

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ им.
Д. Г. КНОРРЕ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

МАЛЫЦЕВА МАРИЯ ВИТАЛЬЕВНА

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

Молекулярно-генетическая организация инактивированных районов хромосом
Drosophila melanogaster

Направление подготовки

1.5 Биологические науки

Специальность

1.5.3 Молекулярная биология

Аспирант _____ М.В. Мальцева

Научный руководитель _____ д.б.н., И.Ф. Жимулев

Научный соруководитель _____ д.х.н., О.И. Лаврик

Работа выполнена в Лаборатории молекулярной цитогенетики Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия.

Научный руководитель:

Жимулев Игорь Федорович

Академик РАН, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной цитогенетики Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Научный соруководитель:

Лаврик Ольга Ивановна

Академик РАН, доктор химических наук, заведующая лабораторией биоорганической химии ферментов Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Фактически у всех эукариот геном можно разделить на две части, различные по генетической и молекулярной организации - эухроматин и гетерохроматин. Еще в 1928 году Э. Хайц предложил эухроматином называть ту часть хроматина, которая во время митоза проходит цикл компактизации-декомпактизации, а гетерохроматином – участки, которые постоянно находятся в компактном состоянии [1]. В митотических хромосомах гетерохроматин чаще всего расположен в прицентромерных районах. За прошедшие годы после открытия Э. Хайца накопился большой объем данных в области изучения гетерохроматина. Выяснилось, что он занимает весомую часть в геноме всех эукариот. Например, в хромосомах *Drosophila* доля гетерохроматина составляет около 30-40%. Также выяснилось, что эухроматин содержит большую часть генов, а в гетерохроматине плотность генов примерно в 100 раз ниже [2,3]. По молекулярно-генетическим характеристикам гетерохроматин значительно отличается от эухроматина: для него характерна поздняя репликация, недорепликация, обогащение метками молчания, обогащение повторенными последовательностями и снижение плотности генов [4–8].

В результате секвенирования геномов множества видов животных и растений, стала доступна возможность их комплексного исследования. К настоящему времени у *D. melanogaster* известна последовательность 99% ДНК [2]. Данные оцифрованы, и можно графически представить расположение генов относительно друг друга, их направленность, а также распределение белков и модификаций гистонов с помощью программ и геномных браузеров, которые помогают наглядно визуализировать данные. Однако, как сопоставить виртуальный геном с реальной цитологической картой хромосом?

Особенно интересно исследовать молекулярно-генетическую организацию генома на стадии интерфазы. Единственным объектом, позволяющим сделать это, являются политенные хромосомы. Политенные хромосомы — это гигантские хромосомы, которые образуются в результате многочисленных раундов репликации без расхождения сестринских хроматид. Политенные хромосомы представляют собой уникальный модельный объект в цитогенетике, поскольку они являются гигантскими интерфазными хромосомами с поперечно-полосатым рисунком, отражающим функциональную организацию генома *Drosophila* [9]. Политенные хромосомы имеют три основных морфологических класса структур: чёрные диски, серые диски и междиски. Они отличаются разной степенью конденсации, разными профилями экспрессии генов, разным временем репликации и разным составом белков и генетических элементов [10]. Оказалось,

что при сопоставлении цитологической и генетической карт политенных хромосом гены развития расположены в черных дисках, а гены домашнего хозяйства занимают междиски промоторными участками и серые диски телами генов [11,12]. Эти две группы генов настолько отличаются друг от друга, что можно сказать, что геном имеет два типа генетической организации [13]. Различаются время их экспрессии, уровни упаковки хроматина, белковый состав, размеры этих генов, длина их интронов, организация промоторных областей генов, время репликации ДНК. Однако черные диски демонстрируют свойства гетерохроматина.

На основе анализа распределения белков, характерных для активных и неактивных генов в клеточных культурах *Drosophila*, были разработаны четыре модели состояний хроматина [11,14–16]. В модели, разделяющей геном *Drosophila* на четыре дискретных состояния (4НММ), разработанной в нашей лаборатории [11], границы между состояниями хроматина можно с высокой степенью достоверности считать границами между дисками и междисками. Эта модель позволяет соотнести молекулярно-генетические карты с цитологической картой политенных хромосом.

В политенных хромосомах прицентромерный гетерохроматин недореплицирован, и в диком типе представлен неструктурированным участком ретикулярного материала, что значительно затрудняет изучение его генетической и молекулярной организации. В лаборатории молекулярной цитогенетики ИМКБ СО РАН была открыт ген *SuUR* (Suppressor of underreplication), который контролирует степень недорепликации [17]. Второй мутацией, используемой в нашей работе, которая влияет на репликацию политенных хромосом, стала *Rif1¹* (Rap1-interacting factor 1) [18,19]. В результате в исследуемых мутантных линиях гетерохроматин представлен крупными реплицированными участками, что позволяет исследовать структуру хромосомы и состояние хроматина в районах гетерохроматина. Благодаря этому мы можем не только прокартировать границы прицентромерного гетерохроматина политенных хромосом, но и обозначить отдельные районы прицентромерного гетерохроматина, которые имеют различные свойства.

Целью данной работы является исследование молекулярной и генетической организации гетерохроматиновых районов политенных хромосом *Drosophila melanogaster* у мутантов, влияющих на политенизацию.

Задачи:

1. Локализовать цитологические границы прицентромерного гетерохроматина второй и третьей политенных хромосом мутантных линий *SuUR^{ES} Su(var)3-9⁰⁶ Rif1¹* и *Rif1¹*

D. melanogaster на физической карте генома и локализовать маркерные гены с помощью метода флуоресцентной гибридизации *in situ*.

2. Проанализировать распределение свойств гетерохроматина, такие как белковый состав, наличие повторов, снижение плотности генов, поздняя репликация, недорепликация в политенных хромосомах, в пределах определенных границ прицентромерного гетерохроматина второй и третьей хромосом и выявить закономерности их локализации.

Научная новизна и практическая значимость

Успехи последних лет в исследовании распределения в геноме многих свойств, которые частично или полностью относятся к гетерохроматину: распределение специфических белков, повторов, зависимости тайминга репликации от положения в геноме, распределение состояний хроматина, появление новых мутаций, позволило подойти к изучению гетерохроматина у мутантов с подавлением недорепликации в политенных хромосомах. Поскольку мутации по генам *SuUR* и *Rif1* приводят к проявлению новых структур гетерохроматина политенных хромосом *Drosophila*, это позволяет сказать, что найденные свойства являются совершенно новыми и ранее не описанными, и могут представлять интерес для дальнейших исследований функции гетерохроматина. В результате анализа распределения вышеупомянутых свойств, мы выяснили, что они плавно изменяются от эухроматина по направлению к центромере, образуя, так называемые, «ступеньки» в гетерохроматине хромосом мутантных линий. Районы, которые имеют дисковый рисунок, но с частичной недорепликацией, характерной для гетерохроматина политенных хромосом, переходят в участки, сильно обедненные генами и с почти полной недопредставленностью; наиболее близкие районы к центромере содержат в основном сателлитные повторы. Также показано, что прицентромерный гетерохроматин и черные диски политенных хромосом находятся под общим контролем некоторых белковых комплексов.

Публикации по материалам работы

Статьи:

1. Zyкова T, **Maltseva M**, Goncharov F, Boldyreva L, Pokholkova G, Kolesnikova T, Zhimulev I. The organization of pericentromeric heterochromatin in polytene chromosome 3 of the *Drosophila melanogaster* line with the *Rif1*¹; *SuUR*^{ES} *Su(var)3-9*⁰⁶ mutations suppressing underreplication. Cells 2021, 10(11), 2809.
2. Зыкова. Т.Ю., **Мальцева М.В.**, Демаков С.А., Похолкова Г.В., Веряскина Ю.А., Лаврик О.И., Колесникова Т.Д., Жимулев И.Ф. Консервативный белок RCC1 - новый компонент

черных дисков политенных хромосом *Drosophila melaogaster*. Онтогенез 2023, Т. 54, № 2, с. 176–180.

3. Жимулев И.Ф., Ватолина Т.Ю., Похолкова Г.В., Антоненко О.В., **Мальцева М.В.** В процессах регулирования транскрипции генов развития и домашнего хозяйства у дрозофилы участвуют различные группы белков. Доклады РАН. Науки о жизни 2023, 512(1), с. 438-443.

4. Turtapkina V.A., **Maltseva M.V.**, Evtushenko E.V., Gatzkaya S.S., Omelina E.S., Battulina N.V., Lemskaya N.A., Shloma V.V., Vershinin A.V., Vatolina T.Y., Zhimulev I.F. The Gene Encoding the RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation 1) Protein in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*. Int J Mol Sci. 2025, 26(23), 11276.

Тезисы:

1. Зыкова Т.Ю., **Мальцева М.В.**, Похолкова Г.В., Веряскина Ю.А., Лаврик О.И., Жимулев И.Ф. Продукты генов «домашнего хозяйства» участвуют в формировании черных дисков политенных хромосом *Drosophila*. Материалы Юбилейной научной конференции «Николай Константинович Кольцов и биология XXI века», М. Издательство Перо, 2022, с. 48.

2. **Мальцева М.В.**, Ватолина Т.Ю., Баттулина Н.В., Омелина Е.С., Жимулёв И.Ф. Консервативный белок RCC1 – новый компонент неактивных районов политенных хромосом *Drosophila*. Хромосома–2023: материалы Международной конференции, Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2023, с. 142.

3. Ватолина Т.Ю., **Мальцева М.В.**, Жимулёв И.Ф. Консервативный белок RCC1 – новый компонент черных дисков политенных хромосом *Drosophila*. Дрозофила 2023: сборник тезисов, Гатчина: НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, 2023, с. 15.

4. **Мальцева М.В.**, Ватолина Т.Ю., Жимулёв И.Ф. Генетическая и молекулярная организация прицентромерного гетерохроматина в политенных хромосомах *Drosophila*. Дрозофила 2023: сборник тезисов, Гатчина: НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, 2023, с. 36.

5. Ватолина Т.Ю., **Мальцева М.В.**, Жимулев И.Ф. Консервативный белок RCC1 - новый компонент сайтов локализации генов развития в геноме *Drosophila*. Сборник тезисов докладов и сообщений XIX всероссийского симпозиума "Структура и функции клеточного ядра", Санкт-Петербург, ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2024, с. 33-34.

6. Жимулев И.Ф., Ватолина Т.Ю., Левицкий В.Г., **Мальцева М.В.**, Цуканов А.В. Гены развития и домашнего хозяйства: два типа организации в геноме дрозофилы. Сборник тезисов докладов и сообщений XIX всероссийского симпозиума "Структура и функции клеточного ядра", Санкт-Петербург, ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2024, с. 51-52.

7. **Мальцева М.В.** Молекулярно-генетическая организация прицентромерного

гетерохроматина второй политенной хромосомы *Drosophila melanogaster*. Биология. Медицина. Психология: материалы 63-й Междунар. науч. студ. конф. 16–22 апреля 2025 г., Новосибирск: ИПЦ НГУ, с. 106.

8. **Мальцева М.**, Ватолина Т., Жимулев И. Молекулярно-генетическая характеристика инактивированных участков ДНК в интерфазном геноме *Drosophila melanogaster*. 15-я международная мультikonференция “Биоинформатика регуляции и структуры геномов / Системная биология”. Тезисы докладов. Новосибирск, ИЦиГ СО РАН, 2026, с. 93-96.

9. Марусов Д., Туртапкина В., **Мальцева М.**, Ватолина Т., Жимулёв И. H3K36Me3 как признак элонгации транскрипции генов домашнего хозяйства у *Drosophila melanogaster*. 15-я международная мультikonференция “Биоинформатика регуляции и структуры геномов / Системная биология”. Тезисы докладов. Новосибирск, ИЦиГ СО РАН, 2026, с. 97-98.

Личный вклад автора

Основные результаты получены автором самостоятельно. Большинство цитологических исследований по иммуоокрашиванию проведены автором самостоятельно с использованием коммерческих антител или предоставленных д.б.н. Воробьевой Н.Е. (ИБГ РАН). Имунноокрашивание с помощью антител против модификации гистона H3K36me3 проведены совместно с Марусовым Д.С. Исследование с помощью метода вестерн-блот анализа проделано автором самостоятельно. Исследование с использованием метода флуоресцентной гибридизации *in situ* по третьей политенной хромосоме проведены совместно с д.б.н Колесниковой Т.Д. (ИМКБ СО РАН); по второй политенной хромосоме проделано автором самостоятельно. Подбор праймеров для ДНК-зондов уникальных генов производился под руководством к.б.н. Ватолиной Т.Ю. (ИМКБ СО РАН), праймеры для ДНК-зондов сателлитных повторов предоставлены д.б.н. Колесниковой Т.Д. (ИМКБ СО РАН). С картированием на цитологической карте политенных хромосом помогал академик РАН, д.б.н. Жимулев И.Ф. (ИМКБ СО РАН). Сопоставление цитологических и физических границ прицентромерного гетерохроматина и исследование закономерности распределения свойств гетерохроматина в пределах определенных границ проводили совместно с к.б.н. Ватолиной Т.Ю. и академиком РАН, д.б.н. Жимулевым И.Ф. (ИМКБ СО РАН).

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю академику РАН, д.б.н., проф. Жимулеву Игорю Федоровичу за помощь на всех этапах выполнения работы; научному соруководителю академику РАН, д.х.н., проф. Лаврик Ольге Ивановне за полезные советы при обсуждении результатов; к.б.н. Колесниковой Татьяне Дмитриевне за

помощь в работе, за хорошие советы по методологии исследования, за предоставление праймеров сателлитных повторов и некоторых картинок, использованных в работе; д.б.н. Похолковой Галине Витальевне, д.б.н. Демакову Сергею Анатольевичу и к.б.н. Баттулиной Надежде Викторовне за помощь в освоении новых методов; д.б.н. Воробьевой Надежде Евгеньевне за предоставление антител против белков RCC1 и NUP93 и за помощь в освоении новых методов; к.б.н. Хорошко Варваре Андреевне и студентам ФЕН НГУ Туртапкиной Вере Александровне и Марусову Даниле Сергеевичу за поддержку и помощь в работе.

Автор особенно благодарен к.б.н. Ватолиной Татьяне Юрьевне за руководство процессом подготовки магистерской дипломной работы и освоения молекулярных и цитогенетических методов, поддержку и помощь в работе на протяжении всего пути и бесконечное терпение.

Автор благодарит сотрудников Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН за постоянную поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Линии мух

Для приготовления цитологических препаратов политенных хромосом были использованы слюнные железы личинок третьего возраста *D. melanogaster*. В качестве дикого типа использовали линию Oregon-R. Мутантная линия *Rifl*¹ была любезно предоставлена Джаредом Нордманом, отдел биологических наук Вандерbiltского университета, США. Линия *SuUR^{ES} Su(var)3-9⁰⁶ Rifl*¹ была получена и любезно предоставлена Галиной Витальевной Похолоковой, лаборатория молекулярной цитогенетики Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Россия. Детектируемые белки SUUR, Su(var)3-9, Rif1 в мутантных линиях отсутствуют соответственно. Мух выращивали на стандартном корме при 18 или 25°C.

Иммуноокрашивание политенных хромосом

Препараты для иммуноокрашивания изготавливали из слюнных желез личинок третьего возраста. Слюнные железы выделяли в растворе Эфрусси-Бидла, дополненном 0,1% Tween-20. Затем использовали последовательно два фиксатора: 1) на основе формальдегида (0,1 М NaCl, 2 мМ KCl, 10 мМ NaH₂PO₄, 2% NP-40 и 2% формальдегида); 2) смесь уксусной кислоты и формальдегида (45%-ный и 3,2%-ный растворы соответственно). Инкубировали слюнные железы в течение 1 минуты в каждом фиксаторе. Давили в 45%-ной уксусной кислоте. Препараты для иммуноокрашивания на гистоны давили непосредственно во втором фиксаторе, опуская добавление 45%-ной уксусной кислоты. Препараты мгновенно замораживали в жидком азоте и скалывали покрывное стекло. Хранили при температуре -20 °C в 70% этаноле.

Для иммуноокрашивания предметные стекла промывали трижды в течение 5 мин в растворе 1xPBS + 0,1% Tween-20 (PBST). Не допуская пересыхания препарата, наносили первичные антитела в блокирующем растворе (PBST+3% Bovine Serum Albumin (BSA)) и инкубировали во влажной камере в течение 2 ч при комнатной температуре. Использовали следующее разведение первичных антител: поликлональные кроличьи анти-RCC1 (Invitrogen и предоставленные д.б.н. Воробьевой Н.Е. (ИБГ РАН)), 1:400; поликлональные кроличьи анти-HP1 (предоставлены проф. Сарой Элгин, Вашингтонский университет, США), 1:200; моноклональные мышьиные анти-H3diMetK9 (Abcam), 1:200; моноклональные мышьиные анти-CHRI3 (DSHB), 1:200; поликлональные кроличьи анти-NUP93-1 (предоставлены д.б.н. Воробьевой Н.Е. (ИБГ РАН)), 1:400; поликлональные

морской свинки анти-SUUR (предоставлены лабораторией клеточного деления ИМКБ СО РАН), 1:40; поликлональные кроличьи анти-H3K36Me3 (ABclonal и Diagenode), 1:200. Далее препараты отмывали в растворе PBST трижды в течение 5 мин и наносили вторичные антитела в блокирующем растворе. Разведение вторичных антител было следующее: анти-кроличьи, анти-мышинные, анти-морской свинки IgG-специфические конъюгаты Alexa Fluor 488 или Alexa Fluor 568; 1:500 (Thermo Fisher Scientific). Препараты инкубировали в течение 2ч при комнатной температуре во влажной камере. Затем снова отмывали в растворе PBST (3 раза по 5 мин). Препараты подсушивали при комнатной температуре и наносили по 5мкл раствора DABCO и DAPI (Abscam) под покровное стекло. Готовые препараты хранили при температуре +4°C.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH)

Для приготовления препаратов для FISH выделяли слюнные железы личинок дрозофилы в растворе 1xPBS, затем фиксировали в растворе этанола и уксусной кислоты в соотношении 3:1 в течение примерно 20 мин на льду, потом давили в 45%-ной уксусной кислоте, замораживали в жидком азоте и хранили в 96%-ном этаноле при температуре -20 °C.

ДНК-зонды были получены с помощью стандартной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием амплификатора T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). В таблицах 1-3 перечислены зонды, использованные в этом исследовании.

Состав ПЦР-реакции (50 мкл):		Протокол ПЦР:	
Геномная ДНК	1мкл	95°C/3 мин	} 30 циклов
Тaq-полимераза	2мкл	95°C/30 с	
10xdNTP	5мкл	*°C/30 с	
10хПЦР буфер	5мкл	72°C/ 1 мин	
H ₂ O	32мкл	72°C/5 мин	
10хпраймеры	5мкл	4°C/∞	

°C* - температура отжига соответствующей пары праймеров.

Таблица 1

Координаты зондов прицентромерного гетерохроматина третьей хромосомы в релизах 5.57 и 6.0

Гены	Зонды	R 5.57		R 6.0	
<i>laza</i>	<i>laza</i>	22453414	22453983	22460314	22460883
<i>1[3]04053</i>	4053	22734398	22735055	22741298	22741955
<i>CkIIa1pha</i>	CkII	23088583	23089008	23095483	23095908
<i>Vps11</i>	Vps	23144198	23144944	23151098	23151844
<i>CG17454</i>	CG17514	23706808	23707423	23713708	23714323
<i>mRps5</i>	mRps5	24534807	24535539	24542069	24542439
<i>Set1</i>	Set1	595557	596293	25110101	25110837
<i>CG40178</i>	CG40178 5'UTR	1403946	1406689	25796760	25797528
<i>CG40228</i>	CG40228	2189654	2190386	27082829	27083561
<i>RpL15</i>	RpL15	2397821	2398985	27267285	27268449
<i>CG17514</i>	CG17514	2776414	2777105	28011347	28012038
<i>Tim17b</i>	Tim17b	1817844	1818536	3740345	3741037
<i>Gfat1</i>	Gfat1	2480192	2481594	4136426	4137828
<i>CG12581</i>	CG12581	444	1153	4174722	4175431

Таблица 2

Координаты зондов прицентромерного гетерохроматина второй хромосомы в релизах 5.57 и 6.0

Гены	Зонды	R 5.57		R 6.0	
<i>ppk13</i>	<i>ppk13</i>	21087260	21088081	21087260	21088081
<i>tsh</i>	<i>tsh</i>	21834141	21834987	21834141	21834987
<i>lt</i>	<i>lt</i>	22818176	22819135	22925444	22926403
<i>rl</i>	<i>rl</i>	198607	199362	1071893	1072648
<i>vlc</i>	<i>vlc</i>	1590680	1591383	5703175	5703878
<i>jing</i>	<i>jing</i>	2505115	2506144	6617610	6618639

Таблица 3

Праймеры зондов, используемых в работе

Гены	Зонды	Праймеры	Последовательность, 5'-3'	Темп-ра отжига, °C
<i>laza</i>	<i>laza</i>	<i>laza_LEFT</i>	AGCTCGGTGGTGAGATAGGT	57
		<i>laza_RIGHT</i>	CTGACTGACTGACGGCTGTT	57
<i>1[3]04053</i>	4053	4053_LEFT	TCTTGTGGTCGCGTTCTCTC	57
		4053_RIGHT	TGGAGCCTGACCTCGTTAGA	58
<i>CkIIa1pha</i>	CkII	CkII_LEFT	GCACAAAAGGTTTCGTCGCA	57
		CkII_RIGHT	AACTCTTAGCGGTCCGTTCCG	57

<i>Vps11</i>	Vps	Vps_LEFT	AGAGCAATAGCTTTCCGCGT	57
		Vps_RIGHT	CCAACCCGTAACGTCACACA	58
<i>CG17454</i>	CG17514	CG17514_LEFT	TGTACGTCAACCAGAACGGG	57
		CG17514_RIGHT	GGCAAAGTTCCGTTGCCAAT	57
<i>mRps5</i>	mRps5	mRps5_LEFT	ACGGTCCTCTCCCCACATTA	58
		mRps5_RIGHT	TTACTCCGCGCCAAATGTCT	57
<i>Set1</i>	Set1	Set1_LEFT	GGACACCGAATTCATCCACG	56
		Set1_RIGHT	GGGGTGGTTGTACTGGATGA	57
<i>CG40178</i>	CG40178 5'UTR	CG40178 5'UTR_LEFT	tcgttttaccgctgcgtatg	56
		CG40178 5'UTR_RIGHT	aggcggaactggaatgaaga	56
<i>CG40228</i>	CG40228	CG40228_LEFT	GTAGGGTGTGCTTGGAGGAT	57
		CG40228_RIGHT	GCAAATGGGCAAACGATTCC	55
<i>RpL15</i>	RpL15	RpL15-1	TAAGTTGGTTGTGCATTCGG	*
		RpL15-2	CTTTGCGTGCACGAAGTG	*
<i>CG17514</i>	CG17514	CG17514_LEFT	gacatgcttgcccgtag	56
		CG17514_RIGHT	GCCCAAACATTCCCTTTCTT	54
<i>Tim17b</i>	Tim17b	Tim17b_LEFT	tttgatcaagccatcaaca	52
		Tim17b_RIGHT	actattttgtggccgaaacg	54
<i>Gfat1</i>	Gfat1	gfat1-1	CGATGTTGCTGCTGTTCCG	*
		gfat1-2	CGGTTTATCCGAAAATATGG A	*
<i>CG12581</i>	CG12581	CG12581_LEFT	GAACCAGGGGAAACGTAGC A	57
		CG12581_RIGHT	AAGTACTCGGCATCGGCAAA	57
<i>ppk13</i>	ppk13	ppk13_left_5'	CATGGAGACTGAGCTGGGAA	57
		ppk13_right_5'	TACAAGAGGGCAGGCAATCA	56
<i>tsh</i>	tsh	tsh_left_5'	TTGTAAAGGGTGGAGCGAGT	56
		tsh_right_5'	TGGTTGTTCTTGGCCATGTG	56
<i>lt</i>	lt	lt_left	AAGGTCGTATCACTGGAGCC	57
		lt_right	tgaattcttgaggcacgacg	55
<i>rl</i>	rl	rl_left_5'	tggctgcaaaaagactgatg	56
		rl_right_5'	gcgaacttacagcaaaggact	55
<i>vlc</i>	vlc	vlc_left_5'	TGCCTACGTTGAATCCAGGT	56
		vlc_right_5'	CGTTAAGCCCTGGAGAATGC	56
<i>jing</i>	jing	jing_left_5'	TTTCCTCCAAATCCGCCTCT	56
		jing_right_5'	GTGAGTGTGCTAATCTGGCG	56
Prodsat	Prodsat	AATAACATAG_L	5'-AATAACATAG) ₃ -3'	**
		AATAACATAG_R	5'-(CTATGTTATT) ₃ -3'	**
Dodeca	Dodeca	DODECA_L	5'-(ACCGAGTACGGG) ₃ -3'	**
		DODECA_R	5'-(CCCGTACACGGT) ₃ -3'	**

* - [20]

** - ДНК-зонды для сателлитов Prodsat и Dodeca были любезно предоставлены д.б.н. Колесниковой Т.Д. (ИМКБ СО РАН) [19].

Полученные ДНК-зонды пересаждали по стандартной методике. Для определения концентрации выделенных и пересаженных фрагментов ДНК использовали спектрофотометр NanoDrop One (Thermo Scientific), опираясь на протокол производителя.

Далее ДНК-зонды были мечены флуоресцентным красителем Flu-12-dUTP или Tamra-5-dUTP (Biosan) с помощью фрагмента Кленова. Для этого полученные ПЦР-продукты ДНК-зондов (количество брали в зависимости от концентрации выделенных фрагментов ДНК) смешивали с 10х гексануклеотидами (до 1%) с разведением водой до 15мкл. Денатурировали 5 мин при 95°C и охлаждали. После добавляли 2мкл буфера Кленова (300 мМ Трис-НСl, 100 мМ MgCl₂, pH 7,8), 1мкл фрагмента Кленова и 2мкл Labeling Mix. Инкубировали в термостате при 37°C в течение ночи. Реакцию останавливали с помощью температуры 95°C в течение 5 мин. Меченные ДНК-зонды хранили при температуре -20 °C.

Денатурация:

Препараты политенных хромосом дважды промывали в 2хSSC (0,15M NaCl, 0,015 Na-цитрат), а затем инкубировали в 2хSSC в течение часа при 65°C. После охлаждали в том же растворе до комнатной температуры. Держали в денатурирующем растворе (5мл 0,7хNaOH, 5мл 20хSSC, 35мл H₂O) 0,5-2 мин. Для остановки денатурации проводили препарат по холодным спиртам (70%, 70%, 96%, 96%) по 5 мин.

Гибридизация:

Использовали следующее разведение для одного препарата: 1мкл КРС, 8мкл ДНК-зондов (т.к. зонды гибридизовали парами, то по 4мкл каждого зонда) и 1мкл воды. Денатурировали 3 минуты при 95°C, охлаждали, добавляли 20мкл гибридизационного буфера (4хSSC, 10% декстран сульфат). Раствор наносили по 30мкл на препарат. После накрывали покровным стеклом, заклеивали резиновым клеем и помещали во влажную камеру с добавлением 2хSSC. Инкубировали в термостате при 37°C в течение ночи.

Отмывки:

Инкубировали препараты в 0,2хSSC при 60°C три раза по 15 минут. Наносили смесь Дарсо+DAPI под покровное стекло. Препараты хранили при +4°C.

Световая микроскопия

Цитологический анализ и фотографирование проводили с помощью микроскопа Olimpus BX-50F с фотокамерой DP70 и источником флуоресцентного освещения X-Cite 120Q. Для этого использовали увеличение x100 под иммерсионным маслом. Каждый эксперимент повторялся не менее пяти раз, при этом во всех случаях характер окраски воспроизводился.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Для электрофореза использовали:

Разделяющий гель 10% (около 6мл)

- 1) H₂O – 2,28мл
- 2) Tris-HCl (pH 8,8; 1,5M) – 1,6мл
- 3) AA(акриламид) (30%) – 2мл
- 4) SDS (додецилсульфат натрия) (10%) – 60мкл
- 5) PSA (персульфат аммония) (10%) – 60мкл
- 6) TEMED (тетраметилэтилендиамин) – 5мкл

Концентрирующий гель 4,5% (около 3мл)

- 1) H₂O – 2,1мл
- 2) Tris-HCl (pH 6,8; 1M) – 0,38мл
- 3) AA(акриламид)(30%) – 0,45мл
- 4) SDS(10%) – 30мкл
- 5) PSA(10%) – 30мкл
- 6) TEMED – 3мкл

Образцы смешивали с 2хбуфером Loading buffer (50 mM трис-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 0,1% Bromphenol blue) + бета-меркаптоэтанол и инкубировали при 95°C, 5 мин. Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере (0,2М глицин, 0,025 М трис, 0,1% додецилсульфат натрия) при постоянном токе 250mA. Использовали маркер PageRuler Prestained Protein Ladder(#SM0671). Электрофорез проводили в течении часа.

Вестерн-блот

Полученный полиакриламидный гель закрепляли вместе с мембраной в камере для переноса таким образом, чтобы гель был расположен ближе к катоду, а мембрана – к аноду. Буфер для переноса: 0,2М глицин, 0,025М трис и 20% метанол. Перенос проводили час при постоянном токе 250 мА. В камеру погружали емкость со льдом для охлаждения.

По окончании мембрану помещали в блокирующий раствор (1×PBS, 0.1% Tween20, 3% сухого молока) на 1 час при комнатной температуре и качали на шейкере при 45-50 об/мин. Коротко промывали мембрану в 1хPBST (1×PBS, 0.1% Tween20) 2 раза.

Первичные антитела разводили в блокирующем растворе (поликлональные антитела кролика к RCC1 - 1:1000; моноклональные антитела мыши к альфа-тубулину – 1:10000). Мембрану помещаем в разведенные первичные тела и инкубируем 1 час при комнатной температуре, качая на шейкере при 45-50 об/мин. Затем промывали в 1хPBST: 1 раз 15 мин, 3 раза по 5 мин.

Разводили вторичные разводили в блокирующем растворе (анти-мышинные и анти-кроличьи - 1:5000). Мембрану помещаем в разведенные первичные тела и инкубируем 1 час при комнатной температуре, качая на шейкере при 45-50 об/мин. Затем промывали в 1xPBST: 1 раз 15 мин, 3 раза по 5 мин.

Иммунодетекцию производили с помощью набора Novex ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Invitrogen). Результаты смотрели на топографе Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences).

Результаты

Гетерохроматин отличается от эухроматина по ряду признаков. Для характеристики гетерохроматина в данной работе мы использовали следующие самые важные — это относительно постоянное конденсированное состояние на протяжении всего клеточного цикла, поздняя репликация, обогащение повторными последовательностями ДНК, снижение плотности генов, наличие специфических белков и модификаций гистонов [1,4–8,14,15,21]. На уровне поличенных хромосом одной из наиболее распространённых особенностей является поздняя репликация и недорепликация, что приводит к недопредставленности целых гетерохроматиновых участков в хромосомах дикого типа [17,22,23]. Таким образом, в рамках данной работы мы рассмотрим один из способов решения проблемы с недопредставленностью гетерохроматина в поличенных хромосомах, сопоставим цитологические границы прицентромерного гетерохроматина 2 и 3 поличенных хромосом с физической картой, рассмотрим основные характеристики гетерохроматина в пределах границ прицентромерного гетерохроматина и выявим общие белки для двух типов закрытого хроматина поличенных хромосом: прицентромерного гетерохроматина и черных дисков.

1. Морфология прицентромерного гетерохроматина поличенных хромосом мутантных линий с подавлением недорепликации

Прицентромерный гетерохроматин поличенных хромосом *Drosophila* собран в общий хромоцентр, и в контрольной линии дикого типа (Oregon-R) представляет участок недореплицированного материала. У Oregon-R в прицентромерном гетерохроматине третьей поличенной хромосомы между дисками 80A и 81F (Рис. 1A) и второй хромосомы между дисками 40A и 41F (Рис. 2A) можно увидеть два или три диска и неструктурированный материал (указаны стрелками на рис. 1A и 2A), который расположен

ближе всего к центромерному району и, следовательно, является участком недореплицированного материала в политенных хромосомах. Первой известной мутацией с подавлением недорепликации стала линия *Suppressor of UnderReplication* (*SuUR^{ES}*) [17,24], в политенных хромосомах которой часть материала вновь реплицируется, и возникает короткая область гетерохроматина с характерным для эухроматина дисковым рисунком - этот фрагмент получил название Plato Atlantis [17,20,25,26]. Было показано, что фенотип мутации *SuUR* связан с тем, что репликация гетерохроматиновых районов завершается существенно раньше, чем в диком типе [25]. Дополнительная мутация *Su(var)3-9⁰⁶* у двойных мутантов *SuUR^{ES} Su(var)3-9⁰⁶* приводит к существенной модификации блоков гетерохроматина, обогащенных умеренно повторяющимися участками ДНК и уникальными последовательностями, из-за чего участок Plato Atlantis намного длиннее, чем у мутантов с одной мутацией *SuUR^{ES}* [20].

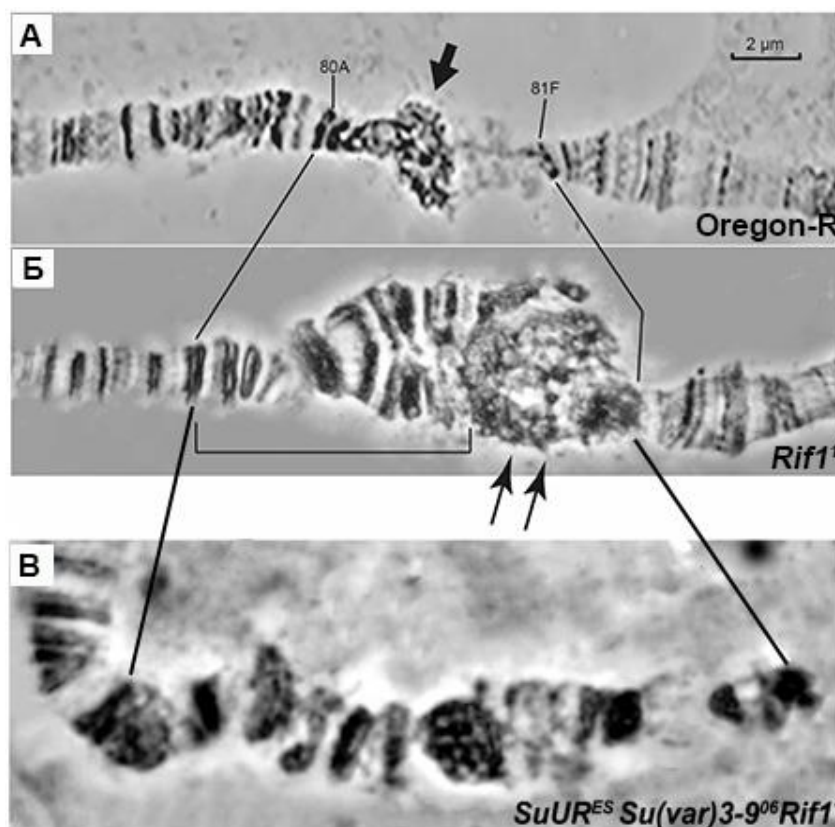


Рисунок 1. Морфология прицентромерного гетерохроматина третьей политенной хромосомы *D. melanogaster* дикого типа Oregon-R (А), в мутантных линиях *Rif1¹* (Б) и *SuUR^{ES} Su(var)3-9⁰⁶ Rif1¹* (В). Стрелка на (А) указывает на фрагмент ретикулярного материала. Дисковая часть прицентромерного гетерохроматина хромосом мутантов *Rif1¹* обозначена скобкой, а ретикулярный материал указан стрелками на (Б). Фотографии прицентромерного гетерохроматина дикого типа Oregon-R и тройных мутантов *SuUR^{ES} Su(var)3-9⁰⁶ Rif1¹* любезно предоставлены д.б.н. Колесниковой Т.Д.

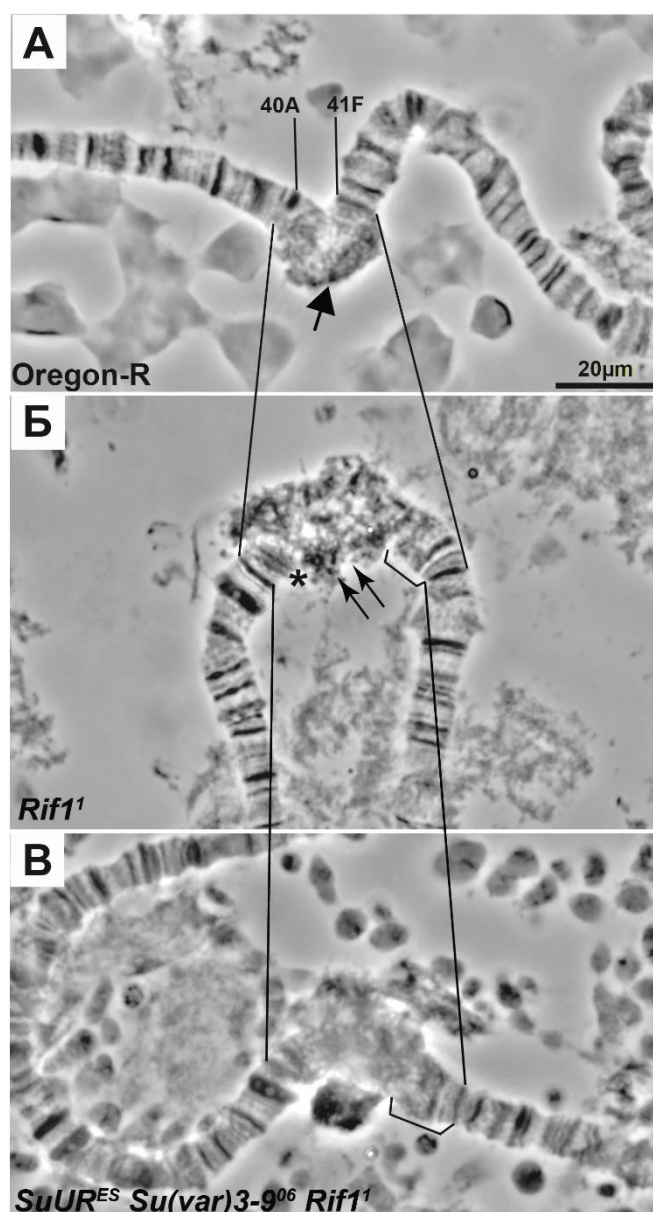


Рисунок 2. Морфология прицентромерного гетерохроматина второй политенной хромосомы *D. melanogaster* в диком типе (А), в мутантных линиях *Rif1*¹ (Б) и *SuUR*^{ES} *Su(var)3-9*⁰⁶ *Rif1*¹ (В). Стрелка на (А) указывает на фрагмент ретикулярного материала. Дисковая часть прицентромерного гетерохроматина у мутантов *Rif1*¹ и тройных мутантов *SuUR*^{ES} *Su(var)3-9*⁰⁶ *Rif1*¹ обозначена скобкой на (Б) и на (В), а сетчатый материал, появляющийся в хромосомах *Rif1*¹, указан стрелками на (Б). Звездочка на рисунке (Б) обозначает вновь образованный диск у мутантов *Rif1*¹.

У мутантов по гену *Rif1*¹ (Рис. 1Б и 2Б) в области прицентромерного гетерохроматина наблюдается гораздо больше материала, что приводит к образованию дисков (обозначены скобками на рис. 1Б и 2Б) и объемного ретикулярного материала в гетерохроматине (указан стрелками на рис. 1Б и 2Б). Между ретикулярной областью и диском 81F третьей хромосомы (Рис. 1Б) практически нет различимого материала. Во второй хромосоме мутантной линии *Rif1*¹ после диска 40А возникает один слабо различимый диск (отмечен звездочкой на рис. 2Б).

В недавно синтезированной линии *Drosophila*, несущей все три мутации, влияющие на недорепликацию гетерохроматина, то есть *SuUR^{ES}*, *Su(var)3-9⁰⁶* и *Rifl¹*, длина области гетерохроматина значительно увеличена. В то же время размер и чёткость дисков в прицентромерном гетерохроматине третьей политенной хромосомы (Рис. 1В) в линии с тремя мутациями поражают воображение. Можно насчитать до 40 блоков и дисков хроматина всех размеров и плотности упаковки. Однако, в прицентромерном гетерохроматине второй политенной хромосомы мы не обнаружили новые области в сравнении с линией *Rifl¹* (отмечены скобками на рис. 2Б и 2В). То есть в случае второй политенной хромосомы обе мутации *Rifl¹* и *SuUR^{ES}* являются одинаково приоритетными.

Таким образом, по сравнению с хромосомами дикого типа, в прицентромерных районах политенных хромосом мутантов возникают дисковые участки за счет политенизации находящихся в гетерохроматине последовательностей ДНК. Размер и морфология этих участков зависит от гомо/гетерогенности мутаций, более того увеличение дозы таких мутаций приводит к увеличению протяженности политенизированного материала.

Черные диски демонстрирует свойства гетерохроматина, такие как поздняя репликация, компактное состояние, недорепликация во время циклов политенизации, эктопическое спаривание как с другими черными дисками, так и с прицентромерным гетерохроматином [27]. Как уже было сказано ранее, у мутантов по генам *Rifl¹* и *SuUR^{ES}* раньше завершается репликация гетерохроматиновых районов, чем в диком типе. Это отражается и на черных дисках, где происходит резкое снижение количества слабых точек и разрывов хромосом, также снижение количества эктопических контактов.

Гетерохроматин в политенных хромосомах почти всех известных линий *D. melanogaster* представлен небольшим фрагментом ретикулярного материала, а остальной материал недопредставлен. Мутации с подавлением недорепликации, которые приводят к почти полному восстановлению гетерохроматина, открывают новые возможности в его изучении. В данной работе мы использовали следующие линии: дикий тип Oregon-R и мутантные линии *Rifl¹* и *SuUR^{ES} Su(var)3-9⁰⁶ Rifl¹*.

2. Белки и модификации гистона, характерные для гетерохроматина

Одним из отличий гетерохроматина от эухроматина является набор белков и модификаций гистонов [28–30]. Картирование белков, характерных для гетерохроматина, позволяет сделать выводы о топографии распределения белков и определить характер мечения гетерохроматина, особенно участков гетерохроматина, расположенных ближе к

центромерам. Чтобы охарактеризовать новообразованный материал в мутантных линиях, мы локализовали антитела на белок и модификацию гистона - известные маркеры гетерохроматина: HP1a и H3K9me2, также сконцентрировали внимание на менее известном белке, но характерном для компактных участков хромосом - RCC1.

Белок RCC1 (Regulator of the Chromosome Condensation 1) был идентифицирован примерно 40 лет назад как один из ключевых регуляторов клеточного цикла [31]. Это единственный известный фактор обмена нуклеотидов с азотистым основанием гуанином для ядерного Ras-подобного G-белка (Ran) [32]. Он напрямую участвует в таких клеточных процессах у человека, как формирование ядерной оболочки, нуклеоцитоплазматический транспорт, сборка митотического веретена и конденсация хроматина в поздней S-фазе и ранней M-фазе клеточного цикла [33]. Ген *RCC1* у *Drosophila* кодирует ядерный белок массой 68 кДа, и его последовательность высококонсервативна у всех эукариот [32–34]. По литературным данным в политенных хромосомах белок локализуется в прицентромерном гетерохроматине и дисках, без привязки к конкретным локусам [34]. В ходе работы с политенными хромосомами мы обнаружили RCC1 в прицентромерном гетерохроматине, в том числе в недавно политеннизированных областях в мутантных линиях, 80A–81F, 40A–41F (Рис. 3). Чтобы повысить видимость белка в политенных хромосомах, мы одновременно с антителами на RCC1 локализовали антитела против белка CHRIZ, характерного для открытого хроматина и расположенного в междисках [35,36]. На плечах политенных хромосом белок RCC1 располагался не так, как было описано ранее [34]: он был обнаружен только в черных дисках, но не в серых (примеры черных дисков, в которых локализован RCC1, отмечены белыми стрелками на рис. 3). Всего для линии *Rifl*¹ было выявлено около 260 участков локализации (Приложение 1). В черных дисках располагаются гены развития, а гены домашнего хозяйства - в междисках/серых дисках. Таким образом, белок RCC1 локализуется в прицентромерном гетерохроматине и областях расположения генов развития. При активации генов развития под действием стероидного гормона экдизона материал черного диска декомпактизуется, и на политенных хромосомах образуется вздутие – пух [37]. При этом белок RCC1 покидает место активной транскрипции и возвращается после восстановления черного диска (Рис. 4). Интересно, что модификация гистона - H3K36me3, обычно связанная с элонгацией транскрипции [38] отсутствует во всех пухах, независимо от их размера и уровня декомпактизации. Данная модификация локализуется исключительно в районах серых дисков и междисков, а значит характерна для повсеместно активных генов. Данное наблюдение может указывать на разные механизмы регуляции генов развития и генов домашнего хозяйства.

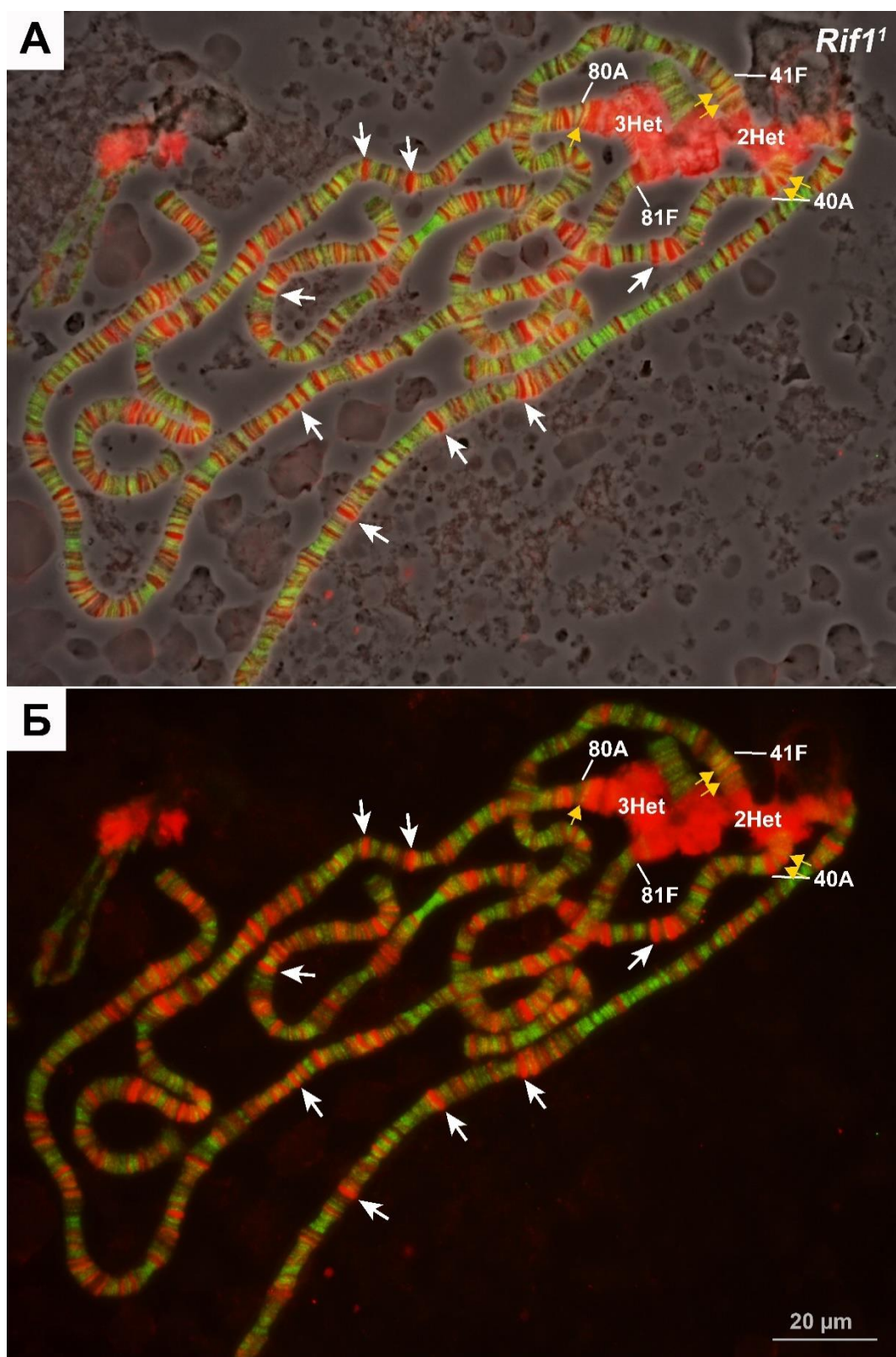


Рисунок 3. Иммунолокализация белка RCC1 в политенных хромосомах *D. melanogaster*. **А** - локализация антител к белку RCC1 и фазовый контраст. **Б** - колокализация антител к белкам RCC1 и CHRIZ. Генотип на данном рисунке — *Rif1*¹. Области прицентромерного гетерохроматина второй и третьей политенных хромосом отмечены как 2Het и 3Het соответственно. Белыми стрелками обозначены примеры локализации антител против белка RCC1 в черных дисках. Желтыми стрелками отмечены области связывания антител против белка CHRIZ в прицентромерном гетерохроматине.

Белок CHRIZ ожидаемо локализуется в междисках по плечам хромосом, то есть в местах локализации промоторных участков генов домашнего хозяйства [11]. Удивительно, но вновь политенизированный прицентромерный гетерохроматин мутантных линий содержит области материала, которые также связываются с антителами на белок CHRIZ в междисках (области отмечены желтыми стрелками на рис. 3).

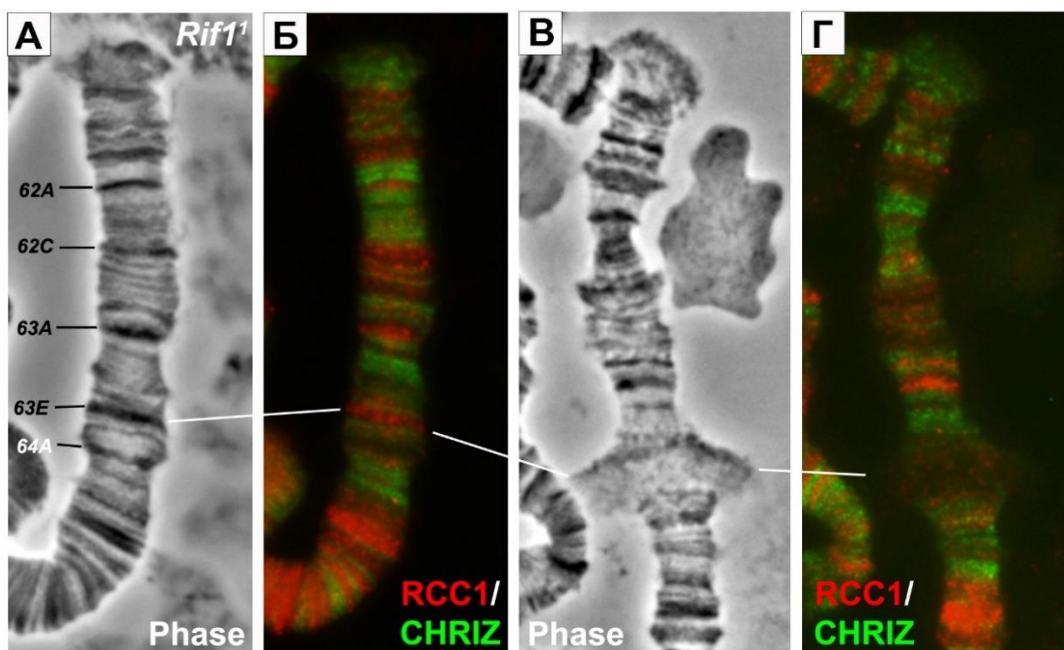


Рисунок 4. Иммунолокализация белка RCC1 при образовании пуфа 63Е из черного диска третьей политенной хромосомы *D. melanogaster*. **А** - фазовый контраст беспуфовой стадии до образования пуфа (PS3); **Б** - локализация белков RCC1 и CHRIZ беспуфовой стадии до образования пуфа; **В** - фазовый контраст стадии образования пуфа (PS10-11); **Г** - локализация белков RCC1 и CHRIZ стадии образования пуфа. Генотип на данном рисунке — *Rif1^l*.

В 1998г. Беляевой Е. С. был открыт ген *SuUR*, мутация по которому приводит к восстановлению политенизации в гетерохроматиновых районах политенных хромосом, из-за чего прицентромерные участки частично приобретают дисковый рисунок, а черные диски не формируют слабых точек и эктопических контактов [17,26,39]. Продукт гена *SuUR* (белок SUUR) связывается с репликативными вилками и взаимодействует с белком Rif1, который напрямую регулирует продвижение репликационной вилки [18]. Ранее было показано, что на политенных хромосомах SUUR связывается с хромоцентром, черными дисками и локализуется в теломерах [24,40]. Мы предположили, что белок RCC1 связывается с теми же районами гетерохроматина, что и SUUR. Для колокализации RCC1 и SUUR мы использовали мутантную линию *Rif1^l*. Важно отметить, что SUUR связывается с репликационными вилками в отсутствие Rif1 [18], поэтому мутация *Rif1^l* не влияет на локализацию белка SUUR. На примере второй политенной хромосомы, окрашивание

желтого цвета (из-за наложения красной и зеленой флуоресценции) видно на большей части длины хромосомы (Рис. 5В), что говорит о почти полном совпадении районов связывания двух белков.

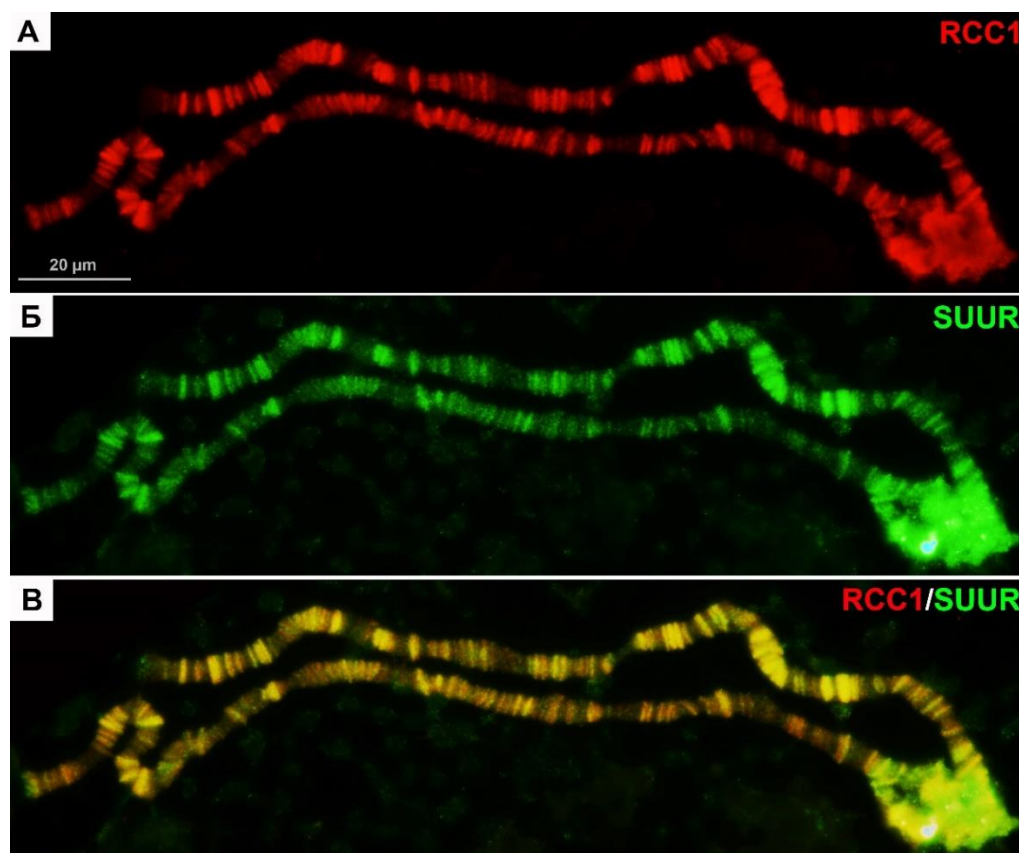


Рисунок 5. Общие районы связывания антител к белкам RCC1 и SUUR в политенных хромосомах *D. melanogaster*. А - локализация антител к белку RCC1. Б - локализация антител к белку SUUR. В – колокализация антител к белкам RCC1 и SUUR. Генотип на данном рисунке — *Rif1*¹.

Как уже сказано ранее, черные диски и хромоцентр часто подвергаются недорепликации, что приводит к недопредставленности материала черных дисков и прицентромерного гетерохроматина в хромосомах дикого типа. Мы использовали метод вестерн-блоттинга для определения молекулярной массы и полуколичественного анализа белка RCC1 в линии дикого типа Oregon-R и в мутантных линиях, восстанавливающих недореплицированные участки ДНК в хромосомах *Drosophila* (Рис. 6). С помощью программы ImageJ было показано, что в мутантных линиях *SuUR*^{ES} *Su(var)3-9*⁰⁶, *Rif1*¹ и *SuUR*^{ES} *Su(var)3-9*⁰⁶ *Rif1*¹ относительное содержание белка RCC1 в клетках слюнных желез увеличивается более чем в три раза по сравнению с материалом дикого типа (Рис. 6Б). В работе были использованы антитела против белка RCC1 *Xenopus*, которые специфически связываются с белком RCC1 как *D. melanogaster*, так и *Homo sapiens*, что еще раз подтверждает консервативность данного белка (Рис. 6А).

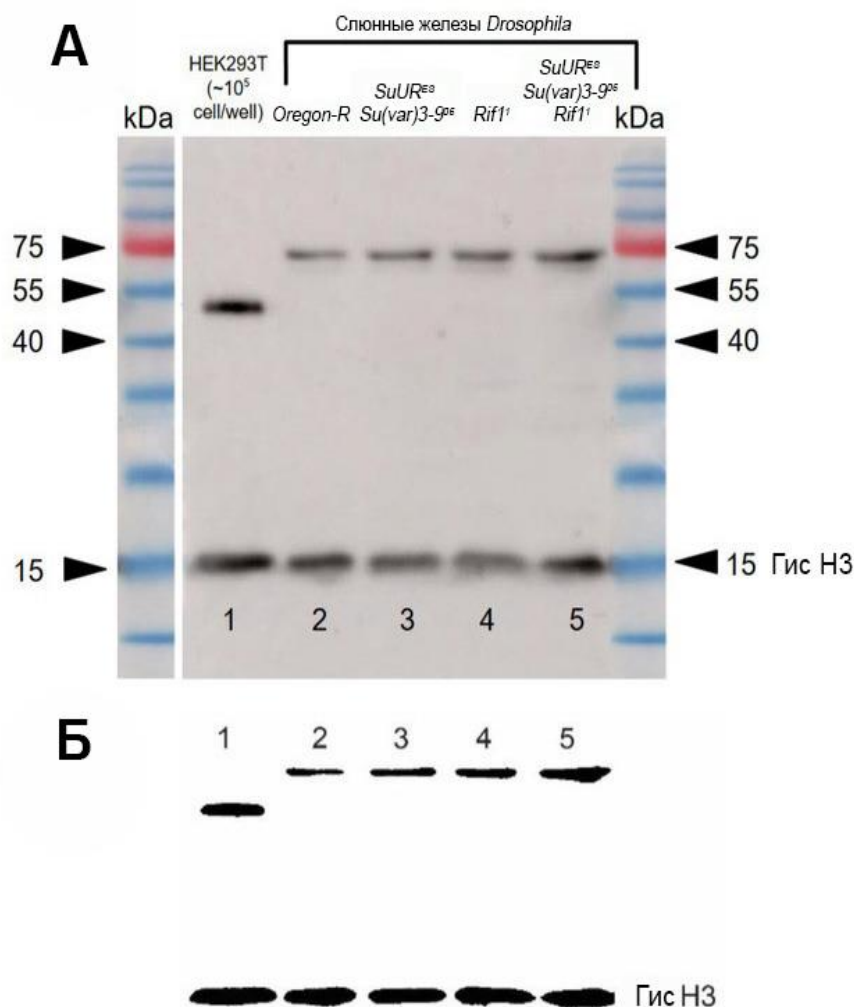


Рисунок 6. А - Характеристика белка RCC1 *D. melanogaster* и *Homo sapiens* с помощью вестерн-блоттинга (поликлональные антитела кролика против белка RCC1 *Xenopus*, 1:1000): 1 - культура клеток эмбриональной почки человека (HEK 293Т); 2-5 - слюнные железы следующих линий *D. melanogaster*: *Oregon-R*, *SuUR^{ES} Su(var)3-9⁰⁶*, *Rif1¹*, *SuUR^{ES} Su(var)3-9⁰⁶ Rif1¹*. Нижняя полоса с молекулярной массой 15 кДа является маркером загрузки дорожки и молекулярной массы — гистонем Н3 (мышинные моноклональные антитела против гистона Н3 — 1:10 000). Клеточная линия HEK293Т является положительным контролем для антител против RCC1 *Xenopus*. Б - Анализ данных вестерн-блоттинга с помощью программы ImageJ; обозначения дорожек (1–5) идентичны тем, что использовались в 6А.

Таким образом, данные, представленные на рис. 6, позволяют сделать вывод, что количество ДНК действительно восстанавливается в мутантных линиях с подавлением недорепликации, а количество материала в черных дисках и хромоцентре увеличивается. Поскольку RCC1 связывается с этими структурами, количество белка RCC1 также увеличивается.

Недавно было показано, что компонент комплекса ядерных пор Nup93-1 участвует в репрессии, опосредованной белками Polycomb [41], которые, как известно, локализуются в чёрных дисках [42]. На недавленных препаратах слюнных желез *Drosophila* в интерфазных ядрах с политенными хромосомами белок NUP93-1 связывается исключительно с ядерной

оболочкой, при этом в основной части ядра не обнаруживается никаких признаков мечения (Рис. 7А). В то же время антитела к RCC1 легко проникают в недавленное ядро и окрашивают хромосомы (Рис. 7Б).

На рис. 3 показано, что в политенных хромосомах антитела к RCC1 интенсивно окрашивают гетерохроматин. На рис. 8 видно, что фрагменты ядерной оболочки, меченные антителами к NUP93-1, локализуются совместно с прицентромерным гетерохроматином (Het), который всегда находится на внутренней стороне ядерной оболочки. Таким образом, можно предположить, что NUP93-1 и RCC1 взаимодействуют друг с другом. Об этом могут свидетельствовать отдельные сигналы NUP93-1 в районе черных дисков (красные стрелки на рис. 8), которые могут указывать на остаточные контакты между RCC1 и ядерной оболочкой. Эти противоречия частично разрешаются тем, что на рис. 7А показаны частичные контакты между белками NUP93-1 и прицентромерным гетерохроматином, который в интерфазном ядре почти всегда находится на внутренней стороне ядерной оболочки.

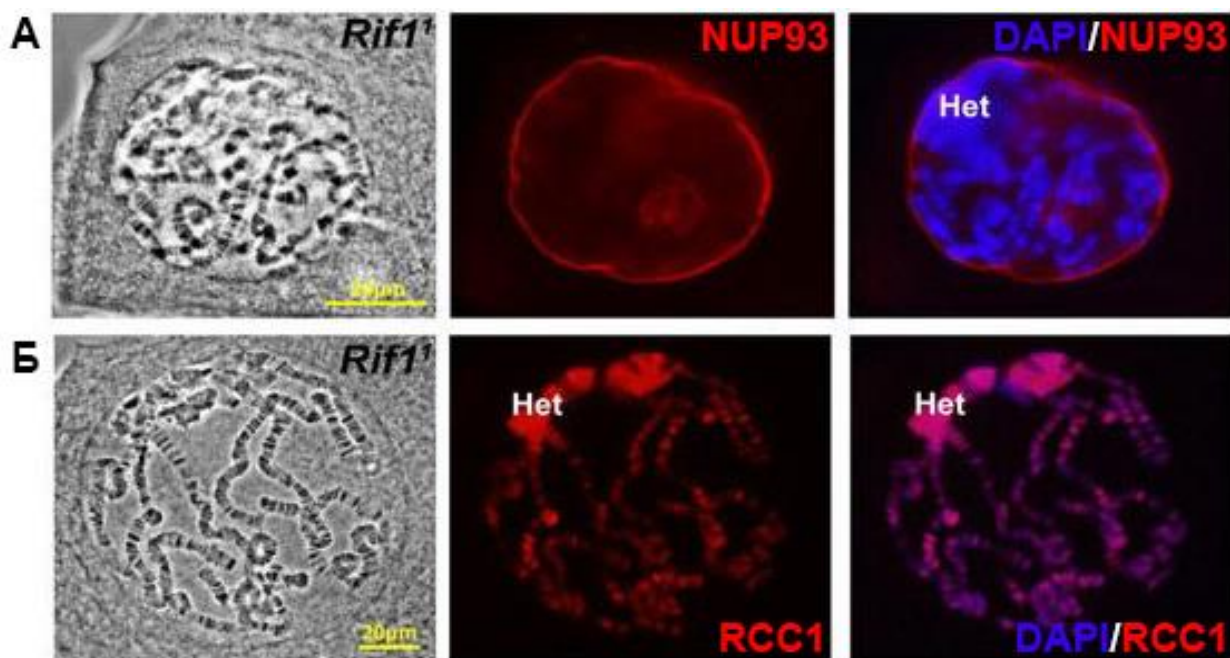


Рисунок 7. Локализация антител к NUP93-1 (А) и RCC1 (В) в недавленных ядрах политенных хромосом слюнных желез *D. melanogaster*.

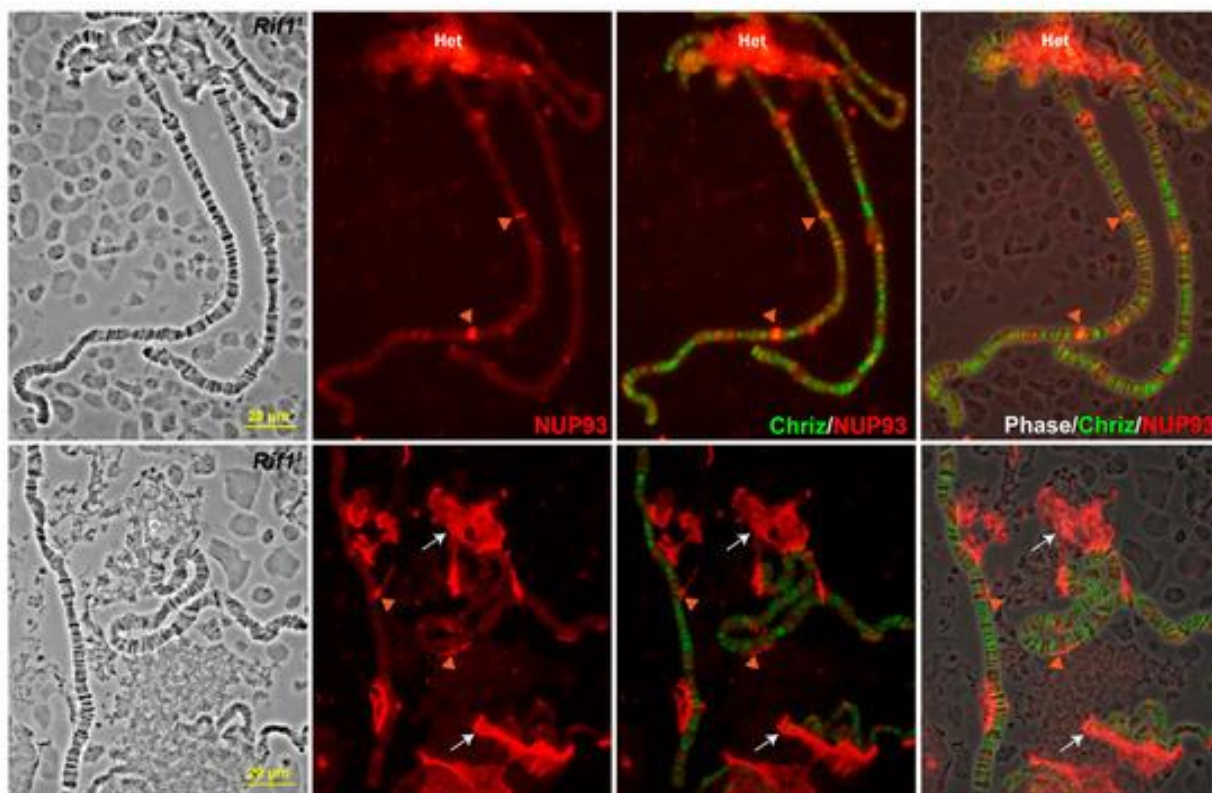


Рисунок 8. Локализация антител к NUP93 и CHRIZ на давленных препаратах слюнных желез *D. melanogaster*. Красные стрелки указывают на предполагаемые контакты плеч хромосом с ядерной оболочкой. Белые стрелки указывают на остатки ядерной оболочки.

Белок HP1 (Heterochromatin protein 1), который, как известно, является наиболее характерным для прицентромерного гетерохроматина [43] и выполняет функцию платформы для модификаторов гетерохроматина, в частности, гистон-метилтрансферазы Su(var)3-9 [44], обнаружен в областях между 80A-81F третьей политенной хромосомы и 40A-42A второй политенной хромосомы (Рис. 9), как в ретикулярном материале, так и в дисковой части вновь политенизированного материала (отмечены скобками на рис. 9), при этом сигнал в междисках часто интенсивнее, чем в дисках.

H3K9me2 служит сайтом связывания белка HP1 [45,46]. Антитела к H3K9me2 были обнаружены в участках 80B–81F, 40A-41F. Все участки гетерохроматина политенных хромосом полностью связываются с антителами к H3K9me2 (Рис. 10), но в некоторых случаях возникает паттерн более интенсивного сигнала в дисках, чем в междисках, в структурированной части гетерохроматина. Таким образом, граница локализации белка HP1 на 2R и 3L хромосомах находилась дистальнее, чем H3K9me2 (Рис. 10Б).



Рисунок 9. Иммулокализация белка HP1 на политенных хромосомах *D. melanogaster*. Генотип на данном рисунке — *Rif1¹*. Области прицентромерного гетерохроматина второй и третьей политенных хромосом отмечены как 2Het и 3Het соответственно. Скобками отмечены области прицентромерного гетерохроматина, которые имеют дисковый рисунок.

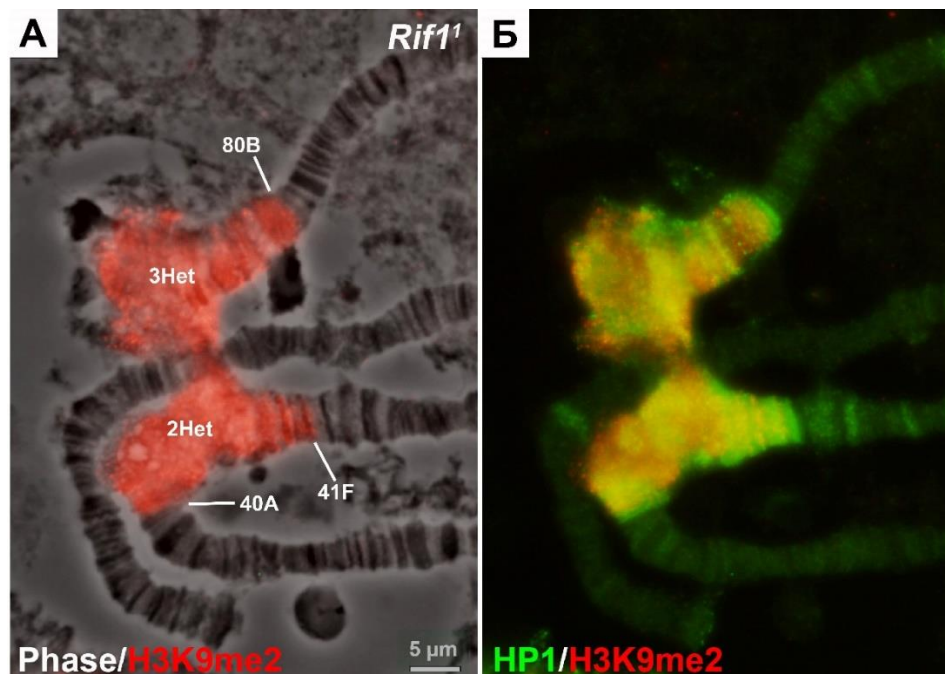


Рисунок 10. Иммулокализация модификации гистона H3K9me2 на политенных хромосомах *D. melanogaster*. **А** — локализация антител к модификации гистона H3K9me2 и фазовый контраст. **Б** — колокализация антител к белку HP1 и модификации гистона H3K9me2. Генотип на данном рисунке — *Rif1¹*. Области прицентромерного гетерохроматина второй и третьей политенных хромосом отмечены как 2Het и 3Het соответственно.

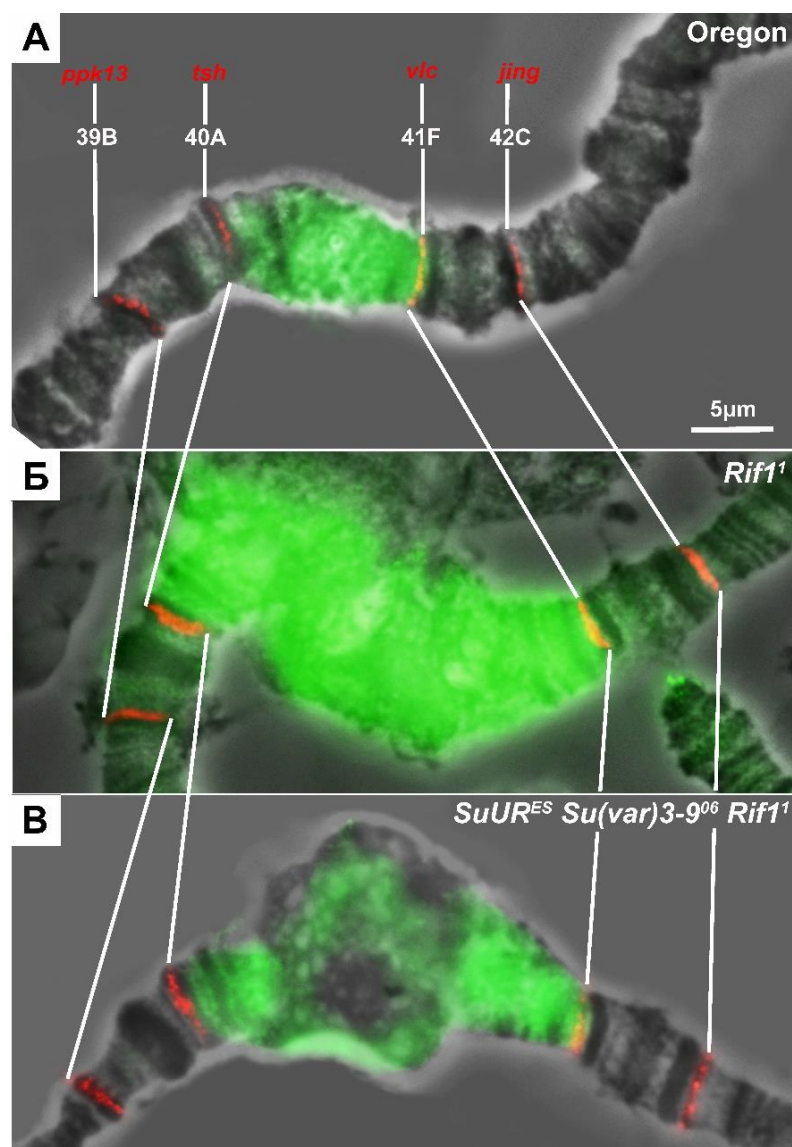


Рисунок 11. Колокализация антител на белок HP1 и ДНК-зондов границ прицентромерного гетерохроматина второй политенной хромосомы в диком типе (А), мутантных линиях *Rif1¹* (Б) и *SuUR^{ES} Su(var)3-9⁰⁶ Rif1¹* (В) *D. melanogaster*.

С помощью вестерн-блот анализа было показано, что количество материала в черных дисках и хромоцентре увеличивается в зависимости от дозы мутаций, приводящих к подавлению недорепликации (Рис. 6). Чтобы определить, изменяются ли эпигенетические границы прицентромерного гетерохроматина в линиях с мутациями *Rif1¹* и *SuUR^{ES}*, или остаются в тех же пределах, что и в диком типе, мы локализовали антитела против белка HP1 на трех линиях: дикий тип Oregon-R в качестве контроля, мутантные линии с подавлением недорепликации: *Rif1¹* и *SuUR^{ES} Su(var)3-9⁰⁶ Rif1¹*. На примере второй политенной хромосомы показано распределение белка HP1 во всех трех линиях (Рис. 11). Для удобства визуализации границ прицентромерного гетерохроматина с помощью метода FIS были локализованы зонды – *tsh* и *vlc*, отобранные из генов, расположенных на краях распределения белка HP1. Как видно из рис. 11 не смотря на увеличение объема

ретикулярного материала и восстановления дискового рисунка прицентромерного гетерохроматина, границы распределения белка HP1 остаются неизменными.

Ранее было известно, что прицентромерный гетерохроматин и черные диски имеют ряд идентичных признаков, такие как плотная упаковка материала, поздняя репликация, недорепликация в политенных хромосомах. Но также эти структуры имеют различия. Похоже, что прицентромерный гетерохроматин и черные диски имеют общие механизмы регуляции поскольку мутации с отсутствием белков SUUR и Rifl приводят к восстановлению политенизации в обоих типах структур закрытого хроматина; имеют общие белки (RCC1, SUUR), что может говорить об общих белковых комплексах. Но также эти структуры различаются в белковом составе, например, H3K9me2 характерен только для прицентромерного гетерохроматина.

Мутации *SuUR^{ES}* и *Rifl¹* в отдельности частично восстанавливают участки гетерохроматина, а увеличение дозы мутаций с подавлением недорепликации приводит к увеличению протяженности политенизированного материала. Однако не смотря на увеличение объема материала прицентромерного гетерохроматина, эпигенетические границы в мутантных линиях остаются неизменными в сравнении с диким типом.

3. Сопоставление физической и цитологической карт прицентромерного гетерохроматина политенных хромосом

Существенная сложность при локализации признаков гетерохроматина на хромосомной карте заключается в том, что их много и локализация каждого из них сопряжена с множеством исключений и неточностей. По тем же причинам границы между эухроматином и гетерохроматином на физической карте не определены точно. Тем не менее было установлено, что цитологические границы между эухроматином и гетерохроматином в третьей политенной хромосоме находятся в пределах 80A и 81F, а во второй – 40A-41F [2,7,47].

Чтобы сопоставить физическую карту с цитологической картой политенных хромосом, мы провели FISH для локализации фрагментов ДНК, положение которых определено на генетической карте. Небольшая часть генов прицентромерного гетерохроматина является транскрипционно активными [5]. Как уже было отмечено ранее, белок CHRIZ, характерный для междисков, то есть промоторной области повсеместно активных генов (генов домашнего хозяйства) [9], также локализуется в прицентромерном гетерохроматине (Рис. 3). Исходя из данных, представленных на схеме молекулярно-

генетической организации (Рис. 13Ж, 17Ж), во всех участках прицентромерного гетерохроматина обнаружены сайты локализации белка CHRIZ, хотя их частота меньше, чем в эухроматине. Мы отобрали зонды из генов, кодирующих белки, расположенных ближе всего к центромерам, в основном по сайтам локализации белка CHRIZ [11]. На рис. 12 показан пример зонда для одного из генов (*Set1*). В области, где расположен этот ген, находятся еще два гена: *MED21* и *UQCR-11*. 5'-концы всех трех генов локализируются в хроматине состояния *Aquamarine*, характерного для открытого хроматина междисков [11,48], и совпадают по локализации с белком CHRIZ.

Поскольку гетерохроматин дикого типа по большей части не имеет дискового рисунка, что затрудняет локализацию зондов, гибридизация проводилась в основном с политенными хромосомами мутантов *SuUR^{ES} Su(var)3-9⁰⁶ Rif¹* и *Rif¹*. Как было показано выше, мутации с подавлением недорепликации не влияют на границы прицентромерного гетерохроматина (Рис. 11).

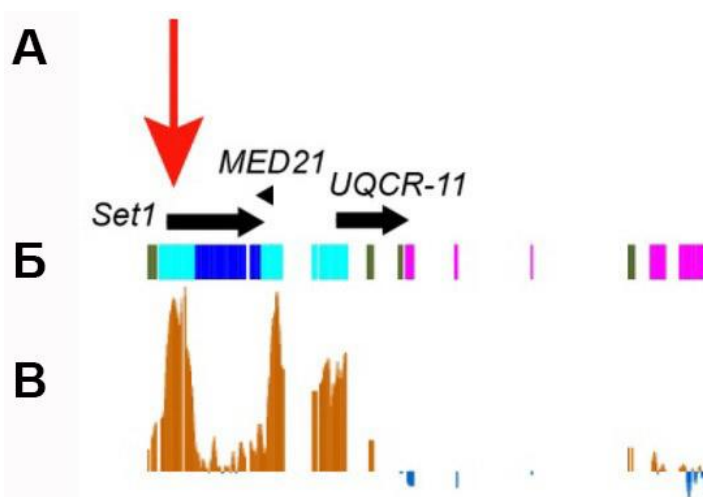


Рисунок 12. Расположение гена домашнего хозяйства *Set1* и двух соседних генов, *MED21* и *UQCR-1*, в геноме прицентромерного гетерохроматина плеча 3L. **А** - направление транскрипции генов (указано стрелками). Красная стрелка указывает на положение зонда FISH; **Б** - состояния хроматина по данным 4HMM [11]. В хроматине состояния *Aquamarine* локализуются промоторы генов домашнего хозяйства, а тела генов домашнего хозяйства – в хроматине типа *Lazurite*; **В** - локализация белка CHRIZ в хромосомах клеточной культуры S2 [49].

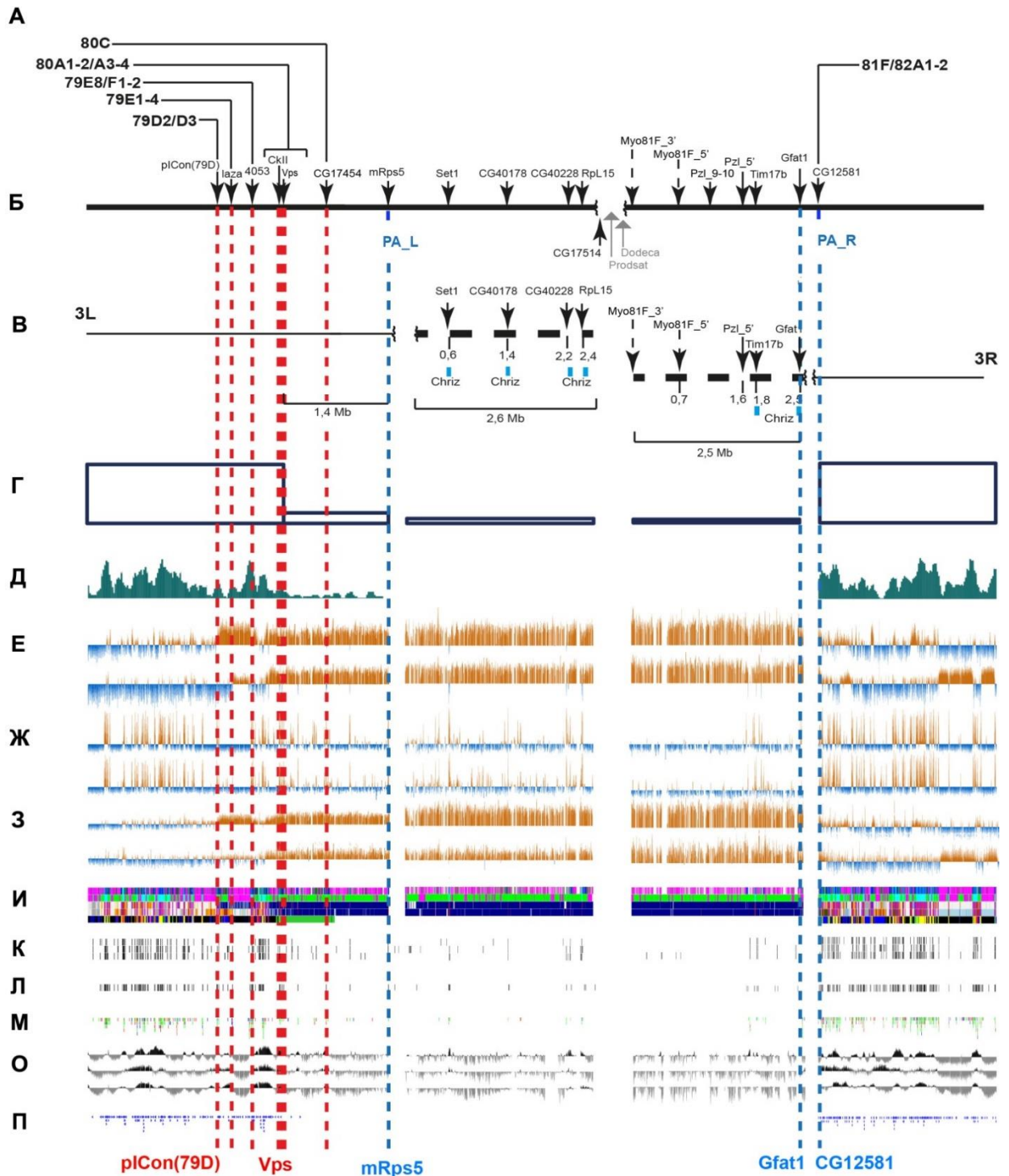


Рисунок 13. Молекулярно-генетическая организация прицентромерного гетерохроматина третьей политенной хромосомы *D. melanogaster* (по данным FlyBase, релиз 5). Недавно политенизированные участки гетерохроматина третьей хромосомы расположены между PA_L и PA_R (синие вертикальные пунктирные линии). **А** - цитологическое расположение дисков с цифрами и буквами, соответствующими карте политенных хромосом; **Б,В** - локализация отобранных ДНК-зондов (черные стрелки) на физической карте; серые стрелки указывают на участки ДНК-зондов сателлитной ДНК. Расстояние между генами на карте выражено в мегабазах; **Г,Д** - плотность генов в эухроматине и гетерохроматине по нашим (**Г**) и предыдущим [50] расчетам (**Д**); **Е** - локализация модификации гистона модификации H3K9me2 в клеточных культурах S2 (верхняя линия) и BG3 (нижняя линия) [30,49]; **Ж** - локализация белка CHRIZ в клеточных культурах S2 (верхняя линия) и BG3 (нижняя линия) [49]; **З** - локализация белка HP1 в

клеточных культурах S2 (верхняя линия) и BG3 (нижняя линия) [49]; **И** - состояния хроматина в соответствии с известными моделями [11,14–16]; **К, Л** - локализация белков комплекса инициации репликации ORC2 в клеточных культурах S2, Кс и BG3 (соответствующие линии на **К**) [51] и в слюнных железах *Drosophila* (**Л**) [52]; **М** – широкие и точечные промоторы [53]; **О** - время репликации в клеточных культурах Кс, S2 и Cl8 [54]; **П** – данные по проекту инактивации генов (Gene Disruption Project) путем вставки Р-элемента и Minos. В нижней части пунктирных линий указаны названия некоторых зондов, в верхней — названия дисков, которым соответствуют данные зонды. Красные вертикальные пунктирные линии обозначают участки ДНК-зондов в дистальной части гетерохроматина 3L.

Чтобы приблизительно определить границы гетерохроматина третьей хромосомы, мы использовали информацию о точной локализации вставки pICon(79D) на физической карте и в политенных хромосомах. Эта вставка расположена в плече 3L, дистальнее центромеры, в позиции 22 260 703 [FlyBase R 5] и в позиции 22 267 604 [FlyBase R 6] (5'-некодирующий экзон гена *Csp*). В политенных хромосомах эта инсерция локализуется в междиске 79D2/79D3 [12] рядом с самой дистальной областью предположительно прицентромерного гетерохроматина плеча 3L, 80A (Рис. 1 и 13). Мы рассматривали только те гены, кодирующие белки, которые расположены проксимальнее вставки pICon(79D), то есть от границы гетерохроматина плеча 3L (80A) до границы гетерохроматина плеча 3R (81F). Расположение отобранных зондов для FISH на генетической карте представлено на рис. 13Б,В (релиз 5) и 14А,Б (релиз 6). В релизах 5 и 6 эти гены расположены в одном и том же порядке, но несколько по-разному, на разном расстоянии относительно друг друга, поэтому мы указываем их расположение в соответствии с обоими релизами. Полученные зонды были последовательно картированы от сайта вставки pICon(79D) проксимально к центромерам. Для упрощения картирования зонды локализовались парами или даже тройками. Таким образом, было картировано 16 уникальных зондов для третьей хромосомы (Рис 15, 16). Данные о локализации показаны на рис. 13А и 14А.

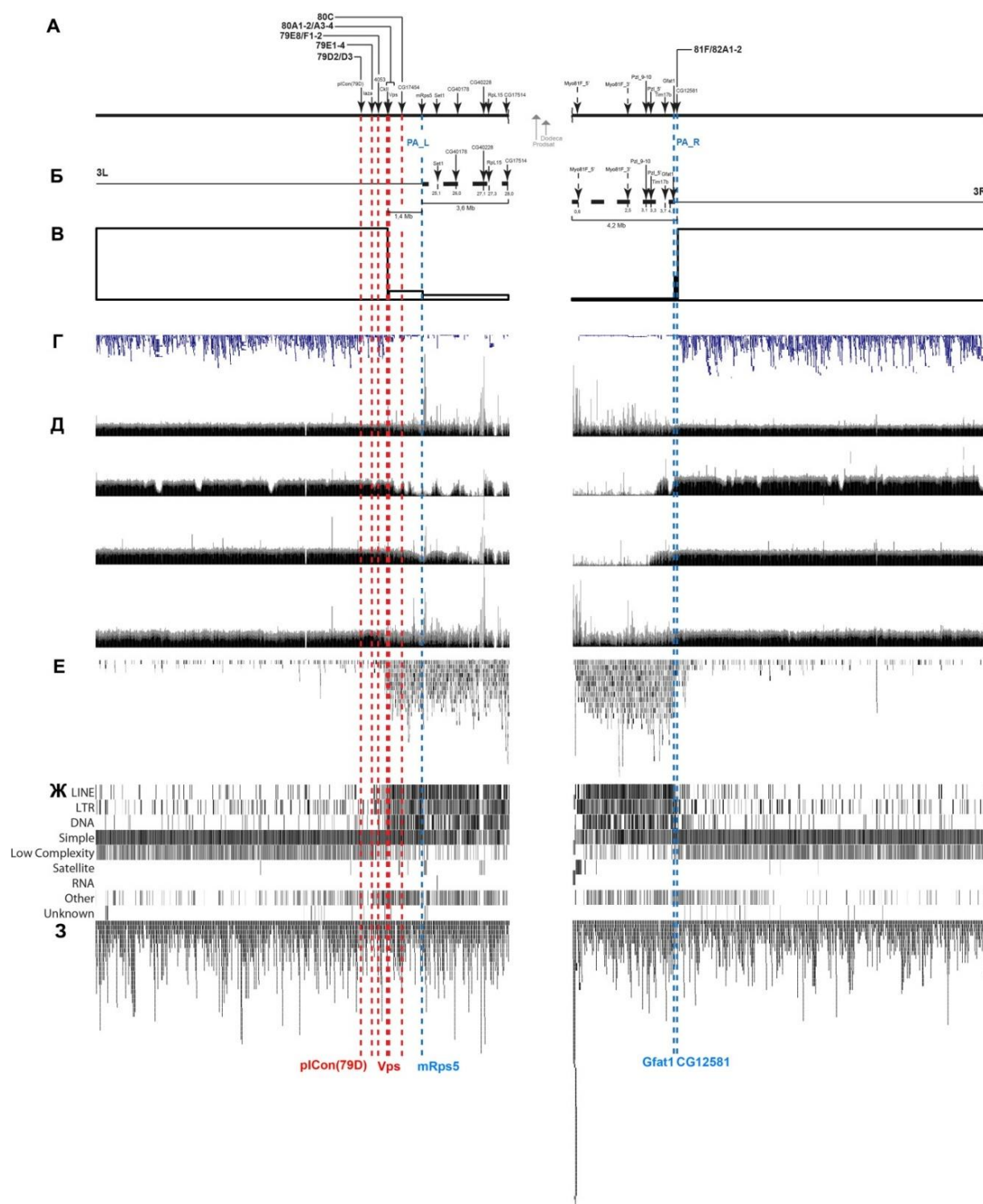
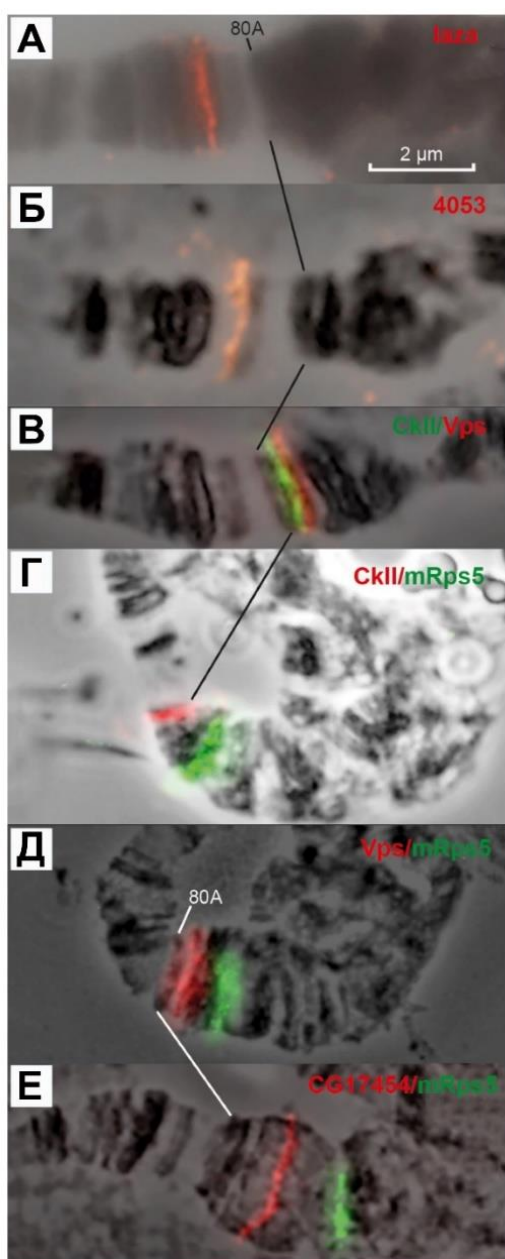


Рисунок 14. Молекулярно-генетическая организация прицентромерного гетерохроматина третьей политенной хромосомы *D. melanogaster* (по данным FlyBase, релиз 6). Недавно политенизированная часть гетерохроматина третьей хромосомы расположена между PA_L и PA_R (синие вертикальные пунктирные линии). А - цитологическое расположение дисков с цифрами и буквами, соответствующими карте хромосом; А,Б - локализация ДНК-зондов (черные стрелки) на физической карте; серые стрелки указывают на участки ДНК-зондов сателлитной ДНК. Расстояние между генами на карте указано в мегабазах; В - плотность генов в эухроматине и гетерохроматине по нашим расчетам; Г - предсказанные гены по базе данных RefSeq Genes NCBI_Release_6; Д - профили количества копий на основе Illumina (количество прочтений на миллион, об/мин) плечей 3L и 3R (сверху вниз) эмбрионов (WT), слюнных желез личинок (WT), слюнных желез личинок (w^{118} ; $SuUR^{ES}$) и слюнных желез личинок (w^{118} ; $RifI^1/RifI^2$) [18]; Е -

прерванные повторы (UCSC Genome Browser); Ж - повторы, обнаруженные с помощью RepeatMasker; З - простые тандемные повторы, обнаруженные с помощью программы Tandem Repeats Finder (TRF). В нижней части пунктирных линий указаны названия некоторых зондов, в верхней — названия дисков, которым соответствуют данные зонды. Красные вертикальные пунктирные линии обозначают участки ДНК-зондов в дистальной части гетерохроматина 3L.

Данные на рис.15 и рис.16 позволяют точно определить расположение различных участков гетерохроматина на цитологической карте. Зонды laza и 4053 расположены в дисковом участке 79E–79F, который никогда не считался гетерохроматином. Зонды CkII, Vps и CG17454 картируются в области 80AC, которая всегда считалась гетерохроматиновой из-за поздней репликации [48]. Фрагмент CkII локализуется в области 80A/80B и, таким образом, ограничивает ее с дистального края, а фрагмент гена *CG17454* локализуется в области 80C, ограничивая район 80AC с проксимального края. Таким образом, область



80AC присутствует во всех линиях *Drosophila* с нормальными аллелями генов, влияющих на гетерохроматин. Ген *mRsp5* картируется в области 80F, то есть ограничивает область 80DF с проксимальной стороны, которая намного тоньше остальной части хромосомы (по-видимому, из-за недорепликации) и редко имеет дисковую структуру (по данным карты Бриджеса Ф. [55]).

В мутантной линии зонды генов *Set1*, *CG40178*, *CG40228*, *Rpl15* и *CG17514* расположены в недавно политенизированном гетерохроматине, названным Plato Atlantis, в междисках (Рис.16). Согласно данным FlyBase, гены *RpL15* и *CG17514* (рис. 13, 14) расположены ближе всего к центромерам на плече 3L.

Рисунок 15. Локализация зондов в гетерохроматине третьей политенной хромосомы: laza (79D (А)), 4053 (79E-78F (Б)), CkII/Vps (80A/80B (В)), CkII/mRsp5 (80B и 80F (Г)), Vps/mRsp5 (80B и 80F (Д)), CG17454/mRsp5 (80D и 80F (Е)). Генотип на всех частях рисунка: *SuUR^{ES} Su(var)3-9⁰⁶ Rif¹*. Часть фотографий с локализацией зондов любезно предоставлены Колесниковой Т.Д.

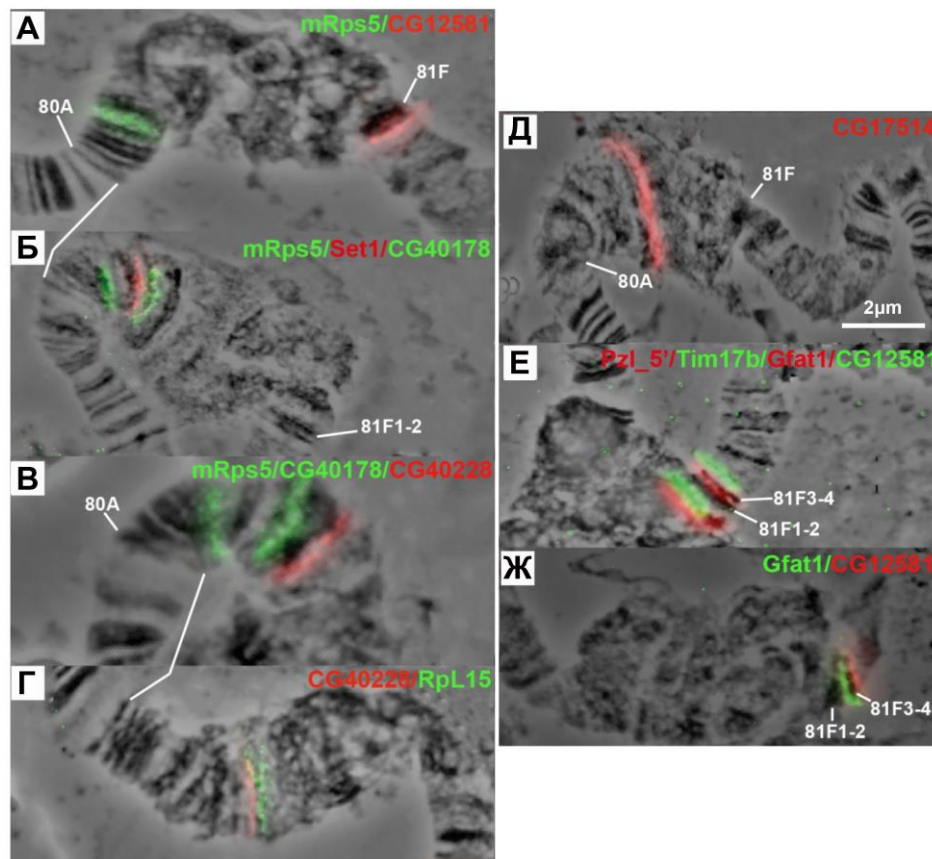


Рисунок 16. Локализация зондов на гетерохроматине третьей политенной хромосомы: mRsp5 и CG12581 (80F и 81F (А)), mRsp5/Set1/CG40178 (80F и Plato Atlantis (Б)), mRsp5/CG40178/CG40228 (80F и Plato Atlantis (В)), CG40228/RpL15 (Plato Atlantis (Г)), CG17514 (Plato Atlantis (Д)), Pz1_5'/Tim17b/Gfat1/CG12581 (Plato Atlantis и 81F3-4 (Е)), Gfat1/CG12581 (Plato Atlantis и 81F3-4 (Ж)). Генотип на всех частях рисунка *Rif^l*. Часть фотографий с локализацией зондов любезно предоставлены Колесниковой Т.Д.

Таким образом мы сопоставили границы прицентромерного гетерохроматина третьей политенной хромосомы на физической и цитологической картах и локализовали маркерные зонды для визуализации отдельных областей прицентромерного гетерохроматина. Полученные результаты так же позволяют нам сравнить эпигенетические границы на молекулярной и цитологической картах. Ранее мы локализовали антитела на белок HP1 и модификацию гистона H3K9me2 на политенных хромосомах и определили области их распределения на третьей политенной хромосоме в пределах 80A-81F, 80B-81F соответственно (Рис. 10). По данным Риддл Н. и соавторов [30] эпигенетические границы между эухроматином и гетерохроматином *Drosophila* различаются в зависимости от типа клеток. Так на молекулярной карте 3L плеча граница локализации антител к H3K9me2 в культуре клеток S2 находится в области с координатами, примерно соответствующими сайту вставки pIcon(79D) (79D), который считается эухроматином. В то же время в клеточной линии BG3 эта граница, по данным авторов, находится в области 80B (Рис. 13Е), которая относится к гетерохроматину, однако расположена проксимальнее цитологической

границы гетерохроматина политенных хромосом. Таким образом, границы распределения H3K9me2 в клеточной культуре BG3 находятся проксимальнее почти на 640 т.п.н., чем в клеточной культуре S2, но дистальнее границ у личинок третьего возраста на 30 т.п.н. [30]. Подобная картина наблюдается и при определении границ распределения белка HP1 (Рис. 13 и 10).

Опираясь на вышеописанную информацию, для сопоставления цитологических и физических границ прицентромерного гетерохроматина второй политенной хромосомы мы исходили из знаний о распределении белка HP1 и модификации гистона H3K9me2 на хромосомной и молекулярной картах. Ранее было установлено, что цитологические границы между эухроматином и гетерохроматином второй политенной хромосомы находятся в пределах 40А-41F. Для визуализации границ распределения белка HP1 на молекулярной карте, был использован метод FISH с локализацией ДНК-фрагментов, отобранных из активных генов, расположенных на границах распределения HP1 или H3K9me2 на виртуальной карте. Первая пара зондов (ppk13 и jing) ограничивает распределение белка HP1 или H3K9me2 в культуре клеток S2 (Рис. 17, 18). Данные зонды расположены в районах 39В и 42С, что не соответствует цитологическим границам прицентромерного гетерохроматина политенных хромосом и, как в случае с третьей хромосомой, расположены дистальнее (Рис. 11, 17).

На основе анализа распределения белков, характерных для активных и неактивных генов в клеточных культурах *Drosophila*, были разработаны четыре модели состояний хроматина (Рис. 13И, 17И) [11,14–16]. В модели, разделяющей геном *Drosophila* на четыре дискретных состояния (4НММ), разработанной в нашей лаборатории [11], границы между состояниями хроматина можно с высокой степенью достоверности считать границами между дисками и междисками. Эта модель позволяет соотнести молекулярно-генетические карты с цитологической картой политенных хромосом. Используя модель 4НММ и расположение зондов ppk13 и jing, мы сопоставили цитологическую карту черных дисков политенных хромосом, расположенных проксимальнее зондов, и области распределения состояния *Ruby*, характерного для закрытого хроматина. Таким образом мы прокартировали черные диски и определили известные цитологические границы прицентромерного гетерохроматина на физической карте. Вторая пара зондов (tsh и vlc) была отобрана из генов, расположенных на границах прицентромерного гетерохроматина на основании наших предположений (Рис. 17, 18). Они локализуются в районах 40А, 41F соответственно, соотносятся с известными цитологическими границами и ограничивают иммулолокализацию антител против белка HP1 (Рис. 11, 17).

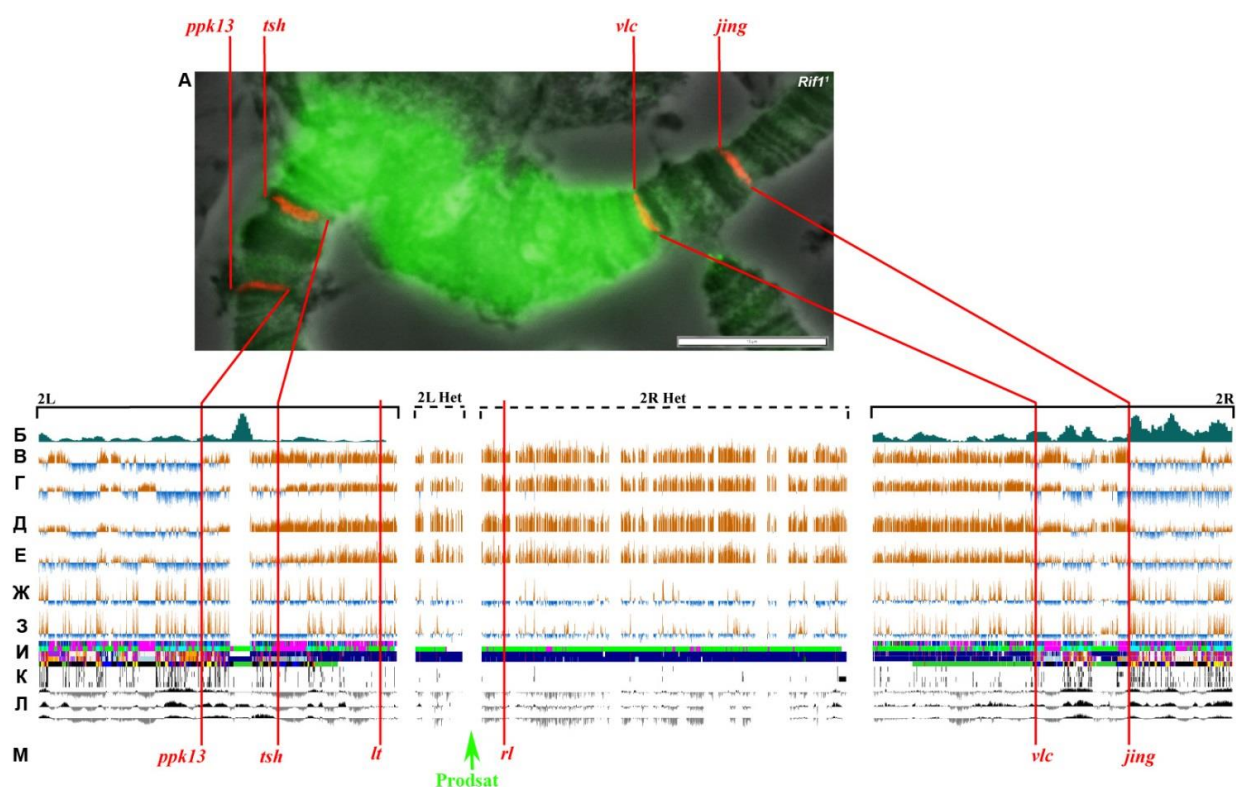


Рисунок 17. Молекулярно-генетическая организация прицентромерного гетерохроматина второй политенной хромосомы *D. melanogaster* (по данным FlyBase, релиз 5). **А** - колокализация ДНК-зондов предполагаемых границ прицентромерного гетерохроматина и антител на белок HP1; **Б** - плотность генов в эухроматине и гетерохроматине [50]; **В** - локализация модификации гистона H3K9me2 в культуре клеток S2 [30,49]; **Г** - локализация модификации гистона H3K9me2 в культуре клеток BG3 [30,49]; **Д** - локализация белка HP1 в культуре клеток S2 [49]; **Е** - локализация белка HP1 в культуре клеток BG3 [49]; **Ж** - локализация белка CHRIZ в культуре клеток S2 [49]; **З** - локализация белка CHRIZ в культуре клеток BG3 [49]; **И** - состояния хроматина в соответствии с известными моделями [11,14–16]; **К** - локализация белков комплекса инициации репликации ORC2 в культурах клеток S2, BG3, Кс [51] и слюнных железах *Drosophila* [52]; **Л** - время репликации в культурах клеток S2, Кс и C18 [54]; **М** - схема расположения ДНК-зондов предполагаемых границ прицентромерного гетерохроматина (отмечены красными вертикальными линиями) и возможное расположение сателлитного повтора Prodsat. Черными сплошными скобками отмечены участки эухроматина и смежного с ним гетерохроматина; черными пунктирными скобками отмечен глубокий гетерохроматин,

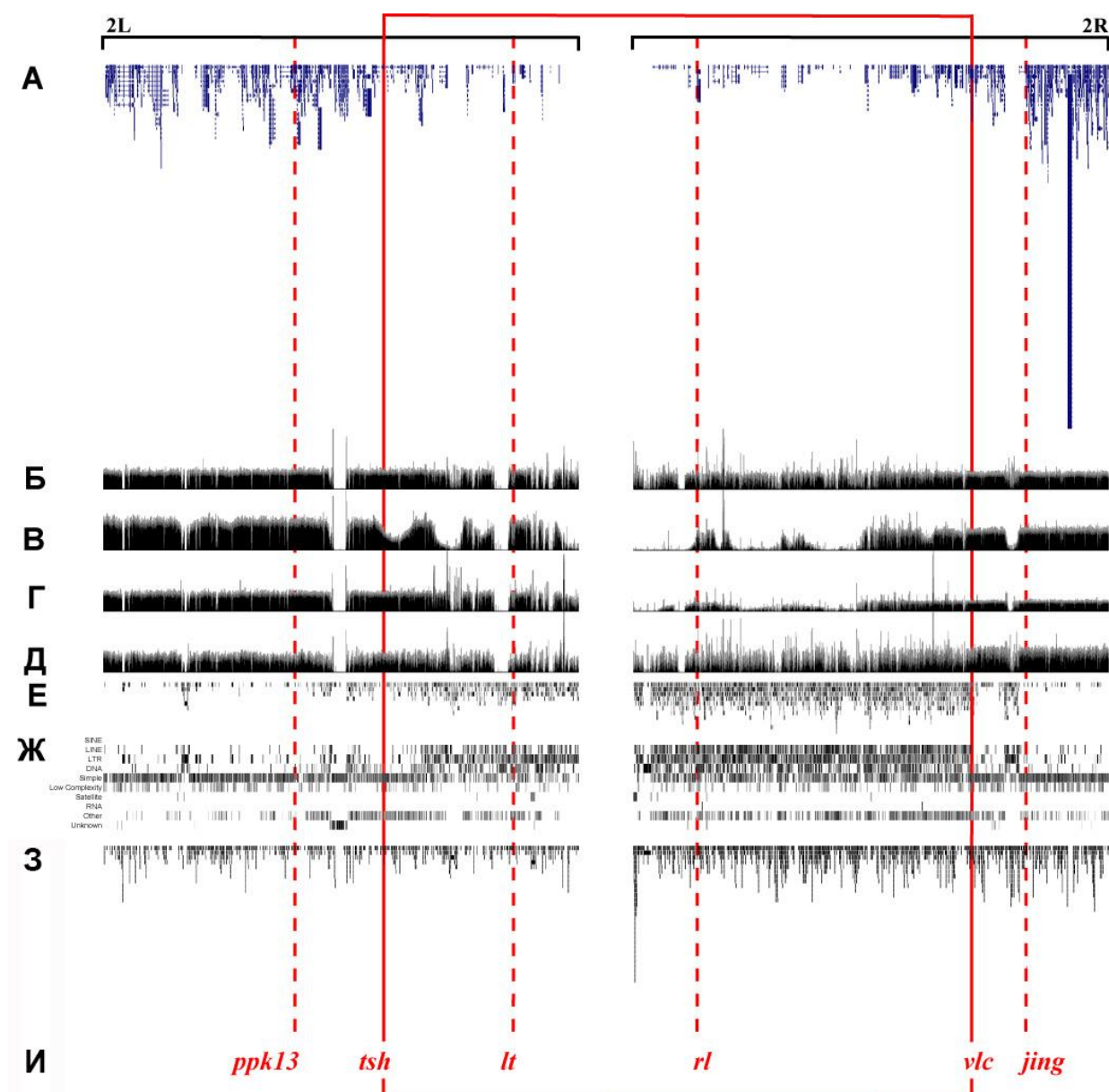


Рисунок 18. Молекулярно-генетическая организация прицентромерного гетерохроматина второй политенной хромосомы *D. melanogaster* (по данным FlyBase, релиз 6). Область прицентромерного гетерохроматина отмечена красной сплошной рамкой. Красными линиями, как пунктирными, так и сплошными, отмечены ДНК-зонды, использованные в работе. **А** - предсказанные гены по базе данных RefSeq Genes NCBI_Release_6; **Б,В,Г,Д** - профили количества копий на основе Illumina (количество прочтений на миллион, об/мин) плечей 2L и 2R (сверху вниз) эмбрионов (WT), слюнных желез личинок (WT), слюнных желез личинок (w^{118} ; $SuUR^{ES}$), слюнных желез личинок (w^{118} ; $Rif1^1/Rif1^2$) [18]. **Е** - прерванные повторы (UCSC Genome Browser). **Ж** - повторы, обнаруженные с помощью RepeatMasker. **З** - простые тандемные повторы, обнаруженные с помощью Tandem Repeats Finder (TRF). **И** - схема расположения ДНК-зондов.

Таким образом с помощью метода FISH сопоставлены границы прицентромерного гетерохроматина второй и третьей политенных хромосом на физической и цитологической картах и локализованы маркерные гены, разграничивающие область вновь политенизированного материала гетерохроматина в мутантных линиях на отдельные

участки. Это позволяет привязать известные молекулярно-генетические характеристики гетерохроматина к его цитологическим структурным особенностям.

4. Гены в прицентромерном гетерохроматине

Известно, что в гетерохроматине мало генов [5,7]. В этой работе мы разделили недавно политенизированный гетерохроматин на участки и провели точные расчеты плотности генов в различных его областях. Результаты, представленные рис. 13Г, 14В, на примере третьей хромосомы, показывают, что гены присутствуют во всех участках гетерохроматина, включая области, расположенные ближе всего к центромерам. Однако их плотность там значительно ниже, чем в прилегающих областях эухроматина. Эти результаты подтверждаются предыдущими исследованиями (Рис. 13Д, 17Б) [50].

Например, участки эухроматина третьей хромосомы, расположенные дальше от гетерохроматина, содержат 125 и 144 гена на 1 Мб ДНК (Приложение 2, FlyBase, релиз 5) и 153 и 155 генов (Приложение 2, FlyBase, релиз 6), в то время как плотность генов в участках прицентромерного гетерохроматина значительно ниже (Рис. 13Г,Д и Рис. 14В). Между зондами *pICon(79D)* и *SkII/Vps* наблюдается небольшое снижение плотности генов (Рис. 13Г). По литературным данным известно о более выраженном снижении плотности генов в этом интервале при использовании базы данных RefSeq Genes NCBI_Release_6 (Рис.14Г). Участок 80А-80F (то есть между генами *Vps* и *mRps5*) содержит значительно меньше генов, чем эухроматин: 22 на 1 Мб ДНК по данным FlyBase R5, и 18 на 1 Мб ДНК по данным FlyBase R6 (Приложение 2). Наконец, участки глубокого гетерохроматина 3LHet и 3RHet, которые, по имеющимся данным, политенизированы из-за мутаций, содержат от 4 до 10 генов на 1 Мб, согласно обоим релизам FlyBase (Приложение 2).

На примере второй хромосомы хорошо видно, что плотность генов в приграничных к прицентромерному гетерохроматину эухроматиновых районах также снижается постепенно. Например, участок эухроматина дистальнее зонда *jing 2R* плеча содержит 182 гена (Приложение 3, FlyBase, релиз 5) и 180 генов (Приложение 3, FlyBase, релиз 6) на 1Мб, в то время, как плотность генов в участке 41F-42C (то есть между зондами *vlc* и *jing*), который в политенных хромосомах относится к эухроматину, а в клеточной культуре S2 – к гетерохроматину (Рис.11, 17), содержит 66 генов на 1 Мб ДНК согласно обоим релизам FlyBase (Приложение 3). Снижение плотности генов происходит и в гетерохроматине. Участок, проксимальне гена *vlc* по данным FlyBase R5 содержит значительно меньше генов: 34 на 1 Мб ДНК (Приложение 3). Наконец, глубокий гетерохроматин 2RHet содержит 8 генов на 1 Мб (Приложение 3). Подобная тенденция наблюдается и на 2L плече с некоторым

исключением: плотность генов на участке 39B-40A (то есть между зондами *ppk13* и *tsh*) (Рис.11, 17), который в политенных хромосомах относится к эухроматину, а в клеточной культуре S2 – к гетерохроматину, значительно выше (291 и 296 генов на 1 Мб согласно релизам FlyBase R5 и R6 соответственно (Приложение 3)), чем на прилегающем участке эухроматина, дистальнее метки *ppk13* (142 гена 1 Мб согласно обоим релизам FlyBase). По-видимому, это связано с кластером генов гистонов, расположенном приблизительно в районе 39D. Участок, проксимальнее *tsh* по данным FlyBase R5 содержит значительно меньше генов: 56 на 1 Мб ДНК, наконец, глубокий гетерохроматин 2LHet содержит 15 генов на 1 Мб (Приложение 3).

Чтобы охарактеризовать гены, находящиеся в гетерохроматине и демонстрирующие определенный уровень транскрипции, мы использовали данные о локализации белка CHRIZ (CHRO), характерного для открытого хроматина и промоторных участков генов домашнего хозяйства. Согласно данным на рис. 13Ж и 17Ж, CHRIZ (CHRO) присутствует во всех областях и чаще встречается в эухроматиновых и дистальных гетерохроматиновых областях. То же самое было обнаружено при анализе литературных данных о широких и точечных промоторах (Рис. 13М) [53], и расположении хроматина состояния *Aquamarine* (рис. 13И и 17И), которое содержит промоторы генов домашнего хозяйства и белок CHRIZ (CHRO).

В таблице 1 приведены данные активности генов прицентромерного гетерохроматина на примере третьей хромосомы, выраженные в значениях RPKM (reads per kilobase per million mapped reads — количество прочтений на килобазу на картированные риды) в разных тканях *Drosophila*. Голубым выделены гены, в промоторах которых локализуется междиск-специфичный белок CHRIZ. Розовым цветом отмечены гены, в промоторах которых белок CHRIZ отсутствует. Из 46 генов, которые мы обнаружили в недавно политенизированном гетерохроматине 3L и 3R между маркерами *mRps5* и *CG12581* (синие пунктирные линии на рис. 13 и 14), 19 имеют промоторы в хроматине состояния *Aquamarine* и демонстрируют различную степень активности — от самой низкой до очень высокой, чаще всего от низкой до высокой (Таблица 1). Большинство других генов, доступных для анализа, не связаны с локализацией CHRIZ или полностью неактивны в исследуемых тканях (Таблица 1).

Таблица 1

Экспрессия генов прицентромерного гетерохроматина третьей хромосомы в тканях *D. melanogaster* выраженная в единицах RPKM в клетках 29 тканей (modENCODE).

#	Гены	Данные экспрессии 29 тканей, modENCODE								5'UTR состояние хроматина
		экстремально высокая (>1000)	очень высокая (101-1000)	высокая (51-100)	умеренно высокая (26-50)	умеренная (11-25)	низкая (4-10)	очень низкая (1-3)	нет/экстремально низкая (0-0)	
5'UTR содержит CHRIZ										
1	<i>mRps5</i>				1	10	15	3		Aquamarine
2	<i>Set1</i>				2	14	12	1		Aquamarine
3	<i>CG40178</i>			1	3	7	9	9		Aquamarine
4	<i>CG40228</i>					2	13	14		Aquamarine
5	<i>RpL15</i>		28	1						Aquamarine
6	<i>CG17514</i>			1		8	17	3		нет данных
7	<i>CG12581</i>			1	1	12	7	7	1	нет данных
8	<i>Tim17b</i>		10	17	2					Aquamarine
9	<i>CG40472</i>						6	20	3	Aquamarine
10	<i>ND-AGGG</i>						16	12	1	Aquamarine
11	<i>MED21</i>		2	1	6	10	8	2		Aquamarine
12	<i>UQCR-11</i>				3	13	12	1		Aquamarine
13	<i>CG40160</i>					3	21	5		Aquamarine
14	<i>vtd</i>				1	7	20	1		Aquamarine
15	<i>Dbp80</i>			2	8	17	2			Aquamarine
16	<i>Parp</i>				1	4	16	8		Aquamarine
17	<i>Alg-2</i>				2	13	12	2		Aquamarine
18	<i>CG41128</i>			2	12	9	6			Aquamarine
19	<i>CG41099</i>			1	1	8	17	2		Aquamarine
20	<i>scro</i>				1	4	9	5	10	Malachite
21	<i>eIF4B</i>							13	16	Aquamarine
22	<i>snoRNA:Me18S-C419</i>						1	9	19	Aquamarine
5'UTR не содержит CHRIZ										
23	<i>CR42722</i>								29	Lazurite
24	<i>CR42723</i>								29	Lazurite
25	<i>FASN3</i>			2	1	1		6	19	Ruby
26	<i>CG41284</i>							7	22	Ruby
27	<i>CG42598</i>							1	28	Malachite
28	<i>spok</i>				1		1	4	23	Ruby
29	<i>CG42402</i>				1		10	8	10	Ruby
30	<i>lncRNA:CR41601</i>						1	1	27	Ruby
31	<i>CG40198</i>		2	1	3	2	4	6	11	Malachite
32	<i>Pzl</i>							2	27	Ruby
нет данных о содержании CHRIZ										
33	<i>Gfat1</i>			2	5	10	8	3	1	нет данных

34	<i>Myo81F</i>						1	2	26	нет данных
35	<i>CR41597</i>								29	нет данных
36	<i>CG45782</i>			3	4	2	2	1	17	нет данных
37	<i>IncRNA:CR45180</i>						5	6	18	нет данных
38	<i>asRNA:CR45182</i>						2	9	18	нет данных
39	<i>CR41320</i>								29	нет данных
40	<i>IncRNA:CR45177</i>				1			11	17	нет данных
41	<i>IncRNA:CR46252</i>								29	нет данных
42	<i>IncRNA:CR45181</i>						3	9	17	нет данных
43	<i>IncRNA:CR46250</i>								29	нет данных
44	<i>IncRNA:CR46122</i>							3	26	нет данных
45	<i>IncRNA:CR45220</i>							3	26	нет данных
46	<i>IncRNA:CR46141</i>			1		1	1	4	22	нет данных

Плотность генов в прицентромерном гетерохроматине ниже, чем в эухроматине, однако неоднородна: во вновь политенизированных структурированных участках гетерохроматина (в районах *Vps-mRps5* третьей хромосомы, *tsh-lt* и проксимальнее *vlc* второй хромосомы) плотность генов заметно выше, чем в глубоком гетерохроматине, который представляет собой ретикулярный материал (в районах *mRsp5-CG12581* третьей хромосомы, проксимальнее *lt* второй хромосомы). Не смотря на представление о гетерохроматине, как о транскрипционно неактивном районе, прицентромерный гетерохроматин содержит гены домашнего хозяйства, которые активно экспрессируются.

5. Повторы в прицентромерном гетерохроматине

Участки, расположенные ближе всего к центромерам, представляют собой блок ретикулярного материала на цитологических препаратах политенных хромосом. На молекулярно-генетической карте данные по этой области отсутствуют, так как участок недосеквенирован из-за высокого содержания повторов (пустые области на рис. 13, 14, 17, 18). Материал области между генами *CG17514* и *Myo81F* третьей политенной хромосомы интенсивно гибридизируется с ДНК двух сателлитов: Prodsat и Dodeca. Dodeca содержит tandemно повторяющиеся G-C-богатые последовательности, длиной 11 и 12 пар оснований. Большая часть этого сателлитного участка расположена около центромеры аутосомы и является ее частью [56,57]. На данный момент Dodeca обнаружена у разных представителей животного и растительного мира [58]. Prodsat – A-T-богатый участок, фланкирующий центромеру слева, и также являющийся ее частью [56,57,59]. Оба сателлитных повтора были картированы на политенных хромосомах тройных мутантов *SuUR^{ES} Su(var)3-9⁰⁶Rif^I* с помощью метода FISH. Как видно на рис. 19 ген *CG17514* – на данный момент наиболее

близкий к центромере известный ген со стороны 3L плеча, ограничивает большой DAPI-положительный блок, большую часть которого занимает сателлит Prodsat (Рис. 19А). Dodeca же окрашивает DAPI-негативный блок, лежащий дистальнее Prodsat со стороны 3R плеча (Рис. 19Б,В). Центромера находится между этими двумя блоками сателлитных повторов.

Prodsat есть не только в гетерохроматине третьей хромосомы, но и второй, где также расположен в области глубокого гетерохроматина. Со стороны 2L плеча он ограничен зондом, отобранным из гена *light* (зонд lt на рис. 17, 18), который локализуется на границе между структурированной частью гетерохроматина мутантной линии и ретикулярным материалом (Рис. 20). Со стороны 2R *rolled* (зонд rl на рис. 17, 18) является известным геном, наиболее близко расположенным к центромере, и локализуется дистальнее Prodsat со стороны 2R плеча (Рис. 20).

Анализ морфологии хромосом в сочетании с данными FISH показывает, что белок Rif1 существенно влияет на политенизацию сателлитных повторов. На рис. 21 хорошо видно увеличение объема ДНК материала сателлитного повтора Prodsat в мутантных линиях с подавлением недорепликации *Rif1*¹ в сравнении с диким типом.

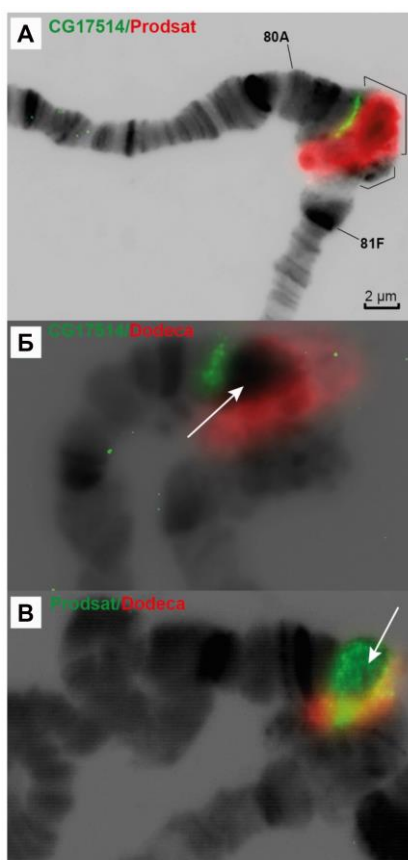


Рисунок 19. Локализация сателлитных повторов Prodsat и Dodeca в гетерохроматине третьей политенной хромосомы: CG17514/Prodsat (А), CG17514/Dodeca (Б), Prodsat/Dodeca (В). Скобки в (А) обозначают сателлиты Prodsat и Dodeca. Белые стрелки на (Б и В) указывают на сателлит Prodsat. Генотип на данном рисунке - *SuUR*^{ES} *Su(var)3-9*⁰⁶ *Rif1*¹.

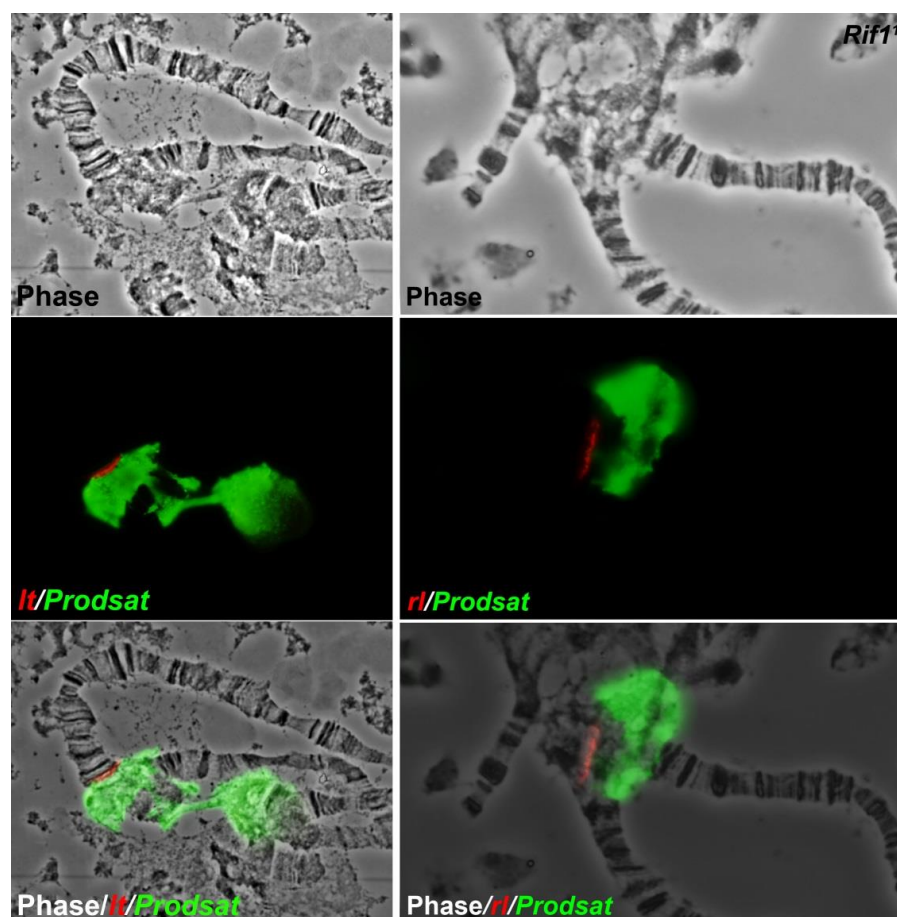


Рисунок 20. Локализация сателлитного повтора Prodsat и зондов, ограничивающих Prodsat, в гетерохроматине второй политенной хромосомы *D. melanogaster*. Генотип на данном рисунке - *Rif1*¹.

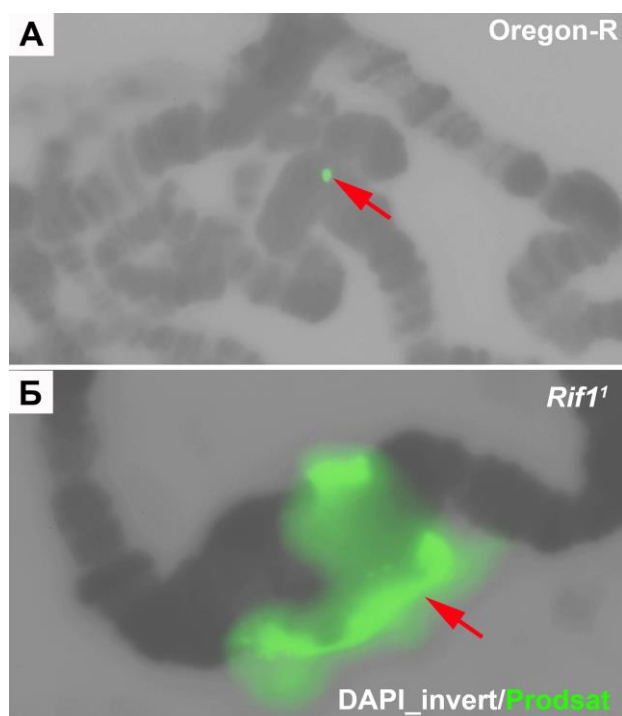


Рисунок 21. Сравнение объема сателлитного повтора Prodsat в гетерохроматине второй политенной хромосомы в диком типе (А) и в мутантной линии *Rif1*¹ (Б) *D. melanogaster*. Генотип на данном рисунке - *Rif1*¹.

Мы также проанализировали известные данные о распределении повторов в геноме *Drosophila*. Из всех типов повторяющихся участков ДНК, описанных в браузере генома UCSC (R6), мы проанализировали повторы, обнаруженные с помощью RepeatMasker: ретротранспозоны (LINE, LTR), повторяющиеся элементы ДНК (DNA), микросателлиты, сателлитные повторы, повторы РНК (в том числе РНК, тРНК, рРНК, мяРНК, сцРНК) и другие. LINE, LTR и ДНК-повторы демонстрируют четкую локальную специфичность: они встречаются в очень небольшом количестве между pIcon(79D) и CkII/Vps третьей хромосомы и в областях ppk13-tsh, vlc-jing второй хромосомы (Рис. 14Ж, 18Ж). Основная часть повторов находится в участке между CkII/Vps и CG12581 (между дисками 80А и 81F) третьей хромосомы и tsh и vlc (между дисками 40А и 41F) второй хромосомы (Рис. 14Ж, 18Ж). Микросателлиты, сателлитные повторы, повторы РНК и другие повторы не обладают какой-либо специфичностью.

Также мы проанализировали фрагменты прерванных повторов (UCSC Genome Browser). На этой дорожке показаны фрагменты исходных вставок повторов, которые были прерваны вставками более молодых повторов или локальными перестройками. В третьей хромосоме на границах гетерохроматина (районы 80А и 81F) происходит резкое увеличение количества повторов (Рис. 14Е). Во второй хромосоме в переходных областях ppk13-tsh, vlc-jing заметно увеличение плотности повторов в сравнении с эухроматином, однако основная область, богатая повторами, находится между tsh и vlc (районы 40А и 41F) (Рис. 18Е).

Простые тандемные повторы, обнаруженные с помощью программы Tandem Repeats Finder (TRF), не демонстрируют какой-либо специфичности в геноме *Drosophila* (Рис. 14З, Рис. 18И).

Таким образом, обогащение повторами в прицентромерном гетерохроматине носит относительно однородный характер.

6. Комплексы распознавания ориджинов, поздняя репликация и недорепликация в гетерохроматине

Поздняя репликация и недорепликация — наиболее характерные особенности гетерохроматина. Поскольку в литературе имеются данные о локализации таких участков относительно молекулярно-генетических маркеров, мы локализовали их относительно тех же маркеров на карте политенных хромосом. В плечах политенных хромосом самая низкая плотность комплексов распознавания ориджинов (origin recognition complexes (ORCs)) наблюдалась в черных дисках (или интеркалярных участках гетерохроматина), что, вероятно, связано с явлением, известным как неполная политения [11,60,61]. Таким

образом, плотность белков ORC в геномных участках можно считать одним из признаков, отличающих эухроматин от гетерохроматина.

Расположение и количество сайтов ORC2 в клеточных культурах S2, Кс и BG3, а также в клетках слюнных желез (Рис. 13К,Л, 17К) были взяты из [51,52]. Распределение белков ORC в гетерохроматине значительно ниже, чем в прилегающем эухроматине, причем снижение не резкое, а постепенное. Самая низкая плотность белков ORC в районе неструктурированного гетерохроматина вблизи центромеры (Рис. 13К,Л, 17К). Таким образом, плотность белков ORC в гетерохроматине, независимо от его структуры, очень низкая. Это открытие может служить основанием для того, чтобы считать низкую плотность белков ORC одной из важных особенностей гетерохроматина.

Поскольку одной из наиболее характерных особенностей гетерохроматина является поздняя репликация, мы провели анализ времени репликации в клеточных линиях Кс, S2 и C18 в пределах генома, соответствующих недавно политенному гетерохроматину в мутантных линиях (Рис. 13О, 17Л) [54]. В эухроматиновой части, расположенной дистально по отношению к pIcon(79D) на 3L, CG12581 на 3R, tsh на 2L и vlc на 2R, ранняя и поздняя стадии репликации чередуются довольно хаотично. Репликация в участках между SKII/Vps и CG12581 третьей хромосомы (между дисками 80A и 81F) и между tsh и vlc второй хромосомы (между дисками 40A и 41F) в большинстве случаев происходит на поздней стадии, и остаются только островки ранней репликации, которые полностью совпадают с участками, где обнаружен белок CHRIZ. Эти островки состоят из хроматина состояния *Aquamarine* и содержат промоторы генов домашнего хозяйства. Время репликации в участке между pIcon(79D) и SKII/Vps третьей хромосомы, который представляет собой нечто среднее между эухроматином и гетерохроматином, такое же, как в эухроматине (Рис. 13О).

Мы также проанализировали профили количества копий на основе Illumina (количество прочтений на миллион, об/мин) [18]. Как видно на Рис. 14Д (первая строка сверху) и 18Б, степень представленности ДНК в геноме эмбрионов дикого типа в интервале между зондами SKII/Vps и CG12581 третьей хромосомы и tsh и vlc второй хромосомы составляет почти 100%, то есть недореплицированного гетерохроматина практически нет. Однако в политенных хромосомах клеток слюнных желез (вторая строка сверху на рис. 14Д и рис. 18В) в этом интервале наблюдается выраженная недорепликация с небольшими участками полной репликации, по-видимому, в тех участках гетерохроматина, где расположены гены домашнего хозяйства. Полностью недореплицированный участок гетерохроматина наблюдался между генами *Myo81F* и *Gfat1* гетерохроматина 3R плеча (вторая строка сверху на рис. 14Д) и от несеквенированной области до зонда p1 гетерохроматина 2R плеча (рис. 18В). Мутация гена *SuUR* приводит к существенному

подавлению недорепликации в участке между генами *CKII/Vps* и *mRsp5*, в меньшей степени — в участке между генами *Rsp5* и *CG17514* и не приводит к подавлению в участке между генами *Myo81F* и *Gfat1* третьей хромосомы (третья строка сверху на рис. 14Д). В гетерохроматине второй хромосомы при мутации *SuUR* происходит подавление недорепликации области между *tsh* и *lt*, однако в остальном гетерохроматине существенных изменений не наблюдается (Рис. 18В). Несколько более высокий уровень подавления во всем интервале между *CKII/Vps* и *Gfat1* (то есть между дисками 80А и 81F) третьей хромосомы (нижняя линия в Рис. 14Д) и между *tsh* и *vlc* (то есть дисками 40А и 41F) второй хромосомы (рис. 18Г) вызвана мутацией *Rif1*.

Заключение

Таким образом, впервые сопоставлены границы прицентромерного гетерохроматина второй и третьей политенных хромосом на цитологической и физической картах. Границы для второй политенной хромосомы отбирались эпигенетически с учетом распределения белков HP1 и H3K9me3 в клеточных культурах S2 и BG3 по данным modENCODE. Границы распределения HP1 и H3K9me3 для S2 были отмечены дистальнее на 700 т.п.н., чем у BG3, что говорит об уникальном распределении белков для отдельных клеточных культур. Для третьей политенной хромосомы мы опирались на ранее известную локализацию вставки pICon(79D), известна ее позиция как по данным FlyBase, так и цитологически. С помощью метода FISH на политенных хромосомах мутантных линий с подавлением недорепликации были прокартированы зонды, отобранные из последовательностей маркерных генов и некоторых сателлитов, что помогло определить границы областей, отличающихся молекулярно-генетическими признаками. Выделены следующие «ступеньки», начиная зоной перехода от типичного эухроматина в левом плече третьей хромосомы до аналогичного участка в правом плече третьей хромосомы: 80А-80С – участок, который имеет поперечно-полосатый рисунок во всех линиях, включая дикий тип, но связывает антитела на белки, характерные для гетерохроматина, имеет сниженную плотность генов относительно эухроматина, но повышенную относительно глубокого гетерохроматина, обогащен повторами, имеет незначительную недорепликацию в политенных хромосомах дикого типа; 80С-80F – участок, который образует поперечно-полосатый рисунок только в мутантных линиях с подавлением недорепликации, плотность генов приблизительно такая же, как в участке 80А-80С, обогащен повторами, имеет выраженную недорепликацию с небольшими участками полной репликации; 80F-81F - область, ближе всего расположенная к центромере, в мутантных линиях представлена неструктурированным хроматиновым

материалом, с самой низкой плотностью генов, обогащен повторами, практически полностью нереплицированный участок в политенных хромосомах дикого типа. Выделены следующие «ступеньки» во второй хромосоме, начиная зоной перехода от типичного эухроматина в левом плече до аналогичного участка в правом плече: 40A-40B – небольшой участок, в котором в мутантных линиях возникает один дополнительный слабо различимый диск, имеет сниженную плотность генов относительно эухроматина, но повышенную относительно глубокого гетерохроматина, обогащен повторами, имеет незначительную недорепликацию в политенных хромосомах дикого типа; 40B – 41A - область, ближе всего расположенная к центромере, в мутантных линиях представлена неструктурированным хроматиновым материалом, с самой низкой плотностью генов, обогащен повторами, нереплицированный участок в политенных хромосомах дикого типа, однако, имеющий небольшие островки реплицированного материала; 41A-41D - участок, который образует поперечно-полосатый рисунок в мутантных линиях с подавлением недорепликации, плотность генов выше, чем в глубоком гетерохроматине, обогащен повторами, имеет выраженную недорепликацию с небольшими участками полной репликации; 41D – 41F - участок, который имеет поперечно-полосатый рисунок во всех линиях, включая дикий тип, но связывает антитела на белки, характерные для гетерохроматина, имеет сниженную плотность генов относительно эухроматина, но повышенную относительно глубокого гетерохроматина, обогащен повторами, имеет незначительную недорепликацию в политенных хромосомах дикого типа.

Прицентромерный гетерохроматин и черные диски имеют общие особенности: поздно реплицируются, недополитенизируются, имеют схожий белковый состав. Степень политении в обеих структурах зависит от экспрессии генов *SuUR* и *Rif1*; имеют общие белки (RCC1, SUUR), что может говорить об общих белковых комплексах. Но также эти структуры различаются в белковом составе, например, H3K9me2 характерен только для прицентромерного гетерохроматина. Исследование этих свойств представляет большой интерес в теоретическом плане.

ВЫВОДЫ

В результате проведенного анализа свойств гетерохроматина хромосом *Drosophila* и наших исследований, мы можем сделать следующие выводы:

1. Впервые прокартированы цитологические границы прицентромерного гетерохроматина второй и третьей хромосом *Drosophila* на физической карте ДНК. В качестве критерия для второй хромосомы стало распределение модификации гистона H3K9me2 и белка HP1 на цитологической и физической картах, для третьей хромосомы - ранее известная локализация вставки pIcon(79D) как по данным FlyBase, так и цитологически. С помощью 26 ДНК-зондов выполнено детальное картирование районов гетерохроматина, и морфологические структуры мутантных линий *SuUR^{ES} Su(var)3-9⁰⁶ Rifl¹* и *Rifl¹* нанесены на физическую карту.

2. Обнаружена сложная ступенчатая организация прицентромерного гетерохроматина политемных хромосом мутантных линий *Drosophila*, в которой каждый блок отличается от соседнего по молекулярному и генетическому составу. Выделены «ступеньки», начиная зоной перехода от типичного эухроматина в одном плече политемной хромосомы до аналогичного участка в другом плече:

- участок, который имеет поперечно-полосатый рисунок во всех линиях, включая дикий тип, имеет сниженную плотность генов относительно эухроматина, имеет незначительную недорепликацию в политемных хромосомах дикого типа;

- участок, который образует поперечно-полосатый рисунок только в мутантных линиях с подавлением недорепликации, плотность генов ниже, чем в эухроматине, имеет выраженную недорепликацию с небольшими участками полной репликации;

- участок, ближе всего расположенный к центромере, в мутантных линиях представлен неструктурированным хроматиновым материалом, с самой низкой плотностью генов, обогащен повторами, практически полностью нереплицируемый участок в политемных хромосомах дикого типа.

3. Ряд белков локализуется одновременно в прицентромерном гетерохроматине и черных дисках политемных хромосом. Мутации с отсутствием белков SUUR и Rifl приводят к восстановлению политемизации в обоих типах структур закрытого хроматина. Это может свидетельствовать об общих механизмах регуляции инактивации генов, локализованных в черных дисках и прицентромерном гетерохроматине.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heitz E. Der bilaterale Bau der Geschlechtschromosomen und Autosomen bei *Pellia fabbronia*, *P. epiphylla* und einigen anderen Jungermanniaceen // Zeitschrift Für Wissenschaftliche Biol. Abteilung E. Planta. 1928. Vol. 5, № 5. P. 725–768.
2. Hoskins R.A. et al. The Release 6 reference sequence of the *Drosophila melanogaster* genome // Genome Res. 2015. Vol. 25, № 3. P. 445–458.
3. Hoskins R.A. et al. Sequence finishing and mapping of *Drosophila melanogaster* heterochromatin // Science (80-.). 2007. Vol. 316, № 5831. P. 1625–1628.
4. Amaral N. et al. Nuclear Dynamics of Heterochromatin Repair // Trends Genet. 2017. Vol. 33, № 2. P. 86–100.
5. Marsano R.M. et al. A New Portrait of Constitutive Heterochromatin: Lessons from *Drosophila melanogaster* // Trends Genet. Elsevier Ltd, 2019. Vol. 35, № 9. P. 615–631.
6. Funikov S.Y. et al. Adaptation of gene loci to heterochromatin in the course of *Drosophila* evolution is associated with insulator proteins // Sci. Rep. Nature Publishing Group UK, 2020. Vol. 10, № 1. P. 11893.
7. Zhimulev I.F. Polytene chromosomes, heterochromatin, and position effect variegation // Adv. Genet. 1998. Vol. 37. P. 1–566.
8. Zenk F. et al. HP1 drives de novo 3D genome reorganization in early *Drosophila* embryos // Nature. Springer US, 2021. Vol. 593, № 7858. P. 289–293.
9. Zykova T.Y. et al. Polytene Chromosomes – A Portrait of Functional Organization of the *Drosophila* Genome // Curr. Genomics. 2018. Vol. 19, № 3. P. 179–191.
10. Zhimulev I.F. Morphology and Structure of Polytene Chromosomes // Adv. Genet. 1996. Vol. 34, № C. P. 1–490.
11. Zhimulev I.F. et al. Genetic organization of interphase chromosome bands and interbands in *Drosophila melanogaster* // PLoS One. 2014. Vol. 9, № 7. P. e101631.
12. Vatolina T.Y. et al. Identification and Molecular Genetic Characterization of the Polytene Chromosome Interbands in *Drosophila melanogaster* // Russ. J. Genet. 2011. Vol. 47, № 5. P. 521–532.
13. Zhimulev I. et al. Developmental and Housekeeping Genes: Two Types of Genetic Organization in the *Drosophila* Genome // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25, № 7. P. 4068.
14. Fillion G.J. et al. Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells // Cell. 2010. Vol. 143, № 2. P. 212–224.
15. Kharchenko P. V et al. Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila* // Nature. 2011. Vol. 471, № 7339. P. 480–485.
16. Milon B. et al. Map of open and closed chromatin domains in *Drosophila* genome // BMC Genomics. 2014. Vol. 15, № 1. P. 988.
17. Belyaeva E.S. et al. *Su(UR)ES*: A gene suppressing DNA underreplication in intercalary and pericentric heterochromatin of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1998. Vol. 95, № 13. P. 7532–7537.
18. Munden A. et al. Rif1 inhibits replication fork progression and controls DNA copy number in *Drosophila* // Elife. 2018. Vol. 7. P. e39140.
19. Kolesnikova T.D. et al. Effects of Mutations in the *Drosophila melanogaster* *Rif1* Gene on the Replication and Underreplication of Pericentromeric Heterochromatin in Salivary Gland Polytene Chromosomes // Cells. 2020. Vol. 9, № 6. P. 1501.
20. Andreyeva E.N. et al. High-resolution analysis of *Drosophila* heterochromatin organization using *SuUR Su(var)3-9* double mutants // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007. Vol. 104, № 31. P. 12819–12824.
21. Saha P. et al. Interplay of pericentromeric genome organization and chromatin landscape regulates the expression of *Drosophila melanogaster* heterochromatic genes // Epigenetics and Chromatin. BioMed Central, 2020. Vol. 13, № 1. P. 41.

22. Joshua S Kaminker et al. The transposable elements of the // Genome. 2002. Vol. 3, № 12. P. 1–20.
23. Rudkin G.T. Non replicating DNA in *Drosophila* // Genetics. 1969. № 61. P. 227–238.
24. Makunin I. V. et al. The *Drosophila* Suppressor of Underreplication Protein Binds to Late-Replicating Regions of Polytene Chromosomes // Genetics. 2002. Vol. 160, № 3. P. 1023–1034.
25. Zhimulev I.F. et al. Influence of the *SuUR* gene on intercalary heterochromatin in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes // Chromosoma. 2003. Vol. 111, № 6. P. 377–398.
26. Semeshin V.F., Belyaeva E.S., Zhimulev I.F. Electron microscope mapping of the pericentric and intercalary heterochromatic regions of the polytene chromosomes of the mutant Suppressor of underreplication in *Drosophila melanogaster* // Chromosoma. 2001. Vol. 110, № 7. P. 487–500.
27. Zhimulev I.F. et al. Intercalary Heterochromatin in *Drosophila* // Chromosoma. 1982. Vol. 87. P. 197–228.
28. Schotta G. et al. Position-effect variegation and the genetic dissection of chromatin regulation in *Drosophila* // Semin. Cell Dev. Biol. 2003. Vol. 14, № 1. P. 67–75.
29. Saha P., Sowpati D.T., Mishra R.K. Epigenomic and genomic landscape of *Drosophila melanogaster* heterochromatic genes // Genomics. Elsevier, 2019. Vol. 111, № 2. P. 177–185.
30. Riddle N.C. et al. Plasticity in patterns of histone modifications and chromosomal proteins in *Drosophila* heterochromatin // Genome Res. 2011. Vol. 21, № 2. P. 147–163.
31. Ohtsubo M., Okazaki H., Nishimoto T. The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA // J Cell Biol. 1989. Vol. 109, № 4. P. 1389–1397.
32. Bischoff F.R., Ponstingl H. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1 // Nature. 1991. Vol. 354, № 6348. P. 80–82.
33. Dasso M. RCC1 in the cell cycle: the regulator of chromosome condensation takes on new roles // Trends Biochem. Sci. 1993. Vol. 18, № 3. P. 96–101.
34. Frasch M. The maternally expressed *Drosophila* gene encoding the chromatin-binding protein BJI is a homolog of the vertebrate gene *Regulator of Chromatin Condensation, RCC1* // EMBO J. 1991. Vol. 10, № 5. P. 1225–1236.
35. Gan M. et al. The Chriz-Z4 complex recruits JIL-1 to polytene chromosomes, a requirement for interband-specific phosphorylation of H3S10 // J. Biosci. 2011. Vol. 36, № 3. P. 425–438.
36. Demakov S.A. et al. Protein composition of interband regions in polytene and cell line chromosomes of *Drosophila melanogaster* // BMC Genomics. BioMed Central Ltd, 2011. Vol. 12, № 1. P. 566.
37. Ashburner M. Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. II. The effects of inhibitors of protein synthesis // Dev. Biol. 1974. № 39. P. 141–157.
38. Lee M.K. et al. Context-Dependent and Locus-Specific Role of H3K36 Methylation in Transcriptional Regulation // J. Mol. Biol. Elsevier Ltd, 2025. Vol. 437, № 1. P. 168796.
39. Moshkin Y.M. et al. Microdissection and sequence analysis of pericentric heterochromatin from the *Drosophila melanogaster* mutant *Suppressor of Underreplication* // Chromosoma. 2002. Vol. 111, № 2. P. 114–125.
40. Andreyeva E.N. et al. Three distinct chromatin domains in telomere ends of polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster* Tel mutants // J. Cell Sci. 2005. Vol. 118, № 23. P. 5465–5477.
41. Gozalo A. et al. Core components of the nuclear pore bind distinct states of chromatin and contribute to Polycomb repression // Mol Cell. 2020. Vol. 77, № 1. P. 67–81.
42. Zhimulev I.F., Belyaeva E.S. Intercalary heterochromatin and genetic silencing //

- BioEssays. 2003. Vol. 25, № 11. P. 1040–1051.
43. James T.C. et al. Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila* // Eur. J. Cell Biol. 1989. Vol. 50, № 1. P. 170–180.
 44. Elgin S.C.R., Reuter G. Position-effect variegation, heterochromatin formation, and gene silencing in *Drosophila* // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2013. Vol. 5, № 8. P. 1–26.
 45. Penke T.J.R. et al. Direct interrogation of the role of H3K9 in metazoan heterochromatin function // Genes Dev. 2016. Vol. 30, № 16. P. 1866–1880.
 46. Nakayama J. et al. Role of Histone H3 Lysine 9 Methylation in Epigenetic Control of Heterochromatin Assembly // Science (80-.). 2001. Vol. 292. P. 110–113.
 47. Hoskins R.A. et al. Heterochromatic sequences in a *Drosophila* whole-genome shotgun assembly. // Genome Biol. 2002. Vol. 3, № 12. P. RESEARCH0085.
 48. Khoroshko V.A. et al. Genes Containing Long Introns Occupy Series of Bands and Interbands In *Drosophila melanogaster* Polytene Chromosomes // Genes (Basel). 2020. Vol. 11, № 4. P. 417.
 49. The modENCODE Consortium et al. Identification of Functional Elements and Regulatory Circuits by *Drosophila* modENCODE // Science (80-.). 2010. Vol. 330, № 6012. P. 1787–1797.
 50. Belyakin S.N. et al. Genomic analysis of *Drosophila* chromosome underreplication reveals a link between replication control and transcriptional territories // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005. Vol. 102, № 23. P. 8269–8274.
 51. Eaton M.L. et al. Chromatin signatures of the *Drosophila* replication program // Genome Res. 2011. Vol. 21, № 2. P. 164–174.
 52. Sher N. et al. Developmental control of gene copy number by repression of replication initiation and fork progression // Genome Res. 2012. Vol. 22, № 1. P. 64–75.
 53. Hoskins R.A. et al. Genome-wide analysis of promoter architecture in *Drosophila melanogaster* // Genome Res. 2011. Vol. 21, № 2. P. 182–192.
 54. Schwaiger M. et al. Chromatin state marks cell-type- and gender-specific replication of the *Drosophila* genome // Genes Dev. 2009. Vol. 23, № 5. P. 589–601.
 55. Bridges P.N. A revised map of the left limb of the third chromosome of *Drosophila melanogaster* // J. Hered. 1941. Vol. 32, № 2. P. 64–66.
 56. Talbert P.B., Henikoff S. Transcribing Centromeres: Noncoding RNAs and Kinetochore Assembly // Trends Genet. 2018. Vol. 34, № 8. P. 587–599.
 57. Chang C.-H. et al. Islands of retroelements are the major components of *Drosophila* centromeres // PLoS Biol. 2019. Vol. 17, № 5. P. e3000241.
 58. Abad J.P. et al. Dodeca satellite: A conserved G+C-rich satellite from the centromeric heterochromatin of *Drosophila melanogaster* // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1992. Vol. 89, № 10. P. 4663–4667.
 59. Kolesnikova T.D. et al. Effects of Mutations in the *Drosophila melanogaster* *Rif1* Gene on the Replication and Underreplication of Pericentromeric Heterochromatin in Salivary Gland Polytene Chromosomes // Cells. 2020. Vol. 9, № 6. P. 3–9.
 60. Kolesnikova T.D., Goncharov F.P., Zhimulev I.F. Similarity in replication timing between polytene and diploid cells is associated with the organization of the *Drosophila* genome // PLoS One. 2018. Vol. 13, № 4. P. e0195207.
 61. Khoroshko V.A. et al. Chromatin Heterogeneity and Distribution of Regulatory Elements in the Late-Replicating Intercalary Heterochromatin Domains of *Drosophila melanogaster* Chromosomes // PLoS One. 2016. Vol. 6, № 11. P. e0157147.

Приложение 1

Локализация антител на белок RCC1 в политенных хромосомах *D. melanogaster* в линии *Rif1*¹

Хр 4	Хр X	Хр 2L	Хр 2R	Хр 3L	Хр 3R	№
101DF	1B1-4	21D1-2	41AE	61C1-2	82EF	1
102D	1E1-4	21E1-2	41F1-3	61F1-4	83D1-5	2
	3A1-4	22A1-3	42A1-2	62A1-2	84A1-2	3
	3C1-6	22B1-2	42B1-3	62B1-2	84A4-5	4
	3DE	22C1-2	43A1-2	62C1-2	84B1-2	5
	4A1-2	22F	43B1-2	62D1-2	84D1-4	6
	4B1-4	23A	44CD	63A1-3	84E1-2	7
	4C1-4	23E1-2	44F1-3	63E1-6	84EF	8
	4D1-2	24D1-2	45A1-2	64C1-5	85A1-6	9
	4E1-2	24E1-2	45C1-4	64D1-6	86A1-8	10
	4F1-4	25A1-4	45D1-2	64E1-2	86B1-2	11
	5A1-8	25E1-2	45E1-2	64F1-2	86C1-2	12
	5D1-6	25F1-2	46A1-2	65A1-6	86D1-5	13
	6A1-2	26A1-2	47A1-2	65B1-2	86E1-8	14
	7B1-2	26CD	47B1-7	65C1-2	87B1-5	15
	7C1-2	26EF	47D1-2	65D1-3	87C1-2	16
	7E1-2	27A	48AB	65E1-4	87D1-5	17
	8A1-2	28C	48C1-2	65E7-9	87E1-2	18
	8B1-4	28D	48D1-2	65F	87F1-2	19
	8C1-2	29D1-2	48E1-2	66A1-2	88A1-2	20
	8E1-4	29EF	49F1-2	66A5-9	88B1-2	21
	9A1-4	30A1-2	50A1-4	67A1-4	88E1-4	22
	9E1-3	30B	50C1-4	67D9-13	89A1-4	23
	10A1-2	31A1-2	51A1-5	67F1-2	89D1-2	24
	10B1-2	32A1-2	51C1-2	68A1-2	89E1-4	25
	11A6-9	32B1-2	51D1-2	68E1-4	90A1-2	26
	11C	32C1-2	51E1-2	69D1-2	90B1-3	27
	11D	32E1-2	53A1-2	69F1-2	90DE	28
	12A1-2	32F1-2	53B1-2	70A1-5	91B1-4	29
	12D1-2	33A1-2	54AB	70C1-2	91D1-2	30
	12E1-8	33CD	55A1-4	70DE	92A1-2	31
	12F1-2	33F1-2	55C1-5	71A1-2	92B1-2	32
	13A1-2	34A1-2	56AB	71C1-2	92C1-2	33
	13B1-4	34EF	56F1-10	71F1-2	92D1-2	34

	13C1-2	35AB	57A1-4	72A1-2	92E1-2	35
	13D1-2	35C	57B1-6	72E1-2	92F1-2	36
	14A1-2	35D1-4	58A1-4	73A1-4	93A1-5	37
	14B1-4	35E1-2	59A1-3	74A1-6	93B1-3	38
	14D1-2	35F	59C1-2	75A1-2	93E1-4	39
	15B1-2	36C1-2	59D1-4	75C1-2	93F9-10	40
	15D1-2	36D1-2	60CD	76A1-4	94A1-5	41
	16A1-9	36E1-4	60E	76EF	94D1-4	42
	16D1-2	37A1-2	60F1-3	77A	95A1-10	43
	16F1-4	37D1-2		77E1-4	96A1-2	44
	17A1-5	38A1-2		78A1-2	96C1-2	45
	17B1-2	38C1-2		79D1-2	96D1-2	46
	17C1-3	38E1-2		79E1-4	96E1-2	47
	17D1-2	39B1-2		80AC	97A1-6	48
	18A1-3	39DE			97B1-4	49
	18C1-4	40A1-2			98A1-3	50
	19A1-4	40C1-2			98B1-2	51
	19C1-2				98C1-2	52
	19E1-4				98D1-2	53
					98E1-2	54
					99A1-2	55
					99B1-4	56
					99E1-3	57
					99F1-2	58
					100A1-2	59
					100B1-2	60
					100B4-5	61
					100C1-5	62
					100F1-2	63
Σ 2	Σ 53	Σ 51	Σ 43	Σ 48	Σ 63	

Приложение 2

Плотность генов в областях эухроматина и прицентромерного гетерохроматина
третьей хромосомы

Регионы на физической карте (FlyBase R5)	Количество генов	Длина ДНК, Мб	Плотность (количество генов на 1Мб)
Дистальнее pIcon(79D)	234	1,8	130
Между pIcon(79D) и CkII/Vps	91	0,8	114
Между CkII/Vps и mRsp5	31	1,4	22,1
3LHet	26	2,6	10
3RHet	21	2,5	8,4
Дистальнее CG12581	360	2,5	144

Регионы на физической карте (FlyBase R6)	Количество генов	Длина ДНК, Мб	Плотность (количество генов на 1Мб)
Дистальнее pIcon(79D)	441	2,7	163,3
Между pIcon(79D) и CkII/Vps	109	0,9	121,1
Между CkII/Vps и mRsp5	25	1,4	17,9
Между mRsp5 и CG17514	35	3,6	9,7
Между Myo81F и Gfat1	17	4,1	4,1
Между Gfat1 и CG12581	2	0,04	50
Дистальнее CG12581	634	4,1	154,6

Приложение 3

Плотность генов в областях эухроматина и прицентромерного гетерохроматина
третьей хромосомы

Регионы на физической карте (FlyBase R5)	Количество генов	Длина ДНК, Мб	Плотность (количество генов на 1Мб)
Дистальнее prk13	283	2	141,5
Между prk13 и tsh	204	0,7	291,4
Проксимальнее tsh	67	1,2	55,8
2LHet	6	0,4	15
2RHet	25	3,3	7,6
Проксимальнее vlc	54	1,6	33,8
Между vlc и jing	59	0,9	65,6
Дистальнее jing	364	2	182

Регионы на физической карте (FlyBase R6)	Количество генов	Длина ДНК, Мб	Плотность (количество генов на 1Мб)
Дистальнее prk13	283	2	141,5
Между prk13 и tsh	207	0,7	295,7
Между tsh и lt	61	1,1	55,5
Проксимальне lt	12	0,6	20
Проксимальне rl	5	1,1	4,5
Между rl и vlc	76	4,6	16,5
Между vlc и jing	59	0,9	65,6
Дистальнее jing	359	2	179,5



Отчет о проверке

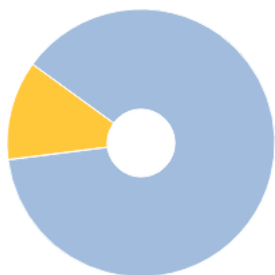
Автор: Мирошниченко Светлана Константиновна

Проверяющий: Мирошниченко Светлана Константиновна

Название документа: Мальцева, аспирант 4 курса_wr

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ

Тариф: FULL



Совпадения:
0%



Оригинальность:
87,87%



ИИ-контент:
0%



Цитирования:
0%



Самоцитирования:
12,13%



«Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирования», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует проверенному тексту документа.

Проверено: 90,02% текста документа, исключено из проверки: 9,98% текста документа. Разделы и элементы, отключенные пользователем: Библиография, Таблицы

- Совпадения** — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.
- Самоцитирования** — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» — это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.
- Цитирования** — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы; библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.
- Текстовое пересечение** — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
- Источник** — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
- Оригинальный текст** — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

Номер документа: 7

Тип документа: Не указано

Дата проверки: 07.09.2026 12:28:41

Дата корректировки: 08.09.2026 08:35:21

Количество страниц: 53

Символов в тексте: 87775

Слов в тексте: 11525

Число предложений: 888

Комментарий: не указано

ПАРАМЕТРЫ ПРОВЕРКИ

Выполнена проверка с учетом редактирования: Да

Выполнено распознавание текста (OCR): Нет

Выполнена проверка с учетом структуры: Да

Разделы и элементы, отключенные пользователем: Библиография, Таблицы

Модули поиска: Перефразирования по базе публикаций открытого доступа PubMed, Патенты СССР, РФ, СНГ, Коллекция НБУ, Профессиональная лексика. Медицина, ИПС Адилет, IEEE, Переводные заимствования, Профессиональная лексика. Юриспруденция, Профессиональная лексика. АПК и биотех, СПС ГАРАНТ: аналитика, Сводная коллекция научных работ Беларуси, Перефразирования по коллекции IEEE, Шаблонные фразы, Рувики, Цитирование, Перефразирования по Коллекции открытых публикаций международных издательств, СМИ России и СНГ, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Кольцо вузов, Сводная коллекция ЭБС, Публикации eLIBRARY, Публикации РГБ, PubMed, Коллекция открытых публикаций международных издательств, Медицина, Кольцо вузов (переводы и перефразирования), Коллекция INVENTORUS, Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика, Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования), Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика, Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Переводные заимствования IEEE, Публикации РГБ (переводы и перефразирования), Переводные заимствования по Коллекции открытых публикаций международных издательств, Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Переводные заимствования по базе публикаций открытого доступа PubMed, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Интернет Плюс Онлайн

ИСТОЧНИКИ

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарий
[01]	16,48%	0%	Мальцева_19425	25 Мая 2021	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[02]	12,71%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	25 Янв 2023	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	Источник исключен. Причина: Другое. Автор работы является автором публикации
[03]	12,13%	12,13%	Мальцева_19425	25 Мая 2021	Кольцо вузов	Тип источника изменен с "совпадение" на "самоцитирование". Причина: Автор документа является автором источника.
[04]	3,07%	0%	Дипломная работа_Туртапкина В...	16 Мая 2025	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Библиография определена неверно.
[05]	2,78%	0%	Дипломная работа_Туртапкина В...	16 Мая 2025	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[06]	1,73%	0%	Консервативный белок RCC1 – но... http://elibrary.ru	01 Янв 2023	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[07]	1,57%	0%	PDF https://mcb.nsc.ru	22 Ноя 2022	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[08]	1,39%	0%	Хорошко, Варвара Андреевна Ло... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2022	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[09]	1,36%	0%	Консервативный белок RCC1 – но... http://elibrary.ru	01 Янв 2023	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[10]	1,25%	0%	Довгань_19427_магистерская — к...	28 Мая 2021	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[11]	1,18%	0%	PDF https://mcb.nsc.ru	22 Ноя 2022	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[12]	1,1%	0%	https://www.mcb.nsc.ru/sites/mcb.... https://mcb.nsc.ru	25 Фев 2025	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[13]	1,08%	0%	Хорошко, Варвара Андреевна Ло... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2022	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[14]	1,02%	0%	Колесникова, Татьяна Дмитриев... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2005	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[15]	1,01%	0%	Белякин, Степан Николаевич Ген... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2005	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.

[16]	0,87%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	07 Фев 2025	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[17]	0,86%	0%	Сидоренко, Дарья Сергеевна Мо... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2019	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[18]	0,86%	0%	Сидоренко, Дарья Сергеевна Мо... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2019	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[19]	0,85%	0%	Сидоренко, Дарья Сергеевна Мо... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2019	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[20]	0,85%	0%	PDF https://mcb.nsc.ru	22 Янв 2020	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[21]	0,81%	0%	Хорошко, Варвара Андреевна Ло... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2022	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[22]	0,8%	0%	The Organization of Pericentromeri... https://platform.inventorus.ru	20 Окт 2021	Коллекция INVENTORUS	Источник исключен. Причина: Библиография определена неверно.
[23]	0,8%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	25 Янв 2023	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Библиография определена неверно.
[24]	0,79%	0%	Сидоренко, Дарья Сергеевна Мо... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2019	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[25]	0,68%	0%	https://www.mcb.nsc.ru/sites/mcb.... https://mcb.nsc.ru	30 Окт 2019	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[26]	0,65%	0%	не указано	11 Мар 2026	Шаблонные фразы	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[27]	0,57%	0%	ВКР_Марусов	15 Мая 2026	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Библиография определена неверно.
[28]	0,55%	0%	Хорошко, Варвара Андреевна Ло... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2022	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[29]	0,55%	0%	PDF https://mcb.nsc.ru	22 Ноя 2022	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[30]	0,52%	0%	Для прессы Институт химической... http://niboch.nsc.ru	14 Сен 2024	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[31]	0,48%	0%	Вассерлауф, Ирина Эгоновна Мо... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2023	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[32]	0,45%	0%	Characteristic of the active substan... https://platform.inventorus.ru	28 Окт 2020	Коллекция INVENTORUS	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[33]	0,42%	0%	https://www.mcb.nsc.ru/sites/mcb.... https://mcb.nsc.ru	25 Фев 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[34]	0,42%	0%	Abstracts_Chkr_2023.pdf https://mcb.nsc.ru	19 Сен 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[35]	0,42%	0%	Abstracts_Chkr_2023.pdf https://istina.msu.ru	22 Мар 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[36]	0,39%	0%	Капуцак, Ярослав Кириллович С... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2026	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[37]	0,39%	0%	Special Issue "Drosophila: A Versati... https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov	19 Июл 2026	PubMed	Источник исключен. Причина: Библиография определена неверно.
[38]	0,36%	0%	Трансформация государственной... https://directmedia.ru	01 Янв 2026	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[39]	0,31%	0%	В процессах регулирования тран... http://elibrary.ru	01 Янв 2023	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[40]	0,29%	0%	АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ ... http://elibrary.ru	27 Фев 2014	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	0,27%	0%	не указано https://platform.inventorus.ru	22 Ноя 2024	Коллекция INVENTORUS	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[42]	0,26%	0%	Лаборатория биоорганической х... http://niboch.nsc.ru	09 Фев 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[43]	0,24%	0%	https://pureportal.spbu.ru/files/10... https://pureportal.spbu.ru	23 Фев 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[44]	0,23%	0%	ВЛИЯНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ЖИЗН...	03 Июн 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[45]	0,22%	0%	https://pureportal.spbu.ru/files/11... https://pureportal.spbu.ru	07 Фев 2025	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[46]	0,22%	0%	Диссертация Глинских АВ	06 Июн 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[47]	0,21%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	12 Янв 2023	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[48]	0,21%	0%	Effects of Mutations in the Drosoph... https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov	19 Июн 2020	Переводные заимствования по базе публикаций открытого доступа PubMed	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[49]	0,2%	0%	«База молекулярно-генетических...» https://fips.ru	27 Апр 2026	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[50]	0,2%	0%	«База клинико-лабораторных да...» https://fips.ru	27 Апр 2026	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[51]	0,2%	0%	RU 2014620509 https://fips.ru	13 Мая 2026	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	0,2%	0%	СПОСОБ ПРОВЕДЕНИЯ ПРЕНАТАЛ... https://fips.ru	04 Апр 2026	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	0,2%	0%	«База молекулярно-генетических...» https://fips.ru	27 Апр 2026	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[54]	0,2%	0%	Список кавалеров ордена Алекса... https://ru.ruwiki.ru	18 Фев 2026	Рувики	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	0,2%	0%	Три бердских предприятия назва... http://berdsk.bezformata.ru	07 Апр 2014	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	0,2%	0%	Распоряжение Правительства РФ... http://ivo.garant.ru	23 Окт 2019	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[57]	0,2%	0%	Распоряжение Правительства РФ... http://ivo.garant.ru	27 Авг 2018	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	0,2%	0%	Постановление Президиума Росс... http://ivo.garant.ru	18 Ноя 2021	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	0,2%	0%	Распоряжение Правительства РФ... http://ivo.garant.ru	01 Фев 2025	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	0,2%	0%	Абдурахманова Мария Маджидо...	11 Янв 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	0,2%	0%	Формирование подходов к оценк... https://book.ru	01 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[62]	0,2%	0%	Метастатический гормончувстви... http://elibrary.ru	01 Янв 2025	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	0,2%	0%	ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛА РАЗВИТИ... http://elibrary.ru	01 Янв 2025	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[64]	0,2%	0%	Кечин, Андрей Андреевич Разра... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2018	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[65]	0,2%	0%	Time course of fluorescent-labelled... https://openalex.org	03 Июн 2024	Коллекция открытых публикаций международных издательств	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	0,2%	0%	Pharmacokinetic assessment of tw... https://openalex.org	19 Дек 2025	Коллекция открытых публикаций международных издательств	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[67]	0,2%	0%	T. 2 part#1 http://emll.ru	08 Июл 2017	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[68]	0,2%	0%	ASSOCIATION OF SNP <i>g>CYP2... https://platform.inventorus.ru	13 Июл 2022	Коллекция INVENTORUS	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[69]	0,2%	0%	publication_200.pdf https://my.bsu.ru	17 Апр 2025	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[70]	0,19%	0%	диплом Аллаярова Элина	20 Мая 2025	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[71]	0,19%	0%	https://drosatchina2017.ru/image... https://drosatchina2017.ru	24 Фев 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[72]	0,19%	0%	https://pureportal.spbu.ru/files/11... https://pureportal.spbu.ru	07 Фев 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[73]	0,19%	0%	https://drosgatchina2017.ru/image... https://drosgatchina2017.ru	09 Фев 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[74]	0,19%	0%	Зачем нужна репарация ДНК, что... http://novosibirsk.bezformata.com	22 Окт 2018	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[75]	0,19%	0%	Зачем нужна репарация ДНК, что... http://novosibirsk.bezformata.com	22 Окт 2018	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[76]	0,18%	0%	«Нобель» за ремонт ДНК http://academcity.org	08 Окт 2015	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[77]	0,18%	0%	Эксклюзивное лекарство против ... http://gorodskoyportal.ru	22 Июл 2016	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[78]	0,14%	0%	Concept of natural genome reconst... https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov	01 Апр 2026	PubMed	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[79]	0,14%	0%	The effects of Non3 mutations on c... https://platform.inventorus.ru	03 Июн 2025	Коллекция INVENTORUS	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[80]	0,14%	0%	Зыкова, Татьяна Юрьевна Характ... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2011	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[81]	0,13%	0%	Способ дифференциальной диаг... https://fips.ru	07 Апр 2026	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[82]	0,13%	0%	ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФНЫ...	12 Мая 2026	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[83]	0,13%	0%	Вестник гематологии. Том IX. № 2... http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[84]	0,13%	0%	Молекулярная биология. 2017. Т. ... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[85]	0,13%	0%	The effect of dimeric bisbenzimidaz... https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov	01 Дек 2025	PubMed	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[86]	0,13%	0%	Differentiation of subgenomes in S... https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov	01 Июл 2026	PubMed	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[87]	0,13%	0%	Oncolytic viruses as promising age... https://openalex.org	13 Янв 2026	Коллекция открытых публикаций международных издательств	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[88]	0,13%	0%	Всероссийская научно-практичес... http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[89]	0,03%	0%	не указано	06 Мая 2026	Профессиональная лексика. Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ им. Д. Г. Кнорре СИБИРСКОГО
ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчёт о проверке текста научно-квалификационной работы на
объём заимствования

Мальцева Мария Витальевна

«Молекулярно-генетическая организация инактивированных районов
хромосом *Drosophila melanogaster*»

Оригинальность работы составляет 87.87%, что соответствует требованиям
порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на
заседании Итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь АК – к.б.н. С.К. Мирошниченко