

СИДОРЕНКО ДАРЬЯ СЕРГЕЕВНА

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ЧЕТВЁРТОЙ ХРОМОСОМЫ *DROSOPHILA MELANOGASTER***

03.01.07 Молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск–2019

Работа выполнена в Лаборатории хромосомной инженерии ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

Научный руководитель: **Жимулев Игорь Федорович**, доктор биологических наук, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярной цитогенетики, научный руководитель ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

Оппоненты: **Фёдорова Светлана Александровна**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующая Сектором генетики клеточного цикла ФИЦ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

Чуриков Николай Андреевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, г. Москва

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, г. Москва

Защита состоится: 27 ноября 2019 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета Д 003.074.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН (630090, Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 8/2, тел. (383)-373-02-49, e-mail: ovant@mcb.nsc.ru С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН https://www.mcb.nsc.ru/diss_council/autoref

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

О.В. Антоненко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Экспрессия генов в период интерфазы определяет многие биологические процессы, происходящие в эукариотических клетках. Известно, что генетическая активность хромосом связана с их структурной организацией. Для более чёткого понимания этой взаимосвязи необходимо сопоставить структуры интерфазных хромосом с генами, и, соответственно, геномными координатами. Классические политенные хромосомы *Drosophila* на протяжении многих лет широко использовались в качестве модели для исследования интерфазных хромосом, поскольку это единственный тип хромосом, которые можно визуализировать по всей их длине в интерфазном ядре. Эти гигантские хромосомы возникают в специализированных клетках (слюнные железы, питающие клетки ооцитов) благодаря многочисленным раундам репликации без последующего расхождения дочерних хроматид, которые, напротив, остаются тесно связанными друг с другом. Благодаря этому, хромомерный рисунок интерфазных хромосом становится контрастно выраженным в виде чередующихся тёмных и светлых поперечных полос. Плотнo упакованный хроматин в политенных хромосомах образует чёрные диски, умеренно конденсированные районы формируют рыхлые серые диски, а деконденсированные области являются светлыми междисками.

В настоящее время накоплено большое количество полногеномных данных по организации интерфазного хроматина культур клеток, делящихся митозом, в частности, в рамках проекта modENCODE (model organism Encyclopedia of DNA Elements) [The modENCODE Consortium *et al.*, 2010]. Прорывом в систематизации таких данных является создание компьютерных моделей, разделяющих хроматин *Drosophila melanogaster* на отдельные состояния. На основании распределения 53 различных белков хроматина, прокартированных методом DamID, было выделено пять типов хроматина, три из которых относятся к репрессированному, а два – к активному хроматину [Filion *et al.*, 2010]. Две более подробных классификации состояний хроматина с выделением девяти и 30 типов хроматина были получены при исследовании локализации 18 модификаций гистонов, определённой методом ChIP-on-chip (chromatin immunoprecipitation on chip) [Kharchenko *et al.*, 2011]. Ещё одна группа исследователей применила альтернативный подход. Они определяли чувствительность хроматина к обработке ДНКазой I и, в результате, разделили хроматин на «открытый», «закрытый» и «нейтральный» [Milon *et al.*, 2014]. Все эти модели позволяют делать некоторые выводы и обобщения о структуре интерфазного хроматина *D. melanogaster*, и

каждая из них успешно применяется при анализе конкретных районов хромосом, однако они оказались неприменимы для точного соотнесения дисков и междисков политенных хромосом с геномными координатами [Zhimulev et al., 2014].

Для решения этой задачи в нашей лаборатории на основании распределения белков «открытого» хроматина, обогащённых в ранее привязанных к геномной карте междисках, была разработана модель четырёх состояний хроматина [Vatolina et al., 2011a,b; Demakov et al., 2011; Zhimulev et al., 2014; Boldyreva et al., 2017; Zyкова et al., 2018]. Преимуществом данной модели является хорошее соответствие полученных типов хроматина дискам и междискам с ранее установленными молекулярными координатами. В настоящее время данная модель успешно применяется для сопоставления большого количества дисков и междисков политенных хромосом с молекулярной картой генома *D. melanogaster* [Zhimulev et al., 2014; Khoroshko et al., 2016; Zhimulev et al., 2016; Kolesnikova, Goncharov, Zhimulev, 2018; Khoroshko et al., 2019].

Сопоставление молекулярной карты генома дрозофилы и имеющегося большого массива полногеномных данных о локализации генов, модификаций гистонов, белков хроматина и различных регуляторных сайтов с подробными цитологическими картами политенных хромосом, отражающими структурную организацию генома в интерфазном ядре клетки, позволит понять закономерности функционирования генома и их взаимосвязь с морфологией хромосом. Данная работа посвящена такому исследованию четвёртой хромосомы дрозофилы.

Детальной общепризнанной цитологической карты четвёртой хромосомы на данный момент не существует. Это связано со сложностями работы с данной хромосомой на цитологическом уровне, обусловленными маленькими размерами хромосомы, большим количеством рыхлых серых дисков и загибанием её дистального конца с образованием эктопических контактов с хромоцентром. Четвёртая хромосома была выбрана объектом изучения, поскольку обладает рядом уникальных свойств. С одной стороны, плотность генов политенизированной части данной хромосомы соответствует эухроматину. В то же время, она обладает свойствами гетерохроматина, такими как отсутствие рекомбинации и, как следствие, высокая плотность повторённых последовательностей ДНК, и наличие белка гетерохроматина HP1a [Riddle, Shaffer, Elgin, 2009]. Кроме того, хроматин четвёртой хромосомы содержит уникальный в геноме дрозофилы усиливающий экспрессию генов четвёртой хромосомы белок POF (painting

of fourth) [Larsson et al., 2001] и специфичную для данной хромосомы гистонметилтрансферазу dSETDB1 [Seum et al., 2007].

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является исследование молекулярной и цитогенетической организации четвёртой политенной хромосомы *Drosophila melanogaster*.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Сопоставить цитологическую и молекулярно-генетическую карты политенизированной части четвёртой хромосомы.
2. Построить функциональную карту четвёртой хромосомы, сочетающую в себе локализацию дисков и междисков, генов, белков, мобильных элементов и регуляторных элементов генома.
3. Исследовать распределение молекулярных и генетических свойств дисков и междисков четвёртой хромосомы.

Научная новизна. В ходе данной работы с помощью впервые применённого комбинированного метода картирования целых секций политенных хромосом была построена подробная цитологическая карта четвёртой политенной хромосомы *D. melanogaster*, приближающаяся по уровню разрешения к электронно-микроскопической карте. Впервые было проведено тонкое картирование всех дисков и междисков целой хромосомы на молекулярной карте генома дрозофилы с использованием модели четырёх состояний хроматина [Zhimulev et al., 2014] и метода флуоресцентной *in situ* гибридизации. Благодаря анализу полногеномных данных, в пределах структур четвёртой хромосомы были получены новые данные о молекулярной и цитогенетической организации исследуемой хромосомы. А именно, было определено генетическое содержание дисков и междисков, а также оценена частота встраивания транспозонов, исследовано распределение сайтов гиперчувствительности к ДНКазе I, сайтов связывания белка репликативного комплекса ORC2, модифицированного гистона H3K27me3 и белков, обеспечивающих уникальное эпигенетическое состояние четвёртой хромосомы – HP1a и POF. Были выявлены отличия в обогащении белками различных типов хроматина четвёртой хромосомы и целого генома дрозофилы. С использованием модели четырёх состояний хроматина [Zhimulev et al., 2014] было показано, что четвёртая хромосома в культурах клеток, делящихся митозом, представлена чередованием структур, соответствующих дискам и междискам данной хромосомы. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что несмотря на явные отличия в организации хроматина четвёртой хромосомы, такие как сочетание свойств эу- и гетерохроматина и наличие уникальных белков POF и dSETDB1, генетическое содержание и некоторые особенности молекулярной организации её цитологических структур (распределение

P-элементов, сайтов гиперчувствительности к ДНКазе I, белка репликативного комплекса ORC2) соответствуют организации дисков и междисков больших плеч политенных хромосом *D. melanogaster*.

Теоретическая и практическая значимость. В данной работе по тонкому картированию дисков и междисков определены геномные координаты морфологических структур целой четвёртой хромосомы *D. melanogaster*. Для картирования границ индивидуальных дисков и междисков и целых секций политенных хромосом (ПХ) показана эффективность применения модели четырёх состояний хроматина [Zhimulev et al., 2014] в сочетании с флуоресцентной *in situ* гибридизацией (FISH) на ПХ личинок дрозофилы, одновременно несущих мутации в генах *SuUR* и *Su(var)3-9* для подавления недорепликации и лучшего расправления ПХ на цитологических препаратах. С использованием данных полногеномных проектов в пределах установленных координат исследована молекулярно-генетическая организация дисков и междисков четвёртой хромосомы *D. melanogaster*, которая долгое время оставалась малоизученной ввиду её необычной организации и сложностей с микроскопическим анализом. Полученные данные могут представлять интерес для учёных, исследующих функции генов четвёртой хромосомы дрозофилы. Результаты данной работы расширяют теоретическую базу знаний об организации интерфазных хромосом и могут быть в дальнейшем использованы для педагогического процесса (дополнить лекционный материал для студентов, изучающих биологию).

Положения, выносимые на защиту:

Впервые предложен комбинированный метод картирования интерфазных политенных хромосом *D. melanogaster*, сочетающий использование модели четырёх типов хроматина, FISH на политенных хромосомах, метод иммунофлуоресценции, мутации в генах *SuUR* и *Su(var)3-9* для значительного улучшения качества хромосом на препаратах. С использованием данного метода и 38 FISH-зондов была построена подробная цитологическая карта и определены геномные координаты дисков и междисков четвёртой хромосомы *D. melanogaster*.

Исследован хроматиновый состав и генетическая организация каждой цитологической структуры политенной четвёртой хромосомы.

Построена функциональная карта четвёртой хромосомы, сочетающая в себе локализацию дисков и междисков, генов, белков, мобильных элементов и регуляторных элементов генома.

Апробация работы. Результаты данной работы обсуждались на научных конференциях и опубликованы в девяти тезисах, в том числе, на международной конференции «Хромосома-2015» (Новосибирск, Россия,

2015), на VII Международной школе молодых учёных по молекулярной генетике «Геномика и биология живых систем» (Звенигород, Россия, 2016), на 13й международной конференции по гетерохроматину *Drosophila* (Кальяри, Италия, 2017) и на международной конференции «Хромосома-2018» (Новосибирск, Россия, 2018).

Вклад автора. Основная часть работы была выполнена автором самостоятельно, в частности, проведён анализ препаратов ПХ для FISH (флуоресцентной *in situ* гибридизации) и иммунодетекции, на новых принципах построена цитологическая карта четвёртой хромосомы *D. melanogaster*, определены геномные координаты её дисков и междисков с использованием модели четырёх состояний хроматина в сочетании с FISH, определено генетическое содержание и исследовано распределение различных свойств хроматина в морфологических структурах четвёртой хромосомы. Компьютерный алгоритм, разделяющий хроматин на четыре типа, создан Ф. П. Гончаровым (Программа для ЭВМ НММ4Band, свидетельство №2014618888). Привязка дисков и междисков четвёртой хромосомы к молекулярной карте генома *D. melanogaster* проводилась совместно с академиком РАН, д.б.н., проф. И.Ф. Жимулёвым. Анализ различий в обогащении белками четырёх типов хроматина в составе четвёртой хромосомы и полного генома *D. melanogaster* выполнен совместно с Ф.П. Гончаровым. Компьютерная программа для подсчёта плотности распределения различных элементов генома в указанных геномных координатах написана И. А. Сидоренко.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из оглавления, введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, списка использованных сокращений, и списка цитируемой литературы, в который входит 158 ссылок. Работа изложена на 149 страницах текста, содержит пять таблиц и 37 рисунков.

Публикации. По результатам и проблематике настоящего исследования опубликовано 12 работ, из них 3 статьи в рецензируемых изданиях рекомендованного перечня ВАК и 9 тезисов конференций.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю, академику РАН, д.б.н., проф. Игорю Федоровичу Жимулеву за помощь на всех этапах выполнения диссертации, д.б.н. Сергею Анатольевичу Демакову, к.б.н. Татьяне Дмитриевне Колесниковой, к.б.н. Татьяне Юрьевне Зыковой за помощь в работе и обсуждение результатов, Фёдору Павловичу Гончарову и Ивану Алексеевичу Сидоренко за помощь в биоинформатическом анализе данных, PhD, проф. Яну Ларссону за обсуждение работы и любезно

предоставленные антитела к белку POF, а также всем сотрудникам Лаборатории хромосомной инженерии и Лаборатории молекулярной цитогенетики ИМКБ СО РАН за постоянную поддержку.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Обзор литературы содержит сведения об организации политенных хромосом, истории их открытия, явлении политении, постоянстве дискового рисунка и о генетической организации. Также обсуждены подходы к созданию функциональных карт интерфазных хромосом, рассмотрены различные модели, разделяющие интерфазный хроматин дрозофилы на отдельные типы, описано современное состояние исследований в данной области. Отдельно представлены данные о модели четырёх типов хроматина, которая была применена в настоящей работе [Zhimulev et al., 2014]. Подробно рассмотрен вопрос об организации хроматина четвёртой хромосомы *D. melanogaster*, детальному исследованию которой посвящена данная работа.

Материал и методы исследования

В данной работе использовалась линия дрозофилы генотипа $\widehat{XY}\widehat{XY}/\widehat{XY}$; *y w*; *SuUR^{ES}*, *Su(var)3-9⁰⁶* со сниженной недорепликацией политенных хромосом для лучшего расправления четвёртой хромосомы на препаратах. Были применены такие методы как флуоресцентная ДНК/ДНК *in situ* гибридизация (FISH), полимеразная цепная реакция, выделение геномной ДНК из целых мух, электрофорез ДНК в агарозном геле, очистка ДНК из раствора переосаждением, мечение ДНК методом статистической затравки с использованием напрямую меченых флуорохромами dNTP, иммуноокрашивание политенных хромосом, анализ препаратов политенных хромосом при помощи световой и эпифлуоресцентной микроскопии, обработка изображений при помощи пакета программ Adobe, анализ полногеномных данных по распределению белков и регуляторных элементов генома.

Результаты и обсуждение

На данный момент не существует детальной общепризнанной цитологической карты четвёртой хромосомы. Большое количество рыхло упакованных серых дисков, малый размер и эктопические контакты дистального конца с хромоцентром затрудняют анализ дискового рисунка данной хромосомы. При помощи 38 FISH зондов мы провели картирование политенизированной части правого плеча четвёртой хромосомы 101E–102F. Зонды подбирали в соответствии с моделью четырёх типов хроматина [Zhimulev et al., 2014]. Модель четырёх

состояний хроматина является удобным инструментом для сопоставления дисков и междисков политенных хромосом с молекулярной картой генома *Drosophila*, поскольку эти типы хроматина хорошо соответствуют структурам, положение которых на геномной карте уже известно.

Пример FISH показан на рисунке 1. Результаты сравнивали с картами К. Бриджеса, электронно-микроскопической фотографией В. Ф. Семешина и номенклатурой дисков из работы [Saura et al., 2002]. Использование линии мух, содержащей мутации в генах *SuUR* и *Su(var)3-9*, позволило получить цитологические препараты с хорошо расправленной четвёртой хромосомой с чётко видимым рисунком дисков. Полученные препараты были затем использованы для тонкого картирования морфологических структур четвёртой хромосомы на молекулярно-генетической карте.

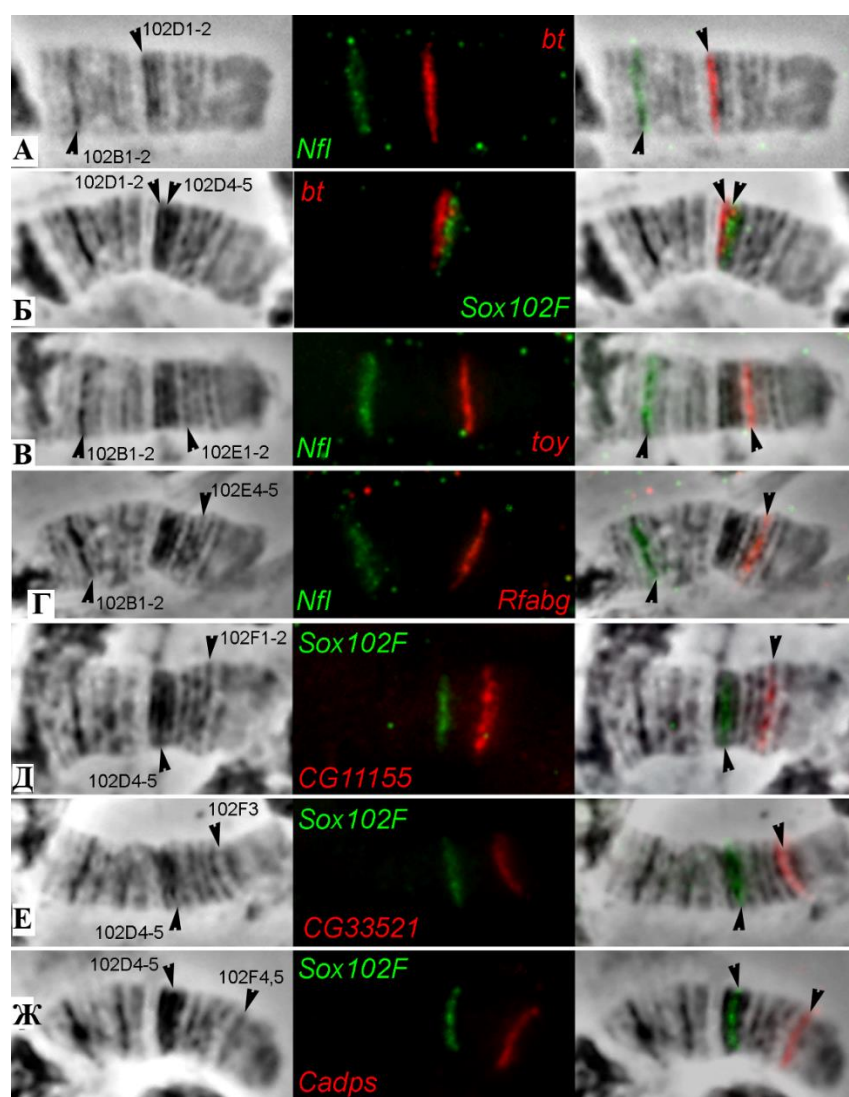


Рисунок 1. FISH на политенной четвёртой хромосоме. Зонды из дисков, предсказанных моделью четырёх типов хроматина [Zhimulev et al., 2014]. Слева направо: фазово-контрастная микрофотография четвёртой хромосомы, совмещённые FISH сигналы и их наложение. Красные сигналы соответствуют зондам, меченым флуорохромом TAMRA,

зелёные сигналы соответствуют зондам, меченым флуорохромом Fluorescein. Стрелками показаны: **А** – зонд *NfI* в диске 102B1-2, зонд *bt* в диске 102D1-2; **Б** – зонд *bt* в диске 102D1-2, зонд *Sox102F* в диске 102D4-5; **В** – зонд *NfI* в диске 102B1-2, зонд *toy* в диске 102E1-2; **Г** – зонд *NfI* в диске 102B1-2, зонд *Rfabg* в диске 102E4-5; **Д** – зонд *Sox102F* в диске 102D4-5, зонд *CG11155* в диске 102F1-2; **Е** – зонд *Sox102F* в диске 102D4-5, зонд *CG33521* в диске 102F3; **Ж** – зонд *Sox102F* в диске 102D4-5, зонд *Cadps* в диске 102F4,5.

Результаты локализации зондов в структурах политенной четвёртой хромосомы позволили нам привязать цитологическую карту к молекулярно-генетической карте. Мы определили геномные координаты всех дисков и междисков четвёртой хромосомы и построили функциональную карту, сочетающую в себе локализацию дисков и междисков, доменов хроматина четырёх типов, генов, белков, мобильных элементов и регуляторных элементов генома. Пример фрагмента такой карты показан на рисунке 2.

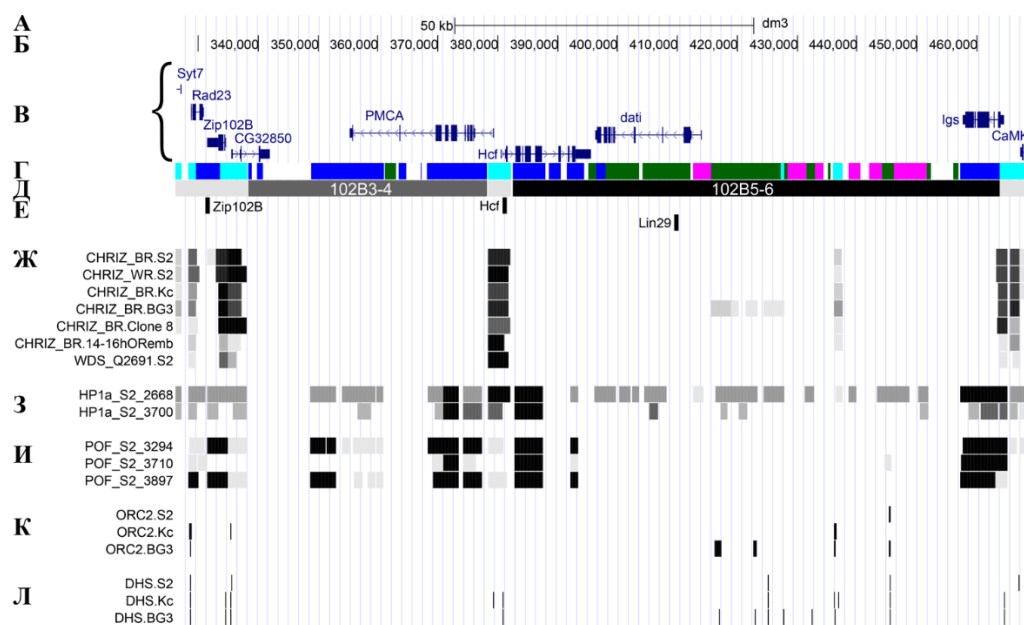


Рисунок 2. Молекулярная, генетическая и цитологическая организация участка 102B3-4 – 102B5-6 четвёртой хромосомы: **А** – шкала масштаба (т.п.н.); **Б** – геномные координаты (п.н.); **В** – гены; **Г** – локализация доменов хроматина согласно модели четырёх типов хроматина; цвета соответствуют типам хроматина: светло-голубой – хроматин «aquamarine», синий – хроматин «lazurite», зелёный – хроматин «malachite», розовый – хроматин «ruby» [Zhimulev et al., 2014; Boldyreva et al., 2017]. Белый цвет соответствует районам, в которых модель не выдаёт определённое значение; **Д** – схема локализации дисков и междисков относительно геномных координат. Указаны номера дисков. Чёрный «ruby»-содержащий диск обозначен чёрным прямоугольником, серый диск обозначен тёмно-серым прямоугольником, междиски

обозначены светло-серыми прямоугольниками. **Е** – FISH зонды; **Ж** – локализация белков «открытого» хроматина CHRIZ и WDS в разных типах клеток (данные modENCODE); здесь и далее градация от серого к чёрному цвету в данных о распределении белков соответствует уровню «светимости» в ChIP-эксперименте; **З** – локализация белка HP1a в S2 клетках (данные modENCODE); **И** – локализация белка POF в S2 клетках (данные modENCODE); **К** – локализация белка ORC2 в разных типах клеток [Eaton et al., 2011]; **Л** – локализация сайтов гиперчувствительности к ДНКазе I (DHS) [Kharchenko et al., 2011].

Из рисунка 2 видно, что междиски 102B1-2/B3-4, 102B3-4/B5-6 и 102B5-6/B7 представлены, в основном, «aquamarine» хроматином, содержат 5'-концы генов и небольшие гены целиком, а также белки «открытого» хроматина CHRIZ и WDS. Серый диск 102B3-4 состоит преимущественно из хроматина «lazurite» и имеет размер ~40 т.п.н. Занят полностью структурными частями генов, 5'-концы которых расположены во фланкирующих междисках. Крупный чёрный диск 102B5-6 содержит три гена, представлен, в основном, плотным «ruby» и «malachite» хроматином, имеет размер ~81 т.п.н. По краям к диску присоединены домены «lazurite» хроматина, содержащие структурные части повсеместно активных генов, 5'-концы которых расположены во фланкирующих междисках. За счёт объединения срединной плотной области диска из «ruby» и «malachite» хроматина с краевым «lazurite» хроматином, который должен соответствовать серым дискам, размер диска существенно увеличивается. Характерные для четвёртой хромосомы белки HP1a и POF преимущественно локализуются в типах хроматина, соответствующих междискам и серому диску 102B3-4 и практически отсутствуют в чёрном диске 102B5-6. Сайты связывания белка комплекса инициации репликации ORC2 и сайты гиперчувствительности к ДНКазе I, в основном, находятся в междисках.

Таким образом мы проанализировали всю четвёртую хромосому и определили геномные координаты её цитологических структур. На рисунке 3 показан хроматиновый состав всех типов морфологических структур данной хромосомы. Кроме того, мы исследовали генетическую организацию структур четвёртой хромосомы (Рисунок 4). Мы показали, что 26 междисков четвёртой хромосомы содержат, в основном, «aquamarine» хроматин и соответствуют 5'-концам повсеместно активных генов, 16 серых дисков преимущественно представлены «lazurite» хроматином и обогащены кодирующими частями этих генов, 11 чёрных дисков содержат большую часть «ruby» хроматина, а также «malachite» и «lazurite», кодирующие части и целые гены, экспрессирующиеся в

меньшем количестве тканей, чем гены, 5'-концы которых локализованы в междисках.

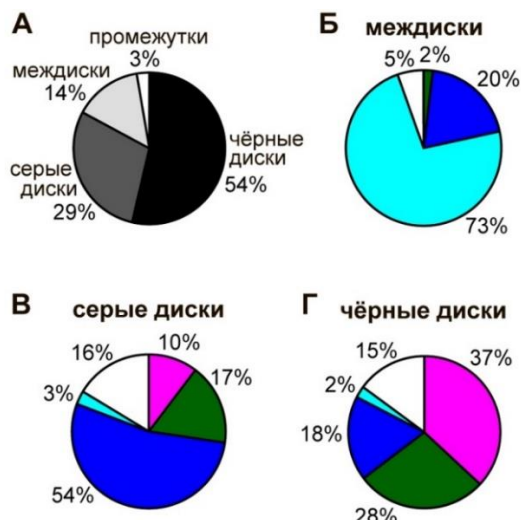


Рисунок 3. Морфологический и хроматиновый состав четвёртой хромосомы. **А** – Доли, занимаемые дисками и междисками в четвёртой хромосоме. Здесь и далее цвета на диаграмме соответствуют морфологическим структурам, белые секции соответствуют промежуткам, которые не были включены в диски или междиски. Хроматиновый состав: **Б** – междисков; **В** – серых дисков; **Г** – чёрных дисков четвёртой хромосомы. Цвет секции соответствует названию типа хроматина.

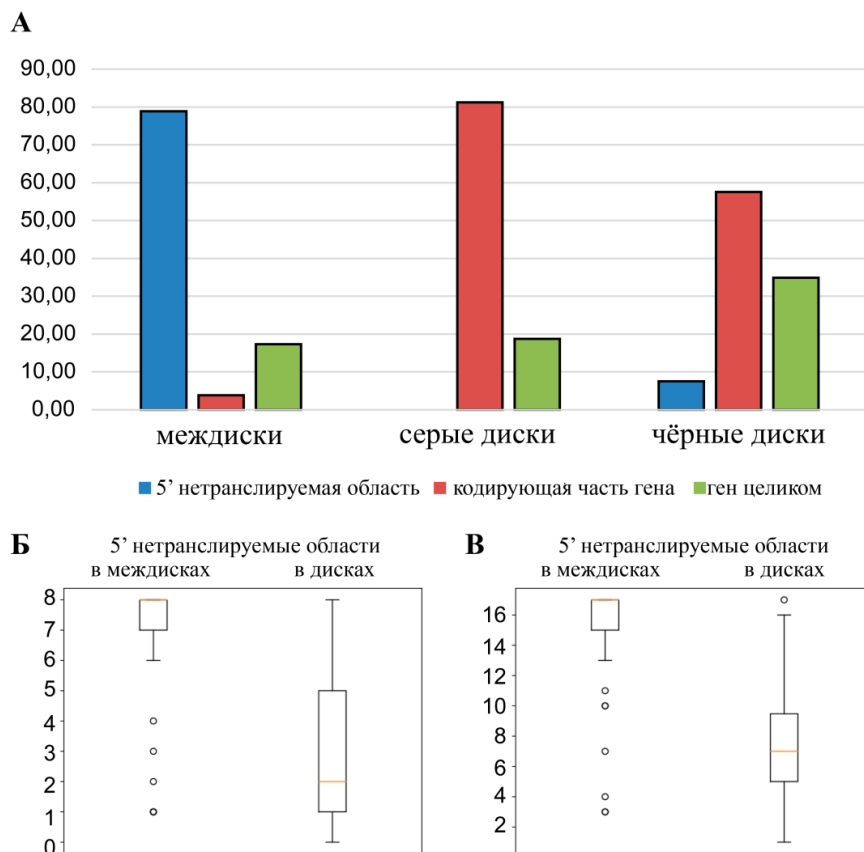


Рисунок 4. Генетическая организация доменов четвёртой хромосомы и «широта» экспрессии генов. **А** – Обогащение разных частей генов в

структурах четвёртой хромосомы **Б** – Количество тканей личинки (максимум – восемь), в которых экспрессируются гены четвёртой хромосомы (обработанные данные [Chintapalli, Wang, Dow, 2007]) **В** – Количество тканей имаго (максимум – 17), в которых экспрессируются гены четвёртой хромосомы (обработанные данные [Chintapalli, Wang, Dow, 2007]).

Благодаря привязке цитологических структур политенной четвёртой хромосомы к молекулярной карте генома мы получили возможность исследовать организацию дисков и междисков с использованием данных полногеномных проектов. Четвёртая хромосома обладает особым эпигенетическим статусом, который обеспечивается, в частности, белком POF. С использованием данных по иммунопреципитации хроматина [Lundberg et al., 2013; Johansson, Larsson, 2014] мы исследовали распределение белка POF в хромосомах клеток слюнных желёз личинок *Drosophila*. POF в слюнных железах преимущественно локализован в доменах хроматина «lazurite» и «aquamarine» (Рисунок 5) и в соответствующих им серых дисках и междисках четвёртой хромосомы (Рисунок 5). POF полностью отсутствует в компактном «guby» хроматине. Наличие POF в чёрных дисках объясняется тем, что эти диски в четвёртой хромосоме содержат не только «guby» хроматин, но также и достаточно большую часть хроматина типов «malachite» и «lazurite» (Рисунок 3).

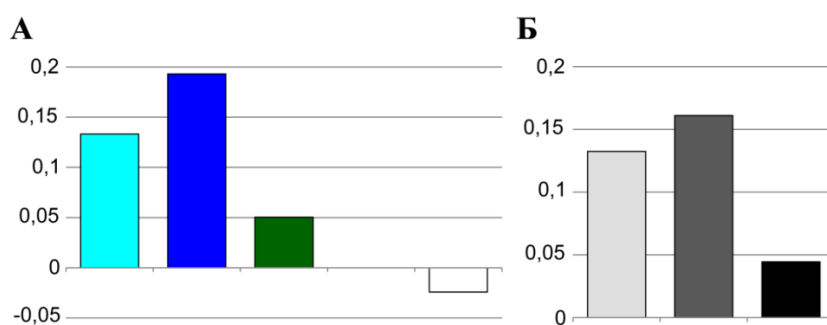


Рисунок 5. Распределение белка POF в четвёртой хромосоме в клетках слюнных желёз личинок *D. melanogaster* (анализ данных [Lundberg et al., 2013; Johansson, Larsson, 2014]): **А** – относительно доменов хроматина четырёх типов [Zhimulev et al., 2014] и **Б** – относительно дисков и междисков. Показано значение медианы пиков ChIP-профилей для каждого типа доменов.

Мы также исследовали распределение белка POF в политенных хромосомах при помощи иммунолокализации антител к данному белку на препаратах политенных хромосом и выявили, что POF локализован в некоторых сайтах «открытого» хроматина четвёртой хромосомы – преимущественно, в междисках и серых дисках (Рисунок 6). Антитела любезно предоставлены профессором Яном Ларссоном (Швеция).

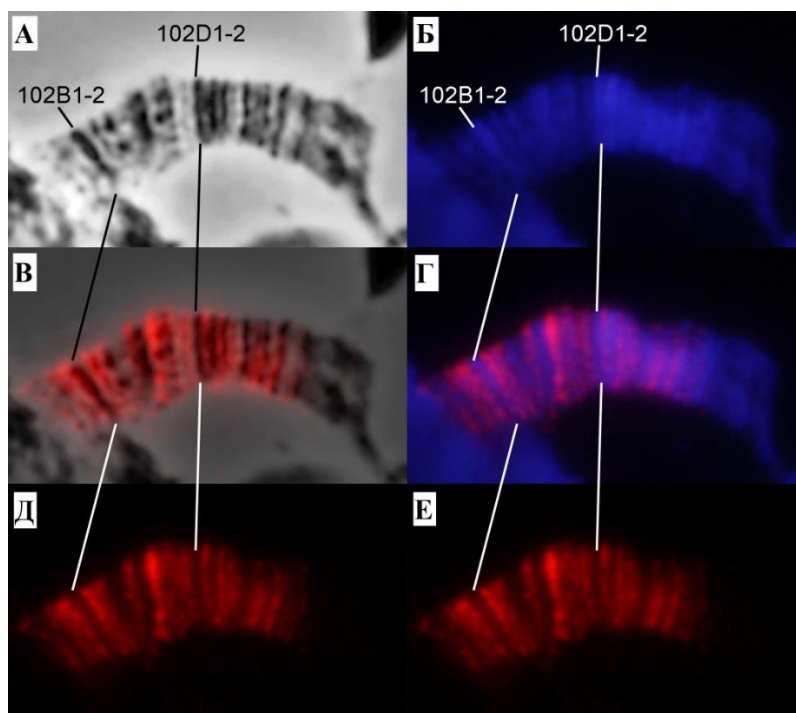


Рисунок 6. Иммунолокализация РОФ на политенной четвёртой хромосоме *D. melanogaster*. А – Фазово-контрастное изображение четвёртой хромосомы. Б – Окрашивание DAPI. В – Совмещение фазового контраста и окрашивания антителами к белку РОФ. Г – Совмещение окрашивания DAPI и РОФ. Д, Е – Окрашивание четвёртой хромосомы антителами к белку РОФ [Larsson et al., 2004]. РОФ окрашивает преимущественно междиски и серые диски четвёртой хромосомы.

Результаты иммуноокрашивания (Рисунок 6) согласуются с молекулярными данными (Рисунок 5). Белок РОФ локализован в некоторых междисках и серых дисках четвёртой хромосомы и отсутствует в чёрных дисках (всего зарегистрировано 17 сигналов). Наши результаты согласуются с ранее опубликованными данными о том, что РОФ специфично связывается с генами, причём преимущественно с экзонами, и чем активнее транскрипция, тем сильнее связывание [Johansson et al., 2007b], поскольку хроматин «aquamarine» соответствует промоторам повсеместно активных генов, а хроматин «lazurite» – кодирующим частям этих генов на полногеномном уровне [Zykova et al., 2018].

Одной из ключевых особенностей четвёртой хромосомы *D. melanogaster* является накопление большого количества повторённых последовательностей ДНК в связи с отсутствием рекомбинации [Slawson et al., 2006]. Ранее для полного генома дрозофилы было показано, что *P*-элементы преимущественно встраиваются в междиски и максимально соответствующий им хроматин «aquamarine» [Zhimulev et al., 2014]. Для корректного сравнения организации хроматина четвёртой хромосомы с

остальными хромосомами *D. melanogaster* мы исследовали распределение встрооек *P*-транспозонов в морфологических структурах и в различных типах хроматина четвёртой хромосомы (107 инсерций). Встройки этих мобильных элементов распределены не случайно. Мы показали, что в четвёртой хромосоме *P*-транспозоны в основном локализованы в междисках и соответствующих им доменах хроматина типа «aquamarine» (Рисунок 7А,Б), что совпадает с их распределением в остальных хромосомах [Zhimulev et al., 2014]. При помощи более детального анализа мы определили, что максимальное количество *P*-транспозонов в четвёртой хромосоме локализуется в пределах ± 200 п. н. вокруг начала генов, 5'нетранслируемые области которых лежат в междисках и соответствующем им «aquamarine» хроматине (Рисунок 7В). Наши результаты согласуются с литературными данными о том, что наличие точек начала репликации имеет первичное значение для интеграции *P*-элементов в геном [Spradling et al., 2011], поскольку сайты связывания белка ORC2, входящего в репликационный комплекс, локализованы, преимущественно, в «aquamarine» хроматине [Zhimulev et al., 2014].

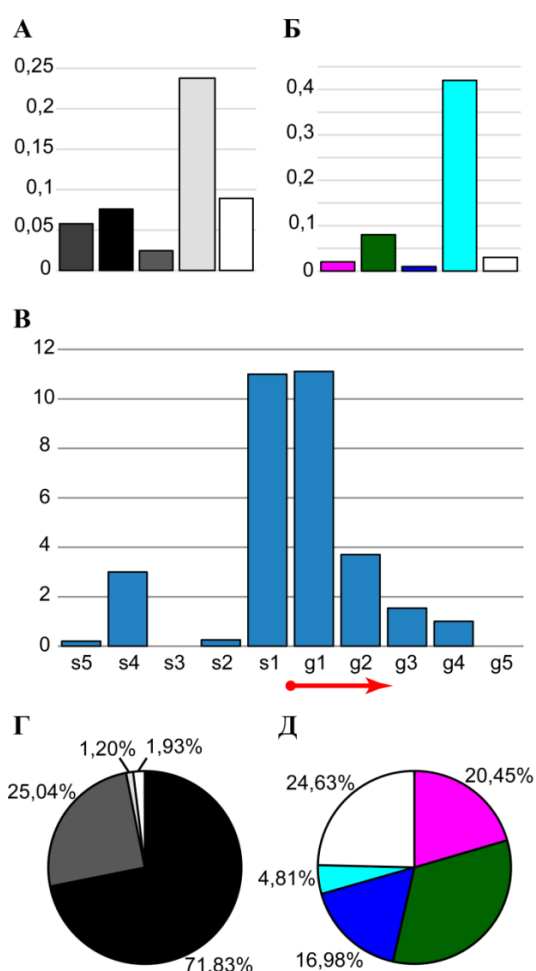


Рисунок 7. Распределение мобильных элементов в четвёртой хромосоме. Распределение *P*-элементов: **А** – в цитологических структурах четвёртой хромосомы; первый столбец соответствует всем дискам четвёртой хромосомы, а далее – как показано на Рисунке 3А; **Б** – в четырёх типах

хроматина четвёртой хромосомы. По оси ординат показана плотность в шт./т.п.н. **В** – Распределение *P*-элементов относительно генов, начинающихся в междисках четвёртой хромосомы. Междиски разделены на фрагменты по 200 п.н. от начала гена в направлении межгенного интервала (*s1 – s5*) и в направлении структурной части гена (*g1 – g5*); гены выровнены относительно начала. На графике показано по пять фрагментов в каждом направлении. По оси ординат показано общее количество сайтов в данных фрагментах, нормализованное на количество транскриптов гена. Красной стрелкой показано начало и направление генов. Распределение элемента 1360 [Kholodilov et al., 1988]: **Г** – в дисках и междисках; **Д** – в четырёх типах хроматина четвёртой хромосомы.

Кроме того, мы определили специфику распределения элемента 1360 [Kholodilov et al., 1988], характерного для четвёртой хромосомы *D. melanogaster*. Мы показали, что элемент 1360 распределён в четвёртой хромосоме дрозофилы не случайным образом. В противоположность *P*-элементам, которые имеют тенденцию встраиваться в «открытый» хроматин, элемент 1360 преимущественно располагается в дисках четвёртой хромосомы и соответствующем им «ruby», «malachite», «lazurite» хроматине (Рисунок 7Г,Д). Этот результат соответствует данным об усилении сайленсинга репортёрных генов, встроенных в составе трансгенной конструкции в домены, обогащённые 1360 [Haynes et al., 2006], поскольку по определению эффект положения мозаичного типа не возникает в участках «открытого» хроматина.

ВЫВОДЫ

1. Впервые построена точная цитогенетическая карта политенизированной части четвёртой хромосомы в результате FISH-локализации 38 зондов, выбранных согласно модели четырёх типов хроматина [Zhimulev et al., 2014; Boldyreva et al., 2017] из разных функциональных доменов.

2. Проведено сопоставление четырёх типов хроматина с локализацией генов в пределах разных морфологических структур четвёртой хромосомы. Междиски преимущественно соответствуют «открытому» «aquamarine» хроматину, содержат 5' концы повсеместно активных генов, кодирующие части которых лежат в «lazurite» хроматине, характерном для серых дисков. Чёрные диски являются полигенными, причём эти гены являются, в основном, тканеспецифичными; кроме того, чёрные диски содержат кодирующие части генов. Большая часть «ruby» хроматина локализована в чёрных дисках, которые, помимо этого, содержат «lazurite» и «malachite» хроматин. В целом, четвёртая хромосома содержит вдвое меньше

компактно упакованного «*tubу*» хроматина по сравнению с другими хромосомами, что связано с отсутствием крупных плотно упакованных дисков интеркалярного гетерохроматина.

3. Модифицированный гистон H3K27me3 обогащён в «*tubу*» хроматине (чёрные диски). Белки POF и HP1a, обеспечивающие особую организацию четвёртой хромосомы, преимущественно локализованы в доменах хроматина типов «*aquamarine*» (междиски) и «*lazurite*» (серые диски). Локализация белка POF в некоторых междисках и серых дисках четвёртой хромосомы подтверждена экспериментально на препаратах хромосом, а также показано частичное перекрывание сигналов связывания белков «открытого» хроматина POF и CHRIZ.

4. Сайты гиперчувствительности к ДНКазе I и белок репликативного комплекса ORC2 преимущественно локализованы в «открытом» «*aquamarine*» хроматине, соответствующем междискам, причём DHS сконцентрированы в фрагментах 200 п.н. выше 5' нетранслируемой области генов, а ORC2 – в фрагментах ± 200 п.н. вокруг старта транскрипции генов, как и в остальных хромосомах дрозофилы.

5. Повторённые последовательности ДНК в четвёртой хромосоме в процентном соотношении локализуются преимущественно в участках, где модель четырёх типов хроматина не выдаёт определённый тип хроматина, и в соответствующих им участках, которые не были отнесены к дискам и междискам. Большое количество фрагментов без определённого типа хроматина в четвёртой хромосоме по сравнению с остальным геномом дрозофилы связано именно с высокой плотностью повторённых последовательностей в хромосоме-точке. Р-элементы преимущественно локализованы в «открытом» «*aquamarine*» хроматине и имеют пик распределения в фрагментах 400 п.н. вокруг 5' нетранслируемой области генов, как и в остальном геноме дрозофилы, в то время как элемент 1360, специфичный для четвёртой хромосомы, занимает «дисковые» типы хроматина.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **Демидова Д. С.**, Демаков С. А., Похолкова Г. В., Зыкова Т. Ю., Жимулёв И. Ф. Комбинированный метод картирования политенных хромосом на примере 4-й микрохромосомы *Drosophila melanogaster* // ЦИТОЛОГИЯ. – 2016. – Т. 58. – №. 4. – С. 253-257.

2. **Sidorenko D. S.**, Zyкова T. Yu., Khoroshko V. A., Pokholkova G. V., Demakov S. A., Larsson J., Belyaeva E. S., Zhimulev I. F. Polytene chromosomes reflect functional organization of the *Drosophila* genome // Vavilovskij zurnal genetiki i selekcii. – 2019. – V. 23. – №. 2. – P. 148-153.

3. **Sidorenko D. S.**, Sidorenko I. A., Zyкова T. Yu., Goncharov F. P., Zhimulev I. F. Molecular and genetic organization of bands and interbands in the dot chromosome of *Drosophila melanogaster* // CHROMOSOMA. – 2019. – V. 128. – №. 2. – P. 97-117.

Тезисы конференций:

1. Zhimulev I. F., Zyкова 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., Belyaeva E. S. Genetic organization of interphase chromosome bands and interbands in *Drosophila melanogaster* // 20th International Chromosome Conference (ICC) Univ Kent, Canterbury, ENGLAND. // Chromosome Research. – 2015 – V. 23. – №. 2. – P. 409-410.

2. Zyкова (Vatolina) T. Yu., **Demidova D. S.**, Levitsky V. G., Khoroshko V. A., Elena Belyaeva E. S., Zhimulev I. F. Molecular and genetic structure of polytene chromosome banding pattern in *Drosophila melanogaster*. // Annual International Conference on Biology, Athens, Greece, 22-25 June 2015.

3. Zyкова T. Yu., **Demidova D. S.**, Sidorenko I. A., Levitsky V. G., Zhimulev I. F. P-elements insert in 5'ends of genes located in polytene chromosome interbands in *D. melanogaster*. // International Conference “Chromosome 2015”, Novosibirsk, Russia, 24-28 August 2015.

4. **Демидова Д. С.**, Сидоренко И. А., Зыкова Т. Ю. Молекулярно-генетическая организация доменов активного и репрессированного хроматина четвёртой хромосомы *Drosophila melanogaster*. // International Conference “Chromosome 2015”, Novosibirsk, Russia, 24-28 August 2015.

5. Zyкова T. Yu, Levitsky V. G., **Demidova D. S.**, Sidorenko I. A., Khoroshko V. A., Zhimulev I. F. Structural and genetic domains of interphase chromosomes in *Drosophila melanogaster*. // 6th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology (CMCB-2016), Dalian, China, 25-28 April 2016.

6. **Сидоренко (Демидова) Д. С.**, Сидоренко И. А., Зыкова Т. Ю., Жимулёв И. Ф. Организация доменов активного и репрессированного хроматина четвёртой хромосомы *D. melanogaster*. // Седьмая Международная школа молодых учёных по молекулярной генетике «Геномика и биология живых систем», Звенигород, Россия, 2016.

7. **Sidorenko (Demidova) D. S.**, Sidorenko I. A., Goncharov F. P., Zyкова Т. Ю., Zhimulev I. F. A combined method for mapping polythene chromosome binding pattern in the fourth microchromosome of *Drosophila melanogaster*. // 13th International Conference on *Drosophila* Heterochromatin. Cagliari, Italy, 4-10 June 2017.

8. Zyкова Т. Ю., Khoroshko V. A., Levitsky V. G., **Sidorenko D. S.**, Zhimulev I. F. Molecular and genetic organization of chromatin in the composition of *Drosophila* interphase chromosomes. // 13th International Conference on *Drosophila* Heterochromatin. Cagliari, Italy, 4-10 June 2017.

9. **Sidorenko D. S.**, Sidorenko I. A., Zyкова Т. Ю., Kolesnikova T. D., Goncharov F. P., Zhimulev I. F.. Molecular and genetic organization of bands and interbands in the dot chromosome of *Drosophila melanogaster*. // International Conference “Chromosome 2018”, Novosibirsk, Russia, 20-24 August 2018.