

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

СИДОРЕНКО ДАРЬЯ СЕРГЕЕВНА

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

Молекулярно-генетическая организация
политенных хромосом *Drosophila melanogaster*

Направление подготовки

06.06.01 Биологические науки

Направленность

03.01.07 Молекулярная генетика

Новосибирск–2019

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

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

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

неприменимы для точного соотнесения дисков и междисков политенных хромосом с физическими геномными координатами [Zhimulev et al., 2014].

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

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

Детальной общепризнанной цитологической карты четвёртой хромосомы на данный момент не существует. Это связано со сложностями работы с данной хромосомой на цитологическом уровне, обусловленными маленькими размерами хромосомы, большим количеством рыхлых серых дисков и загибанием её дистального конца с образованием эктопических контактов с хромоцентром. Четвёртая хромосома была выбрана объектом изучения, поскольку обладает рядом уникальных свойств. С одной стороны, плотность генов политенизированной части данной хромосомы соответствует эухроматину. В то же время, она обладает свойствами гетерохроматина, такими как отсутствие рекомбинации и, как следствие, высокая плотность повторённых последовательностей ДНК, и наличие белка гетерохроматина HP1 [Riddle, Shaffer, Elgin, 2009]. Кроме того, хроматин четвёртой хромосомы содержит уникальные в геноме дрозофилы белки POF [Larsson et al., 2001] и dSETDB1 [Seum et al., 2007].

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

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

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

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

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

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

Положения, выносимые на защиту:

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

Исследован хроматиновый состав и генетическая организация каждой цитологической структуры данной хромосомы, в результате чего показано, что по сравнению с остальным геномом, четвёртая хромосома содержит вдвое меньше компактного «*ruby*» хроматина и не содержит крупных чёрных дисков интеркалярного гетерохроматина, междиски содержат «*aquamarine*» хроматин и 5' концы повсеместно активных генов, а серые диски содержат «*lazurite*» хроматин и кодирующие части этих генов.

Построена функциональная карта четвёртой хромосомы, сочетающая в себе локализацию в геноме дисков и междисков, генов, белков, мобильных элементов и регуляторных элементов генома. Белки POF и HP1a, обеспечивающие особую организацию этой хромосомы, преимущественно локализованы в «aquamarine» (междиски) и «lazarite» (серые диски). Модифицированный гистон H3K27me3 обогащён в «guby» хроматине. Сайты гиперчувствительности к ДНКазе I, белок ORC2 и *P*-элементы преимущественно локализованы в «открытом» «aquamarine» хроматине, в то время как элемент *1360*, специфичный для четвёртой хромосомы, занимает «дисковые» типы хроматина. Несмотря на особенности четвёртой хромосомы, её дисковая организация в целом соответствует организации остального генома *D. melanogaster*.

Апробация работы. Результаты данной работы обсуждались на научных конференциях и опубликованы в тезисах:

1. Zhimulev I. F., Zyкова T. Yu., Goncharov F. P., Khoroshko V. A., Demakova O. V., Semeshin V. F., Pokholkova G. V., Boldyreva L. V., **Demidova D. S.**, Levitsky V. G., Belyaeva E. S. Genetic organization of interphase chromosome bands and interbands in *Drosophila melanogaster* // 20th International Chromosome Conference (ICC) Univ Kent, Canterbury, ENGLAND. // Chromosome Research. – 2015 – V. 23. – №. 2. – P. 409-410.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю, академику РАН, д.б.н., проф. Игорю Фёдоровичу Жимулёву за помощь на всех этапах выполнения работы, д.б.н. Сергею Анатольевичу Демакову, к.б.н. Татьяне Дмитриевне Колесниковой, к.б.н. Татьяне Юрьевне Зыковой за помощь в работе и обсуждение результатов, Фёдору Павловичу Гончарову и Ивану Алексеевичу Сидоренко за помощь в биоинформатическом анализе данных, PhD, проф. Яну Ларссону за обсуждение работы и любезно предоставленные антитела к белку POF, а также всем сотрудникам Лаборатории хромосомной инженерии и Лаборатории молекулярной цитогенетики ИМКБ СО РАН за постоянную поддержку.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В данной работе использовалась линия дрозофилы генотипа $\widehat{XY}\widehat{XY}/\widehat{XY}$; $y w$; $SuUR^{ES}$, $Su(var)3-9^{06}$ со сниженной недорепликацией политенных хромосом для лучшего расправления четвёртой хромосомы на препаратах. Для сопоставления молекулярной и цитологической карт четвёртой хромосомы была использована модель четырёх состояний хроматина [Zhimulev et al., 2014; Boldyreva et al., 2017]. Данная модель классифицирует хроматин дрозофилы на четыре дискретных состояния. Хроматин «aquamarine» занимает около 13% генома и обогащен белками «открытого» хроматина. Междиски, ранее локализованные на физической карте генома, представлены этим типом хроматина. Хроматин «tuby» занимает почти половину генома и полностью лишён белков «открытого» хроматина. Он соответствует чёрным дискам и дискам ИГХ. «malachite» и «lazurite» не демонстрируют специфики относительно «модельных» белков «открытого» хроматина; они часто соответствуют серым дискам. Были применены такие методы, как флуоресцентная ДНК/ДНК *in situ* гибридизация (FISH), полимеразная цепная реакция, выделение геномной ДНК из целых мух, электрофорез ДНК в агарозном геле, очистка ДНК из раствора переосаждением, мечение ДНК методом статистической затравки с использованием напрямую меченых флуорохромами dNTP, иммуноокрашивание политенных хромосом, анализ препаратов политенных хромосом при помощи световой и эпифлуоресцентной микроскопии, обработка изображений при помощи пакета программ Adobe, биоинформатический анализ полногеномных данных по распределению белков и регуляторных элементов генома.

Результаты

На данный момент не существует детальной общепризнанной цитологической карты четвёртой хромосомы. Большое количество промежуточных по уровню компактизации серых дисков, маленький размер данной хромосомы и эктопические контакты дистального конца с хромоцентром затрудняют анализ дискового рисунка четвёртой хромосомы. В данной работе проведено картирование политенизированной части правого плеча четвёртой хромосомы 101E–102F. Результаты сравнивали с электронно-микроскопической фотографией В. Ф. Семешина, картами К. Бриджеса и подписями дисков из работы [Saura et al., 2002]. Картирование выполняли при помощи 38 FISH зондов, зонды подбирали в соответствии с моделью четырёх типов хроматина [Zhimulev et al., 2014]. Пример FISH показан на рисунке 1.

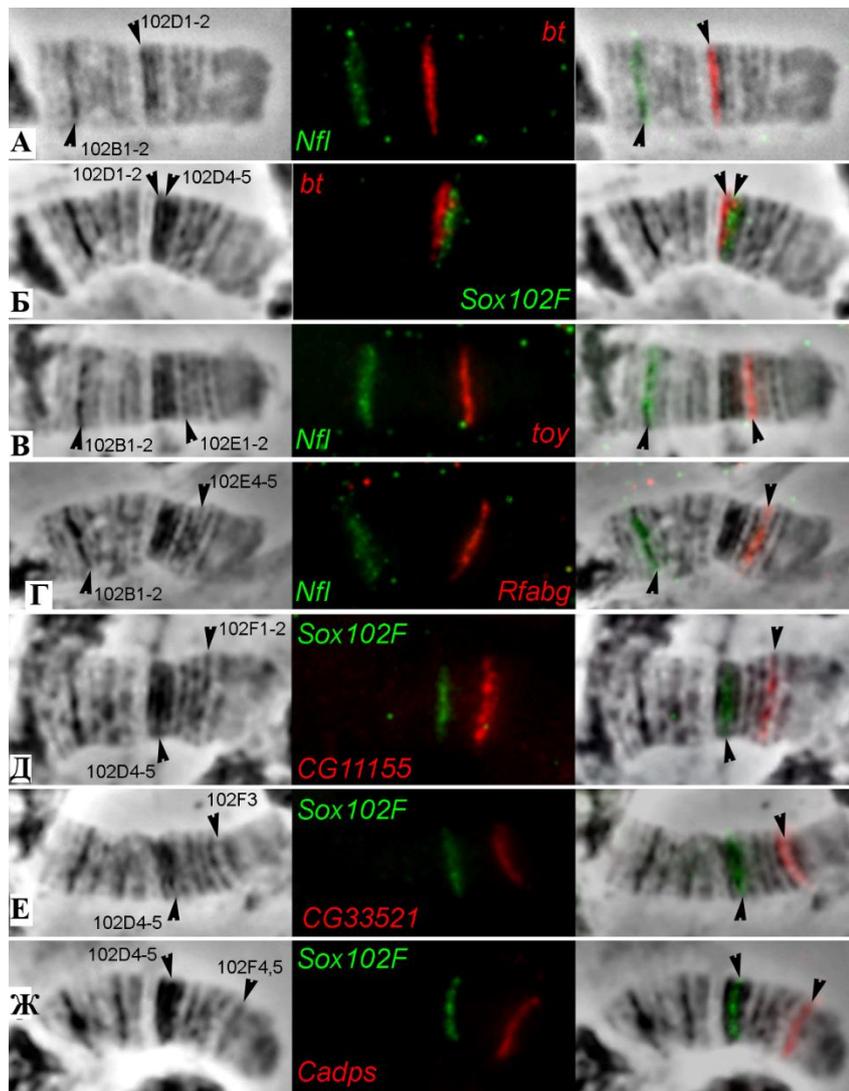


Рисунок 1. FISH на четвёртой политенной хромосоме. Зонды из дисков, предсказанных моделью четырёх типов хроматина [Zhimulev et al., 2014]. Слева направо: фазово-контрастная микрофотография четвёртой хромосомы, совмещённые FISH сигналы и их наложение. Красные сигналы соответствуют зондам, меченым флуорохромом TAMRA, зелёные – флуорохромом Fluorescein. Стрелками показаны зонды: **А** – *NfI* в диске 102B1-2, *bt* в диске 102D1-2; **Б** – *bt* в диске 102D1-2, *Sox102F* в диске 102D4-5; **В** – *NfI* в диске 102B1-2, *toy* в диске 102E1-2; **Г** – *NfI* в диске 102B1-2, *Rfabg* в диске 102E4-5; **Д** – *Sox102F* в диске 102D4-5, *CG11155* в диске 102F1-2; **Е** – *Sox102F* в диске 102D4-5, *CG33521* в диске 102F3; **Ж** – *Sox102F* в диске 102D4-5, *Cadps* в диске 102F4,5.

Суммарные результаты гибридизации 38 зондов нанесены на карту К. Бриджеса (Рисунок 2). Результаты локализации зондов в структурах политенной четвёртой хромосомы позволили привязать цитологическую карту к определённым фрагментам молекулярно-генетической карты. Была построена функциональная карта, сочетающая в себе локализацию в геноме типов хроматина, дисков и междисков, генов, белков и регуляторных элементов генома. Пример фрагмента такой карты показан на рисунке 3.

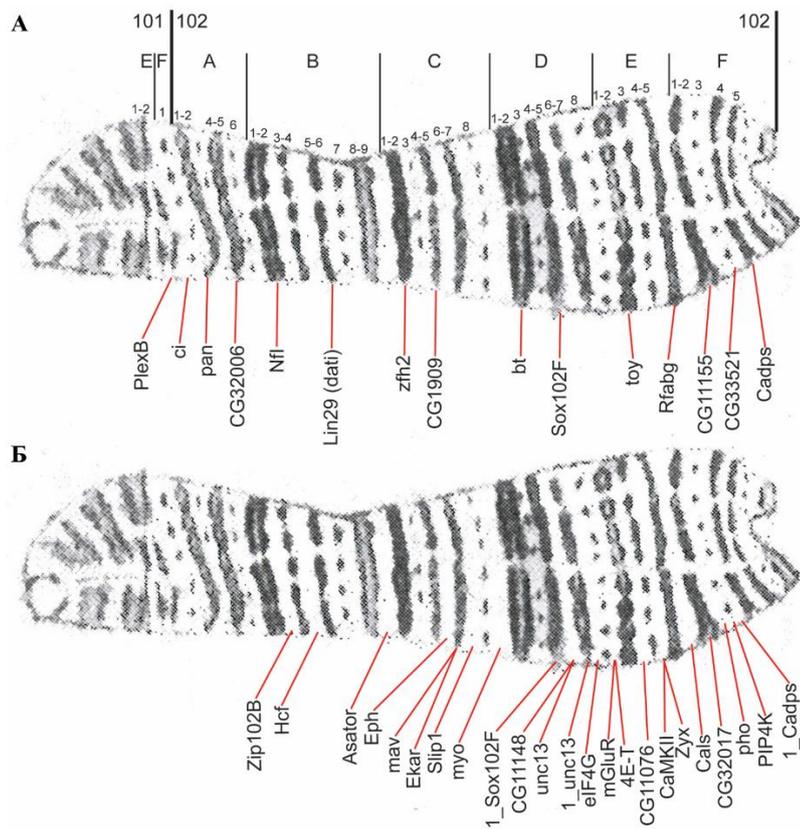


Рисунок 2. Схема локализации зондов в четвёртой хромосоме, нанесённая на карту К. Бриджеса [Bridges, 1935]. **А** – Зонды из дисков, предсказанных моделью четырёх типов хроматина. **Б** – Зонды из междисков, предсказанных моделью четырёх типов хроматина [Zhimulev et al., 2014].

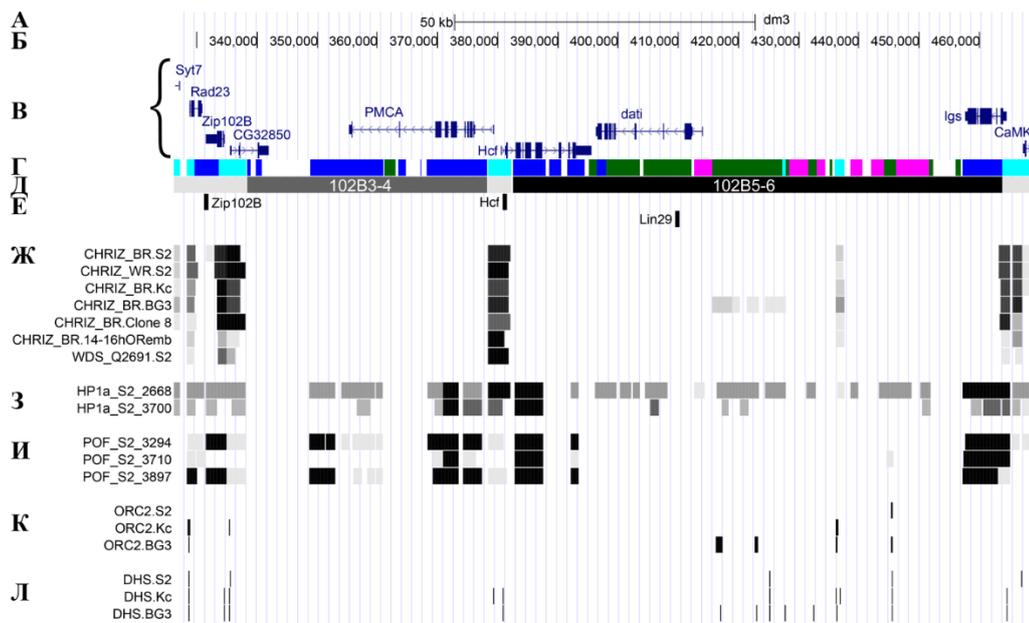


Рисунок 3. Функциональная карта района 102B3-4 – 102B5-6 четвёртой хромосомы: **А** – шкала масштаба (т.п.н.); **Б** – геномные координаты (п.н.); **В** – гены; **Г** – модель четырёх типов хроматина; цвета соответствуют названиям типов [Zhimulev et al., 2014; Boldyreva et

al., 2017]; Д – диски (с номерами) и междиски. Чёрный «guby»-содержащий диск – чёрный прямоугольник, серый диск – тёмно-серый прямоугольник, междиски – светло-серые прямоугольники. Е – FISH зонды; Ж – белки CHRIZ и WDS в разных типах клеток (modENCODE).

Из рисунка 3 видно, что междиски 102B1-2/B3-4, 102B3-4/B5-6 и 102B5-6/B7 представлены, в основном, «aquamarine» хроматином, содержат 5' концы генов и небольшие гены целиком, а также белки «открытого» хроматина CHRIZ и WDS. Серый диск 102B3-4 состоит преимущественно из хроматина «lazarite» и имеет размер ~40 т.п.н. Занят полностью структурными частями генов, 5' концы которых расположены во фланкирующих междисках. Крупный чёрный диск 102B5-6 содержит три гена, представлен, в основном, плотным «malachite» и «guby» хроматином, имеет размер ~81 т.п.н. По краям к диску присоединены домены «lazarite» хроматина, содержащие структурные части повсеместно активных генов, входящих из фланкирующих междисков. За счёт объединения серединной плотной области диска из «guby» и «malachite» хроматина с краевым «lazarite» хроматином, который должен соответствовать серым дискам, размер диска существенно увеличивается. Характерные для четвёртой хромосомы белки HP1a и POF преимущественно локализуются в типах хроматина, соответствующих междискам и серому диску 102B3-4 и практически отсутствуют в чёрном диске 102B5-6. Сайты связывания белка комплекса инициации репликации ORC2 и сайты гиперчувствительности к ДНКазе I, в основном, находятся в междисках.

Таким образом была проанализирована вся четвёртая хромосома и определены геномные координаты её цитологических структур. На рисунке 4 показан хроматиновый состав всех типов морфологических структур данной хромосомы. Кроме того, исследована генетическая организация структур четвёртой хромосомы (Рисунок 5). Показано, что 26 междисков четвёртой хромосомы содержат, в основном, «aquamarine» хроматин и соответствуют 5' концам повсеместно активных генов, 16 серых дисков преимущественно представлены «lazarite» хроматином и обогащены кодирующими частями этих генов, 11 чёрных дисков содержат большую часть «guby» хроматина, а также «malachite» и «lazarite»; кодирующие части и целые гены с более узким профилем экспрессии.

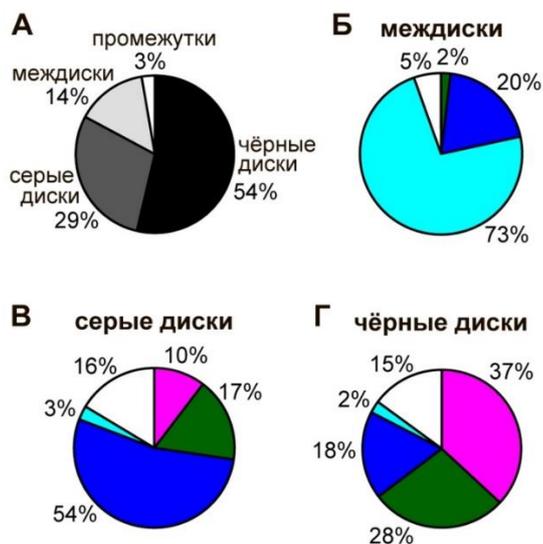


Рисунок 4. Морфологический и хроматиновый состав четвёртой хромосомы. **А** – Доли, занимаемые дисками и междисками в четвёртой хромосоме. Здесь и далее цвета на диаграмме соответствуют морфологическим структурам, белые секции соответствуют промежуткам, которые не были включены в диски или междиски. Хроматиновый состав: **Б** – междисков; **В** – серых дисков; **Г** – чёрных дисков четвёртой хромосомы.

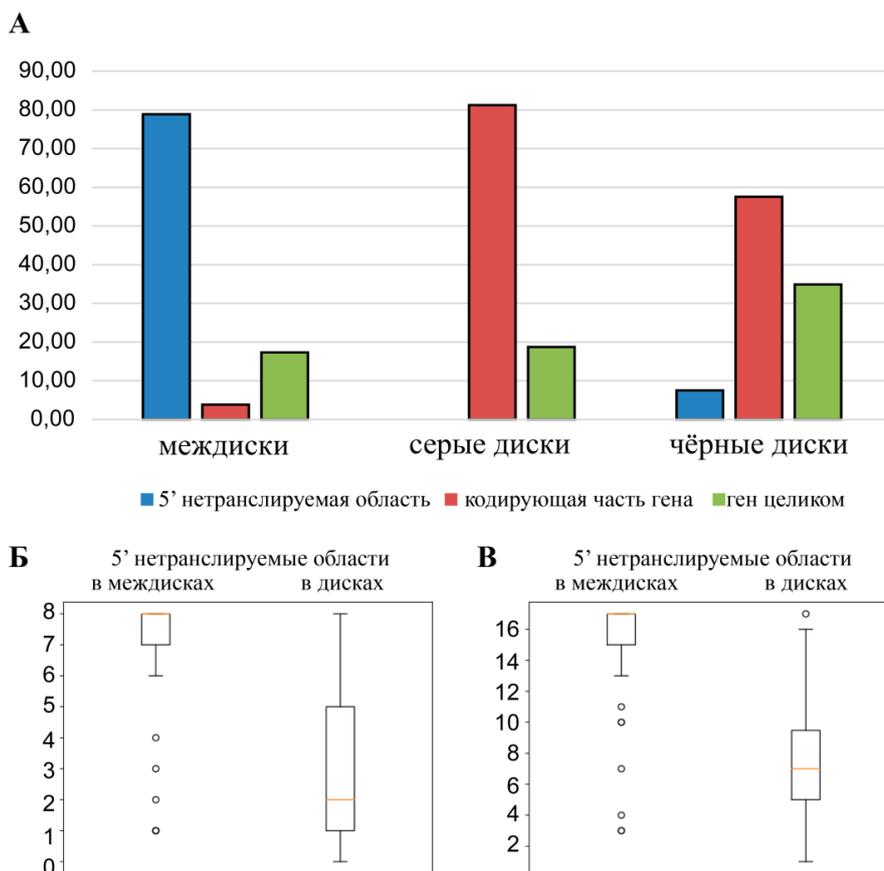


Рисунок 5. Генетическая организация доменов четвёртой хромосомы и экспрессия генов. **А** – Обогащение частей генов в структурах четвёртой хромосомы **Б** – Количество тканей личинки, в которых экспрессируются гены четвёртой хромосомы **В** – Количество тканей имаго, в которых экспрессируются гены четвёртой хромосомы [Chintapalli, Wang, Dow, 2007].

Благодаря привязке цитологических структур четвёртой политенной хромосомы к физической карте генома, мы получили возможность исследовать организацию дисков и междисков с использованием данных полногеномных проектов. В частности, было исследовано распределение нескольких белков в культурах клеток и в слюнных железах. Белки HP1a и POF в S2 клетках локализованы в последовательностях, соответствующих междискам и серым дискам и «aquamarine» и «lazarite» хроматину. В слюнных железах для POF результаты идентичны (Рисунок 6).

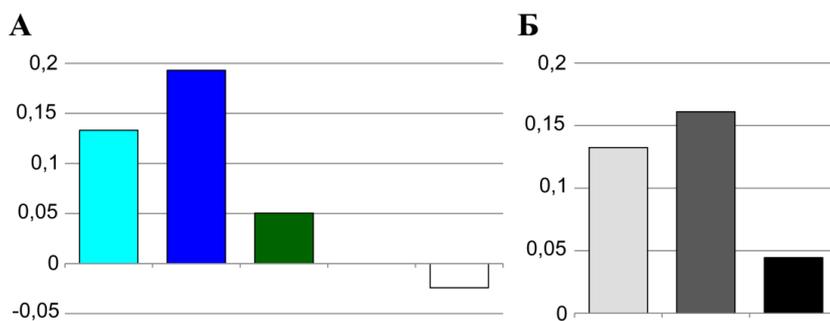


Рисунок 6. Распределение белка POF в четвёртой хромосоме в клетках слюнных желёз личинок *D. melanogaster* [Lundberg et al., 2013; Johansson, Larsson, 2014]: **А** – относительно дисков и междисков и **Б** – относительно доменов хроматина четырёх типов [Zhimulev et al., 2014]. Показано значение медианы пиков ChIP профилей для каждого типа доменов.

Для того, чтобы выяснить, как белки «открытого» хроматина POF и CHRIZ расположены относительно друг друга в структурах четвёртой хромосомы, было выполнено одновременное иммуноокрашивание ПХ *Drosophila* антителами к этим белкам (Рисунок 7). На хорошо растянутой политенной четвёртой хромосоме показано, что CHRIZ занимает все междиски четвёртой хромосомы, кроме 102B5-6/B7 (отмечен звёздочкой на Рисунке 7); антитела к CHRIZ также окрашивают рыхлый серый теломерный конец данной хромосомы. Белок POF локализован в некоторых междисках и серых дисках четвёртой хромосомы и только частично перекрывается с CHRIZ. Интересно, что междиск 102B5-6/B7 также не окрашивается антителами к белку POF, однако причины, лежащие в основе этого явления, ещё предстоит выяснить. Оба исследованных белка отсутствуют в прицентромержной области четвёртой хромосомы. Таким образом, на цитологическом уровне белки POF и CHRIZ занимают сайты «открытого» хроматина четвёртой хромосомы и только частично колокализуются.

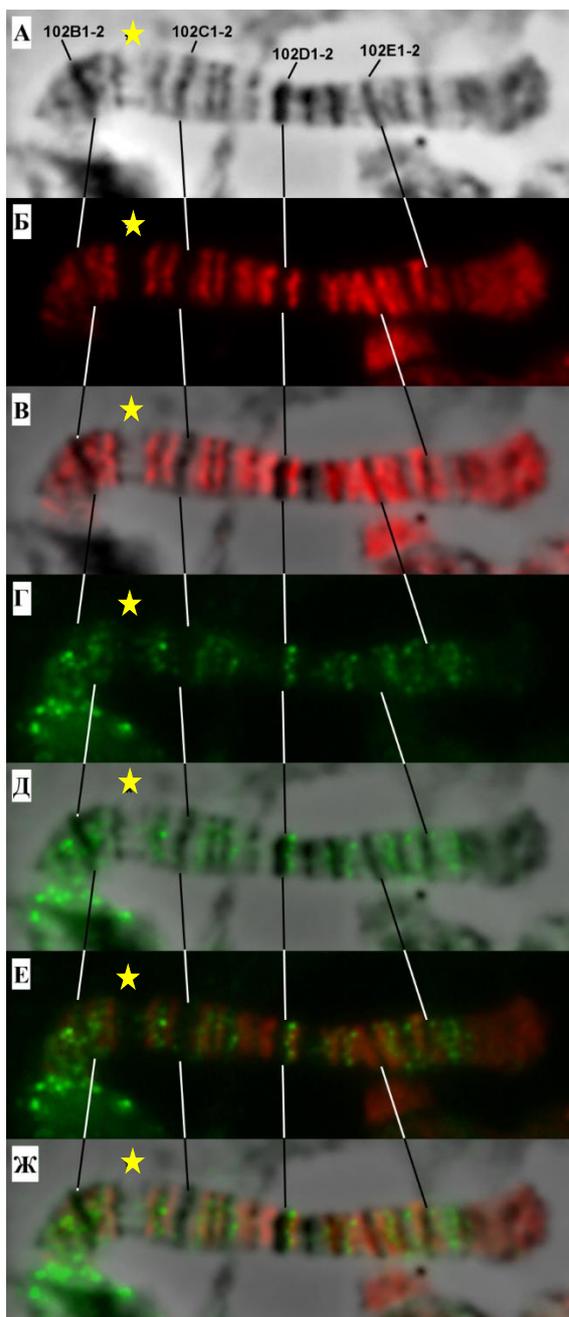


Рисунок 7. Локализация POF и CHRIZ на политенной четвёртой хромосоме *D. melanogaster*. **А** – Фазово-контрастное изображение четвёртой хромосомы. **Б** – Окрашивание CHRIZ [a/т: Gortchakov et al., 2005]. **В** – Совмещённые фазовый контраст и окрашивание CHRIZ. **Г** – Окрашивание POF [a/т: Larsson et al., 2001]. **Д** – Совмещённые фазовый контраст и окрашивание POF. **Е** – Совмещённые изображения окрашивания CHRIZ и POF. **Ж** – Совмещённые фазовый контраст и окрашивание CHRIZ и POF. Звёздочкой указан междиск 102B5-6/B7, в котором отсутствует окрашивание POF и CHRIZ.

Также использованы данные о локализации H3K27me3 в клетках слюнных желёз. Он имеет противоположную картину распределения и обогащён только в компактном «guby» хроматине, что соответствует данным по остальным хромосомам (Рисунок 8).

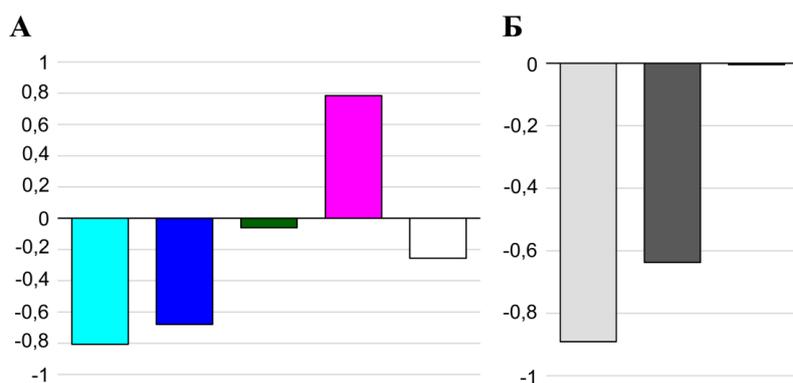


Рисунок 8. Распределение H3K27me3 в клетках СЖ личинок *D. melanogaster* [Sher et al., 2012]: **А** – в четырёх типах хроматина четвёртой хромосомы и **Б** – в дисках и междисках четвёртой хромосомы. Показано медианное значение пиков профиля распределения.

Исследовано распределение встроок *P*-транспозонов в морфологические структуры и в различные типы хроматина четвёртой хромосомы (107 инсерций). Встройки этих МГЭ распределены не случайно. В четвёртой хромосоме, как это было ранее показано для всего генома дрозофилы [Zhimulev et al., 2014], *P*-элементы преимущественно встраиваются в междиски и максимально соответствующий им хроматин «aquamarine» (Рисунок 9А,Б). Более детальный анализ показал, что максимальное количество *P*-транспозонов в четвёртой хромосоме локализуется в пределах 400 п. н. вокруг начала генов, 5′нетранслируемые области которых лежат в междисках и соответствующем им «aquamarine» хроматине (Рисунок 9В). Кроме того, была определена специфика распределения элемента *1360* [Kholodilov et al., 1988] в четвёртой хромосоме *D. melanogaster*. Всего в четвёртой хромосоме находится 59 остатков элемента *1360* (данные modENCODE), четыре из них были исключены из анализа, поскольку полностью перекрывались с другими остатками. Суммарная длина остатков *1360* в четвёртой хромосоме дрозофилы составляет 49974 нуклеотида. Показано, что элемент *1360* распределён в четвёртой хромосоме дрозофилы не случайным образом. В противоположность *P*-элементам, которые имеют тенденцию встраиваться в «открытый» хроматин, элемент *1360* преимущественно располагается в дисках четвёртой хромосомы и соответствующем им «ruby», «malachite», «lazarite» хроматине. На рисунке 9 показано распределение элемента *1360* в цитологических структурах (Г) и в разных типах хроматина четвёртой хромосомы (Д).

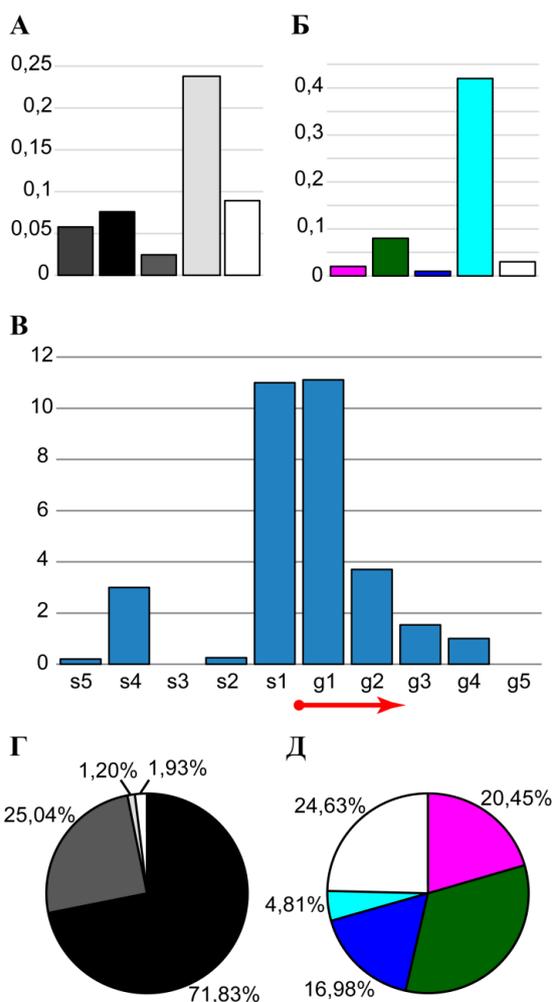


Рисунок 9. Распределение мобильных элементов в четвёртой хромосоме. Распределение *P*-элементов: **А** – в цитологических структурах четвёртой хромосомы; первый столбец соответствует всем дискам четвёртой хромосомы, а далее – как показано на Рисунке 3.20А; **Б** – в четырёх типах хроматина четвёртой хромосомы. На оси ординат – плотность в шт./т.п.н. **В** – Распределение *P*-элементов относительно генов, начинающихся в междисках четвёртой хромосомы. Междиски разделены на фрагменты по 200 п.н. от начала гена в направлении межгенного интервала (s1 – s5) и в направлении структурной части гена (g1 – g5); гены выровнены относительно начала. Показано по пять фрагментов в каждом направлении. На оси ординат – общее количество сайтов в данных фрагментах, нормализованное на количество транскриптов гена. Красной стрелкой показано начало и направление генов. Распределение элемента 1360: **Г** – в дисках и междисках; **Д** – в четырёх типах хроматина четвёртой хромосомы.

Обсуждение

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

исследованию четвёртой хромосомы дрозофилы, которая соединяет в себе свойства эу- и гетерохроматина. Ещё одно отличие четвёртой хромосомы – это наличие особых эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов при помощи белков POF, HP1a и dSETDB1. При этом, полученные результаты показывают, что в целом дисковая организация четвёртой хромосомы совпадает с организацией остального генома.

Выводы

1. В результате FISH-локализации 38 зондов с использованием модели четырёх типов хроматина построена функциональная карта четвёртой хромосомы, сочетающая в себе локализацию в геноме генов, дисков и междисков, белков, мобильных элементов и регуляторных элементов генома.

2. Четвёртая хромосома содержит вдвое меньше компактно упакованного «rubby» хроматина по сравнению с другими хромосомами, что связано с отсутствием крупных плотно упакованных дисков интеркалярного гетерохроматина. Междиски преимущественно соответствуют «открытому» «aquamarine» хроматину, значительная часть суммарной длины серых дисков представлена «lazarite» хроматином, большая часть «rubby» хроматина локализована в чёрных дисках, которые, помимо этого, содержат «lazarite» и «malachite» хроматин.

3. Междиски содержат 5' концы повсеместно активных генов, серые диски – кодирующие части этих генов, чёрные диски являются полигенными, причём эти гены являются, в основном, тканеспецифичными, кроме того, чёрные диски содержат кодирующие части генов.

4. Активные типы хроматина «aquamarine» и «lazarite» четвёртой хромосомы по сравнению с остальным геномом дрозофилы обогащены уникальным для данной хромосомы белком POF, белком гетерохроматина HP1a и колокализующимся с ним белком HP2. «Lazarite» хроматин четвёртой хромосомы относительно генома обогащён гистонметилтрансферазой SU(VAR)3-9, вносящей метку неактивного хроматина – метилирование H3K9. «Aquamarine» и «lazarite» четвёртой хромосомы обеднены относительно генома большим количеством модификаций гистонов, связанных с активной транскрипцией, и белками «открытого» хроматина. «Malachite» хроматин четвёртой хромосомы по сравнению с остальным геномом обогащён белком гетерохроматина HP1a и вариантом гистона H2AV, фосфорилированная форма которого ассоциирована с двуцепочечными разрывами ДНК, которые могут быть вызваны недорепликацией. Транскрипционно неактивный «rubby» хроматин четвёртой хромосомы обогащён относительно остальной части генома метками репрессированного хроматина H3K9me2 и SU(VAR)3-9.

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

6. Сайты гиперчувствительности к ДНКазе I и белок репликативного комплекса ORC2 преимущественно локализованы в «открытом» «aquamarine» хроматине, соответствующем междискам, причём DHS сконцентрированы в фрагментах 200 п.н. выше 5' нетранслируемой области генов, а ORC2 – в фрагментах 400 п.н. вокруг 5' нетранслируемой области генов, как и в остальном геноме дрозофилы.

7. P-элементы преимущественно локализованы в «открытом» «aquamarine» хроматине и имеют пик в фрагментах 400 п.н. вокруг 5' нетранслируемой области генов, как и в остальном геноме дрозофилы, в то время как элемент *I360*, специфичный для четвёртой хромосомы, занимает «дисковые» типы хроматина.

Публикации по теме работы

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

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

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

Список использованной литературы

- Boldyreva L. V., Goncharov F. P., Demakova O. V. et al. Protein and genetic composition of four chromatin types in *Drosophila melanogaster* cell lines // *Current genomics*. - 2017. - Vol. 18. - №2. - P. 214–226.
- Bridges C. B. Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster* // *J Hered* – 1935. – Vol. 26. – P. 60–64.
- Chintapalli V. R., Wang J., Dow J. A. Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease // *Nature genetics*. - 2007. - Vol. 39. - №6. - P. 715.
- Demakov S. A., Vatolina T. Y., Babenko V. N. et al. Protein composition of interband regions in polytene and cell line chromosomes of *Drosophila melanogaster* // *BMC Genomics*. - 2011. - Vol. 12. - P. 566.
- Filion G. J., van Bemmelen J. G., Braunschweig U. et al. Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells // *Cell*. - 2010. - Vol. 143. - №2. - P. 212–24.
- Gortchakov A. A., Eggert H., Gan M. et al. Chriz, a chromodomain protein specific for the interbands of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes // *Chromosoma*. - 2005. - Vol. 114. - №1. - P. 54–66.
- Johansson A. M., Larsson J. Genome-wide mapping of Painting of fourth on *Drosophila melanogaster* salivary gland polytene chromosomes // *Genom Data*. - 2014. - Vol. 2. - P. 63–5.
- Kharchenko P. V., Alekseyenko A. A., Schwartz Y. B. et al. Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster* // *Nature*. - 2011. - Vol. 471. - №7339. - P. 480–5.
- Kholodilov N. G., Bolshakov V. N., Blinov V. M. et al. Intercalary heterochromatin in *Drosophila*. III. Homology between DNA sequences from the Y chromosome, bases of polytene chromosome limbs, and chromosome 4 of *D. melanogaster* // *Chromosoma*. - 1988. - Vol. 97. - №3. - P. 247–53.

- Khoroshko V. A., Levitsky V. G., Zykova T. Y. et al. Chromatin heterogeneity and distribution of regulatory elements in the late-replicating intercalary heterochromatin domains of *Drosophila melanogaster* chromosomes // PLoS One. - 2016. - Vol. 11. - №6. - P. e0157147.
- Khoroshko V. A., Pokholkova G. V., Zykova T. Yu. et al. Gene *dunce* localization in the polytene chromosome of *Drosophila melanogaster* long span batch of adjacent chromosomal structures // Doklady Biochemistry and Biophysics. - 2019. - Vol. 484. - №1. - P. 55–58.
- 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.
- Larsson J., Chen J. D., Rasheva V. et al. Painting of fourth, a chromosome-specific protein in *Drosophila* // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2001. - Vol. 98. - №11. - P. 6273–8.
- Lundberg L. E., Kim M., Johansson A. M. et al. Targeting of Painting of fourth to roX1 and roX2 proximal sites suggests evolutionary links between dosage compensation and the regulation of the fourth chromosome in *Drosophila melanogaster* // G3 (Bethesda). - 2013. - Vol. 3. - №8. - P. 1325–34.
- Milon B., Sun Y., Chang W. et al. Map of open and closed chromatin domains in *Drosophila* genome // BMC Genomics. - 2014. - Vol. 15. - №1. - P. 988.
- Riddle N. C., Shaffer C. D., Elgin S. C. A lot about a little dot - lessons learned from *Drosophila melanogaster* chromosome 4 // Biochem Cell Biol. - 2009. - Vol. 87. - №1. - P. 229–41.
- Saura A. O., Cuenca J. B., Heino T. I. et al. The polytene dot chromosome of *Drosophila*: *D. melanogaster* and *D. subobscura* // Chromosoma. - 2002. - Vol. 111. - №4. - P. 273–83.
- Seum C., Reo E., Peng H. et al. *Drosophila* SETDB1 is required for chromosome 4 silencing // PLoS Genet. - 2007. - Vol. 3. - №5. - P. e76.

Sher N., Bell G. W., Li S. 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.

The modENCODE Consortium et al. Identification of functional elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE // *Science.* - 2010. - Vol. 330. - №6012. - P. 1787–97.

Vatolina T. Y., Boldyreva L. V., Demakova O. V. et al. Identical functional organization of nonpolytene and polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster* // *PLoS One.* - 2011b. - Vol. 6. - №10. - P. e25960.

Vatolina T. Yu., Demakov S. A., Semeshin V. F. et al. Identification and molecular genetic characterization of the polytene chromosome interbands in *Drosophila melanogaster* // *Genetika.* - 2011a. - Vol. 47. - №5. - P. 597–609.

Zhimulev I. F., Boldyreva L. V., Demakova O. V. et al. *Drosophila* polytene chromosome bands formed by gene introns // *Dokl Biochem Biophys.* - 2016. - Vol. 466. - P. 57–60.

Zhimulev I. F., Zykova T. Y., Goncharov F. P. et al. Genetic organization of interphase chromosome bands and interbands in *Drosophila melanogaster* // *PLoS One.* - 2014. - Vol. 9. - №7. - P. e101631.

Zykova T. Yu., Levitsky V. G., Belyaeva E. S. et al. Polytene Chromosomes—A Portrait of Functional Organization of the *Drosophila* Genome // *Current genomics.* - 2018. - Vol. 19. - №3. - P. 179–191.

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Новопашина Дарья Сергеевна danov@niboch.nsc.ru / ID: 7007712
Проверяющий: Новопашина Дарья Сергеевна (danov@niboch.nsc.ru / ID: 7007712)
 Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <https://users.antiplagiat.ru>

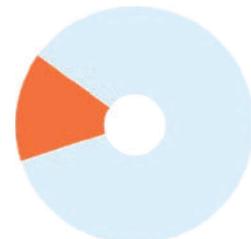
ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 7
 Начало загрузки: 06.09.2019 05:49:50
 Длительность загрузки: 00:00:05
 Имя исходного файла: Сидоренко_научный доклад_2019
 Размер текста: 1283 кБ
 Символов в тексте: 38574
 Слов в тексте: 4849
 Число предложений: 621

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
 Начало проверки: 06.09.2019 05:49:55
 Длительность проверки: 00:00:03
 Комментарии: не указано
 Модуль поиска: Цитирование, Модуль поиска Интернет

ЗАИМСТВОВАНИЯ 14,88%  **ЦИТИРОВАНИЯ** 0%  **ОРИГИНАЛЬНОСТЬ** 85,12% 



Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
 Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.
 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.
 Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.
 Заимствования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.
 Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска
[01]	4,92%	2019 год, Том 23 №2 Читать весь выпуск (1/2)	http://bionet.nsc.ru	21 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[02]	2,08%	Статья	http://tsitologiya.cytspb.rssi.ru	03 Ноя 2018	Модуль поиска Интернет
[03]	0,45%	Article	http://protein.bio.msu.ru	09 Ноя 2018	Модуль поиска Интернет
[04]	0,71%	Лаборатория хромосомной инженерии Институт молекулярной и клеточной био.	http://mcb.nsc.ru	11 Дек 2016	Модуль поиска Интернет
[05]	0,4%	Статья	http://tsitologiya.cytspb.rssi.ru	03 Ноя 2018	Модуль поиска Интернет
[06]	0%	ASSA	http://assa.bionet.nsc.ru	22 Мар 2019	Модуль поиска Интернет
[07]	0,73%	PDF	http://mcb.nsc.ru	03 Сен 2017	Модуль поиска Интернет
[08]	1,01%	Packaging the fly genome: domains and dynamics	https://doi.org	23 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[09]	0,4%	Сборник материалов	https://mcb.nsc.ru	30 Окт 2018	Модуль поиска Интернет
[10]	0,31%	Статья	http://tsitologiya.cytspb.rssi.ru	03 Ноя 2018	Модуль поиска Интернет
[11]	0,75%	Regulatory genomics: Combined experimental and computational approaches	https://doi.org	23 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[12]	0,38%	Cell type-specific genomics of Drosophila neurons	http://fredpdavis.com	27 Июл 2017	Модуль поиска Интернет
[13]	0,8%	Genome-wide mapping of Painting of fourth on Drosophila melanogaster salivary gland...	https://doi.org	03 Дек 2018	Модуль поиска Интернет
[14]	0,79%	Материалы	http://mcb.nsc.ru	05 Дек 2016	Модуль поиска Интернет
[15]	0,32%	Citation listings - GEO - NCBI	https://ncbi.nlm.nih.gov	04 Июл 2019	Модуль поиска Интернет
[16]	0%	Copy Number Variation Is a Fundamental Aspect of the Placental Genome	https://doi.org	23 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[17]	0,26%	Закономерности организации гетерохроматиновых районов политенных хромос...	http://earthpapers.net	02 Ноя 2017	Модуль поиска Интернет
[18]	0,21%	2011 год ИЦИГ	http://bionet.nsc.ru	13 Дек 2017	Модуль поиска Интернет
[19]	0,35%	Cohesin Complexes in Polytene Chromosomes of Drosophila melanogaster Are Located i...	https://doi.org	19 Июн 2019	Модуль поиска Интернет
[20]	0%	Цитотаксономический анализ видов подсемейств Diamesinae и Prodiamesinae + " - c...	http://earthpapers.net	22 Апр 2019	Модуль поиска Интернет

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчет о проверке текста научно-квалификационной работы на
объем заимствования

Сидоренко Дарья Сергеевна

«Молекулярно-генетическая организация политенных хромосом *Drosophila
melanogaster*»

Оригинальность работы составляет ___85.12___ %, что соответствует требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на итоговом заседании Государственной итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь ГЭК - к.х.н. Д.С. Новопашина