

КОМБИНИРОВАННЫЙ МЕТОД КАРТИРОВАНИЯ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ НА ПРИМЕРЕ 4-Й МИКРОХРОМОСОМЫ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© Д. С. Демидова,^{1,*} С. А. Демаков,¹ Г. В. Похолкова,¹
Т. Ю. Зыкова,¹ И. Ф. Жимулев^{1, 2}

¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, 630090,

и ²Лаборатория структурной, функциональной и сравнительной геномики

Новосибирского государственного университета, Новосибирск, 630090;

* электронный адрес: dashademidova@mail.ru

Генетическая активность интерфазных хромосом связана с их структурной организацией, однако механизм этой взаимосвязи до сих пор неясен. Удобной моделью для таких исследований являются классические политенные хромосомы *Drosophila melanogaster*. Несмотря на интенсивное изучение, точное соответствие дискового рисунка большинства районов этих хромосом молекулярной карте генома дрозофилы во многом остается неизвестным. В данной работе мы решили сопоставить генетическую карту и известные молекулярные характеристики хроматина с дисковым рисунком 4-й хромосомы, самой короткой среди аутосом *D. melanogaster* и отличающейся от них эпигенетическим состоянием хроматина, который устанавливается специфичным набором белков, включая HP1, POF и EGG. С использованием биоинформатического подхода в сочетании с методом флуоресцентной *in situ*-гибридизации нами были определены геномные координаты дисков и междисков этой хромосомы. Полученные данные позволят исследовать особенности регуляции активности генов 4-й хромосомы с учетом молекулярных характеристик цитологических структур, в которых расположены эти гены.

Ключевые слова: диски и междиски политенных хромосом, 4-я хромосома *Drosophila melanogaster*, молекулярно-генетическая организация интерфазных хромосом.

Принятые сокращения: ПХ — политенные хромосомы, ЭМ — электронная микроскопия, КК — культура клеток, м. п. н. — миллион пар нуклеотидов, ГХ — гетерохроматин.

Политенные хромосомы (ПХ) *Drosophila melanogaster* являются удобной моделью для исследования интерфазных хромосом эукариот. Характерной чертой ПХ является чередование плотно конденсированных дисков и более рыхлых междисков. Благодаря уникальному дисковому рисунку каждый район ПХ имеет свое название на цитологической карте (Bridges, 1935a).

На данный момент на молекулярной карте генома *D. melanogaster* локализованы границы 32 междисков (Zhimulev et al., 2014). Для этого был использован разработанный ранее подход (Semeshin et al., 1986), основанный на электронно-микроскопическом картировании встроок *P*-транспозонов в ПХ. При встройке транспозона в хромосому происходит его компактизация. При inserции транспозона в участок, соответствующий междиску, в нем выявляется новый тонкий диск. Клонирование ДНК из участка, содержащего *P*-элемент, с прилегающими последовательностями междиска позволило с определенной точностью соотнести физические и цитологические карты для ряда междисков (Demakov et al., 1993, 2011; Semeshin et al., 2008; Vatolina et al., 2011a).

Секвенирование генома *D. melanogaster* стало основой для более детального исследования организации структурных и функциональных элементов хромосом. В проекте modENCODE (model organism Encyclopedia of

DNA Elements) (Roy et al., 2010) было проведено комплексное исследование организации генома *D. melanogaster*, в результате получены данные об организации хроматина в разных типах клеток с привязкой к физической карте хромосом *D. melanogaster*. По этим данным был определен набор белков, обогащенных в последовательностях ДНК, соответствующих междискам. На основе данных о распределении этих белков был разработан алгоритм, позволяющий определять локализацию последовательностей ДНК, соответствующих междискам, по всему геному *D. melanogaster*. С его помощью были выделены четыре типа хроматина, условно названные aquamarine, lazurite, ruby и malachite. Оказалось, что эти типы хроматина хорошо соответствуют ряду дисков и междисков ПХ, положение которых на молекулярной карте уже известно. Хроматин aquamarine занимает около 13 % генома и обогащен белками открытого хроматина. Этому типу хроматина соответствуют и 32 междиска, ранее локализованные на физической карте. Хроматин ruby занимает почти половину генома и полностью лишен белков открытого хроматина. Он соответствует черным дискам и дискам интеркалярного ГХ (гетерохроматина). Хроматин типов malachite и lazurite не показывает специфики относительно этих белков (Zhimulev et al., 2014). Таким образом, модель четырех состояний хроматина дает возмож-

ность определять локализацию и границы междисков и дисков на физической карте генома *D. melanogaster*, а также исследовать молекулярные характеристики этих морфологических структур ПХ с использованием данных полногеномных проектов.

До настоящего момента не существовало подхода к картированию целых секций ПХ. В данной работе мы впервые предлагаем комбинированный подход к определению геномных координат дисков и междисков ПХ. С использованием компьютерного моделирования, данных modENCODE, электронной микроскопии, FISH и световой микроскопии впервые была осуществлена привязка морфологических структур 4-й ПХ к физической карте генома *D. melanogaster* с точностью до диска.

4-я хромосома является самой короткой аутосомой в геноме *D. melanogaster* — имеет размер 4.2 м. п. н., но полностью политенизируется только район в 1.2 м. п. н. (Locke, McDermid, 1993), который в основном состоит из серых дисков. Бриджес (Bridges, 1935b) разделил эту часть 4-й хромосомы на две секции и буквенные подсекции 101E—102F. Однако цитологическая карта 4-й хромосомы так и не была построена, диски не получили индивидуальных номеров. 4-я хромосома во многом отличается от остальных аутосом. Она представляет собой специфический домен хроматина, содержащий активные гены, но по своим свойствам во многом похожий на ГХ.

ГХ состояние 4-й хромосомы подтверждается многими ее свойствами. При инсерции в 4-ю хромосому конструкций на основе *P*-элемента, содержащих репортерный ген *w*, в большинстве случаев возникает эффект положения мозаичного типа. Плотность повторенных последовательностей в 4-й хромосоме сходна с таковой в перичентрическом ГХ. Большая часть повторов, чередующихся с генами, — это фрагменты ДНК-транспозонов и ретровирусов (Slawson et al., 2006). В многочисленных сайтах 4-й хромосомы расположен элемент 1360, который также локализуется в прицентромерном ГХ, Y хромосоме и дисках интеркалярного ГХ (Kholodilov et al., 1988). С ней ассоциированы такие метки ГХ, как белок HP1a (Riddle et al., 2012) и метилированный лизин в 9-м положении гистона H3 (H3K9me). Уникальными характеристиками 4-й хромосомы являются белок POF (painting-of-fourth) (Larsson et al., 2001) и специфическая гистонметилтрансфераза EGG, которая обеспечивает метилирование лизина гистона H3 в 9-м положении (Seum et al., 2007).

Таким образом, целью данной работы являлась разработка подхода к картированию целых секций ПХ на молекулярной карте генома с точностью до диска на примере 4-й хромосомы *D. melanogaster*. Исследование 4-q хромосомы позволит понять, каким образом гены могут функционировать в гетерохроматиновом окружении.

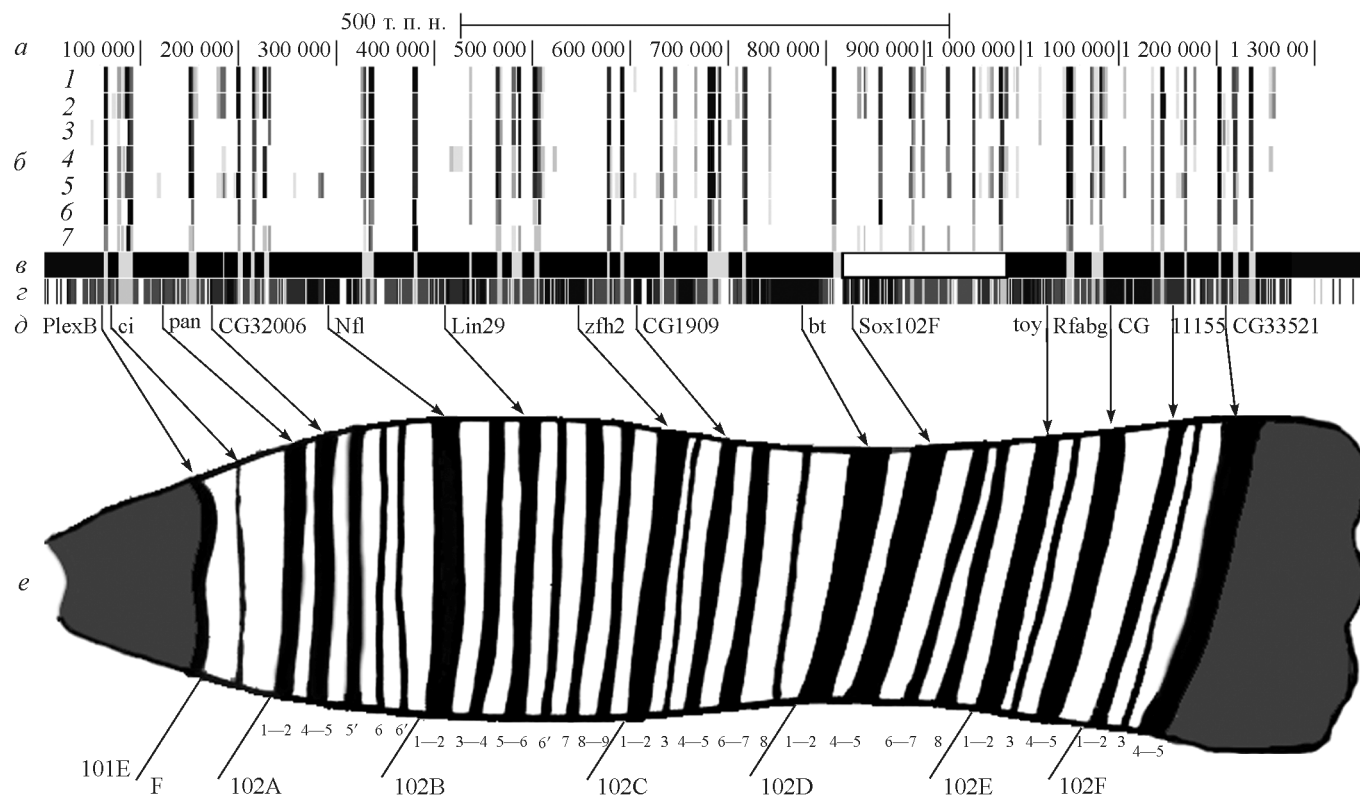


Рис. 1. Сопоставление молекулярной и цитологической карт 4-й хромосомы *D. melanogaster*.

a — геномные координаты, шкала масштаба. *б* — белки открытого хроматина: 1 — CHRIZ, КК (культура клеток) S2, антитела WR; 2 — то же, антитела BR; 3 — CHRIZ, КК Кс, антитела BR; 4 — CHRIZ, КК BG3, антитела BR; 5 — CHRIZ, КК Clone8, антитела BR; 6 — CHRIZ, КК 14-16hORemb, антитела BR; 7 — WDS, КК S2, антитела Q2691. *в* — схема дисков (черные прямоугольники) и междисков (серые прямоугольники) 4-й хромосомы, белый прямоугольник — отсутствие данных. *г* — домены четырех типов хроматина для 4-й хромосомы, насыщенность черного цвета по возрасту: aquamarine—lazarite—malachite—ruby; белые фрагменты — отсутствие данных. *д* — зонды для FISH, подписи соответствуют названиям генов — источников зондов. *е* — схематичное изображение 4-й хромосомы, стрелки показывают соответствие зондов дискам, подписи дисков выполнены в соответствии с ранее опубликованными (Saura et al., 2002).

Материал и методика

Слюнные железы выделяли из личинок третьего возраста линии *XY XY/XY; y w; SuUR^{ES}, Su(var)3-9⁰⁶*. Линия мух любезно предоставлена Е. С. Беляевой. Препараты ПХ для FISH (флуоресцентной *in situ* гибридизации) делали, как описано ранее (Zhimulev et al., 2014). FISH на ПХ выполняли, как описано ранее (Ashburner et al., 2005). Согласно модели четырех состояний хроматина было выбрано 14 участков, предположительно соответствующих дискам 4-й хромосомы, из которых были подготовлены пробы для FISH. Праймеры для ДНК-зондов были подобраны при помощи программы <http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>. Зонды были получены стандартной ПЦР и помечены методом случайной затравки.

Результаты и обсуждение

Сопоставление цитологической и физической карт 4-й хромосомы. Нами было проведено сопоставление цитологической и физической карт 4-й хромосомы. ЭМ-фотографии 4-й хромосомы для детального картирования были любезно предоставлены В. Ф. Семешиним. Подписи дисков и междисков были выполнены в соответствии с ранее опубликованными данными (Saura et al., 2002), при этом наблюдается хорошее соответствие карте Бриджеса (Bridges, 1935b).

Показано, что все 14 зондов из предсказанных моделью дисков действительно гибридизуются в дисках 4-й хромосомы. Эти диски были сопоставлены с цитологическими картами. Для уточнения картирования использовались также данные о распределении белков, характерных для междисков (CHRIZ и WDS). В результате установлены геномные координаты дисков и междисков. На рис. 1 показана схема соответствия зондов и модели четырех типов хроматина дискам 4-й хромосомы.

Детально изучен фрагмент 4-й хромосомы от диска 102B1-2 до диска 102B5-6 (рис. 2).

Зонды из генов *Nfl* и *Lin29* (рис. 2, б–з), образованные материалом компактного хроматина *guby* и *malachite* соответственно, на ПХ локализованы в дисках 102B1-2 и 102B5-6 (рис. 2, з, е–з), границы которых определяются по прилежащим участкам хроматина *aquamarine*, содержащим междиск-специфичные белки *CHRIZ* и *WDS* (рис. 2, д). Между ними находится еще один диск — 102B3-4 (рис. 2, е, з) — на молекулярной карте, состоящий в основном из хроматина *lazurite* (рис. 2, в, з).

Отмечены некоторые различия в картине дисков и междисков 4-й хромосомы на ЭМ-препаратах по сравнению с картой Бриджеса (Bridges, 1935b). В отличие от карты 1935 г., на ЭМ-изображениях не выявлено дисков 101F2, 101F3 и 102A3, но обнаружены дополнительные диски 102A5', 102A6' и 102B6'. Для морфологических структур подсеции 102D требуется дальнейшее уточнение их геномных координат, так как модель четырех со-

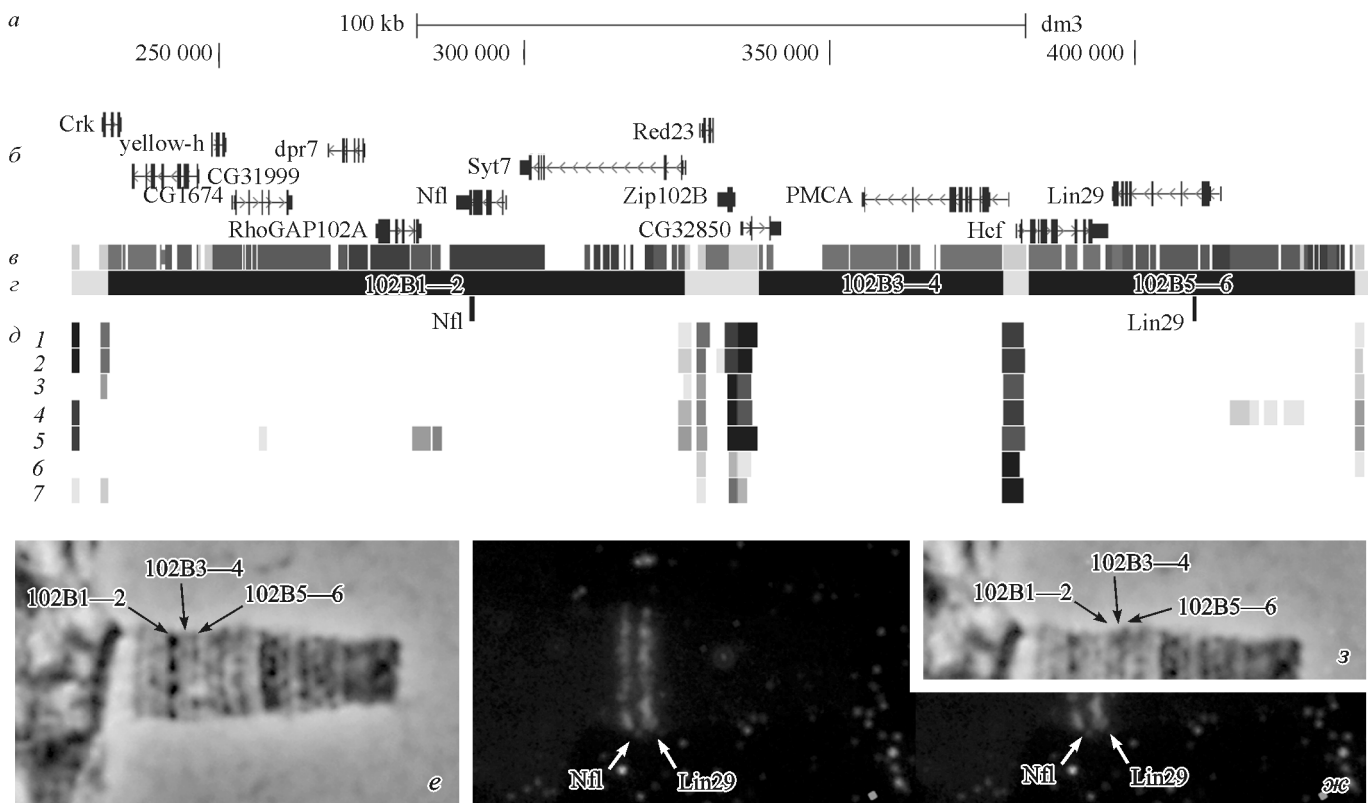


Рис. 2. Фрагмент 4-й хромосомы на молекулярной и цитологической картах.

a — геномные координаты, шкала масштаба; *б* — гены; *в* — домены четырех типов хроматина для 4-й хромосомы, насыщенность черного цвета по возрастианию: *aquamarine*—*lazurite*—*malachite*—*guby*; *белые фрагменты* — отсутствие данных. *з* — схематичное изображение дисков (*черные прямоугольники*) и междисков (*серые прямоугольники*) в масштабе геномных координат и зонды для FISH; *д* — белки открытого хроматина (см. подпись к рис. 1, б); *е* — микрофотография 4-й хромосомы в фазовом контрасте; *ж* — флуоресцентно меченные зонды из генов *Nfl* и *Lin29*; *з* — совмещение фазово-контрастного изображения 4-й хромосомы и зондов. Об. 1000×.

стояний хроматина не выявляет очевидного дискового рисунка.

В целом диски и междиски 4-й хромосомы организованы сходным образом с морфологическими структурами остальных аутосом. Видно, что междиски представлены в основном хроматином aquamarine, в них расположены 5'-концы повсеместно активных генов. Диски представлены хроматином типов lazurite, ruby и malachite. Ранее для ряда районов ПХ была показана такая же закономерность (Demakov et al., 2011; Vatolina et al., 2011b; Zhimulev et al., 2014). Модель четырех состояний хроматина, основанная на распределении белков открытого хроматина, показывает, что 4-я хромосома содержит значительную часть хроматина типов lazurite и malachite, промежуточных по уровню компактизации (Zhimulev et al., 2014). В микрохромосоме *D. melanogaster* не наблюдается такого выраженного, как в больших плечах хромосом, чередования открытого и закрытого хроматина, приблизительно соответствующего дискам и междискам.

Таким образом, с помощью комбинированного подхода были установлены геномные координаты ряда дисков и междисков 4-й хромосомы. Эти результаты дают возможность исследовать их молекулярные характеристики и генетическое содержание, а также закономерности работы генов *D. melanogaster* в окружении ГХ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-14-00934), работа по получению зондов — при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-03898).

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. 1440 p.
- Bridges C. B. 1935a. Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *J. Hered.* 26 : 60—64.
- Bridges C. B. 1935b. Cytological data on chromosome four of *Drosophila melanogaster*. *Trans. Dyn. Develop.* 10 : 463—473.
- Demakov S. A., Semeshin V. F., Zhimulev I. F. 1993. Cloning and molecular genetic analysis of *Drosophila melanogaster* interband DNA. *Mol. Gen. Genet.* 238 : 437—443.
- 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.
- Kholodilov N. G., Bolshakov V. N., Blinov V. M., Solovyov V. V., Zhimulev I. F. 1988. Intercalary heterochromatin in *Drosophila*. III. Homology between DNA sequences from the Y chromosome, bases of polytene chromosome limbs, and chromosome 4 of *D. melanogaster*. *Chromosoma.* 97 : 247—253.
- Larsson J., Chen J. D., Rasheva V., Rasmuson-Lestander A., Pirrotta V. 2001. Painting of fourth, a chromosome-specific protein in *Drosophila*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 98 : 6273—6278.
- Locke J., McDermid H. E. 1993. Analysis of *Drosophila* chromosome 4 using pulsed field gel electrophoresis. *Chromosoma.* 102 : 718—723.
- Riddle N. C., Jung Y. L., Gu T., Alekseyenko A. A., Asker D., Gui H., Kharchenko P. V., Minoda A., Plachetka A., Schwartz Y. B., Tolstorukov M. Y., Kuroda M. I., Pirrotta V., Karpen G. H., Park P. J., Elgin S. C. 2012. Enrichment of HP1a on *Drosophila* chromosome 4 genes creates an alternate chromatin structure critical for regulation in this heterochromatic domain. *PLoS Genet.* 8 : e1002954.
- Roy S., Ernst J., Kharchenko P. V., Kheradpour P., Negre N. et al. 2010. Identification of functional elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE. *Science.* 330 : 1787—1797.
- Saura A. O., Cuenca J. B., Heino T. I., de Frutos R., Sorsa V. 2002. The polytene dot chromosome of *Drosophila: D. melanogaster* and *D. subobscura*. *Chromosoma.* 111 : 273—283.
- 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.
- Semeshin V. F., Demakov S. A., Shloma V. V., Vatolina T. Y., Gorchakov A. A., Zhimulev I. F. 2008. Interbands behave as decompacted autonomous units in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Genetica.* 132 : 267—279.
- Seum C., Reo E., Peng H., Rauscher F. J., Spierer P., Bontron S. 2007. *Drosophila* SETDB1 is required for chromosome 4 silencing. *PLoS Genet.* 3 : e76.
- Slawson E. E., Shaffer C. D., Malone C. D., Leung W., Kellmann E. et al. 2006. Comparison of dot chromosome sequences from *D. melanogaster* and *D. virilis* reveals an enrichment of DNA transposon sequences in heterochromatic domains. *Genome Biol.* 7 : R15.
- Vatolina T. Yu., Demakov S. A., Semeshin V. F., Makunin I. V., Babenko V. N., Belyaeva E. S., Zhimulev I. F. 2011a. Identification and molecular genetic characterization of the polytene chromosome interbands in *Drosophila melanogaster*. *Genetika.* 47 : 597—609.
- 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. 2011b. Identical functional organization of nonpolytene 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.

Поступила 1 XII 2015

A COMBINED METHOD FOR MAPPING POLYTHENE CHROMOSOMES
ON THE EXAMPLE OF THE FOURTH MICROCHROMOSOME OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

D. S. Demidova,^{1,*} S. A. Demakov,¹ G. V. Pokholkova,¹ T. Yu. Zykova,¹ I. F. Zhimulev^{1, 2}

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, 630090,
and ² Laboratory of Structural, Functional and Comparative Genomics,
Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090;
* e-mail: dashademidova@mail.ru

Genetic activity of interphase chromosomes is associated with their structural organization, but the mechanism of these relations is still unclear. Classic polytene chromosomes of dipteran insects are a convenient model for such investigations. Despite intensive study of polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* is carried out, an exact conformity of bands and interbands to the molecular map of the genome remains unknown in most cases. For addressing this issue, the genetic map and molecular characteristics of chromatin have been compared with the banding pattern of the fourth chromosome, which is the smallest chromosome in the *D. melanogaster* genome and is different in many ways from other chromosomes. This is a unique chromatin domain of *D. melanogaster*, which is characterized by specific proteins, including HP1, POF and EGG. Matching of cytological and physical maps of the fourth chromosome has been carried out by FISH. Genomic coordinates of bands and interbands have been determined. This result makes it possible to investigate the regulation of gene activity of the fourth chromosome in the context of molecular characteristics of cytological structures in which these genes are located.

Key words: bands and interbands of polytene chromosomes, the fourth chromosome of *Drosophila melanogaster*, molecular and genetic organization of interphase chromosomes.
