиальные позиции хромосом в ядре при появлении дополнительных копий отдельных хромосом. Конкретная задача, которую мы решали в своих экспериментах, состояла в выяснении того, попадают ли эти дополнительные копии в свой ядерный слой и приводит ли их появление к изменению радиальных позиций других хромосом. Для изучения этих вопросов мы сравнивали пространственное распределение хромосом X и 1 в ядрах первичных фибробластов человека с тетрасомией по X-хромосоме (генотип XXXXY) и нормальным мужским генотипом XY. Поскольку в первой части работы мы продемонстрировали, что положение центромер



адекватно отражает положение целых хромосомных территорий, по крайней мере, в отношении хромосом 1 и X, в данном исследовании мы снова анализировали пространственное распределение центромер этих хромосом.

***1. Положение X-хромосом внутри ядра изменяется при появлении дополнительных копий этой хромосомы.***

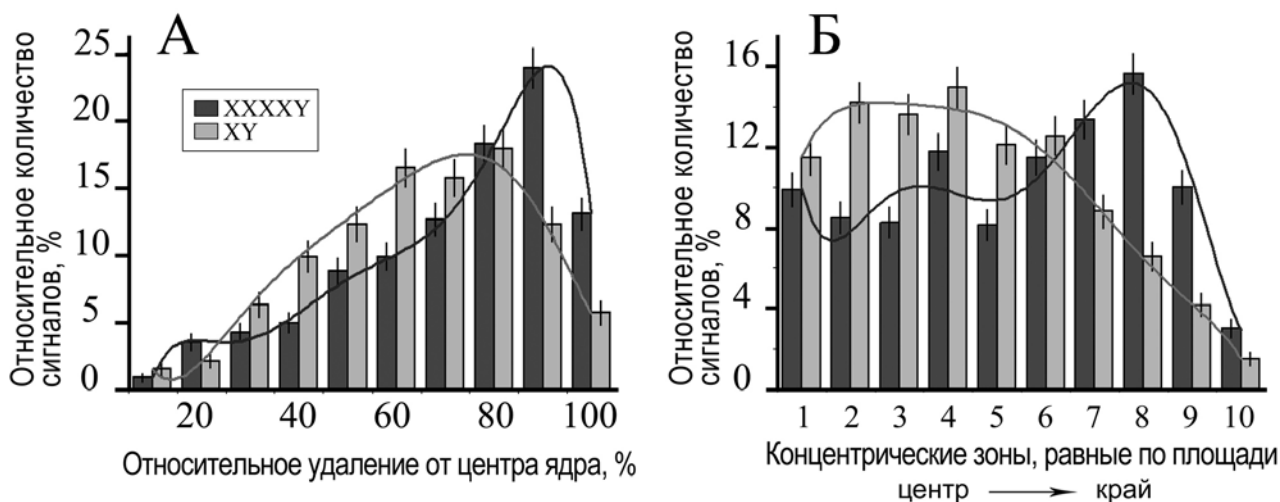
Сначала мы решили сравнить пространственное распределение X-хромосом в клетках, несущих одну (генотип XY) и четыре (генотип XXXXY) копии X-хромосомы, чтобы выяснить занимают ли 4 копии X-хромосомы в XXXXY клетках тот же ядерный слой, что и одна копия X хромосомы в XY клетках. Приблизительное положение хромосомных территорий оценивали посредством визуализации специфичных для этой хромосомы последовательностей альфоидного сателлита. Эксперименты проводили подобно тому, как было описано в предыдущих разделах. Как видно из результатов гибридизации, представленных на рисунке 6, количество сигналов в каждой линии соответствовало количеству X-хромосом. Относительные радиальные позиции каждого сигнала определялись так же, как это делалось ранее. Объем выборки составил 800 наблюдений для линии XXXXY и 669 наблюдений для линии XY. Для анализа полученных данных было вычислено



**Рисунок 6. Результаты иммунофлуоресцентной гибридизации фибробластов, имеющих генотип XXXXY, а также нормальных мужских фибробластов с пробой к альфоидному сателлиту X-хромосомы.**

Верхний ряд – нормальные фибробласты, нижний – фибробласты с полисомией XXXXY. На левой панели ядра, окрашенные DAPI, в центре гибридизационные сигналы, справа совмещение двух предыдущих снимков. Стрелки указывают на положение гибридизационных сигналов внутри ядра.

распределение сигналов между 10 концентрическими зонами с границами, проведенными через одинаковые промежутки, то есть находящимися на расстояниях 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80 и 90% от радиуса ядра. Площадь каждой зоны при таком разбиении линейно возрастает по направлению от центра ядра к периферии. Количество интервалов группирования было увеличено по сравнению с экспериментами в первой части работы для того, чтобы более детально изучить пространственное распределение исследуемых хромосом. Кроме этого было проанализировано распределение гибридизационных сигналов между 10 концентрическими зонами равной площади с границами, проведенными на расстояниях 32%, 45%, 55%, 63%, 71%, 77%, 84%, 89%, 95% от радиуса ядра. Результаты проведенного анализа пространственного распределения центромерной области хромосомы X представлены в виде гистограмм на рисунке 7. Радиальные позиции центромерной области X-хромосомы в ядрах фибробластов с тетрасомией по X статистически достоверно отличается от позиций центромерной области этой хромосомы в ядрах нормальных клеток ( $p < 0,0001$ ,  $\chi^2$  тест). Оба типа анализа показывают, что при появлении дополнительных копий X-хромосомы происходит значительное перемещение этой хромосомы в сторону периферии ядра. Действительно, в клетках с одной X-хромосомой 66% наблюдаемых сигналов



**Рисунок 7. Положение X-хромосомы в ядрах первичных фибробластов человека, имеющих одну (генотип XY) или четыре (генотип XXXXY) копии этой хромосомы.**

Площадь ядра была поделена на 10 концентрических зон с границами, установленными через равные промежутки на расстоянии 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80 и 90% от радиуса ядра, (А) или на 10 концентрических зон, равных по площади, с границами, проходящими на расстоянии 32%, 45%, 55%, 63%, 71%, 77%, 84%, 89%, 95% (Б). Распределение сигналов между этими зонами в клетках XXXXY отражают темные столбцы, в клетках XY – светлые столбцы. Приведены кривые сглаживания и SSD (вертикальные линии)

расположены в центральной половине ядра на расстоянии не более 71% от ядерного радиуса, в то время как в клетках с генотипом XXXXY в этой же области ядра находится только 46% сигналов ( $\chi^2$  тест,  $p < 0.01$ ). В дополнение стоит отметить, что анализ распределения сигналов между концентрическими зонами равной площади более наглядно отражает положение хромосом, потому что разница в количестве сигналов между разными зонами не зависит от площади этих зон. В дальнейшем мы использовали только такой вид анализа.

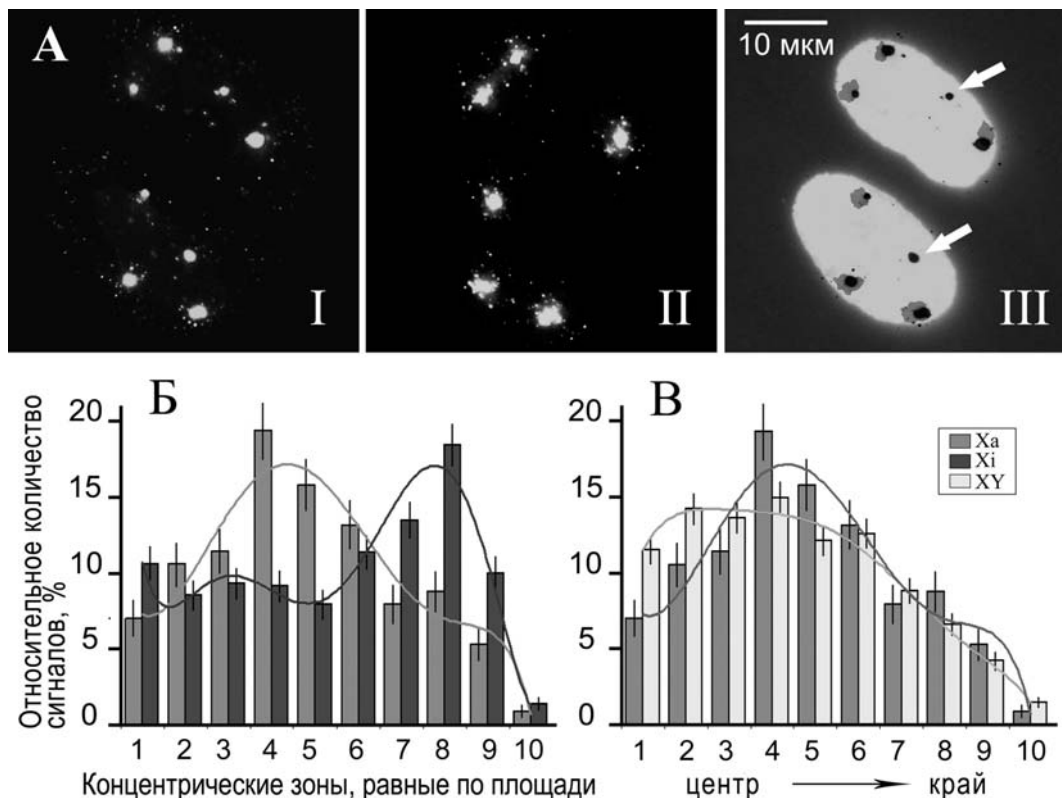
## ***2. Хромосомные территории активных и неактивных копий X-хромосомы характеризуются разными радиальными позициями в ядрах с генотипом XXXXY.***

Существуют данные о том, что в человеческой клетке все копии X-хромосомы, кроме одной, инактивируются (Lyon, 1989; Lyon, 1999). Неактивные X-хромосомы компактно упаковываются, образуя так называемые тельца Барра, и сдвигаются на периферию ядра. Значит, в клетках с генотипом XXXXY три из четырех могут быть неактивными, в то время как в клетках с нормальным мужским генотипом имеется только одна активная X-хромосома. В таком случае обнаруженные в предыдущем эксперименте изменения в положении X-хромосомы при появлении дополнительных копий могут объясняться различной ядерной локализацией активных и неактивных копий X-хромосом.

Чтобы проверить выдвинутое предположение, нам необходимо было различить активные и неактивные X-хромосомы на наших препаратах. Неактивные копии X-хромосомы были выявлены путем флуоресцентной *in situ* гибридизации с пробой к Xist (X (inactive)-specific transcript, специфичный для неактивной X-хромосомы транскрипт) РНК. Эта РНК, не кодирующая белок, транскрибируется только с неактивных копий X-хромосомы и является важным компонентом механизма ее инактивации (Brown et al., 1992; Rastan, 1994).

Фрагмент размером 3 т.п.о. из первого экзона гена, кодирующего Xist РНК, был получен путем ПЦР-амплификации с использованием специфических праймеров. Этот фрагмент клонировали в векторе pGEM-T Easy (Promega) и использовали для приготовления пробы, синтез которой осуществлялся путем *in vitro* транскрипции в присутствии модифицированного биотином дезокси-УТФ. Приготовленную таким способом пробу гибридизовали с фиксированными препаратами первичных фибробластов человека, обладающими генотипом XXXXY. Как видно из результатов гибридизации (рис 8 АП), в клетках с генотипом XXXXY три копии X-хромосомы ассоциированы с Xist РНК, и следовательно, неактивны. Фактически это означает, что все дополнительные копии X-хромосомы инактивируются.

Чтобы различить центромеры активных ( $X_a$ , X active) и неактивных ( $X_i$ , X inactive) копий X-хромосомы в клетках с тетрасомией по этой хромосоме, мы выполнили две последовательные гибридизации на одних и тех же препаратах: с биотинилированной пробой, специфичной в отношении Xist РНК, и с меченой дигоксигенином центромерной пробой к  $\alpha$ -сателлиту X-хромосомы (рис. 8А). Для этого мы сначала провели гибридизацию и детектировали сигнал, соответствующий Xist РНК. Этот сигнал фиксировался на



**Рисунок 8. Анализ пространственного распределения активной и неактивных копий X-хромосом в клетках с генотипом XXXXY**

(А) Экспериментальный подход, использованный для выявления центромер активных и неактивных копий X-хромосомы: последовательная гибридизация одних и тех же препаратов с центромерной пробой к X-хромосоме (AI) и пробой, специфичной для Xist РНК (AII). (AIII) Совмещение AI и AII со снимком ядер, окрашенных DAPI. Сигналы, соответствующие активным копиям X-хромосомы показаны стрелками. (Б) Сравнение распределения активных ( $X_a$ , серые прямоугольники) и неактивных X-хромосом ( $X_i$ , темные прямоугольники) между 10 зонами, одинаковыми по площади, в ядрах с генотипом XXXXY по направлению от центра (1) к периферии (10) ядра. (В) Сравнение пространственного положения активной копии X-хромосомы в ядрах с генотипом XXXXY с положением единственной X-хромосомы в ядрах нормальных мужских фибробластов (XY, светлые прямоугольники). На гистограммах показаны кривые сглаживания и стандартное отклонение (тонкие вертикальные линии).

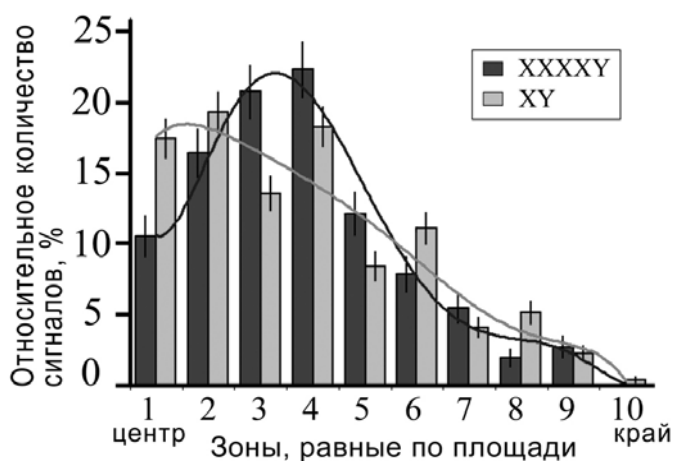
препаратах путем обработки их раствором параформальдегида. Затем препараты обрабатывали щелочью для денатурации ДНК, после чего гибридизовали их с центромерной пробой. Сигнал, соответствующий центромерам X-хромосомы детектировался с помощью антител против дигоксигенина, конъюгированных с Alexa 488, флуоресцирующим в зеленой части спектра. Биотинилированную пробу, узнающую Xist РНК, выявляли с использованием флуорохрома, флуоресцирующего в красной части спектра. Единственный зеленый сигнал, не совпадающий с красным, соответствовал активной X-хромосоме.

Теперь мы могли отдельно проанализировать распределение центромер активных и неактивных копий X-хромосомы в ядрах с генотипом XXXXY. Результаты этого анализа представлены на рисунке 8 Б. Объем выборки в этом эксперименте составил 114 наблюдений для активной и 810 наблюдений для неактивной копии X-хромосомы. Полученные диаграммы четко демонстрируют, что, как и ожидалось, позиции активной и неактивных копий X-хромосом в ядре сильно отличаются. Неактивные X-хромосомы располагаются на периферии ядра, в то время как активные копии сдвинуты ближе к центру ( $p < 0,001, \chi^2$ -тест). Это наблюдение позволяет заключить, что локализация хромосомных территорий в центре ядра связана не только с генной плотностью, но и непосредственно с транскрипционным статусом генов. Действительно, активные и неактивные копии X-хромосомы занимают абсолютно разные ядерные позиции, несмотря на сходное содержание ДНК и одинаковую плотность генов. Следует отметить, что согласно литературным данным именно эти параметры считаются определяющими при локализации хромосом ближе или дальше относительно центра ядра (Croft et al., 1999; Boyle et al., 2001; Bolzer et al., 2005).

Еще более интересный вывод был сделан при сравнении пространственного распределения активной X-хромосомы в полисомных ядрах и единственной X-хромосомы в ядрах с нормальным генотипом (рис 8В). Радиальные позиции этих хромосом отличались друг от друга: центромеры X-хромосомы в линии XY чаще (в 40% случаев) занимали центральную часть ядерного пространства, составляющую треть от общей площади ядра, в то время как активные копии X-хромосомы в клетках линии XXXXY встречались в этой области значительно реже (всего в 28% случаев) ( $p < 0,02, \chi^2$ -тест). Это означает, что в клетках с генотипом XXXXY позиция активной X-хромосомы смещена к периферии ядра по сравнению с нормальными клетками. Таким образом, нами было обнаружено, что, несмотря на инактивацию дополнительных копий X-хромосомы, они оказывают влияние на ядерную локализацию единственной активной копии этой хромосомы, выражающуюся в смещении к периферии ядра.

### 3. Сравнение локализации хромосомы 1 в ядрах нормальных фибробластов и фибробластов с полисомией по X-хромосоме.

На следующем этапе работы мы решили выяснить, влияет ли появление дополнительных копий X-хромосомы на положение других хромосом. Для этого мы сравнили относительные радиальные позиции хромосомы 1 в ядрах нормальных фибробластов и фибробластов с полисомией XXXXY. Все экспериментальные процедуры были выполнены точно так же, как для X-хромосомы. Положение хромосомы 1 выявлялось путем флуоресцентной *in situ* гибридизации с пробой, специфичной для центромерных  $\alpha$ -сателлитных повторов этой хромосомы. Объем выборки составил 487 наблюдений в ядрах нормальных фибробластов и 256 наблюдений в XXXXY клетках. Пространственные распределения центромер хромосомы 1 в ядрах, имеющих одну (XY) или четыре (XXXXY) копии X-хромосомы, представлены на рисунке 9. Оказалось, что радиальная позиция хромосомы 1 в ядрах фибробластов с генотипом XXXXY статистически значимо отличается от позиции этой хромосомы в ядрах нормальных фибробластов ( $\chi^2$  тест,  $p < 0.01$ ). В ядрах с генотипом XY гибридизационные сигналы гораздо чаще (в 37% случаев) располагались в центральной зоне, составляющей 20% от общей площади ядра, по сравнению с клетками, в ядрах которых присутствовало 4 копии X хромосомы ( $\chi^2$  тест,  $p < 0.01$ ). Таким образом, при появлении лишних копий X-хромосомы хромосома 1 сдвигается к периферии ядра.



**Рисунок 9.**

Сравнение радиального распределения хромосомы 1 в ядрах нормальных фибробластов (светлые прямоугольники) и фибробластов с полисомией по X-хромосоме (темные прямоугольники) между 10 концентрическими зонами, одинаковыми по площади. Так же как на предыдущих рисунках показаны кривые сглаживания и SSD (вертикальные линии).

Итак, во второй части работы нами было обнаружено, что в случае тетрасомии по X-хромосоме (генотип XXXXY) три лишние копии этой хромосомы инактивируются и занимают периферические позиции. Тем не менее, при этом происходит изменение ядерной локализации как активной копии X-хромосомы, так и представленной нормальным числом копий хромосомы 1, самой большой хромосомы человека как по размеру так и по количеству генов. Позиции этих хромосом сдвигаются к периферии ядра.

Стоит отметить, что большой спектр возможных положений исследуемых хромосом в разных клетках одной линии никоим образом не понижает значимость сделанных выводов. Дело в том, что положение хромосом в ядре подчиняется законам теории вероятности. Это значит, что распределение хромосомных позиций дает статистическое представление о наиболее вероятном месте нахождения исследуемой хромосомы. Однако нельзя точно указать, где будет находиться эта хромосома в каждой конкретной клетке, потому что в каждой конкретной клетке она может находиться в любом положении, но с разной вероятностью (Parada, 2003; Nagele, 1995, 1998). При этом пространственное распределение большинства хромосом воспроизводится с высокой точностью в нормальных клетках, зачастую принадлежащих даже разным тканям. Так, все распределения для нормальных фибробластов, полученные в наших экспериментах, точно воспроизводились несколько раз на разных линиях и разных пассажах. Поэтому изменение пространственных позиций хромосом в ядрах клеток с генотипом XXXXY достоверно и заслуживает пристального внимания.

Как известно, многие случаи полисомии сопровождаются тяжелыми наследственными заболеваниями. Так, синдром Дауна (трисомия по хромосоме 21) является причиной задержки интеллектуального развития (Newberger and Blyth, 2003). Синдром Эдвардса (трисомия по хромосоме 18) характеризуется нарушениями функционирования жизненно важных органов, таких как мозг, сердце, почки и кишечник, приводящими 90% пациентов к смерти на первом году жизни (Hassold and Jacobs, 1984). Обычно причиной этих наследственных болезней считается несбалансированная экспрессия генов с дополнительных хромосом. Однако это может быть, по крайней мере, не единственной причиной. Ведь благодаря инактивации X-хромосом активной остается только одна копия (Lyon, 1989; Lyon, 1999). Это явление было продемонстрировано в данной работе в отношении полисомии XXXXY. Несмотря на инактивацию дополнительных копий X-хромосомы, этот вид полисомии тоже сопровождается тяжелыми патологиями (задержка умственного развития, многочисленные дефекты скелета), которые приводят в большинстве случаев к смерти в раннем возрасте (Kim et al., 2006). Известен также синдром Кляйнфельтера (47,XXY; 48,XXXY), характеризующийся бесплодием (олигоспермия или азооспермия), остеопорозом,

нарушением моторной функции, речи и т.д. (Wattendorf and Muenke, 2005) Обнаруженные изменения радиальных позиций хромосом в клетках с полисомией XXXXY дают основания полагать, что нарушение пространственного распределения хромосом может быть одной из причин развития патологических эффектов.



## ВЫВОДЫ.

1. Продemonстрировано, что специфическая пространственная организация хромосом в ядрах первичных фибробластов человека поддерживается ядерным матриксом.
2. Установлено, что РНК, присутствующая в составе ядерного матрикса, не оказывает существенного влияния на поддержание специфических позиций хромосом 1 и 19 внутри ядра.
3. Показано, что дополнительные копии X-хромосомы в ядрах первичных фибробластов человека с полисомией 49, XXXXY инактивируются и локализуются на периферии ядра, тогда как активная копия X-хромосомы располагается существенно ближе к центру ядра.
4. Продemonстрировано, что при полисомии XXXXY изменяются предпочтительные ядерные позиции активной копии X хромосомы и представленной нормальным числом копий хромосомы 1 по сравнению с позициями этих хромосом в нормальных клетках.

### **Список печатных работ, опубликованных по теме диссертации.**

1. Petrova NV, Iarovaia OV, Verbovoy VA Razin SV. Specific radial positions of centromeres of human chromosomes X, 1, and 19 remain unchanged in chromatin-depleted nuclei of primary human fibroblasts: evidence for the organizing role of the nuclear matrix. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2005, 96(4):850-857.
2. Петрова Н.В., Яровая О.В., Разин С.В. Специфическая пространственная организация хромосом в ядрах первичных фибробластов человека поддерживается ядерным матриксом. Доклады Академии Наук, 2006, т. 406, №1, стр.1-3.
3. Петрова Н.В., Якутенко И.И., Яровая О.В., Разин С.В. Взаимное расположение хромосом в интерфазных ядрах первичных фибробластах человека с полисомией по X-хромосоме и хромосоме 18. VI Международная конференция по молекулярной генетике соматических клеток. 12-15 декабря, 2005, Звенигород.
4. Петрова Н.В., Яровая О.В., Разин С.В. Роль ядерного матрикса в пространственной организации интерфазных хромосом. 10-ая Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых "Биология - Наука XXI Века", 16 - 21 апреля 2006, Пушино, Россия.
5. Якутенко И.И., Петрова Н.В. Локализация хромосом в интерфазных ядрах первичных фибробластов человека с нормальным фенотипом и полисомиями по X-хромосоме и хромосоме 18. 10-ая Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых "Биология - Наука XXI Века", 16 - 21 апреля 2006, Пушино, Россия.