

на правах рукописи

Сайфитдинова Алсу Фаритовна

**ЗНАЧЕНИЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ СТРУКТУРЫ ХРОМОСОМ
В ЛАМПОВЫЕ ЩЁТКИ**

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург – 2021

Работа выполнена на кафедре анатомии и физиологии человека и животных Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена», г. Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: **Коломиец Оксана Леонидовна**, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией цитогенетики, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва

Подгорная Ольга Игоревна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории некодирующей РНК, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, г. Санкт-Петербург

Родионов Александр Викентьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биосистематики и цитологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, г. Санкт-Петербург

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск

Защита состоится 26 ноября 2021 года в 13.00 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.230.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4.

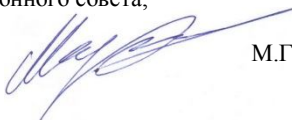
Сайт института: <http://www.incras.ru>
Адрес электронной почты института: cellbio@incras.ru
Факс института: (812) 297-03-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте института по адресу: <http://www.incras.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 года

Ученый секретарь Диссертационного совета,

доктор биологических наук



М.Г.Мартынова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Подавляющее большинство многоклеточных организмов начинают свою жизнь с одной клетки, геном которой заключает в себе всю необходимую для развития информацию. У организмов, возникающих в результате полового размножения, эта первая клетка (зигота) образуется в результате слияния гамет. В процессе гаметогенеза наследственный аппарат претерпевает различные изменения, определяющие, с одной стороны, стабильность видов, а с другой – потенциал для отбора в виде изменчивости. В этот же период времени происходит освобождение генома от части наследственной информации, закреплённой эпигенетическими механизмами, что закладывает дополнительный потенциал для адаптации у нового организма. Ключевым этапом гаметогенеза, как мужского, так и женского, является мейоз, позволяющий осуществить редукцию числа хромосом и протекающий на основе ряда исключительно консервативных событий и процессов [1]. Несмотря на существенный прогресс в понимании протекания отдельных этапов гаметогенеза и их роли для дальнейшего развития нового многоклеточного организма, значение некоторых ключевых элементов этого процесса до сих пор остаётся не до конца понятным.

Настоящее исследование посвящено поиску ответа на вопрос о биологическом значении деконденсации отдельных районов хроматина с формированием характерных транскрипционных единиц, плотно покрытых рибонуклеопротеиновыми (РНП) комплексами, в ходе профазы первого деления мейоза после завершения рекомбинации и непосредственно перед полной компактизацией хромосом, необходимой для правильной сегрегации. Актуальность этой темы определяется широким распространением такого преобразования структуры хромосом, характеризующим как оогенез, так и сперматогенез организмов, принадлежащих к разным таксонам. Это, с одной стороны, свидетельствует о его консерватизме, а с другой стороны – о биологическом и эволюционном значении.

Степень разработанности темы исследования. Несмотря на некоторые морфологические различия на клеточном уровне, ранние стадии гаметогенеза, вне зависимости от пола, у большинства живых организмов очень похожи [2]. После завершения серии гониальных митотических делений, в клетках происходит деконденсация хроматина, сопряжённая с репликацией, а затем хромосомы конденсируются перед вступлением в профазу первого деления мейоза [3-6]. Фиксация субтеломерного гетерохроматина к оболочке ядра с формированием характерной стадии букета является важнейшей для последующего обеспечения быстрого перемещения хромосом в пространстве ядра и спаривания гомологов [7, 8]. В лептотене хромосомы вновь подвергаются частичной деконденсации и

приобретают вид тонких нитей. Они формируют белковые осевые элементы, которые способствуют конъюгации гомологов в зиготене и образуют синаптомемные комплексы [9, 10]. На этой стадии происходит активация транскрипции, которая играет важную роль в обеспечении синапсиса [1]. После успешной рекомбинации гомологов, белки осевых элементов покидают хромосомы и начинается стадия диплотены, сопровождающаяся деконденсацией хроматина, активацией транскрипции и появлением петель. Также, как и в сперматогенезе, в оогенезе ранние стадии профазы первого деления мейоза (лептотена, зиготена, пахитена и ранняя диплотена) не сопровождаются значительным ростом клетки, однако, в зависимости от типа оогенеза и особенностей жизненного цикла организма, длительность диплотены в оогенезе может различаться очень существенно [11-12]. У некоторых видов животных эта стадия в оогенезе может растягиваться на годы, представляя период относительного покоя, получивший название диктиотена. В это время клетки меняют тип дыхания и метаболизма, а задачи их жизнеобеспечения принимают на себя фолликулярные клетки. После достижения половой зрелости, периодически, часть ооцитов вступает в фазу роста и дифференцируется в зрелые яйцеклетки [13]. Хромосомы в составе бивалентов приобретают характерную деконденсированную морфологию с множеством боковых петель, покрытых РНП комплексами, что делает их по внешнему виду похожими на ёршики (лаповые щётки). У многих видов малый рост ооцита, обеспечиваемый активностью фолликулярных клеток, сопровождается наличием в нем хорошо сформированных ламповых щёток, утративших связь с ядерной оболочкой и находящихся в расправленном состоянии в пространстве растущего ядра. Именно на этой стадии ламповые щётки были описаны и изучались в разных лабораториях в течение многих лет [14-16], послужив прекрасным объектом не только для исследования биохимических процессов в клетках, но и предоставив уникальные возможности для высокоразрешающего картирования хромосом [17, 18]. По мере созревания ооцита и перехода к стадии быстрого роста, хромосомы в его ядре подвергаются высокой степени конденсации и удерживаются в пространстве растущего ядра ооцита благодаря связи с кариеферой белковой природы [19].

Хотя история изучения деконденсации хроматина с формированием ламповых щёток в профазе первого деления мейоза насчитывает более 140 лет и получила широкое освещение в научной литературе [14, 16, 18, 20-23], на некоторые вопросы до сих пор не получены ответы. Ни одна из предлагавшихся ранее гипотез не удовлетворяет в полной мере имеющуюся на сегодняшний день совокупность знаний и не может объяснить природу и значение этого феномена.

Цели и задачи. Сформулировать актуальную, удовлетворяющую требованиям времени и позволяющую учесть весь объем современных знаний гипотезу, объясняющую функциональное значение преобразования хромосом в ламповые щётки.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Осуществить выбор адекватных модельных объектов для исследования функционального значения ламповых щёток.
2. Проанализировать данные о молекулярной природе хроматина в составе боковых петель на стадии ламповых щёток.
3. Определить характеристики последовательностей, локализующихся на латеральных петлях.
4. Выявить закономерности преобразования структуры хромосом в ламповые щётки.

Научная новизна. В работе впервые установлены закономерности распределения и упаковки различных элементов генома в составе ламповых щёток у птиц. Выполненное в ходе настоящего исследования определение структурных и функциональных характеристик последовательностей, входящих в состав латеральных петель на примере хорошо разработанных модельных объектов, позволило приблизиться к пониманию фундаментального значения такого преобразования хромосом и роли ламповых щёток в созревании наследственного аппарата гамет. Полученные данные позволили подвести доказательную базу и обосновать отсутствие активного процесса транскрипции на протяжении диктиотены, что легло в основу принципиально новой гипотезы – гипотезы заблокированной транскрипции. Она согласуется с данными о функциональной организации хроматина на стадии диплотены профазы первого деления мейоза у представителей разных систематических групп и, в отличие от существовавших ранее гипотез, не вступает в противоречие с полученными в ходе различных исследований представлениями о гаметогенезе. Впервые удалось найти объяснение многим существовавшим ранее парадоксам, связанными с реализацией и защитой генетической информации, перепрограммированием генома и эпигенетической наследственностью, природой изменчивости в отсутствии рекомбинации.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования носят теоретический характер и имеют фундаментальное значение для развития современной молекулярной биологии. Заключение опираются на данные научных исследований, опубликованные в научных изданиях с момента первого описания ламповых щёток и включают не только данные, полученные лично автором, но и результаты учёных из лабораторий всего мира, аккумулированные на специализированном сайте, созданном Гербертом Макгрегором и редактируемом в последние годы автором диссертации при поддержке Санкт-Петербургского союза учёных.

Сформулированная в результате проведённого исследования новая гипотеза объясняет функциональное значение преобразования хромосом в ламповые щётки с учётом всей полноты имеющихся на сегодня данных об организации генома и процессах перепрограммирования наследственной информации в ходе гаметогенеза, а также принимает во внимание физиологическое состояние ооцитов в диктиотене. Отказ от традиционного представления о ламповых щётках, как о последствии производства больших количеств РНК, необходимых для запасаания желтка в цитоплазме ооцита, позволил взглянуть на них с независимых позиций и объяснить многие существовавшие противоречия. К их числу относится несоответствие между уровнем метаболизма ооцита и предполагаемой синтетической активностью на стадии ламповых щёток, а также несоответствие количества РНК в ядре ооцита ожидаемому уровню и невозможность выявления кодирующих последовательностей в её составе. Новый взгляд позволяет понять значение транскрипции некодирующих последовательностей генома. Предложенная автором гипотеза рассматривает стадию заблокированной транскрипции в профазе первого деления мейоза как универсальный этап онтогенеза, характерный не только для изученных видов. Такой взгляд предполагает в будущем существенное расширение и без того широкого круга организмов, для которых охарактеризован этап формирования ламповых щёток, и получение новых знаний о механизмах реализации блокировки транскрипции в диплотене с привлечением новых модельных объектов.

Практическое значение гипотезы заблокированной транскрипции состоит в понимании некоторых процессов, лежащих в основе возникновения мутаций *de novo* в гаметогенезе и путей передачи эпигенетической информации о функциональной организации генома следующему поколению. Эти исследования могут иметь прикладное значение для выявления факторов, влияющих на установление специфичного для определённого типа гаметогенеза паттерна метилирования генома и развития болезней импринтинга у человека. Их результаты могут найти применение в репродуктивной медицине.

Теоретические и практические результаты исследования используются в курсах «Биология размножения и развития», «Биология развития», «Биология развития животных», «Эмбриология», «Эколого-генетические аспекты онтогенеза» и «Сравнительная эмбриология животных», читаемых автором для студентов Российского государственного педагогического университета им. А.И.Герцена, а также войдут в программу нового разработанного курса «Эпигенетика».

Методология и методы. В основе исследования лежит картирование и аннотация последовательностей в составе латеральных петель на ламповых щётках птиц. Работа опирается на результаты, полученные с применением широкого спектра стандартных методов молекулярной и клеточной биологии, цитогенетики, биологии развития, биоинформатики, использованных автором в ходе выполнения собственных исследований, а также изучении информации, опубликованной в специализированных базах данных и научных публикациях. Для анализа библиографических данных использовали инструменты Clarivate Analytics, объединяющей реферативные базы данных публикаций в научных журналах и патентов на платформе Web of Science (Thomson Reuters Corp.), библиографическую и реферативную базу данных Scopus (Elsevier) и текстовую базу данных медицинских и биологических публикаций PubMed (National Center for Biotechnological Information, NCBI). В качестве дополнительного источника информации использовалась коллекция публикаций тематического <http://spass-sci.ru/lbc/>. Экспериментальные процедуры выполняли с использованием материально-технической базы Центра коллективного пользования оборудованием «Хромас» ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», а также оборудования лаборатории Вспомогательных репродуктивных технологий АО «Международный центр репродуктивной медицины».

Техника выполнения инструментов для микроманипулирования и методы получения препаратов хромосом из растущих ооцитов птиц были адаптированы автором для выполнения исследования. Стандартные процедуры выделения и очистки ДНК и РНК, рестриционного анализа, ник-трансляции, праймерного мечения, полимеразной цепной реакции в различных вариантах, включая полногеномную амплификацию и включение модифицированных предшественников, различные виды секвенирования проводили на основе опубликованных и разработанных в ходе исследования протоколов, а также с использованием протоколов производителей реактивов. Препараты метафазных хромосом получали по стандартному протоколу из первичных культур фибробластов, в том числе модифицированных в ходе исследования. Иммуногистохимическую окраску, а также гибридизацию нуклеиновых кислот *in situ* проводили с использованием специально модифицированных в ходе работы протоколов. Препараты исследовали с помощью методов световой микроскопии стандартными методами. Анализ данных секвенирования проводили с использованием стандартных методов биоинформатического анализа, в том числе с использованием ресурсов BLAST и RepeatMasker, а также с использованием специально разработанного для настоящего исследования подхода на основе анализа сырых данных полногеномного массового параллельного секвенирования.

Положения, выносимые на защиту.

1. Существовавшие представления об интенсивной транскрипции на стадии диплотены профазы первого деления мейоза и роли латеральных (боковых) петель на хромосомах в производстве мРНК, необходимых для вителлогенеза, не удовлетворяют сумме современных данных.

2. Латеральные петли формируются в районах, соответствующих инактивированному в соматических клетках хроматину и содержат тандемные повторы и другие повторяющиеся элементы генома, утратившие репрессивные эпигенетические маркеры в ходе ремоделирования хроматина в гаметогенезе.

3. Накопление транскриптов на боковых петлях ламповых щёток может объясняться блокировкой работы полимеразных комплексов и невозможностью их освобождения на всем протяжении существования ламповых щёток.

4. Преобразование структуры хромосом в ламповые щётки связано с реорганизацией хроматина и необходимостью поддержания генома в стабильном состоянии в течение длительного периода диктиотены.

Степень достоверности результатов и основных выводов обеспечивается: опорой на теоретические и практические данные, получившие обоснование в научных работах в области молекулярной биологии, цитогенетики, биологии развития, геномики, биоинформатики и эволюции; фундаментальностью предмета исследования и широким распространением в природе феномена преобразования хромосом в ламповые щётки; применением современных методов, технологий и подходов для решения поставленных задач; тщательным выбором адекватных модельных объектов; апробацией экспериментальных данных и теоретических заключений на многочисленных научных конференциях и опубликованием их в реферируемых изданиях; объяснением с позиций новой гипотезы существовавших ранее противоречий и обоснованием их взаимосвязи на молекулярном и физиологическом уровнях.

Апробация работы. Материалы исследований автора по теме диссертации были доложены и обсуждались на II, III и VII съездах Вавиловского общества генетиков и селекционеров, 15th International Chromosome Conference, Всероссийской конференции с международным участием «Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция» (к 135-летию со дня рождения П.П.Иванова), VIII ежегодной молодёжной экологической Школе-конференции «Современные проблемы сохранения биоразнообразия естественных и трансформированных экосистем», Всероссийском симпозиуме «Структура и функции клеточного ядра», VII международной научной школе для молодых ученых по экологической генетике «Генетическая токсикология», посвященная 150-летию открытий Г.И. Менделя, Международной конференции Хромосома 2018, 17th International

Conference on Chromosomal Genetics and Evolution, 22nd и 23st International Colloquium on Animal Cytogenetics and Genomics, 36th International Conference on Animal Genetics, 11th European Cytogenetics Conference и 1й Всероссийской цитогенетической конференции с международным участием.

Работа обсуждалась на научных семинарах Кафедры анатомии и физиологии человека и животных Факультета биологии ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена» и прошла апробацию на совместном семинаре Кафедры анатомии и физиологии человека и животных и Кафедры зоологии, а также совместном семинаре Лаборатории морфологии клетки, Лаборатории некодирующей ДНК, Лаборатории стабильности хромосом и микроэволюции генома и Лаборатории регуляции экспрессии генов Института цитологии Российской академии наук.

Публикации. Основные научные и практические результаты диссертации опубликованы в 56 печатных работах, в том числе вошли в состав сборников статей, коллективных монографий, а также 2 учебно-методических пособий. В соответствии с требованиями к публикации основных научных результатов диссертации на соискание учёной степени доктора наук, по теме исследования в рецензируемых научных изданиях из списка Высшей аттестационной комиссии при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации (ВАК) автором опубликованы 18 научных статей, из которых 9 в ведущих международных периодических научных изданиях (Q1-Q2).

Личный вклад автора. Диссертационная работа выполнена самостоятельно. Аналитические заключения носят оригинальный характер, экспериментальные данные, включённые в диссертацию, получены лично, а имена соавторов указаны в тексте и в соответствующих публикациях. Автором разработана концепция исследования, осуществлён выбор модельных объектов с детальной проработкой методической базы, предложены: оригинальная гипотеза, формулировка заключений и выводов.

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-14-50096 «Эволюция представлений о биологическом значении феномена хромосом типа ламповых щёток», выполняемом в РГПУ им. А. И. Герцена в 2019-2020 годах.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, глав, посвящённых обзору литературы, описанию объектов исследования и основных методов, двух глав с изложением результатов и обсуждения, а также заключения и списка литературы, содержащего 524 источника. Работа изложена на 248 страницах и содержит 32 рисунка и 8 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Глава «Феномен ламповых щёток» вводит понятие о хромосомах ламповых щётках и рассказывает об истории их открытия и описания. Ламповыми щётками называют хромосомы, находящиеся в особом морфофункциональном состоянии, характеризующиеся низкой степенью конденсации вдоль оси и дискретной структурой, образованной чередованием хроматиновых петель в составе плотно упакованных хромомеров и диспергированных латеральных петель. При сохранении осевой структуры такие хромосомы характеризуются слабо выраженной компактизацией, а их линейная длина существенно превосходит соответствующие митотические хромосомы. Латеральные (боковые) петли образованы участками хроматина с низкой плотностью упаковки, отходящими от более плотно упакованной основной оси. Это приводит к формированию характерной по морфологии структуры, имеющей внешнее сходство с ёршиком. Отдельное внимание уделено распространённости ламповых щёток в природе на основе анализа существующих публикаций. Представленный в работе список содержит упоминание о 85 видах живых организмов, принадлежащих к разным эволюционным ветвям, что позволяет сделать вывод о том, что появление ламповых щёток в эволюции произошло одновременно или раньше возникновения мейоза, а также об универсальном характере этого явления и его важном функциональном значении. Дополнительно проанализировано и описано развитие методов исследования ламповых щёток для различных модельных организмов. В завершении обзора опубликованных данных подробно описано развитие представлений о функциональной значимости ламповых щёток от самых первых работ до наших дней и подчеркнуты достоинства и противоречия различных гипотез вне зависимости от их популярности у научного сообщества, что позволяет сформировать независимый взгляд.

Несмотря на значительный прогресс в понимании организации ламповых щёток, причина их возникновения в гаметогенезе и формирования многочисленных боковых петель все ещё оставалась непонятной. На сегодняшний день все предложенные гипотезы о роли ламповых щёток выдвинуты на основании данных исследования их организации и функционирования у различных представителей амфибий. Эти объекты дают исследователям серьёзные преимущества не только благодаря крупным ооцитам, но и очень большим физическим размерам хромосом, которые у некоторых хвостатых амфибий на стадии ламповых щёток могут быть различимы даже невооружённым глазом. Однако большие размеры хромосом являются прямым следствием больших размеров генома, что вызвано не только увеличением плоидности у амфибий, но и обогащением повторяющимися элементами. Их обилие приводит к усложнению общей картины, а также является серьёзным

препятствием к завершению работ по анализу и сборке полных геномов для возможности реконструкции линейных последовательностей хромосом. Недоисследованные части генома у амфибий, как и многих других видов, включая человека, представлены в значительной мере повторяющимися элементами, присутствующими в избытке, они трудно поддаются сборке современными методами анализа геномных данных и существенно затрудняют анализ данных. Это позволяет обосновать необходимость выбора других модельных объектов из числа представителей видов с хорошо описанным оогенезом, доступными и хорошо описанными ламповыми щётками, а также максимально расшифрованным и небольшим по размеру геномом.

Глава «Объекты исследования» посвящена описанию основных модельных объектов, принадлежащих к Классу Птицы. Благодаря чётким морфологическим отличиям они составляют хорошо обособленную группу животных, монофилетическое происхождение которой не вызывает сомнения [24]. Результаты современных исследований, основанные на анализе геномных данных, выявляют высокое сходство птиц с рептилиями и могут свидетельствовать в пользу гипотезы, рассматривающей птиц в качестве доживших до наших дней представителей динозавров [25, 26]. Представители птиц давно стали классическими объектами экспериментальной биологии. Куриный эмбрион по праву считается старейшим объектом [27].

Для тех видов птиц, которые к настоящему моменту введены в практику исследований в качестве модельных объектов, хорошо описаны как эмбриональное развитие [28-32], так и все этапы оогенеза [19, 33, 34]. Анатомические исследования плана строения птиц показали наличие характерных морфологических адаптивных приспособлений к полёту, включающих не только особое строение скелета, дыхательной и кровеносной систем, но и утрату одного яичника у подавляющего большинства летающих видов птиц [35]. Ключевую роль для дифференцировки гонад у курицы имеет эффект дозы некоторых генов [36]. Дифференцировка пола у всех изученных птиц определяется генетически, с гетерогаметным женским полом, который определяется наличием морфологически отличающихся хромосом Z и W, и гомогаметным (ZZ) мужским полом [37-39]. Несмотря на существующее в научно-популярной литературе мнение о том, что у птиц возможно полноценное развитие особей с кариотипом Z0, было показано, что такие эмбрионы не жизнеспособны и погибают ещё до вылупления из яйца [40]. Эти данные подтверждаются тем, что в хромосоме W присутствуют гены, необходимые для реализации эмбрионального развития с доказанной чувствительностью к дозе гена [41].

Одомашненные и содержащиеся в неволе для сельскохозяйственных и декоративных целей виды птиц давно используются для исследования закономерностей наследования генетических детерминант и цитогенетических исследований [30, 36, 38, 42, 43]. Поэтому неудивительно, что геном курицы был секвенирован одним из первых среди позвоночных животных [44]. Его размер оказался сравнительно небольшим, так, например, он в три раза меньше генома человека [45-49]. Реализация проекта по секвенированию 10 тысяч геномов птиц (B10K) дала в руки исследователей огромный объем информации для дальнейшего анализа [50]. Доступность геномных данных и их относительно небольшие размеры в сочетании с имеющимся опытом экспериментальных исследований делают птиц исключительно привлекательным объектом для исследования закономерностей функциональной организации хромосом, в том числе на стадии ламповых щёток. Работа опирается на данные высоко разрешающего физического картирования различных элементов генома на ламповых щётках следующих видов птиц: домашняя курица, японский перепел, сизый голубь, обыкновенный зяблик и зебровая амадина.

Глава «Методы исследования» даёт общее описание основных методов и подходов со ссылкой на рутинные протоколы, а также подробно описывает специализированные методики, связанные с приготовлением препаратов ламповых щёток из ядер ооцитов птиц, разработанные с участием автора, и особенности применения метода гибридизации *in situ*. Эта информация подробно представлена в опубликованных работах автора по теме диссертации.

Глава «Функциональная организация хромосом типа ламповых щёток у птиц» начинается с морфологического описания ламповых щёток из превителлогенных ооцитов, формирующихся в ооцитах в самом начале диплотены профазы первого деления мейоза при вступлении в период покоя. Показано, что у курицы все ооциты переходят в это состояние в возрасте 1-1,5 месяцев. Ооциты выделяются большими размерами и характерной организацией хромосом, которые лежат внутри оболочки ядра, однако с ней не контактируют. Вплоть до перехода к стадии большого роста хромосомы представляют собой биваленты, состоящие из гомологов, которые завершили этап синапсиса и рекомбинации и находятся на стадии диплотены. Каждый гомолог состоит из двух хроматид, образовавшихся в результате репликации ДНК еще до вступления клетки в профазу мейоза. Хроматиды в составе бивалента имеют особую хромомерно-петлевою организацию (Рис. 1). Рибонуклеопротеиновые (РНП) и белковые комплексы формируют характерные структуры, ассоциированные с хроматином, а отдельные хроматиды особенно хорошо заметны в участках растянутых двойных мостов. Хромомерная ось представлена чередой плотных розеток неактивного хроматина имеющего петлевою организацию.

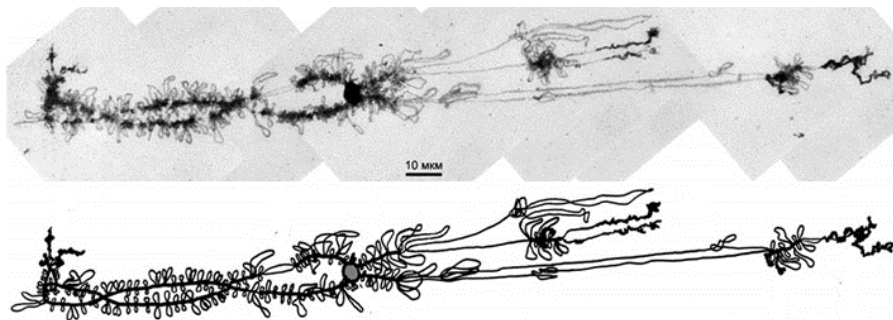


Рисунок 1. Макробивалент III зяблика, окраска Coomassie blue R250 и визуализация с помощью светлопольной микроскопии. Схематический рисунок выполнен по микрофотографии. Масштабная линейка 10 мкм.

Ось хромосомы образуют хромомеры, состоящие из петель разной величины, которые характеризуются наличием молекулярных маркеров инактивированного хроматина [18, 51, 52]. Её структура и взаимодействие между сестринскими хроматидами поддерживаются белковыми комплексами. В составе хромомер практически отсутствуют РНП, центральная часть розеток имеет плотную упаковку, однако нельзя утверждать, что в них совсем не происходит транскрипции, поскольку иногда удаётся выявить синтез РНК в хромомерной оси, хотя и не очень интенсивный. Основу боковых петель составляет двунитевая ДНК, сплошь покрытая плотно следующими друг за другом полимеразными комплексами, между которыми не остаётся места для нуклеосом. Единицы матрикса в диспергированном хроматине ламповых щёток имеют вид типичных «ёлочек», описанных Миллером и образованы РНП-фибриллами, размер которых увеличивается в направлении транскрипции [51, 53, 54, 55], формируя поляризованный матрикс транскрипционных единиц. Хроматин латеральных петель имеет низкую степень конденсации и открытую конформацию, тогда как в составе хромомерной оси хроматин имеет нуклеосомную организацию и упаковку более высокого порядка [18].

Большинство боковых петель на ламповых щётках птиц можно отнести к категории простых петель с одной или несколькими транскрипционными единицами. Помимо них, на ламповых щётках птиц описаны петли, характеризующиеся сложным по составу и морфологии РНП-матриком. Помимо обогащенных РНК структур, в ассоциации с ламповыми щётками находятся белковые маркерные структуры различной природы и морфологии. В ядрах ооцитов птиц также описаны белковые гранулы и сферические белковые тела, иногда характеризующиеся наличием вакуолей. Перечисленные выше ассоциированные с ламповыми щётками структуры

являются маркерными, т.к. их локализация всегда строго определяется хромосомным локусом и может служить своего рода ориентиром для идентификации конкретных хромосом набора. Расположение и морфология простых петель тоже имеет строго определенный характер и специфична для конкретных хромосом. Это позволило создать цитологические карты хромосом высокого разрешения, которые удалось соотнести с генетическими картами. Первоначально, соотнесение митотических хромосом и ламповых щёток проводили на основании размеров, однако их соответствие требовалось доказать. Для половых хромосом эта задача изначально была проще из-за значительной разницы в размере и морфологии гетероморфных хромосом, формирующих асимметричный бивалент [56]. После выявления повторяющихся последовательностей в геномах некоторых видов появилась возможность проводить их локализацию и оценивать расположение на ламповых щётках и метафазных хромосомах. Локализация сателлитов дает возможность учитывать в цитологических картах ламповых щёток положение центромеры и оценивать относительную степень компактизации различных участков хроматина. Создание подробных цитологических карт ламповых щёток с нанесенными на них позициями морфологических маркеров различной природы и локализацией молекулярных маркеров позволяет накладывать на эти карты данные геномных сборок для их верификации и выявления пробелов.

Большинство пробелов относится к участкам локализации повторяющихся последовательностей, организованных в протяженные поля. Наибольший вклад в заполнение брешей в геномной сборке был сделан для определения последовательности половой хромосомы W курицы. Благодаря использованию высокоразрешающего картирования на ламповых щётках удалось определить положение протяженных районов тандемных повторов, что позволило реконструировать организацию всей хромосомы W (Рис. 2).

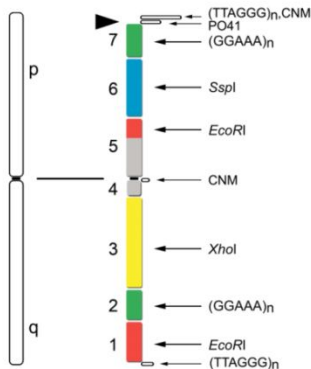


Рисунок 2. Цитологическая карта половой хромосомы W курицы на стадии ламповых щёток с нумерацией хромомеров относительно соответствующей митотической хромосомы. Линия указывает положение центромеры, подписаны короткое (p) и длинное (q) плечи. Головка стрелки указывает место возникновения хиазм в половом биваленте, разными цветами отмечены районы локализации в хромомерах повторяющихся элементов.

Характеристика молекулярного состава матрикса латеральных петель начинается с подробной характеристики белковых компонентов. Особенности локализации петель, обладающих определенным белковым составом РНП, наряду с данными о видоспецифичности распределения петель на конкретных хромосомах, свидетельствует о том, что определяющим фактором в преобразовании хроматина в боковые петли на ламповых щётках является молекулярный состав определенной области генома. Это подводит к выводу о том, что ключом к пониманию феномена образования латеральных петель может стать анализ данных о распределении нуклеотидных последовательностей в пределах различных участков ламповых щёток в зависимости от их природы и функциональной нагрузки в составе генома.

Анализ распределения последовательностей ДНК в составе ламповых щёток начинается с описания попыток идентификации транскрипции генов на латеральных петлях ламповых щёток птиц, завершившихся неудачей. Для поиска уникальных последовательностей в составе боковых петель на ламповых щётках был использован подход, основанный на анализе локализации ВАС клонов из коллекции CHORI-261, предварительно отселектированных на обогащенность генами с помощью методов биоинформатики [57]. При отборе клонов использовались данные о локализации последовательностей концов вставок из генома курицы в сборке генома. Зонды на основе такой селекции могут использоваться в качестве универсальных маркеров, т.к. содержат высококонсервативные участки генома. На ламповых щётках курицы и перепела они локализовались в составе хромомерной оси. Эти данные полностью соответствовали предположению, основанному на результатах по локализации на ламповых щётках различных видов птиц хромосом-специфичных зондов (хромосомных пэинтов) курицы. Сигнал от таких зондов на хромосомах своего вида локализовался как на хромомерной оси, так и на петлях, в то же время проведение межвидовой гибридизации даже без использования конкурентной фракции из повторяющихся элементов генома давало сигнал практически только на хромомерной оси. Это косвенно свидетельствовало о том, что в составе транскрипционных единиц боковых петель находятся главным образом видоспецифичные последовательности, тогда как гены и другие консервативные элементы генома локализируются в хромомерной оси.

У птиц так и не удалось выявить в составе транскрипционных единиц боковых петель на ламповых щётках уникальные последовательности, хотя была предпринята попытка выявить их на основе анализа данных последовательностей ВАС клонов, имеющих частичную локализацию в боковых петлях. В ходе исследований по уточнению сборки генома курицы методом высокоразрешающего картирования были идентифицированы 6

клонов из Вагенингенгской коллекции ВАС библиотек куриного генома [17], дающих сигналы на латеральных петлях: WAG-125P16, WAG-71O17, WAG-38E8, WAG-76E5, WAG-118M14, WAG-23I16. По данным о физической локализации зондов и наличию в них генетических маркеров для 4 клонов удалось установить контиги в геномной сборке. Для клонов, содержащих повторяющиеся элементы, в геномных сборках не оказалось соответствующих последовательностей, что дополнительно свидетельствует о наличии пробелов и неточностей даже в достаточно полно собранном геноме курицы. В 4 идентифицированных контигах были определены позиции потенциальных промоторов и генов, однако ни один из них не вошел в состав локализующихся в петлях клонов.

В отличие от амфибий, у птиц не удалось найти петель, несущих, например, гистоновые гены. Обнаружить транскрипты рибосомных генов также не удалось [58]. До настоящего времени не только уникальные последовательности, но и многократно тандемно повторенные гены на ламповых щётках птиц не обнаружены в составе боковых петель. Ещё одним косвенным свидетельством в пользу того, что кодирующие последовательности в составе ламповых щёток сохраняют компактную упаковку, тогда как деконденсируются обеднённые генами районы служит степень деконденсации богатых генами микрохромосом у курицы. В отличие от макрохромосом, которые в форме ламповых щёток увеличиваются 30-кратно, степень деконденсации микрохромосом не превышает 17-кратной.

Отдельный раздел работы посвящён характеристике некодирующих элементов в геномах птиц, в рамках которой проведена масштабная работа по восполнению пробелов в сборках геномов и осуществлена классификация элементов на основе их функций. Как и большинство живых организмов, птицы в своём геноме несут значительное количество некодирующих последовательностей, которые по формальным причинам не могут быть отнесены к категории генов. Традиционно к таким элементам принято относить участки ДНК, выполняющие структурные функции, которые отличаются высоким уровнем консерватизма, а также значительное количество последовательностей, в том числе повторяющихся элементов, функции которых до сих пор не выяснены.

Несмотря на общее сокращение числа коротких тандемных повторов (STR), в геноме курицы почти вдвое по сравнению с геномом человека, более 10 % генов содержат STR в 2 т.п.н. области выше промотора, что сопоставимо с регуляторными элементами у других видов позвоночных [59]. Это является характеристикой регулируемых промоторов. Также выявлена высокая частота локализации STR в интронах, в особенности в генах, кодирующих трансмембранные белки и транскрипционные факторы.

Помимо общей характеристики повторяющихся элементов в геномах птиц дано подробное описание и классификация, а также результаты идентификации и аннотации повторяющихся элементов из геномов различных видов птиц, наиболее существенный вклад внесен в восполнение данных о геномах домашней курицы и японского перепела. Результаты исследований, полученные на основе анализа сырых данных полногеномного секвенирования, в том числе с использованием длинных прочтений дают наиболее полную картину разнообразия повторяющихся элементов, особенно существенно они дополнили информацию о составе и доле в геноме тандемных повторов, сведения о которых были скудно представлены в полногеномных сборках. Данные о наиболее высококопийных тандемных повторах в геноме курицы подтверждают общую тенденцию к утрате повторяющихся элементов в геномах птиц с преобладанием в списке представителей различных микросателлитов.

В контексте общей характеристики тандемных повторяющихся элементов в геномах птиц особое внимание уделено различиям в копийности отдельных повторяющихся элементов и связанные с ними различия в размерах геномов. Для оценки количества и состава тандемных повторов в геноме японского перепела был также использован упоминавшийся выше подход, позволяющий проанализировать встречаемость последовательностей в сырых данных полногеномного секвенирования. Результаты этого исследования выявили качественные отличия в составе наиболее представленных в геноме повторов у перепела и их доле в общем составе последовательности ДНК. Анализ геномных данных подтвердил наличие в геноме японского перепела описанных ранее сложных HOR с участием повторов PO41 и CJA-BglII [60]. Направление отдельных мономеров в составе таких HOR может быть различным, что создаёт возможности образования транскриптов отдельного элемента в обоих направлениях при сквозной транскрипции и возможности образования фрагментов двунитевых РНК.

Представители разных видов птиц характеризуются определенным спектром не только тандемных, но и рассеянных элементов. Информация о составе и количестве диспергированных повторяющихся последовательностей в геномах различных видов птиц лучше представлена по сравнению с тандемными повторами в аннотированных полных геномах и базах данных собранных до контигов геномов [61, 62, 63, 64]. В отличие от ближайших родственников из числа рептилий, птицы утратили значительную часть эндогенных ретровирусов (ERV), а также существенно сократили долю в геноме коротких рассеянных повторов (SINE) [51, 61, 65, 66]. Наиболее распространенным типом рассеянных повторов у птиц оказались дериваты элемента CR1 (от chicken repeat 1) [67, 68, 69, 70, 71]. Полноразмерный мономер CR1 из генома курицы (регистрационный номер

в GenBank U88211) представляет из себя ретротранспозон, относящийся к классу длинных рассеянных повторов (LINE), который содержит две открытые рамки считывания [67, 72]. Несмотря на то, что подавляющее большинство повторов CR1 представляют собой небольшой фрагмент производной 3'-концевого повтора мобильного элемента, в геноме курицы были обнаружены и функциональные полноразмерные копии [67]. Это свидетельствует о его способности к ретротранспозиции и обеспечению перемещения некоторых укороченных элементов. Подавляющее большинство повторяющихся элементов, относящихся к этому семейству, утратили способность к независимой транспозиции и дивергировали с образованием различных подсемейств тандемных и рассеянных повторов [65, 73]. Было показано, что в геномах птиц, производные CR1 предпочтительно локализуются в обогащенных генами районах, что нехарактерно для представителей LINE у других групп организмов [74, 75, 76]. Это свидетельствует о том, что утрата большинства SINE у предков птиц позволила дериватам CR1 распространиться в районы эухроматина. Широкое распространение CR1 привело к его эволюционированию даже в пределах отдельных геномов, хотя представленность этого повтора у разных видов птиц варьирует. Наиболее молодые элементы, такие как CR1-B2-2, находятся в обогащенных генами районах микрохромосом, представители самого распространенного семейства CR1-C4 имеют умеренный возраст и именно они оккупируют обогащенные генами районы макрохромосом, а самое древнее и наименее консервативное семейство CR1-Y4-4 наиболее представлено на хромосоме Z, где степень дивергенции этих элементов достигает почти 30% [77]. Большая роль экспансии повторяющихся элементов в эволюции гетероморфных половых хромосом уже обсуждалась выше, но здесь важно отметить различия в типах повторяющихся элементов, накапливающихся на разных половых хромосомах и особенностях их распределения. Аналогичные процессы, по-видимому, происходили в эволюции хромосомы линии зародышевого пути (GRC от germ line restricted chromosome) у певчих птиц, в частности у амадины.

В работе подробно описано участие повторяющихся последовательностей в структурной и функциональной организации центромерных и теломерных районов с акцентом на особенности организации перичентромерного и субтеломерного гетерохроматина и их отличия от собственно центромерных и теломерных последовательностей. Приводятся данные о распространенности в геномах птиц повторов (TTAGGG), в том числе новые данные о локализации интерстициальных сайтов этого повтора в геноме перепела. Данные об особенностях организации повторяющихся элементов соотнесены с уровнем их консерватизма.

Заключительная часть этого раздела посвящена организации кластеров рибосомных генов (ядрышковых организаторов, ЯОР) у птиц. У птиц ЯОР находятся на микрохромосомах, причем у большинства исследованных видов в наборе всего одна ядрышкообразующая хромосома [78]. У всех животных рибосомные кластеры имеют сходную организацию и состоят из последовательностей, кодирующих консервативные рибосомные РНК: 18S, 5,8S и 28S и разделяющие их внутренние транскрибируемые спейсеры: ITS1 и ITS2, в виде одной транскрипционной единицы прерибосомной РНК, включающей с флангов также внешние транскрибируемые спейсеры [79]. Тандемно повторенные кластеры отделены друг от друга межгенными спейсерами (IGS), содержащими промоторы и области терминации транскрипции. У курицы полностью собран кластер рибосомных генов (регистрационный номер GenBank KT445934) и последовательности межгенных спейсеров, а также определена последовательность прерибосомной РНК японского перепела. Выявлена особенность организации кластера рибосомных генов у птиц, которая существенно затрудняет их изучение, а именно – последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров оказались насыщены повторами, обогащенными GC парами со сложной вторичной структурой.

Несмотря на существующие представления о рафинировании мономеров в составе полей тандемных повторов, было показано, что индивидуальные повторяющиеся последовательности могут различаться между собой даже в составе одного ЯОР. При сохранении консервативности некоторых элементов, длина соседних мономеров может существенно различаться из-за разницы в организации межгенных спейсеров. Они состоят из блоков тандемных повторов с разным GC составом, организованных в определенном порядке и различающихся копийностью в индивидуальных мономерах, а также двух консервативных уникальных областей, ответственных за инициацию транскрипции и ее терминацию, соответственно. Межгенные спейсеры у курицы могут подвергаться метилированию благодаря наличию CpG районов, хотя вопрос о возможности изменения активности кластеров под действием ядрышкового хроматин-ремоделирующего комплекса все еще остается открытым. Тем не менее, наличие потенциально подверженных избирательной регуляции последовательностей может позволять гибко реагировать на потребности клетки и регулировать активность отдельных кластеров путем метилирования CpG.

Повышенная транскрипционная активность ЯОР в сочетании с высокой копийностью создает предпосылки роста числа обменов и связанные с ними процессы изменения числа копий вовлеченных последовательностей, что закладывает основы индивидуальных отличий [80, 81]. Имеются данные о различиях в копийности рибосомных кластеров

у представителей различных пород кур, что может свидетельствовать о существовании положительного давления отбора в направлении повышения эффективности ЯОР и увеличения числа копий рибосомных генов у мясных пород кур [82, 83]. Помимо входящих в состав кластеров тандемных повторов, районы ЯОР на хромосомах фланкированы повторяющимися последовательностями разной природы [58]. Они состоят из последовательностей, образующих хромоцентры гетерохроматина, окружающих ЯОР [84]. В интерфазном ядре тесно соседствуют функционирующие кластеры рибосомных генов с повышенной транскрипционной активностью и насыщенные мобильными элементами блоки гетерохроматина. Это может быть причиной хорошо известной для многих групп животных высокой частоты транслокаций ЯОР [81]. Интересно, что для птиц такое явление нехарактерно. У курицы ЯОР локализован интерстициально на хромосоме 16 и такое расположение ЯОР наблюдается у подавляющего большинства исследованных видов птиц [51, 70, 85], хотя из-за сложности сборки этого района для многих видов он все еще представлен пробелом. Сохранение единственной анцестральной ядрышкообразующей хромосомы может объясняться тем, что негомлогичные обмены с участием интерстициально расположенного ЯОР приводят к появлению несбалансированности кариотипа, несовместимого с жизнью. Это может иметь особое значение именно для птиц, у которых из-за сокращения числа повторов в геноме мог снизиться уровень уникальности последовательностей, отвечающих за синапсис хромосом в мейозе.

В то же время, описаны виды птиц, несущие более одной ядрышкообразующей хромосомы в кариотипе. У темной камышницы в терминальном районе половой хромосомы W локализован дополнительный функциональный ЯОР [86]. У птиц с гетерогаметным женским полом перенос ЯОР на гетероморфную половую хромосому W приводит к тому, что у самцов число ядрышкообразующих хромосом не увеличивается, а у самок дополнительный ЯОР может использоваться для нужд оогенеза. Повышенные потребности в запасании рибосом у растущих ооцитов разных организмов связаны с такими явлениями, как амплификация экстрахромосомных ядрышек в оогенезе у разных видов позвоночных [21, 87, 88]. У некоторых видов рыб амплификация хромосомных кластеров рибосомных генов сопровождает женскую половую дифференцировку [89]. В то же время, перенос ЯОР на гоносому у видов с генетическим определением пола происходит в природе не очень часто, хотя описан у представителей самых разных групп, от насекомых до млекопитающих [90, 91, 92]. У однопроходных и сумчатых млекопитающих с гетерогаметным мужским полом размещение ЯОР на хромосоме X может приводить к неполной инактивации второй половой хромосомы у самок из-за

поддержания активности рибосомных генов в ее составе [93]. Интересно, что если ЯОР размещается на обоих гомосомах, то он может брать на себя функцию псевдоаутосомного района, отвечающего за спаривание и рекомбинацию [94]. Для защиты от негомологической рекомбинации ЯОР в мейозе у темной камышницы могут служить механизмы, поддерживающие спаривание гетероморфных хромосом, препятствуя обменам с районами интерстициальных ЯОР, однако эффективность такой защиты можно оценить, только проведя отдельное исследование. Субтеломерное размещение дополнительного ЯОР способствует снижению числа вероятных патологических дериватов и уменьшению рисков нарушения конъюгации гомологов.

У японского перепела мы наблюдаем пример увеличения числа ЯОР за счет транслокации их на другие аутосомы. Помимо анцестрального интерстициального ЯОР на хромосоме 16, описаны дополнительные функциональные ЯОР, располагающиеся на коротких гетерохроматиновых плечах двух акроцентрических микрохромосом [95]. Расположение ЯОР с формированием спутников широко распространено в природе и характеризуется не только размещением активно транскрибируемых последовательностей в окружении блоков субтеломерного и перицентромерного гетерохроматина, но и часто наличием нескольких несущих спутники хромосом в наборе [96, 97]. Такое размещение высокогомологичных последовательностей на разных хромосомах имеет наименьшие негативные последствия, по сравнению с интерстициальным. Однако оно накладывает более высокие требования к обеспечению точности синапсиса гомологов по сравнению с наличием одной ядрышкообразующей хромосомы, что мы и наблюдали в организации субтеломерных районов хромосом у японского перепела.

При изучении особенности кластеров рибосомных генов у японского перепела было обнаружено, что консервативные последовательности гена 18S рибосомной РНК, помимо присутствия в составе ЯОР на трех парах микрохромосом (один интерстициальный на хромосоме 16 и два спутника на неидентифицированных микрохромосомах), локализируются в составе гетерохроматиновых блоков на коротких плечах других микрохромосом. Используя праймеры к консервативным участкам рибосомных генов, удалось амплифицировать, клонировать и секвенировать фрагменты рибосомных генов в составе сложных дериватов, а также локализовать их на большинстве микрохромосом (Рис. 3), что подтвердило участие рибосомных генов в образовании гетерохроматиновых блоков на коротких плечах микрохромосом японского перепела.

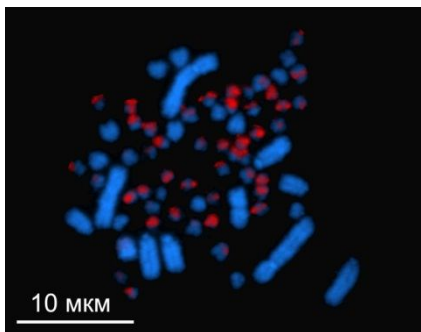


Рисунок 3. Локализация дериватов рибосомных генов на метафазных хромосомах японского перепела методом FISH. Окрашена ДНК хромосом (голубая флуоресценция), локализация биотинилированного зонда, содержащего дериваты 18S рибосомного гена, выявлена иммунохимической реакцией с авидином (красная флуоресценция). Масштабная линейка 10 мкм.

Детальный анализ состава дериватов выявил помимо фрагментов генов главного комплекса гистосовместимости, которые так же, как и интерстициальные ЯОР локализуются на хромосоме 16 [58], наличие различных мобильных элементов (Таблица 1). Активации мобильных элементов в составе гетерохроматина, пространственно локализованных в интерфазном ядре в непосредственной близости от ЯОР может вовлекать рибосомные гены в транспозицию [98]. У японского перепела результат такого процесса закрепился в кариотипе. Интересно, что, несмотря на широкое распространение дериватов в геноме, функциональные ЯОР сформировались в виде спутников только на двух парах микрохромосом, тогда как остальные дериваты вошли в состав гетерохроматина коротких плеч акроцентрических хромосом и утратили функциональность.

Таблица 1. Характеристика мобильных элементов, идентифицированных в составе слитных дериватов 18S рибосомного гена.

Название	Класс	Семейство
CR1-C	NonLTR	NonLTR/CR1
CR1-D2	NonLTR	NonLTR/CR1
CR1-J2 Pass	NonLTR	NonLTR/CR1
CR1-Y	NonLTR	NonLTR/CR1
CR1-Y2	NonLTR	NonLTR/CR1
CR1-Y3	NonLTR	NonLTR/CR1
CR1-Y4	NonLTR	NonLTR/CR1
Tx1-1 BF	NonLTR	NonLTR/Tx1
Penelope-7 SSa	NonLTR	NonLTR/Penelope
hAT-10 XT	DNA	DNA/hAT
Harbinger-2 Gav	DNA	DNA/Harbinger
Copia-25 TC-I	LTR	LTR/Copia
ERV2-1 STr-I	ERV	ERV/ERV2

В завершении более подробно рассмотрены особенности локализации различных элементов генома птиц в составе ламповых щёток превителлогенных ооцитов. Кодрующие уникальные последовательности у птиц входят в состав хромомерной оси. Рибосомные гены, несмотря на наличие большого числа копий, в диктиотене характеризуются упаковкой, свойственной кодирующей части генома. Все кластеры повторов рибосомных генов локализируются только в составе хромомерной оси.

Геном японского перепела, в котором произошло формирование дополнительных районов гетерохроматина в перицентромерных районах микрохромосом с участием дериватов рибосомных генов, сателлитов и мобильных элементов, позволил отдельно рассмотреть их локализацию на ламповых щётках. Используя зонд на основе дериватов 18S рибосомного гена, было установлено, что входящие в его состав последовательности сравнительно молодого гетерохроматина, характеризующиеся низким уровнем консервативности нуклеотидной последовательности, на стадии ламповых щёток на микрохромосомах формируют хорошо выраженные боковые петли с образованием характерных транскриптов (Рис. 4).

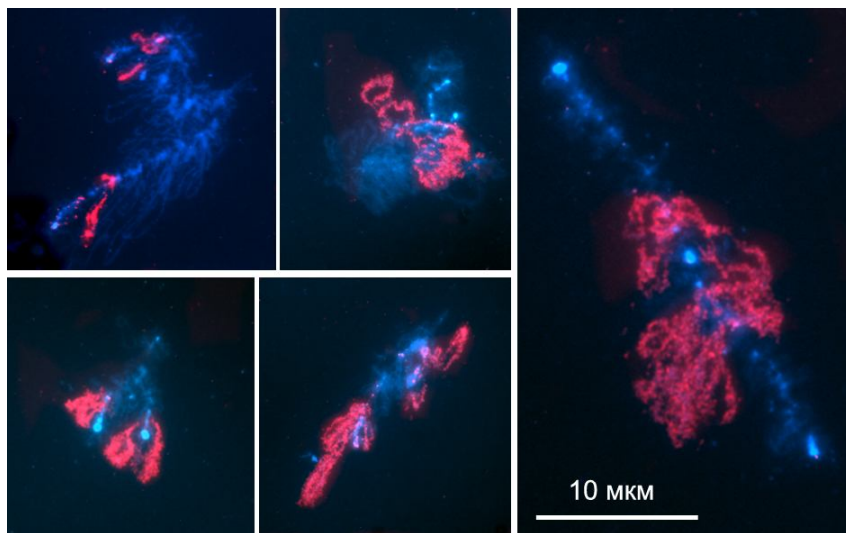


Рисунок 4. Локализация дериватов рибосомных генов на ламповых щётках японского перепела методом FISH. ДНК микрохромосом окрашена DAPI (голубая окраска), локализация биотинилированного зонда, содержащего дериваты 18S рибосомного гена, выявлена иммунохимической реакцией с авидином (красная окраска). Масштабная линейка 10 мкм.

Наличие повторяющихся элементов в составе боковых петель ламповых щёток у курицы впервые было обнаружено Нэнси Хатчисон в ходе неудачной попытки обнаружить транскрипцию генов в оогенезе на этой стадии [99]. Сейчас мы знаем, что в этих районах находятся протяженные блоки тандемных повторов, последовательности которых идентифицированы и охарактеризованы в ряде работ [100, 101, 102, 103], в том числе и наших исследованиях. Было показано наличие транскриптов теломерного повтора на латеральных петлях в составе мегателомер в субтеломерных районах хромосом у курицы и голубя [100, 104]. Выявлено формирование петли в перицентромерном районе II бивалента у голубя и на всех хромосомах у вяхиря с участием тандемного повтора PR1 [105]. Обнаружено присутствие минисателлитов перицентромерного и субтеломерного гетерохроматина, в том числе, в составе петель со сложной организацией транскрипционных единиц у курицы и перепела [101, 102], в том числе нами были охарактеризованы петли в составе самых маленьких микрохромосом курицы. Было показано участие тандемного повтора LL2R в формировании глыбчатых петель на хромосоме 2 курицы [103]. Ведущая роль рассеянных повторов в формировании большинства латеральных петель была также очевидна при проведении гибридизации с хромосомными пейнтами курицы на ламповых щётках того же вида. Об этом свидетельствуют и результаты локализации на ламповых щётках высокоповторяющихся элементов генома курицы из фракции, ренатурирующей при 60°C за 1 час (Cot1) (Рис. 5).

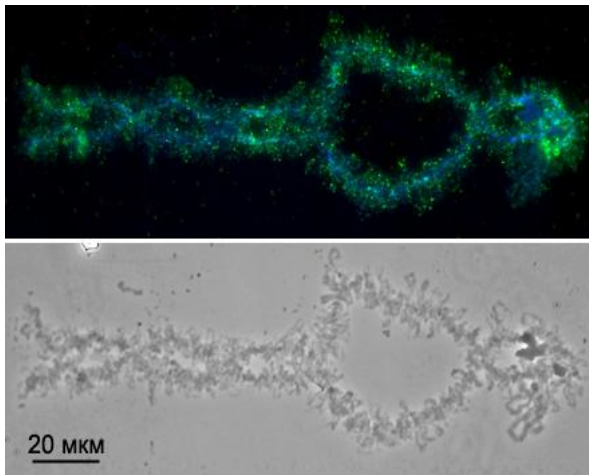


Рисунок 5. Сверху гибридизация зонда на основе фракции Cot1 ДНК курицы на биваленте хромосомы 2 курицы, ДНК окрашена DAPI (голубая окраска), зонд Cot1 (зеленая окраска). Снизу изображение препарата, полученное с использованием фазового контраста. Масштабная линейка 20 мкм.

Данные об исследовании состава фракции Cot1 ДНК курицы отмечают наибольшую представленность в ней высокополимерного инвертированного повтора PIR [73, 106]. Эти повторы характеризуются высокой степенью дивергенции и приурочены, в большей степени, к G-бэндам метафазных хромосом, наряду с LTR транспозонами, которые также входят в состав локализованной фракции. Как уже отмечалось выше, рассеянные повторы играют важную роль в эволюции половых хромосом у птиц. Гибридизация с фракцией повторов на стадии ламповых щёток подтвердила данные молекулярных исследований. Помимо рассеянных элементов были выявлены характерные области локализации tandemных повторов, демонстрирующих более равномерное окрашивание.

К числу tandemных повторов в составе латеральных петель относится блок примерно из 210 tandemно повторенных последовательностей длиной 2,2 т.п.н., составляющие район около 460 т.п.н. в середине короткого плеча хромосомы Z [107]. Этот tandemный повтор находится в районе блока факультативного гетерохроматина MNM (от male hypermethylation), который примыкает непосредственно к гену *DMRT1*. Активация транскрипции этого tandemного повтора происходит только у самок с образованием длинной некодирующей РНК внутриядерной локализации, функция которой не до конца ещё ясна, и зависит от присутствия в кариотипе гоносомы W [107]. Терминальные петли на хромосоме Z хорошо видны с использованием фазового контраста, однако их матрикс не связал зонд на основе фракции Cot1, эти петли гибридизуются с так-называемым «зондом к Z-макросателлиту» [108]. Помимо терминальных петель субтеломерного гетерохроматинового района хромосомы Z, этот зонд связал матрикс терминальных петель макрохромосом с 1 по 4 [108]. Более поздние данные об организации последовательности половой хромосомы Z у курицы показали, что этот район факультативного гетерохроматина включает гены, необходимые для дифференцировки семенников [109]. Он инактивирован в большинстве типов клеток и хорошо различим на метафазных хромосомах. Для приготовления зонда этот район хромосомы Z был клонирован из образца, полученного методом микродиссекции [108]. Помимо генов, ответственных за развитие семенников, в состав зонда попали повторяющиеся элементы, характерные для организации субтеломерных районов некоторых макрохромосом, включая хромосому Z.

Характерные латеральные петли, соответствующие по локализации субтеломерным и перицентромерным областям хромосом, также имели более равномерное окрашивание, свидетельствуя о локализации в них блоков tandemных повторяющихся элементов (Рис. 6). Многие из таких петель соответствуют локализации tandemно организованных блоков минисателлитов [101, 102, 103], в соматических клетках находящиеся в гетерохроматиновых районах хромосом.

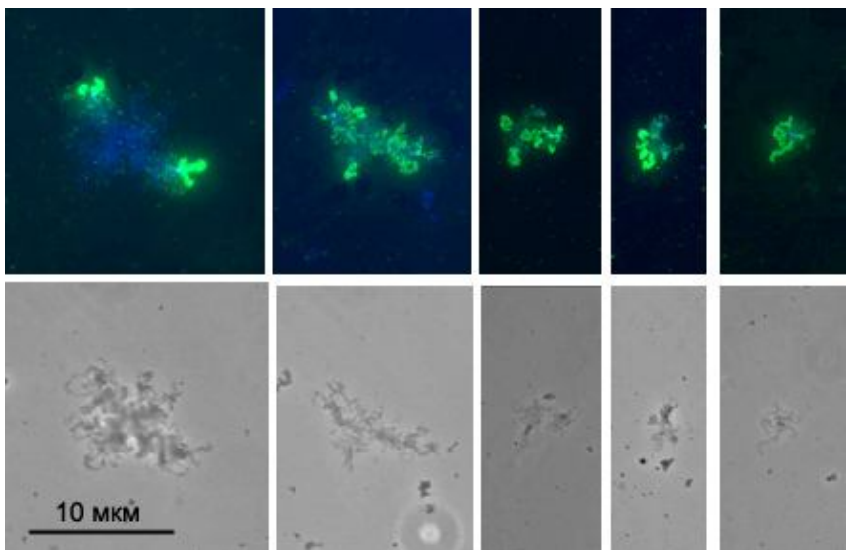


Рисунок 6. Сверху результаты гибридизации зонда на основе фракции Cot1 ДНК курицы на микрохромосомах курицы, ДНК окрашена DAPI (голубая окраска), биотинилированный зонд детектирован иммунохимически (зеленая окраска). Снизу изображение тех же хромосом, полученное с использованием фазового контраста. Масштабная линейка 10 мкм.

Некоторые повторяющиеся последовательности не удалось обнаружить в составе боковых петель на ламповых щётках. К ним относятся умеренные повторы из генома курицы и голубя, локализующиеся в R-бэндах в соматических клетках, которые выявляются в составе хромомерной оси [51, 110, 111]. Один из наиболее распространенных в геноме Курообразных повторяющийся элемент CR1, локализующийся преимущественно в R-бэндах хромосом и обогащенных генами районах [76], также выявляется только в пределах хромомерной оси. Даже использование зонда к высококонсервативной последовательности 3'-конца мономера CR1, способной связывать максимально широкий спектр дериватов представителей разных семейств этого LINE, не позволило нам выявить сигналы в составе латеральных петель. Таким образом, далеко не все типы рассеянных повторяющихся элементов на ламповых щётках участвуют в образовании петель.

Аналогичные результаты получены и при сравнении локализации охарактеризованных tandemных повторов на ламповых щётках. Собственно центромерные последовательности у разных видов птиц, даже составляющие существенную долю в геноме, такие как FCP у зяблика, не

образуют латеральных петель. Они формируют компактные хромеры, прилегающие к центромерной белковой грануле или белковому телу и участвуют в организации бивалентов в пространстве растущего ядра ооцита. Эти последовательности имеют высокий уровень консерватизма, как в пределах особи, так и в пределах вида. Интересно, что у курицы центромерный сателлит GGSAT (*EcoRI*) сформировал дополнительные протяженные поля тандемных повторов на гоносоме W, хотя эти дериваты несут вырожденный CENP-бокс, имеют более высокий уровень дивергенции и не участвуют в формировании центромеры. На метафазных хромосомах они образуют крупные блоки гетерохроматина, которые сохраняют компактную упаковку и в интерфазе [112]. На стадии ламповых щёток оба блока плотно упакованы, составляя первый, а также часть пятого хромера (Рис. 2), эти последовательности не обнаруживаются в составе латеральных петель. Сходным образом ведет себя сателлит GG*XhoI*, формирующий крупный блок гетерохроматина на длинном плече хромосомы W, который занимает полностью самой большой по размеру третий хромер этой хромосомы, не участвуя в образовании петель. Другой тип организации в соматических клетках демонстрируют повторяющиеся элементы GG*SspI* и (GGAAA)*n*, которые транскрибируются в интерфазе и имеют более доступную упаковку в метафазе, чем описанные выше сателлиты GGSAT и GG*XhoI*. Однако на стадии ламповых щёток они также имеют плотную упаковку и не входят в состав боковых петель, демонстрируя сходство с кодирующими последовательностями, что может объясняться функциональным значением транскриптов этих элементов и косвенно объяснять высокий уровень консерватизма их мономеров.

Глава завершается характеристикой последовательностей, входящих в состав латеральных петель на ламповых щётках. Они представлены видоспецифичными повторяющимися элементами, характеризующимися наиболее высоким уровнем дивергенции. К ним относятся тандемные повторы, в том числе, организованные в HOR в составе гетерохроматиновых районов хромосом, а также диспергированные повторяющиеся элементы генома, преимущественно локализующиеся в районах с умеренным содержанием генов. Это подтверждает высказывавшиеся ранее предположения о том, что у птиц на стадии ламповых щёток петли формируются в районах C-блоков (конститутивного гетерохроматина), а также G-бэндов хромосом [99, 113, 114]. Такое распределение последовательностей в составе ламповых щёток хорошо объясняет сделанный ранее вывод о том, что их обогащенные генами хромеры не тождественны плотно упакованным в составе розеток районам метафазных хромосом [51]. Современные данные полностью подтвердили эти предположения и нашли им объяснение.

Исследователи ламповых щёток у разных организмов отмечают корреляцию между размерами геномов, а также характером распределения и размерами боковых петель [14, 22], что свидетельствует о существовании общих принципов их формирования. На примере исследованных представителей птиц наиболее монотонную структуру петель на стадии ламповых щёток демонстрируют хромосомы японского перепела [51, 113]. Помимо большого размера генома, новые данные о составе и особенностях организации повторяющихся элементов у этого вида хорошо объясняют такую морфологическую особенность.

У представителей Воробьинообразных распределение петель на ламповых щётках носит более разнообразный характер, наибольшая представленность выраженных латеральных петель отмечается на хромосоме GRC, обогащенной повторяющимися элементами генома. В то же время трудно говорить о неразборчивой транскрипции, т.к. индивидуальные хромосомы демонстрируют строго определенную видоспецифичную морфологию латеральных петель.

Вопрос о том, каково значение формирования в превителлогенных ооцитах, находящихся в состоянии сниженной биохимической активности длительное время, петель ДНК, поддерживающих характерную расправленную морфологию за счет огромного числа плотно связанных с ДНК матрицей РНК транскриптов, является основным, требующим понимания. Сейчас, достигнув успеха в изучении нуклеотидного состава последовательностей, входящих и не входящих в состав боковых петель, мы, наконец, приближаемся к пониманию ответов на вопросы о том, какова может быть судьба транскриптов и какие механизмы лежат в основе процессов, приводящих к преобразованию хромосом в ламповые щётки. Участки генома птиц, которые входят в состав латеральных петель, не могут служить для формирования запасов белков на стадии вителлогенеза. Эти данные противоречат существовавшим ранее представлениям о состоянии повышенной транскрипционной активности генов для запасания матричных РНК.

Большинство идентифицированных в составе боковых петель последовательностей не являются кодирующими, в соматических клетках они плотно упакованы, и, либо не имеют собственных промоторных районов, либо имеют очень высокую степень метилирования таких районов в подавляющем большинстве клеток. Формирование транскрипционных единиц с участием РНК-полимеразы II в подавляющем большинстве латеральных петель может осуществляться с промоторов рассеянных мобильных элементов, таких как LTR [102]. В соматических клетках они инактивированы за счет эпигенетических изменений хроматина, т.к. их деятельность может привести к неконтролируемым изменениям в геноме. Активация транскрипции таких последовательностей в гаметогенезе может

быть следствием резкого снижения уровня метилирования ДНК и необходимо для обеспечения точного синапсиса гомологов. Однако, активность транспозонов в половых клетках может приводить к необратимым нарушениям программы развития, несовместимым с выживанием эмбрионов. За период продолжительной диктиотены в оогенезе птиц, неконтролируемые мобильные элементы могли бы существенно изменять наследственную информацию будущей гаметы, однако таких последствий мы не наблюдаем. Ценность каждой яйцеклетки у птиц достаточно велика в связи с высокими энергетическими затратами организма на их производство, давление эволюционного отбора должно способствовать созданию механизмов, направленных на предотвращение их неоправданных потерь.

Глава «Гипотеза заблокированной транскрипции» начинается с пересмотра существующих представлений о процессе транскрипции в оогенезе. Сумма всех имеющихся на сегодняшний день фактов позволила по-новому взглянуть на сам феномен ламповых щёток и сформулировать гипотезу заблокированной транскрипции, согласно которой формирование характерных для ламповых щёток латеральных петель за счет морфологически выраженных транскрипционных единиц с плотно расположенными вдоль оси матричной нити ДНК полимеразных комплексов, является результатом блокировки транскрипции уже соединенных с матрицей полимеразных комплексов на этапе ее терминации. Уникальность этого явления связана с тем, что, в отличие от характерной для эукариотической клетки высоко скоординированной регуляции инициации, элонгации и терминации транскрипции, на стадии ламповых щёток происходит независимая блокировка терминации, тогда как инициация транскрипции и способность к элонгации сохраняются в активном состоянии. Благодаря особенностям работы РНК-полимеразы, транскрипты остаются прочно связанными с ДНК матрицей и не могут ее покинуть, что мы и наблюдаем в составе латеральных петель, формирующих хорошо выраженные поляризованные транскрипционные единицы. Снятие блока приводит к тому, что комплексы начинают быстро завершать транскрипцию и покидают петлю, приводя к ее коллапсу, т.к. ДНК ось петли утрачивает опору и восстанавливает свою упаковку. При переходе к стадии большого роста происходит одновременное изменение степени активности промотора и удаление блока транскрипции, в результате чего завершившие синтез полимеразные комплексы покидают петлю и хроматин компактизуется.

Пересмотр функционального значения преобразования хромосом в ламповые щётки позволил по-новому взглянуть на некоторые существовавшие противоречия и найти им объяснение. Формирование развитых латеральных петель на хромосомах в ядрах сперматоцитов

первого порядка и их появление задолго до начала созревания ооцита не может найти объяснения в рамках выдвинутых ранее гипотез и противоречит идее о формировании запаса мРНК для последующего синтеза белков. Если же рассматривать активацию промоторов как следствие удаления эпигенетических маркеров сайленсинга в районах гетерохроматина, то все описанные факты присутствия ламповых щёток у представителей самых разных видов находят объяснение. Более того, это заставляет предположить существование подобной стадии в гаметогенезе всех видов многоклеточных организмов и у одноклеточных со сложным жизненным циклом.

Анализ спектра последовательностей на боковых петлях ламповых щёток у птиц свидетельствует о том, что эти транскрипты могут служить источником коротких регуляторных РНК, необходимых для формирования гетерохроматина на ранних стадиях эмбриогенеза. Гипотеза заблокированной транскрипции связывает стадию ламповых щёток с процессом ремоделирования хроматина, а также с тем, что транскрипты могут играть важную регуляторную роль в раннем развитии, в том числе выступая в качестве гидов для направленного сайленсинга потенциально функциональных мобильных элементов генома. Она позволяет понять реализацию еще одного парадоксального явления, а именно: сохранения в ходе мейотического деления информации о последовательностях, которые необходимо инактивировать после того, как вся эпигенетическая информация удалена. Этот феномен присущ самым разным многоклеточным организмам, от растений до млекопитающих. Он также лежит в основе дифференциальной исчерченности хромосом и может дать ключ к пониманию закономерностей ее возникновения, поддержания и наследования в ряду поколений.

В завершении работы обсуждается теоретическое значение гипотезы заблокированной транскрипции. Подчеркнуто, что выдвинутая новая гипотеза имеет фундаментальное значение с точки зрения понимания механизмов репрограммирования генома для реализации программы развития с одновременным сохранением информации о последовательностях, требующих инактивации. Она интерпретирует феномен преобразования хромосом в ламповые щётки в диплотене профазы первого деления мейоза с формированием латеральных петель с точки зрения процесса, происходящего в результате удаления всех эпигенетических маркеров генома и последующей блокировки транскрипции на этапе терминации. Такая роль этого явления в онтогенезе объясняет его широкое распространение в природе и предполагает открытие в будущем аналогичной стадии практически у всех многоклеточных живых организмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дальнейшее развитие исследований феномена ламповых щёток может иметь фундаментальное значение, так как его широкое распространение у многоклеточных организмов и роль в ремоделировании и эпигенетическом перепрограммировании генома многоклеточных организмов позволяет приблизиться к пониманию механизмов регулирования активности генов от полностью тотипотентного состояния в зиготе к терминальной дифференцировке в конкретных тканях и органах, возникающей в ходе реализации программы развития в онтогенезе, а также механизмам сохранения эпигенетической информации в ряду поколений у самых разных организмов.

Ядерные транскрипты, формирующиеся на боковых петлях ламповых щёток могут иметь важное значение для формирования молекулярных предпосылок ремоделирования хроматина в ходе ранних этапов эмбриогенеза, закладывая определенный паттерн мишеней для метилирования. Роль такой системы передачи наследственной информации увеличивается по мере усложнения программы развития и увеличения размера генома, а у наземных позвоночных лежит в основе дополнительных уровней регуляции активности генов и может являться основным инструментом передачи информации о дифференциальном характере компактизации хроматина в ряду поколений. Реализация такой передачи информации приобретает особое значение из-за необходимости удаления эпигенетической маркировки в ходе ранних этапов профазы мейоза и последующей дополнительной пассивной потери метилирования в период быстрых делений дробления.

Помимо очевидного фундаментального значения, дальнейшие исследования функционирования хромосом на стадии ламповых щёток могут иметь практическое значение для понимания механизмов и последствий сокращения периода поддержания латеральных петель на стадии диктиотены у плацентарных млекопитающих. Прикладные аспекты развития этой тематики могут иметь продолжение в изучении роли ламповых щёток в гаметогенезе и последствий нарушений их формирования для передачи эпигенетической информации, а также возникновения болезней импринтинга. Результаты таких исследований могут в дальнейшем найти применение в репродуктивной медицине.

ВЫВОДЫ:

1. Представители класса Птицы с относительно небольшими и хорошо изученными геномами, а также доступностью для исследования на разных этапах онтогенеза, позволили установить ключевые молекулярные характеристики боковых петель хромосом на стадии ламповых щёток.

2. Наиболее консервативные участки генома птиц на стадии ламповых щёток компактно упакованы в составе хромомеров.

3. Формирование латеральных петель на ламповых щётках происходит в участках генома, в норме в соматических клетках сохраняющих высокий уровень компактизации на протяжении всего клеточного цикла.

4. Последовательности в составе латеральных петель представлены различными классами варьируемых повторяющихся элементов генома, в том числе составляющих районы «молодого гетерохроматина».

5. Расправленные транскрипционные единицы в виде петель с плотно расположенными вдоль оси матричной нити РНК-полимеразными комплексами могут являться следствием невозможности завершения транскрипции.

6. Завершение стадии ламповых щёток сопровождается втягиванием петель, которое происходит в результате разблокировки транскрипции и освобождения транскриптов непосредственно перед завершением первого деления мейоза.

7. Сформулированная гипотеза заблокированной транскрипции объясняет все существующие в рамках ранее высказанных гипотез противоречия и обосновывает фундаментальность и широкое распространение в природе феномена преобразования хромосом в ламповые щётки.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из перечня ВАК и реферируемых изданиях

1. Сайфитдинова А.Ф., Галкина С.А., Гагинская Е.Р. Эволюция представлений о биологическом значении феномена хромосом типа ламповых щёток // Генетика. 2021. Т. 57. № 5. С. 491-507.

2. Davidian, A., Koshel, E., Dyomin, A. Galkina S., Saifitdinova A., Gaginskaya E. On some structural and evolutionary aspects of rDNA amplification in oogenesis of *Trachemys scripta* turtles. Cell Tissue Research. 2021. V.383. P. 853–864.

3. Пуппо И.Л., Сайфитдинова А.Ф., Тонян З.Н. Роль сателлитной ДНК в возникновении структурных перестроек в кариотипе человека // Генетика. 2020. Т. 56. № 1. С. 47–54.

4. Dyomin A., Galkina S., Fillon V., Cauet S., Lopez-Roques C., Rodde N., Klopp C., Vignal A., Sokolovskaya A., Saifitdinova A., Gaginskaya E. Structure of the intergenic spacers in chicken ribosomal DNA // Genetics Selection Evolution. 2019. V.51 № 59. doi:10.1186/s12711-019-0501-7

5. Kulak M., Galkina S., **Saifitdinova A.**, Gaginskaya E. Establishment of primary cell lines from tissues of the red-eared slider // *Biological Communications*. 2019. V. 64. № 4. P. 229–234.
6. Torgasheva A.A., Malinovskaya L.P., Zadesenets K.S., Karamysheva T.V., Kizilova E.A., Akberdina E.A., Pristiyazhnyuk I.E., Shnaider E.P., Volodkina V.A., **Saifitdinova A.F.**, Galkina S.A., Larkin D.M., Rubtsov N.B., Borodin P.M. Germline-restricted chromosome (GRC) is widespread among songbirds // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2019. V. 116. № 24. P. 11845-11850.
7. Lisachov A.P., Galkina S.A., **Saifitdinova A.F.**, Romanenko S.A., Andreyushkova D.A., Trifonov V.A., Borodin P.M. Identification of sex chromosomes in *Eremias velox* (Lacertidae, Reptilia) using lampbrush chromosome analysis // *Comparative Cytogenetics*. 2019. V. 13. № 2. P. 121–132.
8. Komissarov A.S., Galkina S.A., Koshel E.I., Kulak M.M., Dyomin A.G., O'Brien S.J., Gaginskaya E.R., **Saifitdinova A.F.** New high copy tandem repeat in the content of the chicken W chromosome // *Chromosoma*. 2018. V.127. № 1. P.73–83.
9. **Saifitdinova A.**, Koshel E., Vishnevskaya M., Galkina S. Celebrating the Jubilee of Elena Gaginskaya — the founder of the Lampbrushology School in Saint Petersburg University // *Biological Communications*. 2017. T. 62. № 3. C.159-164.
10. **Saifitdinova A.**, Galkina S., Volodkina V., Gaginskaya E. Preparation of lampbrush chromosomes dissected from avian and reptilian growing oocytes // *Biological Communications*. 2017. T. 62, № 3. C. 165-168.
11. Давидьян А.Г., Кошель Е.И., Лаврова О.Б., Демин А.Г., Галкина С.А., **Сайфитдинова А.Ф.**, Гагинская Е.Р. Функциональные особенности ядрышкового организатора в растущих ооцитах неполовозрелых самок птиц // *Онтогенез*. 2017. Т.48, № 3, С.263–269.
12. Dyomin A., Volodkina V., Koshel E., Galkina S., **Saifitdinova A.**, Gaginskaya E. Evolution of ribosomal internal transcribed spacers in Deuterostomia // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2017. V.116. P.87–96.
13. Galkina S., Fillon V., **Saifitdinova A.**, Daks A., Kulak M., Dyomin A., Koshel E., Gaginskaya E.R. Chicken Microchromosomes in the Lampbrush Phase: A Cytogenetic Description // *Cytogenetic and Genome Research*. 2017. V.152. № 1. P.46-54.
14. Koshel E., Galkina S., **Saifitdinova A.**, Dyomin A., Deryusheva S., Gaginskaya E. Ribosomal RNA gene functioning in avian oogenesis // *Cell and Tissue Research*. 2016. V.366. № 3, P.533–542. DOI: 10.1007/s00441-016-2444-4.
15. Dyomin A.G., Koshel E.I., Kiselev A.M., **Saifitdinova A.F.**, Galkina S.A., Fukagawa T., Kostareva A.A., Gaginskaya E.R. Chicken rRNA Gene Cluster Structure // *PLoS ONE*. 2016. V.11 № 6. e0157464. doi:10.1371/journal.pone.0157464.

16. Сайфитдинова А.Ф., Галкина С.А., Кошель Е.И., Гагинская Е.Р. Роль повторяющихся последовательностей в эволюции половых хромосом у птиц. // Цитология. 2016. Т. 58 №5. С. 393–398.
17. Deryusheva S., Kurganova A., Krasikova A., Saifitdinova A., Habermann F., Gaginskaya E. Precise identification of chicken chromosomes in the lampbrush form using chromosome painting probes // Chromosome Research. 2003. V.11. P.749-757.
18. Saifitdinova A., Derjusheva S., Krasikova A., Gaginskaya E. Lampbrush chromosomes of the chaffinch (*Fringilla coelebs* L.) // Chromosome Research. 2003. V.11. P. 99-113.

Основные статьи в журналах и сборниках научных трудов, материалы конференций

1. Сайфитдинова А. Ф., Галкина С. А., Гагинская Е. Р. Методика приготовления препаратов хромосом – ламповых щеток из ооцитов птиц и рептилий // Научный парк СПбГУ: биомедицина, экология, природопользование. СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2020. – С. 67-72. ISBN 978-5-288-06026-7.
2. Большакова Е.В., Сайфитдинова А.Ф. Поиск генов-кандидатов на роль мишеней регуляции половой дифференцировки у курицы // Гены & Клетки. 2020. Т.15 № 3. Приложение. С. 127.
3. Жукова А.А., Володькина В.А., Демин А.Г., Кулак М.М., Павлова О.А., Галкина С.А., Сайфитдинова А.Ф. Кластер генов рРНК у японского перепела (*Coturnix japonica*) // Гены & Клетки. 2020. Т.15 № 3, Приложение. С. 133-134.
4. Большакова Е.В., Сайфитдинова А.Ф. Локализация тандемного повтора (GGAAA)_n в геноме курицы // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Генетика, селекция и биотехнология животных: на пути к совершенству». – Пушкин : ВНИИГРЖ, 2020. С. 54.
5. Жукова А.А., Галкина С.А., Комиссаров А.С., Сайфитдинова А.Ф. Определение последовательности кластера рДНК у японского перепела // Сборник тезисов XII Международной школы молодых ученых «Системная Биология и Биоинформатика». 2020. С. 75.
6. Saifitdinova A., Galkina S., Kulak M., Fillon V., Volodkina V., Pavlova O., Gaginskaya E. Nucleolus organizers transposition in the genome of Japanese quail // Molecular Cytogenetics. 2019. V.12. № 30. P.63. doi: 10.1186/s13039-019-0439-z.
7. Kulak M., Komissarov A., Dyomin A., Fillon V., Gaginskaya E., Saifitdinova A., Galkina S. Description of new tandem repeats in the genome of Japanese quail // Molecular Cytogenetics. 2019. V.1. № 30. P.63. doi: 10.1186/s13039-019-0439-z.
8. Сайфитдинова А.Ф. Биологическое значение феномена хромосом типа ламповых щеток // Сборник тезисов VII съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ». 2019. С. 702.

9. Кулак М.М., Комиссаров А.С., Демин А.Г., Фийон В., **Сайфитдинова А.Ф.**, Павлова О.А., Гагинская Е.Р., Галкина С.А. Гетерохроматиновые районы в хромосомах японского перепела // Сборник тезисов VII съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ». 2019. С. 975.
10. Галкина С.А., **Сайфитдинова А.Ф.**, Комиссаров А.С., Кулак М.М., Володькина В.А., Гагинская Е.Р. Молекулярные основы классических признаков у кур: факты и гипотезы // Сборник тезисов VII съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ». 2019. С. 313.
11. **Saifitdinova A.**, Galkina S., Kulak M., Fillon V., Volodkina V., Pavlova O., Gaginskaya E. The dispersal of ribosomal gene sequences in the karyotype of *Coturnix japonica* // Biopolymers and Cell. 2019. V 35, № 3. P. 229-230.
12. Volodkina V., **Saifitdinova A.**, Kulak M., Koshel E., Galkina S., Gaginskaya E. Organization of zebra finch oocyte nucleus // Biopolymers and Cell. 2019. V 35, №3. P. 241-242.
13. Соколовская А.А., Демин А.Г., **Сайфитдинова А.Ф.**, Галкина С.А., Гагинская Е.Р. Оценка копийности кластера рРНК-генов в геномах модельных объектов – представителей группы Sauropsida // Сборник тезисов XVIII Всероссийского симпозиума с международным участием «Структура и функции клеточного ядра». 2018. С. 54-55.
14. **Сайфитдинова А.Ф.**, Галкина С.А., Кулак М.М. Загадка транскрипции на латеральных петлях хромосом типа ламповых щеток птиц // Материалы международной конференции «Хромосома 2018». 2018. С. 173-174.
15. **Saifitdinova A.F.** Breakthrough in understanding the phenomenon of lampbrush chromosomes // Comparative Cytogenetics. 2018. V. 12 № 3, P. 327-328.
16. Kulak M., Dyomin A., Komissarov A., Fillon V., **Saifitdinova A.**, Pavlova O., Gaginskaya E., Galkina S. New pericentromeric repeat identified in the genome of Japanese quail // Comparative Cytogenetics. 2018. V. 12 № 3, P. 337-338.
17. Volodkina V., Kulak M., Komissarov A., Galkina S., Gaginskaya E., **Saifitdinova A.** Chicken tandem repeats Ggal10 and Ggal20 are specific to different microchromosomes // Comparative Cytogenetics. 2018. V. 12 № 3, P. 357-358.
18. **Saifitdinova A.**, Galkina S., Kulak M., Koshel E., Dyomin A., Chetverikova R., Komissarov A., O'brien S.J., Gaginskaya E. Filling in the gaps in the chicken sex W chromosome map // Molecular Cytogenetics. 2017. V.10. Supplement № 1. P.62.
19. Kulak M., Galkina S., **Saifitdinova A.**, Larkin D., Damas J., Farre M., Griffin D., O'Connor R., Komissarov A., Gaginskaya E. The Japanese quail genome a cytogenetic revision // Molecular Cytogenetics. 2017. V.10 Supplement № 1 P.66.
20. Galkina S., Kulak M., **Saifitdinova A.**, Komissarov A., Dyomin A., Volodkina V., Damas J., Farre M., Griffin D., Larkin D., Gaginskaya E. *In situ* and *in silico* improvement of the Japanese quail genome assembly. // Proceedings

- of the 36th International Conference on Animal Genetics, Dublin, Ireland. 2017. P.13.
21. **Saifitdinova A.**, Galkina S., Dyomin A., Kulak M., Koshel E., Gaginskaya E. Addition to the chicken W-chromosome specific repetitive landscape // Proceedings of the 36th International Conference on Animal Genetics, Dublin, Ireland. 2017. P.70.
22. **Сайфитдинова А.Ф.**, Комиссаров А.С., Галкина С.А., Кошель Е.И., Кулак М.М., Дёмин А.Г., Гагинская Е.Р. Роль повторяющихся последовательностей в эволюции половых хромосом у птиц // Сборник тезисов Всероссийской конференции с международным участием «50 лет ВОГиС: успехи и перспективы». 2016. С. 276.
23. Galkina S., **Saifitdinova A.**, Gaginskaya E. Avian lampbrush chromosomes: a powerful tool for exploration of genome structure and expression // Chromosome Research. 2016. V.24, Supplement № 1. P.35.
24. **Saifitdinova A.**, Komissarov A., Galkina S., Koshel E., Kulak M., Demin A., O'Brien S.J., Gaginskaya E. Sex chromosome specific repeats in the chicken genome // Chromosome Research. 2016. V.24, Supplement № 1. P.36.
25. **Сайфитдинова А.Ф.**, Галкина С.А., Гагинская Е.Р. Роль повторяющихся элементов генома в эволюции половых хромосом птиц // Природные и культурные ресурсы в экосистемах Петергофа: Колл. монография. Под ред. Д.В. Осипова, Д. Ю.Власова. – СПб.: Изд-во ВВМ, 2016. – С.107-120. ISBN978-5-9651-1015-5
26. Davidian A., Koshel E., Dyomin A., **Saifitdinova A.**, Gaginskaya E. Nucleolus-containing and nucleolus depleted growing oocytes can be revealed in the ovary of juvenile chickens // Proceedings of the 12th International Congress of Cell Biology. 2016. P.237.
27. **Saifitdinova A.F.**, Komissarov A.S., Galkina S.A. Koshel E.I., Kulak M.M., O'Brien S.J., Gaginskaya E.R.. A novel chicken W chromosome specific tandem repeat // International Journal of Bioengineering and Life Sciences. 2015. V.2. № 9. P. 1923.
28. **Сайфитдинова А.Ф.**, Комиссаров А.С., Галкина С.А., Кошель Е.И., Кулак М.М., О'Брайен С.Д., Гагинская Е.Р. Характеристика нового тандемного повтора в составе W хромосомы домашней курицы // Материалы международной конференции Хромосома. 2015. С.153-154
29. Stepanov A., Galkina S., Bogomaz D., Gaginskaya E., **Saifitdinova A.** Modified Synthesis of 6-carboxyfluorescein (6-FAM): Application to Probe Labeling for Conventional Cytogenetics // British Journal of Applied Science & Technology. 2015. V.7 №4, P.423-428.
30. **Saifitdinova A.**, Galkina S., Bogomaz D., Radaev A., Gaginskaya E.. Application of directly labeled synthetic oligonucleotides specially designed as probes for fluorescent *in situ* hybridization // Book of abstracts of the Advanced Microscopy Meeting «Super-resolution in different dimensions». 2015. P.79.
31. **Сайфитдинова А.Ф.** Значение транскрипции некодирующих элементов генома в ходе гаметогенеза у позвоночных // Цитология. 2014. Т. 56 № 9. С. 678-679.

32. **Saifitdinova A.**, Daks A., Fillon V., Gaginskaya E., Galkina S. Cytogenic description of chicken microchromosomes at the lampbrush phase. // *Chromosome Research*. 2014. V.22, № 3, P. 411-412.
33. **Сайфитдинова А.Ф.** Транскрипция ядерного генома в ходе гаметогенеза участвует в обеспечении изменчивости наследственной информации. // Сборник тезисов VIII ежегодной молодежной экологической Школы-конференции «Современные проблемы сохранения биоразнообразия естественных и трансформированных экосистем». 2013. С. 122-123.
34. **Сайфитдинова А.Ф.** Транскрипция ядерного генома в ходе проэмбрионального развития позвоночных // Сборник тезисов Всероссийской конференции с международным участием «Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция» (к 135-летию со дня рождения П.П.Иванова). 2013. С. 80.
35. **Saifitdinova A.**, Kulikova T., Gaginskaya E. A new approach to investigation transcription on lampbrush chromosomes // *Chromosome Research*, 2004. V.12. Supplement №1. P. 148-149.
36. **Saifitdinova A.**, Derjusheva S., Gaginskaya E. Chaffinch meiotic chromosomes in the lampbrush form: cytogenetic and molecular study // *Annales de genetique*. 2001. V.44. Supplement №1. P.124.

Учебники и учебно-методические пособия

1. **Сайфитдинова А.Ф.**, Пуппо И.Л. Флуоресцентная *in situ* гибридизация в практике научных и клинических цитогенетических исследований (для студентов биологических и медицинских факультетов университетов). – СПб.: Изд-во РГПУ им. А. И. Герцена, 2021. – 60 с. ISBN 978-5-8064-2984-2
2. **Сайфитдинова А.Ф.** Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов. Учебно-методическое пособие. – СПб.: Свое издательство, 2014. – 110 с. ISBN 978-5-4386-0577-5

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Богданов, Коломиец // Синаптономный комплекс – индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом. – 2007. – 358 с. [2] Богданов, Гришаева // Консерватизм, изменчивость и эволюция мейоза. – 2020. – 345 с. [3] Walters // *Chromosoma*. –1970. – V. 29. – I. 4. – P. 375-418. [4] Church // *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. – 1972. – V. 14. – P. 397-401. [5] Goldstein, Slaton // *Chromosoma*. – 1982. – V. 84. – P. 585-597. [6] Калинина // *Цитология*. – 1986. – Т.28. – С. 1061-1067. [7] Woglar, Jantsch // *Chromosoma*. – 2014. – V. 123. – P. 15-24. [8] Link, Jantsch // *Chromosoma*. – 2019. – V. 128. – P. 317-330. [9] Богданов // В кн.: *Цитология и генетика мейоза*. –1975. – С. 58-95. [10] Rasmussen, Holm // *Hereditas*. – 1980. – V. 93. – P. 187-216. [11] Gall et al. // *Methods in Cell Biology*. – 1991. – V. 36. – P. 149-166. [12] Gall // *Chromosome Research*. – 2012. – V. 20. – P. 905-910. [13] Чинь и др. // *Онтогенез*. – 1979. – Т. 107. – С. 340-349. [14] Callan // *Lampbrush chromosomes /* – 1986. – 254 p. [15] Macgregor // *Symposia of the Society for Experimental Biology*. – 1984. – V. 38. – P. 333-347. [16] Macgregor // *Chromosome Research*. – 2012. – V. 20. – P. 911-924. [17] Galkina et al. // *Genetica*. – 2006. – V. 128. – P. 241-251. [18] Gaginskaya et al. // *Cytogenetic and Genome Research*. – 2009. – V. 124. – P. 251-267. [19] Гагинская, Грузова // *Цитология*. – 1969. – Т. 11. – С. 1241-1251. [20] Дэвидсон // *Действие генов в раннем развитии /* – 1972. – 344 с. [21] Босток, Самнер // *Хромосома эукариотической клетки*. – 1981. – 600 с. [22] Гагинская // *Цитология*. – 1989. – Т. 31. – С. 1267-1291. [23] Красикова, Куликова // *Хромосомы типа ламповых щёток: современные представления и перспективы исследований*. – 2020. – 104 с. [24] Lefèvre et al. // *Biological Journal of the Linnean Society*. – 2014. – V. 113. – P. 790-804. [25] Romanov et al. // *BMC Genomics*. – 2014. – V. 15. – P. 1060. [26] O'Connor et al. // *Nature Communications*. – 2018. – V. 9: 1883. [27] Stern // *Mechanisms of Development*. – 2004. – V. 121. – P. 1011-1013. [28] Hamburger, Hamilton // *Journal of Morphology*. – 1951. – V. 88. – P. 42-92. [29] Reese, Reese // *Journal of the*

experimental analysis of behavior. – 1962. – V. 5. – P. 265-270. [30] Zann // The Zebra Finch – A synthesis of field and laboratory studies. – 1996. – P. 335. [31] Ainsworth et al. // Journal of Anatomy. – 2010. – V. 216. – P. 3-15. [32] Mak et al. // Genesis. – 2015. – V. 53. – P. 669-677. [33] Gilbert et al. // Journal of Reproduction and Fertility. – 1977. – V. 50. – P. 179-181. [34] Гагинская, Чинь // Онтогенез. – 1980. – Т. 11. – С. 213-221. [35] Kinsky // Journal of Ornithology. – 1971. – V. 112. – P. 334-357. [36] Schmid et al. // Cytogenetics and Genome Research. – 2015. – V. 145. – P. 78-179. [37] Ladjali-Mohammed et al. // Cytogenetics and Cell Genetics. – 1999. – V. 86. – P. 271-276. [38] Masabanda et al. // Genetics. – 2004. – V. 166. – P. 1367-1373. [39] Zhou et al. // Science. – 2014. – V. 346. – P. 1246338-1-1246338-8. [40] Graves // Cytogenetics and Genome Research. – 2003. – V. 101. – P. 278-282. [41] Bellott et al. // Nature Genetics. – 2017. – V. 49. – P. 387-394. [42] Ren et al. // Genome Research. – 2003. – V. 13. – P. 2754-2758. [43] Lawal et al. // Frontiers in Genetics. – 2018. – V. 9. [44] Hillier et al. // Nature. – 2004. – V. 432. – P. 695-716. [45] Szarski // International Review of Cytology. – 1976. – V. 44. – P. 93-111. [46] Tiersch et al. // Cytometry. – 1989. – V. 10. – P. 706-710. [47] Schmid et al. // Cytogenetics and Cell Genetics. – 2000. – V. 90. – P. 169-218. [48] Gregory // Animal Genome Size Database [Электронный ресурс]. – 2019. [49] Kasai et al. // Biology Letters. – 2012. – V. 8. – P. 631-635. [50] Zhang et al. // Science. – 2014. – V. 346. – P. 1311-1320. [51] Гагинская // Функциональная морфология хромосом в оогенезе птиц: дис. ... д-ра биол. наук. – 1989. – 335 с. [52] Kulikova et al. // Chromosoma. – 2016. – V. 125. – P. 709-724. [53] Miller // National Cancer Institute Monographs. – 1965. – V. 18. – P. 79-99. [54] Scheer et al. // Journal of Cell Biology. – 1976. – V. 69. – P. 465-489. [55] Гагинская и Цветков // Цитология. – 1988. – Т. 30. – С. 142-150. [56] Solovei et al. // Chromosome Research. – 1993. – P. 153-166. [57] Damas et al. // Genome Research. – 2017. – V. 27. – P. 875-884. [58] Solinhac et al. // BMC Genomics. – 2010. – V. 11. – P. 616. [59] Abe, Gemmell // BMC Genomics. – 2014. – V. 15:900. [60] Deryusheva et al. // Chromosoma. – 2007. – V. 116. – P. 519-530. [61] Cui et al. // Genome Biology. – 2014. – V. 15. – P. 539. [62] Wicker et al. // Nature Reviews Genetics. – 2007. – V. 8. – P. 973-982. [63] Kapusta, Suh // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2017. – V. 1389. – P. 164-185. [64] Weissensteiner, Suh // In: Avian Genomics in Ecology and Evolution. – 2019. – P. 93-150. [65] Wallis et al. // Nature. – 2004. – V. 432. – P. 793-800. [66] Guizard et al. // BMC Genomics. – 2016. – V. 17. – P. 659. [67] Haas et al. // Gene. – 1997. – V. 197. – P. 305-309. [68] Watanabe et al. // Gene. – 2006. – V. 365. – P. 57-66. [69] Treplin et al. // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2007. – V. 43. – P. 328-337. [70] Warren et al. // G3 (Bethesda). – 2017. – V. 7. – P. 109-117. [71] Morris et al. // BMC Biology. – 2020. – V. 18. – N 14. [72] Burch et al. // PNAS. – 1993. – V. 90. – P. 8199-8203. [73] Wicker et al. // Genome Research. – 2005. – V. 15. – P. 126-136. [74] Reitman et al. // Genomics. – 1993. – V. 18. – P. 616-626. [75] Wallén et al. // Biochimica et Biophysica Acta. – 1996. – V. 1308. – P. 193-196. [76] Coullin et al. // Chromosome Research. – 2005. – V. 13. – P. 665-673. [77] Liu et al. // Genome Biology and Evolution. – 2009. – V. 1. – P. 119-130. [78] Schmid, Guttentuch // Chromosoma. – 1988. – V. 97. – P. 101-114. [79] Сингер, Берг // Гены и геномы. – 1998. – 764 с. [80] Arnheim et al. // PNAS. – 1980. – V. 77. – P. 7323-7327. [81] Gerbault-Seureau et al. // Cytogenetic and genome research. – 2017. – V. 153. – P. 138-146. [82] Delany, Krupkin // Genome. – 1999. – V. 42. – P. 60-71. [83] Piégu et al. // Genomics. – 2020. – V. 112. – P. 1660-1673. [84] Gonzalez, Sylvester // Chromosoma. – 1997. – V. 105. – P. 431-437. [85] Schmid et al. // Chromosoma. – 1982. – V. 86. – P. 149-179. [86] Gunski et al. // Cytogenetic and Genome Research. – 2019. – V. 158. – P. 152-159. [87] Macgregor // Biological Reviews. – 1972. – V. 47. – P. 177-210. [88] Macgregor, del Pino // Chromosoma. – 1982. – V. 85. – P. 475-488. [89] Kuznetsova et al. // Frontiers in Genetics. – 2014. – V. 5: 223. [90] Wellauer, et al. // Cell. – 1978. – V. 14. – P. 269-278. [91] Dutrillaux et al. // Cytogenetic and genome research. – 2016. – V. 149. – P. 304-311. [92] Graphodatsky et al. // Atlas of mammalian chromosomes. – 2020. – 1008 p. [93] Cooper et al. // Seminars in Developmental Biology. – 1993. – V. 4. – P. 117-128. [94] Stitou et al. // Chromosome Research. – 2000. – V. 8. – P. 277-283. [95] McPherson et al. // Chromosome Research. – 2014. – V. 22. – P. 71-83. [96] Henderson et al. // Chromosoma. – 1976. – V. 59. – P. 147-155. [97] Nirchio et al. // Genetics and Molecular Biology. – 2007. – V. 30. – P. 25-30. [98] Buzdin et al. // FEBS Letters. – 2007. – V. 581. – P. 2877-2882. [99] Hutchison // The Journal of Cell Biology. – 1987. – V. 105. – P. 1493-1500. [100] Solovei et al. // Chromosome Research. – 1994. – V. 5. – P. 460-470. [101] Krasikova et al. // Chromosome Research. – 2006. – V. 14. – P. 777-789. [102] Deryusheva et al. // Chromosome Research. – 2004. – V. 12. – P. 715-723. [103] Красикова и др. // Генетика. – 2010. – Т. 46. – С. 1329-1334. [104] Solovei et al. // Journal of Cell Science. – 1995. – V. 108. – P. 1391-1396. [105] Solovei et al. // Chromosome Research. – 1996. – V. 4. – P. 588-603. [106] Li et al. // Gene. – 2007. – V. 387. – P. 118-125. [107] Teranishi et al. // Chromosome Research. – 2001. – V. 9. – P. 147-165. [108] Hori et al. // Chromosome Research. – 1996. – V. 4. – P. 411-426. [109] Bellott et al. // Nature. – 2010. – V. 466. – P. 612-613. [110] Родионов и др. // Бюллетень ВНИИ разведения и генетики животных. – 1987. – Вып. 95. – С. 32. [111] Тарангул и др. // Молекулярная биология. – 1989. – Т. 23. – С. 481-490. [112] Saitoh et al. // Chromosoma. – 1991. – V. 101. – P. 32-40. [113] Родионов и др. // Цитология. – 1989. – Т. 30. – С. 142-150. [114] Родионов // Генетика. – 1996. – Т. 32. – С. 597-608.