

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ИНСЕРЦИЙ МОБИЛЬНЫХ P-ЭЛЕМЕНТОВ В ДОМЕНАХ АКТИВНОГО И РЕПРЕССИРОВАННОГО ХРОМАТИНА В ГЕНОМЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© Т. Ю. Зыкова,^{1,*} Д. С. Демидова,¹ Е. Б. Коккоза,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: vatolina@mcb.nsc.ru

Политенные хромосомы слюнных желез *Drosophila melanogaster* широко используют в качестве модели интерфазных активно функционирующих хромосом эукариот. Наиболее заметным признаком политенной хромосомы является поперечная исчерченность, которая связана с чередованием плотных темных дисков и светлых деконденсированных междисков. В последнее время благодаря использованию данных полногеномных проектов обнаружены закономерности в локализации белков, характерных для дисков и междисков. В нашем институте на основе таких данных был разработан алгоритм для определения локализации этих структур в геноме *D. melanogaster*. В данной работе мы исследовали специфику встраивания P-элементов относительно дисков и междисков, локализованных на молекулярной и цитологической картах генома *D. melanogaster*, а также участков открытого хроматина или междисков, предсказанных при помощи разработанного нами ранее алгоритма (Zhimulev et al., 2014). Мы обнаружили, что распределение инсерций P-элементов в геноме *D. melanogaster* неслучайно. P-элементы преимущественно встраиваются в участки хроматина, предсказанные моделью как междиски политенных хромосом. Плотность инсерций P-элементов в дисках компактного интеркалярного гетерохроматина значительно ниже.

Ключевые слова: интерфазные хромосомы, политенные хромосомы, диски, междиски, P-элементы.

Принятые сокращения: ПХ — политенные хромосомы, ИГХ — интеркалярный гетерохроматин, ЭМ — электронная микроскопия.

В настоящее время взаимосвязь структурной организации и генетической активности различных районов интерфазных хромосом очевидна, хотя механизмы этой взаимосвязи остаются во многом непонятными. Их изучение является одной из главных задач современной биологии.

В последние годы было показано, что доменная организация интерфазных политенных хромосом слюнных желез *Drosophila melanogaster* очень близка к организации интерфазных хромосом митотически делящихся клеток (Vatolina et al., 2011; Belyaeva et al., 2012; Zhimulev et al., 2012). Это дает возможность сопоставлять структуры и функционирование «обычных» и политенных хромосом, что очень ценно, поскольку на политенных хромосомах получено большое количество интересных данных с применением методов микроскопии и молекулярной генетики.

Недавно был предложен математический алгоритм для определения границ активного и репрессированного хроматина в масштабе всего генома дрозофилы. В результате обработки данных по распределению белков (modENCODE), характерных для последовательностей ДНК, соответствующих междискам политенных хромосом,

были выделены четыре состояния хроматина интерфазных хромосом, условно названные aquamarine, malachite, lazurite и ruby. Оказалось, что найденные домены хроматина соответствуют доменам интерфазных хромосом, содержащим повсеместно активные и тканеспецифичные гены, а также морфологическим структурам (дискам и междискам) политенных хромосом дрозофилы (Zhimulev et al., 2014; Pindyurin, Gatti, 2015).

Ранее в нашей лаборатории был разработан подход, основанный на электронно-микроскопическом (ЭМ) картировании встроок P-транспозонов в районах междисков и клонировании их ДНК, который позволил точно соотнести молекулярные и цитологические карты для этих районов (Demakov et al., 2004; Ватолина и др., 2011). Впервые было показано, что эти домены характеризуются уникальными последовательностями ДНК, открытой структурой хроматина, локализацией белков ORC (Origin Recognition Complex) и представлены межгенными областями и 5'-некодирующими участками генов. Районы, соответствующие междискам, сохраняют консервативную организацию хроматина в интерфазных хромосомах разных клеточных типов (Vatolina et al., 2011; Zhimulev et al., 2012).

Известно, что P-элементы имеют повышенную частоту встраивания в 5'-регуляторные области генов, т. е. в последовательности длиной около 500 п. н., расположенные выше и ниже от сайта инициации транскрипции, и 5'-некодирующие области генов (Spradling et al., 1995; Bellen et al., 2004). Ранее было показано, что из 26 проанализированных инсерций, не нарушающих жизнеспособность, 21 инсерция произошла в районы, которые являются междисками в политенных хромосомах *D. melanogaster* (Semeshin et al., 1986). Однако селекция и малое число инсертов не позволяют сделать обоснованным заключение о междисках как горячих точках встраивания транспозонов. Поэтому была проанализирована частота P-элементных инсерций в последовательности ДНК 13 междисков, ранее локализованных на физической карте генома, с использованием данных FlyBase о позиции точек встраивания для более чем 30 тыс. известных P-транспозонов в геноме *D. melanogaster*. Оказалось, что в непосредственной близости (на расстоянии менее 1 т. п. н.) от транспозона, маркирующего междиски, находится подавляющее число встроок P-элементов, а остальные, более удаленные от «центра» междиска фрагменты имеют гораздо меньшую частоту встраивания. Таким образом, данные о распределении транспозонов существенно поддерживают представление о междисках как горячих точках встраивания P-элементов (Ватолина и др., 2011).

Встройки P-элементов были обнаружены в тысячах различных геномных позиций, но не все сайты одинаково «привлекательны» для этих мобильных элементов (O'haire, Rubin, 1983; Bellen et al., 2004). Механизм выбора нового сайта инсерции пока точно неизвестен, тем не менее встройки в эухроматин происходят чаще, чем в гетерохроматин (Berg, Spradling, 1991). Было показано, что в закрытом хроматине число актов транспозиции P-элементов действительно ниже, и это не вызвано снижением экспрессии маркерного гена при инсерциях P-элементов в гетерохроматиновые области генома дрозофилы (Bellen et al., 2011). В этой связи особый интерес представляют крупные диски интеркалярного гетерохроматина (ИГХ). Они занимают по несколько сотен тысяч пар оснований и разбросаны по всем плечам хромосом дрозофилы. Эти домены содержат кластеры уникальных генов, демонстрируют репрессию транскрипции и позднюю репликацию ДНК. Недавно впервые были определены границы 60 районов ИГХ на физической карте (Belyaeva et al., 2012). Это позволило проанализировать молекулярные характеристики данных районов и сравнить организацию доменов ИГХ в слюнных железах и культуре клеток Кс. В целом организация районов ИГХ консервативна в политенных и неполитенных тканях. Эти районы являются отдельным классом доменов и содержат большую долю тканеспецифичных генов, разделенных длинными межгенными промежутками, выполняющими, вероятно, особые функции (Belyakin et al., 2005; Belyaeva et al., 2012). Кроме того, было показано, что интерфазные хромосомы содержат два типа дисков: неактивные, позднореплицируемые районы ИГХ, связывающие белки SUUR и ламин В, и активные, раннореплицируемые диски, не связывающие эти белки (Vatolina et al., 2011; Zhimulev et al., 2012).

Таким образом, разделение генома дрозофилы на четыре типа хроматина является удобным инструментом для сопоставления цитологической и физической карт генома *D. melanogaster*, что позволяет изучить геномные

характеристики дисков и междисков, в том числе специфику встраивания P-элементов относительно данных структур хромосом. На сегодняшний день известно, что существуют локусы в геноме *D. melanogaster*, наиболее предпочтительные для инсерций P-элементов, однако остается неясным, с чем связаны такая специфичность встроок P-элементов, а также механизмы выбора нового сайта инсерций.

Материал и методика

Для статистической обработки данных был применен критерий Стьюдента (*t*-критерий):

$$t = \frac{p_1 - p_2}{\sqrt{\sigma p_1^2 + \sigma p_2^2}},$$

где p_1 и p_2 — средние значения частот встроок P-элементов в сравниваемые участки, в сумме приведены к 1; σp_1^2 и σp_2^2 — дисперсии частот встроок (связываний) в сравниваемых участках, $\sigma^2 = \frac{p(1-p)}{n}$.

Количество степеней свободы $df = n_1 + n_2 - 2$.

Было проведено сравнение частот встроок в диски и прилегающие к ним междиски, во фланкирующие диски ИГХ домены хроматина aquamarine и malachite и в составляющие диски ИГХ домены хроматина ruby и malachite.

Результаты и обсуждение

Нами было исследовано распределение P-элементов в последовательностях ДНК морфологических структур больших плеч ПХ *D. melanogaster*, локализованных на молекулярной карте генома.

Из базы данных FlyBase, содержащей 38 888 инсерций P-элементов, были отобраны инсерции, локализованные в идентифицированных на молекулярной карте генома *D. melanogaster* структурах интерфазных хромосом. В каждом случае были подсчитаны плотности встроок (шт./т. п. н. структуры) отдельно для каждой структуры.

Мы исследовали 52 поздно реплицирующихся домена интерфазных хромосом, которые соответствуют дискам ИГХ политенных хромосом (Belyaeva et al., 2012). В соответствии с моделью четырех типов хроматина были уточнены границы этих дисков на молекулярной карте генома дрозофилы и проанализировано распределение 1573 встроок P-элементов в пределах данных дисков и фланкирующих их районах.

Оказалось, что диски ИГХ представлены крупными блоками хроматина ruby и ограничены фрагментами хроматина aquamarine, соответствующего междискам. Край дисков ИГХ также всегда маркированы хроматином malachite, который встречается и внутри дисков. Этот тип хроматина имеет промежуточные характеристики между декомпактным хроматином (aquamarine) и полностью компактизированным (ruby) по времени репликации, распределению белков ORC, сайтов DHS (DNase Hypersensitive Sites) (сайтов гиперчувствительности к ДНКазе I) и соответствует в основном межгенным промежуткам и интронам (Zhimulev et al., 2014).

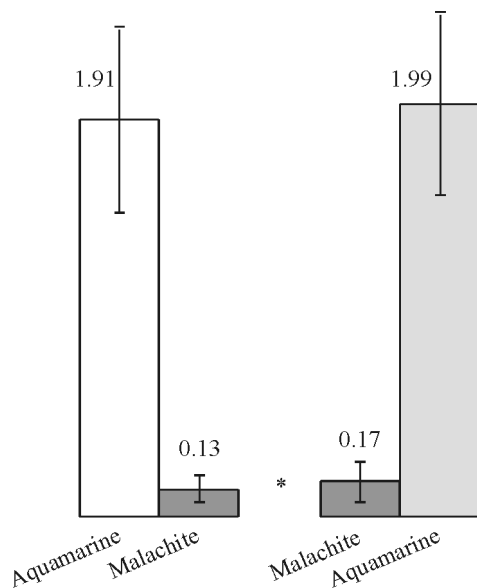


Рис. 1. Средняя плотность инсерций *P*-элементов в доменах хроматина, фланкирующих 52 диска ИГХ.

Показаны усредненные плотности инсерций *P*-элементов в участках, фланкирующих 52 диска ИГХ, с указанием стандартных ошибок среднего (вертикальные отрезки). Звездочкой обозначена внутренняя часть диска ИГХ, которая описана ниже.

При сравнении участков, фланкирующих диски ИГХ (рис. 1), показано, что максимальная плотность встроок приходится на соответствующий междиск хроматин aquamarine. Плотность встроок *P*-элементов в хроматин aquamarine достоверно выше, чем в хроматин malachite ($p < 0.001$).

Большую часть дисков ИГХ (84 %) занимает хроматин ruby (рис. 2, а), для которого характерны локализация

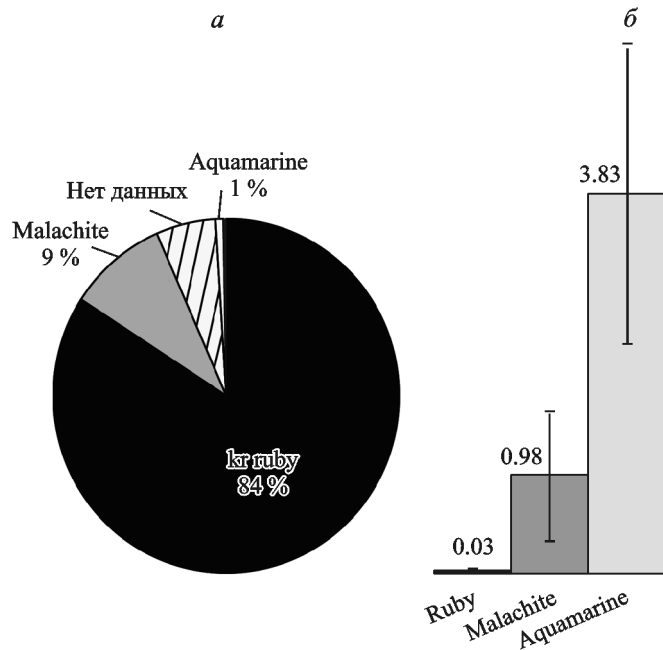


Рис. 2. Типы хроматинов и плотность инсерций в дисках ИГХ.

а — доли суммарных длин доменов хроматина различного типа в 52 дисках ИГХ; б — усредненные для 52 дисков ИГХ плотности инсерций *P*-элементов в четыре типа внутреннего хроматина с указанием стандартных ошибок среднего (вертикальные отрезки).

таких белков, как D1, SUUR и LaminB, поздняя репликация и низкая плотность генов (Pindyurin et al., 2007; Belyaeva et al., 2012). В то же время количество и соответственно плотность встроок в него невелики (рис. 2, б). В каждом таком диске присутствуют тонкие вкрапления хроматина malachite, который достоверно гораздо более предпочтителен для инсерций *P*-элементов ($p < 0.001$) (рис. 2, а, б). В 36 дисках из 52 встречается хроматин aquamarine, всего 90 участков. При этом в большую часть из них *P*-элементы вообще не встраиваются, а если происходит транспозиция (33 участка), то плотность этих мобильных генетических элементов значительно выше, чем в других типах хроматина. Хроматин aquamarine занимает всего 1 % суммарной длины, однако большая часть инсерций транспонов происходит именно в него (рис. 2, а, б). Наличие участков «открытого» хроматина, соответствующего междискам, внутри дисков ИГХ может быть связано с активностью тканеспецифичных генов (Belyaeva et al., 2012).

Таким образом, распределение инсерций *P*-элементов в геноме *D. melanogaster* не случайно. Наибольшее количество встроок происходит в последовательности ДНК, соответствующие междискам ПХ. В целом выявляется корреляция доли встроок мобильных *P*-элементов с уровнем компактизации хроматина. Действительно, *P*-элементы преимущественно встраиваются в 5'-нетранслируемые области генов, как и было известно ранее (Spradling et al., 1995; Bellen et al., 2004). Было показано, что эти 5'-нетранслируемые области в ПХ соответствуют междискам (Ватолина и др., 2011; Vatolina et al., 2011; Zhimulev et al., 2012, 2014). Кроме того, недавно было показано, что *P*-элементы встраиваются в промоторы небольшого набора генов (Spradling et al., 2011). Это хорошо согласуется с тем, что домены хроматина aquamarine содержат промоторы небольшого пула (около 4 тыс.) генов, которые экспрессируются повсеместно в тканях и на всех стадиях онтогенеза *D. melanogaster* (Zhimulev et al., 2014).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-14-00934) и частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-03898).

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 : 597—609. (Vatolina T. Yu., 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 : 597—609.)
- Bellen H. J., Levis R. W., He Y., Carlson J. W., Evans-Holm M., Bae E., Kim J., Metaxakis A., Savakis C., Schulze K. L., Hoskins R. A., Spradling A. C. 2011. The *Drosophila* gene disruption project: progress using transposons with distinctive site specificities. Genetics. 188 : 731—743.
- Bellen H. J., Levis R. W., Liao G. He Y., Carlson J. W., Tsang G., Evans-Holm M., Hiesinger P. R., Schulze K. L., Rubin G. M., Hoskins R. A., Spradling A. C. 2004. The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40 % of *Drosophila* genes. Genetics. 167 : 761—781.
- 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. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 102 : 8269—8274.

Berg C. A., Spradling A. C. 1991. Studies on the rate and site-specificity of P-element transposition. Genetics. 127 : 515—524.

Demakov S. A., Gortchakov A. A., Schwartz Y. B., Semeshin V. F., Campuzano S., Modolell J., Zhimulev I. F. 2004. Molecular and genetic organization of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes: evidence for two types of interband regions. Genetica. 122 : 311—324.

O'hare K., Rubin G. M. 1983. Structures of P-transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome. Cell. 34 : 25—35.

Pindyurin A. V., Gatti M. 2015. Chromosomes in the taiga. Chromosome Res. 23 : 641—647.

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.

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., Stern D. M., Kiss I., Roote J., Laverty T., Rubin G. M. 1995. Gene disruptions using P-transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 92 : 10 824—10 830.

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

Zhimulev I. F., Zykova T. Yu., Goncharov F. P., Khoroshko V. A., Demakova O. V., Semeshin V. F., Pokholkova G. V., Boldyreva L. V., Demidova D. S., Levitsky V. G., 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

LOCALIZATION OF MOBILE P-ELEMENT INSERTIONS IN DOMAINS OF ACTIVE AND REPRESSED CHROMATIN IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*'S GENOME

T. Yu. Zykova,^{1,*} D. S. Demidova,¹ E. B. Kokoza,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: vatolina@mcb.nsc.ru

Classic polytene chromosomes from dipteran insects are extensively used as a model for interphase chromosomes. The peculiar morphology of polytene chromosomes is formed by the alternating densely packed chromatin of bands and less compact interbands. In recent years numerous data have been obtained on the precise localization of different proteins on the molecular map in the interphase chromosomes. A special algorithm has been developed based on the interband specific protein composition. This algorithm allows us to detect the positions of bands and interbands in the whole *Drosophila*'s genome. The goal of our investigation is to analyse of P-elements distribution in localized bands and interbands. We have found that P-elements distribution is not random in *Drosophila*'s genome. Insertions of P-elements predominantly take place in regions of genome predicted by algorithm as interbands. The density of P-element insertions in compacted bands is notably lower.

Key words: interphase chromosomes, polytene chromosomes, bands, interbands, P-elements.