

Политенные хромосомы как инструмент для поиска факторов, влияющих на эффективность инициации репликации ДНК

Колесникова Т.Д.^{1*}, Воробьева Н.Е.², Черендина К.П.³, Балантаева М.Н.³,
Довгань В.В.⁴, Шуберт В.⁵, Жимулев И.Ф.¹

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

² Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

³ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁴ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

⁵ Институт генетики растений и исследований сельскохозяйственных культур имени Лейбница, Гатерслебен, Германия

* kolesnikova@mcb.nsc.ru

Ключевые слова: *Drosophila*; политенные хромосомы; инициация репликации; эффективность инициации репликации; EcR, 3D-SIM

Мотивация и цель: В эукариотических клетках в каждом клеточном цикле используется лишь небольшая доля потенциальных сайтов инициации репликации ДНК, при этом каждый сайт характеризуется определенной вероятностью (эффективностью) инициации репликации. Политенные хромосомы дрозофилы в сочетании с микроскопией сверхвысокого разрешения дают уникальную возможность для анализа вероятностного характера инициации репликации на ультраструктурном уровне. Ранее мы показали, что инициация репликации в политенных хромосомах происходит преимущественно в интервалах между наиболее компактными дисками политенных хромосом, а внутри этих интервалов инициация носит вероятностный характер [1, 2]. Каждый интервал действует как зона инициации репликации, где на каждой нити ДНК репликация инициируется лишь на одном из потенциальных ориджинов репликации. Эти зоны существенно различаются по вероятности инициации репликации в единицу времени. Целью работы было выявить зоны, инициирующие репликацию максимально эффективно, и выяснить, какие факторы влияют на эффективность инициации в политенных хромосомах слюнных желез *Drosophila melanogaster*.

Методы и алгоритмы: Мы анализировали сайты ранней эффективной инициации репликации у личинок дикого типа, а также при индукции эктопической S фазы слабым тепловым шоком у личинок линий дрозофил, несущих трансген *hsp70-SusE* [3]. Для визуализации репликации использовали импульсное включение 5-этинил-2'-дезоксинуридин (EdU). Для визуализации в политенных хромосомах активной транскрипции и связывания транскрипционных факторов использовали иммуноокрашивание политенных хромосом соответствующими антителами. Для выявления цитологических сигналов в политенных хромосомах с максимальным разрешением была использована микроскопия сверхвысокого разрешения со структурированным освещением (3D-structured illumination microscopy, 3D-SIM).

Результаты и выводы: Мы выявили около 80 сайтов очень эффективной инициации ранней репликации, в которых инициация происходит на большинстве нитей политенной хромосомы в первые несколько минут S фазы. Некоторые

хромосомные локусы демонстрировали эффективную инициацию репликации на всех анализируемых стадиях личиночного развития, тогда как другие выступали в роли эффективных сайтов инициации репликации только на определенных стадиях. Многие сайты соответствовали локусам генов, транскрипция которых регулируется гормоном экдизоном, и сайтам связывания антител к белку рецептора экдизона (EcR). При этом у личинок дикого типа инициация репликации и активная транскрипция в этих локусах происходят на разных этапах развития, что может быть связано с механизмом избегания конфликта между репликацией и транскрипцией в этих локусах. Исключением является группа генов *sgs*, производящих секрет слюнной железы, максимальная экспрессия которых совпадает со стадией развития, когда многие клетки слюнных желез вступают в S фазу. Локализация выявленных сайтов на геномной карте и анализ распределения факторов транскрипции и модификаций хроматина позволил сделать вывод, что в клетках слюнных желез наиболее эффективные ориджины/кластеры ориджинов появляются в участках хромосом, несущих энхансерные маркеры.

Финансирование: Исследование поддержано РНФ (№ 24-14-00133).

Polytene chromosomes as a tool to identify factors influencing the efficiency of DNA replication initiation

Kolesnikova T.D.^{1*}, Vorobyeva N.E.², Cherendina K.P.³, Balantaeva M.N.³,
Dovgan V.V.⁴, Schubert V.⁵, Zhimulev I.F.¹

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Gene Biology, RAS, Moscow, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁴ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

⁵ Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Germany

* kolesnikova@mcb.nsc.ru

Key words: *Drosophila*; polytene chromosome; replication initiation; origin efficiency; EcR

Motivation and Aim: In eukaryotic cells, only a small fraction of potential DNA replication initiation sites is used in each cell cycle, and each site is characterized by a certain probability (efficiency) of replication initiation. *Drosophila* polytene chromosomes, combined with super-resolution microscopy, provide a unique opportunity to analyze the probabilistic nature of replication initiation at the ultrastructural level. We have previously shown that the initiation of replication in polytene chromosomes occurs predominantly in the intervals between the most compact polytene chromosome bands, and within these intervals the initiation is probabilistic [1, 2]. Each interval acts as a replication initiation zone, where on each DNA strand, replication is initiated at only one of the potential origins of replication. These zones differ significantly in the probability of replication initiation per time unit. The goal of the work was to identify the zones that initiate replication very efficiently and to find out what factors influence the efficiency of initiation in *D. melanogaster* salivary gland polytene chromosomes.

Methods and Algorithms: We analyzed very efficient early replication initiation sites in wild-type polytene chromosomes, and in chromosomes of hsp70-CycE larvae [3] after ectopic S phase induction [2]. To visualize replication, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) pulses were applied. To visualize active transcription and binding of transcription factors in polytene chromosomes, immunostaining with appropriate antibodies was performed. To analyze the ultrastructure of chromatin and immunosignals at the super-resolution level spatial structured illumination microscopy (3D-SIM) was applied.

Results and Conclusions: We identified ~80 very efficient early replication initiation sites, in which initiation occurs on most polytene chromosome strands during the first few minutes of the S phase. Some chromosomal loci demonstrated efficient initiation of replication at all stages of larval development analyzed, whereas others acted as effective replication initiation sites only at certain stages. Many of the sites corresponded to gene loci whose transcription is regulated by the hormone ecdysone and stained by antibodies to the ecdysone receptor (EcR) protein. Moreover, in wild-type larvae, the initiation of replication and active transcription in these loci occur at different developmental stages, which may be associated with a mechanism to avoid a conflict between replication and transcription. An exception is the group of *sgs* genes that produce salivary gland secretions. Here the maximum transcription coincides with the developmental stage when many salivary gland cells enter the S phase. The localization of the identified efficient early replication initiation sites on the genomic map and the analysis of the distribution of transcription factors and chromatin modifications led to the conclusion that in salivary gland cells, the most efficient replication origins occur in chromosomal regions containing transcriptional enhancers.

Funding: The study is supported by RSF (No. 24-14-00133).

Список литературы/References

1. 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;13(4):e0195207
2. Kolesnikova T.D., Pokholkova G.V., Dovgan V.V., Zhimulev I.F., Schubert V. Super-resolution microscopy reveals stochastic initiation of replication in *Drosophila* polytene chromosomes. *Chromosome Res.* 2022;30(4):361-383
3. Knoblich J.A., Sauer K., Jones L., Richardson H., Saint R., Lehner C.F. Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell*. 1994;77(1):107-120