

MODERN VIEWS ON STRUCTURE AND FUNCTION OF POLYTENE CHROMOSOME

I. F. ZHIMULEV

Current views are considered on the polytene chromosomes structure and function: genetic organization of polytene chromosome bands, interbands and puffs. Modern scheme of hormonal regulation of gene activity in Drosophila is described.

Изложены современные представления о строении и функционировании политенных хромосом. Представлены данные о генетической организации хромомеров и пuffed. Описана современная схема гормональной регуляции активности генов в политенных хромосомах.

© Жимулев И.Ф., 1997

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ОРГАНИЗАЦИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ

И. Ф. ЖИМУЛЕВ

Новосибирский государственный университет

Материальным носителем наследственности являются молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Они соединяются с различными белками, образуя дезоксирибонуклеопротеиновые (ДНП) нити, которые в результате определенной укладки образуют хромосомы. Хромосомы можно обнаружить только во время клеточного деления, когда слагающий их материал компактизуется, то есть специфическим образом многократно складывается и приобретает состояние, максимально удобное для транспортировки в новые (дочерние) клетки, возникающие в результате митоза. В ходе каждого клеточного деления молекулы ДНК компактизируются примерно в 10 тыс. раз: в участке митотической хромосомы длиной 1 мк содержится 10 000 мкм ДНК. Естественно, что ДНК в таком плотноупакованном состоянии генетически неактивна.

У некоторых организмов в ряде тканей (слюнные железы насекомых, клетки зародышевого мешка растений, клетки некоторых злокачественных опухолей у млекопитающих) процесс репликации ДНК не сопровождается делением клетки, в результате чего в ядре накапливаются тысячи одноименных хромосом (или хроматид). Ядро и соответственно клетка увеличиваются в размерах, масса всего органа растет не за счет увеличения числа клеток, а в результате их роста. Такие гигантские клетки называют полиплоидными. Во время интерфазы, между двумя митотическими делениями, хромосома активно функционирует: в генах, расположенных в хромосомах, происходит синтез РНК, а на определенных стадиях интерфазы — репликация ДНК. Дезоксирибонуклеопротеин, составляющий каждую хромосому или хроматиду, в интерфазе неравномерно компактизован вдоль хромосомы: компактизованные участки, называемые хромомерами, перемежаются с декомпактизованными участками (межхромомерами).

В полиплоидных клетках многочисленные хроматиды могут располагаться одним из двух следующих способов: 1) все хроматиды плотно конъюгируют друг с другом одноименными (или гомологичными) хромомерами, образуя канатообразную структуру.

Гомологичные хромеры всех хроматид объединяются в один общий хромер (рис. 1). В результате при наблюдении окрашенных политенных хромосом в световом микроскопе хорошо заметны перемежающиеся поперечные полосы: темные (диски или хромеры) и светлые (междиски или межхромеры). Диски при окрашивании выглядят более темными, так как их материал более плотно упакован, чем материал междисковых участков. Так выглядят политенные (или многонитчатые) хромосомы “классического” типа; 2) очень часто конъюгация хроматид в ядре может быть неполной. Это выражается в том, что хроматиды объединяются в пучки по несколько штук, а не по тысяче, как в случае классических политенных хромосом. Однако между пучками конъюгация нарушена. В другом варианте хроматиды располагаются почти полностью независимо друг от друга, конъюгируя лишь в некоторых участках. Хромосомы с неполной конъюгацией хроматид являются, несомненно, политенными, но они не имеют четкой поперечной исчерченности. Более того, при значительных нарушениях конъюгации такие хромосомы представляют собой скопления спутанных нитей, их вообще трудно различить в объеме ядра. Этот тип организации называют скрытой политенией.

Оба вида политении легко могут переходить друг в друга при изменении внешних и внутренних условий жизни клетки. Например, в питающих клетках ооцитов у большинства видов двукрылых насекомых классические политенные хромосомы не образуются. Однако у некоторых видов комаров политенные хромосомы имеют наиболее четкий рисунок дисков именно в питающих клетках. У этих представителей хроматиды плотно конъюгируют друг с другом, а у большинства видов такой конъюгации нет.

После 14 поколений близкородственных скрещиваний и отбора на появление классической структуры в питающих клетках ооцитов у мясных — каллифор образуются классические политенные хромосомы. Однако если представителей двух

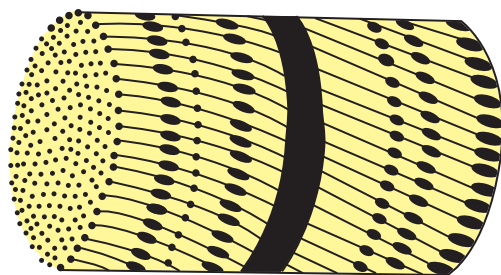


Рис. 1. Схема образования поперечных дисков в политенных хромосомах. Изображен отрезок хромосомы, состоящей из нескольких тысяч индивидуальных хроматид, следы которых видны на срезе. Узелки плотно компактизованного материала — хромеры, присутствующих в каждой хроматиде, образуют поперечную полосу или диск

линий с такими хромосомами скрестить между собой, то уже в первом поколении в ядрах этих клеток можно найти только мелкие глыбки хроматина, а классические политенные хромосомы не выявляются (рис. 2).

У дрозофилы степень плотности конъюгации гомологичных хроматид в ядре изменяется под влиянием мутаций, у растений — под действием температуры. У фасоли давно известны политенные хромосомы, образующиеся в различных типах клеток, однако эти хромосомы не имеют четкого рисунка дисков. Как правило, такая структура хромосом формируется, если выращивать растения при температуре 22°C. Если изменить температурный режим (8°C ночью и 12°C днем), политенные хромосомы приобретают четкий рисунок дисков.

Генетиков давно интересовал вопрос: в чем смысл поперечной исчерченности хромосом? Отражает ли организация дисков и междисков их специфику в функционировании? К настоящему времени значительный прогресс достигнут в области изучения генетического содержания хромерных районов хромосом. Фиксированное расположение дисков и междисковых участков в политенной хромосоме дрозофилы навело цитогенетиков на мысль, что каждый диск, возможно, соответствует отдельному гену. Анализ летальных мутаций не только подтвердил это предположение, но и позволил подсчитать число жизненно важных генов (таких, мутации которых приводят организм к гибели) у дрозофилы: их оказалось около 5 тыс., то есть приблизительно столько же, сколько дисков в хромосомах. Например, при попытке индуцировать мутации, картируемые в небольшом участке хромосом (содержащем около десятка дисков), генетическими методами выявлено около 10 жизненно важных генов. Хотя данный метод и не позволяет определить, где именно локализован конкретный ген — в диске или междиске, — эти наблюдения дают основание для следующего вывода: обычный диск может содержать последовательности ДНК, кодирующие не более чем один-единственный жизненно важный белок.

Однако последующие эксперименты заставили усомниться в правильности гипотезы “один диск — один ген”. Были клонированы многочисленные области генома дрозофилы длиной от нескольких десятков до нескольких сот тысяч пар нуклеотидов. Затем отдельные фрагменты этих областей использовали в качестве зондов для идентификации матричных РНК (мРНК), синтезирующихся в данном участке. Этот метод позволяет выявить участки, кодирующие мРНК на физической карте ДНК, то есть фактически гены. Как оказалось, число отдельных мРНК в три—пять раз превышает число дисков.

В лаборатории автора предпринято единственное до сих пор генетическое и молекулярное исследование индивидуального диска (рис. 3). В нем было обнаружено около 20 генов. Часть из них

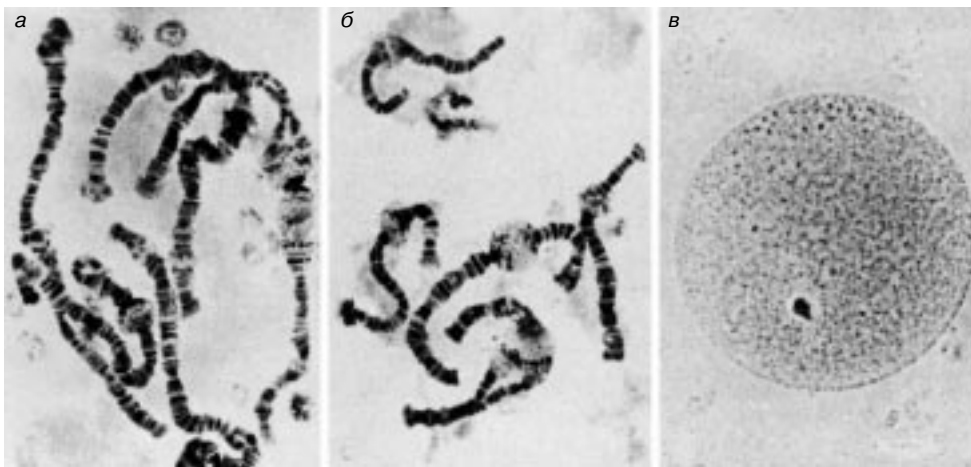


Рис. 2. Возникновение гранулярной структуры в ядрах питающих клеток ооцитов у каллифоры в результате скрещивания двух линий с классическими политенными хромосомами: а, б – классические политенные хромосомы в питающих клетках ооцитов у представителей двух линий каллифор; в – структура ядра у потомков от скрещиваний их между собой

выявляется с помощью мутаций, другие гены обнаружены по их активности в синтезе РНК. Некоторые отрезки ДНК, входящей в состав диска 10A1-2 (см. рис. 3, з), обогащены повторами, одинаковыми последовательностями нуклеотидов, встречающимися в геноме десятки и сотни раз. Повторы, найденные в диске 10A1-2, характерны только для половой X-хромосомы. Они расположены гнездами по несколько копий подряд, и эти гнезда распределены вдоль по длине X-хромосомы примерно в двух десятках районов. Роль этих повторов не выяснена.

Можно было бы предположить, как это и делали многие генетики, что гены, расположенные в одном диске, участвуют в осуществлении какой-то одной функции или они находятся под общим контролем, то есть функционируют координированно. Однако это оказалось не так. На рис. 3, д показаны точки разрывов многочисленных хромосомных перестроек, таких, как инверсии, делеции и транслокации. С их помощью часть материала диска может быть перенесена в другое место в этой же хромосоме или в другие хромосомы или даже удалена. В результате одна группа генов данного диска переносится в соседство с другими генами, и целостность генной группировки диска нарушается. Однако это не отражается на их активности: даже будучи разобщенными, все гены диска функционируют нормально. Еще интереснее оказались результаты эволюционного исследования диска 10A1-2. Клонированные последовательности ДНК, составляющие этот диск у *D. melanogaster* – основного объекта исследований, были картированы в хромосомах у других видов эволюционно разошедшихся около 10 млн лет назад: у *D. virilis*, *D. repleta*, *D. hydei*. У этих видов ДНК диска 10A1-2 оказалась представленной в двух независимых дисках X-хромосомы. Таким образом нормально работающая группа генов, заключенных

в одном диске у *D. melanogaster*, также нормально работает в составе разных дисков у других видов. Все это свидетельствует об отсутствии функциональной сцепленности различных генов, входящих в состав диска.

Межхромомерные участки (междиски) содержат отрезки ДНК длиной от 300 до 4000 тыс. пар нуклеотидов. Функции междисков загадочны и до сих пор не выяснены, несмотря на то что обсуждаются уже 60 лет. В последние несколько лет в лаборатории автора впервые удалось выделить фрагменты ДНК, входящие в состав междисков. В них определили последовательность нуклеотидов, в результате чего удалось установить последовательности триплетов, кодирующих аминокислоты. В междисках такие последовательности кодирующих триплетов (их обычно называют открытыми рамками считывания – ОРС) оказались очень короткими – от 300 до 550 пар нуклеотидов. Это означает, что в них может быть закодирована только очень короткая белковая цепочка – от 100 до 180 аминокислот. Функции таких малых белков пока неизвестны.

Когда гены, расположенные в диске, активируются, в районе хромосомы происходят серьезные изменения. При активировании гена по молекуле ДНК начинает двигаться молекула РНК-полимеразы и в комплексе с ней многочисленные факторы транскрипции. При этом ДНК выпрямляется, на ней синтезируются многочисленные молекулы РНК. Все это приводит к значительному разрыхлению ранее плотноупакованного ДНП в хромомерах. В результате на месте прежнего диска образуется большое вздутие – пуф (рис. 4).

Каждая стадия развития личинки или предкуколки характеризуется определенным набором активных генов, а следовательно, и крупных пуфов. В ходе развития эти наборы закономерно сменяют

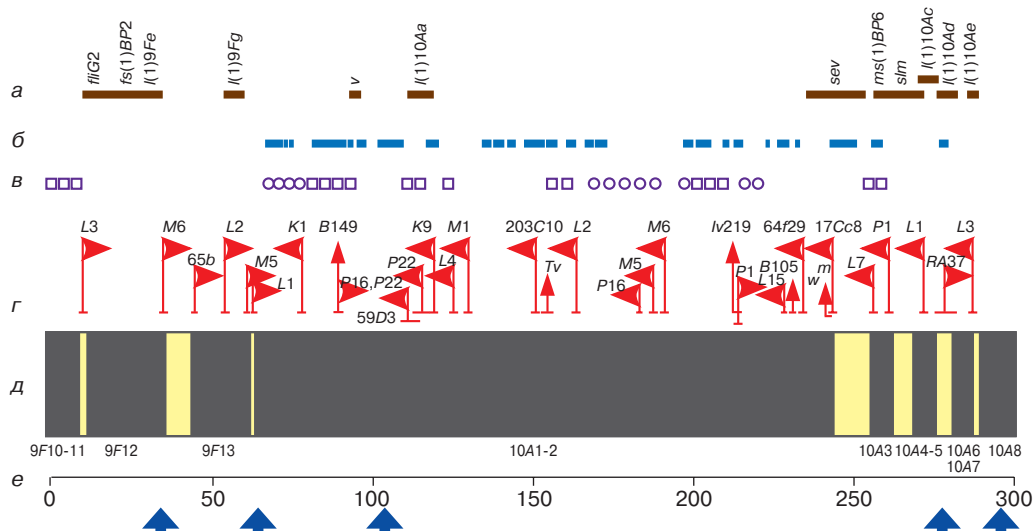


Рис. 3. Молекулярно-генетическая организация диска 10A1-2 политенной хромосомы дрозофилы. На рис. 3, д изображены диски (9F10–10A8), вошедшие в изучаемый район; ниже (е) показана физическая карта ДНК (от 0 до 300 тыс. пар нуклеотидов). Границы дисков соответствуют протяженности ДНК, входящей в тот или иной диск. Например, диск 10A1-2 занимает около 180 т.п.н.; а – гены выявляемые с помощью мутаций; б – гены, выявленные по локализации матричных ДНК; в – повторенные участки ДНК; г – вертикальные линии с флажками указывают точку разрыва ДНК хромосомными перестройками, стрелка флажка – направление перестройки

друг друга. У наиболее молодых личинок, политенные хромосомы которых уже достаточно велики и доступны для анализа, присутствуют только так называемые межличинные пuffy. В самом конце личиночного развития, примерно за 6 ч до формирования предкуколки, железы внутренней секреции личинки выделяют гормон экдистерон, и на фоне резкого повышения концентрации гормона эти пuffy инактивируются. Одновременно гормон индуцирует образование новых пуфов. Сначала появляются так называемые ранние пuffy, то есть те, которые активировались раньше других – примерно через 30 мин после контакта клеток с экдизоном. С задержкой в несколько часов индуцируются так называемые поздние пuffy. К моменту образования предкуколки активность пуфов наивысшая в том смысле, что в геноме наибольшее число пуфов активны именно на этой стадии развития и размеры пуфов в это время достигают максимальных значений. После достижения пика активности в последующие 2–3 часа активность пуфов быстро понижается. В конце стадии предкуколки опять на фоне нового повышения титра экдизона проходит повторная волна ранних и поздних пуфов.

Наиболее фундаментальные исследования процесса активирования генов (пуфов) под действием гормона провел английский генетик М. Эшбернер. Исследования гормональной регуляции активности генов удобнее проводить не на живом организме, а в системе *in vitro*, инкубируя органы в пробирке, благодаря чему можно по усмотрению экспериментатора изменять условия обработки гормонами –

варьировать их концентрации, продолжительность воздействия, использовать вещества, прерывающие протекание различных процессов (ингибиторы).

В результате серии остроумных экспериментов М. Эшбернер показал, что ранние и поздние пuffy различаются по многим признакам. Во-первых, это реакция на ингибиторы синтеза РНК и белков. Если через час после начала инкубации клеток циклогексимидом добавить гормон экдистерон, ранние пuffy все же образуются, то есть для их индукции не требуется предварительного синтеза белков. Они

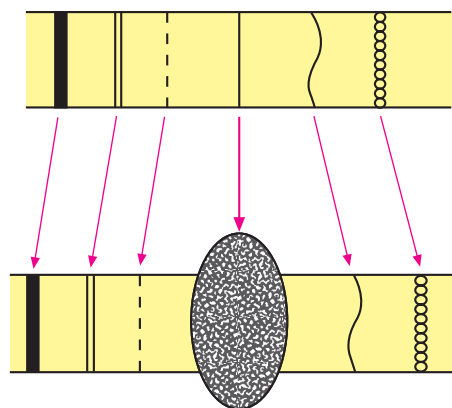


Рис. 4. Образование пуфа в участке политенной хромосомы. Вверху изображен фрагмент хромосомы с характерным дисковым рисунком. На месте одного из дисков в участке хромосомы, изображенной внизу, образовалось вздутие – пуф

используют те белки, которые были синтезированы задолго до этого. В поведении ранних пуфов обнаружилась еще одна удивительная особенность. Обычно ранние пуфы быстро реагируют на гормон — активируются, через 4 ч они развиваются до максимальных размеров, затем полностью инактивируются, и материал пуфа, компактизуясь, превращается в диск. Под действием ингибитора синтеза белка ранние пуфы нормально активируются, но их обычной инактивации не происходит. Этот факт может свидетельствовать только об одном: инактивация ранних пуфов — такой же гормон-индуцируемый процесс, как и их индукция. Отсюда вытекает другой важный вывод: белки, выключающие активность ранних пуфов, кодируются в самих ранних пуфах. Поздние пуфы на фоне ингибирования синтеза белка не индуцируются. Это означает, что для их индукции необходимы белки, синтезируемые под действием гормона экдистерона, то есть в ранних пуфах. Кроме того, как оказалось, ранние и поздние пуфы еще более различаются по реакции на удаление гормона из клеток. Если некоторое время инкубировать железы в пробирке в растворе, содержащем гормон, а затем поместить в новый раствор уже без гормона, ранние пуфы быстро уменьшаются в размерах и исчезают совсем. На индукцию поздних пуфов отмывка гормона влияет очень специфично. Если удалять гормон через 1, 2, 3 ч от начала инкубации, то ничего не происходит. Если инкубация протекала 4 ч и более, то удаление гормона приводит к быстрой преждевременной индукции поздних пуфов. Эти эксперименты означают, что для поддержания активности ранних пуфов гормон нужен постоянно. Этот же гормон блокирует развитие поздних пуфов до определенного времени.

Для объяснения результатов этих опытов М. Эшбернер предложил следующую модель (рис. 5). Гормон (E) обратимо связывается с молекулой белка рецептора (R). Рецептор облегчает проникновение гормона в клетку и связывание гормона с генами. Гормон-рецепторный комплекс взаимодействует с регуляторными областями генов, расположенных в ранних пуфах, и активирует их. Для активности ранних пуфов нужно постоянное присутствие гор-

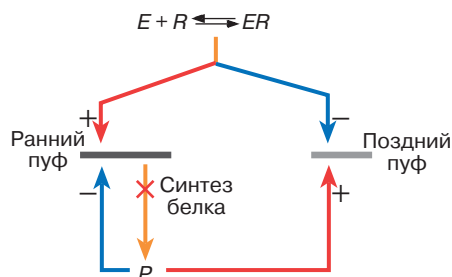


Рис. 5. Модель индукции каскада ранних и поздних пуфов, предложенная М. Эшбернером (объяснения в тексте)

мона. Отмывка его приводит к инактивации этих генов. В то же время гормон-рецепторный комплекс взаимодействует с регуляторными районами генов, расположенных в поздних пуфах, и инактивирует их. По прошествии некоторого времени после начала действия гормона ранние пуфы нарабатывают белковые продукты (P), которые действуют двояко. Некоторые из этих белков инактивируют прежде активные ранние пуфы (рис. 5). Поэтому подавление синтеза белка предотвращает инактивацию ранних пуфов. Другие белки из этой категории (рис. 5, P) связываются с регулируемыми зонами поздних генов, вытесняют экдизон-рецепторный комплекс, в результате чего активируются поздние пуфы. Очевидно, что если подавить синтез белка, то поздние пуфы развиваться не будут: в клетках еще не синтезированы белки P .

Легко объяснить роль отмывки гормона. Поскольку для поддержания активного состояния ранних пуфов необходимо постоянное пребывание комплекса ER на регуляторных районах генов, то удаление гормона приводит к быстрой инактивации пуфов. Сложнее с реакцией на отмывку поздних пуфов. Если начать удалять гормон слишком рано, когда белки P еще не синтезированы, то отмывка не вызывает преждевременной индукции поздних пуфов. Белки P синтезируются примерно через 3–4 ч после начала действия гормона. Если отмыть экдизон в это время, то количество белков P в клетках уже достаточно для того, чтобы вытеснить из регуляторных районов генов комплекс ER , концентрация которого к тому же быстро уменьшается в результате отмывки. Если в пробирку, откуда гормон уже удален, вновь добавить экдизон, поздние пуфы вновь инактивируются.

В последние два года в результате работ по молекулярному клонированию ДНК многих пуфов, выяснилось, что в клетках дрозофилы функционирует не один, а несколько рецепторов гормона, и гены, кодирующие их, располагаются в разных пуфах, как в самых ранних, так и в тех, которые активируются несколько позже и даже совсем поздно. Выяснено также, что белковые молекулы-рецепторы весьма консервативны, то есть независимо от того, какой это рецептор и даже какой из стероидных гормонов

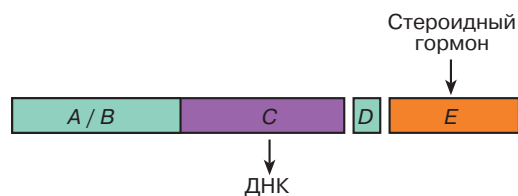


Рис. 6. Обобщенная схема строения молекулы белка-рецептора стероидного гормона: A/B и D — участки белковой молекулы с неизвестными функциями, C — участок связывания гормон-рецепторного комплекса с ДНК, E — участок связывания рецептора с гормоном

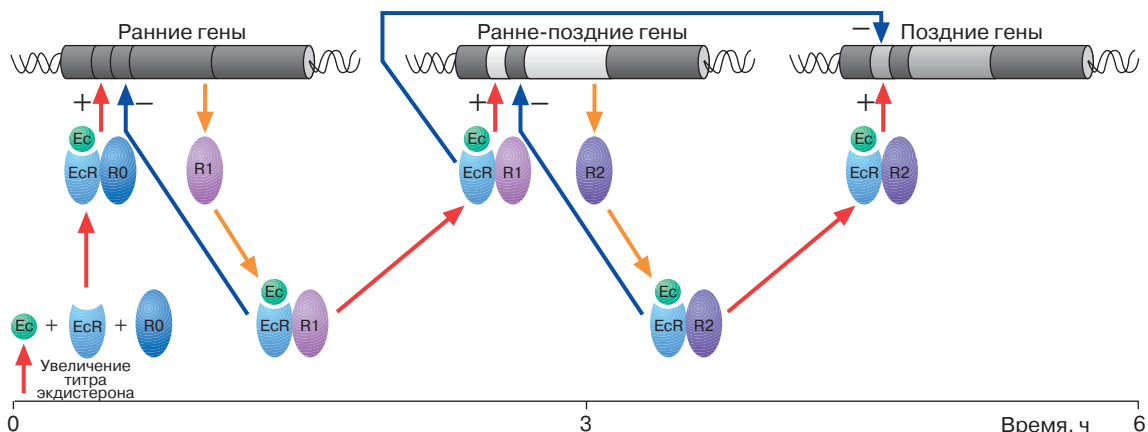


Рис. 7. Модель активирования каскада генов в клетках слюнных желез дрозофилы под действием гормона эcdистерона (объяснения в тексте)

он связывает, все рецепторы имеют общий принцип строения (рис. 6). Все молекулы белков-рецепторов имеют 4–5 доменов – специфических участков. Один из доменов (рис. 6, C) отвечает за связывание комплекса ER с ДНК: находит именно тот ген, который необходимо активировать. Этот домен содержит 66–68 аминокислот. Другой домен (рис. 6, E) отвечает за удержание гормона в комплексе. Он содержит 220 аминокислот. Функции доменов A/B и D пока не определены.

С учетом этих факторов модель протекания каскада активирования генов под влиянием гормона эcdистерона была дополнена другим английским генетиком – Дж. Ричардсом (рис. 7). Согласно новому варианту модели, когда увеличивается титр эcdистерона, его молекулы связываются с двумя молекулами белков-рецепторов: *EcR* и *RO*. Этот комплекс поступает на регуляторные участки ранних генов и активирует их. Продуктом раннего гена является другой рецепторный белок – *R1*, который в гормон-рецепторном комплексе замещает место белка *RO*, или *EcR*, или оба эти белка. Образовавшийся в результате этого новый гормон-рецепторный комплекс *Ec–EcR–R1* подавляет активность ранних генов и активирует пuffs, возникающие несколько позже ранних. В научной литературе их называют ранними-поздними. Кроме активирования ранних-поздних генов этот вновь образованный комплекс связывается с регулируемыми участками поздних генов и инактивирует их. Одним из продуктов активности ранне-поздних пuffs является новый белок-рецептор *R2*, который образует гормон-рецепторный комплекс с гормоном, заменяя в старом комплексе *EcR* или *R1* или оба их. Новый комплекс отключает гены, которые произвели сам *R2*, и одновременно включает поздние гены.

В этой схеме многое еще остается невыясненным, в частности неизвестно, в каких пuffs расположены гены, кодирующие рецепторы *R1* и *R2*. Неясно также, какую роль играют остальные пuffs.

Известно, что в политенных хромосомах дрозофилы функционируют около 120 крупных пuffs и около 220 мелких. Пока выяснена роль только примерно 20 пuffs. Но и эти данные позволили сформулировать модель процесса гормональной регуляции активности генов в клетках эукариот. Это оказалось возможным только потому, что в качестве модели использовали политенные хромосомы, на которых весь процесс можно непосредственно наблюдать под микроскопом.

Таким образом, в результате наблюдения политенных хромосом удалось выявить два типа активных районов: междиски и пuffs, возникающие при декомпактизации материала дисков. Районы обоих типов транскрипционно активны. В состоянии дисков гены неактивны. Активирование генов, расположенных в дисках, и образование пuffs происходят специфично по отношению к стадии развития или определенной ткани. Материал декомпактизуется, и ген начинает работать. Междиски находятся в постоянно декомпактизованном состоянии. Повидимому, они постоянно (в большинстве тканей и на всех стадиях развития) активны. Функции их транскриптов неясны.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Жимулев И.Ф. Политенные хромосомы: Морфология и структура. Новосибирск: Наука, 1992. 480 с.
2. Жимулев И.Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск: Наука, 1993. 491 с.
3. Жимулев И.Ф. Хромомерная организация политенных хромосом. Новосибирск: Наука, 1994. 565 с.

* * *

Игорь Федорович Жимулев, зав. лабораторией молекулярной цитогенетики Института цитологии и генетики Российской Академии наук, доктор биологических наук, профессор Новосибирского государственного университета. Работает в области молекулярной организации хромосом. Автор более 200 публикаций, в том числе четырех монографий.