

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К КАРТИРОВАНИЮ ПОЗДНО РЕПЛИЦИРУЮЩИХСЯ ДИСКОВ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ В ГЕНОМЕ ДРОЗОФИЛЫ

© Т. Д. Колесникова,^{1,2,*} И. Ф. Жимулев^{1,3}

¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, 630090,
²Кафедра молекулярной биологии Новосибирского государственного университета, Новосибирск, 630090,
и ³Лаборатория структурной, функциональной и сравнительной геномики
Новосибирского государственного университета, Новосибирск, 630090;
* электронный адрес: trotsenko@mcb.nsc.ru

Рисунок дисков и междисков политенных хромосом (ПХ) дрозофилы определяется свойствами хроматина. Недавно разработана модель четырехцветного хроматина, позволившая выделить отдельный хроматин, включающий в себя все междиски. В рамках этой модели все ранее прокартированные на геномной карте районы интеркалярного гетерохроматина представлены в значительной степени хроматином типа *guby*. В настоящей работе на примере дистального участка ПХ 2R мы демонстрируем, что все «черные» поздно реплицирующиеся диски ПХ также содержат хроматин этого типа. Мы предлагаем комплексный подход, сочетающий использование данных по картированию аннотированных генов из базы данных FlyBase, новых подходов по предсказанию цитогенетических структур в геноме по особенностям их белкового состава и данных по последовательности репликации дисков ПХ. Этот метод позволяет установить соответствие «черных» поздно реплицирующихся дисков цитологической карты ПХ с молекулярной картой с высокой точностью.

Ключевые слова: политенные хромосомы, диски, междиски, поздняя репликация, цитологическая карта, интеркалярный гетерохроматин, модель четырехцветного хроматина.

Принятые сокращения: ПХ — политенные хромосомы слюнных желез, ИГХ — интеркалярный гетерохроматин.

Благодаря своему гигантскому размеру и характерному рисунку междисков и дисков политенные хромосомы слюнных желез дрозофилы (ПХ) — очень удобный инструмент цитогенетических исследований. В последние годы показано, что рисунок дисков и междисков определяется свойствами хроматина. Более того, свойства хроматина, лежащие в его основе, сохраняются в разных типах клеток дрозофилы (Vatolina et al., 2011). Разработан компьютерный алгоритм, который на основании локального обогащения открытого хроматина белками, характерными для междисков, подразделяет геном дрозофилы на четыре дискретных типа хроматина, первоначально названных «cyan», «blue», «green» и «magenta» (Zhimulev et al., 2014). Позднее названия изменены на «aquamarine», «lazarite», «malachite» и «guby» соответственно. Все изученные ранее междиски соответствуют хроматину типа aquamarine, и предполагается, что в него попадают все междиски ПХ дрозофилы (Zhimulev et al., 2014).

Все диски ПХ по морфологическим особенностям можно достаточно четко разделить на два класса — «серые» и «черные». Первые — относительно тонкие компактные структуры, они не всегда хорошо видны на световом уровне, но четко выявляются на электронно-микроскопических срезах ПХ. «Серые» диски реплицируются в S-фазе очень рано (Zhimulev et al., 2014).

«Черные» диски, хорошо видимые даже в световой микроскоп, лежат в основе классических карт ПХ (они всегда лежат в начале секций и подсекций) (Bridges, 1935). Они, как правило, более толстые, представлены очень компактным материалом, реплицируются в конце S-фазы, и если препарат не слишком контрастен, то выделяются черным цветом на общем сером фоне. Среди «черных» дисков отдельно выделяются диски интеркалярного гетерохроматина (ИГХ) — самые большие плотные «черные» диски, соответствующие кластерам генов в состоянии репрессии. Гены из районов ИГХ реплицируются очень поздно и в ПХ недореплицированы. Это свойство использовали для их картирования на молекулярной карте генома *Drosophila melanogaster* (Belyakin et al., 2005; Belyaeva et al., 2012).

Показано, что в рамках модели четырехцветного хроматина диски ИГХ представлены в значительной степени хроматином типа *guby* с вкраплениями относительно коротких участков хроматина malachite. Хроматин *guby* выделили как участки генома, где белки открытого хроматина, характерные для междисков, практически отсутствуют. В геноме присутствует значительно больше участков этого хроматина, чем районов ИГХ. Мы предположили, что все они соответствуют «черным» поздно реплицирующимся дискам ПХ.

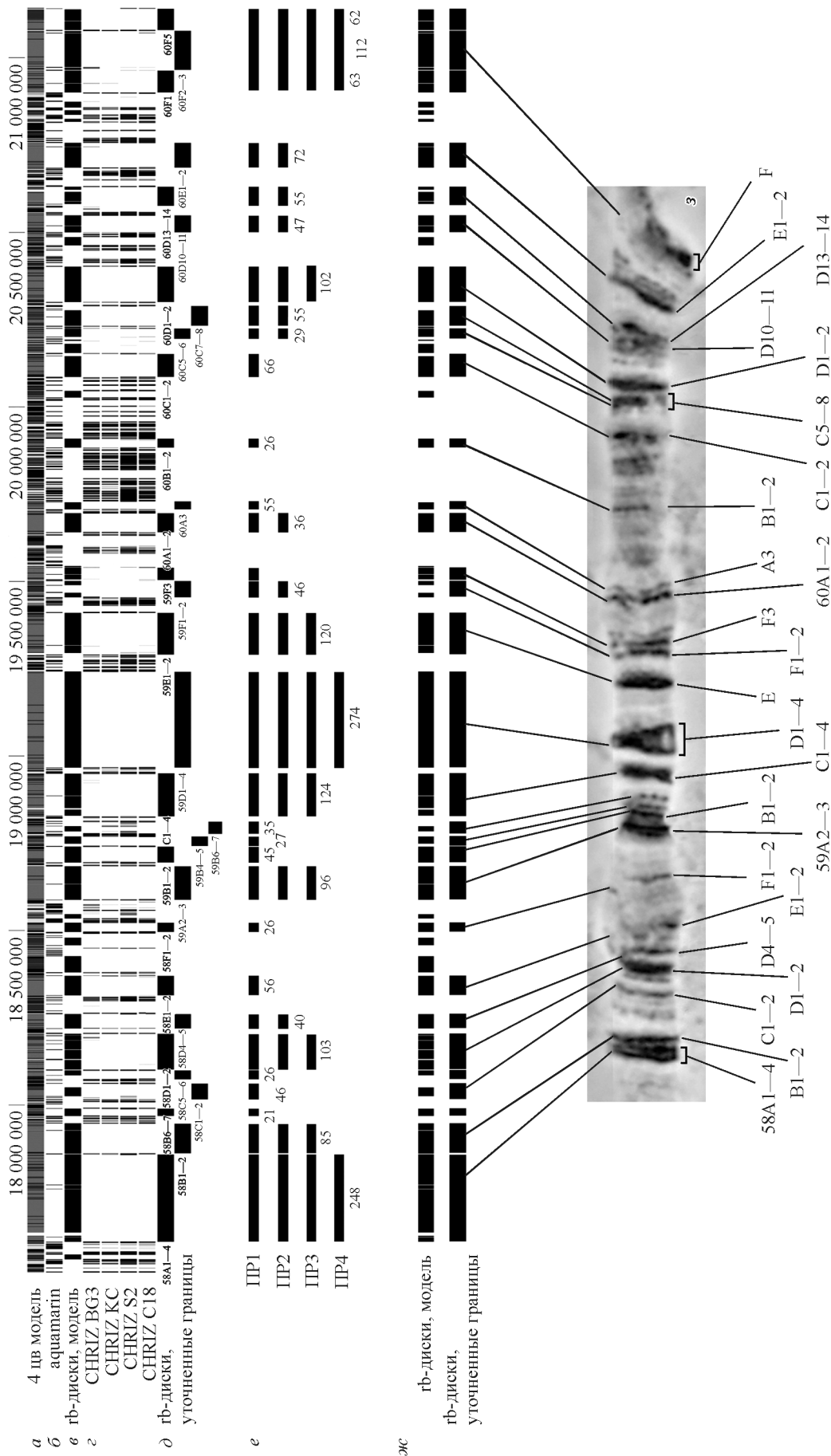


Рис. 1. Локализация поздно реплицирующихся дисков из районов 58—60 политенной хромосомы (ПХ) 2R на молекулярной карте генома *Drosophila melanogaster*. а — модель четырех состояний хроматина. б — интервалы, соответствующие хроматину ациатини. в — результаты предсказания дисков, содержащих хроматин тубу (тб-дисков), на основании модели четырехцветного хроматина (интервалы между участками хроматина ациатини, включающие хроматин тубу). г — пикеты локализации белка CHRIZ в четырех типах клеток (Bg3, Kc, S2, C18); д — результаты предсказания дисков и групп тб-дисков на основании модели четырехцветного хроматина с применением дополнительных критериев междиска. Названия дискам присвоены по результатам анализа данных по картированию аннотированных генов из базы данных FlyBase (см. текст). е — последовательность завершения репликации для предсказанных нами тб-дисков, построенная на основании цитологических данных. ПР1—ПР4 — последовательные стадии поздней репликации (см. рис. 2). Для каждой стадии приведены все диски, в которых на этой стадии еще выявляются антитела к PCNA. Для упрощения картины на схеме не отражена задержка в инициации репликации, наблюдаемая для некоторых наиболее толстых дисков. Цифры внизу обозначены длины соответствующих дисков в т. п. н. жс — соответствие предсказанных дисков «черным» дискам ПХ. Можно видеть, что все «черные» диски в районе 58—60 ПХ 2R соответствуют предсказанным нами тб-дискам. При этом более толстые диски соответствуют более протяженным интервалам в геноме. з — фрагмент соответствующего участка хромосомы, окрашенной ацетоорсеином (*in situ* приведены названия «черных» дисков).

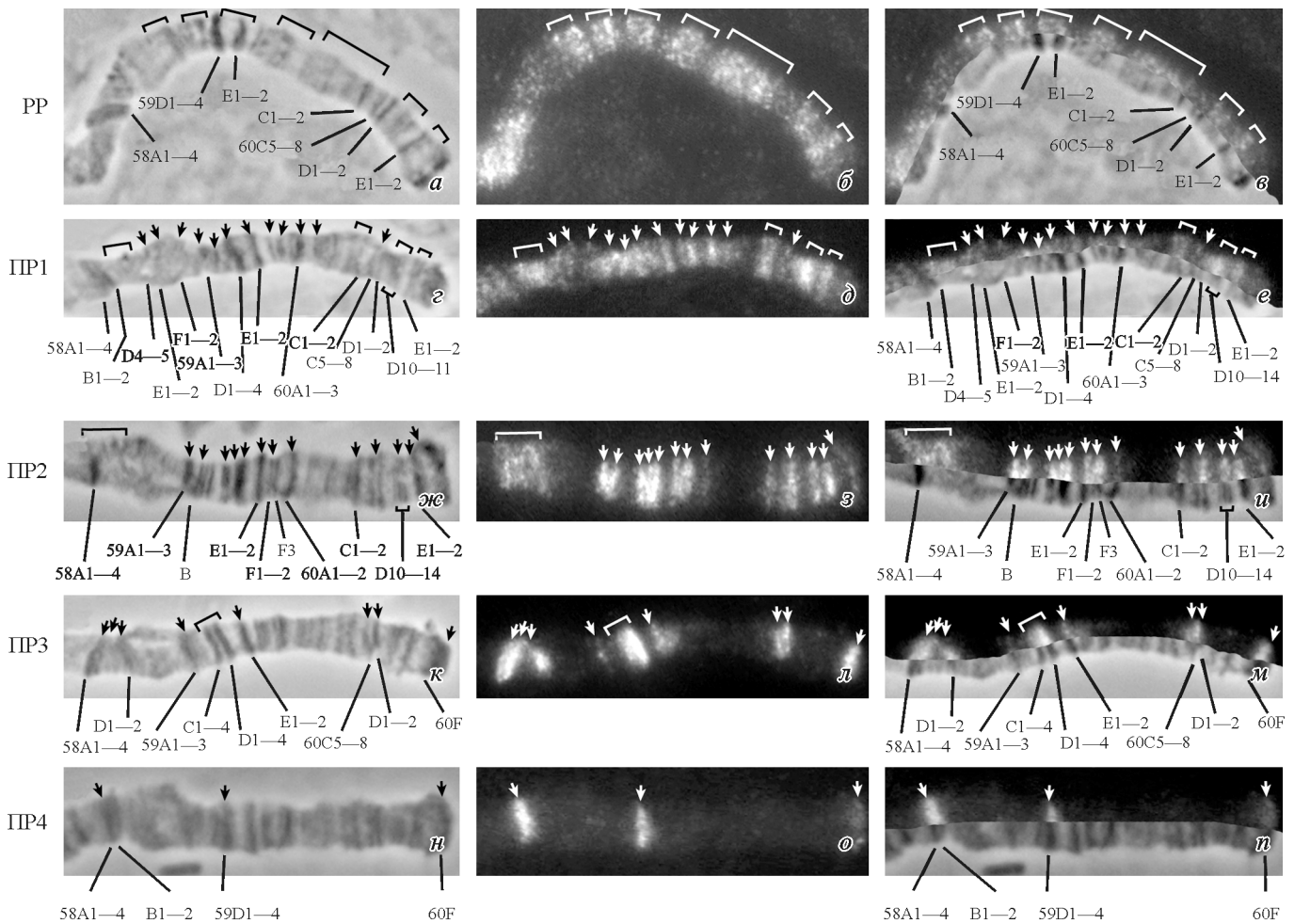


Рис. 2. Последовательность репликации дисков в дистальном участке политенной хромосомы 2R.

a, g, j, k, n — фазовый контраст; *б, д, з, л, о* — иммуноокрашивание антителами к белку PCNA; *в, е, u, м, n* — фазовый контраст/PCNA. PP (ранняя репликация) и PП1—4 (четыре стадии поздней репликации) — пять стадий S-фазы. Стрелками и скобками обозначены диски и группы дисков соответственно, в которых обнаруживается сигнал иммуноокрашивания.

Для проверки этой гипотезы мы выделили в геноме все участки, не относящиеся к хроматину aquamarine, т. е. относящиеся к дискам, и полученные интервалы отсортировали по наличию хроматина *guby*. На рис. 1 в качестве примера приведен участок геномной карты, соответствующий дистальному участку хромосомы 2R (районы 58—60 ПХ 2R), на котором выявляется 69 таких интервалов (рис. 1, *a—в*).

Поскольку не все участки хроматина aquamarine относятся к междискам, для уточнения границ предсказанных дисков мы воспользовались дополнительными критериями, определяющими междиски (Ватолина и др., 2011; Boldyreva et al., 2016). Согласно ранее опубликованным данным, фрагмент aquamarine считается с высокой вероятностью междиском, если в нем присутствуют пики связывания белка CHRIZ в разных типах клеток. На рис. 1, *г* можно видеть, что не все фрагменты aquamarine обладают этим свойством. Кроме того, большинство проанализированных междисков содержат 5'-области активно транскрибирующихся генов (Zhimulev et al., 2014). Поэтому еще одним критерием междиска с высокой вероятностью мы приняли наличие первого типа хроматина (активные промоторы) по модели проекта ModEncode (Kharchenko et al., 2011) одновременно и в клетках Bg3, и в клетках S2.

В результате для обозначенного на рисунке дистального района хромосомы 2R мы получили 31 интервал (рис. 1, *д*). Из них 24 ограничены участками хроматина aquamarine, в которых присутствуют все перечисленные критерии междисков. Для этих интервалов мы можем полагать, что они соответствуют отдельным дискам или группам дисков ПХ, при этом разрешение нашего картирования их границ соответствует характерному размеру междиска, т. е. порядка 1—2 т. п. н.

Чтобы установить, какому конкретному диску или группе дисков ПХ соответствуют предсказанные диски, мы использовали данные по картированию аннотированных генов из базы данных FlyBase, как уже делали ранее (Andreyenkova et al., 2013). Для 17 из 31 диска соответствие удалось установить с хорошей точностью: для каждого есть как минимум две независимые ссылки на данные по картированию генов в конкретный диск ПХ, при этом картирование генов в прилегающих районах подтверждает соответствие именно этому диску. В результате нам удалось построить непротиворечивую карту, на которой все предсказанные нами *guby*-содержащие диски (*gb*-диски) соответствуют дискам на карте ПХ (рис. 1, *ж*). На рис. 1, *з* приведен фрагмент соответствующего участка хромосомы, окрашенной ацетоорсеином. При таком окрашивании диски очень хорошо разделяются на «чер-

ные» и «серые». Можно видеть, что все «черные» диски соответствуют предсказанным нами gb-дискам. Интересно отметить, что чем толще диск, тем более протяженному участку генома он соответствует. В свою очередь, наиболее протяженные предсказанные диски соответствуют ранее картированным толстым дискам ИГХ 58A1-4 и 59D1-4.

Чтобы проверить гипотезу о поздней репликации gb-дисков, мы провели иммуноокрашивание ПХ антителами к белку PCNA (Kolesnikova et al., 2013) и выбрали некоторые характерные паттерны окраски, упорядоченные в порядке завершения S-фазы (рис. 2). На рис. 2, а–в хромосомы находятся на стадии ранней S-фазы. Диски ИГХ 58A1-4, 59D1-4 и некоторые другие «черные» диски еще не вступили в репликацию. Мечение пока выявляется не в индивидуальных дисках, но целыми «зонами», включающими в себя группы дисков и междисков. На рис. 2, г–е мы все еще не видим сигнала в середине дисков ИГХ 58A1-4 и 59D1-4, реплицирующийся поздно «черный» диск 60D1-2 также не красится. Однако яркие сигналы PCNA выявляются преимущественно в дисках. Все «черные» диски, за исключением перечисленных, метятся. Рис. 2, ж–п соответствует классическим стадиям дискретного мечения, где метятся только отдельные «черные» диски, включая диски ИГХ (Zhimulev et al., 2003). На каждой следующей стадии меченых дисков все меньше, и в конце S-фазы метятся только те, которые остаются недореплицированными, т. е. «классические» диски ИГХ.

Мы проанализировали несколько десятков хромосом на каждом этапе S-фазы, в результате чего построили расписание выхода из репликации для всех прокартированных нами дисков (групп дисков) в районах 58–60 (рис. 1, е). Можно отметить, что характерный размер дисков, заканчивающих репликацию последними, составляет 200–250 т. п. н. (исключением являются прителомерные диски). Для остальных дисков наблюдается тенденция: чем позже диск выходит из репликации, тем он длиннее. Такая закономерность ранее описана для дисков ИГХ (Belyaeva et al., 2012) и связана, вероятно, с тем, что «черные» диски ПХ реплицируются с оридинов, расположенных по краям или же за пределами дисков (Belyaeva et al., 2012; Sher et al., 2012). Обнаруженная закономерность может оказаться очень полезной для дальнейшего картирования «черных» дисков ПХ. Действительно, если мы знаем расписание репликации интересующего нас района, а модель предсказывает в этом районе диски разной длины, самые длинные с большой вероятностью будут соответствовать дискам, реплицирующимся последними.

В заключение можно сказать, что предлагаемый нами подход, сочетающий использование данных по картированию аннотированных генов из базы данных FlyBase и новых подходов по предсказанию цитогенетических структур в геноме по особенностям их белкового состава (Zhimulev et al., 2014), а также включающий в себя данные по последовательности репликации дисков ПХ, позволяет установить соответствие «черных» поздно реплицирующихся дисков цитологической карты ПХ с молекулярной картой с точностью, ранее недоступной. Более того, он позволяет для каждого «черного» диска ПХ поставить в соответствие участки на молекулярной карте генома. Это дает новые возможности для дальнейшего исследования молекулярной организации и эволюции этих районов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-04-00934), часть

работы, связанная с определением границ дисков, — при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-40137).

Список литературы

- Ватолина Т. Ю., Демаков С. А., Семешин В. Ф., Макунин 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. (Vatolina T. Ju., Demakov S. A., Semeshin V. F., Makunin I. V., Babenko V. N., Belyaeva E. S., Zhimulev I. F. 2011. Identification and molecular genetic characterization of the polytene chromosome interbands in *Drosophila melanogaster*. Genetika. 47 (5) : 597–609.)
- Andreyenkova N. G., Kolesnikova T. D., Makunin I. V., Pokholkova G. V., Boldyreva L. V., Zykova T. Y., Zhimulev I. F., Belyaeva E. S. 2013. Late replication domains are evolutionary conserved in the *Drosophila* genome. PLoS ONE. 8 : e83319.
- 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.
- 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. PNAS. 102 : 8269–8274.
- Boldyreva L. V., Goncharov F. P., Demakova O. V., Zyova T. Yu., Levitsky V., Kolesnikov N. N., Pindyurin A. V., Semeshin V. F., Zhimulev I. F. 2016. Protein and genetic composition of four chromatin types in *Drosophila melanogaster* cell lines. Current Genomics. In Press.
- Bridges C. B. 1935. Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. J. Hered. 26 : 60–64.
- Kharchenko P. V., Alekseyenko A. A., Schwartz Y. B., Mino-da A., Riddle N. C., Ernst J., Sabo P. J., Larschan E., Gorchakov A. A., Gu T., Linder-Basso D., Plachetka A., Shanower G., Tolstorukov 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., Elgin S. C., Kuroda M. I., Pirrotta V., Karpen G. H., Park P. J. 2011. Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster*. Nature. 471 : 480–485.
- Kolesnikova T. D., Posukh O. V., Andreyeva E. N., Bebyakina D. S., Ivankin A. V., Zhimulev I. F. 2013. *Drosophila* SUUR protein associates with PCNA and binds chromatin in a cell cycle-dependent manner. Chromosoma. 122 : 55–66.
- 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.
- 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 : e25960.
- 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.
- 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.

COMPREHENSIVE APPROACH TO MAPPING LATE-REPLICATING BANDS
IN POLYTHENE CHROMOSOMES OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*Т. Д. Колесникова,^{1,2,*} И. Ф. Жимулев^{1,3}¹ Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, 630090,² Department of Molecular Biology, Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090,³ Laboratory of Structural, Functional and Comparative Genomics, Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090,

* e-mail: trotsenko@mcb.nsc.ru

Heterogeneity of chromatin structure underlies the banding pattern of *Drosophila* polythene chromosomes. Recently, a four-color model of chromatin has been proposed, with one chromatin type, aquamarine, largely corresponding to interbands (Zhimulev et al., 2014). In this model, most of the previously mapped regions of intercalary heterochromatin are represented by the ruby chromatin type. In the present report, we used the distal part of the chromosome arm 2R to show that all dense late-replicating bands in this region invariably encompass ruby chromatin type. We propose a comprehensive approach that combines cytology mapping data of the FlyBase-annotated genes, novel tools for predicting cytogenetic features of chromosomes based on their protein composition and data on the sequence of replication in polythene chromosome bands. This approach allows to establish accurately the correspondence between reference late-replicating bands visible on cytology maps and the molecular map.

Key words: polythene chromosome, bands, interbands, late replication, cytological map, intercalary heterochromatin, four-color model.
