

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 политетенных хромосом. Представлены данные о генетической организации хромомеров и пуфов. Описана современная схема гормональной регуляции активности генов в политетенных хромосомах.

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 компактизуются 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 хромомеры всех хроматид объединяются в один общий хромомер (рис. 1). В результате при наблюдении окрашенных политечных хромосом в световом микроскопе хорошо заметны перемежающиеся поперечные полосы: темные (диски или хромомеры) и светлые (междиски или межхромомеры). Диски при окрашивании выглядят более темными, так как их материал более плотно упакован, чем материал междисковых участков. Так выглядят политечные (или многонитчатые) хромосомы "классического" типа; 2) очень часто коньюгация 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 политечных хромосом. Однако между пучками коньюгация нарушена. В другом варианте хроматиды располагаются почти полностью независимо друг от друга, коньюгируя лишь в некоторых участках. Хромосомы с неполной коньюгацией хроматид являются, несомненно, политечными, но они не имеют четкой поперечной исчерченности. Более того, при значительных нарушениях коньюгации такие хромосомы представляют собой скопления спутанных нитей, их вообще трудно различить в объеме ядра. Этот тип организации называют скрытой политехией.

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

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

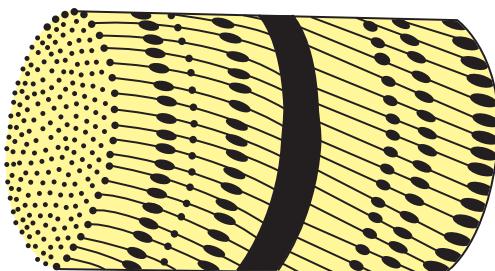


Рис. 1. Схема образования поперечных дисков в политечных хромосомах. Изображен отрезок хромосомы, состоящей из нескольких тысяч индивидуальных хроматид, следы которых видны на срезе. Узелки плотно компактизированного материала — хромомеров, присутствующих в каждой хроматиде, образуют поперечную полосу 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 политечные хромосомы не выявляются (рис. 2).

У дрозофилы степень плотности коньюгации гомологичных хроматид в ядре изменяется под влиянием мутаций, у растений — под действием температуры. У фасоли давно известны политечные 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), политечные 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 хромомерных районов хромосом. Фиксированное расположение дисков и междисковых участков в политечной 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 политечными хромосомами: *а, б* – классические политечные 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, *г*), 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 – OPC) оказались очень короткими – от 300 до 550 пар нуклеотидов. Это означает, что в них может быть за- кодирована 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 разрывлению ранее плотноупакованного ДНП в хромомерах. В результате на месте прежнего диска образуется большое вздутие – пух (рис. 4).

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

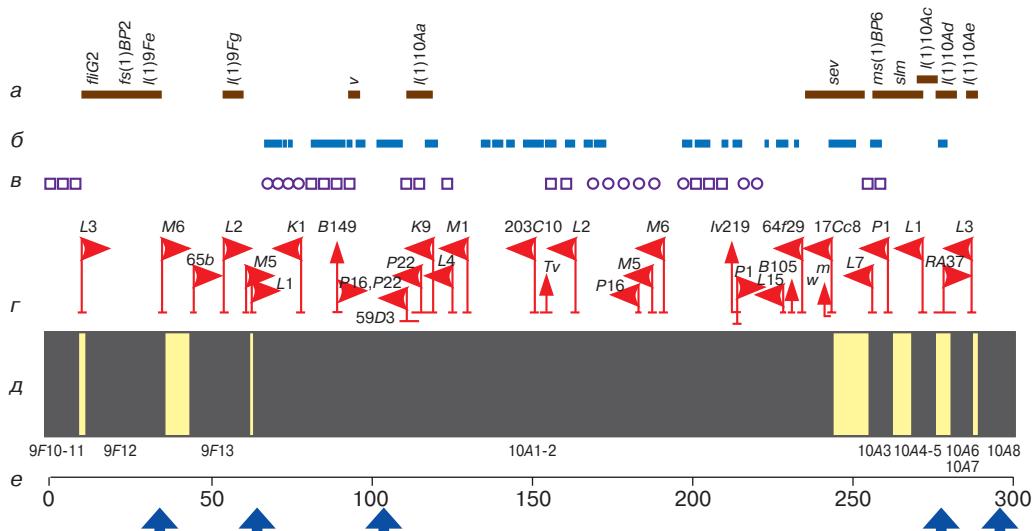


Рис. 3. Молекулярно-генетическая организация диска 10A1-2 политечной хромосомы дрозофилы. На рис. 3, д изображены диски (9F10–10A8), вошедшие в изучаемый район; ниже (е) показана физическая карта ДНК (от 0 до 300 тыс. пар нуклеотидов). Границы дисков соответствуют протяженности ДНК, входящей в тот или 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 флагами, стрелка флагжа – направление перестройки

друг друга. У наиболее молодых личинок, политечные хромосомы которых уже достаточно велики и доступны для анализа, присутствуют только так называемые межлинечные пуфы. В самом конце личиночного развития, примерно за 6 ч до формирования предкуколки, железы внутренней секреции личинки выделяют гормон эcdистерон, и на фоне резкого повышения концентрации гормона эти пуфы инактивируются. Одновременно гормон индуцирует образование новых пуфов. Сначала появляются так называемые ранние пуфы, то есть те, которые активировались раньше других – примерно через 30 мин после контакта клеток с эcdизоном. С задержкой в несколько часов индуцируются так называемые поздние пуфы. 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 эcdизона 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 пуфы различаются по многим признакам. Во-первых, это реакция на ингибиторы синтеза РНК и белков. Если через час после начала инкубации клеток слюнных желез с ингибитором синтеза белков – циклогексимидом добавить гормон эcdистерон, ранние пуфы все же образуются, то есть для их индукции не требуется предварительного синтеза белков. Они

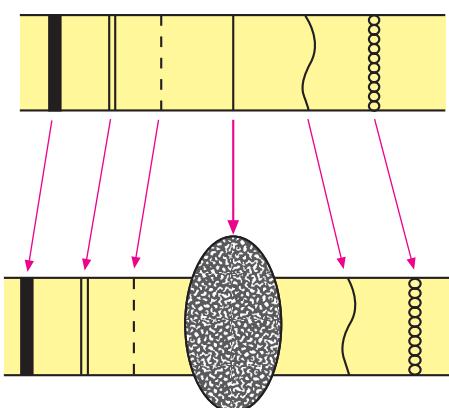


Рис. 4. Образование пуфа в участке политечной хромосомы. Вверху изображен фрагмент хромосомы с характерным дисковым рисунком. На месте одного из дисков в участке хромосомы, изображенной внизу, образовалось вздутие – пуф

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, компактизясь, 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 эндоцитерона, 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 отмыка 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-

мона. Отмыка 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 регулирующими зонами поздних генов, вытесняют эндоцитон-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 отмыки 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 отмыку поздних пуфов. Если начать удалять гормон слишком рано, когда белки *P* еще не синтезированы, то отмыка не вызывает преждевременной индукции поздних пуфов. Белки *P* синтезируются примерно через 3–4 ч после начала действия гормона. Если отмыть эндоцитон 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 отмыки. Если в пробирку, откуда гормон уже удален, вновь добавить эндоцитон, 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, расположены 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

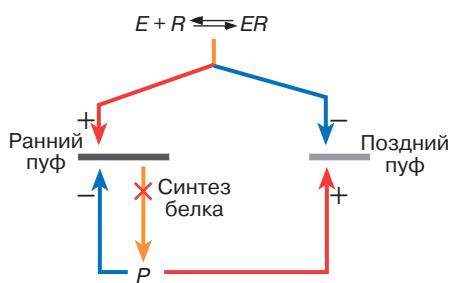


Рис. 5. Модель индукции каскада ранних и поздних пуфов, предложенная М. Эшбернером (объяснения в тексте)

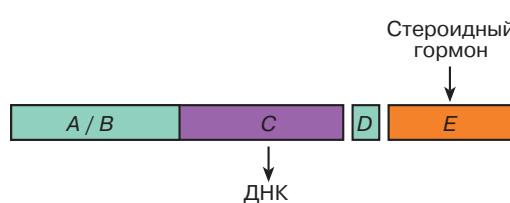


Рис. 6. Обобщенная схема строения молекулы белка-рецептора стероидного гормона: *A/B* и *D* – участки белковой молекулы с неизвестными функциями, *C* – участок связывания гормон-рецепторного комплекса с ДНК, *E* – участок связывания рецептора с гормоном

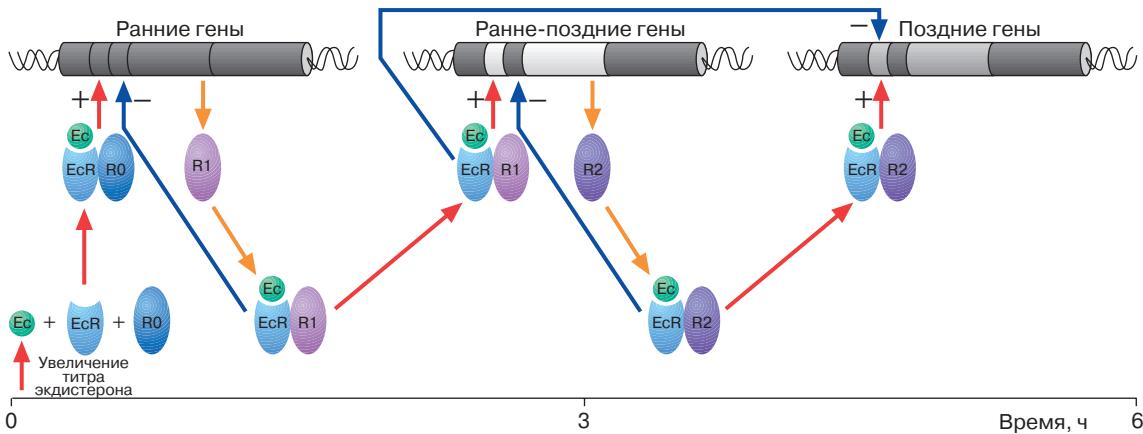


Рис. 7. Модель активирования каскада генов в клетках слюнных желез дрозофилы под действием гормона эcdистерона (объяснение в тексте)

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 пуфы, возникающие несколько позже ранних. В научной литературе их называют ранними-поздними. Кроме активирования ранних-поздних генов этот вновь образованный комплекс связывается с регулирующими участками поздних генов и инактивирует их. Одним из продуктов активности ранне-поздних пуфов 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 пуфах расположены гены, кодирующие рецепторы *R1* и *R2*. Неясно также, какую роль играют остальные пуфы.

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

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

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Жимулов И.Ф. Политеческие хромосомы: Морфология и структура. Новосибирск: Наука, 1992. 480 с.
- Жимулов И.Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск: Наука, 1993. 491 с.
- Жимулов И.Ф. Хромомерная организация политеческих хромосом. Новосибирск: Наука, 1994. 565 с.

* * *

Игорь Федорович Жимулов, 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.