

На правах рукописи

Мудрак
Ольга Станиславовна

**Архитектура хромосом в ядре сперматозоида
человека**

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2006

Работа выполнена в Медицинской школе Восточной Вирджинии, США

Научный руководители: чл. - корр. РАН, доктор биологических наук,
Томилин Николай Викторович
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

доктор биологических наук, профессор
Заленский Андрей Олегович
Медицинская школа Восточной Вирджинии, США

Официальные
оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Михельсон Виктор Михайлович,
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

чл. - корр. РАМН, доктор биологических наук,
Баранов Владислав Сергеевич
Институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта
РАМН, Санкт-Петербург

Ведущая организация: Институт
экспериментальной медицины

Защита состоится 14 декабря 2006 года в _____ часов на заседании
диссертационного совета Д 002.230.01 при Институте цитологии РАН по
адресу: 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии
РАН.

Автореферат разослан 14 ноября 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

кандидат биологических наук
Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Регуляция генной экспрессии в интерфазных ядрах эукариотических клеток осуществляется не только на уровне индивидуальных генов и хроматина, но и на ядерном уровне, включающем перемещение локусов в ядре посредством изменения крупномасштабной структуры хроматина (Van Driel et al., 2003). Поэтому изучение геномной архитектуры (трехмерной организации генома) интерфазных ядер – одно из важнейших направлений современной клеточной биологии.

В сперматозоидах человека – генетические активности подавлены. Репрессия репликации и транскрипции обеспечивается сверхкомпактной упаковкой ДНК специфическими для сперматозоидов белками – протаминами. Несмотря на это, и в ядрах сперматозоидов обнаружены элементы геномной архитектуры, а именно: 1) каждая хромосома занимает в ядре зрелого сперматозоида ограниченный объем - хромосомную территорию (ХТ) (Brandriff, Gordon, 1992; Haaf, Ward, 1995; Zalensky et al., 1995); 2) внутриядерная локализация этих территорий неслучайна (Luetjens et al., 1999; Hazzouri et al., 2000; Tilgen et al., 2001; Zalenskaya, Zalensky, 2004; Foster et al., 2005); 3) центромеры всех хромосом сосредоточены в центре ядра и образуют компактный хромоцентр (Zalensky et al., 1993, 1995; Haaf, Ward, 1995; Hoyer-Fender et al., 2000); 4) теломеры расположены на периферии ядра, где они взаимодействуют, образуя димеры (Zalensky et al., 1995, 1997; Meyer-Ficca et al., 1998; Hazzouri et al., 2000); 5) в большинстве случаев теломерные димеры образованы за счет взаимодействий концов одной и той же хромосомы, и, следовательно, хромосомы сложены наподобие шпильки (Solov'eva et al., 2004).

Какова роль геномной архитектуры в генетически неактивном ядре сперматозоида?

Локализация теломер на ядерной мембране может быть важна для процесса оплодотворения. После проникновения сперматозоида в ооцит, периферически расположенные теломеры сперматозоида - одни из первых

районов хромосом, экспонированных к ооплазме. Показано, что деконденсация отцовского хроматина зависит от управляемого микротрубочками движения мужского пронуклеуса к женскому (Sutovsky and Schatten, 2000). Взаимодействие теломер с микротрубочками было показано для дрожжей (Ding et al., 1998; Hiraoka, 1998). Таким образом, направляемое микротрубочками движение мужского пронуклеуса к женскому, осуществляется с участием теломер. Наконец, теломерные ассоциации (Zalensky et al., 1995, 1997) могут обеспечивать сохранение территориальной организации хромосом во время их деконденсации в яйцеклетке, наблюдаемое вплоть до стадии полностью развитого пронуклеуса (Brandriff, Gordon, 1992).

В хроматине спермиев человека 85 % ДНК связаны с протаминами, а 15 % ДНК - с гистонами (Gatewood, et al., 1990). Предположительно, распределение нуклеопротаминовых и нуклеогистоновых районов неслучайно. Показано, что гистоны ассоциированы с некоторыми кодирующими последовательностями (гены акрозина, бета-глобина, IGF-2 гены), а также с некодирующими повторами (Alu, центромеры и теломеры) (Wykes, Krawetz, 2003; Zalenskaya et al., 2000). Предполагают, что специфическое распределение гистонов и протаминов внутри ядра сперматозоида важно не только для трехмерной организации, но также может нести эпигенетическую информацию, например, маркировать набор генов, вовлеченных в ранний эмбриогенез (Gatewood et al., 1987). Так, эмбрион-специфический ϵ - и γ -глобиновые гены обогащены гистонами в сперматозоиде, в то время как постнатально экспрессирующийся β -глобиновый ген обогащен протаминами (Gardiner-Garden et al., 1998).

Таким образом, реорганизация мужского генома, активация и экспрессия отцовских генов после оплодотворения и на ранних стадиях эмбриогенеза зависит от их структурной организации и пространственной упаковки в сперматозоиде. Поэтому, изучение иерархической организации хромосом в ядре сперматозоида (хромосомной архитектуры) приобретает несомненную актуальность.

Цель и задачи исследования

Цель работы заключалась в выявлении новых элементов упорядоченной геномной архитектуры, характерных для зрелого сперматозоида человека методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

Были сформулированы следующие экспериментальные задачи:

1. Проанализировать процесс декомпактизации хромосом 1, 2, 5 в искусственно деконденсированных ядрах сперматозоидов человека, моделирующий события, происходящие при оплодотворении.
2. Описать общую топологию и способ упаковки хромосом 1, 2, 5 и их плечевых доменов в искусственно деконденсированных ядрах сперматозоида человека.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Хромосомы 1, 2, 5 имеют неслучайную локализацию в ядре сперматозоида человека.
2. В пределах **XТ** хромосомы имеют конформацию шпильки: они изогнуты на 180° в области центромеры, а плечи сближены по всей длине.
3. Хромосомные изгибы локализованы неслучайно, что показано впервые в ядре сперматозоида.
4. Плечи хромосом шириной ~ 1000 нм сформированы из двух параллельных фибрилл хроматина. Каждая из фибрилл состоит из хроматиновых глобул диаметром 500 ± 70 нм, соединенных между собой более тонкими хроматиновыми нитями.

Предложена модель иерархической упаковки сперматозоидов, начиная от 500 нм хроматиновых глобул до компактной хромосомной территории.

Научная новизна работы

Впервые на сперматозоидах человека выполнена гибридизация *in situ* с хромосом-специфическими плечевыми пробками, что позволило визуализировать р- и q- плечевые домены внутри хромосомной территории.

Впервые описан процесс декомпактизации хромосом в искусственно деконденсированных ядрах сперматозоидов человека.

Впервые изучена внутренняя организация хромосомного плеча в деконденсированном сперматозоиде и, на основании полученных результатов, предложена модель организации хромосом в ядре сперматозоида, заполняющая существующий пробел между представлениями об упаковке ДНК в нуклеопротаминовые тороиды и сведениями о крупномасштабной архитектуре ДНК и хромосом в ядре.

Теоретическое и практическое значение работы

Данные о структурной организации гаплоидного генома в сперматозоидах млекопитающих позволяют предположить, что вклад сперматозоида в процесс оплодотворения и раннего эмбриогенеза не ограничивается передачей генетической информации, закодированной в отцовской ДНК. Структура хроматина и способ упаковки хромосом в сперматозоиде – эпигенетические факторы, контролирующий вышеупомянутый процессы. Полученные в работе данные вносят существенный вклад в современные представления об организации генома в сперматозоидах человека, позволяют моделировать процессы деконденсации (реактивации) мужского генома, происходящие при оплодотворении и способствуют пониманию механизмов компактизации хромосом в пространстве ядра.

Материалы диссертации могут быть включены в курсы лекций по клеточной биологии для студентов медицинских и биологических специальностей высших учебных заведений.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано статей. Материалы работы доложены и представлены на следующих научных собраниях:

Конференция «Eastern Virginia Medical School Research Day Conference Norfolk, VA (USA), October 1, 2004»

Конгресс «First International Cytogenetic and Genome Society Congress Granada (Spain), June 14-18, 2005»

Конференция «Eastern Virginia Medical School Research Day Conference Norfolk, VA (USA), October 1, 2005»

Конференция «British Andrology Society Annual Meeting on sperm function and maturation Leeds, (UK), November 15-18, 2006»

Основные положения диссертации были доложены и обсуждались на научных семинарах Лаборатории стабильности хромосом и клеточной инженерии и Лаборатории радиационной цитологии Института цитологии РАН.

Объем и структура диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающего ссылки. Материалы диссертации изложены на страницах текста и иллюстрированы рисунками.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки, использованные в работе

Сперматозоиды были получены из эякулятов 10 фертильных доноров. Средняя концентрация сперматозоидов и доля прогрессивно-подвижных форм составили $(25 \pm 2) \times 10^6$ клеток/ мл и 52 ± 2 % соответственно. Клетки во всех образцах имели нормальную морфологию ($> 30\%$ нормальных форм, по критерию ВОЗ).

Предварительные опыты не выявили существенной разницы как между образцами, полученными от разных доноров, так и между подвижной фракцией сперматозоидов, полученной методом флотации и тотальным образцом. Поэтому для большинства опытов мы использовали тотальные образцы сперматозоидов.

Подготовка клеток для FISH

Эякулят фильтровали, клетки осаждали центрифугированием (10 мин. X 4000 g), промывали 1X PBS (фосфатно-солевой буферный раствор следующего состава: 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , pH 7.1); ресуспензировали в 30%-ном глицерине/PBS и хранили при -80 °C.

В день опыта клетки размораживали, отмывали от глицерина, фиксировали 0.5%-ным раствором формальдегида в PBS (5 минут при комнатной температуре) и инкубировали в смеси 10 mM дитиотрейтола (ДТТ) и 0 - 0.5 мг/мл гепарина в 1X PBS в течение 30 минут при комнатной температуре. Гепарин ослабляет взаимодействие ДНК с основными белками (Villeronteau, 1992), а ДТТ расщепляет дисульфидные связи, образованные протаминами (Balhorn, 1989). В результате такой обработки ядро сперматозоида набухает и сверхкомпактный хроматин деконденсируется. Этот процесс имитирует события, происходящие после проникновения сперматозоида в ооцит, поскольку гепарин и ДТТ являются аналогами компонентов ооплазмы, таких как гепаран сульфат (Romanato et al., 2003) и глутатион (Sutovsky, Schatten, 1997).

Разбухшие клетки наносили на предметное стекло, давали им осесть в течение 5 минут, затем отмывали препарат: сначала в 2X SSC (стандартный солевой раствор следующего состава: 0.3 M NaCl, 0.03 M цитрат натрия, pH 7.0), потом в воде; дегидратировали в 70 – 95%-ном этаноле и высушивали.

ДНК пробы для FISH

Для гибридизации использовали меченые биотином (BIO) и дигоксигенином (DIG) пробы, окрашивающие p- и q-плечи хромосом по всей длине (painting probes) компании A.L.Tech. Biomedical Inc., USA: BIO-1p, DIG-1q, BIO-2p, DIG-2q, DIG-5p, BIO-5q и меченую DIG пробу на субтеломерный регион 5q.

FISH и микроскопия

ДНК в сперматозоидах денатурировали, помещая препараты в 70%-ный формамид в 2X SSC, нагретый до 72 °C, на 2 минуты и немедленно

фикси́ровали в ледяном этаноле. Гибри́дизацию и послегибридизационные отмывки проводили в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем (A. L. Tech. Biomedical. Inc., США). Места неспецифического связывания блокировали 3%-ным БСА (бычий сывороточный альбумин) с 0,2 % Tween-20 в 4X SSC. Для детекции биотинилированных проб использовали авидин, конъюгированный с Техасом Красным (1:100, Vector Inc., США), биотинилированные козлиные антитела к авидину (1:100, Vector Inc., США), затем снова авидин, конъюгированный с Техасом Красным; Для детекции проб, меченых DIG – последовательно наносили следующие антитела: овечьи антитела к дигоксигенину, конъюгированные с FITC (1:100, Roche, Германия); кроличьи антитела к овечьему IgG, конъюгированные с FITC (1:200, Roche, Германия); козлиные антитела к кроличьему IgG, конъюгированные с FITC (1:200, Roche, Германия). Каждый слой инкубировали в течение 30 минут при 37°C. Между инкубациями с антителами препараты отмывали в трех сменах 4X SSC (0.6 M NaCl, 0.06 M цитрат натрия, pH 7.0) с 0,2 %-ным Tween – 20 (по 5 минут каждая смена) при 45 °C и блокировали в течение 5 минут. Тотальную ДНК окрашивали DAPI. Готовые препараты заключали в среду Vectashield (Vector).

Результаты гибридизации оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Leitz Ortholux, снабженного цветной цифровой камерой (MagnaFire, Optronics Inc., США) и набором селективных фильтров. Для каждого ядра делали 4 фотографии с использованием разных фильтров (только для Техаса Красного, только для FITC, только для DAPI и совместный). Всего было проанализировано 600 ядер (по 200 для каждой хромосомы). Для измерения расстояний и статистического анализа использовали программы Sigma Scan Pro 5.0 и Microsot Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Замена гистонов хроматина на протамины, происходящая на заключительных этапах сперматогенеза, а также формирование сети

дисульфидных мостиков при созревании в эпидидимисе приводит к сверхконденсации хроматина в зрелых спермиях и затрудняет проникновение к ДНК гибридизационных проб и антител (Zalensky et al., 1993). Поэтому предварительная деконденсация ядер – необходимое условие проведения FISH на сперматозоидах. Мы деконденсировали сперматозоиды смесью гепарина и ДТТ. Ранее было показано, что такая обработка приводит к равномерному (с сохранением основных геометрических параметров клетки) разбуханию ядра, без существенной потери ядерных белков, а также обеспечивает сохранность ядерной морфологии и воспроизводимость результатов FISH (Zalensky et al., 1993, 1995).

Основываясь на экспериментальных данных о том, что, чем выше концентрация гепарина, тем сильнее деконденсация ядра (Delgado et al., 1980; Zalensky et al., 1993), мы использовали возрастающие концентрации гепарина, чтобы получить разные стадии деконденсации хроматина.

Используя FISH с пэинтинговыми плечевыми пробами, мы проследили процесс декомпактизации хромосом 1, 2, 5 от компактной ХТ до деконденсированного хроматина, занимающего значительный объем ядра, и выявили наиболее характерные паттерны.

Компактные хромосомные территории и внутриядерная локализация хромосом

В минимально деконденсированных ядрах (близких по размеру к интактному сперматозоиду), хромосомы 1, 2, 5 занимали удлинённые компактные ХТ, составляющие приблизительно 1/16 площади ядра. Изображения, полученные с использованием селективных фильтров, показали, что ХТ образованы близко расположенными р- и q-хромосомными плечами, одинаковыми по форме и размеру. Сигналы от р- и q-плеч накладываются друг на друга, что говорит о параллельной укладке или переплетении хромосомных плеч. Систематическое наблюдение внутриядерной позиции ХТ по отношению к месту прикрепления хвоста

показали неслучайную локализацию каждой, из трех изученных хромосом (рис.1). В 90% клеток хромосома 1 была обнаружена в апикальной половине ядра; хромосома 2 (80% клеток) и хромосома 5 (85% клеток) располагались преимущественно в базальной (хвостовой) половине ядра сперматозоида.

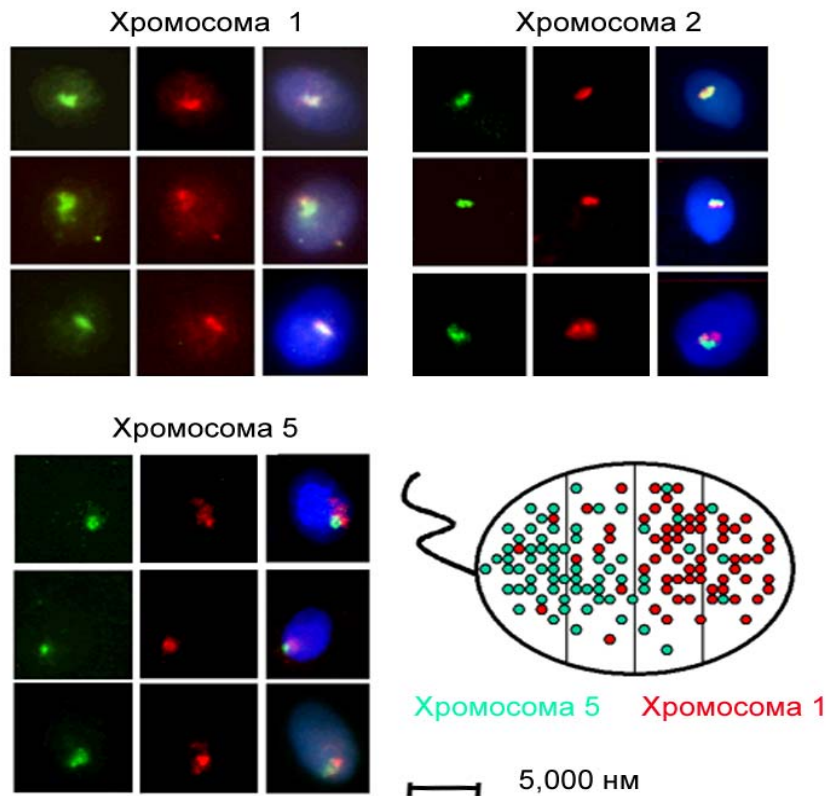


Рис. 1. Компактные хромосомные территории. Детекция хромосомных плеч с использованием селективных фильтров. Каждой клетке соответствует три изображения: q-плечо (FITC), p-плечо (Texas Red) и одновременная визуализация обоих плеч и DAPI (triple-band-pass filter). Места прикрепления хвостов отмечены звездочками. Схема иллюстрирует преимущественную локализацию хромосом 1 и 5 в ядре сперматозоида.

Этот факт соответствует литературным данным о неслучайном расположении ХТ в ядре сперматозоида. Так, у человека хромосомы 1 и 6 (Zalenskaya, Zalensky, 2004), а также хромосома X (Luetjens et al., 1999; Hazzouri et al., 2000; Zalenskaya, Zalensky, 2004) расположены

преимущественно в субакросомной части ядра; хромосома 18 (Luetjens et al., 1999) - в базальной части ядра. Внутриядерная локализация некоторых хромосом эволюционно консервативна. Например, у ряда млекопитающих X-хромосома в сперматозоиде расположена в субакросомном районе ядра, т.е. вблизи области первого контакта сперматозоида с яйцеклеткой. Предположительно, эта хромосома ранее других экспонируется к цитоплазме яйца при оплодотворении (Greaves et al., 2003). Такое расположение X-хромосомы характерно для сумчатых и плацентарных млекопитающих, эволюционные ветви которых разошлись 170 млн. лет назад (Kirsch et al., 1997). Консервативность внутриядерной локализации предположительно свидетельствует о функциональной значимости. Поскольку при нормальном оплодотворении проникновение сперматозоида в яйцо начинается с акросомы, существует определенная временная последовательность экспозиции хромосом сперматозоида к ооплазме. В таком случае, расположение хромосомы в ядре сперматозоида может быть критическим, так как оно определяет время деконденсации и структурной реорганизации, тем самым влияя на дифференциальную экспрессию отцовских генов в эмбрионе (Schultz, Worrad, 1995; McLay, Clarke, 2003).

В пределах хромосомной территории хромосома имеет конформацию шпильки

Более высокая степень деконденсации хроматина была достигнута после обработки ядер 0.5 мг/мл гепарина и 10мМ ДТТ. Размер ядра (определенный по длине длинной оси сперматозоида) увеличился в 1.5 – 2 раза. Размеры компактной ХТ тоже возросли, что позволило нам проследить расположение плечевых доменов внутри хромосомной территории. В большинстве клеток хромосомы 1, 2, 5 занимали вытянутые территории, ориентированные вдоль длинной оси сперматозоида, причем центромера оказывалась локализованной в апикальной части, а концы хромосом - в базальной части ядра. Это согласуется с высказанным ранее предположением об укладке хромосомы наподобие шпильки (Zalensky et al.,

1995) и с данными о взаимодействии p- и q-субтеломерных регионов, принадлежащих одной и той же хромосоме (Zalensky et al., 1997; Solov'eva et al., 2004).

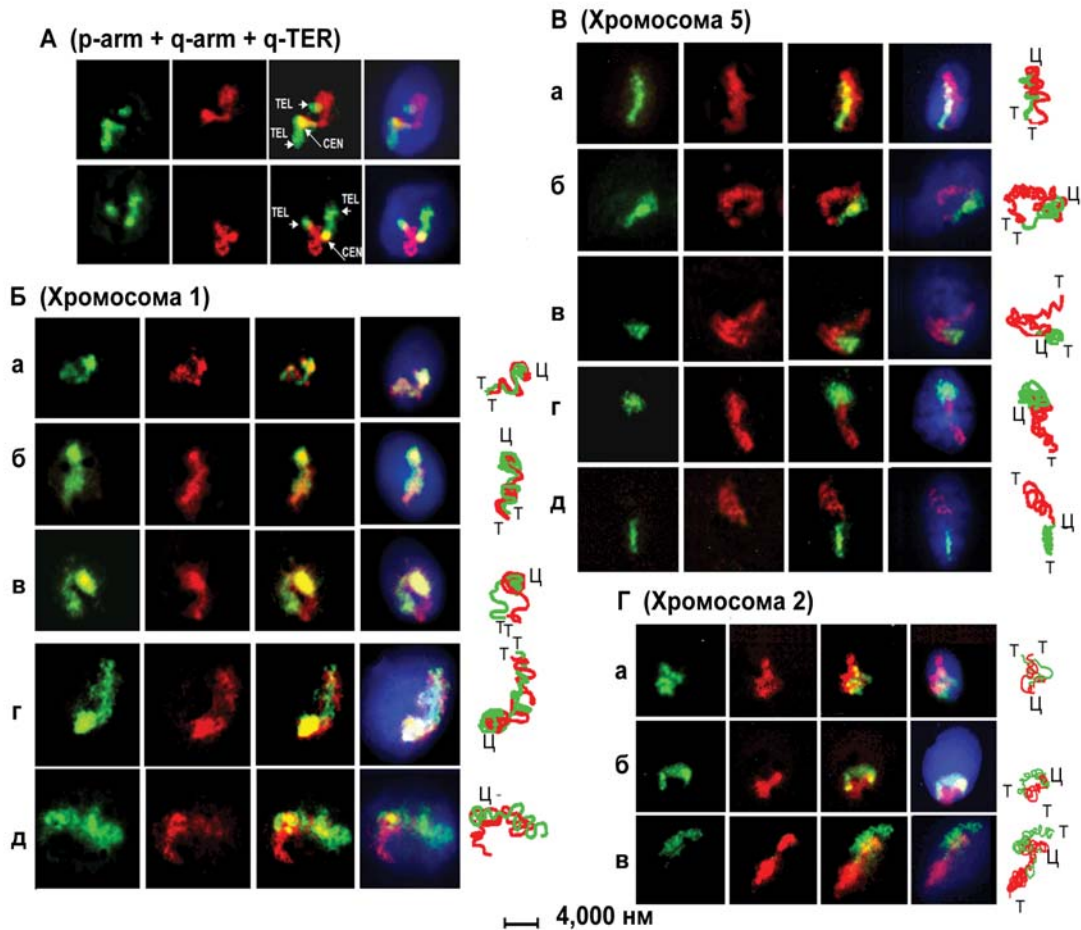


Рис 2. Организация ХТ в декомпактизированных ядрах. **А** – идентификация центromеры и q-терминального региона хромосомы 5: желтый сигнал в центromерном регионе - результат перекрытия плеч в области центromеры; q-плечо окрашено Texas Red (красный); теломерный регион q-плеча окрашен FITC (зеленый); p-плечо окрашено FITC (зеленый). **Б – Г** – взаиморасположение плечевых доменов в ХТ. Справа – схематическая интерпретация изображений.

Центромера в наших экспериментах легко идентифицировалась в большинстве ядер благодаря яркому желтому сигналу, который она давала в совместном фильтре. Поскольку использованные нами плечевые пробы

не охватывали область центромеры, мы предполагаем, что интенсивный желтый сигнал - результат перекрывания плеч в области центромеры. Положение хромосомных концов (pter- и qter-) определялось по концам областей гибридизации и было подтверждено экспериментами по локализации специфической qter- пробы (рис. 2)

Палочкообразные ХТ ранее наблюдали в спермиях мышей (Haaf, Ward, 1995) и человека (Zalensky et al., 1993). Мейер-Фика и коллеги (Meyer-Ficca et al., 1998) наблюдали растягивание большой акроцентрической хромосомы 2 между центромерой и теломерой в сперматиде крысы. Показано, что превращение ХТ разнообразной формы в удлинённые палочкообразные ХТ происходит во время созревания сперматид, на заключительных стадиях спермиогенеза (Meyer-Ficca et al., 1998). Одновременно с этим происходит образование центромерного кластера и ассоциация теломер (выявляемая по уменьшению числа сигналов гибридизации). Предполагают, что кластеризация центромер может играть ведущую роль в упорядочивании процесса компактизации ядра сперматозоида (Scherthan et al., 1996), и, что внутриядерное расположение центромер и теломер является основой, поддерживающей ХТ.

В соматических клетках, напротив, наблюдается большая вариабельность во взаимном расположении плечевых доменов в пределах данной ХТ, а также широкие вариации в расстояниях между pter- и qter- регионами одной хромосомы (Dietzel et al., 1998). Поскольку трехмерная архитектура генома связана с транскрипционной активностью (Cremer et al., 1993; Strouboulis, Wolffe, 1996), падение транскрипционной активности может способствовать компрессии ХТ, и, следовательно, упорядоченной компактизации генома в спермиогенезе (Meyer-Ficca et al., 1998).

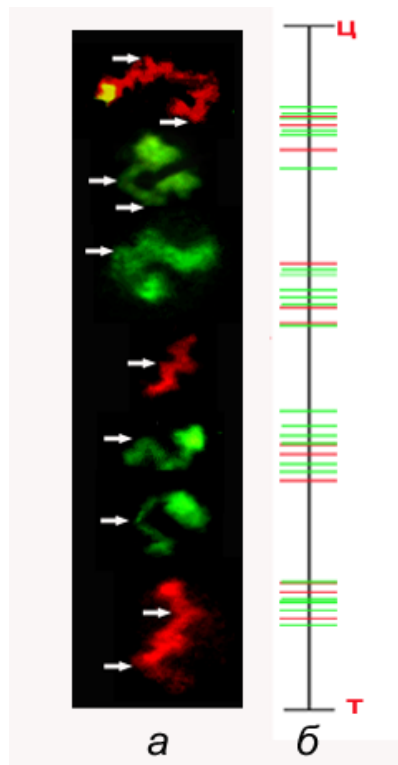
Неслучайное расположение хромосомных изгибов

При декомпактизации р- и q- плеч хромосомы 1 были замечены резкие изгибы хромосомной нити, разделенные протяженными линейными

участками (рис. 3, а). Мы попытались приблизительно оценить локализацию этих изгибов на хромосомном плече. Изобразив плечо в виде отрезка, один конец которого – центромера, а другой – теломера, мы отметили места локализации изгибов. Оказалось, что изгибы расположены неслучайно (рис. 3, б).

Рис. 3. Неслучайное расположение изгибов на хромосомных плечах

а – на обоих плечах хромосомы 1 (р-плечо – красное, q- плечо – зеленое) видны резкие изгибы хромосомной нити (показаны стрелками); б – схема, полученная в результате анализа 9 клеток, показывает расположение изгибов на плече метацентрической хромосомы 1. Красным цветом отмечены изгибы р-плеча хромосомы 1; зеленым цветом – изгибы q-плеча хромосомы 1; Ц – центромера; Т – теломера.



Неслучайное расположение изгибов в митотических метафазных хромосомах наблюдали ранее (Plaja et al., 2004). В хромосоме 12 такие изгибы были локализованы в бэндах 12p12, 12cen, 12q14, 12q21, 12q23, 12q24.2 (это преимущественно G-темные бэнды) и было показано строгое совпадение этих бэндов с изгибами хромосомы внутри интерфазной хромосомосомной территории (Plaja et al., 2004). Отмечалось, что изгибы в кариотипе встречаются с разной частотой. В X хромосоме наиболее выраженным является изгиб в регионе Xq13.3 – Xq21.1. Интересно, что в этом же месте (Xq11.2 – Xq21.1) локализован

центр для конденсации тельца Барра. Предполагают, что в этом участке хромосомы находится точка инициации процесса конденсации, и изгиб в этом регионе – видимое проявления процесса конденсации (Flejter et al., 1984).

Компактная ХТ хромосомы 1, согласно нашим измерениям, в 4 раза меньше метафазной хромосомы 1. Исходя из этого, можно предположить,

что упаковка хромосомы в компактную ХТ в сперматозоиде достигается за счет неслучайного изгибания хромосомной нити. Мы наблюдали также изгибы в р- и q- плечах хромосомы 2, и q- плече хромосомы 5. Наши наблюдения неслучайных изгибов являются, однако, предварительными и требуют дальнейшей экспериментальной проверки.

Устойчивость центромерного и теломерного доменов к деконденсации

Интересной особенностью процесса декомпактизации была повышенная устойчивость центромерного и теломерных участков изученных хромосом к деконденсирующему воздействию ДТТ/гепарина. Эти районы сохраняли свою компактность даже в сильно набухших ядрах. Наиболее стабильным был околоцентромерный регион. Даже в клетках, где размеры длинной оси были втрое больше, чем в интактных ядрах, центромерный регион оставался компактным (рис. 4, А, Б). Повышенная устойчивость отдельных участков хромосом к действию ДТТ/гепарина может быть связана с особой конформацией их хроматина. Известны консервативные хромосомные белки семейства HP1, некоторые из них (HP1 α , β) преимущественно связываются с гетерохроматином (Eissenberg, Elgin, 2000). Белок HP1- α связывается с конденсированными хроматиновыми структурами высокого порядка и изменяет способ укладки хроматина (Fan et al., 2004). В сперматиде млекопитающих HP1- α локализован в хромоцентре, структуре, образованной в результате ассоциации центромерного гетерохроматина различных хромосом (Martianov et al., 2002). Белки HP1 связаны также с теломерами у *Drosophila* (Perrini et al., 2004). Первичная структура ДНК также может вносить вклад в конформационные изменения хроматина. Полиадениновые последовательности, характерные для центромерных ДНК повторов считаются важными для контроля изгибания ДНК и степени компактности хроматина (Canara et al., 2002).

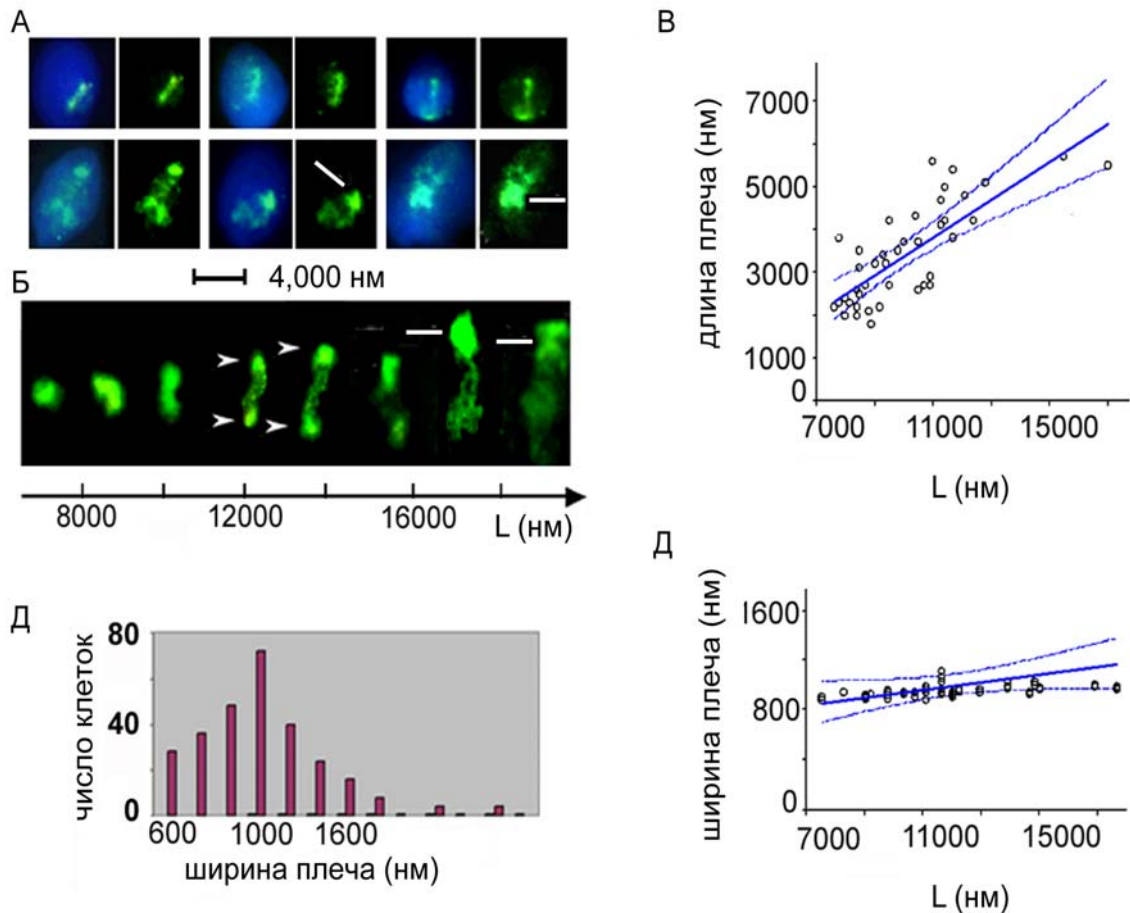


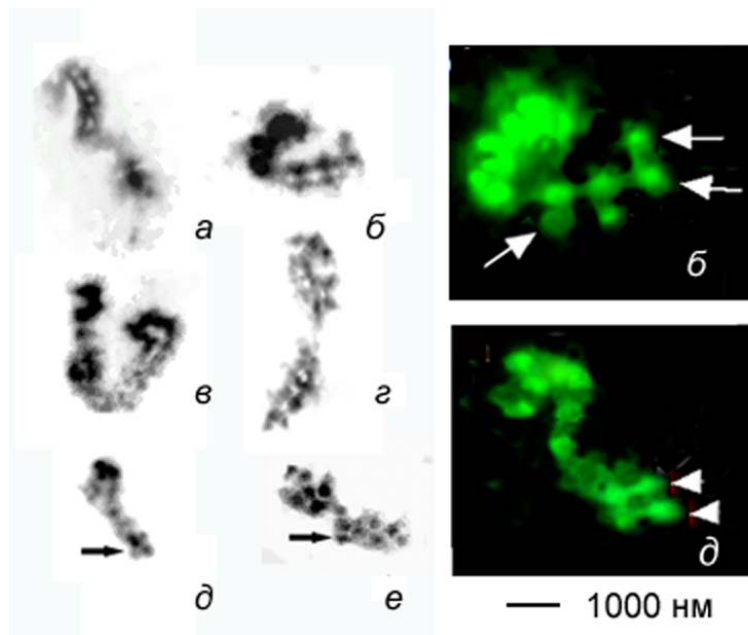
Рис. 4 Декомпактизация q-плеча хромосомы 1. **А** – визуализация q-плеча хромосомы 1 в ядре сперматозоида с использованием фильтров для FITC (зеленый) и совместного (FITC + DAPI). **Б** – типичные паттерны q-плеча в ядрах разной величины. L (нм) – длина длинной оси сперматозоида. В **А** и **Б** стрелочками показаны конденсированные гетерохроматиновые регионы, белыми линиями – центромерные районы. **В** – удлинение q-плеча положительно коррелирует с увеличением размера ядра сперматозоида. **Г** – ширина q-плеча не зависит от длины длинной оси сперматозоида. **Д** – ширина q-плеча: распределение частот в ядрах размером от 0.4 мкм до 2.6 мкм.

Мы измерили расстояние между околотеломерными и околоцентромерными компактными участками хромосомы 1 в 60 ядрах с разной степенью деконденсации, и обнаружили, что оно изменяется пропорционально увеличению размеров длинной оси сперматозоида. Это может свидетельствовать о физической связи этих участков с ядерными структурами. Взаимодействие теломер с ядерной мембраной

предполагалось ранее (Haaf, Ward, 1995; Zalensky et al., 1997). Частично охарактеризован теломер-связывающий комплекс в спермиях (Gineitis et al., 2000). Хромоцентр в сперматозоидах человека расположен в «глубине» ядра (Zalensky et al., 1993), но его связь с ядерным матриксом не установлена.

Иерархическая структурная организация хромосом в сперматозоиде

Измеренная нами ширина q-плеча хромосомы 1 была равна 1000 ± 120 нм (рис. 4 Д). Такой же размер характерен для p- и q- плечей всех изученных хромосом. Относительное постоянство этого параметра может быть следствием устойчивой структурной организации 1000 нм нити (см.



ниже). В высоко деконденсированных клетках ($L > 17$ мкм) там, где длина q-плеча хромосомы 1 в четыре раза больше размера компактной ХТ, 1000 нм хромосомная нить разрешается на две параллельные фибриллы хроматина, соединенные

Рис. 5 Внутренняя организация хромосомного плеча. **а** – на инвертированных изображениях видны две хроматиновые фибриллы, соединенные поперечными хроматиновыми филаментами; **д, е** – стрелками показаны хроматиновые глобулы диаметром 500 нм. Справа - неинвертированные изображения **б** и **д** даны в увеличении.

более тонкими хроматиновыми филаментами. Каждая из фибрилл состоит из цепочки плотных хроматиновых глобул.

Диаметр глобул варьировал от 420 нм до 550 нм и в среднем составлял 480 ± 60 нм (рис. 5). Если сложить диаметры двух глобул, то получится

приблизительно 1000 нм, что соответствует измеренной нами ширине хромосомного плеча. То есть, два ряда хроматиновых глобул диаметром 500 нм образуют хромосомное плечо диаметром 1000 нм.

Глобулы диаметром 500 нм были наименьшими упаковочными единицами хроматина сперматозоида, которые мы могли наблюдать с помощью эпифлуоресцентной микроскопии (предел разрешения около 300 нм).

Хааф и Вард (Haaf, Ward, 1995) на препарате расправленного хроматина спермиев наблюдали основную единицу упаковки - бусины размером 180 ± 20 нм, а также более крупные шаровидные структуры размером 360 ± 30 нм и 600 ± 60 нм ("superbeads"). В этой работе для получения расправленных хроматиновых нитей использовали обработку клеток 2М NaCl, 1%-ным Тритоном X-100 и этанолом, которая могла привести к диссоциации и перераспределению молекул протаминов. 500 нм хроматиновые глобулы, описанные нами могут соответствовать вышеозначенным 600 нм структурам, хотя трудно сравнивать данные из-за принципиально различных методов приготовления препаратов.

Методами электронной микроскопии в сперматозоидах наблюдали следующие структуры: узловатые фибриллы ("knobby fibers") 33-42 нм и 65-120 нм шириной, соединенные нитями толщиной 6-8 нм (Sobhon et al., 1982); узловые ("hub-like") ядерные тельца с диаметром от 10 до 100 нм, соединенные сетью хроматиновых нитей (Sanchez-Vazquez et al., 1998); глобулярные структуры 120-150 Å в диаметре (Gusse, Chevaillier, 1980). Электронно-микроскопические наблюдения не различают принадлежность хроматина к разным хромосомам или хромосомным плечам. Шкалы доступных измерений в флуоресцентной и электронной микроскопии различны, равно как и методы приготовления хроматина/ядер, что не позволяет прямо сравнивать полученные нами данные с данными электронной микроскопии.

Модель иерархической структурной организации хромосом в сперматозоиде человека

Уникальные структурные белки сперматозоидов - протамины упаковывают ДНК в тороидальные структуры, содержащие около 50 т.п.о. ДНК (Hud et al., 1993, 1994; Allen et al., 1995). Согласно одной из гипотез, ДНК спермиев организована в петлевые домены, размером около 50 т.п.о., которые прикреплены своим основанием к ядерному матриксу (Ward et al., 1989; Kramer, Krawetz, 1996). Вардом (Ward, 1993) была предложена модель, по которой петлевому домену соответствует тороид (Ward, 1993; Ward, Zalensky, 1996). Каким образом нуклеопротаминовые тороиды организованы в структуры более высокого порядка, неизвестно.

На основании данных о локализации различных хромосомных доменов, полученных методом флуоресцентной гибридизации *in situ* панцентромерных, пантеломерных, специфических центромерных, субтеломерных и пэинтинговых проб была предложена модель пространственной организации ядра сперматозоида человека (reviewed by Zalensky, 1998; Zalenskaya and Zalensky, 2000). Согласно этой модели центромерные регионы всех хромосом объединены в центрально расположенный хромоцентр, в то время как р-теломерный и q-теломерный домены каждой хромосомы взаимодействуют на периферии (рис. 6, А).

Здесь мы предлагаем модель иерархической структурной организации хромосом в ядре сперматозоида человека, частично заполняющую этот пробел.

В минимально деконденсированных ядрах, близких по размеру к «нативному» сперматозоиду, изученные хромосомы образуют компактные территории. Сигналы гибридизации от хромосомных плеч близки по форме и в значительной степени перекрываются (рис. 6, Б). В более «раздутых» ядрах ХТ принимают форму удлинённых фибрилл, шириной 2000 ± 200 нм. Внутри этих фибрилл хромосомная нить изогнута на 180° в области центромеры, р- и q-плечи лежат одно вдоль другого, р- и q теломеры сближены. Каждое хромосомное плечо, в свою очередь, представляет

собой фибриллу шириной 1000 ± 120 нм, образованную двумя рядами хроматиновых глобул диаметром около 500 нм. Известные из литературы (Valhorn et al., 2000) размеры нуклеопротаминового тороида $25 \times (60 - 100)$ нм) позволяют предположить, что хроматиновая глобула диаметром 500 нм соответствует 100 – 200 тороидам или 3 – 5 Мб ДНК.

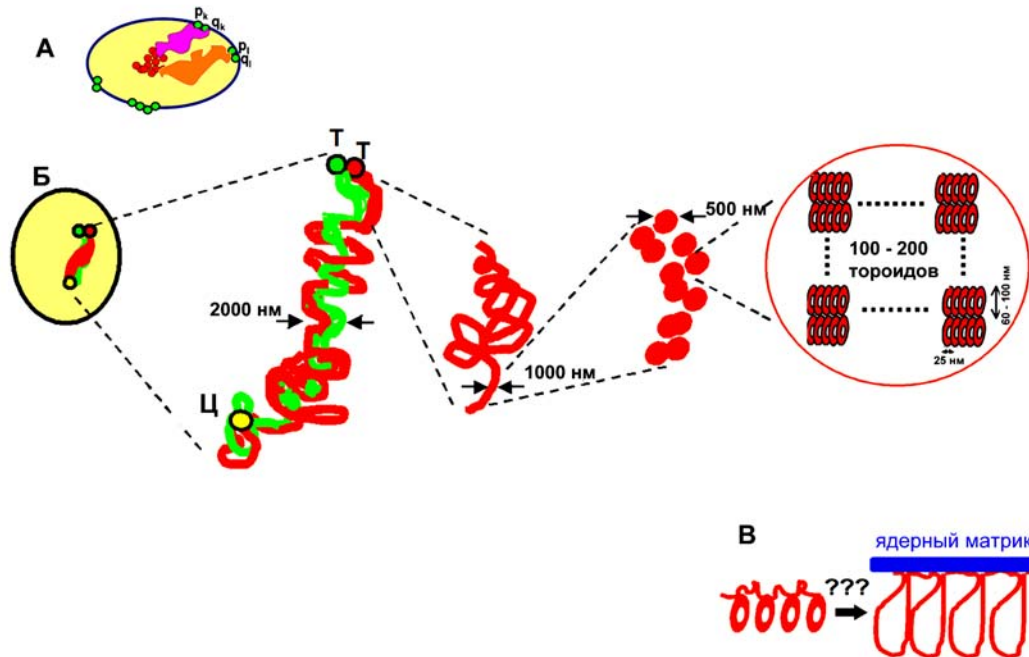


Рисунок 6. Модель иерархической структурной организации хромосом в ядре сперматозоида человека (объяснения в тексте).

Согласно модели Варда (Ward and Ward, 2004) нуклеопротаминовые тороиды, представляющие собой конденсированные петли ДНК, соединены между собой нуклеогистоновыми линкерами, которые отвечают за прикрепление ДНК к ядерному матриксу (рис. 6, В) Наша модель описывает хроматиновые структуры размером более 300 нм и, поэтому, не может ни подтвердить, ни опровергнуть модель Варда.

Насколько наша модель, описывающая организацию генома в сперматозоиде человека приложима к сперматозоидам млекопитающих других видов? Существование хромосомных территорий и их неслучайная локализация в ядре обнаружены в сперматозоидах свиньи (Foster et al.,

2005), грызунов (Haaf, Ward, 1995; Meyer-Ficca et al., 1998) и у эволюционно далеких сумчатых млекопитающих (Greaves et al., 2003; Grutzner et al., 2004). Теломерные димеры описаны в ядрах спермиев мыши, крысы, свиньи, быка и лошади (Zalensky et al., 1997; Meyer-Ficca et al., 1998). То есть принцип пространственной организации ядра сперматозоида у млекопитающих по-видимому одинаков.

ВЫВОДЫ

1. Хромосомы 1, 2, 5 имеют неслучайную локализацию в ядре сперматозоида человека.
2. В пределах хромосомной территории хромосома имеет конформацию шпильки: она изогнута на 180 ° в области центромеры, а плечи сближены по всей длине.
3. Хромосомные изгибы локализованы неслучайно, что показано впервые в ядре сперматозоида.
4. Предложена модель организации хромосом в ядре сперматозоида, заполняющая существующий пробел между представлениями об упаковке ДНК в нуклеопротеиновые тороиды и сведениями о трехмерной структуре ядра.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Olga Mudrak** and Andrei Zalensky. Direct visualization of chromosome path in the Human Sperm Nucleus. In “EVMS Research Day Conference, Norfolk, VA (USA), October 1, 2004”.
2. **Mudrak O**, Tomilin N, Zalensky A. 2005. Chromosome architecture in the human sperm nucleus. *J. Cell. Sci.* 118: 4541-4550.
3. Andrei Zalensky, **Olga Mudrak**, Maria Svetlova, Ludmila Solov'eva and Irina Zalenskaya. 2005. Chromosome architecture in Human Sperm Nuclei. In “First International Cytogenetic and Genome Society Congress, Granada (Spain), June 14-18, 2005”.
4. Andrei Zalensky, **Olga Mudrak**, Maria Svetlova, Ludmila Solov'eva. Chromosome architecture in Human Sperm Nuclei In “EVMS Research Day Conference, Norfolk, VA (USA), October 1, 2005”.

5. **Mudrak O.**, Zalensky A. 2006. Genome architecture in human sperm cells: possible implication for male infertility in: Male Infertility: Diagnosis and Treatment. Informa UK Ltd. 73-85.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Allen M.J., Bradbury E.M., Balhorn R. 1995. The natural subcellular surface structure of the bovine sperm cell. *J. Struct. Biol.* 114: 197-208. - **Balhorn R.**, Brewer L., Corzett M. 2000. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Mol. Reprod. Dev.* 56: 230-234. - **Brandriff B.F.**, Gordon L.A. 1992. Spatial distribution of sperm-derived chromatin in zygotes determined by fluorescence in situ hybridization. *Mutat. Res.* 296: 33-42. - **Canapa A.**, Cerioni P.N., Barucca M., Olmo E., Caputo V. 2002. A centromeric satellite DNA may be involved in heterochromatin compactness in gobiid fishes. *Chromosome Res.* 10: 297-304. - **Cremer T.**, Kurz A., Zirbel R., Dietzel S., Rinke R., Schrock E., Speicher M.R., Mathieu U., Juach A., Emmerich P., Scherthan H., Ried T., Cremer C., Lichter P. 1993. Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* LVIII, 777-792. - **Dietzel S.**, Jauch A., Kienle D., Qu G., Holtgreve-Grez H., Eils.R., Munkel C., Bittner M., Meltzer P.S., Trent J.M., Cremer T. 1998. Separate and variably shaped chromosome arm domains are disclosed by chromosome arm painting in human cell nuclei. *Chromosome Res.* 6: 25-33. - **Ding D.Q.**, Chikashige Y., Haragushi T., Hiraoka Y. 1998. Oscillatory nuclear movement in fission yeast meiotic prophase is driven by astral microtubules, as revealed by continuous observation of chromosomes and microtubules in living cells. *J. Cell Sci.* 111, 701-712. - **Eissenberg J.C.**, Elgin S.C. 2000. The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 204-210. - **Fan J.Y.**, Rangasamy D., Luger K., Tremethick D.J. 2004. H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1 alpha-mediated chromatin fiber folding. *Mol. Cell.* 16: 655-661. - **Flejter W.L.**, Van Dyke D.L., Weiss L. 1984. Bends in human mitotic metaphase chromosomes, including a bend marking the X-inactivation center. *Am. J. Hum. Genet.* 36: 218-226. - **Foster H.A.**, Abeydeera L.R., Griffin D.K., Bridger J.M. 2005. Non-random chromosome positioning in mammalian sperm nuclei, with migration of the sex chromosomes during late spermatogenesis. *J. Cell Sci.* 118: 1811-1820. - **Gardiner-Garden M.**, Ballesteros M., Gordon M., Tam P.P. 1998. Histone- and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the beta-globin domain in human sperm. *Mol. Cell. Biol.* 18: 3350-3356. - **Gatewood J.M.**, Cook G.R., Balhorn R., Bradbury E.M., Schmid C.W. 1987. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science.* 236: 962-964. - **Gineitis A.A.**, Zalenskaya I.A., Yau P.M., Bradbury E.M., Zalensky A.O. 2000. Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *J. Cell Biol.* 151: 1591– 1598. - **Greaves I.K.**, Rens W., Ferguson-Smith M.A., Griffin D., Marshall-Graves J.A. 2003. Conservation of chromosome arrangement and position of the X in mammalian sperm suggests functional significance. *Chromosome Res.* 11: 503-512. - **Gusse M.**, Chevaillier P. 1980. Electron microscope evidence for the presence of globular structures in different sperm chromatins. *J. Cell Biol.* 87: 280-284. - **Haaf T.**, Ward D.C. 1995. Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridization and extended chromatin fibers. *Exp. Cell Res.* 219: 604-611. - **Hazzouri M.**, Rousseaux S., Mongelard F., Usson Y., Pelletier R., Faure A.K., Vourc'h C., Sele B. 2000. Genome organization in the human sperm nucleus studied by FISH and confocal microscopy. *Mol. Reprod. Dev.* 55: 307–315. - **Hiraoka Y.**, 1998. Meiotic telomeres: a matchmaker for homologous chromosomes. *Genes Cells* 3: 405-413. Hoyer-Fender S., Singh P.B., Motzkus D. 2000. The murine heterochromatin protein M31 is associated with the chromocenter in round spermatids and is a component of mature spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 254: 72–79. - **Hud N.V.**, Allen M.J., Downing K.H., Lee J., Balhorn R. 1993. Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193: 1347-1354. - **Hud N.V.**, Milanovich F.P., Balhorn R. 1994. Evidence of novel secondary structure in DNA-bound protamine is revealed by Raman spectroscopy. *Biochemistry.* 33: 7528-7535. - **Kirsch J.A.W.**, Lapointe F.J.,

Springer M.S. 1997. DNA-hybridisation studies of marsupials and their implications for metatherian classification. *Australian Journal of Zoology*. 45: 211. - **Kramer J.A.**, Krawetz S.A. 1996. Nuclear matrix interactions within the sperm genome. *J. Biol. Chem.* 271: 11619-11622. - **Luetjens C.M.**, Payne C., Schatten G. 1999. Non-random chromosome positioning in human sperm and sex chromosome anomalies following intracytoplasmic sperm injection. *Lancet*. 353: 1240. - **McLay D.W.**, Clarke H.J. 2003. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction*. 125: 625-633. - **Martianov I.**, Brancorsini S., Gansmuller A., Parvinen M., Davidson I., Sassone-Corsi P. 2002. Distinct functions of TBP and TLF/TRF2 during spermatogenesis: requirement of TLF for heterochromatic chromocenter formation in haploid round spermatids. *Development*. 129: 945-955. - **Meyer-Ficca M.**, Muller-Navia J., Scherthan H. 1998. Clustering of pericentromeres initiates in step 9 of spermiogenesis of the rat (*Rattus norvegicus*) and contributes to a well defined genome architecture in the sperm nucleus. *J. Cell Sci.* 111: 1363–1370. - **Perrini B.**, Piacentini L., Fanti L., Altieri F., Chichiarelli S., Berloco M., Turano C., Ferraro A., Pimpinelli S. 2004. HP1 controls telomere capping, telomere longation, and telomere silencing by two different mechanisms in *Drosophila*. *Mol. Cell*. 15: 467-476. - **Plaja A.**, Miro R., Lloveras E., Sarret E., Fernandez B., Egozcue J. 2004. Intranuclear arrangement of human chromosome 12 is reflected in metaphase chromosomes as non-random bending. *Ann Genet.* 47: 429-432. - **Romanato M.**, Cameo M.S., Bertolesi G., Baldini C., Calvo J.C., Calvo L. 2003. Heparan sulphate: a putative decondensing agent for human spermatozoa in vivo. *Hum. Reprod.* 18: 1868-1863. - **Sanchez-Vazquez M.L.**, Reyes R., Ramirez G., Merchant-Larios H., Rosado A., Delgado N.M. 1998. DNA unpacking in guinea pig sperm chromatin by heparin and reduced glutathione. *Arch. Androl.* 40: 15-28. - **Schultz R.M.**, Worrall D.M. 1995. Role of chromatin structure in zygotic gene activation in the mammalian embryo. *Semin. Cell Biol.* 6: 201-208. - **Sobhon P.**, Chutatape C., Chalermisarachai P., Vongpayabal P., Tanphaichitr N. 1982. Transmission and scanning electron microscopic studies of the human sperm chromatin decondensed by micrococcal nuclease and salt. *J. Exp. Zool.* 221: 61-79. - **Solov'eva L.**, Svetlova M., Bodinski D., Zalensky A.O. 2004. Nature of telomere dimers and chromosome looping in human spermatozoa. *Chromosome Res.* 12: 817-823. - **Strouboulis J.**, Wolffe A.P. 1996. Functional compartmentalization of the nucleus. *J. Cell Sci.* 109: 1991-2000. - **Sutovsky P.**, Schatten G. 1997. Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. *Biol. Reprod.* 56: 1503-1512. - **Sutovsky P.**, Schatten G. 2000. Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm – egg fusion. *Int. Rev. Cytol.*: 195, 1–65. - **Tilgen N.**, Guttenbach M., Schmid M. 2001. Heterochromatin is not an adequate explanation for close proximity of interphase chromosomes 1–Y, 9–Y, and 16–Y in human spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 265: 283–287. - **Van Driel R.**, Fransz P.F., Verschure P.J. 2003. The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J. Cell Sci.* 116: 4067-75. - **Villeponteau B.** 1992. Heparin increases chromatin accessibility by binding the trypsin-sensitive basic residues in histones. *Biochem. J.* 288: 953-958. - **Ward W.S.** 1993. Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol. Reprod.* 48: 1193-1201. - **Ward W.S.**, Partin A.W., Coffey D.S. 1989. DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma*. 98: 153-159. - **Ward M.A.**, Ward W.S. 2004. A model for the function of sperm DNA degradation. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 547-554. - **Ward W.S.**, Zalensky A.O. 1996. The unique, complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 6: 139-147. - **Wykes S.M.**, Krawetz S.A. 2003. The structural organization of sperm chromatin. *J. Biol. Chem.* 278: 29471-29477. - **Zalenskaya I.A.**, Zalensky A.O. 2000. Telomeres in mammalian germ-line cells. *Intern. Rev. Cytology*. 218: 37-67. - **Zalenskaya I.A.**, Zalensky A.O. 2004. Non-random positioning of chromosomes in human sperm nuclei. *Chromosome Res.* 12: 163-173. - **Zalensky A.O.**, Breneman J.W., Zalenskaya I.A., Brinkley B.R., Bradbury E.M. 1993. Organization of centromeres in the decondensed nuclei of mature human sperm. *Chromosoma*. 102: 509–518. - **Zalensky A.O.**, Allen M.J., Kobayashi A., Zalenskaya I.A., Balhorn R., Bradbury E.M. 1995. Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus. *Chromosoma*. 103: 577-590. - **Zalensky A.O.**, Tomilin N.V., Zalenskaya I.A., Teplitz R.L., Bradbury E.M. 1997. Telomere-telomere interactions and candidate telomere binding protein(s) in mammalian sperm cells. *Exp. Cell Res.* 232: 29-41.