

## ХАРАКТЕРИСТИКА ХРОМАТИНА ТОНКИХ ДИСКОВ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© *О. В. Демакова*<sup>1,\*</sup>, *Л. В. Болдырева*<sup>1</sup>, *С. А. Демаков*<sup>1</sup>, *Ф. П. Гончаров*<sup>1</sup>,  
*О. В. Антоненко*<sup>1</sup>, *И. Ф. Жимулев*<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> *Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, 630090,*  
*и* <sup>2</sup> *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090;*

\* *электронный адрес: demakova@mail.ru*

Недавно мы разработали биоинформатический алгоритм, который выделил в геноме дрозофилы 4 типа хроматина, различающиеся по белковому составу. Это позволило предложить модель структурно-функциональной организации интерфазных политенных хромосом, которая предполагает существование корреляции между типами хроматина и морфологическими структурами политенных хромосом. Так, постоянно и повсеместно открытый тип хроматина «aquamarine» характерен для междисков, а комбинации остальных трех типов («lazarite», «malachite» и «guby») формируют диски. В данной работе мы проанализировали белковый состав, генетическую организацию и морфологические особенности 39 участков «lazarite»-хроматина в политенных хромосомах. Мы показали, что из «lazarite»-хроматина формируются тонкие «серые» диски и реже — краевые участки плотных крупных дисков. Этот тип хроматина обогащен гистоновыми модификациями и белками, связанными с активной транскрипцией на стадии элонгации, и содержит кодирующие части генов и их 3'-концы. У генов, связанных с исследованными участками «lazarite»-хроматина, паттерн экспрессии различается в зависимости от того, в каком типе хроматина располагаются их 5'-области.

Ключевые слова: дрозофила, политенные хромосомы, хроматин, флуоресцентная гибридизация *in situ*, диски.

Принятые сокращения: ИГХ — интеркалярный гетерохроматин, FISH — флуоресцентная гибридизация *in situ*, am-хроматин — «aquamarine»-хроматин, lz-хроматин — «lazarite»-хроматин, mch-хроматин — «malachite»-хроматин, gb-хроматин — «guby»-хроматин.

Динамичная организация хроматина в интерфазном ядре обеспечивает точную регуляцию транскрипции, репликации и других важных клеточных процессов. Однако остается неясным, как динамичная активность интерфазных хромосом связана с их доменной организацией и насколько стабильны домены и их границы в разных типах клеток. Политенные хромосомы слюнных желез дрозофилы с их гигантскими размерами и уникальным рисунком дисков считаются удобной моделью интерфазной хромосомы, позволяющей изучать хроматин на уровне отдельных хромосомных доменов (Zhimulev et al., 2004). В нашей лаборатории разрабатывается гипотеза о существовании единого плана организации интерфазной хромосомы в разных типах клеток. Так, было показано, что домены поздней репликации, расположенные в эухроматиновых плечах хромосом и содержащие кластеры тканеспецифичных генов, сохраняют свои границы и свойства на геномном уровне в разных тканях дрозофилы. Для этих районов интеркалярного гетерохроматина (ИГХ) характерны репрессия транскрипции и плотная упаковка хроматина (Belyakin et al., 2005; Belyaeva et al., 2012). Работы последних лет с использованием биоинформатического анализа полногеномных данных по распределению белков хроматина и гистоновых модифи-

каций позволили выделить несколько типов хроматина (Filion et al., 2010; Kharchenko et al., 2011). Мы установили, что междиски имеют специфический набор белков и что этот набор характерен для разных типов клеток (Demakov et al., 2011; Vatolina et al., 2011). Рассматривая этот белковый набор как маркер «междисковых» участков на физической карте и используя полногеномные данные по распределению белков проекта modENCODE, мы разработали свой биоинформатический алгоритм, позволяющий выделить в геноме дрозофилы 4 типа хроматина. Мы впервые соотнесли типы хроматина с морфологическими структурами политенных хромосом и предположили, что их распределение вдоль физической карты отражает общую хромомерную организацию интерфазных хромосом (Zhimulev et al., 2014). Так, свойства 32 междисков, к настоящему времени прокартированных на физической карте, оказались присущи почти всем участкам am-хроматина (ранее суап-хроматина): они являются сайтами открытого хроматина, занимаемыми 5'-областями генов, содержат белок CHRIZ, РНК-полимеразу II, маркер активного хроматина H3K4me3 и белки, участвующие в ремоделировании нуклеосом при активировании транскрипции WDS, NURF и ISWI (Zhimulev et al., 2014).

Таким образом, к настоящему времени мы имеем представление о молекулярно-генетической организации плотных дисков ИГХ и междисков. Однако в политенных хромосомах помимо этих структур имеется множество других дисков, различающихся по морфологии и ряду свойств. До сих пор их молекулярно-генетическая организация и локализация на физической карте генома неизвестны. В данной работе мы сфокусировали наше внимание на анализе одного из дискобразующих типов хроматина — «lazurite»-хроматине — и его предполагаемой связи с тонкими дисками политенных хромосом.

## Материал и методика

**FISH-картирование.** Давленные препараты политенных хромосом делали из слюнных желез личинок третьего возраста линии дрозофилы, несущей мутацию *Suppressor of Underreplication (SuUR)* (Belyaeva et al., 1998). Процедуру FISH проводили по стандартному протоколу (Ashburner et al., 2005). ДНК-пробы для гибридизации получали методом ПЦР с геномной ДНК дрозофилы с использованием специфичных праймеров (все в ориентации 5'—3') к соответствующим генам из 10 участков lz-хроматина: CG11190 — agacagatcacattgtacggca и tgggcatagtgtcgtctattcc; Trf2 — ggtacccgggattcaagtca и caatcgcgcaatcaatcccc; Trf4-1 — ctggtggtggtggtgatcgta и tacaaccgggactcaactgc; CG1354 — tgggtggcactaacgcttat и scatcctcgacggtgtagtt; ZAP3 — ggaccggattcaatagatgac и ctatgcaagctgggtcaagc; CG34408 — cgacaagtatgagtcggcc и aaggtgacggcctcctgaac; dgl1 — ggaaccgctcagtgcatfta и gtttcagcgcgtccagaattg; HP5 — gtggtgaaggtgaggaggac и gcccacctgcgtaacttga; CG2025 — gctatgcaacgagcagcag и saaacgttcgcccaggac; HERC2 — ctacctggcgacgatggca и ccgattgtcgtgccccgac.

Анализ хромосом после FISH проводили в ультрафиолетовом свете при помощи микроскопа Olympus BX-50F (Япония).

## Результаты и обсуждение

На физической карте можно выделить два основных варианта расположения участков lz-хроматина по отношению к соседним с ними типам хроматина (рис. 1). Чтобы понять, насколько точно можно предсказать тип диска и его цитологическую локализацию с помощью нашего

алгоритма, мы проанализировали две группы участков lz-хроматина.

В первую группу входило 29 участков, примыкающих одной своей границей к тем участкам am-хроматина, которые ранее уже были прокартированы как междиски (Zhimulev et al., 2014). Вторую молекулярную границу для этих предсказанных дисков мы определяли по следующему участку am-хроматина, отвечающему всем критериям междиска (Demakov et al., 2011; Vatolina et al., 2011). Мы обнаружили, что 60 % lz-участков локализуются на физической карте по варианту 1 (рис. 1, а) и все они соответствуют тонким серым дискам, как например, участок lz-хроматина, формирующий диск 84F10 (рис. 2, б, в). Остальные lz-участки располагаются по варианту 2 (рис. 1, б) и входят в состав «комбинированных» дисков. Часть таких дисков состоит из комбинации lz- и mch-типов хроматина, в длину они не превышают 16 т. п. н. и морфологически представляют собой тонкие серые диски. 7 участков, где lz-хроматин находится на краю mch/rb-хроматиновых блоков, характерных для дисков ИГХ (Zhimulev et al., 2014), соответствуют толстым плотным дискам.

Во вторую группу мы включили 10 lz-участков, выбранных случайным образом из разных районов хромосомы X. Для привязки участка физической карты к хромосомному району на уровне секции мы использовали цитологическую карту базы данных FlyBase. Для более тонкого картирования она непригодна, и далее соответствие пары «lz-участок—диск» мы предсказывали исключительно с помощью нашего алгоритма. Прокартировав 10 проб с помощью метода FISH, мы показали, что и морфологический статус дисков, и их цитологическая локализация полностью совпадают с ожидаемыми. Например, lz-участок (ген *Trf1-4*), расположенный по варианту 1, формирует тонкий серый диск 7F5-6 (рис. 1, а; 3, а—в), а lz-участок (ген *ZAP3*), расположенный по варианту 2, маркирует толстый диск 9A4 (рис. 1, б; 3, з—е).

Таким образом, 74 % изученных участков lz-хроматина соответствуют тонким серым дискам в политенных хромосомах. Эти «монохроматиновые» диски, по-видимому, представляют собой группу наиболее тонких декомпактизированных дисков, часть которых четко детектируется только на электронно-микроскопическом уровне. Однако тонкие диски могут включать в свой состав не только lz-, но и mch-хроматин. В целом lz-содержащие «комбинированные» диски могут иметь разные морфологию и свойства. Поскольку размеры самих lz-участков не-

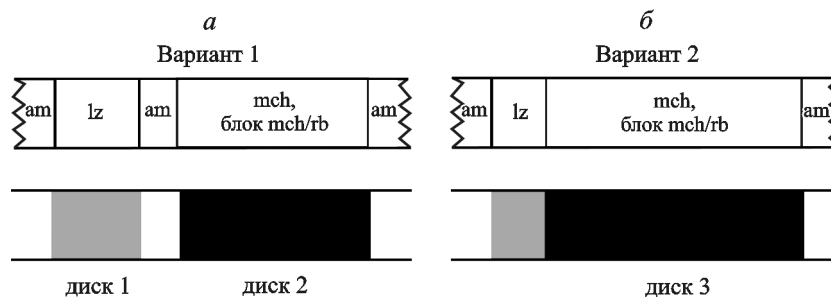


Рис. 1. Схема предсказания дискового рисунка в зависимости от расположения участка «lazurite»-хроматина на физической карте.

а — участок lz-хроматина (lz) ограничен с обеих сторон am-хроматином (am) (верхняя часть рисунка). В соответствующем районе политенной хромосомы формируются два отдельных диска, один из них — «монохроматиновый» тонкий «серый» диск из lz-хроматина, а другой — из хроматина других типов (malachite (mch) или ruby (rb)) (нижняя часть рисунка). б — участок lz-хроматина ограничен с одной стороны am-хроматином, а с другой — хроматином других типов (верхняя часть рисунка). В политенной хромосоме формируется один «комбинированный» диск, его краевая часть состоит из lz-хроматина (нижняя часть рисунка).

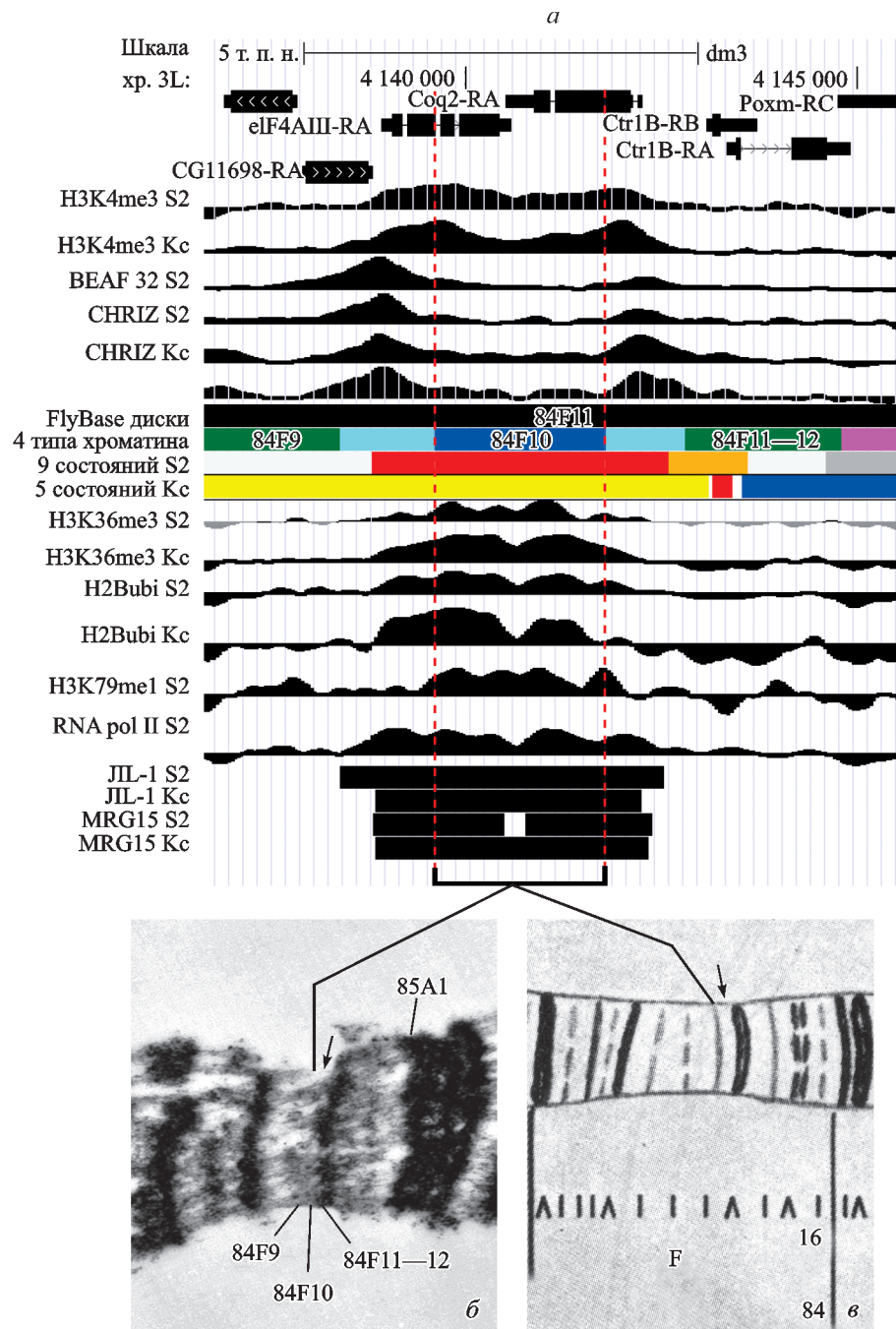


Рис. 2. Молекулярно-генетическая организация и белковый состав диска 84F10.

*a* — физическая карта хромосомного района 84F6-12. Верхняя часть — геномные координаты (версия г.5.50 базы данных FlyBase); центральная часть — распределение типов хроматина, предсказанное разными моделями: 4 типа хроматина — по Жимулеву (Zhimulev, 2014), 9 состояний — по Харченко (Kharchenko, 2011), 5 состояний — по Филиону (Filion, 2010); нижняя часть — цитологическая карта базы данных FlyBase, распределение ряда белков, характерных для активного хроматина (по данным modENCODE). Штриховыми линиями выделен участок lz-хроматина, ограниченный с дистальной стороны молекулярно картированным междиском 84F10/F11-12 (Zhimulev, 2014). *б* — электронно-микроскопическая карта района 84F (Semeshin et al., 2008). *в* — район 84F на карте Бриджеса (Lindsley, Zimm, 1992). Междиск 84F10/84F11-12 отмечен стрелками.

велики, то можно предполагать, что чем больше вклад *mch- /gb*-хроматина, тем более плотные и крупные диски формируются в политенных хромосомах.

Iz-хроматин был описан как активный хроматин, лишенный междискового белка CHRIZ (Zhimulev et al., 2014). Используя базу данных проекта modENCODE (Roy et al., 2010), мы определили белковый состав 39 lz-участков и выявили его сходство в разных клеточных линиях. Частично результаты этого анализа представлены на

рис. 2, *a*. Наряду с *am*-хроматином lz-участки перекрываются с областями активного хроматина, предсказанными другими моделями (Filion et al., 2010; Kharchenko et al., 2011), обогащены РНК-полимеразой II, а также белками MRG15 и JIL1, которые, связываясь гистоновыми модификациями H3K36me и H3K4me, участвуют в регуляции транскрипции генов и в поддержании декомпактизированной структуры хроматина (Filion et al., 2010; Regnard, 2011). Однако часть белков и гистоновых модификаций

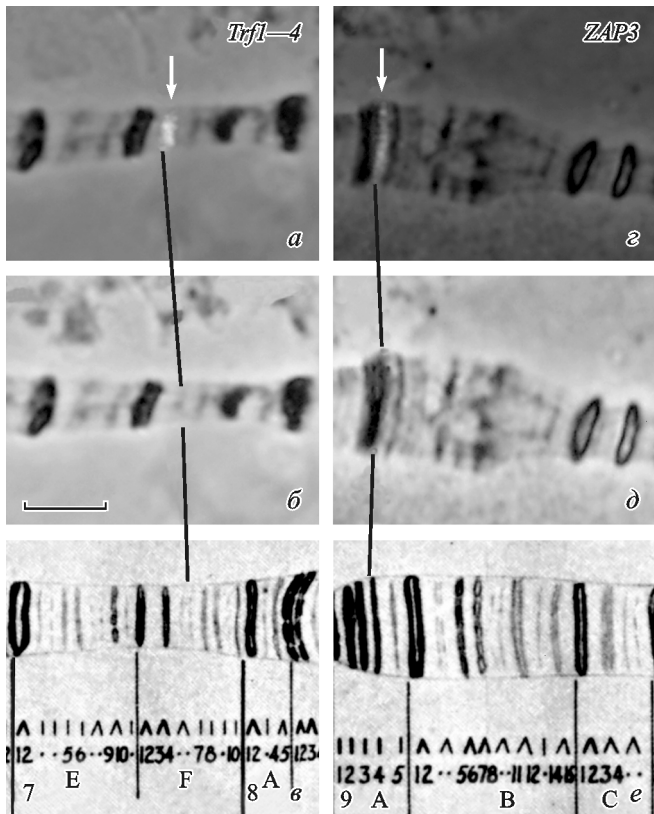


Рис. 3. FISH-картирование ДНК-проб из участков lz-хроматина на политенной хромосоме X.

*a–в* — проба ДНК из гена *Trf1-4* локализуется в тонком сером диске 7F5-6; *z–e* — проба ДНК из гена *ZAP3* локализуется в толстом плотном диске 9A4. *a, z* — совмещенное изображение гибридационной метки (белая стрелка) и фазового контраста; *б, д* — фазовый контраст; *в, e* — карта Бриджеса (Lindsley, Zimm, 1992). Шкала соответствует 3 мкм.

активного хроматина распределяется в этих двух типах хроматина комплементарно (рис. 2). Так, в отличие от *am*-участков lz-хроматин обогащен гистоновыми модификациями H3K36me3, H2Bubi и H3K79me1, связанными с активной транскрипцией на стадии элонгации и максимально представленными в экзонах генов (Filion et al., 2010; Kwak et al., 2013). И напротив, 39 участков lz-хроматина обеднены CHRIZ, H3K4me3 и другими типичными для *am*-хроматина гистоновыми модификациями и белками.

Эти результаты хорошо соотносятся как с данными о частях генов, входящих в состав lz-хроматина, так и с данными о характере экспрессии этих генов. Мы показали, что с 39 lz-участками перекрываются 63 белок-кодирующих гена, причем в lz-хроматине находятся их кодирующие части и 3'-концы. У 84 % этих генов 5'-области находятся в соседнем *am*-хроматине, и за редким исключением, это гены с постоянной и повсеместной экспрессией. Напротив, гены, у которых 5'-области находятся в lz- или *mch*-хроматине, являются ткане- и стадийноспецифичными. Таким образом, у генов, связанных с lz-хроматином, паттерн экспрессии различается в зависимости от того, в каком типе хроматина находятся их 5'-области. Дальнейшие полногеномные исследования позволяют выяснить, является ли расположение промоторов генов в постоянно открытом *am*-хроматине, а тела гена — в

lz-хроматине обязательной чертой генов «домашнего хозяйства» (housekeeping genes).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-14-00934), проведение FISH-картирования выполнено при поддержке бюджетного финансирования (0310-2014-002).

### Список литературы

Ashburner M., Golic K. G., Hawley R. S. 2005. *Drosophila: a laboratory handbook*. 2nd ed. New York; Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. Press. 566 p.

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 Yu. 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., Christophides G. K., Alekseyenko A. A., Kriventseva E. V., Belyaeva E. S., Nanayev R. A., Makunin I. V., Heidelberg Fly Array Consortium, 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. USA. 102 : 8269—8274.

Demakov S. A., Vatolina T. Y., 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. doi: 10.1186/1471-2164-12-566.

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.

Kharchenko P. V., Alekseyenko A. A., Schwartz Y. B. et al. 2011. Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster*. Nature. 471 : 480—485.

Kwak H., Lis J. T. 2013. Control of transcriptional elongation. Annu. Rev. Genet. 47 : 483—508.

Lindsley D. L., Zimm G. G. 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. San Diego: Acad. Press. 1133 p.

Regnard C., Straub T., Mitterweiger A., Dahlsveen I. K., Fabian V., Becker P. B. 2011. Global analysis of the relationship between JIL-1 kinase and transcription. PLoS Genet. 7 : e1001327.

Roy S., Ernst J., Kharchenko P. V., Kheradpour P. et al. 2010. Identification of functional elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE. Science. 330 : 1787—1797.

Vatolina T. Y., 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 : e25960.

Zhimulev I. F., Zykova T. Y., Goncharov F. P., Khoroshko V. A., Demakova O. V., Semeshin V. F., Pokholkova G. V., Boldyreva L. V., Demidova D. S., Babenko V. N., Demakov S. A., Belyaeva E. S. 2014. Genetic organization of interphase chromosome bands and interbands in *Drosophila melanogaster*. PLoS ONE. 9 : e101631.

Zhimulev I. F., Belyaeva E. S., Semeshin V. F., Koryakov D. E., Demakov S. A., Demakova O. V., Pokholkova G. V., Andreyeva E. N. 2004. Polytene chromosomes: 70 years of genetic research. Int. Rev. Cytol. 241 : 203—275.

CHARACTERISTIC OF THE CHROMATIN TYPE CORRESPONDING TO THIN «GREY» BANDS  
IN POLYTHENE CHROMOSOMES OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

O. V. Demakova,<sup>1,\*</sup> L. V. Boldyreva,<sup>1</sup> S. A. Demakov,<sup>1</sup> F. P. Goncharov,<sup>1</sup>  
O. V. Antonenko,<sup>1</sup> I. F. Zhimulev<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, 630090,  
and <sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090;  
\* e-mail: demakova@mail.ru

Recently, we developed a bioinformatic algorithm dividing drosophila genome into 4 types of chromatin which differ in protein composition. This allows us to propose a model of structural and functional organization of interphase chromosomes which postulates an existence of correlation between the chromatin types and morphological structures of polytene chromosomes. So, constantly and everywhere open chromatin type named «aquamarine» is characteristic of interbands, while the combinations of the other three types («lazurite», «malachite» and «ruby») form the bands. In this study, we characterized protein composition, genetic organization and morphological features of 39 «lazurite»-chromatin regions in polytene chromosomes. We found out that «lazurite»-chromatin usually form thin «grey» bands and more rarely — boundary portions of large bands. This type of chromatin contains coding parts and 3'-ends of genes and is enriched with proteins and histone modifications associated with active transcription at the stage of elongation. The expression patterns of these genes differ greatly depending on the type of chromatin in their 5'-regions.

**Key words:** *Drosophila melanogaster*, polytene chromosomes, chromatin, fluorescent hybridization *in situ*, bands.