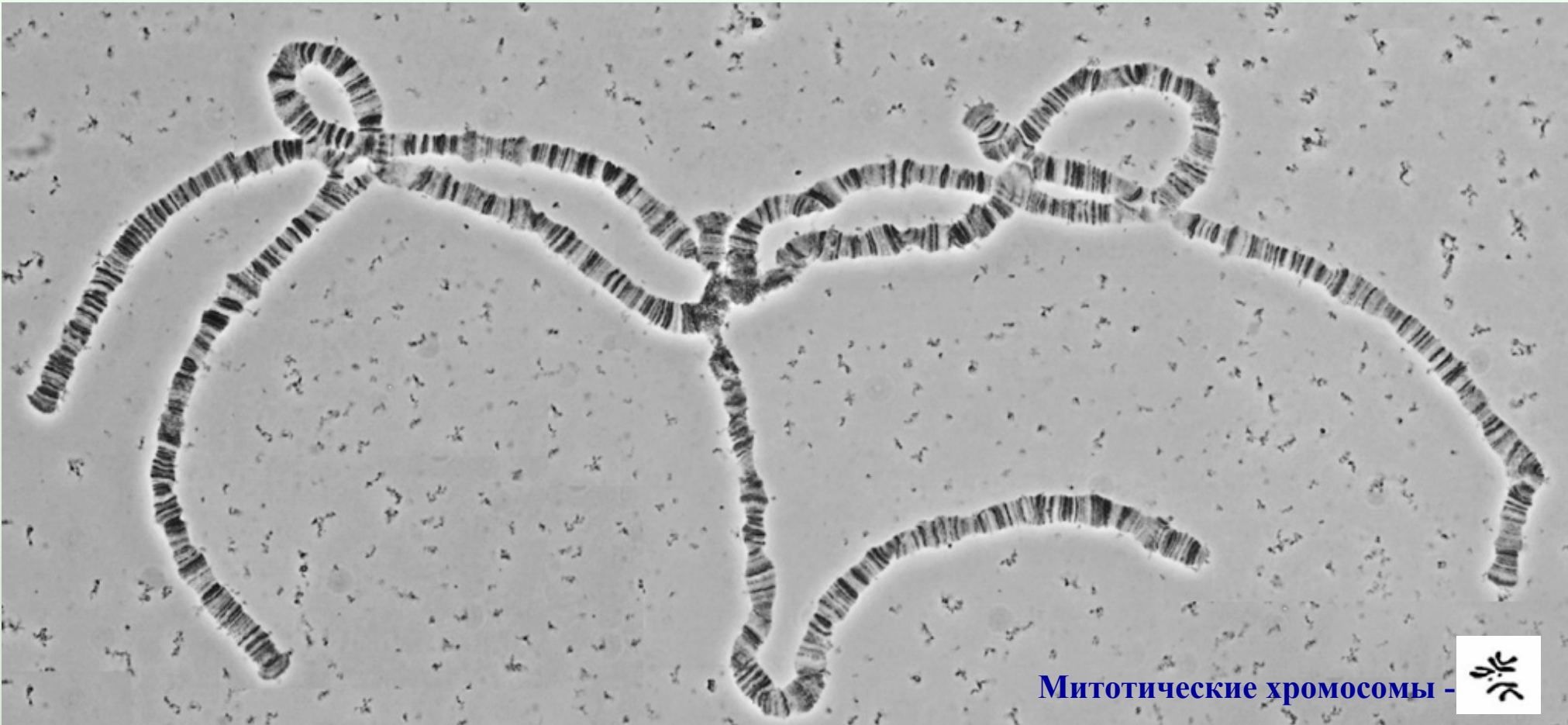


Молекулярно-генетическая организация
междисков политенных хромосом
Drosophila melanogaster

Политенные хромосомы слюнных желез *D. melanogaster*



Митотические хромосомы -



Возможные свойства междисков

- Содержат постоянно активные гены «домашнего хозяйства»**
- Образованы регуляторными участками генов**
- Выполняют барьерные функции при разделении хромосом на структурно-функциональные домены**
- Являются районами инициации репликации**

Трансгенные линии мух, использованные для ЭМ картирования

Линия	Транспозон /Локализация	Новый диск	Источник получения линии
Adh ^{hs61C} Adh ^{hs82B}	pHAP / 61C ; 3L pHAP / 82B ; 3R	+ +	J. Bonner
28X-C, 28X-F 28-term	28X / 42F ; 2R 28X / 1B ; X 28term / 97A ; 3R	- + +	V. Corces
HВΔ194 HВΔ73 HВΔ59 HВΔ23	cHВΔ-194 / 84E ; 3R cHВΔ-73 / 12E ; X cHВΔ-59 / 8E ; X cHВΔ-23 / 9E ; X	+ - - +	J. Lis
R310.1	R310.1 / 93AB ; 3R	+	G. Rubin
ICon-3C(1A) ICon-3C(5F) ICon-3C(8E) ICon-3C(67B) ICon-3C(79D)	pICon-3C / 1A ; X / 5F ; X / 8E ; X / 67B ; 3L / 79D ; 3L	+ + + + +	С. Демаков П. Зимин
ICon(dv)-61C (84F) ICon(dv)-61C (87C)	pICon(dv)-61C / 84F; 3R / 87C; 3R	+ +	С. Демаков

P-транспозоны в составе хромосом формируют новые структуры

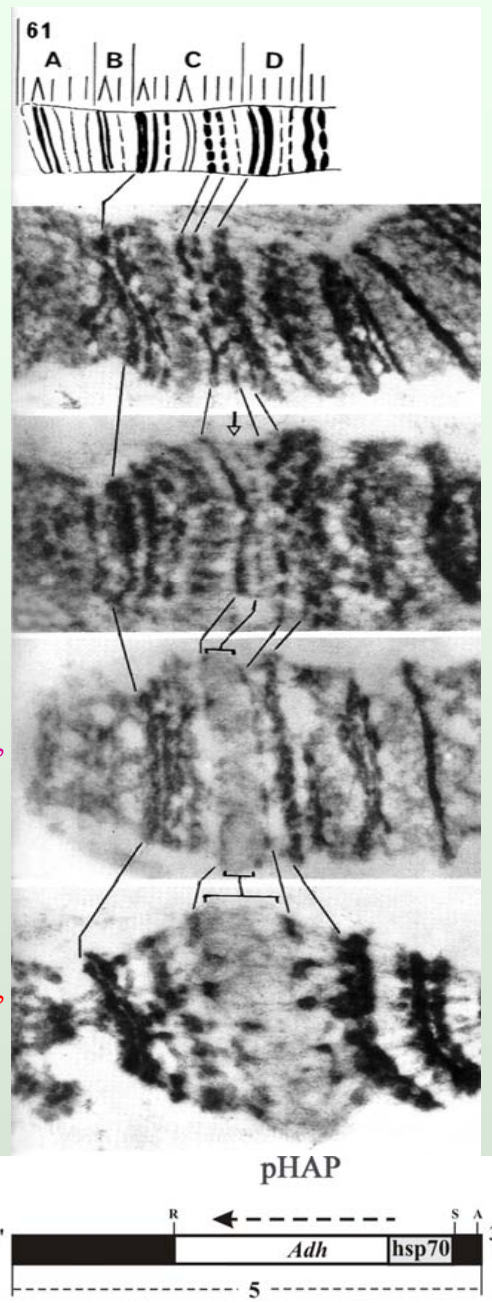
Контроль

Линия
 Adh^{hs61C}

ТШ -

ТШ 3'

ТШ 5'



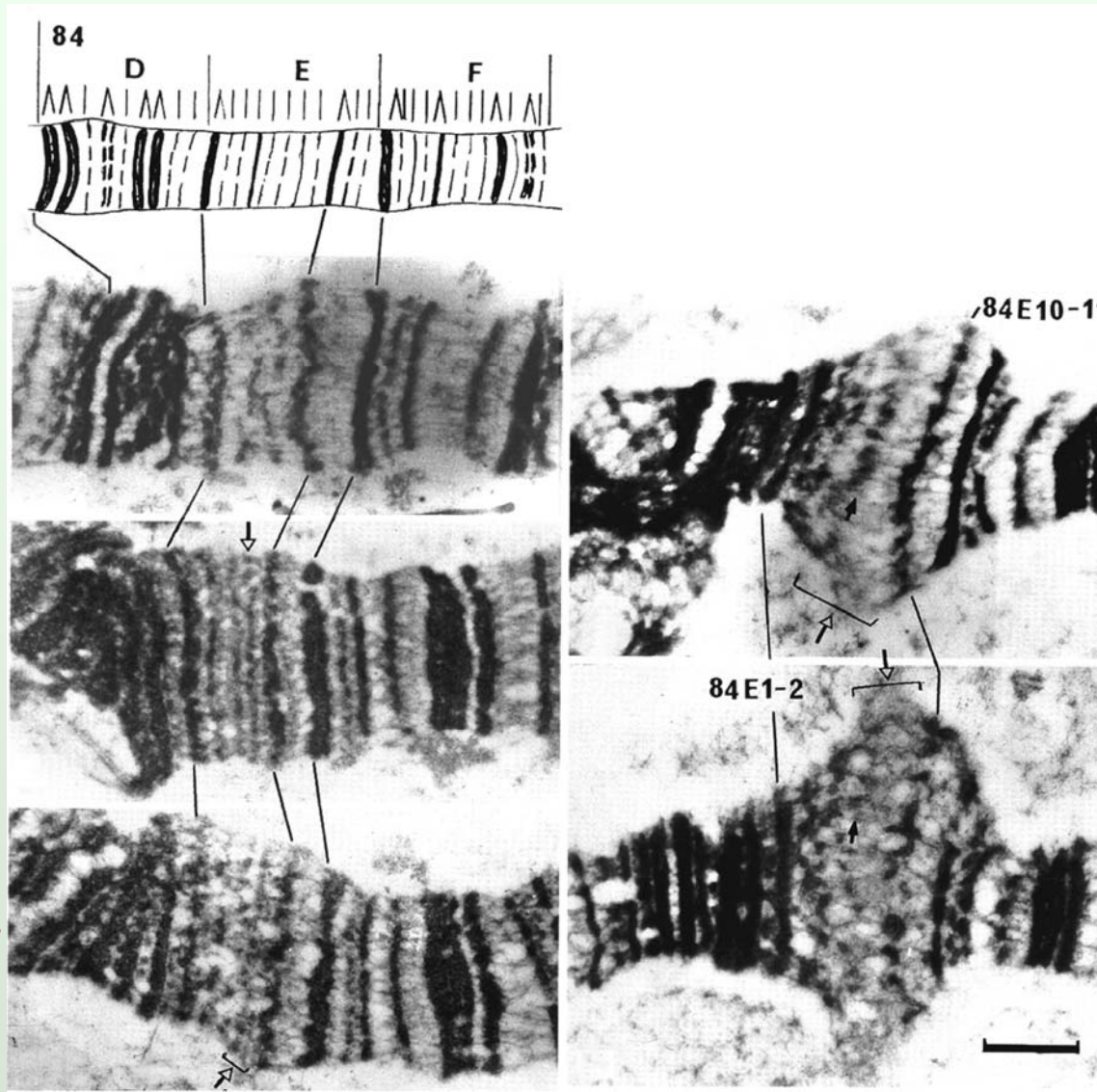
P-транспозоны в составе хромосом формируют новые структуры

Контроль

Линия НВΔ-194

ТШ -

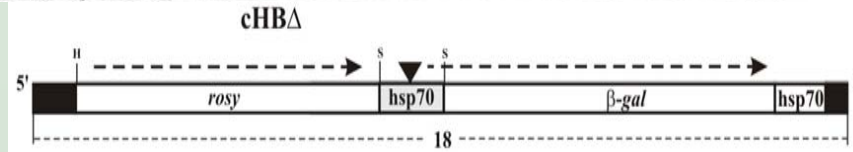
ТШ 1'



Линия НВΔ-194

ТШ 3'

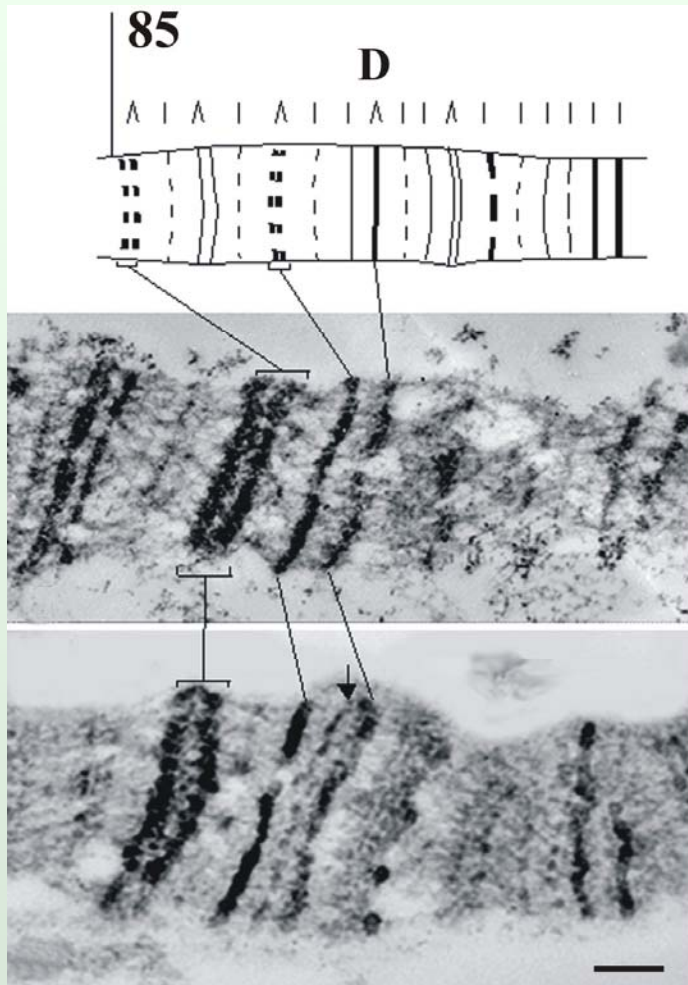
ТШ 5'



P-транспозоны в составе хромосом формируют новые структуры

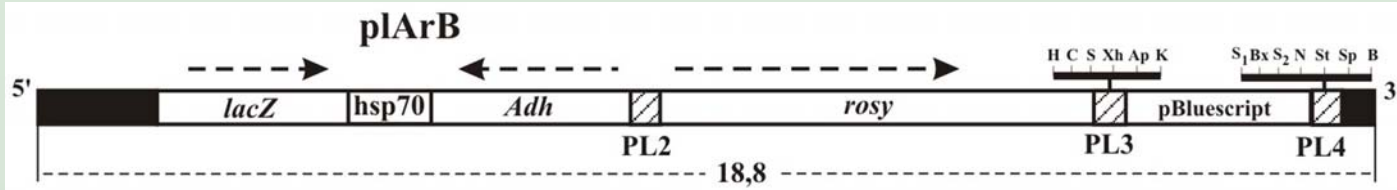
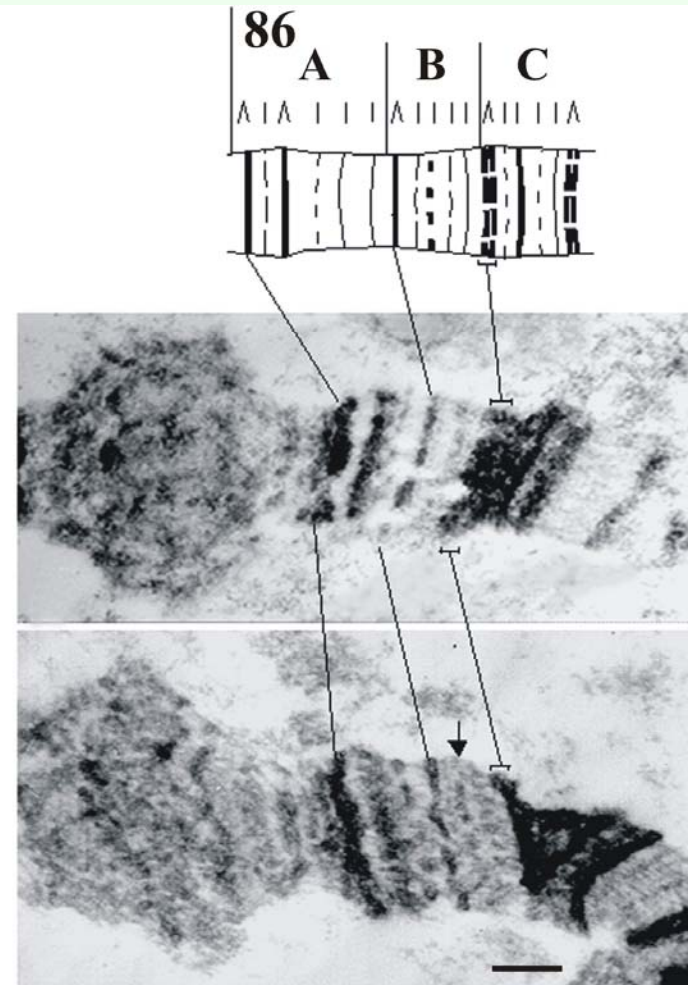
Контроль

Линия 12



Контроль

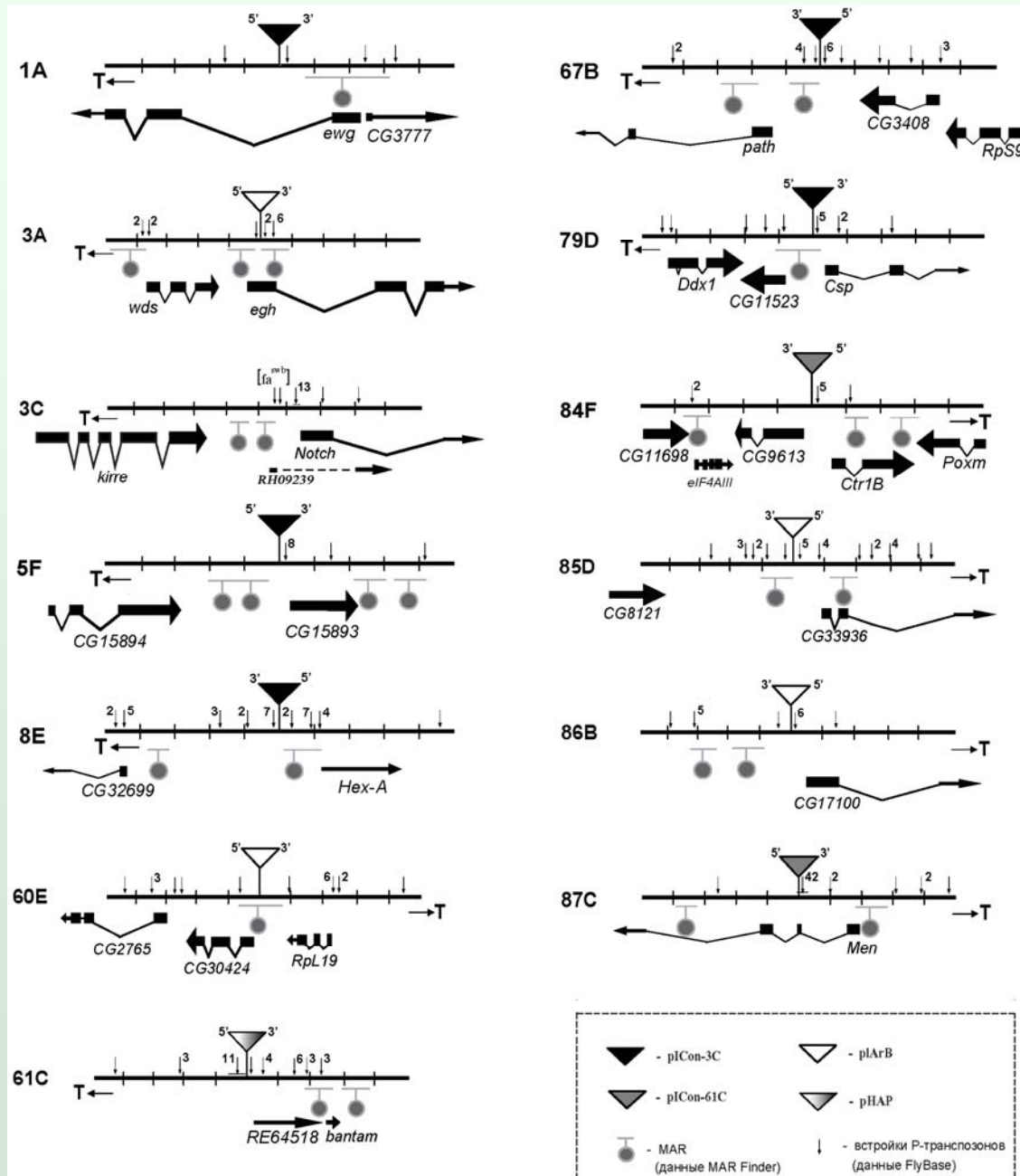
Линия 2



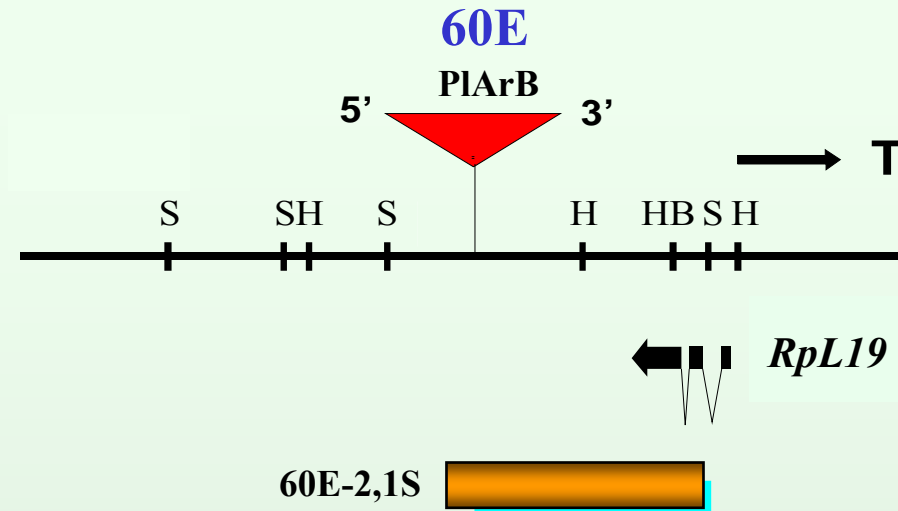
Трансгенные линии мух, использованные для клонирования ДНК междисков

Линия	Транспозон /Локализация	Новый диск	Источник получения линии
Adh ^{hs61C} Adh ^{hs82B}	pHAP / 61C ; 3L pHAP / 82B ; 3R	+ +	J. Bonner
28X-C, 28X-F 28-term	28X / 42F ; 2R 28X / 1B ; X 28term / 97A ; 3R	- + +	V. Corces
HVA-194 HVA-73 HVA-59 HVA-23	cHVA-194 / 84E ; 3R cHVA-73 / 12E ; X cHVA-59 / 8E ; X cHVA-23 / 9E ; X	+ - - +	J. Lis
R310.1	R310.1 / 93AB ; 3R	+	G. Rubin
ICon-3C(1A) ICon-3C(5F) ICon-3C(8E) ICon-3C(67B) ICon-3C(79D)	pICon-3C / 1A ; X / 5F ; X / 8E ; X / 67B ; 3L / 79D ; 3L	+ + + + +	С. Демаков П. Зимин
ICon(dv)-61C (84F) ICon(dv)-61C (87C)	pICon(dv)-61C / 84F; 3R / 87C; 3R	+ +	С. Демаков
2 12 55 148	PIArB / 86B ; 3R / 85D ; 3R / 60E ; 2R / 3A ; X	+ + + +	Л. Омелянчук

Молекулярно-генетическая организация хромосом в районах исследованных междисков

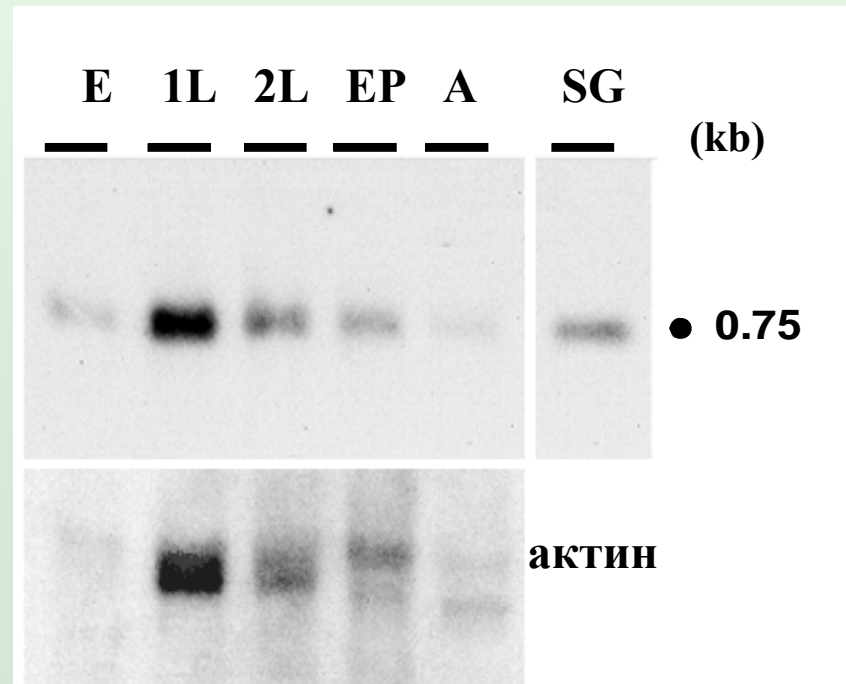


Анализ транскрипционной активности междисков



карта района

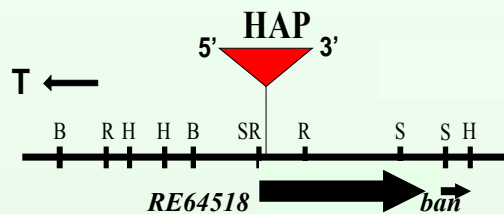
зонд



Нозерн-блот
гибридизация

Анализ транскрипционной активности междисков

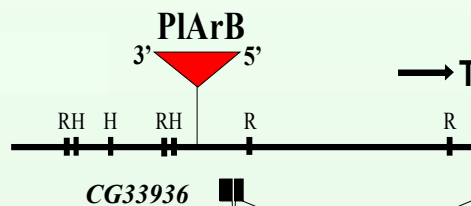
61C



61C-3,8HB



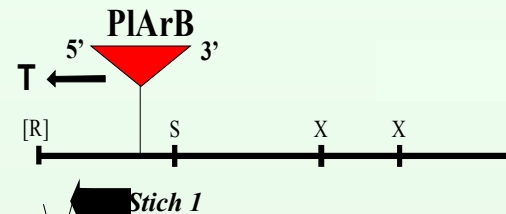
85D



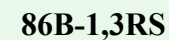
85D-2,2R



86B



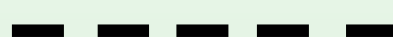
86B-1,3RS



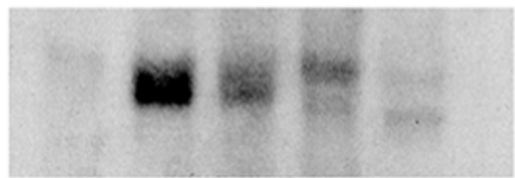
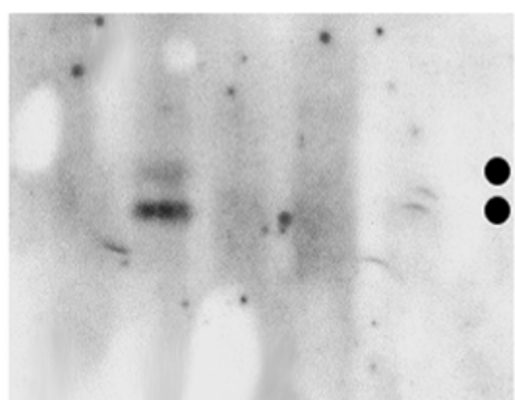
карта
района

ЗОНД

E 1L 2L EP A



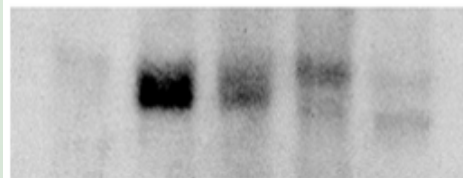
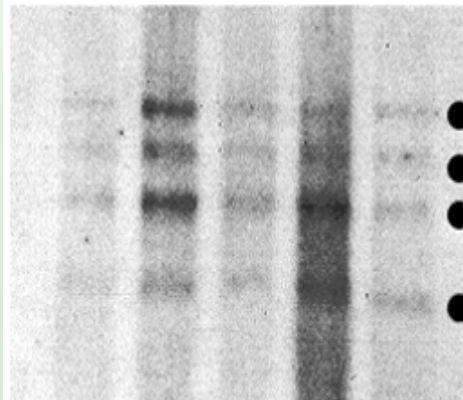
(kb)



E 1L 2L EP A



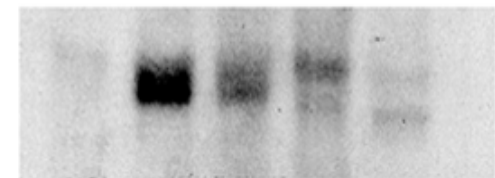
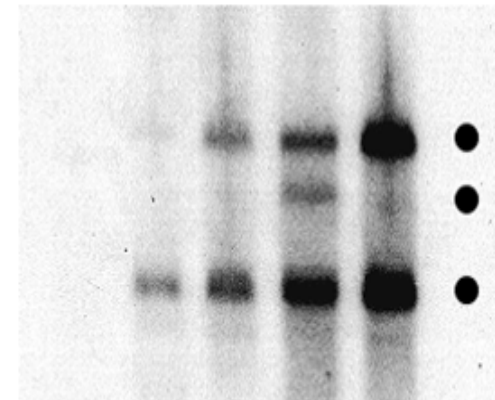
(kb)



E 1L 2L EP A



(kb)



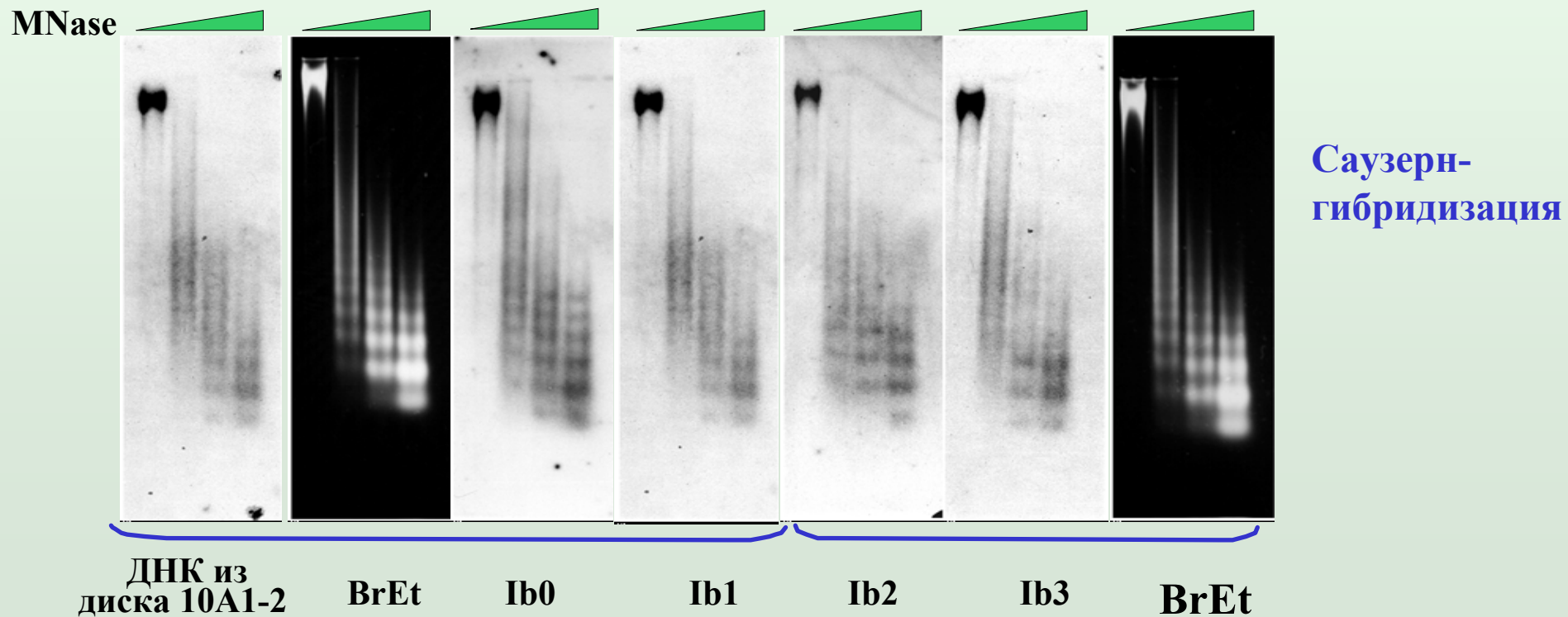
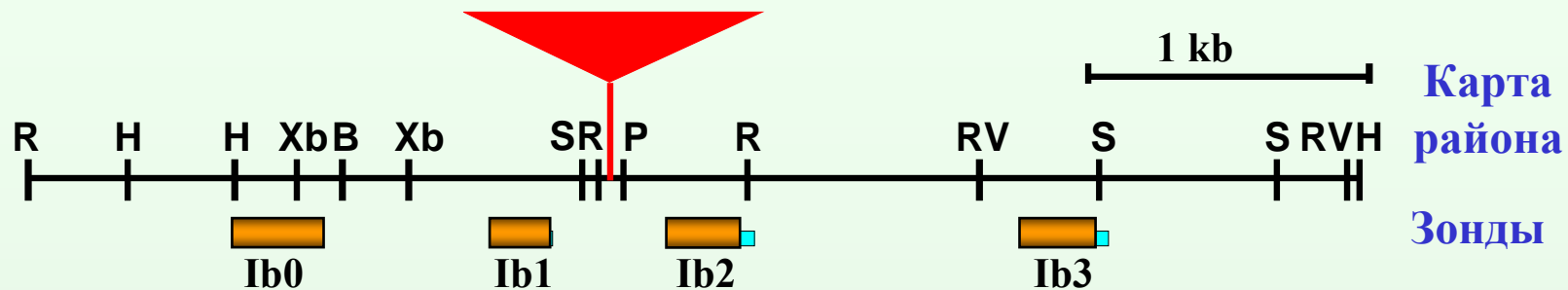
Нозерн

АКТИН

Генетическая организация междисков

1. Междиски образованы постоянно активными белок-кодирующими генами «домашнего хозяйства»
2. Междиски с очень низкой транскрипционной активностью содержат 5'-некодирующие участки генов, неактивных в слюнных железах

Нуклеосомная организация междиска 61С7/С8



Междиски содержат матрикс-связывающие участки ДНК

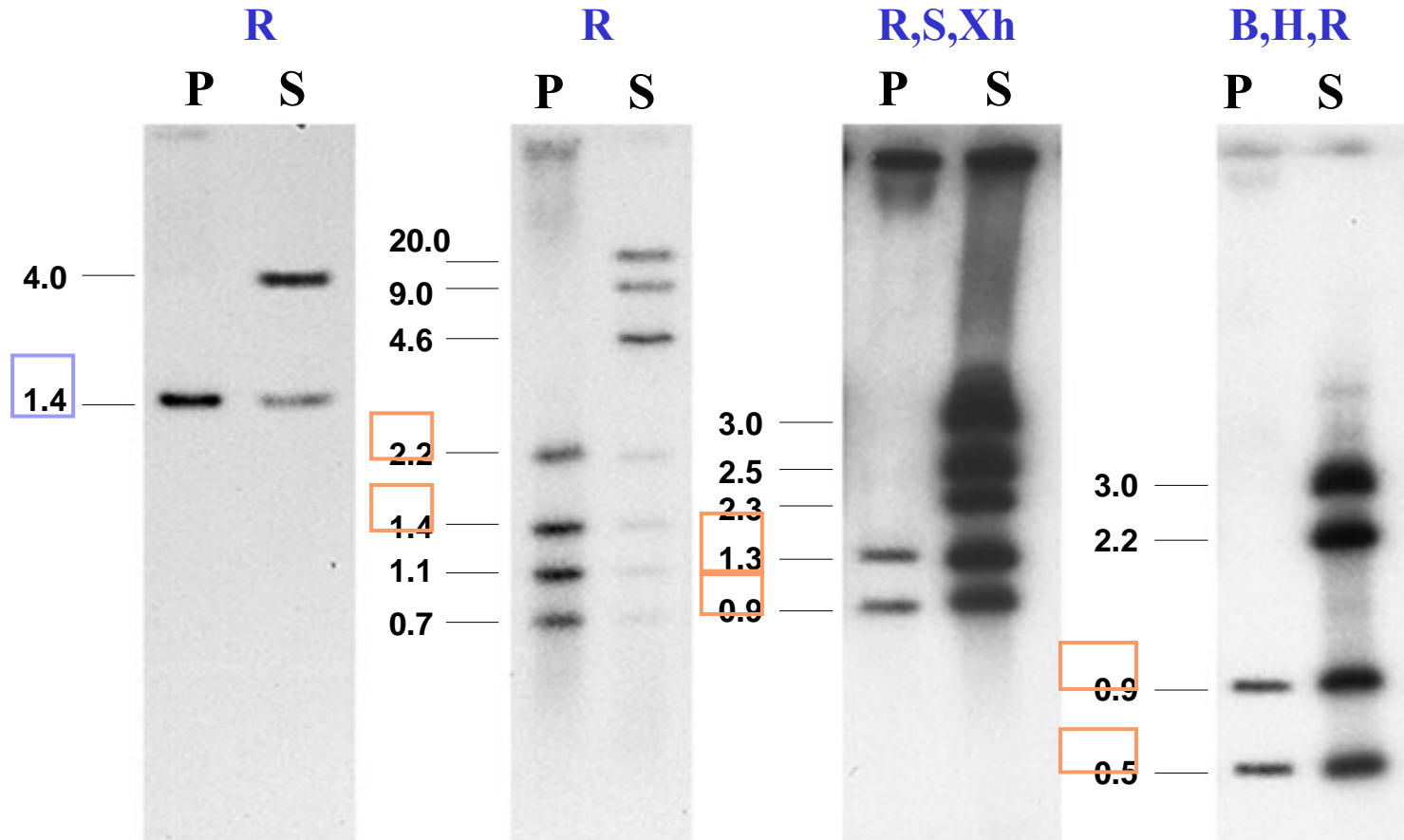
MAR из кластера
гистоновых генов

Фрагменты ДНК, перекрывающие междисковые районы

85D

86B

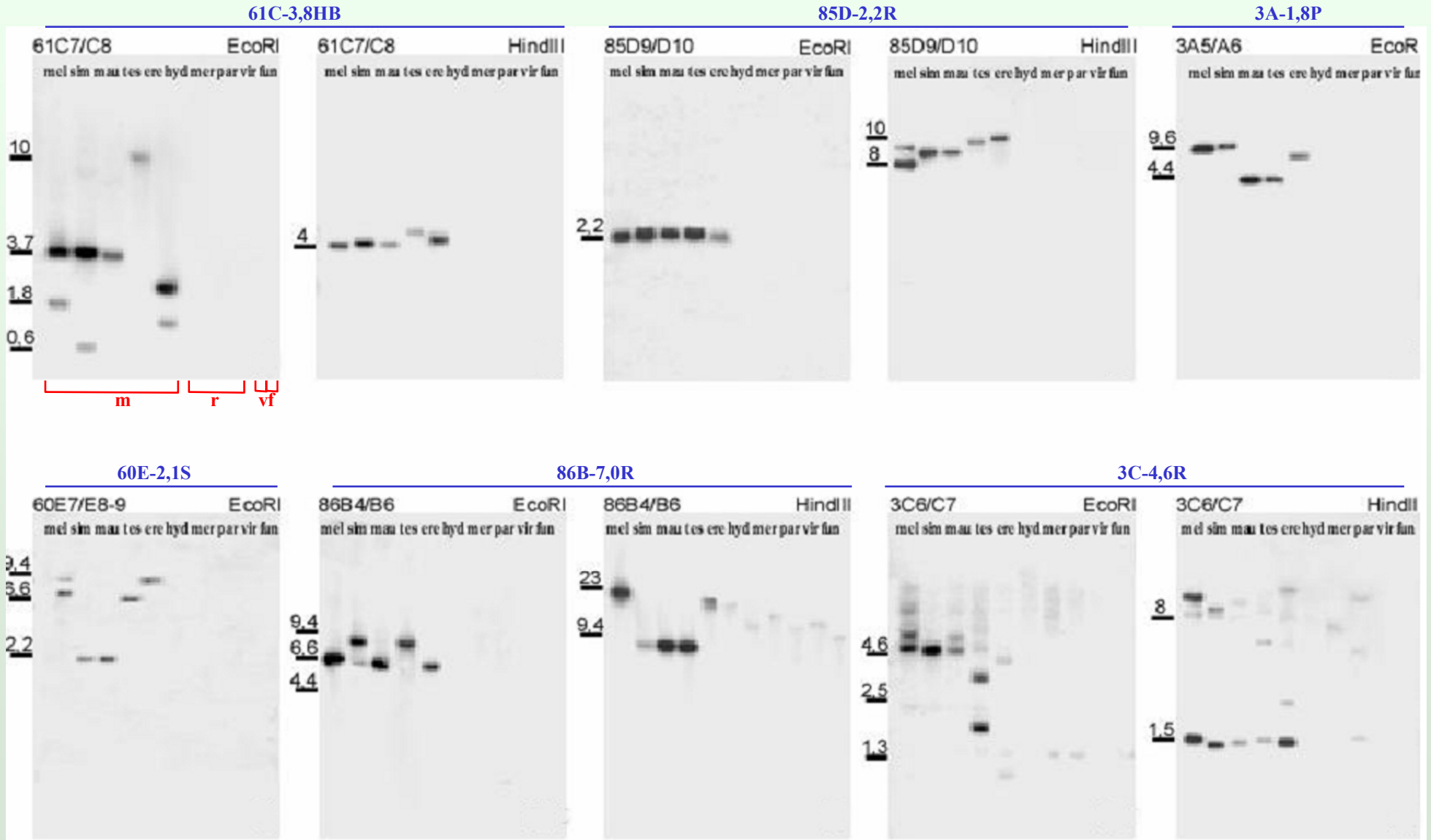
61C



Использованные в работе виды *Drosophila*

<i>Подрод</i>	<i>Подгруппа</i>	<i>Вид</i>			
<i>Sophophora</i>	<u><i>melanogaster</i></u>	<i>D. melanogaster</i>] 2-5 м.л.н.		
		<i>D. simulans</i>			
		<i>D. mauritiana</i>			
		-----	-----	<i>D. teissieri</i>] 10-15 м.л.н.
				<i>D. erecta</i>	
<i>Drosophila</i>	<u><i>repleta</i></u>	<i>D. hydei</i>] 30-50 м.л.н.		
		<i>D. mercatorum</i>			
		<i>D. paranaensis</i>			
	-----	-----		-----	
	<u><i>virilis</i></u>	<i>D. virilis</i>			
	<u><i>funnebris</i></u>	<i>D. funnebris</i>			

ДНК из районов междисков *D. melanogaster* имеет высокую гомологию с ДНК из видов подгруппы “*melanogaster*”



Характеристика ДНК видов подгруппы “melanogaster”, гомологичных ДНК междиска 61С7/С8

Длины нуклеотидных последовательностей

<i>D. simulans</i>	- 3096 п.н.
<i>D. mauritiana</i>	- 3095 п.н.
<i>D. teissieri</i>	- 3104 п.н.
<i>D. erecta</i>	- 3164 п.н.
Консенсус	3224 п.н.

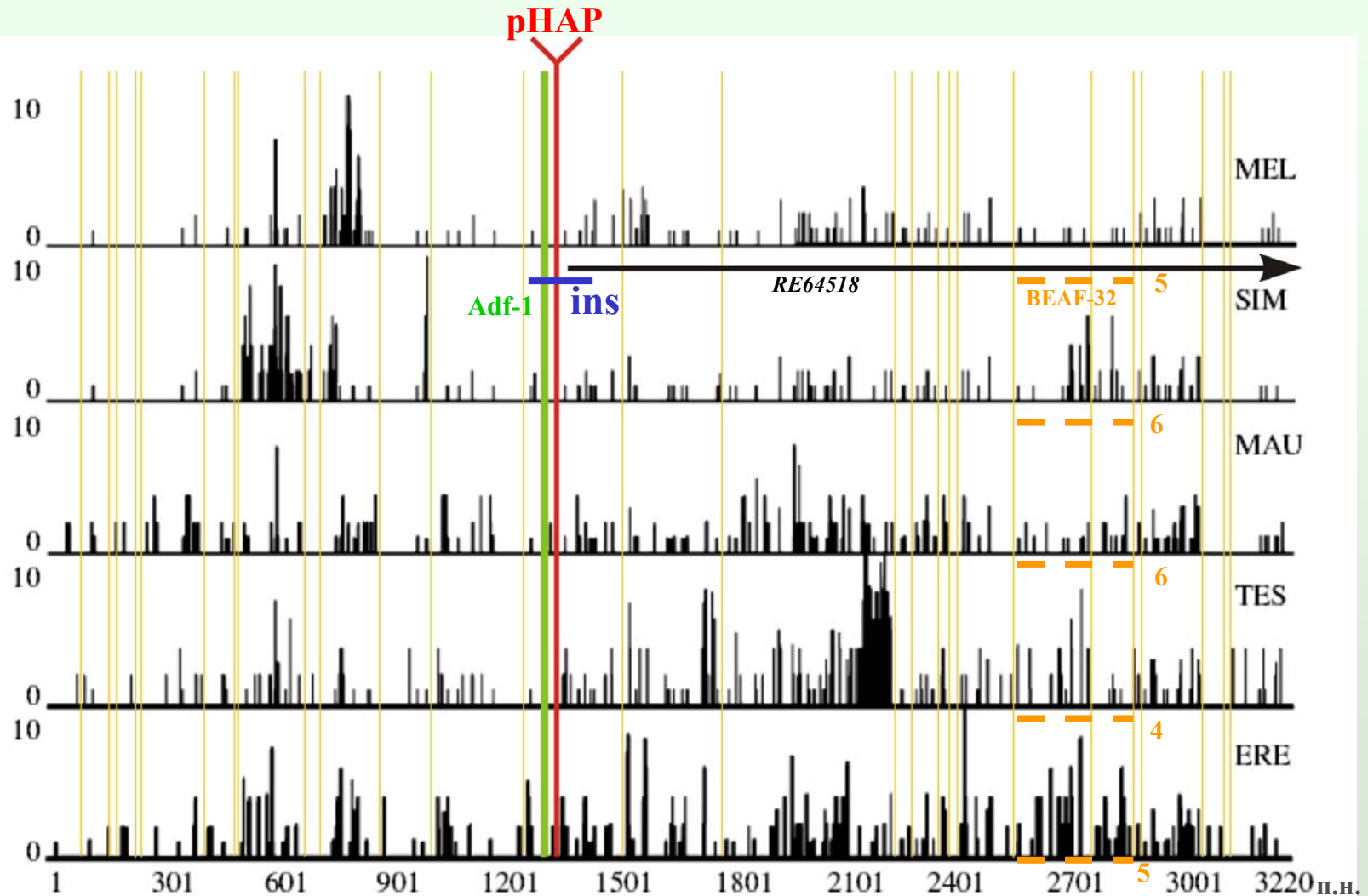
Сходство нуклеотидных последовательностей

<i>D. melanogaster</i>	/ <i>D. simulans</i>	– 96,4%
	/ <i>D. mauritiana</i>	– 96,3%
	/ <i>D. teissieri</i>	– 92,2%
	/ <i>D. erecta</i>	– 92,6%

Скорость накопления нуклеотидных замен за 1 миллион лет

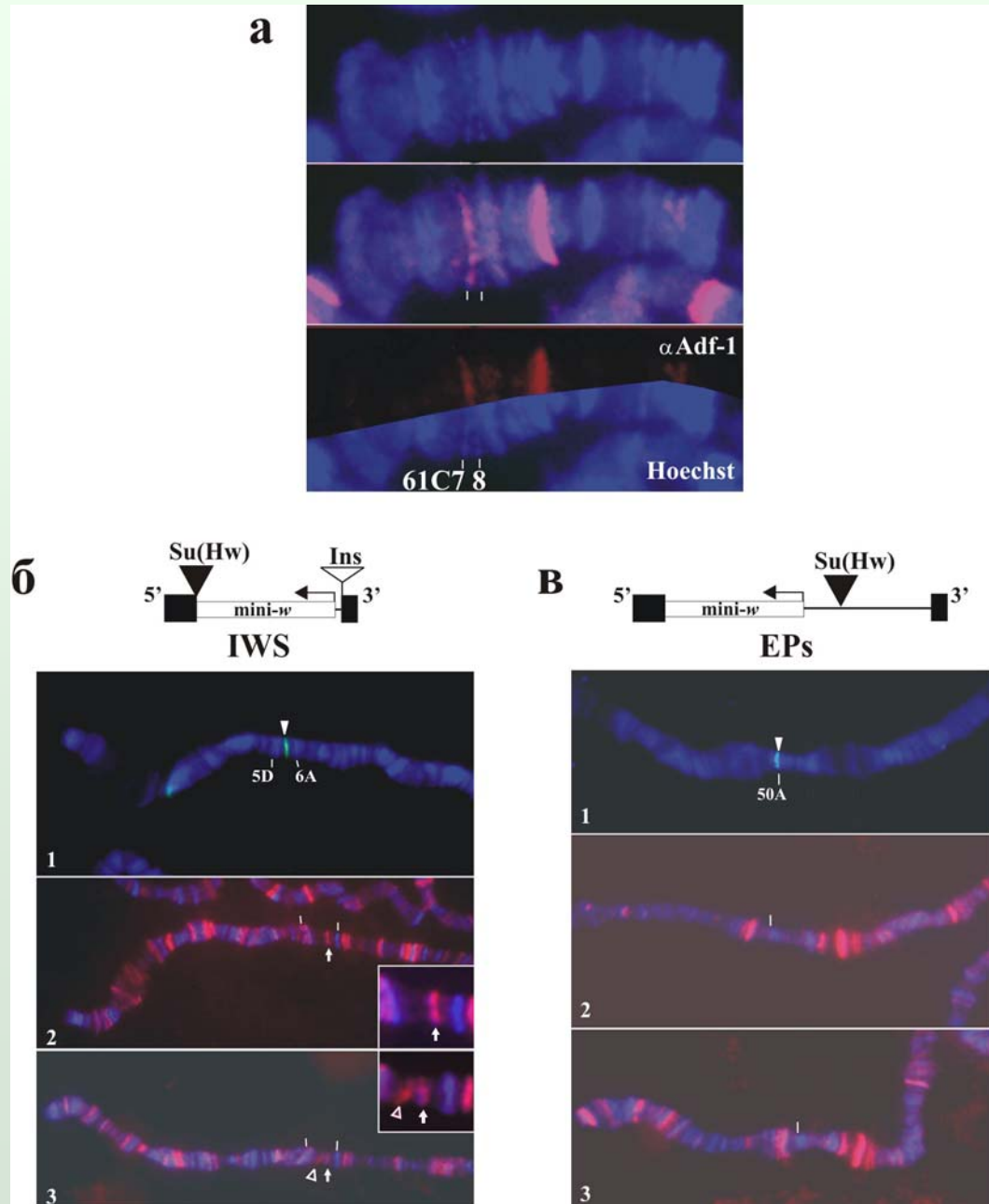
<i>D. melanogaster</i>	/ <i>D. simulans</i>	– 0.7%-1.8%
	/ <i>D. mauritiana</i>	– 0.8%-1.9%
	/ <i>D. teissieri</i>	– 0.8%-1.6%
	/ <i>D. erecta</i>	– 0.7%-1.5%

Анализ последовательности ДНК междиска 61С7/С8 методом “филогенетического футпринта”

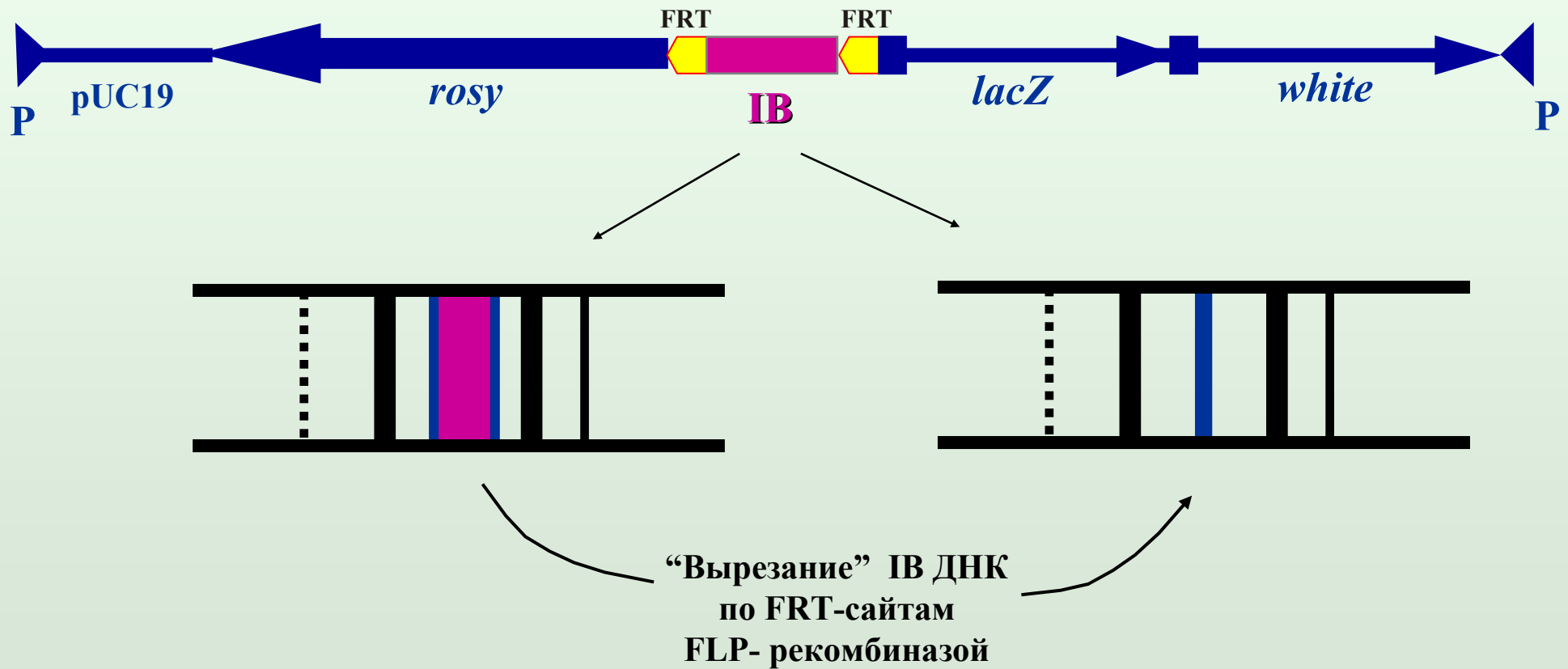


Профиль множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей *D. simulans* (SIM), *D. mauritiana* (MAU), *D. teissieri* (TES), *D. erecta* (ERE) и последовательности из междиска 61С7/С8 *D. melanogaster* (MEL). По оси абсцисс отложен размер последовательностей в нуклеотидах, по оси ординат – степень различия анализируемой последовательности и рассчитанным по всем исследуемым последовательностям консенсусом для каждого положения.

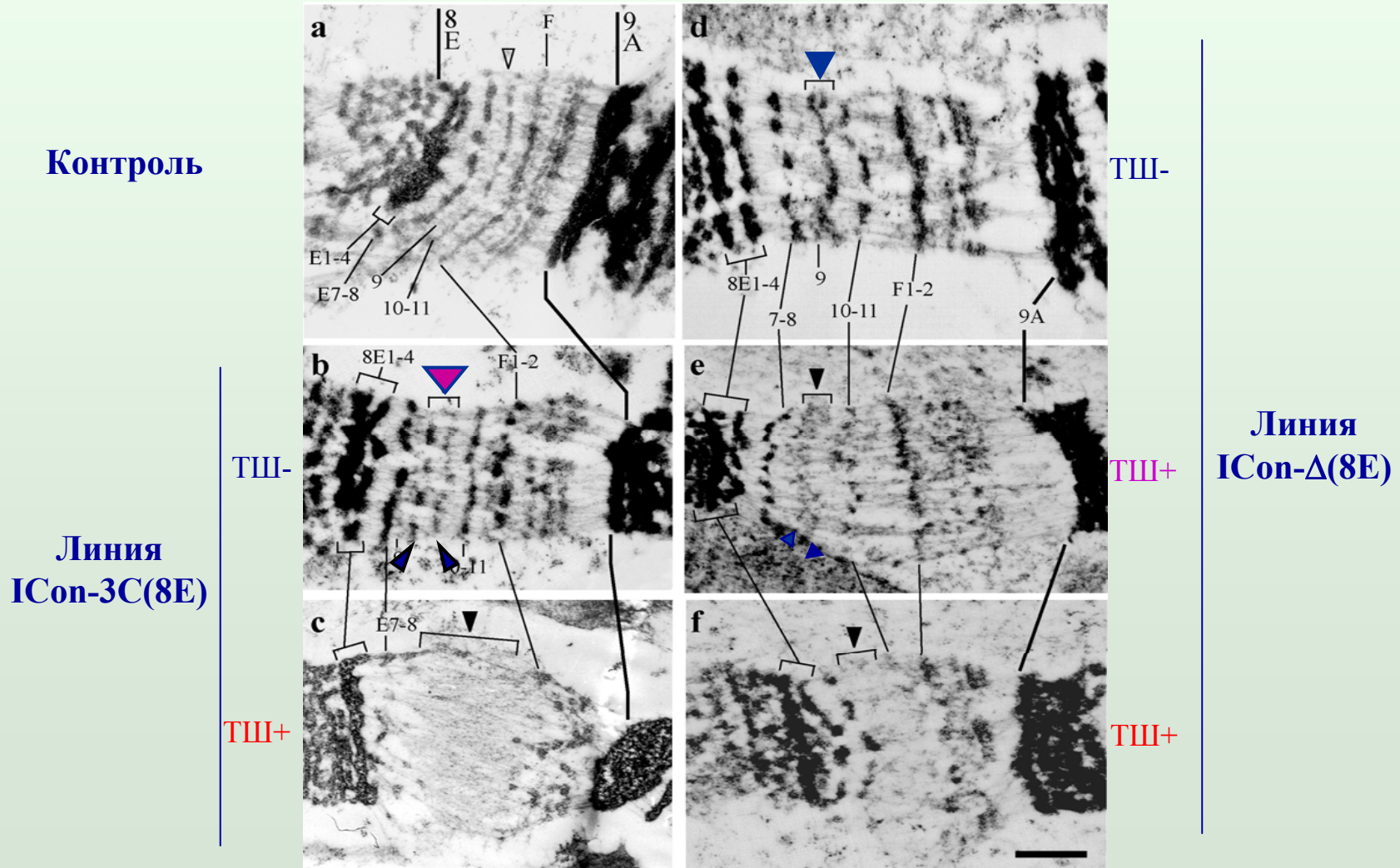
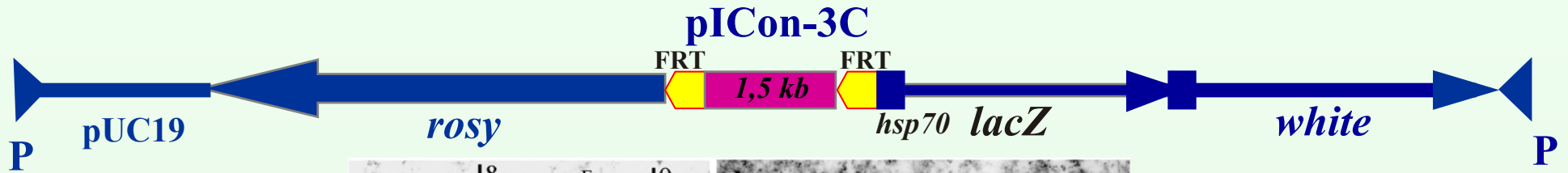
Фактор транскрипции Adf-1 связывается с ДНК междиска 61C7/C8 *in vivo*



Возможные варианты морфологии хромосомы в районе встройки транспозона

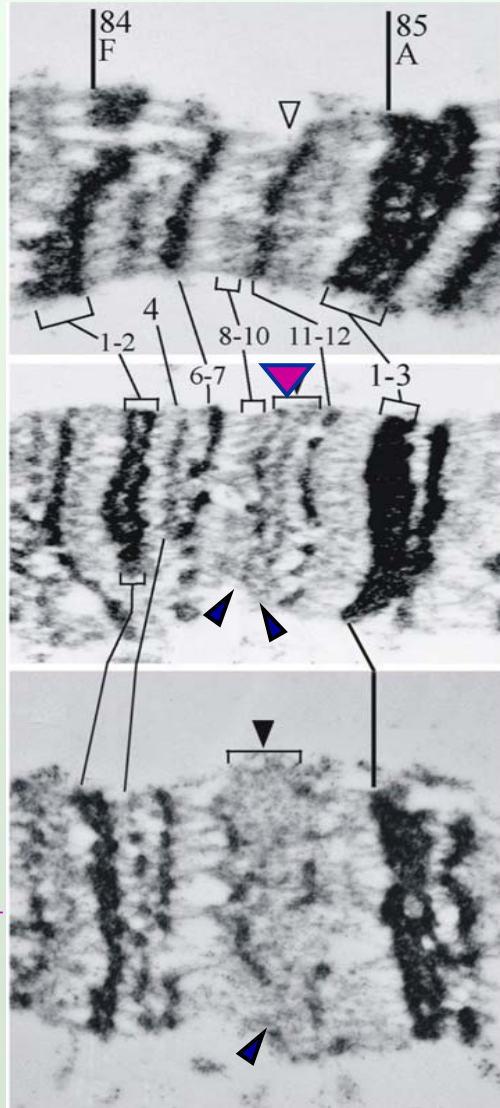


Междисковая ДНК автономна в различном генетическом окружении





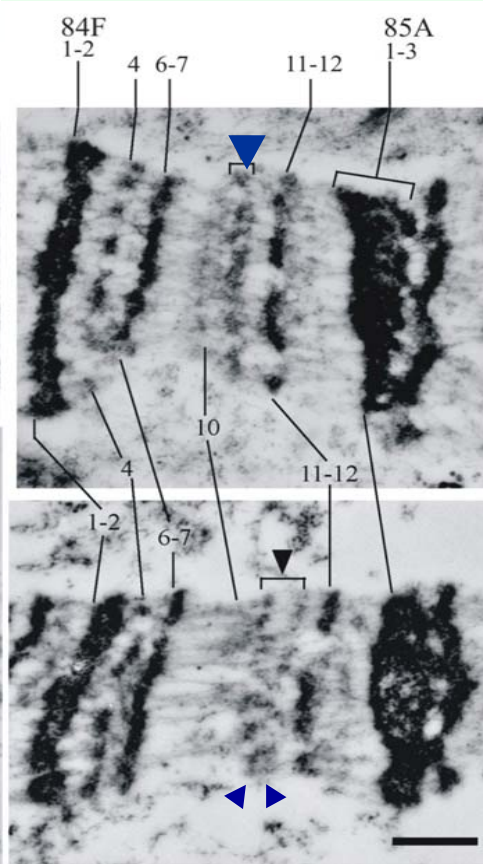
Контроль



TSH-

TSH+

**Линия
ICon(dv)-61C(84F)**



TSH-

TSH+

**Линия
ICon(dv)-Δ(84F)**

Выводы

1. Проведен широкий комплексный анализ молекулярно-генетической организации основных структур политенных хромосом – дисков и междисков.

2. С помощью трансформации генома дрозофилы Р-элементами, содержащими фрагменты ДНК с известными молекулярными характеристиками, впервые проведено моделирование хромосомных структур - дисков, междисков и пуфов. Установлено, что морфологическое разнообразие этих структур определяется степенью компактизации и протяженностью фрагментов ДНК, образующих Р-транспозоны. Показано, что в составе политенных хромосом Р-транспозоны расположены преимущественно в районах междисков или очень близко к ним.

3. Реализован новый подход, основанный на использовании Р-транспозонов в районах междисков в качестве молекулярных зондов для клонирования ДНК междисков и изучения их молекулярно-генетической организации. С помощью этого подхода впервые проведено клонирование ДНК из 12 районов междисков.

4. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей ДНК междисков позволил сделать следующие заключения:

- а) все последовательности являются уникальными в составе генома дрозофилы;
- б) во всех последовательностях обнаружены характерные участки, обладающие высоким потенциалом связывания с белками ядерного матрикса. Для ДНК междисков 61С7/С8, 85D9/D10 и 86В4/В6 связывание с ядерным матриксом показано экспериментально;
- в) значительная часть междисковых районов образована некодирующими участками генома: 9 районов содержат межгенные спейсеры или 5'- и 3'- концы генов, что указывает на возможные регуляторные функции этих последовательностей ДНК; 2 района представлены некодирующими экзонами генов и один район содержит интрон гена. Гены в районах междисков различаются по функциям и особенностям экспрессии в онтогенезе.

5. На основании данных об информационном содержании междисков и анализе их транскрипционной активности развито и обосновано представление о функциональной гетерогенности междисков. Полученные в работе факты позволяют выделить два функционально различных типа организации этих структур. Междиски первого типа образованы небольшими постоянно активными белок-кодирующими генами “домашнего хозяйства”. Междиски второго типа проявляют очень низкую транскрипционную активность и представлены 5’-регуляторными районами генов, неактивных в слюнных железах.

6. На примере междиска 61С7/С8 показано, что хроматин междисковых районов имеет нуклеосомный уровень организации в составе политенных хромосом слюнных желез, а также в большинстве личиночных тканей. Эти наблюдения позволяют заключить, что различия в степени компактизации ДНК дисков и междисков связаны с более высокими уровнями организации хроматина.

7. Сравнительный филогенетический анализ ДНК междисков с геномными ДНК из разных видов дрозофил показал, что нуклеотидные последовательности ДНК этих районов в целом эволюционно лабильны. Обнаружено, что нуклеотидная последовательность ДНК из междиска 61С7/С8 эволюционирует со скоростью, близкой к скорости нейтральной эволюции в подгруппе *melanogaster*. Такая эволюционная нестабильность предполагает либо отсутствие каких-либо важных функций для междиска, либо необязательность сохранения строгого порядка расположения нуклеотидов для выполнения его возможных функций. Показано, что наиболее вероятно последнее предположение: методом “филогенетического футпринта” в составе последовательности ДНК этого междиска выявлены эволюционно консервативные участки, которые могут иметь функциональное значение. В частности, были обнаружены области, содержащие возможный промотор и сайты связывания фактора транскрипции Adf-1 и инсуляторного белка BEAF-32. Связь этих белков с ДНК междиска 61С7/С8 показана экспериментально.

8. Впервые показана принципиальная возможность детального изучения механизмов формирования хромомерного рисунка хромосом с помощью моделирования междисковых структур в составе политенных хромосом транзгенными методами в комбинации с сайт-специфичными системами рекомбинации. С помощью этих систем получены данные, которые свидетельствуют об автономности декомпактного состояния исследованных междисков:

а) встраивание протяженных фрагментов ДНК из междисков 3С6/С7 и 61С7/С8 в другие районы хромосом в составе транспозона рISop приводит к образованию новых междисков, тогда как точная эксцизия этих фрагментов вызывает удаление данных междисков и слияние дисков, сформированных из материала транспозона ;

б) особенности организации хроматина в районах междисков 3С6/С7 и 61С7/С8 воспроизводятся и в составе инсерций, содержащих ДНК из этих районов.

Участники исследований

Семешин В.Ф
Ватолина Т.Ю.
Горчаков А.А.
Жимулев И.Ф.
Зимин П.И.
Зыков И.А.
Шароглазова И.В.
Шварц Ю.Б.
Шлома В.В.

Разин С.В.
Юдинкова Е.С.

**Институт
цитологии и генетики
Новосибирск**

**Институт
биологии гена
Москва**

Спасибо за внимание !!!