

УДК 577.213.3:576.316.352:595.773.4

КОМБИНАЦИЯ МУТАЦИЙ ГЕНОВ *OTU* И *RIF^r* ПОЗВОЛЯЕТ АНАЛИЗИРОВАТЬ САТЕЛЛИТНУЮ ДНК В ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМАХ ГЕРМИНАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЯИЧНИКОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2024 г. Т. Д. Колесникова^{1,*}, А. Р. Нохова², А. С. Шацких³, М. С. Кленов⁴, академик РАН И. Ф. Жимулев¹

Поступило 06.12.2023 г.

После доработки 08.12.2023 г.

Принято к публикации 09.12.2023 г.

Политенные хромосомы дрозофилы — классическая модель для цитогенетических исследований. Однако гетерохроматиновые районы хромосом обычно недореплицированы, что препятствует их анализу. Мутации гена *Rif^r* приводят к дополнительной репликации гетерохроматиновых последовательностей, включая сателлитную ДНК, в клетках слюнных желез. В настоящей работе мы исследовали влияние мутации *Rif^r* на представленность гетерохроматина в политенных хромосомах, которые формируются в герминальных питающих клетках яичников при мутации гена *otu*. Мы вывели линию *otu¹¹; Rif^{r1}* и обнаружили, что на фоне мутации *Rif^r* в клетках яичников происходит дополнительная политенизация прицентромерных районов, в том числе появляются крупные хроматиновые блоки, образованные сателлитной ДНК. Таким образом, эффекты мутации *Rif^r* оказались схожи в герминальных клетках и клетках слюнных желез. Система *otu¹¹; Rif^{r1}* открывает новые возможности для изучения факторов, ассоциированных с гетерохроматином, в процессе оогенеза.

Ключевые слова: политенные хромосомы, псевдопитающие клетки, *Rif^r*, недорепликация, гетерохроматин, сателлитная ДНК.

DOI: 10.31857/S2686738924020048, EDN: WFYUYA

Области конститутивного гетерохроматина, занимающие более трети генома *D. melanogaster*, состоят преимущественно из последовательностей мобильных элементов и высокоповторенной сателлитной ДНК, но также содержат важные для клетки функциональные элементы [1]. В политенных хромосомах (ПХ) *D. melanogaster* дикого типа гетерохроматиновые районы хромосом обычно практически не представлены вследствие явления недорепликации [2]. Недавно было обнаружено, что мутации гена *Rif^r*, консервативного регулято-

ра репликационного тайминга, приводят к полной репликации аннотированной области гетерохроматина в клетках слюнных желез (СЖ) [3]. Кроме того, на фоне мутаций *Rif^r* значительно подавлена недорепликация tandemных повторов — сателлитов и рибосомных генов [4].

Политенные хромосомы у дрозофилы могут образовывать не только клетки СЖ, но и герминальные клетки яичников. Яичники дрозофилы состоят из овариол — цепочек яйцевых камер, находящихся на разных этапах развития. Каждая яйцевая камера содержит оболочку соматических клеток, развивающийся ооцит и 15 герминальных питающих клеток, которые транскрипционно высокоактивны, поскольку обеспечивают продукцию белков и других факторов для развития транскрипционно-инертного ооцита. Хромосомы питающих клеток у мух дикого типа полиплоидны (до 8192 С), но не политенны [5]. Однако они могут стать политенными в результате определенных мутаций, например при мутации гена *otu* (*ovarian tumor*) [6]. Одним из аллелей, вызывающих образование политенных хромосом с четкой дисковой структурой в питающих

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

⁴Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

*E-mail: doliolida@gmail.com

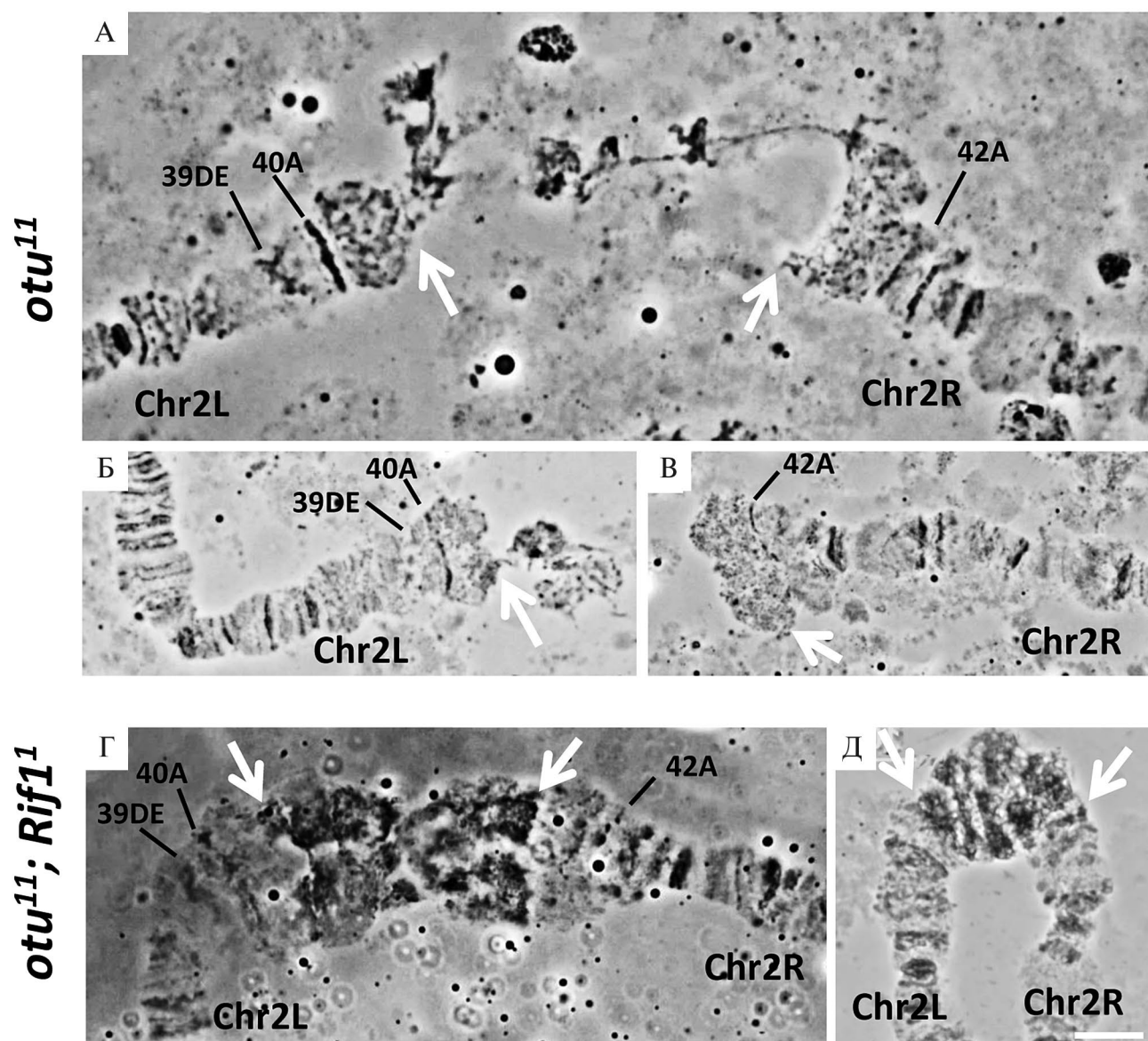


Рис 1. Мутация *Rif1¹* приводит к дополнительной политенизации прицентромерных районов в ППК. Показан прицентромерный район хромосомы 2 в ППК мутантов *otu¹¹* (А-В) и мутантов *otu¹¹; Rif1¹* (Г, Д). На фоне *Rif⁺* политенизированные плечи хромосомы 2 могут соединяться тонкими тяжами гетерохроматина (А). В других случаях левое (Б) и правое (В) плечи хромосомы 2 лежат отдельно друг от друга. Белые стрелки указывают на концы политенизированных участков хромосом. На фоне мутации *Rif1¹*, зона, фланкированная белыми стрелками, политенизируется, а хромосома 2 выглядит как единое целое и представлена блоками компактного хроматина, интенсивно окрашивающегося ацето-орсеином. Окраска — ацетоорсеином, фазовый контраст. Масштаб — 10 мкм.

клетках, является *otu¹¹* [6, 7]. При этом питающие клетки мутантов *otu* именуются псевдопитающими (ППК), потому что их морфология отличается от клеток дикого типа, и в яйцевых камерах часто отсутствуют ооциты, по отношению к которым питающие клетки выполняют трофическую функцию [8]. Стоит отметить, что в питающих клетках, в отличие от клеток СЖ, недорепликация гетерохроматина начинается не с первого, а только с пятого цикла репликации [9]. Вследствие этого в таких

хромосомах несколько снижена недорепликация гетерохроматина по сравнению с политенными хромосомами СЖ, что ведет к появлению дополнительных политенизированных блоков и уменьшению частоты разломов хромосом [10, 11]. Однако в целом политенные хромосомы СЖ и ППК схожи между собой: дисковые паттерны хорошо коррелируют, проявляя лишь незначительные различия [7].

Целью данного исследования было проверить, будет ли мутация гена *Rif¹* влиять на недореплика-

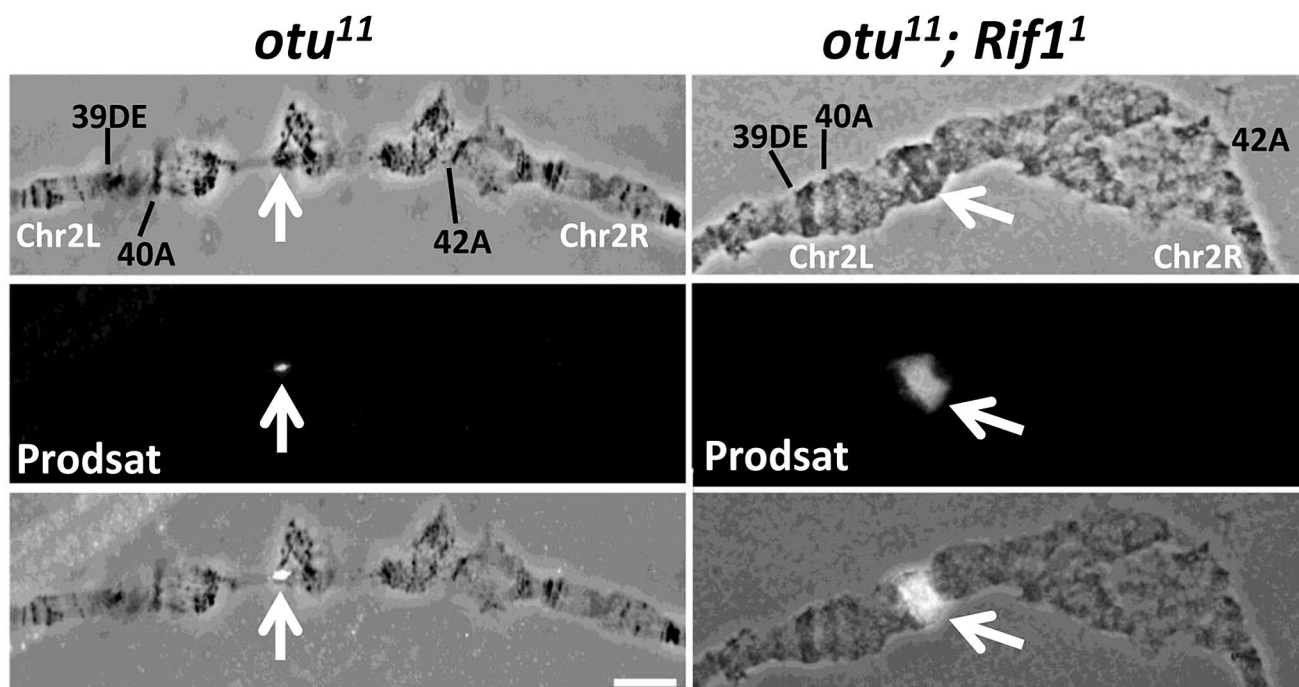


Рис. 2. Мутация *Rif1*¹ приводит к политенизации сателлита Prodsat в хромосоме 2 ППК. Приведены фазово-контрастные изображения с окраской ацетоорсеином (верхний ряд), результат гибридизации *in situ* зонда к сателлиту Prodsat (средний ряд) и наложение сигнала на фазово-контрастное изображение (нижний ряд). Масштаб — 10 мкм.

цию гетерохроматина в политенных хромосомах клеток зародышевого пути — ППК. Для этого мы вывели линию *otu*¹¹; *Rif1*¹ и охарактеризовали влияние *Rif1*¹ на гетерохроматиновые районы политенных хромосом в питающих клетках. Для объединения двух мутаций в одном генотипе вторая хромосома линии у *w otu*¹¹ *sn*¹/*FM3* [7] была заменена на вторую хромосому из линии *w*¹¹⁸; *Rif1*¹ [3]. В результате была получена линия с генотипом у *w otu*¹¹ *sn*¹/*FM3*; *Rif1*¹.

Для анализа политенных хромосом из ППК самок, гомозиготных по хромосоме у *w otu*¹¹ *sn*¹, содержали на питательной среде с добавлением сухих дрожжей при температуре 18 °С. Для получения препаратов политенных хромосом из самок возрастом 8–12 дней извлекали яичники в растворе PBS, затем переносили их в каплю ацетоорсеина (1%-й орсеин в 45%-й уксусной кислоте) на 20–30 мин, а после этого — в каплю 55%-й молочной кислоты, в которой яичники разделяли на отдельные яйцевые камеры.

Для анализа выбирали камеры, содержащие крупные ядра питающих клеток круглой формы. Отобранные яйцевые камеры переносили пипеткой в каплю 55%-й молочной кислоты на покровное стекло и накрывали предметным стеклом. После легкого постукивания препаративной иглой под контролем настольного микроскопа и удаления лишней жидкости при помощи фильтровальной бумаги покровное стекло придавливали пальцем

через фильтровальную бумагу для достижения оптимального распластывания и расправления хромосом. Препараты анализировали при помощи микроскопа Olympus BX51, с объективом 100×/1.30 Uplan FI Ph3 и цифровой камерой DP52.

В ядрах ППК мутантов *otu*¹¹ политенные хромосомы не формируют общий хромоцентр: на препаратах плечи аутосом либо лежат отдельно, либо соединяются тонкими нитями (рис. 1А–В). Введение мутации *Rif1*¹ привело к резкому изменению морфологии прицентромерных районов. Плечи хромосом оказались соединены блоками компактного материала (рис. 1Г, Д).

Ранее мы показали, что в СЖ такое изменение морфологии связано с политенизацией сателлитной ДНК. Для проверки влияния мутации *Rif1*¹ на политенизацию сателлитной ДНК в ППК мы провели *in situ* гибридизацию (FISH) с зондом к сателлиту Prodsat (AATAACATAG), занимающему протяженные участки гетерохроматина в хромосомах 2L и 3R вблизи центромер [12]. Ранее политенизация этого сателлита на фоне мутации *Rif1*¹ была нами показана в политенных хромосомах СЖ [4]. Чтобы добиться наилучшей морфологии хромосом на препаратах для FISH из ППК, мы разработали новый подход приготовления препаратов, включающий дополнительную окраску хромосом ацетоорсеином. На первом этапе препараты хромосом готовили по схеме, описанной выше. Затем

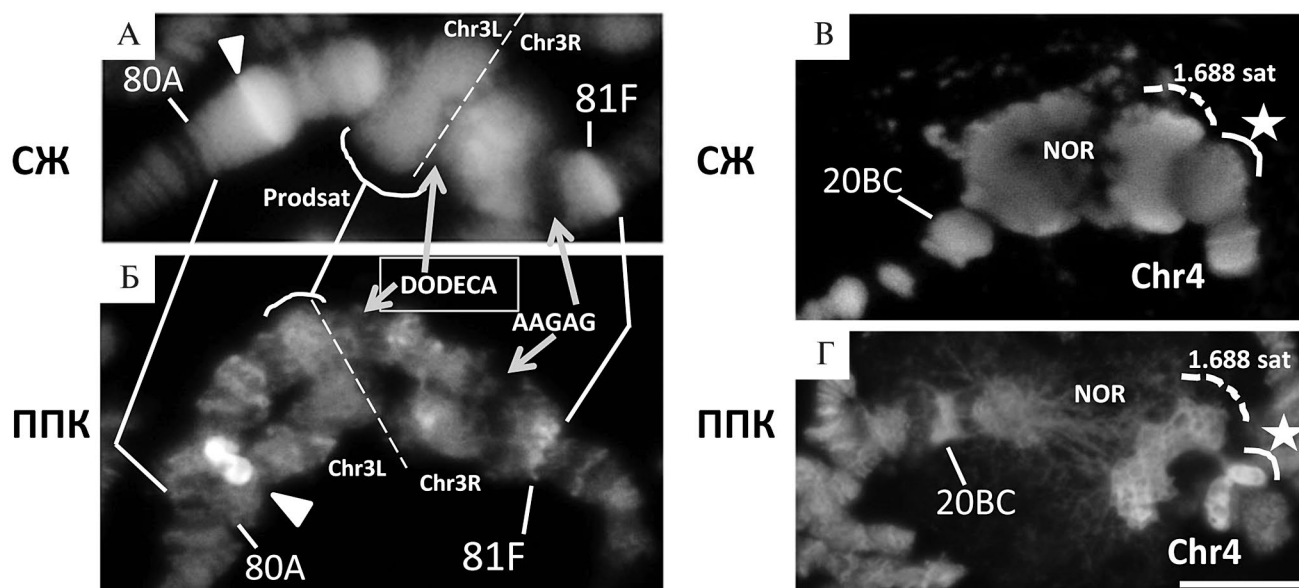


Рис. 3. Окрашенные DAPI прицентромерные районы хромосомы 3 в политенных хромосомах СЖ (А) и ППК (Б) на фоне мутации *Rif^I*. Участок, ограниченный районами 80А и 81F, соответствует митотическому гетерохроматину хромосомы 3. Стрелками и линиями показаны районы, имеющие сходную морфологию в двух типах клеток, а также указан предполагаемый состав ДНК для некоторых районов согласно [4]. Белый треугольник указывает на DAPI-позитивный блок, соответствующий блоку h48 карты митотического гетерохроматина. Скобкой выделено положение сателлита Prodsat, фланкирующего центромеру хромосомы 3. Приблизительное положение центромеры указано пунктирной линией, пересекающей хромосому в соответствии с [4] для политенных хромосом СЖ и по сходству морфологии соответствующих районов в ППК. В,Г. Объединенные прицентромерные районы политенных хромосом X и 4 в СЖ (В) и ППК (Г). Окрашивание — DAPI, масштаб — 10 мкм.

препараты прогревали на настольном термостате при 70°C 10 с для лучшего прикрепления хромосом к стеклу, фотографировали хромосомы при помощи фазово-контрастного микроскопа, после чего препараты замораживали в жидком азоте, скалывали покровное стекло, дофиксировали и хранили в 96%-й этаноле при температуре –18 °C. В хромосомах ППК мутантов *otu¹¹*; *Rif^I* наблюдалось резкое усиление сигнала FISH Prodsat по сравнению с *otu¹¹* (рис. 2). В ППК одиночных мутантов *otu¹¹*, несмотря на то что там проходит несколько раундов полной репликации генома, этот сателлит представлен лишь маленькой точкой.

Снижение недорепликации сателлитов в политенных хромосомах СЖ у *Rif^I*-мутантов приводит к появлению крупных чередующихся блоков DAPI-позитивного и DAPI-негативного материала, которые соответствуют тем же блокам в метафазных хромосомах *D. melanogaster*. Таким образом, можно получить своего рода “дифференциальное окрашивание”, выявляющее блоки разных сателлитов, что позволяет изучать особенности организации хроматина, которые связаны с сателлитной ДНК, а также облегчает идентификацию сателлитов [4]. Для доказательства дополнительной политенизации сателлитной ДНК на фоне *Rif^I* в ППК мы провели более детальный анализ морфологии прицентромерных районов хромосом с помощью окрашивания

DAPI (рис. 3). Для этого препараты, приготовленные по методике, описанной выше, замораживали в жидком азоте, скалывали покровное стекло, дофиксировали в 96%-й этаноле, высушивали и покрывали средой VectaShield с добавлением 0.15 мкг/мл DAPI.

На примере хромосомы 3 можно видеть, что чередование DAPI-позитивных и DAPI-негативных блоков в прицентромерных районах политенных хромосом СЖ и ППК мутантов по гену *Rif^I* сходно и позволяет визуализировать отдельные блоки политенизированных сателлитов (см. рис. 3).

Например, DAPI-негативный блок сателлита ААГАГ характерен для политенных хромосом обоих типов. В хромосомах ППК мутантов *otu¹¹*; *Rif^I* наблюдается характерное для политенных хромосом СЖ мутантов по гену *Rif^I* объединение прицентромерных районов хромосом X и 4 (см. рис. 3 В,Г). Отчетливо видна зона, соответствующая ядрышкообразующему району (NOR). В основании хромосомы 4 расположены два сходных в двух типах клеток крупных блока DAPI-позитивного материала, соответствующие в ПХ СЖ блокам сателлита 1.688 и тандемным повторам типа ААНАН из гетерохроматина хромосомы 4 и проксимального гетерохроматина хромосомы X (см. рис. 3В,Г).

Чтобы дополнительно подтвердить, что сходные по морфологии блоки гетерохроматина в хромо-

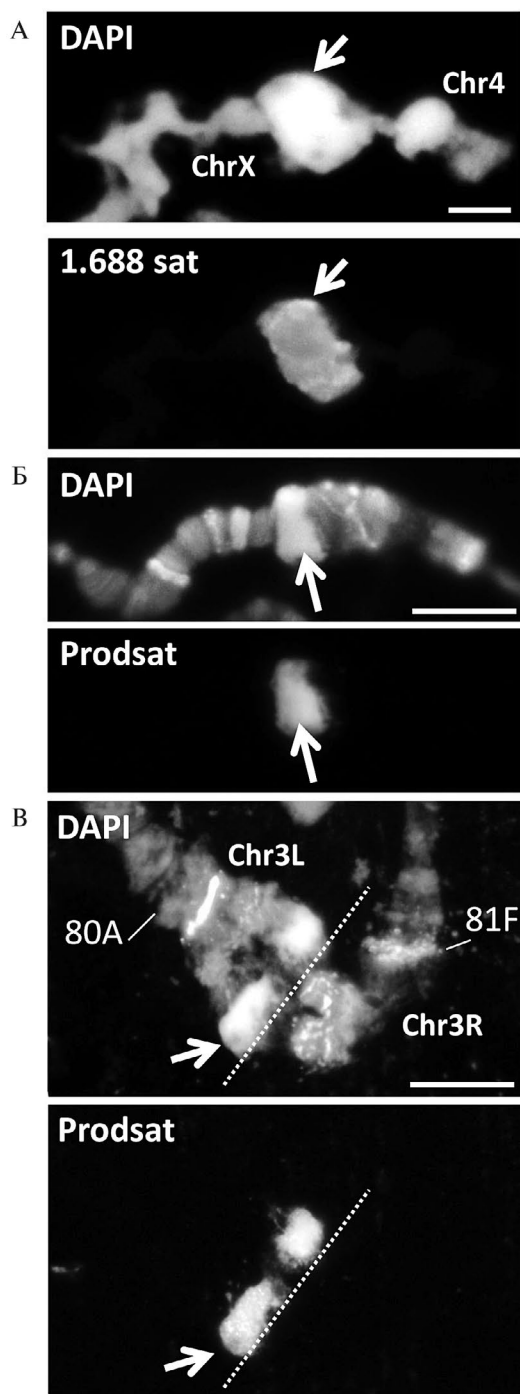


Рис. 4. Результаты FISH с зондами к сателлитам 1.688 и Prodsat в политенных хромосомах ППК (А,В) и СЖ (Б) мутантов *otu¹¹; Rif¹*. А. Один из двух блоков DAPI-позитивного материала в основании хромосомы 4 гибридизуется с пробой к сателлиту 1.688, что соответствует выводу, сделанному на основании морфологического анализа. Выявление фланкирующего центромеру хромосомы 3 сателлита Prodsat в СЖ (Б) и ППК (В). Положение сигнала полностью соответствует предсказанию, сделанному на основе анализа морфологии. Окрашивание — хромосом DAPI. Положения сигнала отмечены стрелками. Масштаб — 10 мкм.

сомах СЖ и ППК — это одни и те же блоки сателлитной ДНК, мы провели FISH сателлитов 1.688 и Prodsat. Мы показали, что в ППК сателлит 1.688 выявляется в виде протяженного блока, присоединенного к хромосоме 4. Сателлит Prodsat, который фланкирует хромоцентры аутосом, выявляется в хромосомах 3 в виде большого блока DAPI-позитивного материала в середине гетерохроматина хромосомы 3 как в СЖ (рис.4 Б), так и в ППК (рис. 4В). Эти результаты полностью соответствуют нашим ожиданиям, основанным на данных, полученных ранее для политенных хромосом СЖ мутантов *Rif¹*.

В целом наши данные позволяют заключить, что в политенных хромосомах клеток зародышевого пути, так же как и в клетках слюнных желез, репликация гетерохроматиновых областей генома и сателлитной ДНК находится под контролем белка *Rif¹*. Комбинация мутаций *otu¹¹; Rif¹* приводит к появлению в герминальных клетках яичников политенных хромосом с полностью реплицированными прицентромерными областями, структура которых аналогична таковой в политенных хромосомах клеток слюнных желез мутантов по гену *Rif¹*. Система *otu¹¹; Rif¹* может быть использована для изучения районов гетерохроматина и связанных с ними белков в процессе оогенеза, что представляет особый интерес в связи с существованием герминально-специфичных механизмов репрессии мобильных элементов и сателлитов [13–15].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Д. Е. Корякова за помощь в освоении работы с хромосомами ППК.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Часть работы, связанная с морфологическим анализом хромосом питающих клеток, была выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00051-П). Часть работы, связанная с проведением гибридизации *in situ* выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00382).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

В соответствии с пунктом 3 главы 1 Директивы 2010/63/ЕС от 2.09.2022 г. о защите животных, используемых в научных целях, требования биоэтики не распространяются на объект данного исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marsano R.M., Giordano E., Messina G., et al. A New Portrait of Constitutive Heterochromatin: Lessons from *Drosophila melanogaster* // Trends Genet. 2019. V. 35. P. 615–631.
2. Zhimulev I.F. Polytene Chromosomes, Heterochromatin, and Position Effect Variegation // Adv. Genet. 1998. V. 37. P. 1–555.
3. Munden A., Rong Z., Sun A., et al. Rif1 inhibits replication fork progression and controls DNA copy number in *Drosophila* // eLife. 2018. V.7. e39140.
4. Kolesnikova T.D., Kolodyazhnaya A.V., Pokholkova G.V., 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. V. 9. P. 1501.
5. McLaughlin J.M., Bratu D.P. *Drosophila melanogaster* Oogenesis: An Overview // Methods Mol Biol. 2015. V. 1328. P. 1–20.
6. King R.C., Riley S.F., Cassidy, J.D., et al. Giant polytene chromosomes from the ovaries of a *Drosophila* mutant // Science. 1981. V. 212. P. 441–443.
7. Mal'ceva N.I., Gyurkovics H., Zhimulev I.F. General characteristics of the polytene chromosome from ovarian pseudonurse cells of the *Drosophila melanogaster* *otu11* and *fs(2)B* mutants // Chromosome. 1995. Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol. V. 3. P. 191–200.
8. Heino T.I. Polytene chromosomes from ovarian pseudonurse cells of the *Drosophila melanogaster* *otu* mutant. I. Photographic map of chromosome 3 // Chromosoma. 1989. V. 97. P. 363–373.
9. Dej K.J., Spradling A.C. The endocycle controls nurse cell polytene chromosome structure during *Drosophila* oogenesis // Dev. Camb. Engl. 1999. V. 126. P. 293–303.
10. Mal'ceva N.I., Zhimulev I.F. Extent of polytene in the pericentric heterochromatin of polytene chromosomes of pseudonurse cells of *otu* (ovarian tumor) mutants of *Drosophila melanogaster* // Mol. Gen. Genet. 1993. V. 240. P. 273–276.
11. Koryakov D.E., Domanitskaya E.V., Belyakin S.N., et al. Abnormal tissue-dependent polytenization of a block of chromosome 3 pericentric heterochromatin in *Drosophila melanogaster* // J. Cell Sci. 2003. V. 116. P. 1035–1044.
12. Garavís M., Méndez-Lago M., Gabelica V., et al. The structure of an endogenous *Drosophila* centromere reveals the prevalence of tandemly repeated sequences able to form i-motifs // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 13307.
13. Yang F., Xi R. Silencing transposable elements in the *Drosophila* germline // Cell Mol Life Sci. 2017. V. 74. P. 435–448.
14. Sato K., Siomi M.C. The piRNA pathway in *Drosophila* ovarian germ and somatic cells // Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2020. V. 96. P. 32–42.
15. Wei X., Eickbush D.G., Speece I., et al. Heterochromatin-dependent transcription of satellite DNAs in the *Drosophila melanogaster* female germline // Elife. 2021. V. 10. e62375.

OTU AND RIF¹ DOUBLE MUTANT ENABLES ANALYSIS OF SATELLITE DNA IN POLYTENE CHROMOSOMES OF OVARIAN GERM CELLS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

T. D. Kolesnikova^{a,*}, A. R. Nokhova^b, A. S. Shatskikh^c, M. S. Klenov^d,
Academician of the RAS I. F. Zhimulev^a

^aInstitute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russia

^bNovosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

^cNational Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, Russian Federation

^dInstitute of Molecular Genetics RAS, Moscow, Moscow, Russian Federation

*E-mail: doliolida@gmail.com

Polytene chromosomes in *Drosophila* serve as a classical model for cytogenetic studies. However, heterochromatic regions of chromosomes are typically under-replicated, hindering their analysis. Mutations in the *Rif*¹ gene lead to additional replication of heterochromatic sequences, including satellite DNA, in salivary gland cells. Here, we investigated the impact of the *Rif*¹ mutation on heterochromatin in polytene chromosomes formed in ovarian germ cells due to the *otu* gene mutation. By the analysis of *otu*¹¹; *Rif*¹ double mutants, we found that, in the presence of the *Rif*¹ mutation, ovarian cells undergo additional polytenization of pericentromeric regions. This includes the formation of large chromatin blocks composed of satellite DNA. Thus, the effects of the *Rif*¹ mutation were similar in salivary gland and germ cells. The *otu*¹¹; *Rif*¹ system opens new possibilities for studying factors associated with heterochromatin during oogenesis.

Keywords: polytene chromosomes, pseudonurse cells, Rif¹, under-replication, heterochromatin, satellite DNA.