

РАЙОНЫ ПОЗДНЕЙ РЕПЛИКАЦИИ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© Т. Д. Колесникова, Н. Г. Андреевкова, Е. С. Беляева, Ф. П. Гончаров,
Т. Ю. Зыкова, Л. В. Болдырева, Г. В. Похолкова, И. Ф. Жимулев

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск;
электронный адрес: zhimulev@mcb.nsc.ru

На хромосомах *Drosophila melanogaster* выделяют около 240 специфических районов, которые характеризуются репликацией в самом конце S-фазы, репрессивным состоянием хроматина, низкой плотностью генов, длинными межгенными интервалами и большим содержанием тканеспецифичных генов. В политенных хромосомах около четверти этих районов не успевает реплицироваться полностью, в результате чего образуются зоны, представленные меньшим числом нитей ДНК. При исследовании 60 районов, демонстрирующих наиболее выраженную недорепликацию, было обнаружено, что у видов рода *Drosophila* порядок генов в этих районах консервативен. Это позволяет предполагать существование эволюционных механизмов, направленных на поддержание целостности таких районов.

Ключевые слова: *Drosophila*, поздняя репликация, политенные хромосомы, недорепликация, интеркалярный гетерохроматин, синтенные блоки.

Принятые сокращения: ИГХ — интеркалярный гетерохроматин, СЖ — слюнные железы, УКР -ультраконсервативные районы.

В эукариотических клетках синтез ДНК подвержен точной пространственно-временной регуляции, что необходимо для поддержания стабильного эпигенетического состояния хроматиновых доменов, а также целостности генома в клеточных поколениях. Политенные хромосомы слюнных желез (СЖ) *Drosophila melanogaster* стали в свое время одной из первых экспериментальных моделей для исследования пространственно-временных закономерностей репликации. Эксперименты по импульсному включению меченого предшественника ДНК (^3H -тимидина), проведенные еще в 1970-е годы, показали, что в политенных хромосомах СЖ первыми включают метку междиски и пuffed, затем наступает фаза сплошного мечения, когда реплицируются все районы хромосом, а в конце S-периода ^3H -тимидин включается только в прицентромерный гетерохроматин и отдельные районы на плечах хромосом. Во всех плечах политенных хромосом СЖ *D. melanogaster* дикого типа обнаруживается примерно 240 таких поздно реплицирующихся сайтов. Около четверти этих районов могут образовывать «разломы» при изготовлении цитологических препаратов политенных хромосом, что является следствием неполной политенизации части последовательностей ДНК (Zhimulev et al., 2003). Оказалось, что эти недореплицированные районы соответствуют дискам интеркалярного гетерохроматина (ИГХ), которые были названы так еще в 1939 г. Б. Кауфманом из-за морфологического сходства с прицентромерным гетерохроматином (Kaufmann, 1939). Это историческое название мы используем и сейчас.

В настоящее время известны как минимум три фактора, которые приводят к недорепликации ДНК в поздно-

реплицирующихся районах политенных хромосом. Во-первых, это особенности клеточного цикла в клетках СЖ. В этих клетках отсутствует фаза «поздней репликации» в значении этого термина для митотического клеточного цикла, и S-фаза заканчивается на стадии, соответствующей средней S-фазе митотического цикла (Lilly, Spradling, 1996), что приводит к недорепликации позднореплицирующихся районов. Во-вторых, недавно было показано, что в районах недорепликации политенных хромосом СЖ дрозофилы практически отсутствуют ориджины репликации, т. е., эти районы реплицируются вилками репликации, приходящими из соседних областей (Sher et al., 2012). Третьим фактором является наличие в клетках белка SUUR. Политенизация ДНК во всех районах ИГХ и в некоторых прицентромерных районах полностью восстанавливается на фоне мутации *SuUR* (Belyaeva et al., 1998). Это связано с тем, что у мутантов эти районы заканчивают репликацию быстрее (Zhimulev et al., 2003), что, вероятно, обеспечивается способностью белка SUUR влиять непосредственно на скорость движения репликационных вилок. Недавно было показано, что мутация *SuUR* увеличивает скорость движения вилок репликации при амплификации хорионовых генов в фолликулярных клетках яичников дрозофилы (Sher et al., 2012).

Белок SUUR — это хроматиновый белок, который связывается непосредственно с районами поздней репликации в политенных хромосомах СЖ, причем характер связывания меняется в течение клеточного цикла. В фазе G и ранней S-фазе SUUR на плечах хромосом не выявляется, в то время как на поздних стадиях S-фазы его распределение повторяет распределение белка PCNA —

маркера репликационных вилок. Можно предполагать, что SUUR тормозит продвижение репликационной вилки и тем самым приводит к недорепликации наиболее позднореплицирующихся районов.

Неполная политенизация ДНК в политенных хромосомах СЖ позволила локализовать 60 наиболее позднореплицирующихся районов на физической карте генома дрозофилы с помощью определения числа копий генов на политенных хромосомах в масштабах всего генома (Belyakin et al., 2005). Оказалось, что 80 % этих районов соответствуют районам поздней репликации в клетках Кс (культуре клеток дрозофилы эмбрионального происхождения), а степень политенизации на хромосомах СЖ обратно коррелирует с интенсивностью связывания SUUR в клетках Кс (Pindyurin et al., 2007). Все это указывает на принципиальное сходство организации хроматина в политенных хромосомах СЖ и клетках Кс.

Следующий шаг к установлению границ доменов ИГХ на молекулярной карте хромосом был сделан на основании накопленных знаний о молекулярном содержании междисков политенных хромосом и данных проекта modENCODE. Используя полученную в рамках проекта информацию о распределении белков, характерных для междисков политенных хромосом в культуральных клетках дрозофилы, мы с гораздо более высокой точностью определили границы 60 районов ИГХ на геномной карте дрозофилы (Belyaeva et al., 2012). Это позволило провести анализ молекулярной организации индивидуальных районов ИГХ и сравнить особенности соответствующего хроматина в разных тканях.

Исследования свойств ДНК районов недорепликации показали, что в отличие от прицентромерных районов здесь нет значительных различий по составу GC или содержанию повторенных последовательностей (Belyakin et al., 2005). Для районов ИГХ характерны сниженная плотность генов, длинные межгенные интервалы и обогащение тканеспецифичными генами (Belyakin et al., 2010). Исследования организации хроматина этих районов показали, что зоны недорепликации в политенных хромосомах СЖ соответствуют протяженным доменам репрессивного хроматина в клетках Кс (Filion et al., 2010).

Определение границ районов ИГХ на геномном уровне позволило исследовать вопрос эволюционной консервативности этих районов. В качестве показателя консервативности мы использовали размеры синтенных блоков, выявленных при сравнении геномов девяти видов рода *Drosophila* (Von Grotthuss et al., 2010). Для построения синтенных блоков были использованы не гены напрямую, а «независимые генные якоря» (independent gene anchors, или IGA), которые не учитывают размеров гена. Каждый из якорей соответствует одному гену или группе физически связанных (перекрывающихся) генов и считается одной эволюционной единицей (Von Grotthuss et al., 2010). В состав синтенных блоков вошли 9193 IGA, включающие в себя 10 733 гена. Следует уточнить, что в цитированной работе представлены три варианта деления генома на синтенные блоки, которые различаются по строгости определения синтении. Мы в своих исследованиях использовали только один вариант, в котором требуется строгое соответствие порядка генов, но не учитывается их взаимная ориентация.

Мы показали, что синтенные блоки, пересекающие районы ИГХ, включают в себя в среднем большее количество генов. Кроме того, мы обнаружили, что гены внутри района ИГХ имеют тенденцию составлять единый

синтенный блок, и границы такого синтенного блока часто практически соответствуют границам самого района ИГХ. Таким образом, мы предположили, что районы ИГХ характеризуются пониженной плотностью точек разрывов хромосомных перестроек. В целом наши данные хорошо согласуются с недавно опубликованной работой (Ranz et al., 2012), демонстрирующей, что районы, связывающие белки SUUR и Lam, обладают в среднем большей эволюционной стабильностью, чем районы, не связывающие эти белки.

Для проверки гипотезы о консервативности порядка генов в районах ИГХ мы решили проанализировать соответствие между районами ИГХ и 22 районами, которые были выделены авторами работы (Von Grotthuss et al., 2010) как ультраконсервативные районы (УКР) — синтенные блоки с максимальным количеством генов (20—46 IGAs). Часть УКР пересекается с такими районами ИГХ, для которых ранее были установлены геномные координаты. Для определения локализации на хромосомах остальных УКР мы провели цитологическое картирование при помощи флуоресцентной гибридизации *in situ*. Оказалось, что только 3 УКР не локализируются в позднореплицируемых районах. Это подтверждает склонность синтенных блоков с большим количеством генов располагаться в районах ИГХ.

Однако далеко не все районы ИГХ пересекаются с синтенными блоками, содержащими большое количество генов. Это вполне ожидаемо, если принять во внимание, что для районов ИГХ характерна пониженная плотность генов. Учитывая обнаруженную нами корреляцию расположения ИГХ и синтенных блоков с большим количеством генов, мы предположили, что районы ИГХ склонны содержать не просто синтенные блоки с повышенным содержанием генов, а физически длинные синтенные блоки.

Чтобы проверить это предположение, мы отсортировали синтенные блоки по физической длине в геноме *D. melanogaster* и показали, что из 2683 блоков все 30 самых длинных соответствуют районам поздней репликации в политенных хромосомах СЖ. При этом 12 наиболее длинных блоков из самой вершины списка (383—704 т. п. о.) демонстрируют недорепликацию. Кроме того, мы обнаружили, что содержание синтенных блоков, длиной более 100 т. п. о. в ИГХ примерно в 5 раз выше, чем в среднем по геному. Таким образом, можно сделать вывод о том, что расположение физически длинных синтенных блоков коррелирует с районами ИГХ еще более явно, чем расположение синтенных блоков с большим содержанием генов.

Таким образом, мы видим, что районы ИГХ эволюционно консервативны с точки зрения порядка генов. Кроме того, недавно была показана обогащенность ИГХ высококонсервативными некодирующими элементами (HCNEs) (Filion et al., 2010), которые, вероятно, могут участвовать в регуляции транскрипции генов (Engstrom et al., 2007). Это позволяет предполагать, что в эволюции действует отбор на поддержание этих кластеров неразрывными. В то же время есть данные о том, что нейтральная эволюция в районах ИГХ идет быстрее, чем в остальном геноме. В частности, показано, что гены в позднореплицирующихся районах генома дрозофилы имеют более высокую скорость мутирования, что объясняется, вероятно, снижением эффективности систем репарации во время поздней S-фазы (Weber et al., 2012). Кроме того, в районах поздней репликации чаще возникают дубликации (Cardoso-Moreira et al., 2011).

Обобщая имеющуюся на сегодняшний день информацию, можно сказать, что районы ИГХ, т. е. наиболее позднореплицируемые районы политенных хромосом дрозофилы, — это особые домены, которые характеризуются репрессивным состоянием хроматина и репликацией ДНК в поздней S-фазе клеточного цикла не только в политенных хромосомах, но и в культуре клеток Кс. Эти районы отличаются низкой плотностью генов, длинными межгенными интервалами и содержат большую долю тканеспецифичных генов. В настоящей работе мы показали, что районы интеркалярного гетерохроматина — это районы генома с наиболее низкой вероятностью разрыва хромосомными перестройками в эволюции. Поиск эволюционных механизмов, направленных на поддержание целостности таких районов, — интересное направление для будущих исследований.

Список литературы

- Belyaeva E. S., Goncharov F. P., Demakova O. V., Kolesnikova T. D., Boldyreva L. V., Semeshin V. F., Zhimulev I. F. 2012. Late replication domains in polytene and non-polytene cells of *Drosophila melanogaster*. PLoS One. 7 : e30035.
- Belyaeva E. S., Zhimulev I. F., Volkova E. I., Alekseyenko A. A., Moshkin Y. M., Koryakov D. E. 1998. *Su(UR)ES*: a gene suppressing DNA underreplication in intercalary and pericentric heterochromatin of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 95 : 7532—7537.
- Belyakin S. N., Babenko V. N., Maksimov D. A., Shloma V. V., Kvon E. Z., Belyaeva E. S., Zhimulev I. F. 2010. Gene density profile reveals the marking of late replicated domains in the *Drosophila melanogaster* genome. Chromosoma. 119 : 589—600.
- Belyakin S. N., Christophides G. K., Alekseyenko A. A., Kriventseva E. V., Belyaeva E. S., Nanayev R. A., Makunin I. V., Kafatos F. C., Zhimulev I. F. 2005. Genomic analysis of *Drosophila* chromosome underreplication reveals a link between replication control and transcriptional territories. Proc. Nat. Acad. Sci. 102 : 8269—8274.
- Cardoso-Moreira M., Emerson J. J., Clark A. G., Long M. 2011. *Drosophila* duplication hotspots are associated with late-replicating regions of the genome. PLoS Genet. 7 : e1002340.
- Engström P. G., Ho Sui S. J., Drivenes O., Becker T. S., Lenhard B. 2007. Genomic regulatory blocks underlie extensive microsynteny conservation in insects. Genome Res. 17 : 1898—1908.
- Filion G. J., van Bemmel J. G., Braunschweig U., Talhout W., Kind J., Ward L. D., Brugman W., de Castro I. J., Kerkhoven R. M., Bussemaker H. J., van Steensel B. 2010. Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. Cell. 143 : 212—224.
- Kaufmann B. P. 1939. Distribution of induced breaks along the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. Proc. Nat. Acad. Sci. 25 : 571—577.
- Lilly M. A., Spradling A. C. 1996. The *Drosophila* endocycle is controlled by Cyclin E and lacks a checkpoint ensuring S-phase completion. Genes Develop. 10 : 2514—2526.
- Pindyurin A. V., Moorman C., de Wit E., Belyakin S. N., Belyaeva E. S., Christophides G. K., Kafatos F. C., van Steensel B., Zhimulev I. F. 2007. SUUR joins separate subsets of PcG, HP1 and B-type lamin targets in *Drosophila*. J. Cell Sci. 120 : 2344—2351.
- Ranz J. M., Diaz-Castillo C., Petersen R. 2012. Conserved gene order at the nuclear periphery in *Drosophila*. Mol. Biol. Evol. 29 : 13—16.
- Sher N., Bell G. W., Li S., Nordman J., Eng T., Eaton M. L., Macalpine D. M., Orr-Weaver T. L. 2012. Developmental control of gene copy number by repression of replication initiation and fork progression. Genome Res. 22 : 64—75.
- Von Grotthuss M., Ashburner M., Ranz J. M. 2010. Fragile regions and not functional constraints predominate in shaping gene organization in the genus *Drosophila*. Genome Res. 20 : 1084—1096.
- Weber C. C., Pink C. J., Hurst L. D. 2012. Late-replicating domains have higher divergence and diversity in *Drosophila melanogaster*. Mol. Biol. Evol. 29 : 873—882.
- Zhimulev I. F., Belyaeva E. S., Makunin I. V., Pirrotta V., Volkova E. I., Alekseyenko A. A., Andreyeva E. N., Makarevich G. F., Boldyreva L. V., Nanayev R. A., Demakova O. V. 2003. Influence of the *SuUR* gene on intercalary heterochromatin in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. Chromosoma. 111 : 377—398.

Поступила 26 XI 2012

LATE-REPLICATING REGIONS IN SALIVARY GLAND POLYTENE CHROMOSOMES OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

T. D. Kolesnikova, N. G. Andreyenkova, E. S. Belyaeva, F. P. Goncharov, T. Yu. Zykova, L. V. Boldyreva, G. V. Pokholkova, I. F. Zhimulev

Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk;
e-mail: zhimulev@mcb.nsc.ru

About 240 specific regions that are replicated at the very end of the S-phase have been identified in *D. melanogaster* polytene chromosomes. These regions have a repressive chromatin state, low gene density, long intergenic distances and are enriched in tissue specific genes. In polytene chromosomes, about a quarter of these regions have no enough time to complete replication. As a result, underreplication zones represented by fewer DNA copy number, appear. We studied 60 chromosome regions that demonstrated the most pronounced underreplication. By comparing the location of these regions on a molecular map with syntenic blocks found earlier for *Drosophila* species by von Grotthuss et al., 2010, we have shown that across the genus *Drosophila*, these regions tend to have conserved gene order. This forces us to assume the existence of evolutionary mechanisms aimed at maintaining the integrity of these regions.

Key words: *Drosophila*, late replication, polytene chromosomes, underreplication, intercalary heterochromatin, synteny blocks.