

ХРОМОСОМНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА У ДРОЗОФИЛЫ

© И. Ф. Жимулев,¹ Е. С. Беляева, Т. Ю. Зыкова (Ватолина), В. Ф. Семешин,
С. А. Демаков, О. В. Демакова, Ф. П. Гончаров, В. А. Хорошко,
Л. В. Болдырева, Е. Б. Козога, Г. В. Похолкова

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск;

¹ электронный адрес: zhimulev@mcb.nsc.ru

В результате обработки биоинформатических баз данных по локализации в геноме дрозофилы структурных белков, модификаций гистонов, ДНКаз-гиперчувствительных районов, ориджин репликации (программа modEncode) и их цитологической привязки к структурам политенных хромосом показано, что два типа интерфазных хромосом — политенные слюнных желез и митотически делящиеся из клеточных линий — демонстрируют идентичный рисунок дисков и междисков, т. е. одинаковую локализацию и протяженность на физической карте составляющей их ДНК, а также одинаковые наборы белков в их структуре. В междисках обоих типов хромосом располагаются белки, контролирующие инициацию транскрипции (РНК-полимераза II, факторы транскрипции), репликативного комплекса (ORC2), белки, модифицирующие нуклеосомы (wds, nurf), а также белки инсуляторных комплексов (BEAF); в междисках понижена плотность распределения нуклеосом и гистона H1, а также локализованы ДНКаз I-гиперчувствительные районы. Таким образом, у дрозофилы как политенные, так и интерфазные хромосомы митотически делящихся клеток построены по общему принципу, и политенные хромосомы являются точной моделью интерфазных хромосом. Междискам хромосом принадлежит важнейшая роль в процессах инициации транскрипции и репликации. Междиски хромосом являются местами расположения 5'-областей генов; при этом 3'-части генов располагаются в соседних дисках. Постоянство деконденсации регуляторных участков генов в междисках приводит к выводу о том, что эти гены постоянно функционируют, т. е. в них расположены гены домашнего хозяйства. Крупные диски интеркалярного гетерохроматина, как правило, полигенны; средние части дисков заполнены генами, не имеющими контактов с прилежащими междисками. Эти гены, как правило, тканеспецифичны.

Ключевые слова: политенные хромосомы, диски, междиски, интеркалярный гетерохроматин, *Drosophila melanogaster*, гены домашнего хозяйства.

Политенные хромосомы справедливо рассматриваются в качестве наилучшей модели интерфазных хромосом (Zhimulev, 1999). Тем не менее целый ряд нерешенных проблем до сих пор не позволяет принять это заключение полностью. Политенные хромосомы имеют гигантские размеры и характерную поперечную исчерченность (темные диски, состоящие из конденсированного материала, и деконденсированные светлые междиски). Поскольку интерфазные хромосомы митотически делящихся соматических и половых клеток в силу небольших размеров недоступны для цитологического анализа, неизвестно, существует ли у них дисковый рисунок. Что касается самих политенных хромосом, наиболее ключевые вопросы их молекулярно-генетической организации также не решены. До последнего времени не существовало метода, позволяющего определить протяженность ДНК в дисках и междисках, а также их координаты на физической карте из-за отсутствия подходов для картирования границ цитологических структур на физической карте ДНК.

Нами разработан метод одновременной маркировки материала междисков как на цитологической карте политенных хромосом, так и на физической карте ДНК. Основан он на том, что при встраивании в геном транспо-

зонов их ДНК находится в конденсированном состоянии, в результате чего формируются новые диски. При этом если встраивание произошло в уже существующий диск политенной хромосомы, конденсированный материал транспозона сливается с конденсированным материалом диска-реципиента и визуально не выявляется. При встраивании транспозона в междиск его материал становится хорошо заметным и выявляется под электронным микроскопом как новый диск. Место встройки транспозона картировано на молекулярной карте, поэтому оно привязывает к ней междиск-реципиент, что позволяет изучать молекулярно-генетические особенности его организации (Semeshin et al., 1986; Demakov et al., 2011).

В последние годы появились объемные данные о высокоточной локализации многих белков как на цитологическом уровне в политенных хромосомах, так и на молекулярном — в интерфазных хромосомах клеточных линий (см. обзор: Zhimulev et al., 2012). Особенно существенные данные получены в рамках программы «модЭнкод» («энциклопедия элементов ДНК у модельных организмов») (Celniker et al., 2009; Kharchenko et al., 2011).

Мы использовали эту информацию для анализа молекулярной организации междисков, локализованных на

этого эксперимента убедительно свидетельствуют о том, что материал, который в интерфазных хромосомах клеточных линий определен как междиск, является междиском и в политенных хромосомах.

Для сопоставления локализации границ ДНК в дисках и междисках политенных и интерфазных хромосом клеточных линий использовали данные о генетической организации цитогенетически изученного района 10A—10B в X-хромосоме дрозофилы. Важно отметить, что самый крупный диск этого района (10A1-2) по результатам картирования точек разрывов хромосомных перестроек на физической карте ДНК маркирован наличием в его пределах двух генов — *vermilion* (*v*) и *sevenless* (*sev*), при этом ген *v* расположен примерно в 30 т. п. н. от дистального края диска, а ген *sev* — на самом проксимальном краю (Kozlova et al., 1994). Это позволяло установить положение диска 10A1-2 на физической карте. Участки локализации белков и других элементов генома в этом районе были картированы с помощью указанной выше программы. В результате были получены данные о протяженности междисков (в парах нуклеотидов) и их расположении на физической карте. Очевидно, что участки ДНК между междисками входят в состав дисков (см. рисунок).

Одновременные гибридизации фрагментов ДНК, выявленных в междисках интерфазных хромосом, и локализация антител на белки, характерные для этих междисков, в политенных хромосомах обнаружили полную идентичность локализации этих ДНК и белков в обоих типах хромосом (Vatolina et al., 2011). Сопоставление фрагментов карты политенных хромосом в районе 9F13-10B3 с локализацией дисков и междисков, выявленных по распределению специфических белков в интерфазных хромосомах клеточных культур, показало полную тождественность как их числа, так и протяженности на физической карте (см. рисунок).

В участках ДНК, соответствующих междискам изученного нами района 9F13—10B3 X-хромосомы, локализуются в основном 5'-области генов, причем эти гены направлены либо в противоположные («голова к голове»), либо в одну («хвост к голове») стороны (Vatolina et al., 2011). Части генов, расположенные ниже, лежат в прилегающих к ним разрыхленных («серых») дисках, называемых также «малыми пuffedами» (Zhimulev, Belyaeva, 1975). Кроме регуляторных частей генов в междисках иногда располагаются короткие гены целиком. Гены, чья 5'-область локализована в междисках, обычно функционируют во всех изученных к настоящему моменту тканях, клеточных линиях, стадиях развития и после разнообразных воздействий (длительным холодом, холодовым шоком, тепловым шоком, ионами металлов, этанолом, кофеином, гербицидами, ротеноном) (Chintapalli et al., 2007; Feller et al., 2011; Graveley et al., 2011; Weber, Hurst, 2011; Celniker group (modENCODE)). По всей видимости, это гены домашнего хозяйства.

Другая категория дисков — черные под фазовым контрастом, плотные диски, содержащие как в политенных хромосомах, так и в хромосомах клеточных культур многочисленные, в основном неактивные, гены, экспрессирующиеся в узкоограниченных временных и пространственных интервалах, т. е. это районы тканеспецифичных генов (подробно см.: Belyaeva et al., 2012; Колесникова и др., 2013). «Дисковые» гены, расположенные внутри черных дисков, не имеют физического контакта с междисками и регулируются тканеспецифическими факторами.

Описанные две категории дисков — «серые» с малым числом генов, имеющих регуляторные области в прилегающих междисках, и «черные» — крупные кластеры тканеспецифических генов — вероятно, не исчерпывают всех принципов организации генома. По-видимому, существуют структуры промежуточного типа, например диски, содержащие как постоянно, так и тканеспецифично экспрессирующиеся гены. Все многообразие этих элементов генома создает специфический для каждого района «рисунок дисков», который позволяет идентифицировать эти районы на цитологическом уровне. В тестируемом районе 10A1-2—10B1-2 в настоящей работе эти группы дисков легко выявляются визуально: «черные» диски 10A1-2 и 10B1-2 имеют почти 200-кратную степень упаковки ДНК, а «серые» — примерно 40-кратную (Zhimulev et al., 2012).

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН (проект 6.4), междисциплинарного интеграционного проекта фундаментальных исследований СО РАН (проект 51) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-31589).

Список литературы

- Vatolina T. Yu., Demakov S. A., Semeshin V. F., Makunin I. B., Babenko V. N., Belyaeva E. S., Zhimulev I. F. 2011. Идентификация и молекулярно-генетическая характеристика междисков политенных хромосом *Drosophila melanogaster*. Генетика. 47(5): 597—609.
- Колесникова Т. Д., Беляева Е. С., Андреевкова Н. Г., Гончаров Ф. П., Зыкова Т. Ю., Болдырева Л. В., Жимулев И. Ф. 2013. Районы поздней репликации политенных хромосом слонных желез *Drosophila melanogaster*. Цитология. 55 (3): 000—000.
- 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. doi: 10.1371/journal.pone.0030035.
- 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., Micklem 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.
- Chintapalli V. R., Wang J., Dow J. A. 2007. Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. Nat. Genet. 39: 715—720.
- Demakov S. A., Vatolina 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.
- Feller C., Prestel M., Hartmann H., Straub T., Soding J., Becker P. B. 2011. The MOF-containing NSL complex associates globally with housekeeping genes, but activates only a defined subset. Nucleic Acids Res. 40: 1509—1522.
- Graveley B. R., Brooks A. N., Carlson J. W., Duff M. O., Landolin J. M., Yang L., Artieri C. G., van Baren M. J., Boley N., Booth B. W., Brown J. B., Chervas L., Davis C. A., Dobin A., Li R., Lin W., Maloney J. H., Mattiuzzo N. R., Miller D., Sturgill D., Tuch B. B., Zaleski C., Zhang D., Blanchette M., Dudoit S., Eads B., Green R. E., Hammonds A., Jiang L., Kapranov P., Langton L., Perrimon N., Sandler J. E., Wan K. H., Willingham A., Zhang Y., Zou Y., Andrews J., Bickel P. J., Brenner S. E., Brent M. R., Chervas P., Gingeras T. R., Hoskins R. A., Kaufman T. C., Oliver B., Celniker S. E. 2011. The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. Nature. 471: 473—479.
- Kharchenko P. V., Alekseyenko A. A., Schwartz Y. B., Minoda A., Riddle N. C., Ernst J., Sabo P. J., Larschan E., Gorchakov A. A., Gu T., Linder-Basso D., Plachetka A., Shanower G., Tol-

storukov M. Y., Luquette L. J., Xi R., Jung Y. L., Park R. W., Bishop E. P., Canfield T. K., Sandstrom R., Thurman R. E., MacAlpine D. M., Stamatoyannopoulos J. A., Kellis M. et al. 2011. Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster*. *Nature*. 471 : 480—485.

Kozlova T. Yu., Semeshin V. F., Tretyakova I. V., Kokoza E. B., Pirrotta V., Grafodatskaya V. E., Belyaeva E. S., Zhimulev I. F. 1994. Molecular and cytogenetical characterization of the 10A1-2 band and adjoining region in the *Drosophila melanogaster* polytene X chromosome. *Genetics*. 136 : 1063—1073.

Semeshin V. F., Belyaeva E. S., Zhimulev I. F., Lis J. T., Richards G., Bourouis M. 1986. Electron microscopical analysis of *Drosophila polytene* chromosomes. IV. Mapping of morphological structures appearing as a result of transformation of DNA sequences into chromosomes. *Chromosoma*. 93 : 461—468.

Spradling A. C., Bellen H. J., Hoskins R. A. 2011. *Drosophila* P elements preferentially transpose to replication origins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 108(38) : 15 948—15 953.

Vatolina T. Yu., Boldyreva L. V., Demakova O. V., Demakov S. A., Kokoza E. B., Semeshin V. F., Babenko V. N., Goncharov F. P., Belyaeva E. S., Zhimulev I. F. 2011. Identical functional organization of cell line interphase and polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*. 6(10) : e25960.

Weber C. C., Hurst L. D. 2011. Support for multiple classes of local expression clusters in *Drosophila melanogaster*, but no evidence for gene order conservation. *Genome Biol.* 12 : R23.

Zhimulev I. F. 1999. Genetic organization of polytene chromosomes. *Adv. Genet.* 39 : 1—589.

Zhimulev I. F., Belyaeva E. S. 1975. Proposals to the problem of structural and functional organization of polytene chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 45 : 335—340.

Zhimulev I. F., Belyaeva E. S., Vatolina T. Yu., Demakov S. A. 2012. Banding patterns in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes correlate with DNA-binding protein occupancy. *BioEssays*. 34 : 498—508.

Поступила 26 XI 2012

CHROMOMERIC ORGANIZATION OF INTERPHASE CHROMOSOMES IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

I. F. Zhimulev,¹ E. S. Belyaeva, T. Yu. Zykova (Vatolina), V. F. Semeshin, S. A. Demakov, O. V. Demakova, F. P. Goncharov, V. A. Khoroshko, L. V. Boldyreva, E. B. Kokoza, G. V. Pokholkova

Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk;

¹ e-mail: zhimulev@mcb.nsc.ru

As a result of treatment of bioinformatic data on the genome localization of structural proteins, histone modifications, DNase-hypersensitive regions, replication origins (taken from modENCODE) and their cytological localization to polytene chromosome structures, it is shown here that two types of interphase chromosomes — polytene chromosomes from salivary glands and from mitotically dividing cells cultures — demonstrate identical pictures of interband/band, i. e. the same localization and length on physical map and the same sets of proteins. In the interbands of both chromosome types we find the proteins that control initiation of transcription (RNA-polymerase II, transcription factors), replication (ORC2) as well as proteins modifying nucleosome structure (WDS, NURF) and proteins of insulators (BEAF). The nucleosome density and H1 histone concentration in the interbands are depleted; localization of DNase-hypersensitive regions corresponds strictly to the interbands. So, we conclude that both polytene and cell line interphase chromosomes are arranged according to general principle and polytene chromosomes represent precise model of interphase chromosomes. The interbands play a critical role in the initiation of transcription and replication. The interbands of interphase chromosomes are the sites of 5' parts of genes, while the 3' gene ends are located in the adjacent bands. The constancy of interbands decondensation results in the conclusion that the «interbands» genes are constantly active, i. e. they contain «house-keeping» genes. The large late replicating bands contain genes that do not have direct contact to the adjoining interbands are usually polygenic and contain tissue-specific genes.

Key words: to polytene chromosomes, interband/band, interphase chromosomes, *Drosophila melanogaster*, house-keeping genes.