

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕТЕРОХРОМАТИНА В ХРОМОСОМАХ ДРОЗОФИЛЫ

И. Ф. ЖИМУЛЕВ

Новосибирский государственный университет

MOLECULAR AND GENETIC ORGANIZATION OF HETEROCHROMATIN IN DROSOPHILA CHROMOSOMES

I. F. ZHIMULEV

A short review of the modern data on molecular and genetic organization of heterochromatin, its differences from euchromatin and peculiarities of the function of "heterochromatic" genes during development of organisms is presented.

Представлен краткий обзор современных данных о молекулярной и генетической организации гетерохроматина, его отличиях от эухроматина, особенностях функционирования генов, локализованных в гетерохроматине, в ходе развития организмов.

ВВЕДЕНИЕ

Геномом в современной генетике называют совокупность генов и иных последовательностей ДНК, содержащихся в клеточном ядре с гаплоидным набором хромосом, например в головке сперматозоида или ядре яйцеклетки. Оказалось, что фактически у всех эукариот геном можно разделить на две части, различные по генетической и молекулярной организации входящей в них ДНК, — эухроматин и гетерохроматин.

Разделение материала хромосом на эу- и гетерохроматин было сделано в конце 1920-х — начале 1930-х годов, когда о роли ДНК в наследственности еще и не задумывались. Дело в том, что еще с начала XX века знали о наличии в интерфазных ядрах особых, сильно окрашенных и компактных гранул или зерен (рис. 1, *z–e*). В то же время было известно, что разные участки митотических хромосом также различаются по степени окрашиваемости. Эти различия становятся легко заметными начиная с ранней профазы. В конце метафазы они исчезают.

Э. Хайц в 1928 году предположил, что в хромосомах есть районы, составляющие основную часть хромосом, которые претерпевают обычный цикл компактизации—декомпактизации во время митоза; он назвал их эухроматином, то есть собственно хроматином. Другие районы — гетерохроматиновые (отличные от эухроматиновых) постоянно находятся в компактном состоянии. В митотических хромосомах гетерохроматин чаще всего расположен в прицентромерных районах, у многих видов животных Y-хромосома является полностью гетерохроматиновой (рис. 1, *a–b*). В телофазе эухроматиновые районы декомпактизуются, в то время как гетерохроматиновые блоки хромосом остаются компактными и в последующей интерфазе образуют упомянутые выше зерна компактного хроматина.

За годы, прошедшие после открытия Э. Хайца, в области изучения гетерохроматина накопился огромный объем данных. Выяснилось, что гетерохроматин

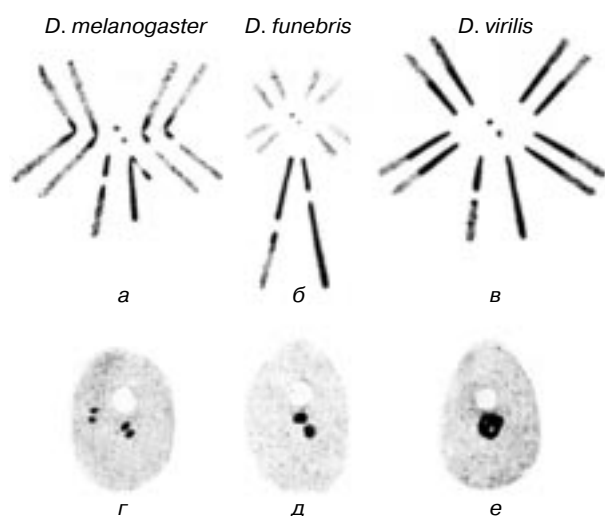


Рис. 1. Прицентроммерный гетерохроматин в метафазных хромосомах – темные части хромосом (а–в) и интерфазных ядрах – черные капли материала (г–е) у некоторых видов дрозофилы (рисунок из статьи Э. Хайца, взят из [1])

характерен для геномов всех эукариот, что его количество в геноме каждого вида весьма существенно, например в хромосомах дрозофилы доля гетерохроматина составляет около 33%. По молекулярным и генетическим характеристикам гетерохроматин существенно отличается от эухроматина. Ниже суммированы эти различия, выявленные для генома дрозофилы как лучшего модельного объекта, используемого в генетических исследованиях.

РАЗЛИЧИЯ В ОРГАНИЗАЦИИ ЭУ- И ГЕТЕРОХРОМАТИНА ДРОЗОФИЛЫ

Наиболее существенные свойства эу- и гетерохроматина, характеризующие различия в их организации, приведены в табл. 1.

Даже первого взгляда на эту таблицу достаточно, чтобы увидеть, насколько эу- и гетерохроматин различны по строению и функционированию. Некоторые из свойств очень интересны, и мы рассмотрим их более детально.

Таблица 1. Свойства эу- и гетерохроматина дрозофил

Свойства	Эухроматин	Гетерохроматин
Доля генома	67%	33%
Расположение в хромосомах	Плечи хромосом	В прицентроммерных областях, вся Y-хромосома
Состояние компактности в клеточном цикле	В ходе митотического и мейотического делений	На протяжении всего клеточного цикла
Компактизирующее влияние на приближенные участки хромосом (эффект положения мозаичного типа)	Не оказывает	Участки эухроматина, приближенные к гетерохроматину, также становятся компактными, а гены в них инактивируются
Способность объединяться с другими районами хромосом	Не отмечена	Гетерохроматиновые участки объединяются, образуя хромоцентры
Образование хромосомных перестроек	Обычная частота обнаружения	Повышенная частота обнаружения
Расположение в клеточном ядре	По всему объему ядра	Главным образом на ядерной оболочке
Время синтеза ДНК в клеточном цикле	Первые 3/4 периода синтеза ДНК в интерфазе (S-периода)	Последняя половина S-периода. Завершение процесса репликации ДНК сильно задержано
Дифференциальная окраска специфическими красителями (С-окраска)	Отсутствие окраски	Интенсивная окраска
Фракции ДНК по степени повторности	~90% уникальных последовательностей и ~10% умеренно повторенных	Основная масса ДНК представлена высокоповторенными фракциями, в меньшей степени умеренными повторами и совсем мало уникальных последовательностей
Наличие особых компактизирующих белков, например белка HP1	Почти отсутствует	Обильно присутствует по всему гетерохроматину
Варьирование количества материала в хромосомах	Заметное варьирование не обнаружено	Варьирование количества гетерохроматина широко представлено в каждой хромосоме
Генетическое содержание	Основная часть всех генов генома локализована в эухроматине	Гены почти отсутствуют

Эффект положения мозаичного типа

Одним из удивительных свойств гетерохроматина является его способность передавать компактизованное состояние на эухроматиновые фрагменты хромосом, перенесенные в его соседство с помощью хромосомных перестроек (рис. 2). Гены в перенесенном фрагменте инактивируются, хотя и не во всех клетках одного и того же органа. Например, если ген w^+ у дрозофилы, обеспечивающий нормальный красный цвет глаз у мухи, переносится с помощью инверсии $In(1)w^{m4}$ в новое положение — в окружение прицентромержного гетерохроматина, в части клеток он инактивируется. В результате на фоне нормально окрашенных участков глаза будут появляться пятна из неокрашенных белых клеток, в которых ген w^+ инактивирован — образуется как бы мозаика из окрашенных и неокрашенных клеток (см. рис. 2). Это явление, называемое эффектом положения мозаичного типа, в настоящее время изучают весьма интенсивно, поскольку исследователи полагают, что оно является удобной моделью для понимания генетического контроля механизмов компактизации—декомпактизации хроматина.

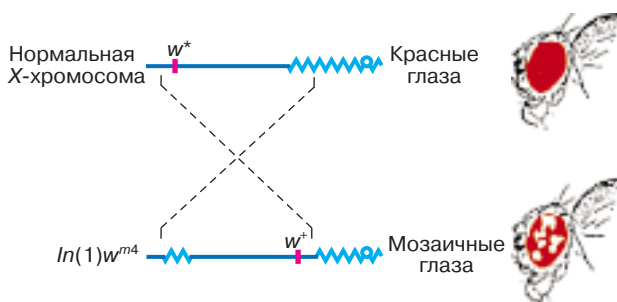


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая эффект положения мозаичного типа — генетическую инактивацию эухроматинового фрагмента хромосомы, содержащего ген w^+ , перенесенного в соседство гетерохроматина

Дифференциальные окраски

В 1970-е годы были разработаны специфические окраски хромосом, позволявшие окрашиваться только гетерохроматиновым районам. Для этого ДНК хромосом на цитологическом препарате подвергают денатурации, то есть тепловой обработке, при которой две цепи, составляющие двойную спираль, разъединяются, потом препарат охлаждают и позволяют цепям воссоединиться, после чего красят хромосомы специфической краской, например красителем Гимза. В результате гетерохроматин в отличие от эухроматина приобретает интенсивную окраску. Так получают специфическую окраску на гетерохроматин или С-окраску. Обычно интенсивно окрашенными становятся те районы хромо-

сом, которые обнаруживают постоянную высокую степень компактизации. Поэтому С-окраску называют окраской на конститутивный гетерохроматин (Constitutive или С-окраска).

Кроме С-окраски известны разнообразные другие, например Q-, H-, G-, N-, $AgNO_3$ -окраски. Удалось установить, что, например, Q- и H-окрашенные фрагменты выявляются в тех районах гетерохроматина, которые обогащены АТ-парами нуклеотидов. Таким образом, несмотря на то что весь участок гетерохроматина проявляет одно общее свойство — постоянно компактное состояние, с помощью различных дифференциальных окрасок показаны качественные отличия в организации отдельных его участков. Гетерохроматин пяти митотических хромосом дрозофилы (X, 2, 3, 4 и Y-хромосом) по результатам дифференциальных окрасок удалось разбить на 61 фрагмент, каждый из которых отличается от соседних по реакции на определенные окраски. Например, в Y-хромосоме выделено 25 таких районов (рис. 3): участки 1 и 2 — оба окрашиваются по С-процедуре, но разделены перетяжкой, то есть сужением диаметра хромосомы. Следующие районы 4 и 5 отделяются друг от друга также перетяжкой, а от 1 и 2 — небольшим районом (3), не окрашенным С-положительно. В результате такого картирования можно построить цитологическую карту различных фрагментов гетерохроматина в любой хромосоме. Относительно характерных маркеров на цитологической карте можно расположить гены (см. рис. 3).

Другим отличием гетерохроматина от эухроматина являются особенности организации ДНК. У эукариот существенная часть генома состоит из коротких, многократно повторенных последовательностей, состав оснований которых отличается от среднестатистического состава нуклеотидов основной части генома. Если раздробить ДНК любого генома на короткие ~1000 пар нуклеотидов (п.н.) отрезки, а затем нанести эту смесь на поверхность раствора хлористого цезия, концентрация (и плотность) которого увеличивается от верха по направлению ко дну пробирки, и отцентрифугировать (то есть провести в градиенте плотности центрифугирование), основная часть этих фрагментов ДНК будет расположена в определенном, очень узком интервале плотности градиента. Это главный пик осаждения или основная фракция генома по среднестатистическому составу нуклеотидов. Некоторая часть ДНК отличается от основного пика в силу обогащенности определенными нуклеотидами и, следовательно, имеет другую плавучую плотность. Эта фракция ДНК расположена рядом с основным пиком и представляет собой как бы его спутник (сателлит). Поэтому ее называют сателлитной ДНК (рис. 4). Все данные, полученные до сих пор, свидетельствуют о том, что сателлитная ДНК

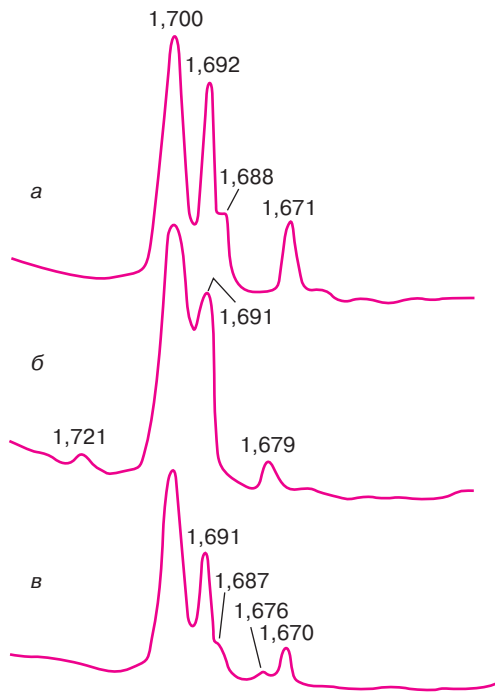


Рис. 4. Распределение фракций ДНК из генома *Drosophila virilis* (а), *D. americana* (б) и у их гибрида (в); 1,700 – главный пик ДНК, 1,692–1,670 – сателлиты

располагается в участках прицентромерного гетерохроматина. Иногда, очень редко, некоторое количество сателлитных последовательностей локализовано в эухроматине. Кроме сателлитной ДНК в прицентромерном гетерохроматине располагаются умеренно повторенные последовательности. Это прежде всего гены рибосомной РНК (рРНК) и мобильные элементы генома. Гены рРНК расположены в гетерохроматине, в то время как мобильные элементы находятся как в эу-, так и в гетерохроматине.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕТЕРОХРОМАТИНА

Уже в первых статьях о гетерохроматине в 1929–1933 годах Э. Хайц, имея в виду различия в степени компактизации эу- и гетерохроматина, по аналогии с генетически неактивным компактным материалом митотических хромосом предположил, что гетерохроматин также генетически неактивен.

Во многом Хайц оказался прав, но не во всем. Долгое время не было подходов для выяснения вопросов генетической организации гетерохроматина, пока наконец в 1980 году канадский ученый А. Хилликер не разработал метод генетического насыщения гетерохроматиновых участков хромосом. Не вдаваясь в детали этого метода, можно лишь заключить, что он позволяет обнаружить гены, необходимые для выживания и мутации по которым летальны. Проведя серию исследований, Хилликер установил, что гены в гетерохроматине есть, но плотность их расположения в ДНК в сотни раз ниже, чем в эухроматине. Так, в гетерохроматине X-хромосомы, который составляет около 40% длины всей хромосомы, найдено 6–7 генов, в то время как в эухроматине (60% длины хромосомы) – 1–2 тыс. В гетерохроматине второй хромосомы (29% длины хромосомы) найдено 18 генов, в эухроматине – около 2 тыс., в гетерохроматине третьей хромосомы (25% хромосомы) найдено 12 генов, в эухроматине – 2–3 тыс. Гены, найденные в гетерохроматине X, 2 и 3 хромосом, по организации и функционированию ничем не отличаются от генов, расположенных в эухроматине. Другое дело – гены Y-хромосомы.

ГЕНЫ Y-ХРОМОСОМЫ

Еще на заре рождения генетики, в 1916 году, американский ученый К. Бриджес установил, что экспериментально полученные самцы дрозофилы без Y-хромосомы

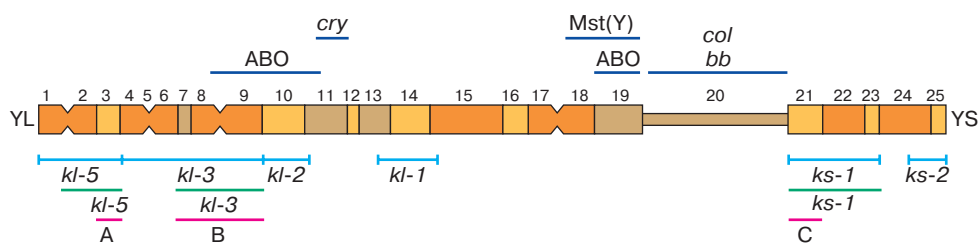


Рис. 3. Цитологическая карта различных фрагментов гетерохроматина Y-хромосомы дрозофилы. 1–25 – номера фрагментов гетерохроматина. Центромера находится между номерами 17 и 18, поэтому номера с 1 по 17 относятся к длинному плечу (YL), а с 18 по 25 – к короткому плечу (YS). Горизонтальные линии над картой с надписями (ABO и др.) представляют собой локализацию на данной карте генов, выявленных в Y-хромосоме. Ниже цитологической карты (*kl-5* и др.) нанесена локализация факторов плодовитости самцов, А–С – участки, из которых образуются петли в сперматоцитах

(то есть ХО в отличие от нормальных самцов ХУ) имеют нормальную жизнеспособность и строение всех органов, но они полностью стерильны. В последующих экспериментах было показано, что Y-хромосома дрозофилы содержит только девять генов, из которых шесть влияют на способность самцов оставлять потомство (фертильность) (см. рис. 3). Оставшиеся три гена — это *bobbed* (*bb*), серия или кластер генов, кодирующих рибосомную РНК и активность которых приводит к образованию ядрышка (нужно упомянуть, что второй ядрышкообразующий ген *bb* у дрозофилы находится также в гетерохроматиновом районе, но X-хромосомы). Ген *bb*, состоящий из повторенных фрагментов, занимает около 5% всей ДНК Y-хромосомы.

В пределах гена *bb* находятся участки, контролирующие процесс конъюгации хромосом в мейозе. Дело в том, что в мейозе спариваются гомологичные хромосомы за счет конъюгации гомологичных последовательностей нуклеотидов ДНК. Поскольку половые X- и Y-хромосомы морфологически и функционально совершенно различны, вопрос о механизмах спаривания этих элементов в мейотической профазе I достаточно актуален. Начиная с 1930-х годов накапливались данные о наличии участков спаривания в гетерохроматине X-хромосомы, в районе локализации гена *bobbed*. Их назвали сайтами *collohores* (*col* на рис. 3).

В 1990 году удалось показать, что ответственными за опознание X- и Y-хромосом и их последующую конъюгацию и расхождение в мейозе являются короткие последовательности нуклеотидов длиной в 240 п.н., расположенные в промежутках между генами рибосомной РНК, как в X-, так и Y-хромосоме. Участок локализации локуса *col* занимает в Y-хромосоме около 7% ее длины. Удаление *bb* с помощью хромосомных нехваток (делетий) полностью нарушает правильную конъюгацию половых хромосом.

Еще один ген — *crystal* (*cry* на рис. 3) влияет на поведение хромосом в мейозе и правильное формирование гамет. Разрывы участка хромосом, занимаемого этим геном, не приводят к развитию каких-либо фенотипических изменений у самцов дрозофил. Однако при полном или частичном удалении этого участка с помощью делетий в первичных сперматоцитах, в клетках, из которых образуются сперматозоиды, появляются белковые кристаллы, а во время мейоза нарушается расщепление хромосом. Интересно отметить, что есть еще один ген, расположенный в эухроматине X-хромосомы, — *Stellate* (*Ste*), который взаимодействует с геном *crystal*. При этом, если в X-хромосоме присутствует нормальный аллель гена *Stellate* (*Ste*⁺), кристаллы имеют игловидную форму, если мутантный *Ste*⁻ — они приобретают вид звезды. Ген *Ste*⁺ был клонирован, и в ре-

зультате анализа ДНК было показано, что он содержит tandemно повторенную (до 200 раз) последовательность длиной 1250 п.н. Нужная степень повторенности этого фрагмента соответствует аллелю *Ste*⁺ (игловидные кристаллы у *Ste*⁺/0 самцов, то есть тех, которые не имеют Y-хромосомы). Высокая степень повторенности приводит к образованию звездовидных кристаллов у *Ste*⁻/0. Транскрипты гена *Ste*⁻ находят в семенниках. Ген *Ste*⁺ кодирует бета-субъединицу фермента казеинкиназы-2. Этот белок, по-видимому, вовлечен в процессы конденсации хромосом и их последующего расхождения по гаметам.

Присутствие нормального аллеля гена *crystal* ингибирует накопление РНК гена *Ste*⁺. По существующим представлениям *cry*⁺ контролирует активность гена *Ste*⁺: удаление Y-хромосомы приводит к сверхпродукции *Ste*⁺-РНК, в результате чего избыток белка этого гена кристаллизуется в сперматоцитах и нарушает их функциональные возможности, что и приводит к стерильности.

У *D. melanogaster* найдено шесть факторов фертильности самцов (*kl-5*, *kl-3*, *kl-2*, *kl-1*, *ks-1* и *ks-2* на рис. 3). Из них три очень больших: *kl-5*, *kl-3* и *ks-1* — занимают по 10% Y-хромосом каждый, то есть примерно по 4000 т.п.н.

Интересно проявляется активность факторов фертильности у дрозофилы. В 1961 году три немецких ученых (G.F. Meyer, O. Hess, W. Veermann) описали особые нитевидные структуры в ядрах развивающихся сперматоцитов *D. melanogaster*, которые впоследствии стали называть петлями (рис. 5). Такие структуры нашли фактически у всех 50 изучаемых видов дрозофилы. Показано, что петли — это декомпактизованные, а следовательно, активные участки Y-хромосом. В них синтезируется РНК и накапливаются белки. Каждая петля в ядре данного вида дрозофилы имеет характерные размеры, ультраструктуру и внешний вид (см. рис. 5). У других видов морфология набора петель другая.

О том, что петли формируются из материала Y-хромосомы, свидетельствуют следующие факты.

1. У самцов, не имеющих Y-хромосомы (ХО), нет и петель, а у особей с двумя Y-хромосомами (ХУУ) они присутствуют в двойном наборе. Если происходит делеция части Y-хромосомы, обнаруживаются не все петли. В линиях с дубликациями частей Y-хромосомы число петель соответственно увеличивается.

2. У межвидовых гибридов морфология петель такая же, как и у вида — донора Y-хромосомы.

Более детальный анализ показал, что гены фертильности самцов локализованы в петлях.

1. Сначала были установлены корреляции между числом генов и петель. Затем, используя хромосомные

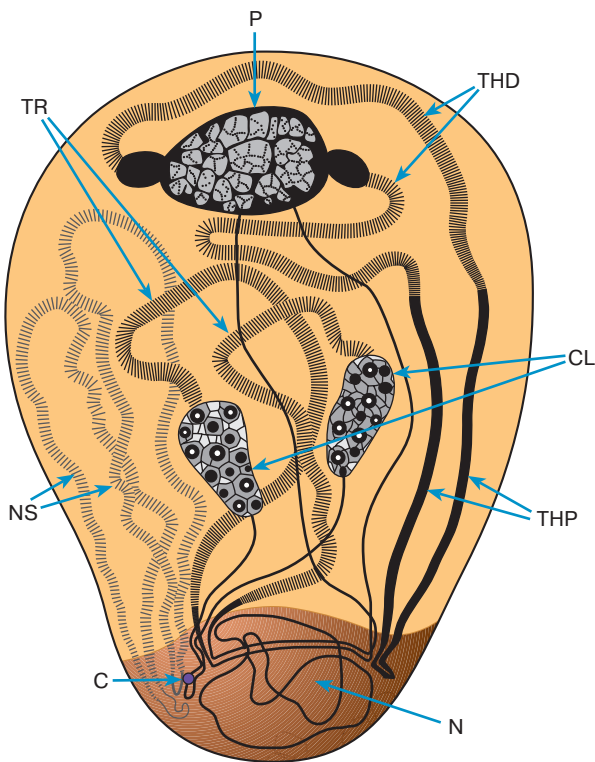


Рис. 5. Общий вид ядра сперматоцита у самца *Drosophila hydei* (из [1], с. 62). TR, P, THD, CL, THP, NS – названия петель, C – центромера, N – ядрышко

перестройки, установили прямое соответствие в их локализации. Так, фактор *kl-5* соответствует петле А, поскольку и петля, и фактор располагаются между точками разрывов одних и тех же перестроек (см. рис. 3). Фактор *kl-3* расположен в петле В, *ks-1* – в петле С.

2. При удалении делециями хотя бы одной петли самец становится стерильным.

После получения клонов ДНК из Y-хромосом дрозофил появилась возможность анализа молекулярной организации этой хромосомы. Общая длина петель составляет около 1000 мкм, или 1/12 всей длины ДНК в Y-хромосоме. Функции остальных 11/12 пока неизвестны. В состав ДНК Y-хромосомы входят два типа повторенных последовательностей.

1. Y-специфичные, которые встречаются только в этой хромосоме; они представлены семействами из 200–2000 копий и организованы в кластеры тандемно повторенных единиц длиной 200–400 п.н., расположенных, по-видимому, в петлях. Один из повторяющихся элементов – *rally* представляет около 1% всей ДНК Y-хромосомы.

2. Y-ассоциированные, которые встречаются как в Y-, так и в других хромосомах. Эти последовательности встречаются реже. Число их в участке локализации варьирует от нескольких до 50 копий различной длины.

Одним из свидетельств генетической активности петель является синтез в них РНК. В петлях синтезируется до 50% внеядрышковой РНК. Остальные 50% метки включаются, по-видимому, в транскрипционно активные районы X-хромосомы и аутосом, не образующие петель.

Транскрибируются оба типа повторов: Y-специфичные и Y-ассоциированные, причем длина транскриптов варьирует от 260 до более чем 1000 т.п.н. Несмотря на активную транскрипцию ДНК в составе петель, расшифровка последовательностей нуклеотидов не дает оснований полагать, что они могут кодировать белки, то есть в данном случае мы имеем пример крайне необычной ситуации: ДНК интенсивно транскрибируется, но белки не синтезируются.

В петлях накапливается большое количество различных белков, которые составляют основную часть белков в ядрах сперматоцитов. Часть белков входит в состав РНП-частиц, заполняющих пространство вокруг петель. Некоторые белки являются специфическими для определенных петель. Белки, накапливаемые в петлях Y-хромосомы, кодируются генами из других хромосом. В пользу этого свидетельствуют следующие факты.

1. Найдены аутосомные рецессивные мутации, действие которых приводит к исчезновению соответствующих петель.

2. В межвидовых скрещиваниях можно получить самцов, у которых Y-хромосома получена от одного вида, а аутосомы – от другого. Структура петель у таких самцов стала напоминать таковую, какая наблюдается у вида-донора, аутосоме, хотя понятно, что морфология петли зависит не только от состава белков, но и от интенсивности транскрипции, размеров транскриптов и морфологии РНП-содержащих частиц.

3. Некоторые белки петель выявляются с помощью антител в ядрах сперматоцитов у особей, не имеющих Y-хромосомы и соответственно не образующих петель.

Из рассмотрения приведенных фактов очевидно, что эу- и гетерохроматин сильно различаются по молекулярной и генетической организации слагающей их ДНК.

Возникает вопрос о различиях в их функциях. Если в отношении эухроматина все довольно очевидно – в нем содержится основная часть генов, необходимых для развития организма и функционирования клеток, то вопрос о функциональной значимости гетерохроматина до сих пор остается предметом споров и фантазий ученых. К настоящему времени разумных объяснений

существования гетерохроматина неизвестно. Можно только попытаться указать на ту область, где эти объяснения следует искать. Кажется уместным привести следующие соображения.

1. Гетерохроматин присутствует в геномах подавляющего большинства видов, что косвенно может свидетельствовать о его необходимости.

2. Последовательности ДНК, составляющие гетерохроматин, в ходе онтогенеза могут легко теряться из ядер соматических клеток, например: при политенизации хромосом у дрозофилы, диминуции хроматина аскарид или циклопов, созревании макронуклеуса у инфузорий и т.д. Однако в клетках зародышевого пути эти последовательности ДНК всегда присутствуют.

3. Те немногие гены, которые найдены в гетерохроматине, чаще всего связаны с осуществлением каких-то функций в клетках зародышевого пути, например для созревания гамет. Некоторые последовательности ДНК, расположенные в гетерохроматине, необходимы для осуществления функций в ходе мейоза, например для спаривания половых хромосом в профазе.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Жимулев И.Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск: Наука, 1993. 490 с.
2. Прокофьева-Бельговская А.А. Гетерохроматические районы хромосом. М.: Наука, 1986. 431 с.
3. Gatti M., Pimpinelli S. // Annu. Rev. Genet. 1992. Vol. 26. P. 239–275.
4. Hennig W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1993. Vol. 90. P. 10904–10906.

Рецензент статьи А.А. Богданов

* * *

Игорь Федорович Жимулев, доктор биологических наук, профессор кафедры цитологии и генетики Новосибирского государственного университета, зав. лабораторией молекулярной цитогенетики Института цитологии и генетики СО РАН, академик Европейской академии наук, член-корреспондент РАН и РАЕН. Автор более чем 200 публикаций, в том числе пяти монографий по проблемам организации хромосом.

