

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА МЕЖДИСКА 3С6/С7 ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© О. В. Андреенков, Е. И. Волкова, В. Ф. Семешин, И. Ф. Жимулев, С. А. Демаков¹

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск;

¹ электронный адрес: demakov@mcb.nsc.ru

Представлены результаты исследования механизмов декомпактизации хроматина междисков политенных хромосом дрозофилы. На примере междиска 3С6/С7 X-хромосомы изучена способность различных последовательностей ДНК формировать междиск в новом генетическом окружении. Сайт-специфичная FLP-рекомбинация между двумя транспозонами, содержащими FRT-сайты, позволяет внедрять конкретные фрагменты ДНК из известных междисков в цитологически хорошо охарактеризованный район с последующим электронно-микроскопическим анализом изменений этого района. С помощью этого подхода было показано, что перемещение фрагмента ДНК длиной 276 пар нуклеотидов (п. н.) из междиска 3С6/С7 в конструкцию rICon(dv) приводит к образованию нового междиска в районе встройки этого транспозона. Данный фрагмент ДНК оказался минимальной известной на сегодняшний день последовательностью, необходимой и достаточной для формирования междиска в новом генетическом окружении. Помимо этого, в транспозон rICon(dv) были интегрированы 3 тандемно повторенных участка ДНК из междиска 3С6/С7 длиной по 900 п. н., включающих в себя фрагмент 276 п. н. Введение дополнительных копий не меняло морфологию образуемого междиска. Показано, что в междисковых последовательностях, перенесенных в составе транспозона в новое генетическое окружение, сохраняются сайты гиперчувствительности к ДНКазе I. Полученные данные позволяют перейти к анализу конкретных факторов (белков, ДНК мотивов), определяющих формирование декомпактного состояния как определенного междиска, так и хромомерной организации интерфазных хромосом дрозофилы в целом.

Ключевые слова: транспозон, сайт-специфическая рекомбинация, генетическая трансформация, хроматин, междиск, политенные хромосомы.

Одним из ключевых механизмов регуляции активности генома эукариот является его организация в структурно-функциональные домены. Как соотносятся выявляемые домены с хромомерной организацией хромосом, до сих пор мало изучено. Политенные хромосомы дрозофилы благодаря своим гигантским размерам являются уникальным объектом, позволяющим с высокой точностью сопоставить такого рода домены с морфологическими структурами, прежде всего компактно упакованными дисками и менее плотными междисками. Несмотря на обширную накопленную информацию, функции междисков и причины их декомпактного состояния в целом во многом остаются загадочными.

Ранее, используя одновременное картирование встроек ДНК Р-транспозонов на физической и цитологической картах, мы в ряде случаев смогли установить, какой участок генома входит в состав междиска и исследовать его свойства (Semeshin et al., 1986; Ватолина и др., 2011; Demakov et al., 2011). С помощью этого подхода для отдельных междисков нами выявлены последовательности ДНК, которые сохраняли способность формировать декомпактное состояние хроматина, присущее исходным междискам, при переносе в составе транспозонов в другие районы хромосом. Значительная длина этих последовательностей и ограниченное разрешение цитологических методов до сих пор не позволяли су-

дить о том, распространяют эти участки декомпактное состояние на прилегающие районы или оно ограничено размерами исходных междисковых последовательностей.

В настоящей работе нами использован оригинальный комплексный подход для изучения способности различных по длине последовательностей ДНК формировать междиск в новом генетическом окружении. Этот подход основан на использовании системы сайт-специфичной гомологичной FRT/FLP-рекомбинации между двумя транспозонами, содержащими FRT-сайты (Golic et al., 1997). В предыдущей работе (Андреенков и др., 2010) на примере междиска из района 3С6/С7 мы показали, что короткий фрагмент ДНК из последовательности, удаляемой мутацией *fa^{swb}* района 3С6/С7, в котором расположена 5'-область гена *Notch*, является необходимым для формирования междиска. В настоящей работе, используя тот же подход, мы показали, что этот фрагмент достаточен для формирования междиска.

Материал и методика

Структура используемых транспозонов и схема генетических скрещиваний подробно представлены ранее (Андреенков и др., 2010). Ядра из личинок дрозофилы

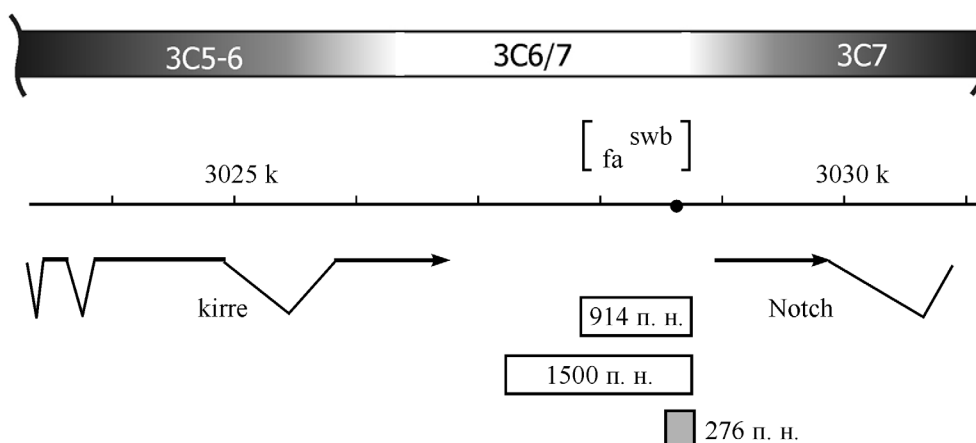


Рис. 1. Схема молекулярно-генетической организации района 3С6-С7 X-хромосомы.

Последовательность между генами *kirre* и *Notch*, удаляемая делецией fa^{swb} , отмечена квадратными скобками. Фрагменты ДНК различной длины, использованные для моделирования междисковой структуры в составе транспозона $\rho\text{Con}(dv)$, обозначены прямоугольниками. Гиперчувствительный к ДНКазе I участок отмечен черным кружком.

выделяли по методике, описанной Шаффером и соавторами (Shaffer et al., 1994).

Для обработок ДНКазой I ядра осаждали центрифугированием при 1000 *g* в течение 5 мин при 4 °С, удаляя супернатант и суспендировали осадок в холодном буфере А (около $2 \cdot 10^8$ ядер/мл). Равные количества суспензии ядер распределяли по отдельным пробиркам (по $5 \cdot 10^7$ ядер) на льду, а затем инкубировали их по очереди по 3 мин при 37 °С, добавив 0, 0,5 и 1,5 мкл (0U, 50U и 150U соответственно) ДНКазы I (Serva) при концентрации 10 мг/мл. Процесс гидролиза ДНК блокировали добавлением ЭДТА до 25 мМ и помещением образцов в лед. Каждый образец после центрифугирования при тех же условиях и удаления супернатанта суспендировали в 500 мкл лизирующего буфера (1,25 % SDS, 0,3 М Трис-НСl, рН 8,4, 0,1 М ЭДТА и 5 % сахарозы) для последующей очистки геномной ДНК фенольным способом. Далее проводили саузерн-блот-гибридизацию выделенных фрагментов ДНК с ^{32}P -меченным зондом по стандартной методике.

Результаты и обсуждение

Короткая последовательность ДНК длиной 276 пар нуклеотидов (п. н.) (рис. 1) была встроена в геном дрозофилы в составе донорного транспозона ρFRTV , а затем при помощи генетических скрещиваний переведена в акцепторную конструкцию $\rho\text{Con}(dv)$ в районе 84F. Электронно-микроскопический анализ выявил образование нового междиска в районе 84F (рис. 2, а). Этот междиск по размеру не отличается от междисков, полученных нами в предыдущей работе (Андреенков и др., 2010) из более протяженных последовательностей длиной 914 и 1500 п. н. междиска 3С6/С7. Таким образом, декомпактное состояние хроматина междиска 3С6/С7 определяется короткой последовательностью, удаление которой приводит к исчезновению междиска (Андреенков и др., 2010), а наличие оказывается достаточным для формирования искусственного междиска. Малые размеры этой последовательности позволяют приступить к поиску возможных белковых факторов, ответственных за специфическое состояние хроматина в междиске 3С6/С7. Одним из способов облегчить обнаружение связывающихся с данной по-

следовательностью белков, на наш взгляд, могло быть увеличение числа копий данной последовательности в конструкции, что создало бы дополнительные сайты связывания и могло бы привести к видимым изменениям структуры хроматина в районе встройки.

С целью проверить гипотезу о возможном влиянии многократно повторенной последовательности на декомпактизацию хроматина нами была синтезирована конструкция, включающая в себя встройку трех tandemно повторенных фрагментов ДНК длиной 914 п. н., включающих в себя целиком последовательность, удаляемую мутацией fa^{swb} . Таким образом, общая длина междискового материала в данной конструкции составляла 2700 п. н. Была получена линия мух, несущая эту встройку в районе 84F. Электронно-микроскопический анализ данной линии также выявил образование нового междиска в районе встройки акцепторного транспозона $\rho\text{Con}(dv)$ (рис. 2, б). Как видно на электронно-микроскопической фотографии, увеличение числа копий не оказывает видимого эффекта на размеры и структуру образующегося междиска. На основании отсутствия зависимости размеров междиска как от длины, так и от копийности встраиваемого фрагмента можно предложить механизм образования декомпактного состояния. Возможно, что формирующийся в сайте связывания белковый комплекс приводит к декомпактизации прилегающих районов хроматина вне зависимости от их состава, что на цитологическом уровне выглядит как образование постоянного по размерам и структуре междиска. В связи с этим встает вопрос о характерных особенностях изучаемой последовательности.

Из данных литературы (Ramos et al., 1989) известно, что в пределах изучаемой последовательности на расстоянии 130 п. н. от проксимальной точки разрыва делеции fa^{swb} находится прямой повтор длиной 47 п. н. Также известно, что изучаемая последовательность содержит сайты, гиперчувствительные к ДНКазе I, что рассматривается как доказательство существования в данном районе специфических нуклеопротеиновых структур (Vazquez, Schedl, 2000).

Чтобы изучить взаимосвязь между декомпактным состоянием и присутствием сайтов гиперчувствительности к ДНКазе I, мы провели поиск гиперчувствительных к ДНКазе I сайтов во всех полученных нами линиях со встройками материала междиска 3С6/С7. Для этого обра-

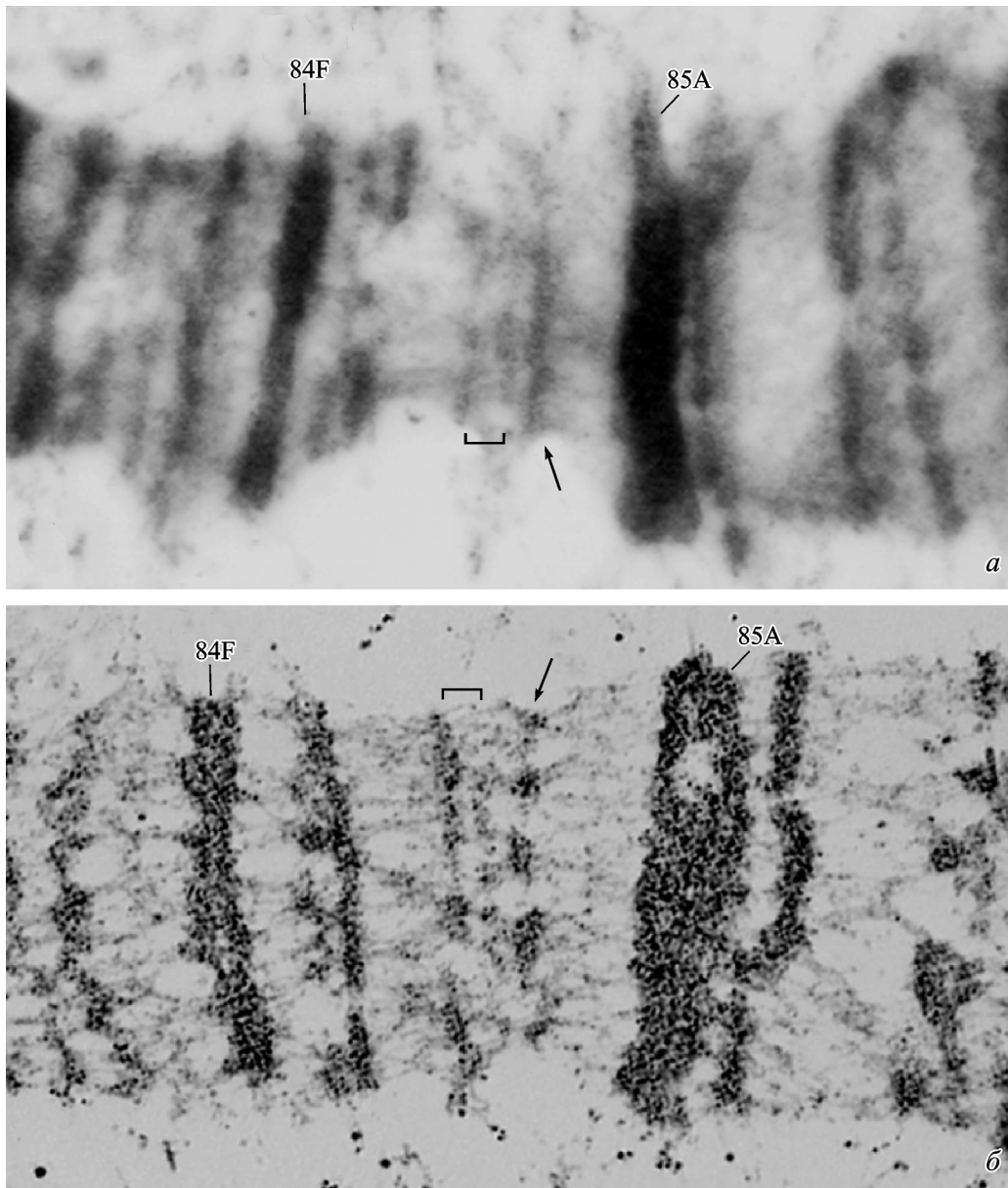


Рис. 2. Электронно-микроскопические микрофотографии района 84F хромосомы 3R трансгенных мух со встройкой двух тестируемых последовательностей из района 3С6/С7 в конструкцию pICon(dV).

Новый междиск (отмечен квадратной скобкой) образован фрагментом ДНК длиной около 276 п. н. (а) и тремя копиями тандемно расположенных фрагментов ДНК общей длиной 2.7 т. п. н. (б) из междиска 3С6/С7 в составе диска, состоящего из материала транспозона pICon(dv). Стрелками отмечен эндогенный диск 84F11-12.

батывали ДНКазой I ядра личинок и проводили саузерн-блот-гибридизацию выделенных фрагментов ДНК с меченым зондом (рис. 3). Линии мух, содержащие различные встройки материала из района 3С6/С7, дают следующие картины распределения гиперчувствительных к ДНКазе I сайтов.

В каждой линии присутствует отчетливо выраженный (мажорный) ДНКазы I-гиперчувствительный сайт, связанный с наличием в транспозоне промотора гена теплового шока Hsp70 (рис. 3). В линиях, содержащих встройку фрагментов ДНК длинами 914 и 276 п. н., отмечается появление дополнительного мажорного ДНКазы I гиперчувствительного сайта (рис. 3, а, б). Местоположение этого сайта на молекулярной карте соответствует участку гиперчувствительных сайтов в междиске 3С6/С7,

который попадает в зону делеции в линии fa^{swb} (Vazquez, Schedl, 2000). В линии со встройкой последовательности длиной 1258 п. н., из которой были удалены 246 п. н. (Андреев и др., 2010), сайт гиперчувствительности отсутствует (рис. 3, в), что полностью соотносится с характером распределения гиперчувствительных сайтов в 5'-области гена *Notch*. Обработка ДНКазой I ДНК из линии мух с тремя повторами материала в 914 п. н. выявляет три новых ДНКазы I-гиперчувствительных сайта, разделенных участками приблизительно в 800 п. н., что соответствует ожидаемой картине распределения гиперчувствительных сайтов в трех тандемных повторах последовательности fa^{swb} (рис. 3, г).

Полученные результаты свидетельствуют о сохранении характерных структурных особенностей организации

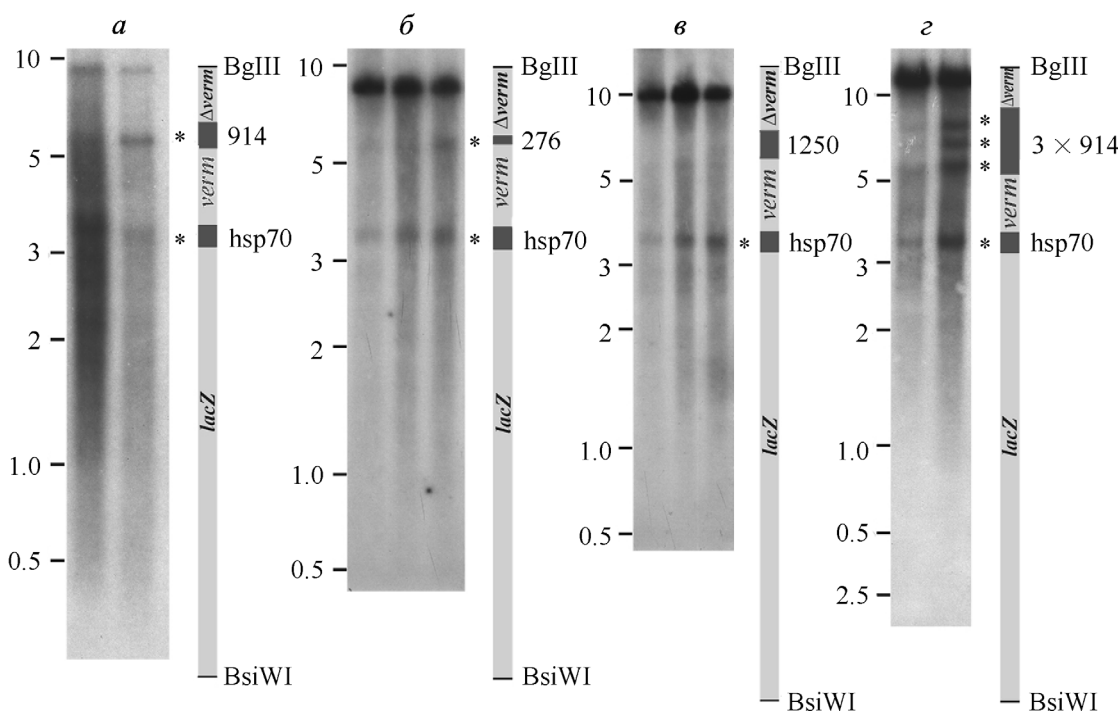


Рис. 3. Картирование ДНКазы I-гиперчувствительных сайтов в составе транспозона pIcon(dv) с фрагментами ДНК из района междиска 3С6/С7.

Дорожка 1 — без добавления ДНКазы I, дорожки 2, 3 — обработка ДНКазой I в разных концентрациях. Справа от дорожек — схема молекулярной организации транспозона pIcon(dv), в составе которого находятся различные фрагменты ДНК из междиска 3С6/С7: фрагмент 914 п. н. (а), фрагмент 276 п. н. (б), фрагмент 1250 п. н. (в), тандемный повтор из трех копий фрагмента 914 п. н. (г). ДНКазы I-гиперчувствительные сайты отмечены звездочкой.

хроматина междиска 3С6/С7 в новом генетическом окружении.

Согласно данным проекта modEncode (Celniker, et al., 2009), в клеточных культурах дрозофилы для изучаемого района 3С6/С7 характерны следующие особенности. На промежутке около 100 п. н., соответствующем положению прямого повтора 47 п. н., наблюдается значительное локальное снижение сигнала нуклеосомной плотности, уникальное для участка около 10 000 п. н. в обе стороны от исследуемого района (рис. 4). В районе, из которого происходит изучаемая минимальная последовательность, способная формировать междиск, отмечены значимые пики связывания ряда инсуляторных белков — CP190, CTCF и BRF1, причем середина пиков во всех случаях совпадает с изучаемой последовательностью. Также в данном районе локализуется белок ORC2, входящий в комплекс белков, формирующих участки инициации репликации (рис. 4).

Эти данные позволяют говорить о наличии открытого состояния хроматина в изучаемом районе, что хорошо соотносится с нашими наблюдениями. Необходимо отметить, что в проекте modEncode (Celniker, et al., 2009) использованы данные, полученные на культурах клеток *Drosophila*, тогда как наши данные получены на политенных хромосомах слюнных желез и прямое сравнение может осложняться возможным наличием тканеспецифичных особенностей структуры и функций хроматина в изучаемом районе.

Способность столь малой последовательности ДНК к формированию междиска в новом генетическом окружении и тот факт, что размер моделируемого междиска, образующегося при встраивании более протяженного фрагмента ДНК, не отличается на уровне электронной микро-

скопии от размера междиска, формируемого из короткого фрагмента длиной 276 п. н., на наш взгляд, говорят о вовлечении в материал междиска окружающих последовательностей, ранее находившихся в конденсированном состоянии в районе 84F в составе транспозона.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН (проект № 6.4), программы фундаментальных исследований СО РАН 2012—2014 гг., выполняемых совместно с организациями УрО и ДВО РАН (проект № 82).

Список литературы

- Андреев О. В., Волкова Е. И., Демаков С. А., Семешин В. Ф., Жимулев И. Ф. 2010. Декомпактное состояние хроматина междиска из района 3С6/С7 политенных хромосом *Drosophila melanogaster* определяется короткой последовательностью ДНК. Докл. РАН. 431 : 119—122.
- Ватолина Т. Ю., Демаков С. А., Семешин В. Ф., Макушин И. В., Бабенко В. Н., Беляева Е. С., Жимулев И. Ф. 2011. Идентификация и молекулярно-генетическая характеристика междисков политенных хромосом *Drosophila melanogaster*. Генетика. 47(5) : 597—609.
- Celniker S. E., Dillon L. A., Gerstein M. B., Gunsalus K. C., Henikoff S., Karpen G. H., Kellis M., Lai E. C., Lieb J. D., MacAlpine D. M., Micklethwait G., Piano F., Snyder M., Stein L., White K. P., Waterston R. H. ; modENCODE Consortium. 2009. Unlocking the secrets of the genome. Nature. 459 : 927—930.
- Demakov S. A., Vatulina T. Yu., Babenko V. N., Semeshin V. F., Belyaeva E. S., Zhimulev I. F. 2011. Protein composition of interband regions in polytene and cell line chromosomes of *Drosophila melanogaster*. BMC Genomics. 12 : 566.

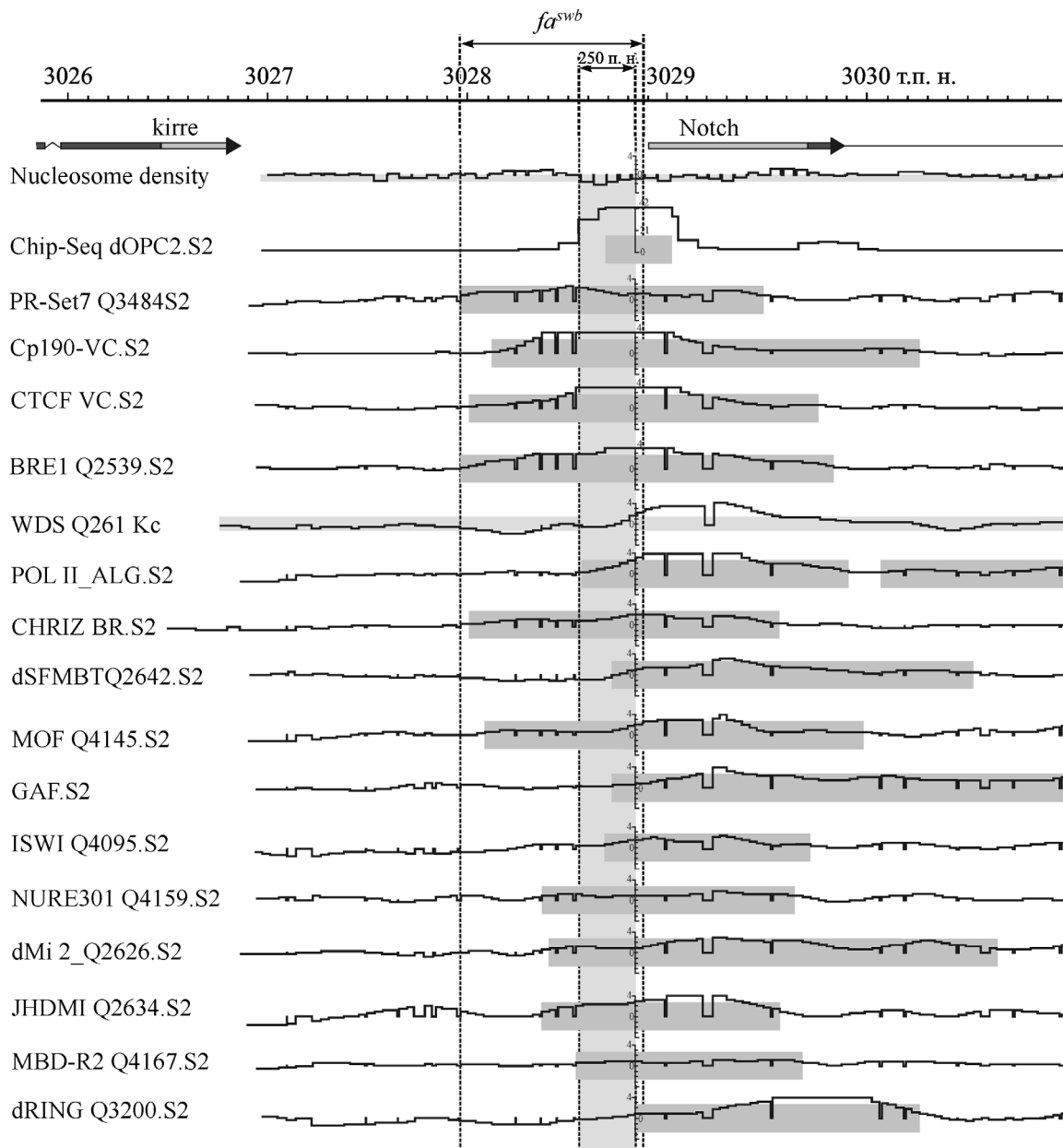


Рис. 4. Профили связывания белков в районе междиска 3C6/C7.

Границы делеции fa^{swb} и фрагмента ДНК длиной около 250 п. н., образующего междиск, отмечены вертикальными штриховыми линиями. Пики связывания белков и плотности нуклеосом (Nucleosome density) отмечены темными прямоугольниками. Пики связывания одного белка в разных типах клеток и с различными антителами сгруппированы и выделены оттенком фона. Данные приводятся по материалам проекта modENCODE (Celniker et al., 2009).

Golic M. M., Rong Y. S., Petersen R. B., Lindquist S. L., Golic K. G. 1997. FLP-mediated DNA mobilization to specific target sites in *Drosophila* chromosomes. Nucl. Acids Res. 25 : 3665—3671.

Ramos R. G. P., Grimwade B. G., Wharton K. A., Scottgale T. N., Artavanis-Tsakonas S. 1989. Physical and functional definition of *Drosophila* Notch locus by P-element transformation. Genetics. 123 : 337—348.

Semeshin V. F., Belyaeva E. S., Zhimulev I. F., Lis J. T., Richards G., Bourouis M. 1986. Electromicroscopical analysis of

Drosophila melanogaster polytene chromosomes. IV. Mapping of morphological structures appearing as results of transformation of DNA sequences into chromosomes. Chromosome. 91 : 461—468.

Shaffer C. D., Wuller J. M., Elgin S. C. R. 1994. Preparation of *Drosophila* nuclei. Methods Cell Biol. 44:185—189.

Vazquez J., Schedl P. 2000. Deletion of an insulator element by the mutation facet-strawberry in *Drosophila melanogaster*. Genetics. 155 : 1297—1311.

Поступила 26 XI 2012

STRUCTURAL FEATURES OF CHROMATIN ORGANIZATION OF 3C6/C7
INTERBAND IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* POLYTENE CHROMOSOMES

O. V. Andreenkov, E. I. Volkova, V. F. Semeshin, I. F. Zhimulev, S. A. Demakov¹

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk;

¹ e-mail: demakov@mcb.nsc.ru

This article presents an analysis of the causes of chromatin decompaction of interbands in *Drosophila* polytene chromosomes. On the example of interband 3C6/C7 of X chromosome, we investigate the ability of different DNA segments from the region to form an interband in a new genetic environment. Site-specific FLP recombination between two transposons with FRT-sites allows introducing the DNA fragments from the interband 3C6/C7 into pIcon(dv) transposon located in cytologically well-characterized 84F region of chromosome 3 followed by electron microscopic analysis of changes in the region, caused by insertion of the DNA fragments into the transposon. Thus, it has shown that the insertion of DNA fragment 276 bp in length from 3C6/C7 region into the pIcon(dv) transposon leads to the formation of a new interband between two thin bands which are represented by material of the transposon. To date, the DNA fragment is minimal known sequence that is necessary and sufficient for interband formation. In addition, the sequence containing three tandemly repeated copies of DNA fragment 0.9 kb including a fragment of 276 bp from the interband 3C6/C7 was integrated in the transposon. The presence of additional copies of the DNA fragment did not change the morphology of the resulting interband. It was shown that sites of hypersensitivity to DNase I persist in interbands formed in the new genetic environment. The data obtained allow us to start analysis of the specific factors (proteins, DNA motifs, etc.) that determine the formation of decompacted chromatin state in certain interband region and, as a whole, chromometric organization of interphase chromosomes in *Drosophila*.

Key words: transposons, site-specific recombination, genome transformation, chromatin, interband, polytene chromosomes.
