

На правах рукописи

**ЗЫКОВА
ТАТЬЯНА ЮРЬЕВНА**

**Характеристика ДНК и белкового состава
междисковых районов хромосом
*Drosophila melanogaster***

Молекулярная генетика – 03.01.07

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск - 2011

Работа выполнена в лаборатории функциональной организации политемных хромосом Учреждения Российской академии наук Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

Научный руководитель: доктор биологических наук
Демаков Сергей Анатольевич
Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН,
г. Новосибирск

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Омельянчук Леонид Владимирович
Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН,
г. Новосибирск

кандидат биологических наук
Елисафенко Евгений Анатольевич
Институт цитологии и генетики СО РАН,
г. Новосибирск

Ведущее учреждение: Институт биологии гена РАН, г. Москва

Защита состоится «07» декабря 2011 г. на заседании диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук (Д-003.045.02) в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8. e-mail: kokoza@mcb.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Автореферат разослан «__» _октября_ 2011 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
кандидат биологических наук



Е.Б. Коккоза

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В настоящее время взаимосвязь структурной организации и генетической активности различных районов интерфазных хромосом очевидна. Причины и механизмы этой взаимосвязи до сих пор во многом не поняты. Их изучение является одной из главных задач современной биологии. “Классические” политенные хромосомы двукрылых, которые рассматриваются в качестве модели интерфазной хромосомы, открывают большие возможности в этом направлении.

Политенные хромосомы имеют гигантские размеры и характерную морфологию, которая возникает вследствие чередования плотноупакованного хроматина дисков и менее плотных междисков и пуфов. Многочисленные исследования в значительной степени прояснили молекулярно-генетическую организацию дисков и пуфов. Однако функции междисков до сих пор во многом не понятны. Обнаружение у некоторых из них свойств, характерных для транскрипционно активных районов, а также высокое сходство дискового рисунка хромосом из разных тканей и органов дрозофилы поддерживают гипотезу о локализации в междисках небольших, постоянно активных генов клеточного метаболизма, т.н. генов «домашнего хозяйства». Существуют и другие точки зрения. В частности, эти структуры рассматривают как регуляторные районы генов, расположенных в соседних дисках, как барьеры, разделяющие хромосомы на структурно-функциональные домены, по другим представлениям - возможные участки инициации репликации. Тем не менее, ни одна из многочисленных гипотез о молекулярной и генетической организации хромосом не получила убедительного фактического обоснования (подробности в обзоре Zhimulev et al, 2004).

Функциональная роль междисков может быть определена в результате анализа их молекулярной организации, однако их малые размеры и низкое содержание ДНК, а также отсутствие адекватных методов не позволяют точно соотнести между собой молекулярные и цитологические данные для этих районов.

Систематический молекулярный анализ организации междисков, включающий исследования конкретных последовательностей, упаковки ДНК в них и характеристик ассоциированных белковых факторов, был начат относительно недавно и обязан развитию двух методов – *P*-элемент-опосредованной трансформации генома дрозофилы и электронно-микроскопического (ЭМ) картирования инсерций транспозонов на политенных хромосомах. В частности, в результате ЭМ анализа политенных хромосом было обнаружено, что встройка транспозона в междисковый район может вызывать формирование нового тонкого диска, что открывает уникальную возможность решения проблемы точного соотнесения

молекулярных и цитологических данных в этих районах. Зная молекулярную организацию транспозона, можно клонировать и определить последовательности ДНК, прилежащие к встройке, что позволяет проводить прямые эксперименты по изучению генетических и структурных особенностей междисковых районов. Было показано, что последовательности ДНК междисков уникальны в геноме дрозофилы, представляют собой преимущественно межгенные области, содержат поли-А, поли-АТ, и поли-АГ-тракты, последовательности, способные переходить в Z-конформацию, консенсусы узнавания топоизомеразой II, общую АТ-обогащенность (до 80%), а также участки, характерные для последовательностей ДНК, связанных с белками ядерного матрикса (Demakov et al., 1993; Шварц и др., 1998; Demakov et al., 2004; Зимин и др., 2004; Semeshin et al., 2008; Ватолина и др., 2011).

Поскольку гигантские политенные хромосомы легко анализировать под микроскопом, а интерфазные хромосомы обычных диплоидных клеток увидеть практически невозможно, до сих пор остаются открытыми вопросы о том, насколько одинакова организация двух этих типов хромосом: существуют ли какие-то структурные различия между ними, кроме очевидных различий в размерах и есть ли в интерфазных хромосомах митотически делящихся клеток структуры, подобные дискам и междискам политенных хромосом.

Разработанный нами подход по точному молекулярному картированию районов междисков в совокупности с новыми данными, полученными прежде всего в рамках глобального проекта modENCODE, по полногеномному распределению широкого спектра хроматиновых белков в различных типах клеток и на разных стадиях развития дрозофилы позволяют с высоким разрешением картировать сайты связывания многих белковых факторов и проводить тонкий структурно-функциональный анализ хроматина на значительных участках хромосом.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы является определение молекулярно-генетических характеристик междисковых районов и сравнение их организации в политенных и не политенных хромосомах дрозофилы. Для достижения этих целей были сформулированы следующие задачи:

-На основе данных электронно-микроскопического анализа по картированию инсерций транспозонов в районах междисков, провести клонирование, определить последовательности ДНК междисков и их положение на молекулярной карте.

-Провести сравнительный анализ последовательностей нуклеотидов ДНК из районов междисков и охарактеризовать их молекулярно-генетическую организацию

-Исследовать следующие функциональные характеристики междисков:

а. Локализацию ДНК-аза I гиперчувствительных сайтов как маркеров открытого хроматина.

б. Закономерности встраивания *P*-элементов (по данным FlyBase) в районы исследуемых междисков.

в. Распределение белков хроматина, плотности нуклеосом, компонентов репликативного комплекса ORC (OriRigin Recognition Complex) (данные проекта modENCODE) в районах хромосом митотически делящихся культур клеток, соответствующих междискам политенных хромосом

-На основе свойств хроматина, выявленных для междисков, определить границы дисков и междисков на физической карте на примере отдельного района политенной хромосомы.

Научная новизна. В настоящей работе идентифицировано на физической карте семь новых междисков и суммированы результаты молекулярно-генетического анализа 13 междисков. Определены их генетическое содержание и такие функциональные характеристики как частота встраивания транспозонов, распределение гиперчувствительных к ДНКазе I сайтов, локализация хромосомных белков. Впервые показано, что для большинства районов, соответствующих междискам, в культуре клеток выявляется комбинация белков, характерных для открытого хроматина. Распределение данных белков коррелирует с локализацией участков, имеющих сниженную плотность нуклеосом, а также с распределением белка ORC2 из комплекса инициации репликации. На примере района 9F13-10B3 X хромосомы впервые показано, что хромосомы митотически делящихся клеток представлены структурами, порядок чередования и характеристики которых соответствуют дискам и междискам политенных хромосом. На основании полученных результатов впервые сформулировано представление о междиске как базовой структуре, принимающей участие в общеклеточных процессах формирования и поддержания функциональной архитектуры интерфазной хромосомы.

Положения, выносимые на защиту. Рассматривается представление о междисках политенных хромосом как структурах размером 1 – 3 т.п.н., обладающих открытой автономной конформацией хроматина. Для них характерны: присутствие белков открытого хроматина, сниженная плотность нуклеосом, гиперчувствительность к ДНКазе I, высокая частота инсерций *P*-элементов и преимущественная локализация межгенных областей или 5' некодирующих участков генов. Междиски сохраняют консервативность организации в интерфазных хромосомах разных типов клеток и связаны с белками, участвующими в таких общеклеточных процессах как транскрипция, репликация и модификация хроматина. На основании полученных результатов развивается представление о междиске как базовой постоянной структуре интерфазной хромосомы.

Практическая ценность. В работе показана высокая технологичность подхода к тонкому картированию и анализу конкретных хромосомных структур, предложенного ранее для клонирования ДНК междисков. Проведены первые прямые эксперименты по изучению организации

хроматина междисков. Предложен подход, позволяющий с высокой точностью картировать границы отдельных междисков и дисков на физической карте генома дрозофилы. Приведены первые результаты анализа организации интерфазных хромосом в разных типах клеток, полученные с использованием анализа распределения хромосомных белков по данным полногеномных исследований последних лет. Результаты этих экспериментов являются базовыми для дальнейшего анализа структурно-функциональной организации интерфазных хромосом.

Апробация работы. Результаты работы были представлены в виде постеров на: 19-той Европейской научно-исследовательской конференции по дрозофиле (Венгрия, 2005), Международной молодежной научно-методической конференции (Томск, Россия, 2007), международной конференции «Хромосома 2009» (Новосибирск, Россия, 2009), Всероссийском симпозиуме «Структура и функции клеточного ядра», (Санкт-Петербург, Россия 2010), а также в виде докладов на: международной конференции «Хромосома 2009» (Новосибирск, Россия, 2009), международном симпозиуме «Контроль экспрессии генов и рак», (Москва, Россия, 2010) и 2-ой ежегодной научно-исследовательской конференции по дрозофиле (Сан-Диего, США, 2011, пленарный доклад).

Вклад автора. Основная часть экспериментов была выполнена автором самостоятельно. Электронно-микроскопический анализ районов инсерций транспозонов был полностью проведен д.б.н. В.Ф. Семешиным (ИХБФМ СО РАН). Саузерн-блот гибридизации, а также начальные эксперименты по клонированию ДНК междисков проводились совместно и в соавторстве с д.б.н. С.А. Демаковым. Картирование цитологических структур на физической карте и характеристика дисков и междисков района 9F13 – 10B3 политенной X хромосомы проводилось совместно и в соавторстве с академиком РАН, д.б.н., проф. И.Ф. Жимулевым. Полногеномный анализ распределения белков и анализ распределения инсерций P-элементов в районах междисков проводился совместно с к.б.н. В.Н. Бабенко (ИЦиГ СО РАН), к.б.н. И.В. Макуниным и Ф.П. Гончаровым (ИХБФМ СО РАН).

Объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, а также выводов и списка цитируемой литературы, включающего 348 ссылок. Работа изложена на 152 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц и 29 рисунков.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 статьи и 8 тезисов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии мух. Используемые в работе линии мух описаны в справочнике Lindsley, Zimm, 1992, в базе данных FlyBase (flybase.bio.indiana.edu/), а также в статьях Демаков и соавт., 2001; Зимин и соавт., 2004; Semeshin et al., 2008; Ватолина и соавт., 2011.

Работа с нуклеиновыми кислотами. Все эксперименты, связанные с выделением и анализом нуклеиновых кислот, проводили с использованием

методов, описанных в руководстве (Sambrook and Russell, 2001) или в соответствии с рекомендациями фирм-производителей (Qiagen, Promega и др.).

Работа с бактериями и плазмидами. Работу с бактериями и плазмидами проводили по стандартным протоколам, описанным в сборниках (Маниатис и др., 1984; Мазин и др., 1990), с небольшими модификациями. «Спасение» *P*-мишени осуществляли, как описано ранее (O’Kane, Gehring, 1987).

Работа с хроматином. Клеточные ядра выделяли по методике, описанной Шаффером и соавторами (Shaffer et al., 1994). Обработку ДНКазой I проводили, как описано в руководстве (Sambrook and Russell, 2001).

Компьютерный анализ данных. Нуклеотидные последовательности анализировали, используя программное обеспечение BLAST, сервер UCSC, а также данные FlyBase и доступные данные проекта modENCODE для *D. melanogaster* (Celniker et al., 2009). Оценку степени колокализации белков открытого хроматина в геноме дрозофилы проводили с помощью программного обеспечения XLStat (www.xlstat.com).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Молекулярно-генетическая организация междисков

P-элементные транспозоны, интегрированные в геном дрозофилы, при встраивании в районы междисков политенных хромосом формируют новые диски, что позволяет использовать их как маркеры положения междисковых районов на физической карте. С помощью этого подхода ранее были получены последовательности нескольких междисков, показана их уникальность и обогащенность АТ-районами, установлено наличие нуклеосомной укладки и матрикс-ассоциированных последовательностей (Rykowski et al., 1988; Semeshin et al., 1989; Шварц и др., 1998; Demakov et al., 2004). В настоящей работе мы идентифицировали на физической карте еще 7 новых междисков и суммируем результаты молекулярно-генетического анализа 13 междисков. Анализ последовательностей ДНК в непосредственной близости от маркерных транспозонов показал, что в 9 случаях инсерции произошли в геномные области между кодирующими генами. В остальных случаях оказалось, что в междиске 1A8/B1-2 сайт инсерции находится в интроне гена *ewg*, а в междисках 3A4/A6 и 79D2/D3 - в 5'UTR генов *egh* и *Csp*, соответственно; в междиске 87C8/C9 - в экзоне гена *Men* (Рис. 1). Поскольку положение транспозонов относительно границ междисков точно не известно, мы анализировали последовательности вокруг транспозонов ступенчато, по фрагментам: первым был фрагмент, содержащий по 1 т.п.н. справа и слева от точки встраивания; следующие фрагменты отступали от первого каждый раз на 1 т.п.н. В сумме все фрагменты заняли 20 т.п.н. - по 10 т.п.н. вправо и влево от места встройки. В каждом фрагменте определяли число нуклеотидов, соответствующих интронам, экзонам, межгенным районам на основании Fly

Base gene annotations, а также число нуклеотидов консервативных элементов, используя phastCons elements (Siepel et al., 2005). Результаты показывают, что фрагменты, содержащие участки, непосредственно прилегающие к встройке, которые, вероятнее всего, и соответствуют междиска, обогащены некодирующими и 5' нетранслируемыми последовательностями ДНК по сравнению с фрагментами, более удаленными от точки встраивания. В то же время ближайшие к встройке последовательности являются наименее консервативными в геномах рода *Drosophila*. (Рис. 2а).

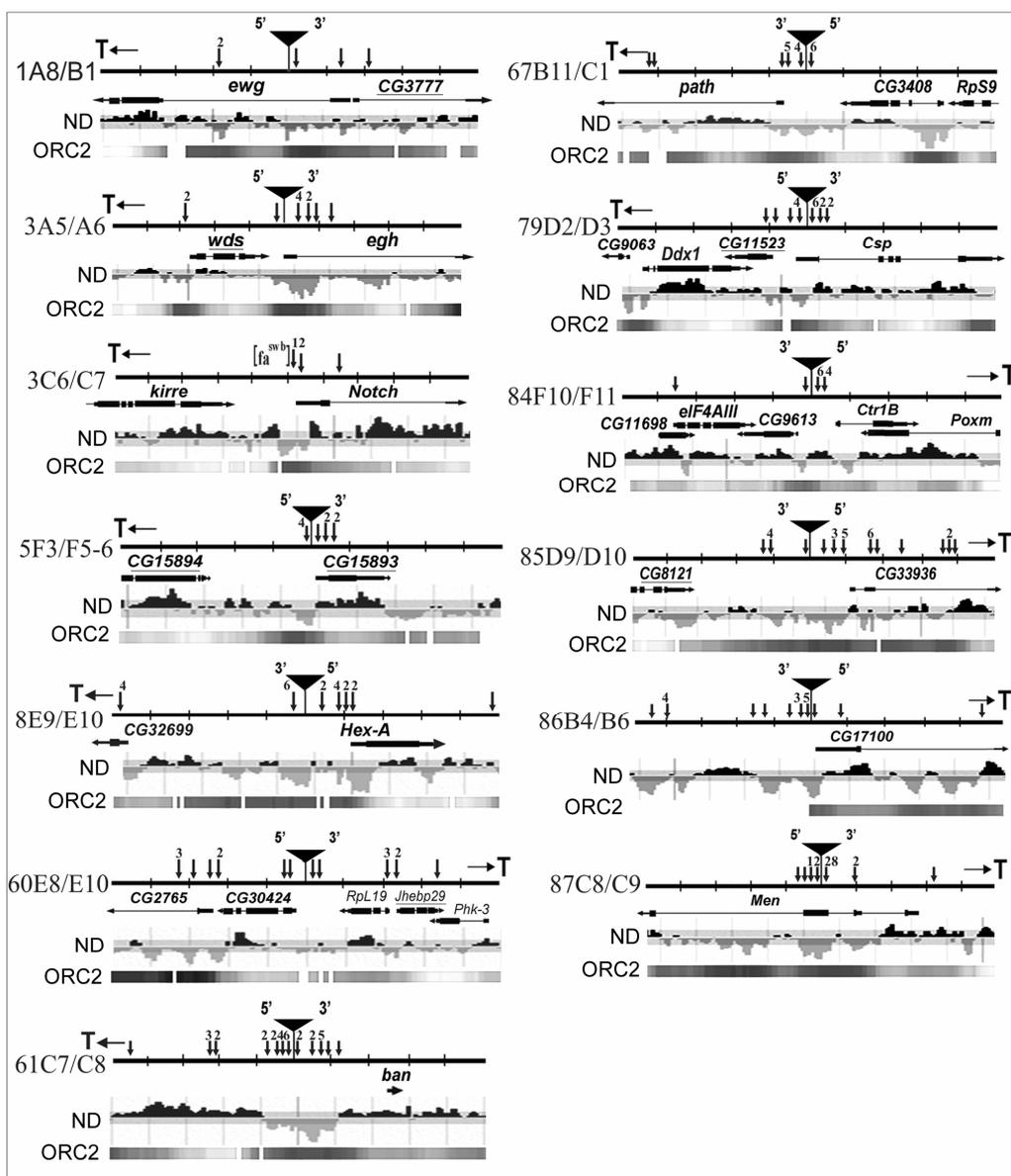


Рисунок 1. Молекулярно-генетическая карта районов, окружающих точки встраивания маркерных транспозонов. Треугольники обозначают сайты инсерций маркерных транспозонов; вертикальные стрелки – сайты интеграции P-элементов (Fly Base, в случае близкого расположения сайтов встраивания их число указано над стрелками). Т - направление к теломере. Центральная панель соответствует физической карте; внизу показаны данные о плотности нуклеосом (ND) и сайтов связывания для белка пререпликативного комплекса ORC2 (MacAlpine et al., 2010). Степень интенсивности окраски соответствует интенсивности связывания белка. Для междиска 3С6/С7

положение междиска соответствует позиции делеции fa^{swb} , удаляющей междиск. Одно деление на физической карте равно 1 т.п.н.

2. Междиски являются горячими точками для *P*-элементных инсерций

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). Тонкое ЭМ картирование показало, 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; Semeshin et al., 1989). Однако селекция и малое число инсертов не

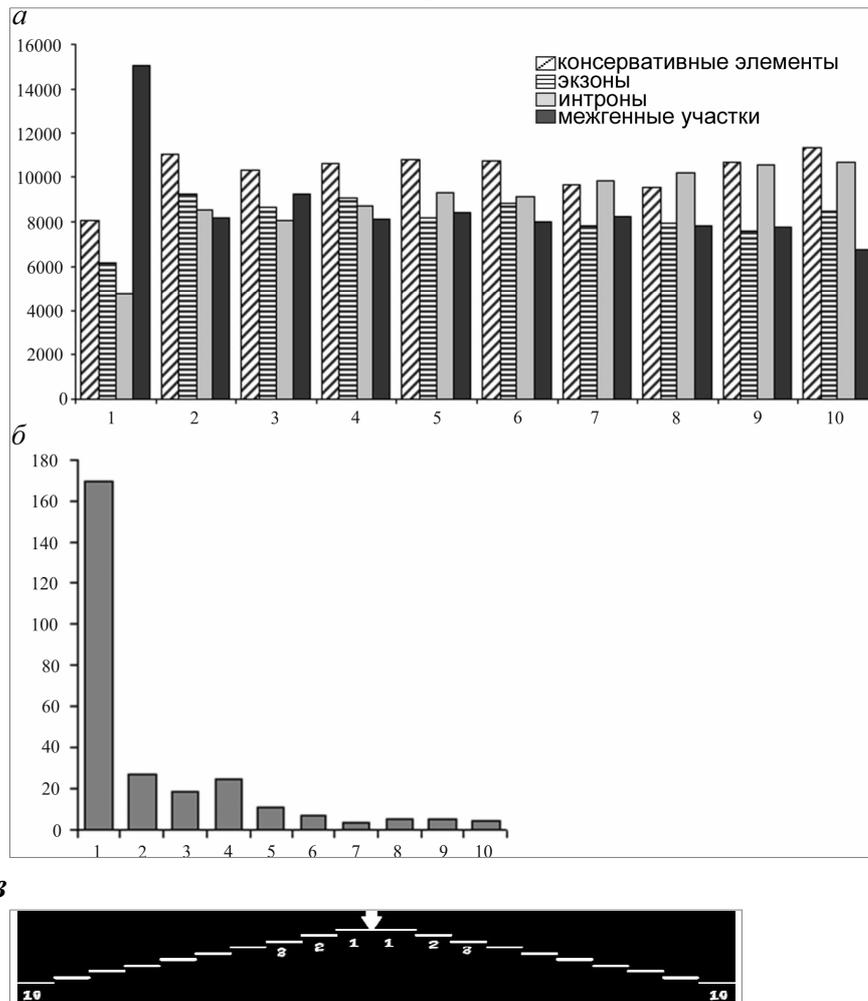


Рисунок 2. Число нуклеотидов, принадлежащих консервативным элементам, эксонам, интронам и межгенным областям (**а**), и число инсерций, локализованных на различном расстоянии от точки встраивания маркерного транспозона (**б**). По оси абсцисс – расстояние сегментов ДНК от точки встраивания маркерного транспозона; одно деление равно 1 т.п.н.; по оси ординат – число нуклеотидов (**а**) и число инсерций (**б**). Схема распределения сегментов ДНК относительно маркерного транспозона в районах междисков (**в**).

позволяют сделать обоснованное заключение о междисках как горячих точках встраивания транспозонов. Для анализа распределения *P*-элементов мы отобрали 33481 инсерцию с единичными (уникальными) сайтами интеграции в геноме *D. melanogaster*. Точность картирования сайтов составляла менее 10 п.н (FlyBase, версия FB2010 01 от 22.01.2010). Анализ проводили, используя поисковый сервер UCSC Genome Browser (Kuhn et al., 2009), dm3 genome assembly и аннотации к версии 5.12 (октябрь 2008). В каждом из 13 исследованных районов мы анализировали 10 сегментов геномной ДНК, образованных последовательно расположенными фрагментами длиной по 1 т.п.н. по обе стороны от сайта встройки маркерного транспозона (Рис. 2в). Данные для каждого сегмента анализировали с помощью Table Browser на сервере UCSC (<http://genome.ucsc.edu>). Всего, в изучаемых сегментах оказалось 275 инсерций *P*-элементов, причем первый сегмент (1 т.п.н. относительно маркерного транспозона) содержит подавляющее число встроек (171), а остальные, более удаленные от «центра» междиска 9 сегментов, имеют гораздо меньшую частоту встраивания (Рис.2б). Таким образом, эти данные подтверждают наше представление о междисках как горячих точках встраивания *P*-элементов.

3. Междиски содержат ДНКазы I гиперчувствительные области

Картирование ДНКазы I гиперчувствительных сайтов или DHSs (DNAse I Hypersensitive Sites) является одним из подходов для выявления «открытого» хроматина. Известно, что активность эукариотических генов сопровождается чувствительностью к нуклеазам, которая отражает изменения в конфигурации хроматина, необходимые для взаимодействия с транс-факторами при экспрессии и репликации генов (Armstrong et al., 1996). Мы картировали DHSs в шести междисках хромосом слюнных желез личинок дикой линии Oregon-R с помощью непрямого терминального мечения. Кроме того, использовали линию *fa^{swb}*, в которой имеется делеция, удаляющая междиск 3C6/C7 (Rykowski et al., 1988; Demakov et al., 2004). Для всех шести нативных междисков мы нашли специфические на DHSs сигналы в областях, соответствующих ближайшему окружению маркерного транспозона (4-8 т.п.н. вокруг сайта встраивания маркерного транспозона) (Рис. 3). Размеры DHS варьировали от 50 до 580 п.н. Ранее было показано, что 1,5 т.п.н. из междиска 3C6/C7 сохраняют деконденсированное состояние, находясь в составе транспозона, встроенного в геном (Semeshin et al., 2008). В проксимальной области этого фрагмента в политенных хромосомах линии Oregon-R мы обнаружили два больших DHSs (DHS3 и DHS4) и несколько минорных (рис. 3б, в). Интересно отметить, что обнаруженные нами в междиске 3C6/C7 из слюнных желез DHSs совпадают с картированием DHSs (DHSs 1-4) в ядрах эмбриональных клеток (Vasquez, Schedl., 2000). Важно подчеркнуть, что DHSs, картированные нами в эндогенных междисках 3C6/C7 и 61C7/C8, сохранялись в интегрированных в геном транспозонах

Pcon-3C и Pcon-61C, несущих последовательности этих междисков (Semeshin et al., 2008). Удаление из междисковой последовательности 3C6/C7 250 п.н., совпадающих с локализацией DHSs, привело к ингибированию формирования междиска в транспозоне (Андреев и соавт., 2010). В целом результаты еще раз подтверждают открытость хроматина в междисках и позволяют предполагать, что наличие DHS в междисках связано с их деконденсированным состоянием.

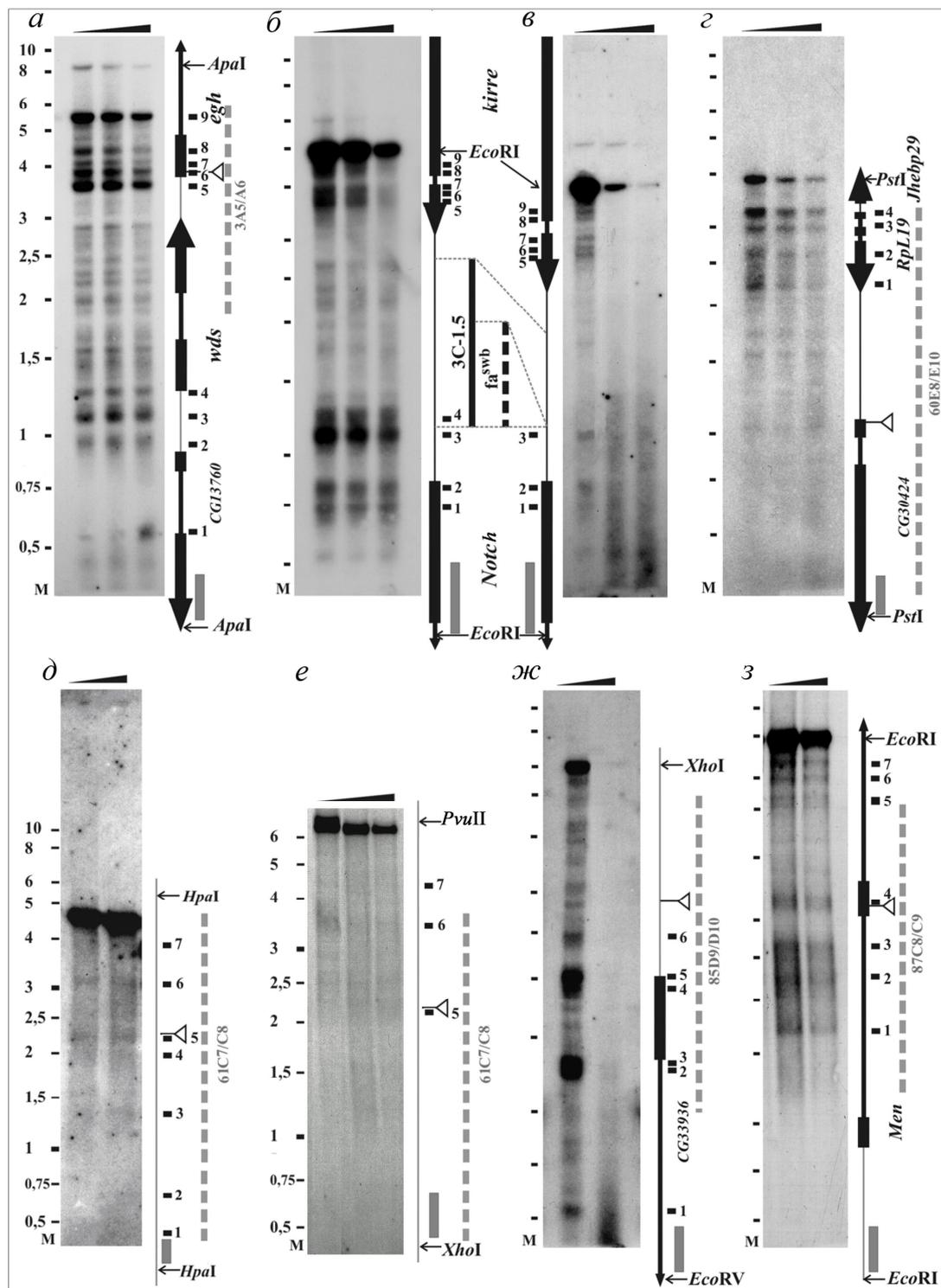


Рисунок 3. Саузерн-блот гибридизация для районов эндогенных междисков 3A5/A6 (а), 3C6/7 (б, в), 60E8/E10 (г), 61C7/C8 (д, е), 85D9/D10 (ж) и 87C8/C9 (з). Фрагмент 3C-1.5,

содержащий 1,5 т.п.н., формирующие междиск 3С6/С7, обозначен черной линией. Фрагмент, удаляемый делецией fa^{swb} , обозначен пунктирной линией. Горизонтальные стрелки обозначают сайты рестрикции для эндонуклеаз, продуцирующих инициальные фрагменты ДНК; вертикальные стрелки – гены и направление транскрипции; треугольники – сайты встраивания маркерного транспозона; вертикальные прерывистые линии – районы наиболее вероятной локализации междисков; серые прямоугольники – позиции проб; черные прямоугольники (обозначены цифрами) – ДНКазы I гиперчувствительные сайты. Треугольники над фореграммами отражают концентрацию ДНКазы I. М – маркер молекулярной массы ДНК.

4. В хромосомах митотически делящихся клеток районы, соответствующие междискам политенных хромосом, обогащены белками, характерными для открытого хроматина

Зная позиции междисков политенных хромосом на физической карте генома, можно наложить на них данные по распределению различных белков

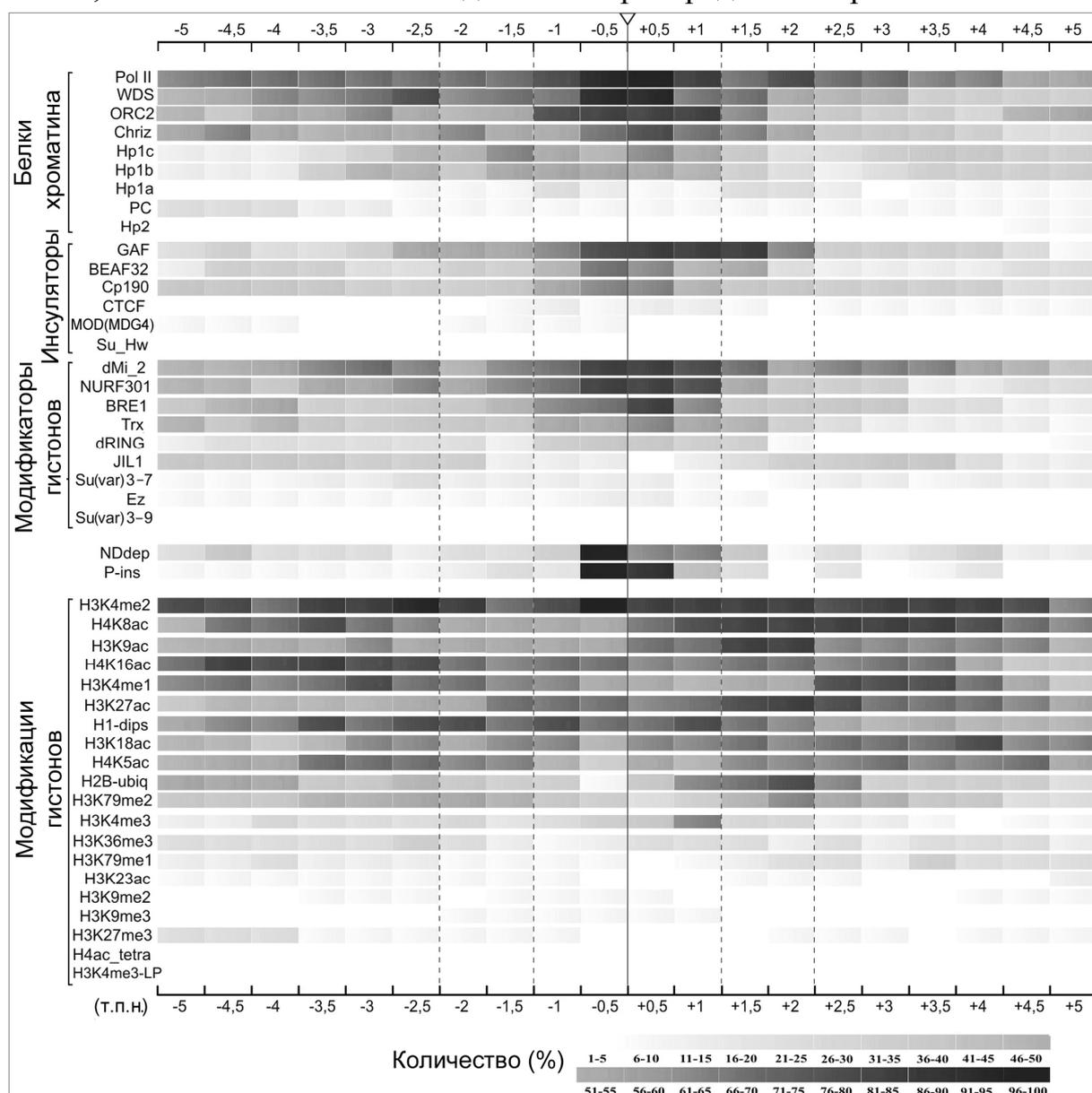


Рисунок 4. Интегрированное распределение индивидуальных белков и свойств хроматина в участках генома клеточных культур дрозофилы, соответствующих 13 междисковым районам политенных хромосом. Доли

фрагментов ДНК (в процентах), связывающие определенные белки или характеризующиеся определенной плотностью распределения мононуклеосом и встроок *P*-транспозонов и приходящиеся на каждый из участков размером 0,5 кб в пределах 10 кб (по 5 кб влево и вправо от *P*-транспозонов, маркирующих междиски), обозначены цветной кодировкой внизу рисунка. Вертикальными пунктирными линиями отмечены участки, наиболее вероятно относящиеся к междискам.

и других характеристик хроматина, полученные на культурах клеток в проекте modENCODE (Celniker et al., 2009). Были использованы данные по распределению белковых факторов в культуре клеток S2. На рисунке 4 показан анализ распределения каждого из белков хроматина и гистоновых модификаций, а также сайтов локализации *P*-транспозонов и участков с пониженной плотностью нуклеосом в пределах 10 т.п.н, центрированных относительно сайтов инсерций маркерных транспозонов в 13 междисковых районах. Оказалось, что последовательности от 1,5 до 4 т.п.н., ближайšie к этим сайтам, действительно значительно обогащены сайтами связывания таких белков –маркеров открытого хроматина как RNA pol II, CHRIZ, ORC2, GAF, BEAF-32, CP190, Trx, WDS, dMi-2, NURF301 и BRE1. Кроме того, эти же участки чаще всего проявляют сниженную плотность нуклеосом и характеризуются преимущественным встраиванием *P*-транспозонов (рис. 1, рис. 4). Среди гистоновых модификаций, характерных для активного хроматина, наиболее часто (50-100%) и широко (8-10 т.п.н.) представлены формы H3K4me2, H4K8Ac, H3K9Ac, H3K4me1 и H4K16Ac. В отличие от негистоновых белков - маркеров открытого хроматина, распределение гистоновых модификаций, характерных для этого типа хроматина, не носит ярко выраженного локального характера, однако наблюдается незначительное повышение их представленности к краям исследованных нуклеотидных последовательностей (рис. 4). В исследованных районах междисков представленность белков, характерных для закрытого хроматина, крайне низкая и нам не удалось выявить каких-либо закономерностей в их локализации.

5. Полногеномный анализ распределения белков, выявленных в районах междисков

Для анализа особенностей локализации белков в масштабе всего генома дрозофилы были использованы данные из базы GEO на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/> и modENCODE в виде gff-formatted files. Мы выбрали фрагменты с положительными значениями M-value и оценили их распределение и длины в пределах генома дрозофилы. Количество фрагментов, связывающих белки открытого хроматина, составляет 3000–5300. Они имеют длину 1-3 т.п.н., что соответствует размеру и количеству междисков в политенных хромосомах (Zhimulev, 1996). Наиболее высокие степени корреляции выявляются между группой белков, характерных для открытого хроматина выявляемых в 13 исследованных междисках, таких как BEAF-32, CHRIZ, RNApol II, ORC2, H1-dips, Trx, WDS, NURF301 и BRE1, а

также между белками, чаще относящимися к закрытому хроматину, - MOD(MDG4), SU(HW), E(Z), dRING (рис. 5а). Используя метод Agglomerative hierarchical clustering, мы оценили частоты колокализации белков, которые разделились на 3 группы (рис. 5б). Среди них наиболее часто вместе располагаются такие факторы открытого хроматина, как BEAF-32, CHRIZ, H1-dips, RNApol II, ORC2, Trx и WDS, значительная часть которых, по данным литературы, локализуется в районах междисков политенных хромосом.

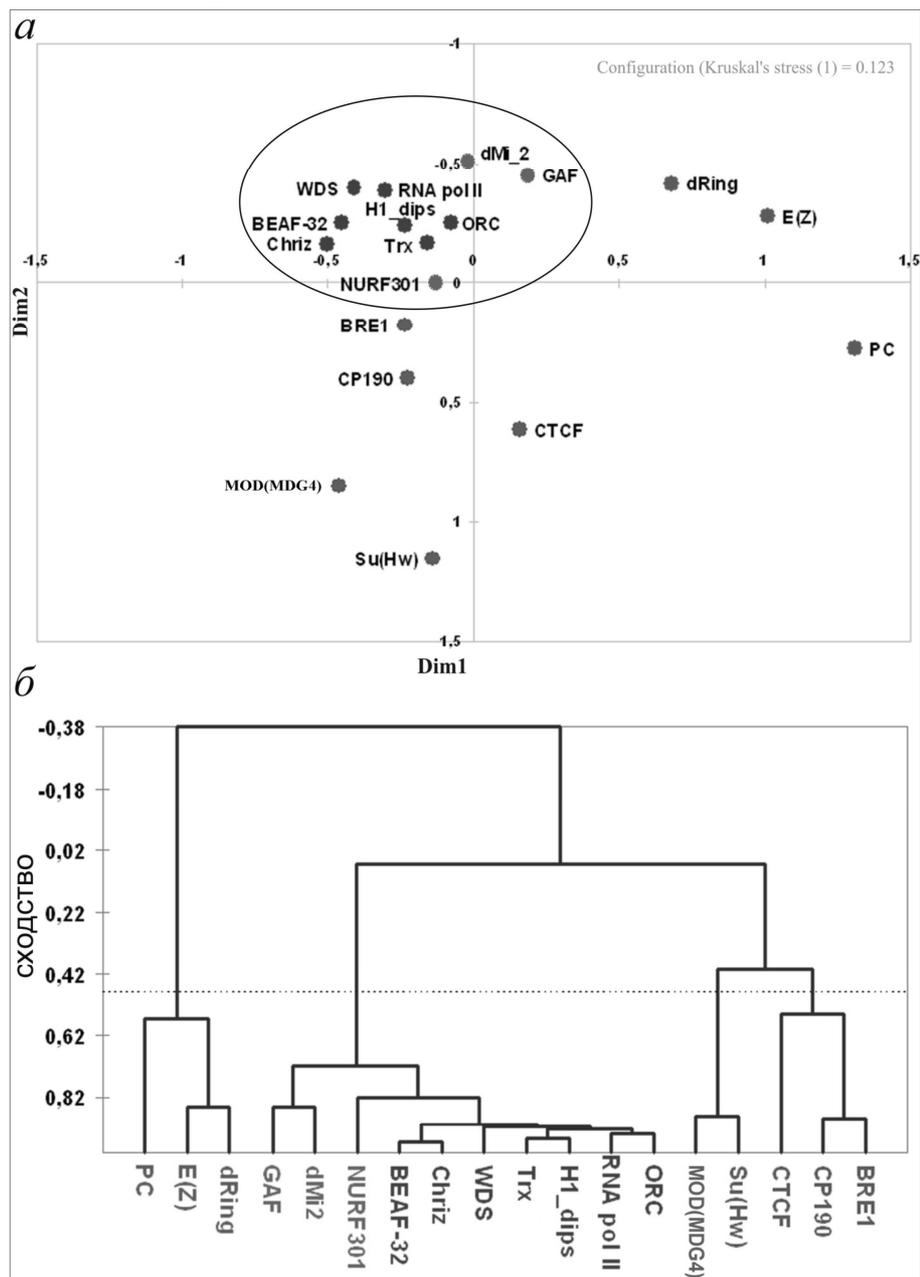


Рисунок 5. Оценка степени колокализации «междисковых» белков хроматина в масштабе всего генома дрозофилы. **(а)** График многомерного шкалирования (MDS) plot для 18 белковых факторов; по осям абсцисс и ординат показана степень колокализации белковых факторов (в условных единицах). **(б)** Аггломеративная иерархическая кластеризация белковых факторов (Agglomerative hierarchical clustering (AHC) (XLStat Inc., www.xlstat.com)).

6. Картирование цитологических структур на физической карте и характеристики дисков и междисков в районе 9F13 – 10B3

На основе данных о междиск-специфичных белках (Ватолина и др., 2011), белковых комплексах в геноме *Drosophila* (Filion et al., 2010) и результаты проекта modENCODE (Kharchenko et al., 2011) были впервые прокартированы границы дисков и междисков на физической карте и охарактеризованы их основные свойства. Мы изучили организацию хромосом митотически делящихся клеток в районе 9F13 – 10B3, который ранее был хорошо охарактеризован цитологически и генетически; многие гены в этом районе были локализованы на физической карте с помощью хромосомных перестроек; для этого района была построена электронно-микроскопическая карта (Zhimulev et al., 1981; Kozlova et al., 1994). Данные по точной локализации генов в изучаемом районе, цитологической локализации интеркалярного гетерохроматина, характеризующегося поздней репликацией, наличием белка SUUR, плотной упаковкой материала хромосомы и низкой плотностью генов, а также данные по распределению различных белков, модификаций гистонов, ORC2 и инсерций *P*-элементов, полученные на культурах клеток в масштабе генома *Drosophila* (данные modENCODE; Filion et al., 2010; Kharchenko et al., 2011; MacAlpine et al., 2010; van Steensel et al., 2010; Deal et al., 2010), были наложены на физическую и цитологическую карты исследуемого района (рис. 6).

По характеристикам хроматина в культурах клеток дрозофилы в районе 9F13 – 10B3 выделяется три домена (рис. 6). Необходимо отметить, что диск 10A1-2 политенных хромосом маркируется геном *v* в дистальной части и геном *sev* в проксимальной (Kozlova et al., 1994) (рис. 6а). Эти гены расположены на физической карте в длинном фрагменте инактивированного хроматина («черного», по Filion et al., 2010), который соответствует диску 10A1-2 в политенных хромосомах (рис. 6б).

Два больших домена, соответствующих дискам 10A1-2 и 10B1-2 размером 190 и 170 т.п.н., не содержат белков-маркеров открытого хроматина (рис. 6в), характеризуются отсутствием ДНКазы I гиперчувствительных сайтов (рис. 6г) и белков ORC2 (рис. 6д), поздней репликацией (рис. 6о), пониженной плотностью генов (рис. 6п). С этими доменами связываются белки-маркеры неактивного хроматина, такие как SUUR, Lamin и D1 (рис. 6л, м, н). Таким образом, эти два домена в культурах митотически делящихся клеток обладают свойствами интеркалярного гетерохроматина.

Средний домен, напротив, отличается высокой плотностью генов (рис. 6п), ранним завершением репликации (рис. 6о), отсутствием белков SUUR, Lamin и D1 (рис. 6л, м, н), наличием белков открытого активного хроматина (рис. 6в), ДНКазы I гиперчувствительных областей (рис. 6г), белков ORC2 (рис. 6д), участков, в которых отсутствует гистон H1 (рис. 6е). Белки и другие характеристики хроматина располагаются в этом домене локально, в виде узких участков размером 1-3 т.п.н. и число этих участков соответствует числу междисков политенной хромосомы в районе 9F13-10B3. Кроме того,

большие домены, которые соответствуют большим черным дискам 10A1-2 и 10B1-2 интеркалярного хроматина политенной хромосомы, также ограничены участками, содержащими специфичные для междисков белки

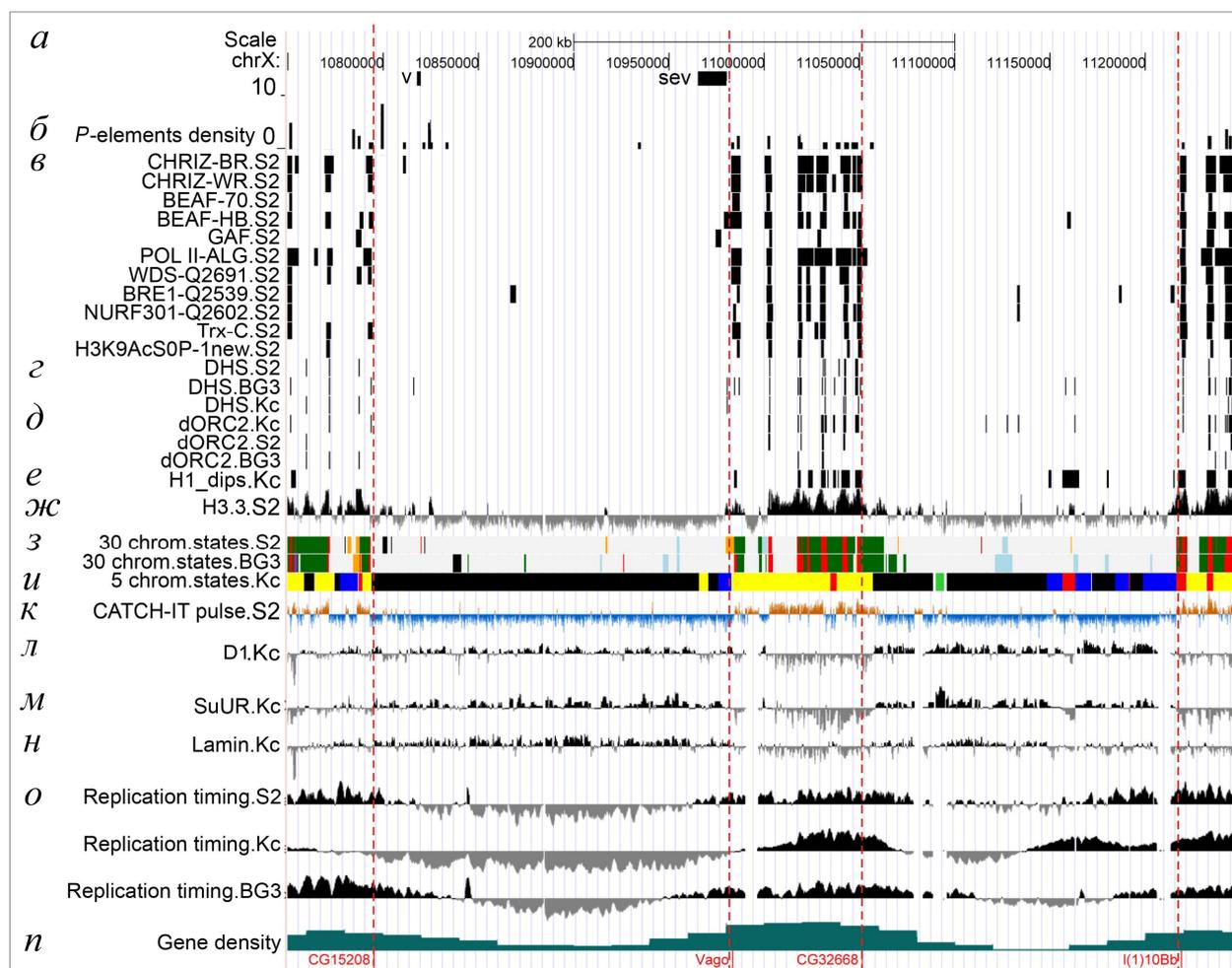
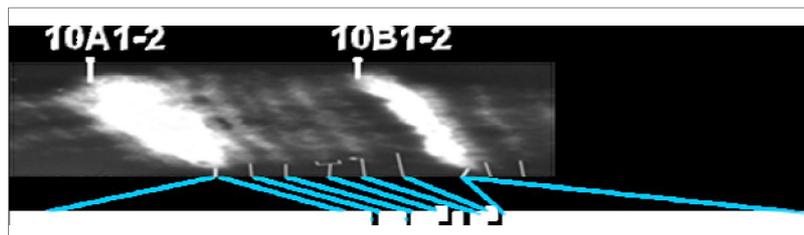


Рисунок 6. Локализация белков и характеристик хроматина в районе 9F13 – 10B3 митотических хромосом (данные modENCODE). **(а)** физическая карта ДНК; позиции генов *v* и *sev* согласно FlyBase. **(б)** количество инсерции *P*-элементов на 1 т.п.н. (данные FlyBase). **(в)** белки, специфические для междисков и открытого хроматина в клетках S2 (Kharchenko et al., 2011). **(г)** ДНКазы I гиперчувствительные сайты (DHSs) в культурах клеток S2, BG3 и Kc (Kharchenko et al., 2011). **(д)** сайты связывания ORC2 в культурах клеток S2, BG3, Kc и клетках слюнных желез личинок 3-го возраста (Eaton et al., 2010). **(е)** провалы в связывании гистона H1 в клетках Kc (Braunschweig et al., 2009). **(ж)** гистон H3.3 в клетках S2 (modENCODE, Henikoff group). **(з)** 30 типов хроматина в BG3 и S2 клетках (Kharchenko et al., 2011). **(и)** 5 типов хроматина в Kc клетках (Filion et al., 2010). **(к)** динамика нуклеосом в S2 клетках (Deal et al., 2010). **(л)** локализация белка D1 в клетках Kc (Filion et al., 2010). **(м)** локализация белка SuUR в клетках Kc (Filion et al., 2010). **(н)** локализация ламина в клетках Kc (Filion et al., 2010). **(о)** ранне-поздняя репликация в S2, Kc и BG3 клетках (Schwaiger et al., 2009). **(п)** плотность генов (Belyakin et al., 2010).

Картируя положение междиск-специфичных белков на физической карте, мы смогли оценить длину междисков и дисков. Междиски в районе 9F13 – 10B3 диплоидных хромосом составляют 5% от всей ДНК этого района, их размер варьирует от 1,3 до 4,2 кб (2,2 т.п.н. в среднем), что точно соответствует оценкам Беермана (1972), полученным на политенных хромосомах (5% и 2 т.п.н., соответственно). Длина диска 10A1-2 в диплоидных хромосомах (190,1 т.п.н.) практически точно соответствует оценкам длины этого диска в политенных хромосомах с помощью хромосомной ходьбы (183-195 т.п.н., 189 т.п.н. в среднем) (Kozlova et al., 1994). Таким образом, хромосомы митотически делящихся клеток обладают структурами, подобными дискам и междискам района 9F13-10B3 политенной X хромосомы.

Заключение

Полученные в данной работе результаты позволяют сделать следующее заключение относительно структурной и функциональной организации междисковых районов. Междиски являются структурами размером около 1-3 т.п.н. и характеризуются: уникальными последовательностями ДНК; автономной открытой конформацией хроматина; локализацией белков, специфичных для открытого хроматина; наличием участков, в которых отсутствует гистон H1; сниженной плотностью нуклеосом; гиперчувствительностью к ДНКазе I; высоким уровнем инсерций *P*-элементов; локализацией белков ORC; представлены межгенными областями и 5' некодирующими участками генов. Районы, соответствующие междискам политенных хромосом, сохраняют консервативную структуру в интерфазных хромосомах разных клеточных типов и связываются с белками, участвующими в общеклеточных процессах, таких как транскрипция (содержат сайты связывания РНК полимеразы II), репликация и модификации хроматина.

На основании полученных данных развивается представление о междиске как базовой постоянной структуре интерфазной хромосомы.

ВЫВОДЫ

1. На основании данных по цитологическому картированию встроенок *P*-транспозонов в районы междисков клонированы, определены и локализованы на молекулярной карте последовательности ДНК семи междисков.

2. Анализ молекулярно-генетической организации последовательностей ДНК 13 междисков (семи, полученных в данной работе и шести, идентифицированных ранее) показал, что они в большинстве случаев представлены некодирующими межгенными спейсерами и 5' некодирующими областями генов. В двух случаях междиски представлены интроном и экзоном генов.

3. Междисковые районы обогащены ДНКазы I гиперчувствительными участками. Положение этих участков сохраняется в последовательностях ДНК междисков, перенесенных в другое генетическое окружение.

4. Показано, что в пределах протяженных участков геномной ДНК встройки *P*-транспозонов происходят преимущественно в районы исследуемых междисков. Локализация сайтов встраивания *P*-транспозонов коррелирует с положением ДНКазы I гиперчувствительных участков.

5. Районы междисков в политенных и митотически делящихся клетках содержат сходный набор белков-маркеров открытого хроматина: РНК-полимеразу II, ORC2, GAF, TRX, CHRIZ и ацетилированные гистоны. Эти районы обеднены белками репрессированного, неактивного хроматина: PC, E(Z), H3K9Me3, H3K27Me3 и др.

6. Белки открытого хроматина, характерные для междисков, в рамках всего генома дрозофилы демонстрируют преимущественную колокализацию.

7. Данные о междиск-специфичных белковых компонентах позволили определить границы дисков и междисков на физической карте (для района 9F13–10B3). Показано, что в митотически делящихся клетках организация хроматина в данном районе соответствует рисунку дисков и междисков политенной хромосомы.

Список публикаций по теме диссертации

1. Semeshin V.F., Demakov S.A., Shloma V.V., **Vatolina (Zykova) T.Yu**, Gorchakov A.A., Zhimulev I.F. Interbands behave as decompacted autonomous units in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Genetica*, 2008, 132(3), 267-279.
DOI 10.1007/s10709-007-9170-5
2. Демаков С.А., Андреев О.В., Беркаева М.Б., **Ватолина (Зыкова) Т.Ю.**, Волкова Е.И., Квон Е.З., Семешин В.Ф., Жимулев И.Ф. «Функциональная организация междисков политенных хромосом дрозофилы». *Генетика* (2010) N10, 1421-1423
3. **Ватолина (Зыкова) Т. Ю.**, Демаков С. А., Семешин В. Ф., Макунин И. В., Бабенко В. Н., Беляева Е. С., Жимулев И. Ф. Идентификация и молекулярно-генетическая характеристика междисков политенных хромосом *Drosophila melanogaster*. *Генетика*, 2011, № 5, С. 597-609

Тезисы конференций

1. **Ватолина (Зыкова) Т.Ю.**, Демаков С.А., Семешин В.Ф., Шлома В.В., Жимулев И.Ф. Клонирование и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей ДНК междисков политенных хромосом *Drosophila melanogaster*// *Цитология*. – 2005. - Т. 47(9). С. 799-800.
2. Demakov S., Gortchakov A., Semeshin V., Shloma V., **Vatolina (Zykova) T.**, Zhimulev I. Analysis of interbands of *D. melanogaster* polytene chromosomes using a novel *P*-transposon pICon. 19th European *Drosophila* Research Conference. August 31- September 3, 2005. Eger, Hungary. 120 p.

3. **Ватолина (Зыкова) Т.Ю.**, Демаков С.А., Семешин В.Ф., Шлома В.В., Жимулев И.Ф. Сравнительный анализ последовательностей ДНК тринадцати междисков политенных хромосом *Drosophila melanogaster*. «Проблемы молекулярной и клеточной биологии». Сб. материалов Международной молодежной научно-методической конференции 9 - 12 мая 2007 г. (Под ред. В.Н. Стегния). Томск: ТГУ, 2007. С. 44-45.
4. **Ватолина (Зыкова) Т. Ю.**, Семешин В.Ф., Демаков С.А. Молекулярно-генетическая организация междисков политенных хромосом *Drosophila melanogaster*. International Conference “Chromosome 2009”, Novosibirsk, Aug 31- Sep 6, 2009, Abstracts of the Conference. Poster. P. 123
5. Демаков С.А., Андреенков О.В., Беркаева М.Б., **Ватолина (Зыкова) Т.Ю.**, Волкова Е.И., Квон Е.З., Семешин В.Ф., Жимулев И.Ф. Функциональная организация межхромомеров политенных хромосом дрозофилы. International Conference “Chromosome 2009”, Novosibirsk, Aug 31- Sep 6, 2009, Abstracts of the Conference. P. 104
6. Zhimulev I.F., **Vatolina (Zykova) T.Yu.**, Belyaeva E.S., Demakov S.A., Semeshin V.F., Makunin I.V., Babenko V.N., Belyakin S.N., Goncharov F.P., Kokoza E.B., Boldyreva L.V., Demakova O.V., Andreyeva E.N. Fundamental principles of interphase chromosomes organization in eukaryotes. Proceedings of the International Symposium “Control of gene expression and cancer”. June 21-25, 2010, Moscow, Russia.
7. **Ватолина (Зыкова) Т.Ю.**, Демаков С.А., Семешин В.Ф., Макунин И.В., Бабенко В.Н., Жимулев И.Ф. Молекулярно-генетический анализ междисковых районов политенных хромосом *Drosophila melanogaster*. Цитология 2010, т. 52 (N8): 650. (Материалы XVI Всероссийского симпозиума «Структура и функции клеточного ядра», Санкт-Петербург, 5-7 октября 2010 г.)
8. Zhimulev I.F., **Vatolina (Zykova) T.Yu.**, Babenko V.N., Demakov S.A., Belyaeva E.S. Chromosomal organization of *Drosophila melanogaster* genome. 2nd Annual Drosophila Research Conference, San Diego, CA, USA. March 30-April 3, 2011. Abstracts of the Conference.