

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГЕНА *dunce* В БОЛЬШОЙ СЕРИИ БЛИЗЛЕЖАЩИХ СТРУКТУР ПОЛИТЕННОЙ ХРОМОСОМЫ *Drosophila melanogaster*

В. А. Хорошко^{1,*}, Г. В. Похолкова¹, Т. Ю. Зыкова¹,
И. С. Осадчий², академик РАН И. Ф. Жимулев^{1,3}

Поступило 08.08.2018 г.

Исследовали молекулярную и хромосомную локализацию гена *dunce*. Ген имеет размер 167,3 кб и почти целиком состоит из интронов, в которых также локализуется кластер из семи коротких тканеспецифичных генов. По результатам FISH-гибридизации фрагментов гена мы установили, что *dunce* лежит в пределах девяти хромосомных структур (четырёх дисков и пяти междисков), что не соответствует господствующим представлениям о локализации генов только в одной структуре — диске или междиске или их расположении на границе этих структур. Полученные результаты являются совершенно неожиданными и оригинальными и существенно расширяют современные представления о генетической организации интерфазных хромосом.

Ключевые слова: *dunce*, интроны, диски и междиски, политенные хромосомы *Drosophila melanogaster*, модель 4НММ.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524844507-510>

По данным Flybase (Release 6.22) геном дрозофилы содержит 17 753 гена (из них 13 931 кодируют белки). Анализ данных их размеров показал, что в среднем длина одного гена составляет около 6,9 кб. По функциям белоккодирующие гены можно разделить на две группы — гены “домашнего хозяйства” и гены развития. Гены “домашнего хозяйства” активны на всех стадиях развития дрозофилы, их промоторы располагаются в междисках, а структурные части образуют тонкие серые диски [1]. Гены развития находятся в дисках интеркалярного гетерохроматина и выполняют тканеспецифические функции [2].

Большой интерес представляет ген *dunce* (*dnc*), размер которого в 25 раз больше средней длины гена в геноме. Он кодирует цАМФ-фосфопептидазу, необходимую для нормального обеспечения функций обучения и памяти у дрозофилы, а также отвечает за фертильность самок [3]. Ген локализуется в районе 3C9–3D1,2, и его протяжённость составляет 167,3 кб (Flybase, Release 6.22). Около 94%

самого длинного транскрипта (*dnc-RS*) занимают интроны, в которых локализируются короткие гены (рис. 1б). Часть из них (*ng1*, *Sgs4*, *CG10793*) считывается в том же направлении, что и ген *dnc* (от теломеры к центромере), но для большей части из них (*CG14265*, *ng2*, *ng3*, *ng4*, *Pig1*) считывание производится по обратной цепи ДНК. У гена *dnc* 17 транскриптов, отвечающих за разные биологические функции [4]. Детальному исследованию локализации и функций гена *dnc* посвящено настоящее сообщение.

Функции гена *dnc* не связаны с функциями коротких генов, расположенных в его протяжённых интронах. Кластер генов, занимающий 11 кб, содержит *Pig1* (экспрессируется в слюнных железах), *Sgs-4* (экспрессия секрета в слюнных железах) и гены серии *ng* (*nested genes*) (активны на личиночных стадиях в слюнных железах) [4, 5].

Модель четырёх состояний хроматина 4НММ (описана ранее в [1]) позволяет изучить структуру хроматина, в которой лежит ген *dnc* (рис. 1б, в). Почти на всём протяжении гена соответствуют неактивные состояния хроматина *guby* и *malachite* (93%), что хорошо соотносится с суммарным размером интронов в гене (94%). Почти все 5'-концы транскриптов гена лежат в хроматине состояния *aquamarine* кроме трёх (*dnc-RG*, *dnc-RF*, *dnc-RL*), что соответствует междискам.

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии
Сибирского отделения Российской Академии наук,
Новосибирск

² Институт биологии гена
Российской Академии наук, Москва

³ Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет

* E-mail: vicerna@mcb.nsc.ru

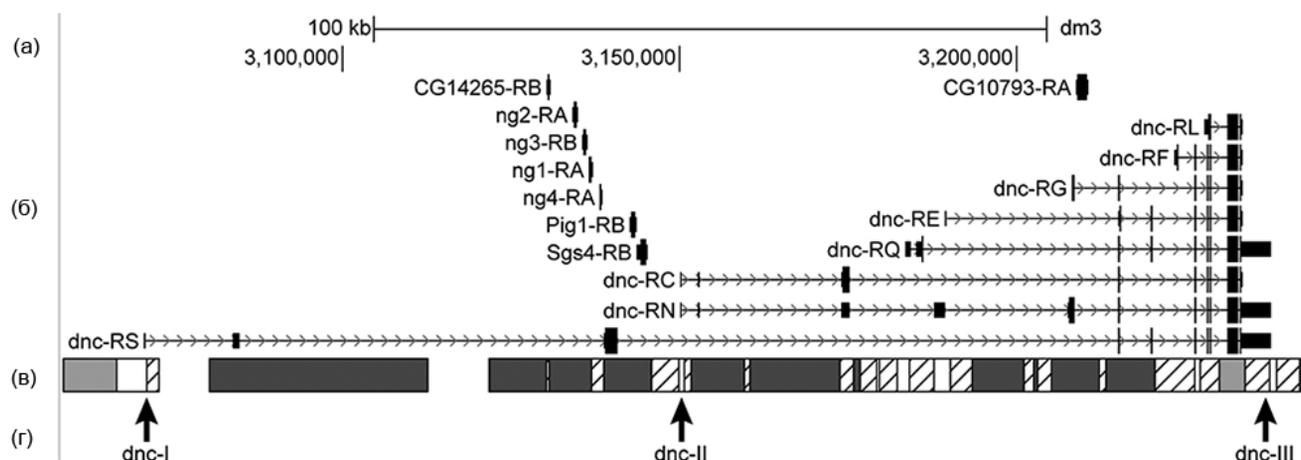


Рис. 1. Схема гена *dnc*. а — масштаб и координаты на молекулярной карте. б — расположение генов RefSeq (для *dnc* опущены транскрипты с одинаковой длиной и сходной структурой). в — модель 4НММ [1] (белым цветом отмечен хроматин aqua/magine, светло-серым — хроматин lasurite, косой штриховкой — хроматин malachite, тёмно-серым — хроматин ruby). г — расположение зондов FISH.

Цитологически ген *dnc* локализуется в районе 3С8–3D1,2, электронно-микроскопические фотографии всего района 3СD были получены В.Ф. Семешиным и соавторами ранее [6] (рис. 2б). Район содержит четыре двойных тёмных диска (3С2-3, 3С5-6, 3С9-10, 3D5-6), два двойных рыхлых диска (3D1,2 и 3D3,4), а также два тонких серых диска (3С1 и 3С7) [7] (рис. 2а). На электронно-микроскопических фотографиях все перечисленные хромосомные структуры различимы отчётливо, кроме двух плохо просматривающихся дисков между 3С7 и 3С9-10, 3С9-10 и 3D1,2, предсказанных К. Бриджесом [7] (рис. 2а, б).

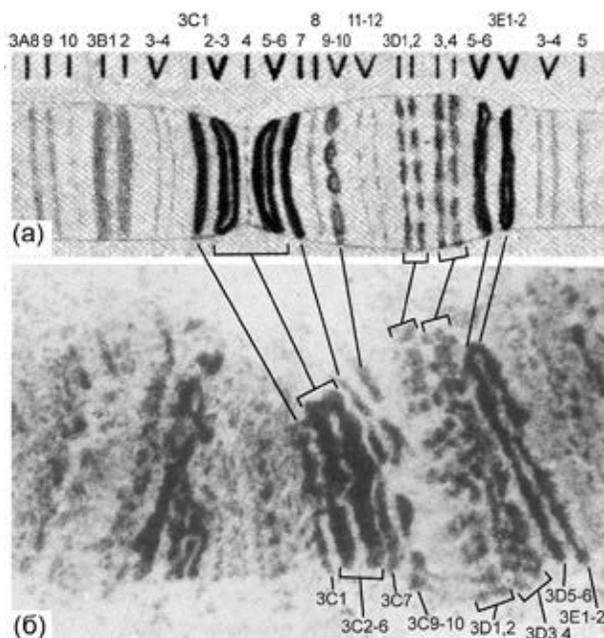


Рис. 2. Карта района 3СD. а — карта Бриджеса для района [7]; б — электронная микрофотография района [6].

Для определения точной локализации гена *dnc* на препарате политенных хромосом из слюнных желез дрозофилы мы применили метод FISH-гибридизации. В качестве зондов использовали три фрагмента ДНК (отмечены стрелками на рис. 1г), соответствующих 5'- и 3'-UTR самого длинного транскрипта (*dnc-RS*) и группе альтернативных промоторов (*dnc-RC*, *dnc-RP*), имеющих одинаковую локализацию 5'-концов. Локализация зондов соответствовала состоянию хроматина aqua/magine по модели 4НММ, что указывало на наличие междисков в этих районах.

По результатам FISH-гибридизации на цитологическом препарате потянутых политенных хромосом мы обнаружили, что зонды *dnc-I* и *dnc-III*, локализующие 5'- и 3'-концы гена были представлены двумя отдельными сигналами (рис. 1г, рис. 3а, б, в, г). Зонд *dnc-II*, локализующий старты альтернативных транскриптов гена (*dnc-RC*, *dnc-RN*, рис. 1), находился в середине между зондами *dnc-I* и *dnc-III* (рис. 3д, е).

Зонд *dnc-I* находился в междиске 3С7/3С8 и располагался на расстоянии 78,5 кб от зонда *dnc-II*, который лежал в междиске 3С9-10/3С11-12 (рис. 1г, рис. 3). Между зондами размещались два диска 3С8, 3С9-10, и они объединяли пять цитологических структур (диски 3С8, 3С9-10 и междиски 3С7/3С8, 3С8/3С9-10, 3С9-10/3С11-12). На молекулярной карте видно, что между зондами расположились восемь альтернативных транскриптов гена *dnc*, большей частью состоящих из интронов (~76 кб), и гены *CG14265*, *ng1*, *ng2*, *ng3*, *ng4*, *Pig1*, *Sgs4*, *CG10793* (рис. 1, рис. 2).

Зонд *dnc-III* локализовался в междиске 3D1,2/3D3,4 и находился на расстоянии 85,9 кб от зонда *dnc-II*, который лежал в междиске

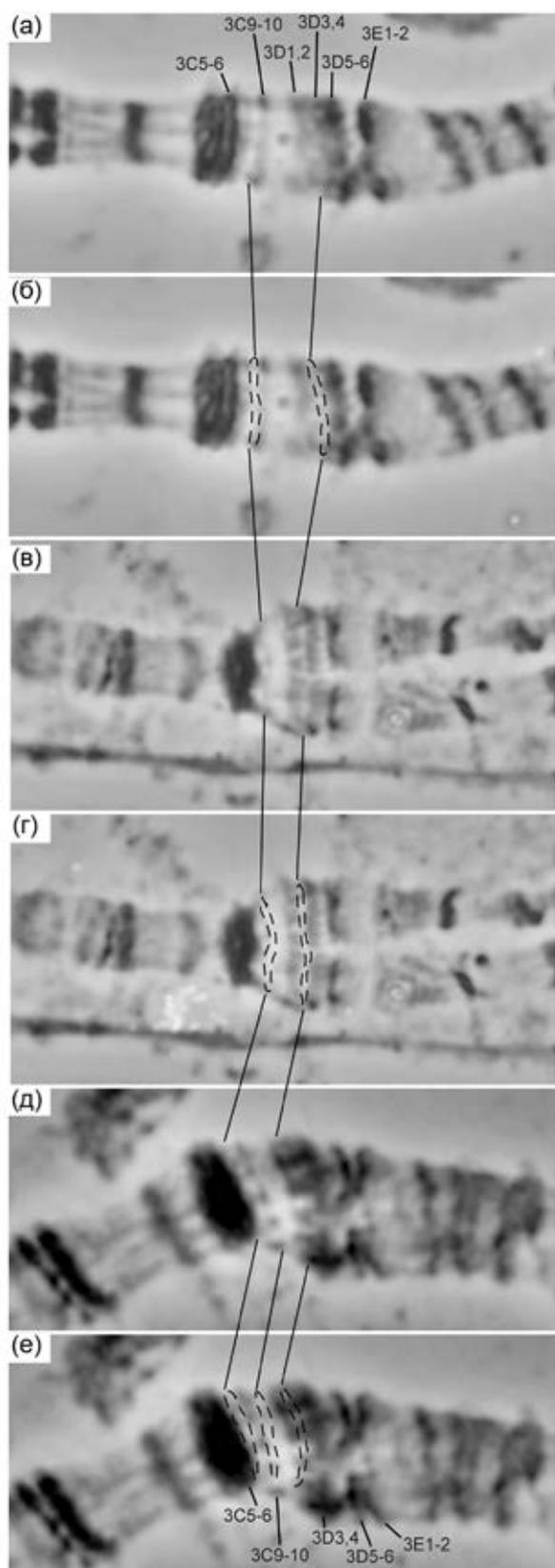


Рис. 3. FISH-гибридизация ДНК гена *dnc*. а, в, д — фазовые фотографии района 3CD; б, г, е — FISH-гибридизация зондов, сигналы флуоресценции для усиления изображения обведены пунктирной линией.

3C9-10/3C11-12 (рис. 1г, рис. 3д, е). Между зондами располагались два диска 3C11-12, 3D1,2, и они объединяли пять цитологических структур (диски 3C11-12, 3D1,2 и междиски 3C9-10/3C11-12, 3C11-12/3D1,2, 3D1,2/3D3,4). На молекулярной карте видно, что между зондами расположены 17 транскриптов гена *dnc*, большей частью состоящих из интронов (~78 кб), а также ген *CG10793* (рис. 1, рис. 3).

По результатам FISH-гибридизации можно сделать вывод, что зонды *dnc*-I, *dnc*-II и *dnc*-III локализуют ген *dnc*, который находится в пределах девяти цитологических структур — пяти междисков 3C7/3C8, 3C8/3C9-10, 3C9-10/3C11-12, 3C11-12/3D1,2, 3D1,2/3D3,4 и четырёх дисков 3C8, 3C9-10, 3C11-12, 3D1,2.

Таким образом, мы впервые показали, что в геноме дрозофилы существуют весьма интересные случаи расположения генов, отличающиеся от известных ранее [8, 9] (более подробный список моделей расположения генов представлен в [10]). Материал интронов, составляющих большую часть длины гена *dnc*, образует не только рыхлые серые и плотные тёмные диски, но и междиски, хроматин в которых открыт для репликации.

Источник финансирования. Работа поддержана грантом Российского научного фонда 14-14-00934 (анализ хроматина по модели 4НММ) и грантом РФФИ 17-00-00284 (проведение флуоресцентной гибридации *in situ*).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhimulev I.F., Zykova T.Y., Goncharov F.P., Khoroshko V.A., Demakova O.V., Semeshin V.F., Pokholkova G.V., Boldyreva L.V., Demidova D.S., Babenko V.N., Demakov S.A., Belyaeva E.S. Genetic Organization of Interphase Chromosome Bands and Interbands in *Drosophila melanogaster* // PLoS One. 2014. V. 9. № 7. e101631.
2. Belyakin S.N., Christophides G.K., Alekseyenko A.A., Kriventseva E.V., Belyaeva E.S., Nanayev R.A., Makunin I.V., Kafatos F.C., Zhimulev I.F. Genomic Analysis of *Drosophila* Chromosome Underreplication Reveals a Link between Replication Control and Transcriptional Territories // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. № 23. P. 8269–8274.
3. Qiu Y.H., Chen C.N., Malone T., et al. Characterization of the Memory Gene *dunce* of *Drosophila melanogaster* // J. Mol. Biol. 1991. V. 222. № 3. P. 553–565.
4. Qiu Y., Davis R.L. Genetic Dissection of the Learning/Memory Gene *dunce* of *Drosophila melanogaster* // Genes Develop. 1993. V. 7. № 7B. P. 1447–1458.
5. Furia M., D'Avino P.P., Crispi S., et al. Dense Cluster of Genes Is Located at the Ecdysone-Regulated 3C Puff of *Drosophila melanogaster* // J. Mol. Biol. 1993. V. 231. № 2. P. 531–538.

6. Семешин В.Ф., Артеро Р., Перес-Алонсо М, Шлома В.В. Электронно-микроскопическая гибридизация *in situ* проб, меченных dUTP-диоксигенином, с политенными хромосомами *Drosophila melanogaster* // Цитология. 1998. Т. 40. № 10. С. 893–894.
7. Bridges C.B. Salivary Chromosome Maps: with a Key to the Banding of the Chromosomes of *Drosophila melanogaster* // J. Hered. 1935. V. 26. № 2. P. 60–64.
8. Crick F. General Model for the Chromosomes of Higher Organisms // Nature. 1971. V. 234. № 5323. P. 25–27.
9. Paul J. General Theory of Chromosome Structure and Gene Activation in Eukaryotes // Nature. 1972. V. 238. № 5365. P. 444–446.
10. Zhimulev I.F. Genetic Organization of Polytene Chromosomes. N.Y.: Acad. Press, 1999. 599 p.

GENE *dunce* LOCALIZATION IN THE POLYTENE CHROMOSOME OF *Drosophila melanogaster* LONG SPAN BATCH OF ADJACENT CHROMOSOMAL STRUCTURES

V. A. Khoroshko, G. V. Pokholkova, T. Yu. Zykova, I. S. Osadchiy,
Academician of the RAS I. F. Zhimulev

Received August 8, 2018

The molecular and chromosomal localization of the *dunce* gene was studied. This gene (167.3 kb) consists almost entirely of introns, in which a cluster of seven short tissue-specific genes is located. On the basis of the results of FISH analysis of the gene fragments, we established that the *dunce* gene is located within nine chromosomal structures (four bands and five interbands), which contradicts the common idea that genes are located in only one structure (band or interband) or at the boundary of these structures. Our results are quite unexpected and original and greatly expand the current understanding of the genetic organization of interphase chromosomes.

Keywords: *dunce*, introns, bands and interbands, polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*, 4HMM model.