

**Глава 9. Организация и функционирование хромосом**

<b>9.1. Введение</b>	<b>2</b>
9.2.1. Хромосомы вирусов, клеточных органелл и прокариот	2
9.2.2. Геном дрожжей	4
<b>9.3. Митотические хромосомы</b>	<b>5</b>
9.3.1. Идентификация хромосом	5
9.3.2. Кариотип и идиограмма	6
9.3.3. Дифференциальные окраски хромосом	8
9.3.4. “Правило Меллера” и синтения	9
<b>9.4. Эу- и гетерохроматин в митотических хромосомах</b>	<b>11</b>
9.4.1. Компактизация хроматина	12
9.4.2. Дифференциальная окрашиваемость	14
9.4.3. Конъюгация гетерохроматиновых районов	15
9.4.4. Контакты гетерохроматина с ядерной оболочкой	16
9.4.5. Гетерохроматин и хромосомные перестройки	16
9.4.6. Поздняя репликация	17
9.4.7. Варьирование количества гетерохроматина	18
9.4.8. Формирование гетерохроматиновых районов хромосом в онтогенезе	18
9.4.9. Повторенные оследовательности	19
9.4.10. Генетическое содержание гетерохроматиновых районов хромосом	22
9.4.11. Заключение	29
<b>9.5. Теломеры и теломерный гетерохроматин</b>	<b>31</b>
9.5.1. Концепция теломеры	31
9.5.2. Строение теломер	34
<b>9.6. Диминуция хроматина и хромосом</b>	<b>43</b>
9.6.1. Диминуция хроматина у аскарид	43
9.6.2. Диминуция хроматина у циклопов	44
9.6.3. Элиминация хроматина у инфузорий	46
9.6.4. Элиминация хромосом у двукрылых насекомых	47
9.6.5. Физиологическое значение диминуции хроматина и хромосом	48
<b>9.7. Строение центромеры</b>	<b>50</b>
<b>9.8. В-хромосомы</b>	<b>53</b>
<b>9.9. Генетическая инактивация хромосомы у <i>D. miranda</i></b>	<b>54</b>
<b>9.10. Факультативный и конститутивный     гетерохроматин</b>	<b>54</b>
<b>9.11. Гетерохроматин и клетки зародышевого пути</b>	<b>54</b>

## 9. Строение и функционирование хромосом

### 9.1. Введение

Хромосомы - это нуклеопротеиновые тела, в которых хранится, передается потомству и реализуется наследственная информация.

По иронии судьбы сначала были открыты ядерные структуры, которые в течение многих последующих лет никто не считал хромосомами. В 1881 году Э. Бальбиани описал в клетках слюнных желез хирономуса поперечно-исчерченные ленты. Их назвали “структурами Бальбиани”. Только в 1912 году чешский ученый Ф. Рамбоусек предположил, что это специализированные хромосомы. А окончательно это название утвердилось в 1930-1935 гг. (D. Kostoff, T. Painter, H. Muller).

Хромосомы, как “окрашивающиеся тела” были открыты в митотически и мейотически делящихся клетках классиками цитологии Флеммингом и Страсбургером (W. Flemming, 1882; E. Strasburger, 1884). Свое название хромосомы получили благодаря способности интенсивно окрашиваться основными красителями.

Сам термин “хромосома” предложил в 1888 году W. Waldeyer.

Огромное значение факта продольного расщепления каждой хромосомы - образование хроматиды - в процессе деления клетки отметил в тот же период В. Ру (W. Roux, 1883). С удивительной интуицией он указал, что подобный способ деления хромосом свидетельствует о присутствии в них жизненно важных для клетки элементов и о расположении этих элементов в линейном порядке.

А. Вейсман предположил, что наследственность сосредоточена в хромосомах, а доказали это Т.Х. Морган, К. Бриджес, Г. Меллер и А. Стертевант, завершившие к середине 1930-х годов разработку хромосомной теории наследственности.

В настоящее время наиболее известны три типа хромосом:

- а. У прокариот в нуклеоиде и в клеточных органеллах у эукариот.
- б. Хромосомы из делящихся клеток эукариот.
- в. Интерфазные хромосомы эукариот.

### **Литература к разделу 9.1.**

Босток К., Самнер Э. Хромосома эукариотической клетки. Москва, Мир, 1-598, 1981 (перевод с англ. издания 1978 года).

Прокофьева-Бельговская А.А. Строение и функция хромосом в кн. Руководство по цитологии, т.2, Москва-Ленинград, Наука, стр. 280-329, 1966.

Прокофьева-Бельговская А.А. Гетерохроматические районы хромосом. Москва, Наука, 1-431, 1986.

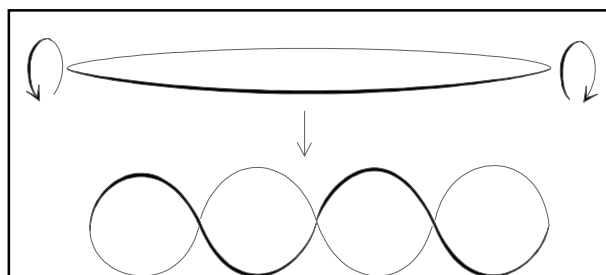
### **9.2.1. Хромосомы вирусов, клеточных органелл и прокариот**

У ДНК - содержащих вирусов, бактерий, сине-зеленых водорослей, а также в самореплицирующихся органеллах клеток эукариот (пластидах, митохондриях и центриолях) хромосома представляет собой голую двуспиральную молекулу ДНК.

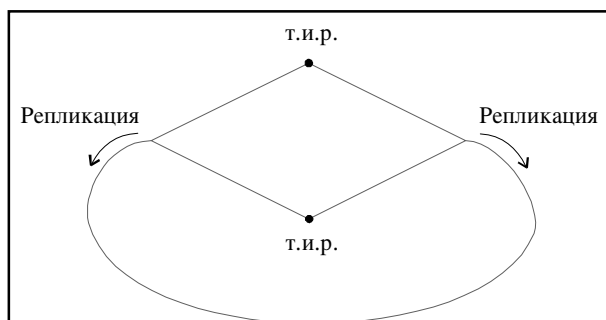
У большинства форм эта молекула образует кольцо, которое закручено в шпильку, и хромосома имеет суперспирализованный вид (Рис. 9.1.).

Репликация этих хромосом начинается с единственной определенной точки (точки инициации репликации) и прогрессирует, пока не закончится репликация всей хромосомы: таким образом, хромосома представляет собой единицу репликации-репликон. В большинстве случаев, а у бактерий - всегда, репликация хромосомы идет одновременно в обе стороны от точки инициации репликации (т.и.р.) (Рис. 9.2).

Репликация хромосом вирусов и прокариот протекает быстро, со скоростью порядка 30 микронов в минуту. У прокариот хромосома прикреплена одной точкой к клеточной мембране, и после репликации расхождение дочерних хромосом осуществляется раздвиганием этих точек вследствие роста мембраны.



**Рис. 9.1.** Кольцевая и суперспирализованная форма молекулы ДНК у бактерий



**Рис. 9.2.** Схема репликации кольцевой ДНК

Длина молекул ДНК, служащих хромосомами у вирусов, прокариот и клеточных органелл, варьирует (Табл. 9.1).

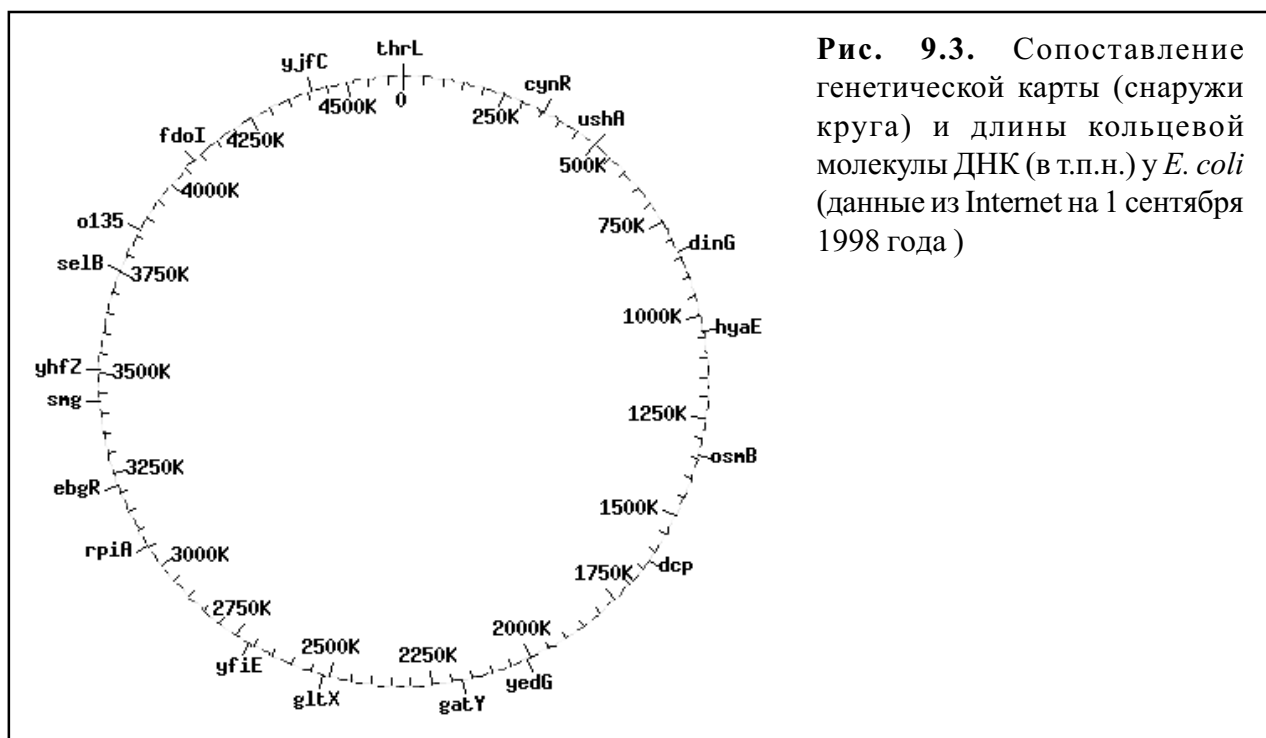
В результате полного секвенирования геномов некоторых бактерий длины кольцевых молекул ДНК и числа генов определены по данным на 1 сентября 1998 года: у *Bacillus subtilis* длина ДНК составляет 4214,814 т.п.н. и геном содержит около 4100-4220 генов, у *E. coli* – 4639,221 т.п.н. и, соответственно, примерно 4290 генов (Рис. 9.3.).

У бактерий геном организован в некое тело или тела, которые выглядят довольно компактными и занимают около трети объема клетки. Эти тела называют нуклеоидами. ДНК в бактериальном нуклеоиде находится в ассоциации с ДНК-связывающимися белками:

1. Белок HU конденсирует ДНК, возможно заворачивая ее в бусоподобные структуры. Он стимулирует репликацию ДНК.
2. Белок H1 связывается с ДНК, взаимодействуя прежде всего с теми последовательностями, которые изогнуты. Функции белка неизвестны.

**Табл. 9.1.** Размеры кольцевой молекулы ДНК - хромосомы у вирусов, прокариот и в клеточных органеллах эукариот (Из: Алиханян и др. 1985, стр. )

Кольцевая молекула ДНК	Длина	
	микрометры	пары нуклеотидов
Мелкие вирусы, центриоли	0,4-1,0	1200-3000
Другие вирусы, пластиды, митохондрии	5-100	15000-300000
Бактерии	1000-2000	3000000-6000000



**Рис. 9.3.** Сопоставление генетической карты (снаружи круга) и длины кольцевой молекулы ДНК (в т.п.н.) у *E. coli* (данные из Internet на 1 сентября 1998 года)

3. Белок Р был секвенирован и по последовательности аминокислот напоминает протамины, которые связываются с ДНК в сперматозоидах некоторых видов. Предполагается, что Р - это ДНК-связывающийся белок, однако функции его не известны. ДНК в нуклеоиде составляет около 80% (для сравнения у эукариот - только 50%). Она свернута в петли, примерно по 40 т.п.н. в каждой петле (Рис. 9.4.).

Основания петель защищены с помощью какого-то неизвестного механизма, что предотвращает передачу

вращения ДНК с одной петли на другую. В геноме примерно 100 таких петель - или доменов. (см. детали: Lewin, 1994, pp. 772-776).

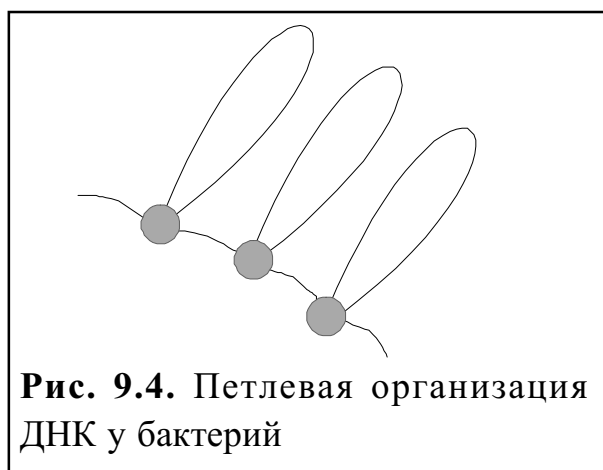
### Литература к разделу 9.2.

- Алиханян С.И., Акифьев А.П., Чернин Л.С. Общая генетика. Москва, Высшая школа, 1-446, 1988.  
Lewin B. Genes V, Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press, 1-1272, 1994.

#### 9.2.2. Геном дрожжей

Хромосомы этих низших эукариот не видны под микроскопом, однако по генетическим данным выделяют 16 групп комплементации. Геном дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к настоящему времени полностью секвенирован. Общая длина ДНК в геноме составляет 13390 т.п.н., варьирование хромосом по длине показано на Рис. 9.5.

В геноме выявлено около 6085 генов.



**Рис. 9.4.** Петлевая организация ДНК у бактерий

### 9.3. Митотические хромосомы

#### 9.3.1. Идентификация хромосом

Еще в 1882 году Страсбургером было обнаружено у одного из исследованных им растений, а именно *Funkia sieboldiana*, что хромосомы одной и той же ядерной пластинки весьма резко отличаются по своей величине. Аналогичные отношения были констатированы впоследствии для целого ряда растений и животных. Несколько позже, Мюллер (Cl. Muller, 1912) посвятил целое исследование, специально посвященное различиям в размерах хромосом. Указанные различия являлись не простым варьированием, а характеризовали собой определенные типы более крупных и мелких хромосом, точно повторявшиеся в различных ядерных

пластинках одного и того же вида. Каждый тип был представлен в соматических клетках парой одинаковых элементов, очевидно отцовского и материнского происхождения. Такого рода данные представляли - рядом с постоянством числа хромосом - наглядную иллюстрацию индивидуальности хромосом, понимаемой в смысле определенных, характерных для каждой пары особенностей.

Точным установлением факта, что хромосомам присущи, помимо их абсолютной и относительной величины, еще и особые постоянные и характерные различия в построении их тела, наука обязана трудам Сергея Гавриловича Навашина (1910-1914).

Уже в ранних работах Навашин выделяет три типа хромосом: а) U-



образные, почти равноплечие, б) U-образные, явно неравноплечие, в) крючковидные, один членок которых настолько короток, что может даже ускользнуть от наблюдения (Навашин, 1911, стр. 27, у Левитского, 1968, стр. 174).

В 1912 году на заседании физико-математического отдела Академии наук состоялось знаменитое сообщение С.Г. Навашина, где он установил у неоднократно до того подвергнувшегося исследованию объекта *Galtonia candicans* наличие особых мельчайших, но вполне постоянных придатков, присоединенных при помощи “ниточки” к двум “средним” хромосомам. Придатки эти были названы С.Г. Навашиным “спутниками” (*satelles* - лат.). Тельца эти при делении ядра расщепляются вместе с остальным телом хромосомы. Таким образом впервые была показана возможность идентификации хромосом по особенностям их строения. (Из: Левитский, 1968, стр. 171-175).

В 1914 году С.Г. Навашин установил, что в участке прикрепления нитей веретена образуется перетяжка материала хромосомы и эта перетяжка расположена в характерных местах в трех ранее установленных типах хромосом.

Из-за того, что данные Навашина были опубликованы на русском языке, к тому же в специальных изданиях, а также из-за последовавших вскоре политических пертурбаций, его работа осталась совершенно неизвестной за границей. Факты, установленные Навашиным, постепенно открывались иностранными учеными вторично, например, много позже Ньютоном и Тейлором. (Newton, 1924; Taylor, 1924). Оба они, как мы видим, с большим

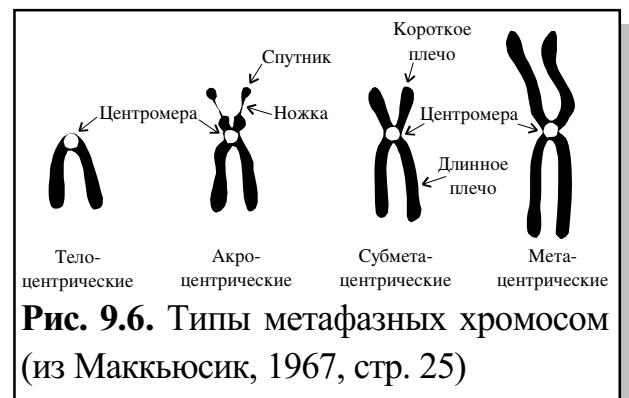
отставанием открыли спутники и перетяжки хромосом в месте прикрепления нитей веретена (Из: Левитский, 1968, стр. 175-178).

Фактически в соответствии с классификацией Навашина, выделяют 4 типа хромосом в зависимости от положения центромеры и определяемой этим положением относительной длины плеч, т.е. частей хромосомы по обе стороны от центромеры (Рис. 9.6.).

По мнению многих ученых любая хромосома имеет два плеча, т.е. телоцентрической хромосомы в природе не существует. У телоцентрических хромосом во всех случаях обнаружено наличие второго, пусть очень короткого плеча. Современные данные свидетельствуют о том, что во всех случаях на каждом конце хромосомы должна быть специальная структура - теломера с большим количеством прителомерного гетерохроматина (см. разд. 9.5.) Таким образом, центромера не может находиться на самом конце хромосомы, и телоцентрики в природе действительно не существуют.

### 9.3.2. Кариотип и идиограмма

Индивидуальные хромосомы составляют кариотип - хромосомный комплекс вида со всеми его особенностями: числом хромосом, их морфологией, наличием видимых под световым микроскопом деталей строения



**Рис. 9.6.** Типы метафазных хромосом (из Маккьюсик, 1967, стр. 25)

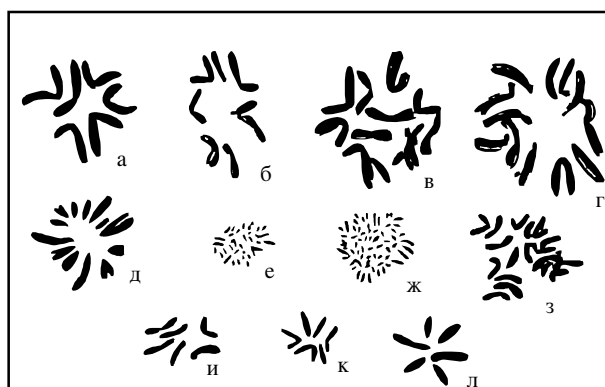
отдельных хромосом, перетяжек, спутников, соотношением длин плеч, чередованием эу- и гетерохроматина (Рис. 9.7.).

Группируя хромосомы попарно и располагая хромосомы в порядке уменьшения их длины, можно построить идиограмму - диаграмматический рисунок кариотипа (Рис. 9.8.).

Диплоидные числа хромосом варьируют в очень широких пределах от 2-х до 1600 (Табл. 9.2.).

Сведения о числах хромосом см у: Лобашев, 1967, стр ..., Алиханян и др. 1985, стр. 22; Инге-Вечтомов, 1989, стр. 66-67).

Известный российский генетик А.П. Акифьев (1993) обратил внимание на то, что размеры хромосом не могут быть меньше определенных размеров. У эукариот нет нормальных хромосом, которые бы не были видны в световом микроскопе т.е. меньших определенного размера. Это означает, что существует своего рода "критическая масса" хромосом, которая не может быть потеряна ни при каких обстоятельствах. Акифьев отмечает, что в соматических клетках хромосомы могут быть реорганизованы в широких пределах, вплоть до их полного распада в макронуклеусах некоторых инфузорий. Однако, прохождение митоза и мейоза невозможно без

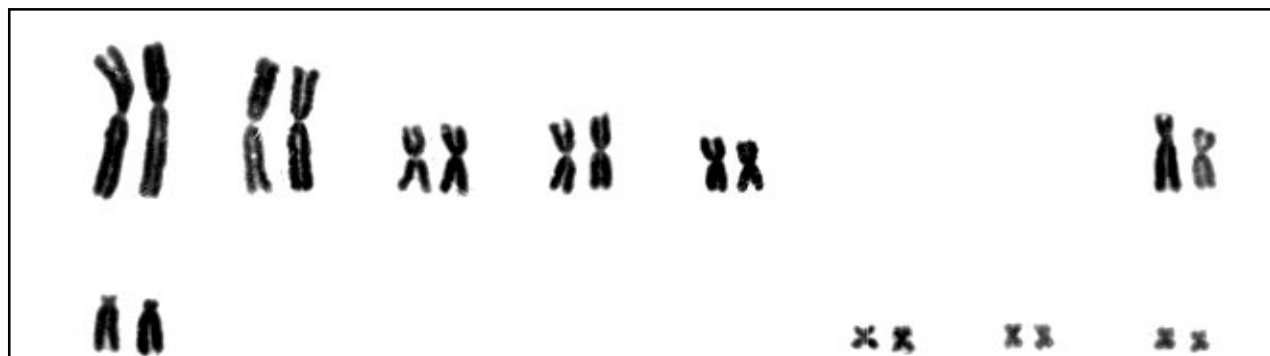


**Рис. 9.7.** Гаплоидные кариотипы в микроспорах представителей семейства Commelinaceae. (По Anderson a. Sax, 1936, из: Прокофьева-Бельговская, 1966).

а - *Tradescantia humilis*; б - *Tradescantia sp.*; в - *T. canaliculata*; г - *T. rosea*; д - *T. micrantha*; е - *T. geniculata*; ж - *Tradescantia sp.*; з - *Setcreasea brevifolia*; и - *Rhoco discolor*; к - *Spironema fragrans*; л - *Callisia repens*

типичных хромосом, поддерживающих критическую массу. Причины, определяющие критическую массу, неизвестны.

Как кариотип, так и идиограмма позволяют морфологически характеризовать каждую хромосому, но очень часто не дают возможность получить четкую характеристику, позволяющую идентифицировать



**Рис. 9.8.** Идиограмма хромосом серого хомячка (фотография Саблиной О.В. и Раджабли С.И.)

**Табл. 9.2.** Диплоидные числа хромосом у некоторых организмов (Прокофьева-Бельговская, 1966, стр. 286, с дополнениями)

Человек	46
Горилла	48
Кошка	60
Крыса	42
Мышь	40
Дрозофила	8
Аскарида	2
Речной рак	116
Сазан	104
Малярийный плазмодий	2
Лилия	24
Лук	16
Рожь	14
Кукуруза	20
Пшеница	42
Радиолярии	1600
Томат	24
Картофель	48
Крыжовник	16
Вишня	32

отдельные хромосомы. Такую возможность дают методы дифференциальных окрасок хромосом.

### 9.3.3. Дифференциальные окраски хромосом

В 1968 г. Т. Caspersson предложил метод окрашивания хромосом квинакрином (или акрихином) с последующим облучением их ультрафиолетом и индукцией флуоресценции. Оказалось, что в разных районах хромосом выявляется разное число сайтов связывания красителя. Сайты к тому же сильно варьировали по размерам и

интенсивности свечения. Наборы флуоресцирующих полос создавали индивидуальность не только целых хромосом, но даже их плеч. В результате каждую хромосому оказалось возможным идентифицировать. Однако, как выяснилось число полос и их интенсивность варьировали в работах разных исследователей. В 1971 году на Парижской конференции была принята единая номенклатура окраски каждой хромосомы человека (Парижская номенклатура). Эта окраска получила название Q-окраска или Q-banding.

В этом же 1971 году Shaw, Schendl и Sumner предложили метод G-окраски. Препараты после предварительной щелочной обработки инкубируют в стандартном солевом растворе (2×SSC) а затем окрашивают красителем Гимзы-Романовского. В результате этой окраски появляются темные поперечные (G+) полосы и светлые неокрашенные (G-) полосы между ними.

В разных публикациях набор и интенсивность G-полос может варьировать. Парижская номенклатура устанавливает норму числа G+ полос в хромосомах человека - 800 на геном. Кроме того, эти полосы должны быть в определенных позициях. Полосам присвоены определенные номера и относительно их картируют гены. На Рис. 9.9. представлена карта первой хромосомы человека с нанесенными сайтами мутаций, обуславливающих различные физиологические недостатки.

Кроме обычной G-методики, известна модификация, позволяющая получить до 2000 полос. Это High Resolution методика.

Маркировка хромосом с помощью G-метода позволяет идентифицировать индивидуальные хромосомы и их



фрагменты, следить за их перемещениями в ходе эволюции, под воздействием различных экологических факторов.

### 9.3.4. «Правило Меллера» и синтения

В 1940 году Г. Меллер предположил, что 6 плеч хромосом, составляющих кариотип разных видов дрозофил, сохраняются в эволюции неизменными. По его мнению «кариотип всего рода состоит из 5 палочковидных хромосом (элементы А-Е) и точечной шестой хромосомы (элемент F), в которых в ходе эволюции происходили лишь парацентрические инверсии и центрические слияния, в результате чего у близких видов группы сцепления сохраняются неизменными». Годом позже А. Стертевант и Ю. Новицкий, картируя гены и составляя генетические карты у разных видов дрозофил, нашли, что элементы хромосомного набора имеют определённые и постоянные серии генов. Различия выявляются главным образом в порядке расположения генов в пределах каждой группы. Например, у *D. melanogaster* такие гены как *u*, *w*, *sn*, и *v* находятся в X-хромосоме. У других видов дрозофил эти гены также располагаются в X-хромосоме. Порядок их расположения сильно отличается из-за большого числа инверсий, которыми различаются эти виды. Гомеология между различными хромосомными элементами была найдена для 26 видов дрозофил (Ashburner, 1989). В 1980-90-е годы нашли гомеологию между группами сцепления дрозофилы и других представителей отряда Diptera (*Musca domestica*, *Lucilia cuprina*, *Ceratitis capitata*, гавайские дрозофилы).

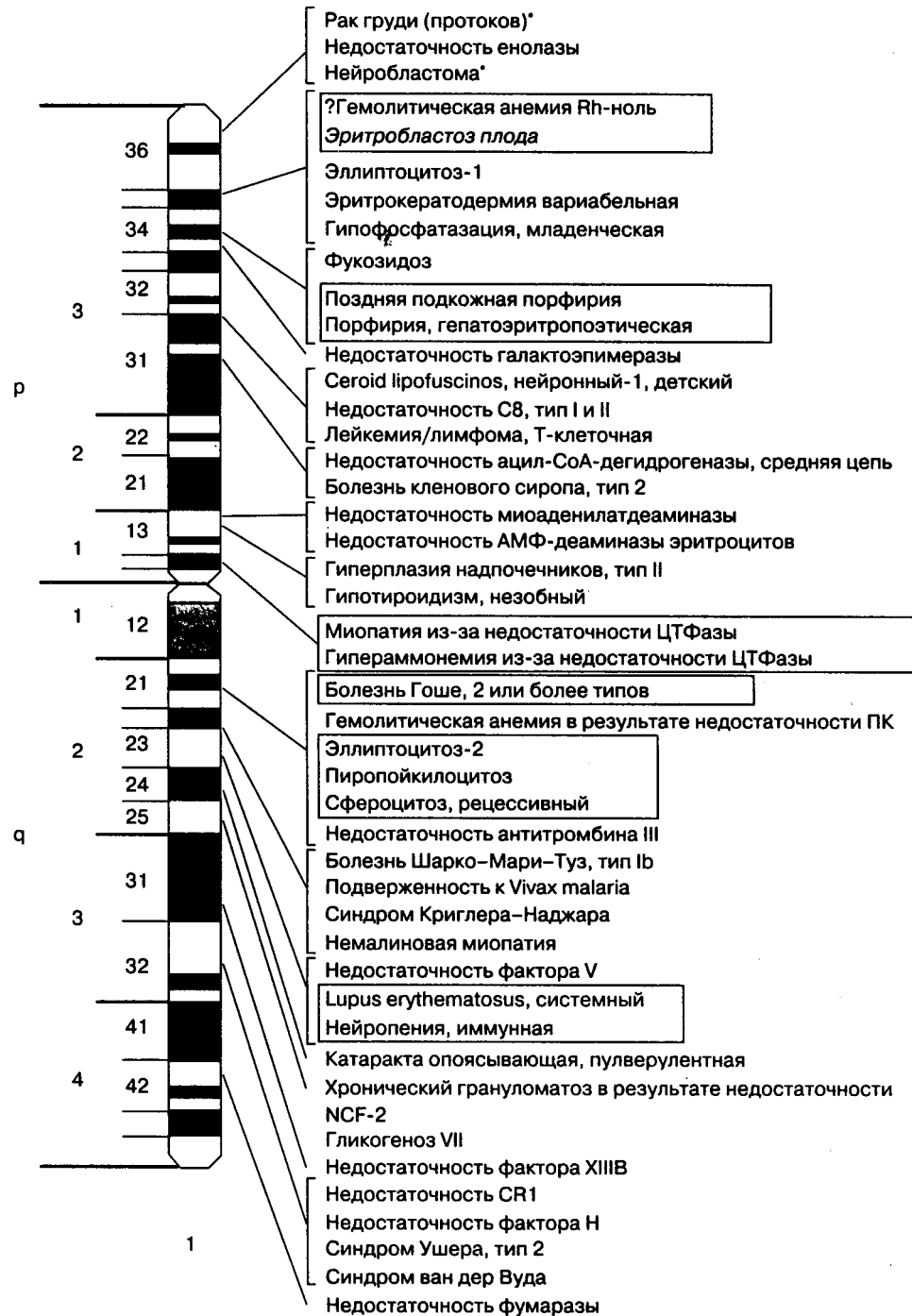
Использование правила Меллера дает хорошие практические результаты, особенно при использовании метода гибридизации *in situ*. Так, имея по одному клону ДНК из генов или последовательностей, расположенных в 4-х разных хромосомах *D. melanogaster* и локализовав их в политенных хромосомах какого-то другого вида, можно быстро установить соответствие между группами сцепления *D. melanogaster* и индивидуальными хромосомами, а также группами сцепления другого вида.

Гены, которые расположены в гомеологичных элементах хромосом разных видов, называют синтенными, а само явление гомеологии участков хромосом у отдалённых видов называется синтенией.

У представителей рода *Chironomus* также обнаружена обширная гомология различных плеч хромосом, которая довольно легко выявляется по рисунку дисков.

Широко применяются в последнее время опыты по перекрестной гибридизации ДНК одного вида с кариотипом другого, в результате чего в хромосомах разных видов можно выявить зоны гомеологии. Например, в результате гибридизации ДНК человека с метафазными хромосомами тюленя выявлено свыше 30 гомеологичных сегментов, т.е. протяжённые районы хромосом одного вида присутствуют в хромосомах другого вида в более или менее идентичном состоянии (Fronicke et al., 1997).

Ещё более впечатляющие примеры гомеологии были обнаружены при сравнении строения генома у столь отдалённых видов как рыба *Fugu*



**Рис. 9.9.** Патологическая анатомия человека: гены болезней, картированные в первой хромосоме (McKusick, 1992, По: Пузыреву 1996, стр. 25).

Рамкой обведены аллельные состояния; °-новообразования, связанные со специфической хромосомной перестройкой, онкогеном или потерей гетерозиготности опухолевых клеток; курсивом отмечена несовместимость матери и плода. p - короткое плечо, q - длинное плечо, 1-3, 1-4 - районы хромосом

*rubripes*, обитающая в японском море, и человек.

У человека в 14-й хромосоме в районе локуса AD3, контролирующего развитие болезни Альцхаймера, расположены 3 других гена: дигидролипоамид сукцинилтрансферазы, S31iii125, S20i15, примыкающие к гену FOS. Первые три гена обнаружены в геноме рыбки *Fugu*, они также примыкают к локусу cFOS. Относительный порядок генов cFOS, S31iii125 и S20i15 был одинаков у обоих генов. Однако, у *Fugu* эти три гена лежат во фрагменте 12,4 т.п.н., в то время как у человека они занимают участок более чем 600 т.п.н. Размер генома *Fugu* в 7,5 раз меньше, чем у человека, поэтому плотность генов на единицу длины ДНК у них выше (Trower et al., 1996).

### **Литература к разделу 9.3.**

- Акифьев А.П. Концепция базигенома и критической массы хромосом эукариот. Докл. Акад. Наук, 332, N1, 96-98, 1993.
- Алиханян С.И., Акифьев А.П., Чернин Л.С. Общая генетика. Москва, Высшая школа, 1-446, 1985.
- Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции. Москва, Высшая школа, 1-592, 1989.
- Левитский Г.А. Морфология хромосом. История. Методика. Факты. Теория, в сб. Классики советской генетики. Ленинград, Наука, 171-226, 1968.
- Лобашев М.Е. Генетика (издание второе). Ленинград, Изд-во ЛГУ, 1-751, 1967.
- Маккюсик В. Генетика человека. Москва, Мир, 1-200, 1967.
- Прокофьева-Бельговская А.А. Строение и функция хромосом. в кн. Руководство по цитологии, т. 2,

Москва-Ленинград, Наука, стр. 280-329, 1966.

- Пузырев В.П. Геномные исследования и болезни человека, 1996. Соросовский образовательный журнал N5, 19-27, 1996.
- McKusick, A. Mendelian inheritance in man. Baltimor, London; John Hopkins University, 1992.

### **9.4. Эу- и гетерохроматин в митотических хромосомах**

К началу 20 века стало известно, что некоторые хромосомы или их фрагменты во время клеточного деления выглядят более конденсированными и интенсивно окрашенными. Такие различия были названы гетеропикнозом (Gutherz, 1907) (гетерос - иной, пикнозис - плотность, греч.). Гетеропикноз может быть отрицательным при слабой и положительным при сильной окрашиваемости. В интерфазных ядрах цитологи находили сгустки интенсивно окрашенного материала, которые назвали хромоцентрами Э. Хайц (E. Heitz), проанализировав поведение гетеропикнотических участков хромосом и интерфазных хромоцентров, пришел к выводу, что плотные, сильно окрашенные районы хромосом не деконденсируются в телофазе, сохраняя свою плотность. В последующей интерфазе они и образуют хромоцентры. Для обозначения районов хромосом, демонстрирующих положительный гетеропикноз на некоторых стадиях митотического цикла, Э. Хайц (Рис. 9.10.) в 1928 году предложил термин "гетерохроматин". С его помощью он предложил различать эу-хроматин - основную часть митотических хромосом, которая претерпевает обычный цикл компактизации - декомпактизации во время митоза, и гетерохроматин - участки

хромосом, постоянно находящиеся в компактном состоянии.

У большинства видов эукариот хромосомы содержат как эу-, так и гетерохроматиновые участки, причем последние, как правило, составляют значительную часть генома. Так, у *D. melanogaster* полностью гетеропикнотична Y-хромосома самца, в X-хромосоме доля гетерохроматина составляет около 40%, во второй - 29%, в третьей - 25% длины хромосом. По-видимому, большая часть 4ой хромосомы является гетерохроматиновой. Общая доля гетерохроматина в кариотипе дрозофилы (Из: Жимулев, 1993, стр. 13).

Гетерохроматиновые районы обладают рядом свойств, отличающих их от эухроматина. Их характеристика приведена ниже.

#### 9.4.1. Компактизация хроматина

По данным Хайца начиная с ранней профазы гетерохроматиновые районы хромосом становятся легко заметными и отличаются от эухроматиновых более интенсивной окраской. В конце метафазы эти различия исчезают. В телофазе эухроматиновые районы декомпактизуются, а гетерохроматиновые остаются положительно гетеропикнотичными и опять выявляются цитологически. В последующей интерфазе они представлены многочисленными сильноокрашенными зернами или крупными блоками гетеропикнотичного материала, издавна называемыми хромоцентрами (Рис. 9.11.)

Прицентромерные гетерохроматиновые районы окрашены более интенсивно. В интерфазных ядрах (г-е) гетерохроматин представлен интенсивно

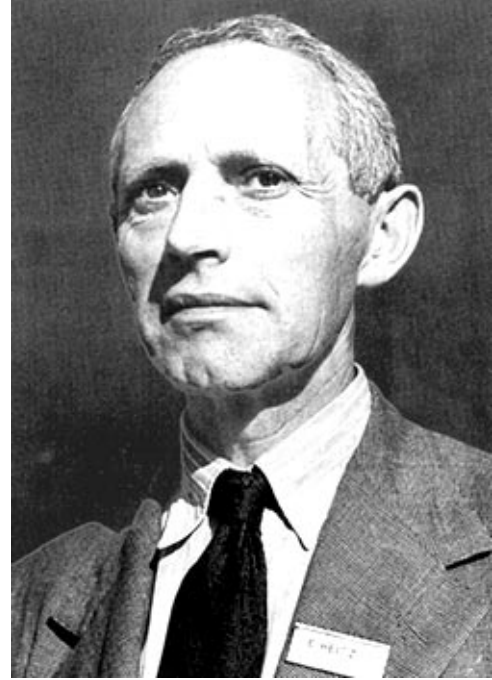


Рис. 9.10. Эмиль Хайц  
1892-1965

окрашенными зернами - хромоцентрами.

Эта картина изменений состояния компактности позволила Шульцу (J. Schultz) в 1947 году сформулировать представление о гетерохроматине как районах хромосом, которые имеют специфическое свойство оставаться в виде блоков в межмитотической стадии. Таким образом, эухроматин и гетерохроматин различаются по циклам компактизации. В то время как первый проходит полный цикл компактизации - декомпактизации от интерфазы до интерфазы, второй сохраняет состояние относительной компактности.

Однако постоянство компактности укладки гетерохроматиновых районов хромосом относительно. Об этом свидетельствуют следующие факты:

1. В клеточном цикле не находят сильного окрашивания гетерохроматина аутосом дрозофилы до стадии профазы.

2. Гетерохроматиновых районов не находят в хромосомах эмбрионов на самых ранних этапах дробления.

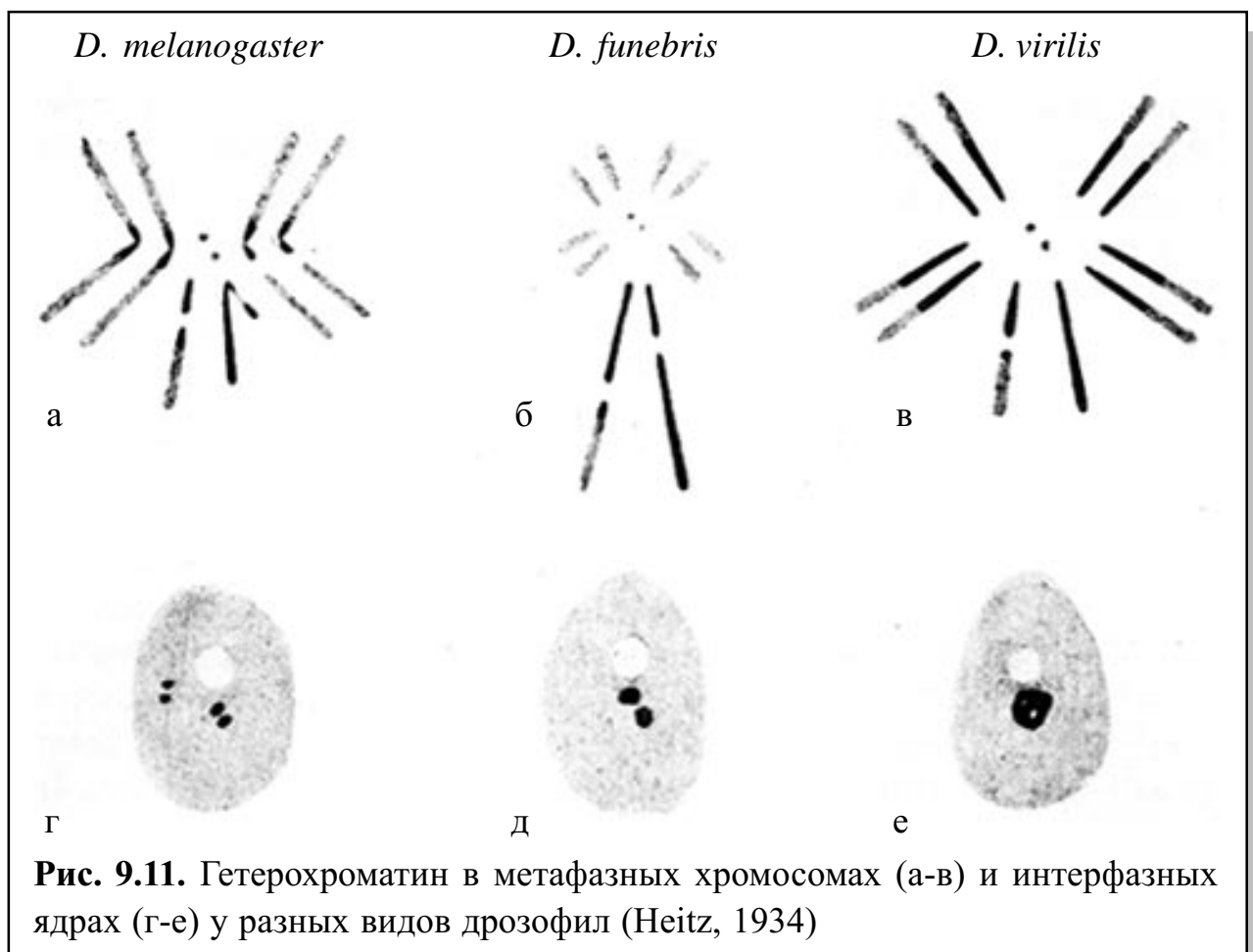
3. В интерфазных ядрах хромосом дрозофилы число хромоцентров варьирует от 0 до 5. Их отсутствие может свидетельствовать о полной декомпактизации гетерохроматина на каких-то стадиях интерфазы, возможно, в конце S-периода, когда реплицируется ДНК гетерохроматина.

4. В ходе митотического цикла гетерохроматин так же как и эухроматин компактизуется. При измерениях длин митотических хромосом дрозофилы, находящихся на разных стадиях компактизации, показано, что чем больше в составе хромосом гетерохроматина, тем меньше они укорачиваются. Измерения суммарных длин гетерохроматина всех

хромосом показали, что они варьируют в пределах 4,1 - 7,2 мкм, в то время как абсолютная длина гаплоидного набора - в пределах 13,4 - 67,0. Эти данные, во-первых, подтверждают представления о значительной компактности гетерохроматина уже на ранних стадиях митоза, а во-вторых, что степень компактности гетерохроматина в клеточном цикле непостоянна, и он все-таки компактизуется в профазе.

5. Существуют различные факторы, влияющие на компактизацию, химические и физические.

Компактизация района хромосомы в клеточном цикле является основной характеристикой, определяющей принадлежность данного района к гетерохроматину (Из: Жимулев, 1993, стр. 13-20).



### 9.4.2. Дифференциальная окрашиваемость

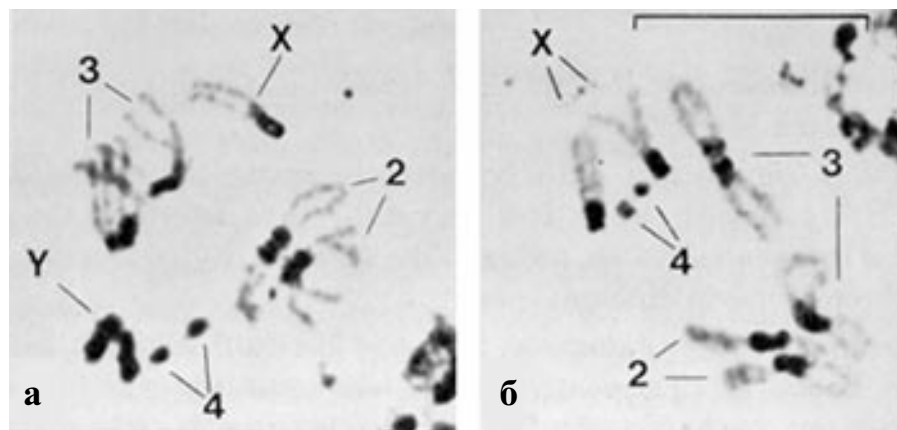
В 1970 году М.Л. Пардю и Дж. Голл (M.L. Pardue, J. Gall) обнаружили, что прицентромерный гетерохроматин в хромосомах мыши после денатурации - ренатурации ДНК и гибридизации *in situ* окрашивается красителем Гимзы более интенсивно, чем эухроматин. А в 1971 году Т. Шу и Ф.Т. Арриги (T. Hsu, F. Arrighi) предложили методику обработки препаратов хромосом, позволяющую дифференцированно окрашивать эу- и гетерохроматин. Основными этапами процедуры являлись: денатурация ДНК хромосом в 0,7N NaOH, тепловая ренатурация (65°C) и окраска в растворе Гимза. Обработав таким образом препараты хромосом 20 видов млекопитающих, авторы нашли, что районы прицентромерного гетерохроматина, выявляемого при обычных окрасках по большей плотности, интенсивно окрашивались, а эухроматин оставался бесцветным. Авторы назвали эту процедуру обработки методикой

окраски на конститутивный (С) гетерохроматин, или С-окраской (C-banding).

Как правило, у всех изученных видов обнаруживается хорошее совпадение в локализации гетерохроматиновых районов, выявляемых по аллоцикличности компактизации и окраски, например, ацето-орсеином и с помощью С-окраски (Рис. 9.12.).

Механизм С-окрашивания не выяснен. И хотя в большинстве случаев расположение С-окрашенных районов хромосом совпадает с локализацией сателлитных ДНК, известны и очень важные исключения, например, Y-хромосома *D. hydei* не содержит высокоповторенных ДНК, но обнаруживает четкую С-окраску.

Эффективными в выявлении гетерохроматина являются флуоресцирующие красители, такие как квинакрин (Q-окраска) и Хекст (Hoechst 33258 - H-окраска). Оба они связываются с районами хромосом, обогащенными А-Т парами, но механизмы окраски у них



**Рис. 9.12.** Локализация эу- (светлые части хромосом) и гетерохроматина (интенсивно окрашенные участки) в кариотипе дрозофилы по результатам С-окрашивания (Из: Faccio Dolfini, 1974, в кн. Жимулев, 1993, стр. 22). **а** - самец, **б** - самка. Цифры - номера хромосом, X и Y - половые хромосомы, шкала - 10 мкм

разные. Квинакрин интеркалирует в молекулу ДНК, Хекст связывается с наружной стороны молекулы в ее узкой бороздке.

Известны другие процедуры: N-окраска, акридином оранжевым, а также дифференциальное энзиматическое переваривание хромосом (см. в кн. Жимулев, 1993, стр. 21-29).

Разные участки гетерохроматина окрашиваются разными красителями, некоторые районы - только каким-то одним, другие - сразу несколькими, третьи - тоже несколькими, но другими. Применяя различные красители и используя хромосомные перестройки, разрывающие гетерохроматиновые районы, в хромосомах дрозофилы удалось охарактеризовать много небольших районов, где сходство к окраскам отлично от такового в соседних участках. Все эти районы были пронумерованы (от 1 до 61) и таким образом была создана карта гетерохроматина (см. Рис. 9.16.).

### 9.4.3. Конъюгация гетерохроматиновых районов

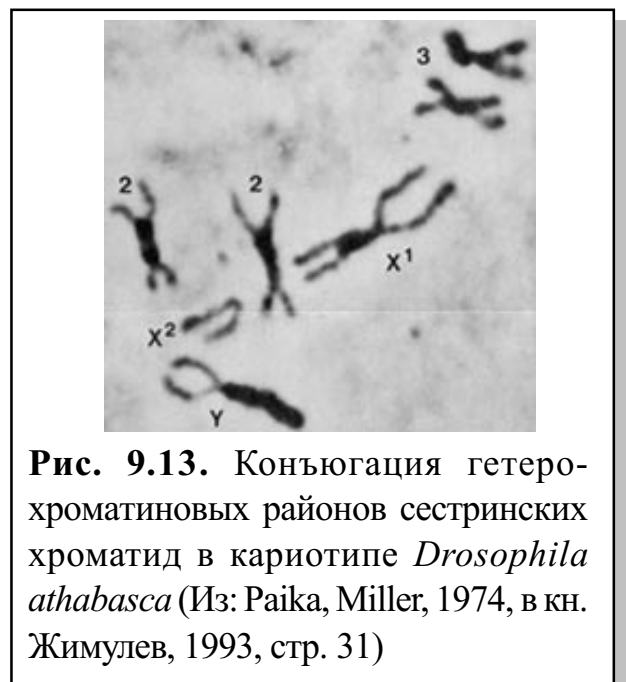
Одним из специфических свойств гетерохроматиновых районов является их сильно выраженная способность к контактам между собой. Фактически все известные данные о строении интерфазных ядер свидетельствуют о наличии в них одного или нескольких хромоцентров, образующихся в результате слияния гетерохроматиновых районов всех хромосом кариотипа. Число хромоцентров, большее единицы, свидетельствует о том, что не всегда гетерохроматиновые районы объединены в единственный хромоцентр.

В ранней профазе гетерохроматиновые районы еще объединены в хромоцентр. Позднее эухроматиновые части сестринских хроматид, тесно конъюгирующие еще в профазе митоза, отделяются друг от друга, в то время как гетерохроматиновые районы сохраняют конъюгацию вплоть до начала анафазы (Рис. 9.13.). Хроматиды хромосом, имеющих много гетерохроматина (например, Y- или четвертая хромосома у дрозофилы), никогда не расходятся до начала анафазы.

Конъюгация хроматид осуществляется вследствие особенностей самого гетерохроматина, а не центромеры.

В пользу представлений о тесном соседстве гетерохроматиновых районов гомологичных хромосом от S-периода до метафазы свидетельствуют данные по индукции митотического кроссинговера. Более высокие частоты мозаиков по генам X-хромосомы дрозофилы получены в линиях с более высоким содержанием гетерохроматина.

В профазе I мейоза районы прицентромерного гетерохроматина у



**Рис. 9.13.** Конъюгация гетерохроматиновых районов сестринских хроматид в кариотипе *Drosophila athabasca* (Из: Paika, Miller, 1974, в кн. Жимулев, 1993, стр. 31)

дрозофилы выглядят объединенными в плотное темно-окрашенное тело, которое тоже называют хромоцентром. Такие хромоцентры описаны у многих видов. Полагают, что хромоцентр является структурой, которая может играть роль в ориентации хромосом в профазе мейоза. Конъюгация негомологичных X- и Y-хромосом в первом делении мейоза у самцов дрозофилы осуществляется за счет специальных сайтов, расположенных в гетерохроматине (Из: Жимулев, 1993, стр. 29 - 32).

#### 9.4.4. Контакты гетерохроматина с ядерной оболочкой

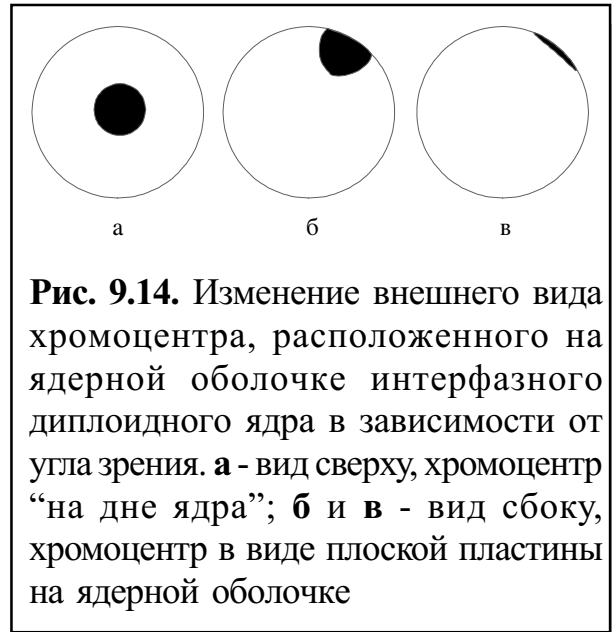
Хромоцентры, состоящие из гетерохроматина интерфазных хромосом, расположены на ядерной оболочке (Рис. 9.14.).

Во время митотического деления связь гетерохроматиновых районов с внутренней мембраной ядра сохраняется вплоть до прометафазы.

#### 9.4.5. Гетерохроматин и хромосомные перестройки

Широко известны представления о значительной роли гетерохроматиновых районов в эволюции кариотипа. По гетерохроматиновым районам происходят слияния и разделения плеч, что приводит к изменениям морфологии и числа хромосом в кариотипе.

Одним из основных механизмов, действующих в процессе эволюции хромосомных наборов, являются Робертсоновские преобразования. В результате Робертсоновского процесса двуплечая хромосома разламывается на два акроцентрика или два акроцентрика соединяясь, формируют одну двуплечую



**Рис. 9.14.** Изменение внешнего вида хромоцентра, расположенного на ядерной оболочке интерфазного диплоидного ядра в зависимости от угла зрения. **а** - вид сверху, хромоцентр “на дне ядра”; **б** и **в** - вид сбоку, хромоцентр в виде плоской пластины на ядерной оболочке

хромосому. Представления о самом механизме этих процессов долгое время были весьма противоречивы, т.к. никаких данных о способности центромеры к разрывам или слияниям без потери ее активности не имелось. Поэтому лучшее объяснение Робертсоновскому процессу при возникновении двуплечей хромосомы из двух одноплечих давало представление о неравной транслокации. При этом предполагалось, что маленький центрический фрагмент одного из акроцентриков теряется.

По другому механизму это может быть соединение двух моноцентрических одноплечих хромосом с образованием двуплечей хромосомы, в которой две близкорасположенные центромеры могут функционировать как одна, или же одна из двух центромер может инактивироваться. Это С-С соединение хромосом (центромера к центромере). Возможность такого процесса обеспечивается свойствами гетерохроматиновых районов, в которых локализуется центромера. Примером С-С соединения служит механизм образования хромосомы 2 у человека (Из: Прокофьева-Бельговская, 1986, стр. 345).



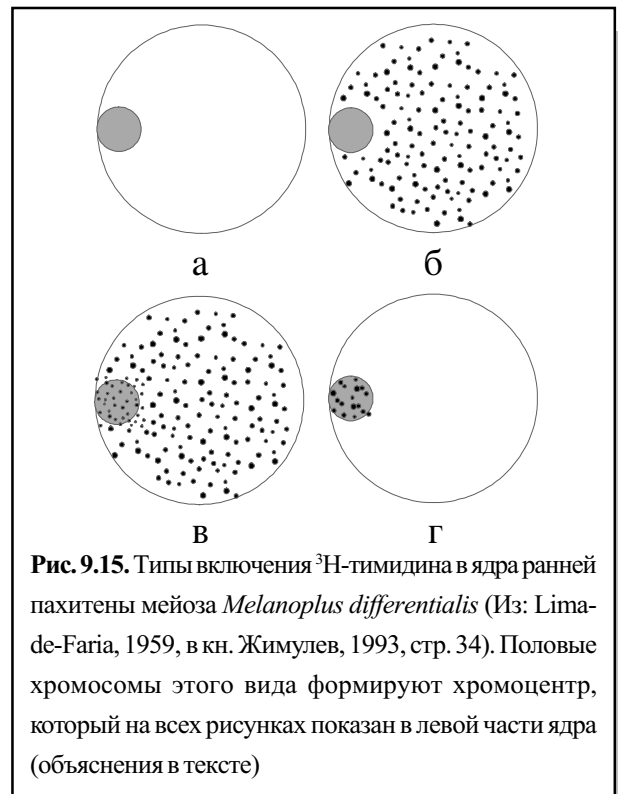
Внутривидовой полиморфизм кариотипов также во многом складывается из образования хромосомных перестроек, имеющих точки разрыва в гетерохроматине.

В культуре клеток дрозофилы хромосомные перестройки, индуцируемые ультрафиолетовым излучением, образуются преимущественно в гетерохроматине X- и Y-хромосом и аутосом. При обработке мутагенами дрозофил, несущих мутации по нарушениям рекомбинации и чувствительности к мутагенам, оказалось, что у мутантов по гену *mus109* около 80% индуцированных разрывов картировано в гетерохроматине. (Из: Жимулев, 1993, стр. 32-33).

#### 9.4.6. Поздняя репликация

Изучая распределение метки на радиоавтографах после включения  $^3\text{H}$ -тимидина в клетки сперматоцитов кузнечика *Melanoplus differentialis*, А. Лима-де-Фариа в 1959 году обнаружил 4 типа мечения (Рис. 9.15.).

В части клеток метка полностью отсутствовала (Рис. 9.15. а), в другой части клеток включение предшественника происходило только в эухроматин аутосом (Рис. 9.15.б), в ядрах третьего типа - все ядро метилось сплошь (Рис. 9.15.в), и наконец в части ядер включение происходило только в гетерохроматиновый блок половых хромосом (Рис. 9.15.г). Поскольку семенники у самцов этого вида состоят из группы фолликулов, в которых сперматоциты объединены в цисты с синхронным прохождением мейоза, удалось показать, что четвертый тип мечения соответствует наиболее поздним стадиям S-периода.



**Рис. 9.15.** Типы включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ядра ранней пахитены мейоза *Melanoplus differentialis* (Из: Lima-de-Faria, 1959, в кн. Жимулев, 1993, стр. 34). Половые хромосомы этого вида формируют хромоцентр, который на всех рисунках показан в левой части ядра (объяснения в тексте)

В последующие годы получен огромный объем экспериментальных данных, позволяющих сделать общий вывод о том, что в гетерохроматиновых районах хромосом завершение репликации ДНК задержано.

Сейчас даже предполагают, что поздний синтез ДНК является единственным константным признаком гетерохроматина, известным до сих пор. Однако известны и исключения: у некоторых видов мхов-печеночников, включая род *Pellia*, на представителях которого Э. Хайц в 1928 году описал гетерохроматин, обнаруживающий к тому же С-окраску, гетерохроматиновые районы завершают репликацию рано. Полагают, что время репликации ДНК в районах конститутивного гетерохроматина может зависеть от того, когда он декомпактизуется в интерфазе. Например, у ряда печеночников гетерохроматин компактен в G1-периоде, но становится диффузным с началом S-периода. К середине S-периода

репликация в нем завершается и он опять становится компактным. (Из: Жимулев, 1993, стр. 33-36).

#### 9.4.7. Варьирование количества гетерохроматина

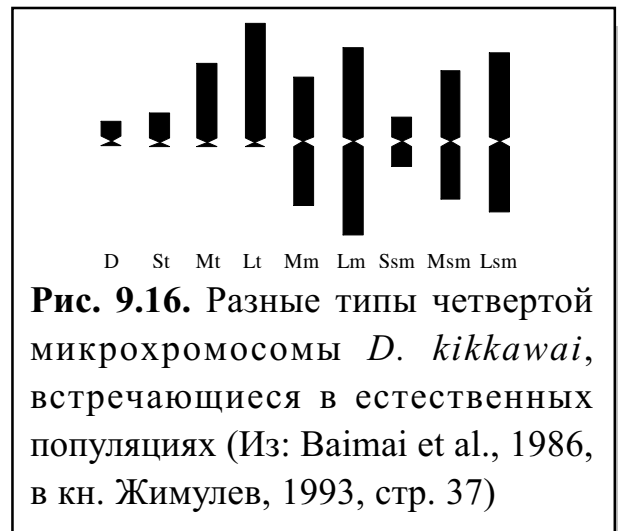
В 1929-1937 гг. в работах Ланцефилда и Добжанского была открыта еще одна особенность гетерохроматина - варьирование его количества в геноме. Например, у *Drosophila pseudoobscura* Y-хромосома в разных популяциях представлена в семи вариантах, сильно различающихся по длине.

Замечательны различия в размерах точечной четвертой хромосомы у *D. kikkawai* (Рис. 9.16.).

У насекомых обнаружены значительные вариации в размерах X-, Y- и микрочромосом, которые обогащены гетерохроматином. С помощью специфических окрасок показано, что варьирующей компонентой является именно гетерохроматин. (Из: Жимулев, 1993, стр. 36-40).

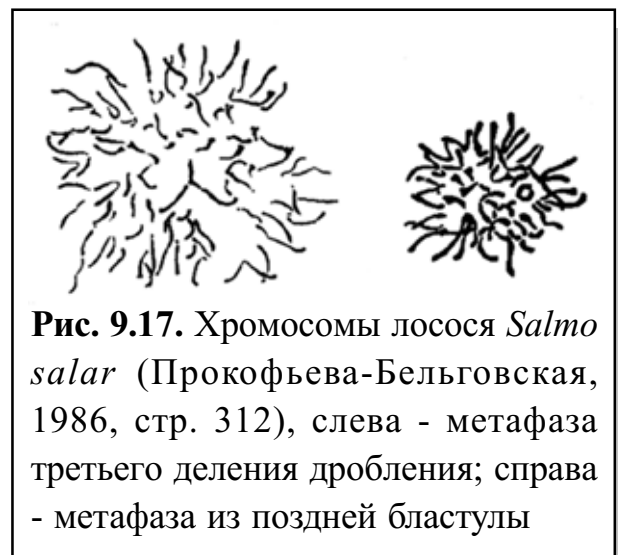
#### 9.4.8. Формирование гетерохроматиновых районов хромосом в онтогенезе

Исследования А.А. Прокофьевой-Бельговской, проведенные на ряде объектов (рыбы, амфибии, млекопитающие), привели ее к выводу о том, что в раннем развитии метафазные хромосомы значительно отличаются по морфологии от метафазных хромосом более поздних стадий развития: они тоньше, сильно декомпактизованы, в них отсутствуют блоки гетерохроматина. Она назвала такие хромосомы ювенильными (Рис. 9.17.)



**Рис. 9.16.** Разные типы четвертой микрочромосомы *D. kikkawai*, встречающиеся в естественных популяциях (Из: Vaimai et al., 1986, в кн. Жимулев, 1993, стр. 37)

У всех организмов, хорошо изученных на стадиях раннего эмбриогенеза - циклопы, вьюн, лосось, форель, ряд амфибий, мыши, интерфазные ядра самых первых делений дробления обладают примечательными особенностями. На стадии двух-четырех бластомеров они представляют собой пузырьки неправильной формы с прозрачной кариоплазмой, гетерохроматиновые районы в них не обнаруживаются. Все участки хромосом в этих ядрах полностью деспирализованы, ядрышко отсутствует. На стадии метафазы хромосомы представляют собой тонкие нитеобразные структуры. Последовательные деления бластомеров сопро-



**Рис. 9.17.** Хромосомы лосося *Salmo salar* (Прокофьева-Бельговская, 1986, стр. 312), слева - метафаза третьего деления дробления; справа - метафаза из поздней бластулы

вождаются постепенным структурированием ядра, развитием ядрышка; хромосомы в метафазе приобретают свойственную данному виду морфологическую структуру (см. Рис. 9.14.). В составе гетерохроматина на этих стадиях развития выявляются главным образом гистоны, а вот негистоновые белки не обнаружены (Из: Прокофьева-Бельговская, 1986, стр. 312-313).

Хорошо изучено раннее развитие у дрозофилы до стадии бластулы (бластодермы). После оплодотворения происходит восемь быстрых синхронных делений ядер, которые затем начинают мигрировать к поверхности яйца, продолжая деления. Уже около поверхности проходят еще 4 деления (циклы 10-13), в результате чего образуется синцитий из одного слоя ядер. После образования клеточных оболочек вокруг ядер в интерфазе 14-го цикла формируется клеточная бластодерма.

Клеточные деления дробления проходят очень быстро. Один митотический цикл протекает в среднем за 10 мин. Начиная с 12-го деления время каждого цикла увеличивается: до 12,4 мин - в 12-м, до 21,1 мин в 13-м. В первых 11-12 делениях в ядрах не выявляются ядрышки и хромоцентры, хроматин ядра представлен тонкодисперсной сетью, а митотические хромосомы не дифференцируются на эу- и гетерохроматин.

Как ядрышки, так и хромоцентры появляются на стадии бластодермы. При трансплантации ядер бластодермы в неоплодотворенное яйцо хромоцентры и ядрышки в них быстро исчезают, хроматин превращается в тонкодисперсную сеть, и уже через 15 мин вновь начинаются деления дробления.

При окраске на С-гетерохроматин метафазные хромосомы первых 4-5 циклов деления (30-60 мин после оплодотворения) отличаются от таковых на стадии бластодермы или от хромосом нейробластов. Они имеют вид длинных тонких слабо конденсированных нитей. В кариотипе достаточно четко окрашивается только Y-хромосома, в прицентромерных районах других хромосом видны лишь "следы" окрашивания. Специфический для гетерохроматина белок HP1 до 5-6 циклов дробления в ядрах не обнаруживается. Надежно выявляется HP1 белок начиная с 10-11 цикла. В это же время в хромосомах начинается транскрипция. Таким образом, стадия бластодермы является критической, в это время активируются гены и одновременно хромосома дифференцируется на эу- и гетерохроматин. (Из: Жимулев, 1993, стр. 41-45).

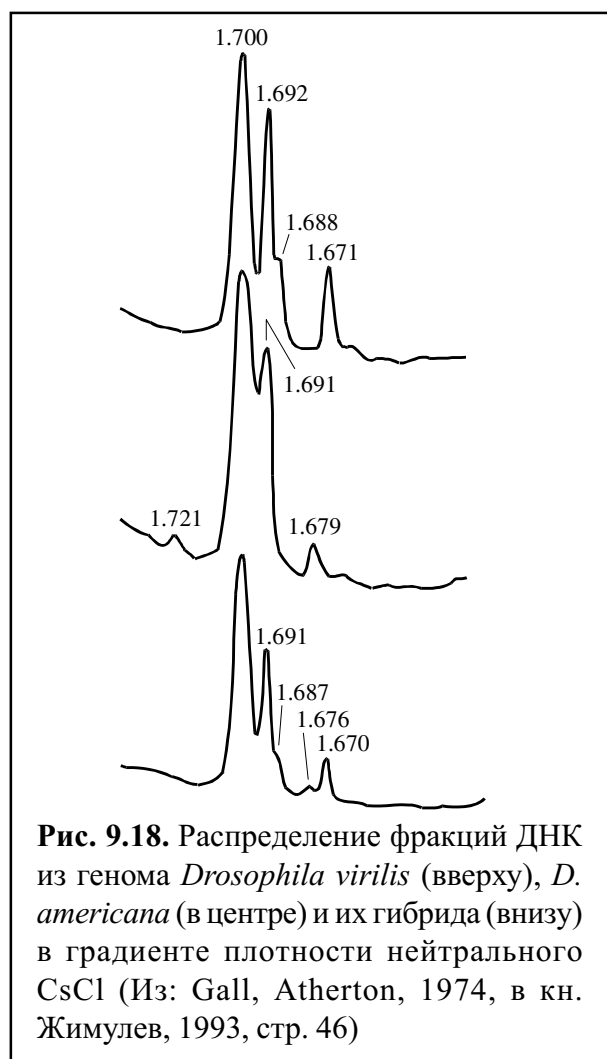
#### **9.4.9. Повторенные последовательности**

У эукариот существенная часть генома состоит из коротких многократно повторенных последовательностей, состав оснований которых отличается от среднестатистического состава нуклеотидов основной части генома. Повторенные последовательности ДНК могут быть охарактеризованы с помощью двух подходов: по их исключительно высокой скорости ренатурации или градиентном центрифугировании в хлористом цезии. В последнем случае основная часть ДНК составляет главную полосу осаждения (главный пик), а повторенная фракция в силу обогащенности определенным набором нуклеотидов и, следовательно, другой

молекулярной массы, дает одну или несколько дополнительных (сателлитных) полос (Рис. 9.18.).

Все данные, полученные до сих пор с помощью гибридизации *in situ*, свидетельствуют о том, что сателлитная ДНК располагается в участках прицентромерного гетерохроматина в метафазных хромосомах или в хромоцентрах интерфазных ядер. Иногда, очень редко, некоторое количество сателлитных последовательностей локализовано в эухроматине.

Кроме сателлитов в прицентромерном гетерохроматине располагаются умеренные повторы генов рибосомной ДНК. Анализ высокоповторенных ДНК дрозофилы позволяет



**Рис. 9.18.** Распределение фракций ДНК из генома *Drosophila virilis* (вверху), *D. americana* (в центре) и их гибрида (внизу) в градиенте плотности нейтрального CsCl (Из: Gall, Atherton, 1974, в кн. Жимулев, 1993, стр. 46)

разбить их на три группы в соответствии с составом нуклеотидов и степенью повторности:

1. Фракция, осаждающаяся в зоне 1,679 г/см<sup>3</sup> и состоящая из последовательностей рибосомной ДНК;
2. Сателлиты, состоящие из повторенных 5-10 п.н.;
3. Сателлит, осаждающийся в зоне 1,688 г/см<sup>3</sup>. Это тандемный повтор длиной 359 п.н.

Клонирование коротких (300-600 п.н.) фрагментов, выделенных из различных трактов сателлитных ДНК с последующим определением последовательностей нуклеотидов показал следующее:

1. Всего найдено 11 типов сателлитных ДНК, четыре из них мажорные и семь - минорные.

2. Как правило, разные сателлиты есть в каждой хромосоме, однако, есть и сателлиты, специфичные для определенных хромосом, например, сателлит 359 п.н. (Рис. 9.19.).

3. Как правило нуклеотидный состав повторов гомогенен, единичные замены нуклеотидов встречаются на 1 т.п.н., хотя в некоторых случаях частоты замен могут быть в 100 раз выше (Рис. 9.20.). Каждая горизонтальная полоса представляет копию повтора. Если есть замены, то указан новый нуклеотид в данном положении.

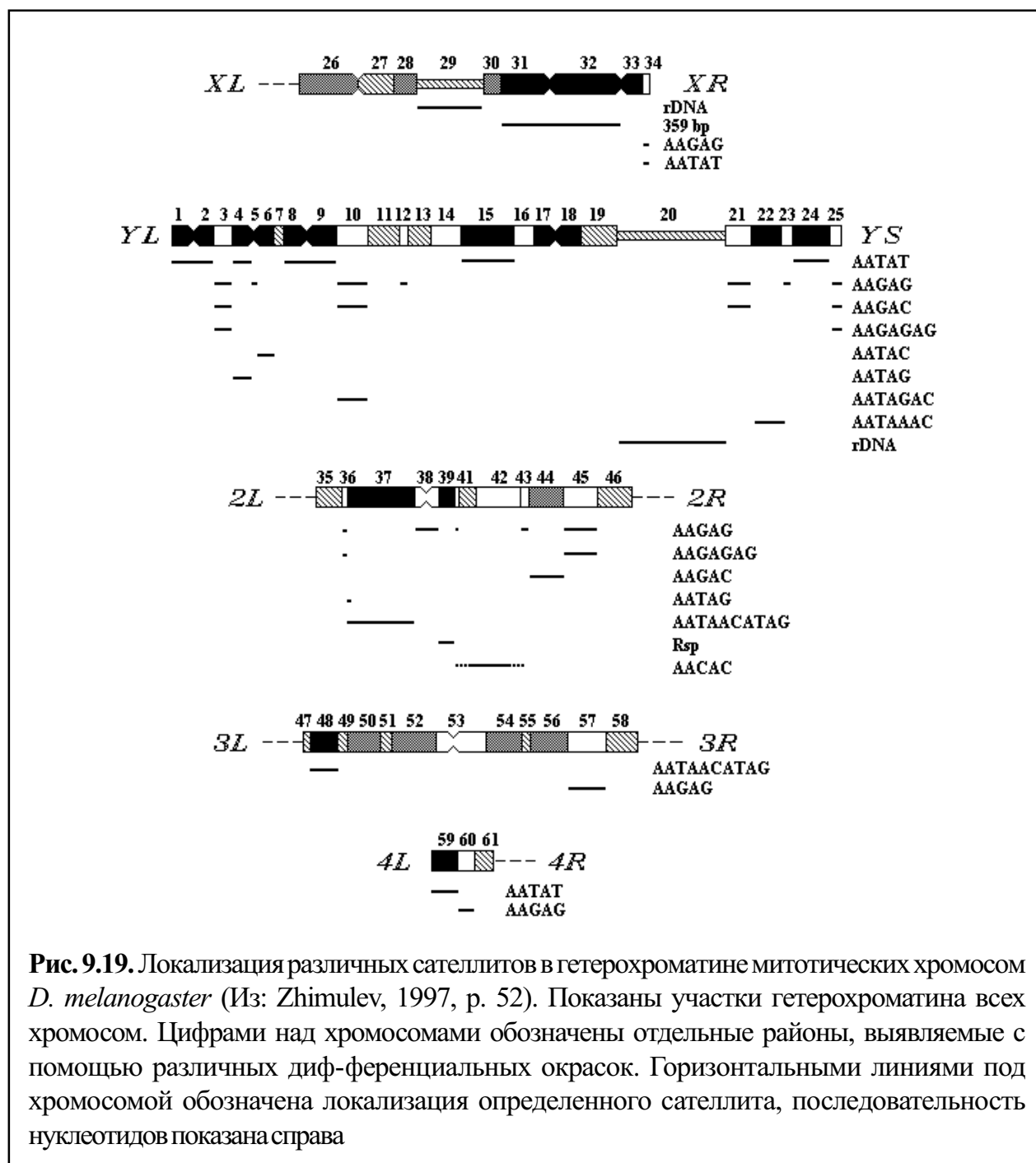
4. Среди сателлитных последовательностей часто располагаются мобильные элементы (т.е. умеренные повторы).

Высоко повторенные последовательности, как полагают, являются наиболее быстро эволюционирующими частями генома. Сравнение сателлитных профилей даже у очень близких видов выявляет большие различия (см. например, Рис. 9.18.) у *D. virilis* 40% ДНК состоит из сателлитных последовательностей, у *D.*

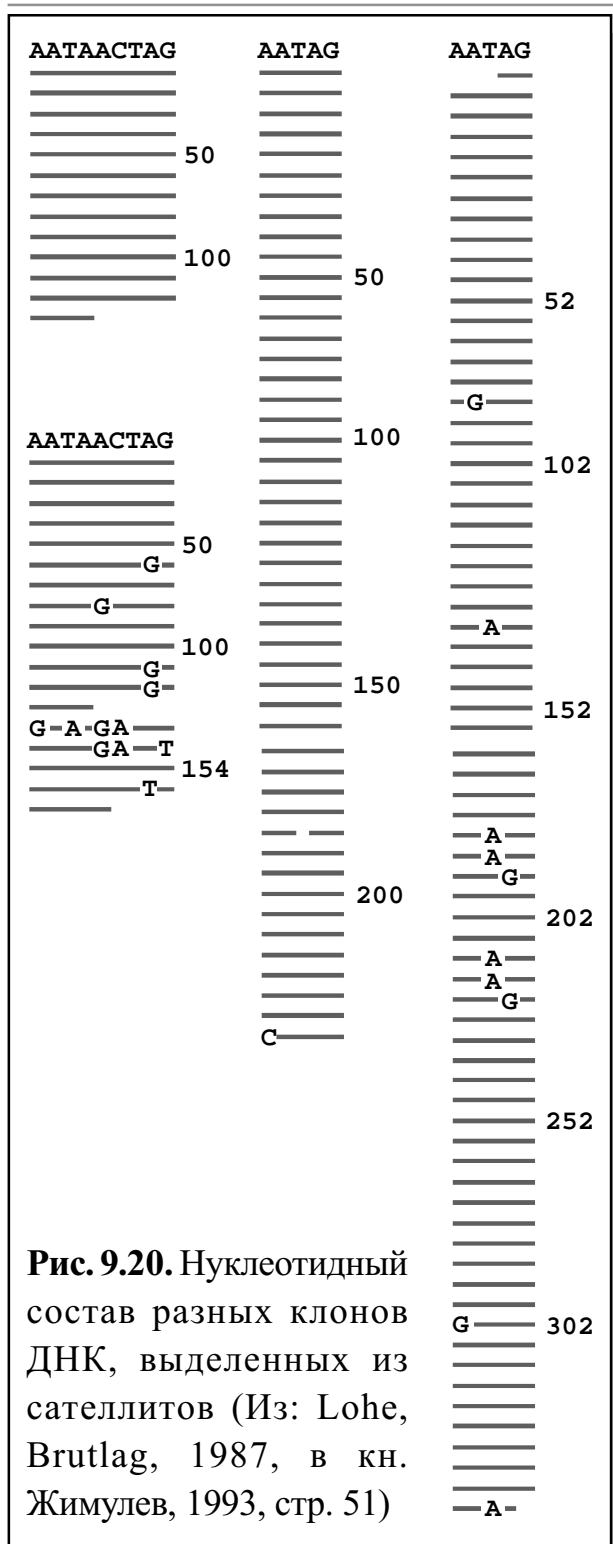
*texana* - 35%, но с другими константами седиментации, совсем не найдено сателлитов у третьего близкого вида - *D. ezoana*.

Y-хромосома у многих животных, в том числе, дрозофилы, млекопитающих и человека состоит главным образом из повторенных последовательностей. Эта хромосома наследуется только от отца к сыну и не претерпевает рекомбинации в мейозе. Поэтому все индивидуальные

изменения структуры уникальных и повторенных последовательностей как бы запечатлевают историю происхождения именно этой Y-хромосомы, присутствующей именно у конкретного мужчины. На Рис. 9.21. показано каким образом может передаваться Y-хромосома потомкам в ходе исторического развития. Очевидно, что все современные Y-хромосомы имеют единственного предка мужского пола. Это неизбежно, хотя

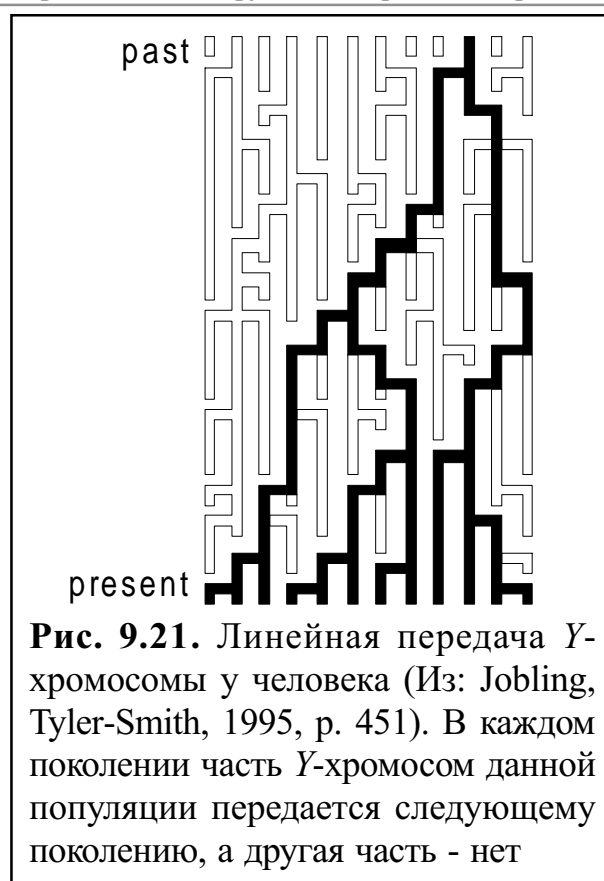


**Рис. 9.19.** Локализация различных сателлитов в гетерохроматине митотических хромосом *D. melanogaster* (Из: Zhimulev, 1997, p. 52). Показаны участки гетерохроматина всех хромосом. Цифрами над хромосомами обозначены отдельные районы, выявляемые с помощью различных диф-ференциальных окрасок. Горизонтальными линиями под хромосомой обозначена локализация определенного сателлита, последовательность нуклеотидов показана справа



неясно каким был этот предок: совсем недавно существовавший и похожий на современного человека или же древний, доисторический.

Y-хромосомы в разных популяциях могут иметь различные отклонения в молекулярной структуре: инсерции, делеции, дубликации, инверсии, изменения

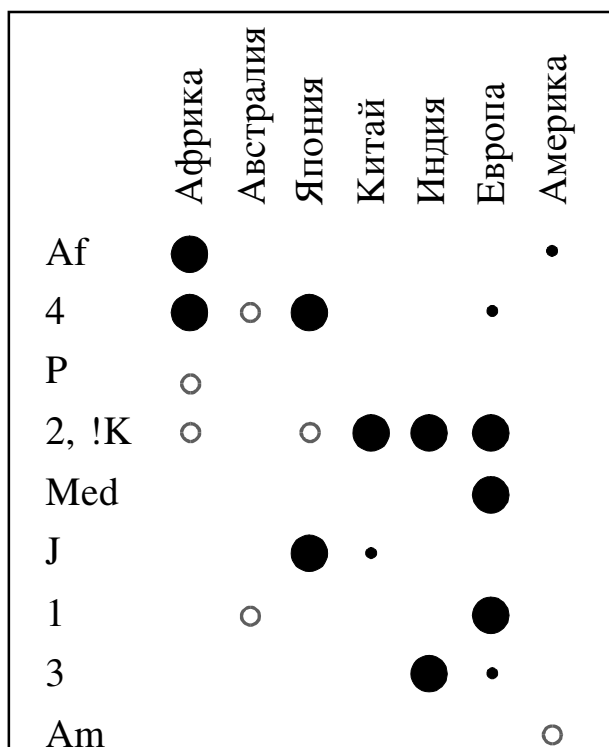


в последовательностях крупных и мелких сателлитов, изменения длин рестрикционных фрагментов. Комбинация этих различий (полиморфизмов) дает гаплотип. Наиболее вариабельные полиморфизмы позволяют делать различия между всеми независимыми Y-хромосомами. Менее вариабельные признаки позволяют находить что-то общее для объединения хромосом в группы. На сегодняшний день известно 9 гаплотипов. Они по-разному представлены в разных популяциях (Рис. 9.22.).

Данные, показанные на рисунке 9.22. свидетельствуют о том, что концентрация тех или иных гаплотипов существенно варьирует в разных популяциях.

#### 9.4.10. Генетическое содержание гетерохроматиновых районов хромосом

Еще Е. Хайц в 1929-1933 гг., имея ввиду различия в степени компактизации



**Рис. 9.22.** Встречаемость гаплотипов Y-хромосомы человека в различных популяциях (Из: Jobling, Tyler-Smith, 1995, p. 454).

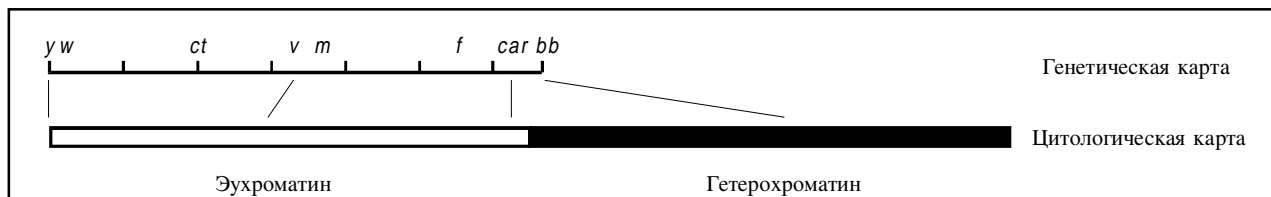
По вертикали - гаплотипы: Af - африканский, P - пигмеи, !K - !Кунг, Med - Средиземноморский, J - японский, Am - американо-индейский.

Большой черный кружок - означает широкое распространение данного гаплотипа в популяции, маленький черный кружок - редкая встречаемость гаплотипа в популяции, белый кружок - встречаемость у отдельных особей

эу- и гетерохроматина, по аналогии с компактными митотическими хромосомами предположил, что гетерохроматин генетически неактивен. Его цитологические воззрения уже тогда противоречили генетическим данным: в 1916 г. К. Бриджес установил, что в случае нерасхождения хромосом в мейозе получались самцы без Y-хромосомы (XO), которые были полностью жизнеспособными, но стерильными. Таким образом было показано, что гетерохроматиновая Y-хромосома несет факторы, отвечающие за плодовитость.

В начале 1930-х годов в результате локализации генов X-хромосомы на ее цитологической карте с помощью хромосомных перестроек было показано, что фактически вся генетическая карта этой хромосомы (исключая локус *bobbed*) разместилась в эухроматине (Рис. 9.23.). Это с определенностью свидетельствовало о значительной генетической инертности гетерохроматина. Однако, Дж. Шульц (J. Schultz) в 1941 году установил, что потеря блоков гетерохроматина у дрозофилы летальна, что свидетельствует о наличии генов в гетерохроматине.

Указанные противоречия были разрешены только в 1980-ые годы. Связано это, главным образом с появлением многочисленных хромосомных перестроек, хорошо картируемых с помощью дифференциальных окрасок, а также с



**Рис. 9.23.** Сопоставление генетической карты X-хромосомы *D. melanogaster* с распределением эу- и гетерохроматина в митотической хромосоме (по данным: Muller, Painter, 1932)

появлением высокоразрешающих методик гибридизации *in situ*. К настоящему времени хорошо изучено генетическое содержание гетерохроматина X-, Y-хромосом и аутосом у разных видов дрозофил, в первую очередь у *D. melanogaster*.

В результате генетического насыщения мутациями гетерохроматиновых областей второй хромосомы, ограниченных делециями прицентромерного гетерохроматина, было выявлено 113 мутаций, которые после комплементационного анализа распределились в 13 локусах. Несколько генов в гетерохроматине второй хромосомы были известны ранее, т.е. всего обнаружено 18 генов (Рис. 9.24.).

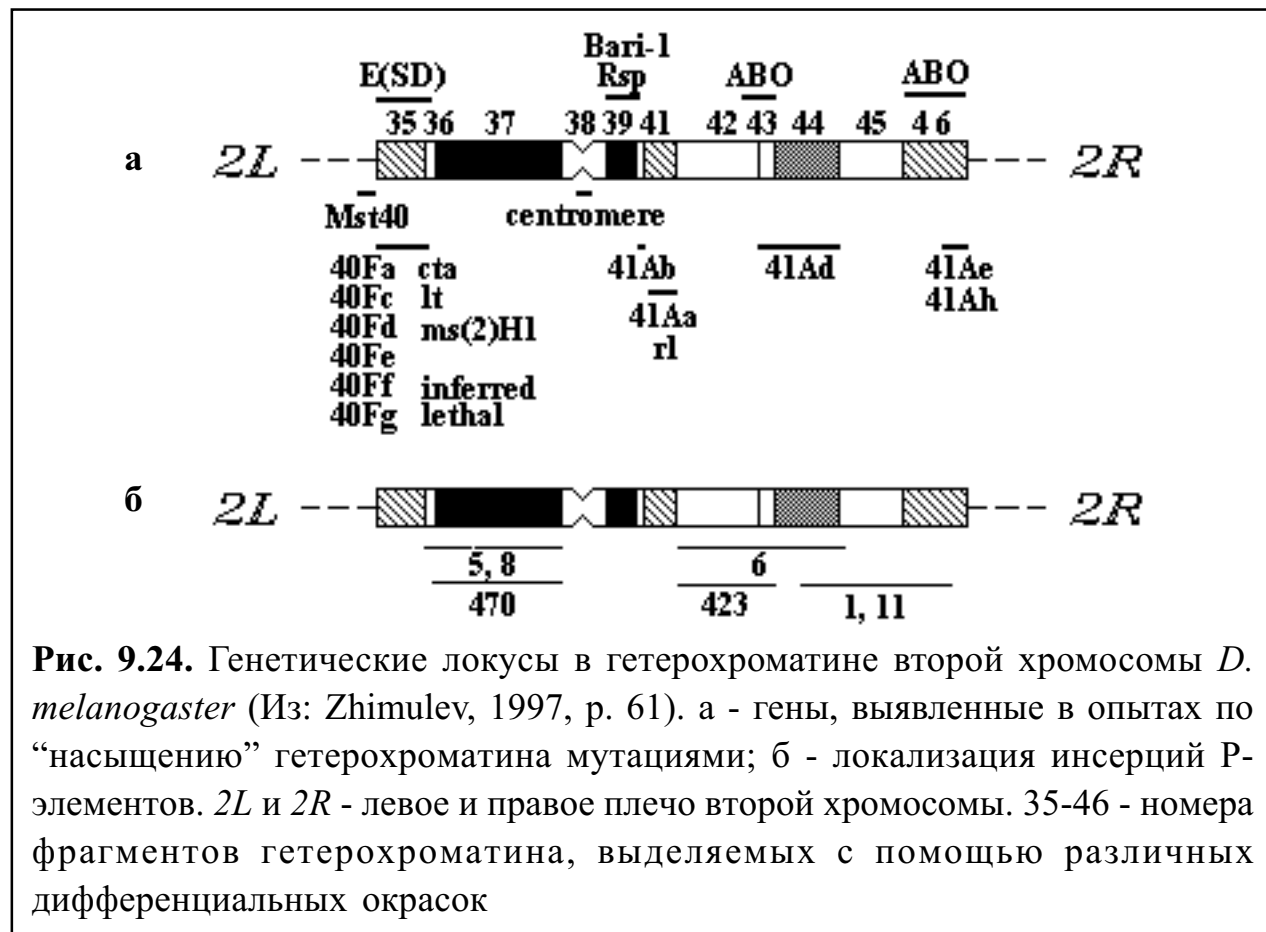
Эти результаты показывают насколько гетерохроматин обеднен генами: частоты встречаемости генов на единицу длины ДНК в гетерохроматине второй хромосомы

составляют примерно 1% от таковой для эухроматина.

В третьей хромосоме с помощью аналогичных экспериментов выявлено 12 генов, а значит, плотность генов в гетерохроматине этой хромосомы примерно такая же как и во второй хромосоме (Из: Жимулев, 1993, стр. 54-60).

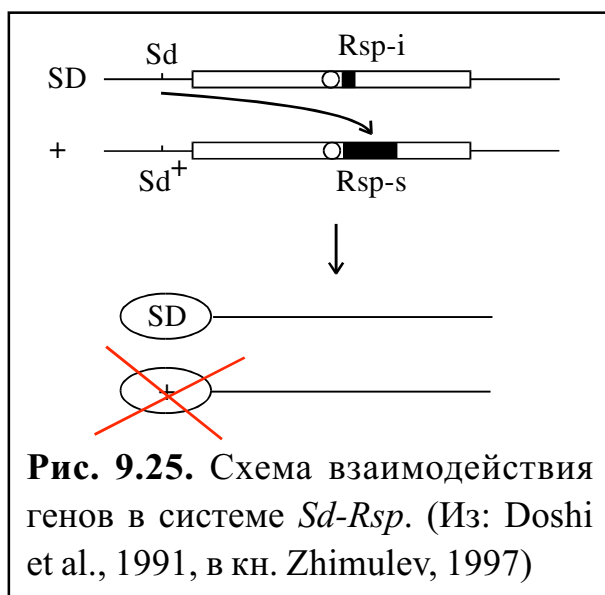
Несколько генов из гетерохроматиновых районов второй хромосомы были клонированы и охарактеризованы: например, ген *rolled* кодирует белок, гомологичный митоген-активируемой протеин-киназе, ген *concertina* кодирует альфа-субъединицу G-протеина, играющего роль в межклеточных коммуникациях в ходе эмбрионального развития.

Представляет интерес система взаимодействующих локусов *SD-Rsp*, из которых *Rsp* расположен в



**Рис. 9.24.** Генетические локусы в гетерохроматине второй хромосомы *D. melanogaster* (Из: Zhimulev, 1997, р. 61). а - гены, выявленные в опытах по “насыщению” гетерохроматина мутациями; б - локализация инсерций Р-элементов. 2L и 2R - левое и правое плечо второй хромосомы. 35-46 - номера фрагментов гетерохроматина, выделяемых с помощью различных дифференциальных окрасок

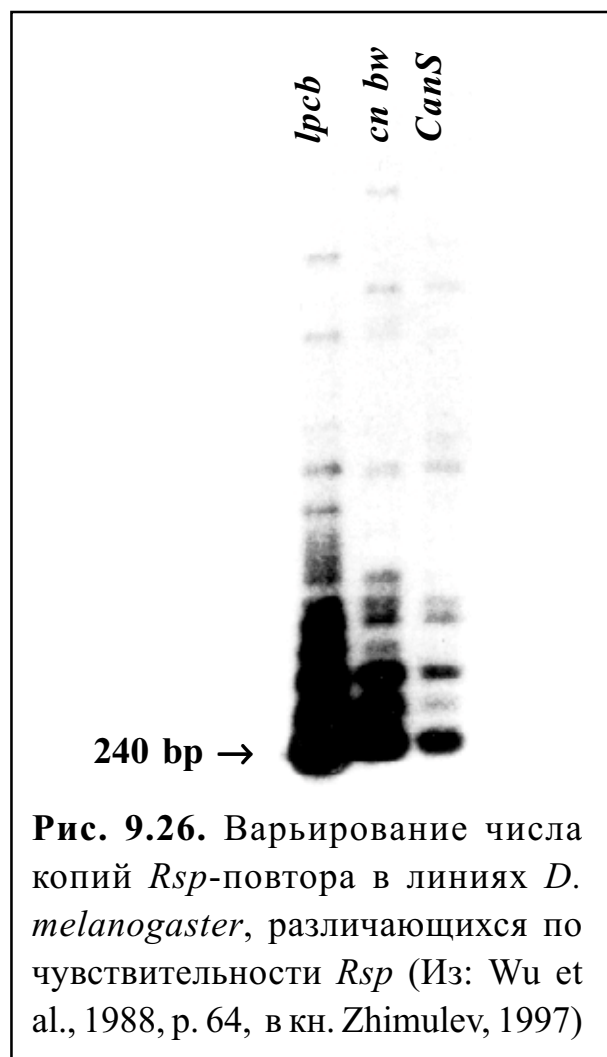




гетерохроматиновой секции 39 второй хромосомы (см. Рис. 9.24.).

В левом плече эухроматиновой части второй хромосомы был обнаружен ген *SD* (Segregation Distortion), мутация которого у гетерозиготных самцов *Sd/Sd+* приводит к существенному сдвигу в числе гамет, имеющих аллель *Sd* по сравнению с числом гамет *Sd+*. С помощью электронной микроскопии установили, что спермиогенез гамет *Sd+* в *Sd/Sd+* генотипах нарушен из-за сильной декомпактизации хроматина. Как выяснилось, ген *Sd* взаимодействует с геном *Rsp*, расположенным в гетерохроматине. Известны два аллеля *Rsp-i* (insensitive) и *Rsp-s* (sensitive). Линии с нарушенным расщеплением гамет имеют генотип: *Sd, Rsp-i/Sd+*, *Rsp-s* (Рис. 9.25).

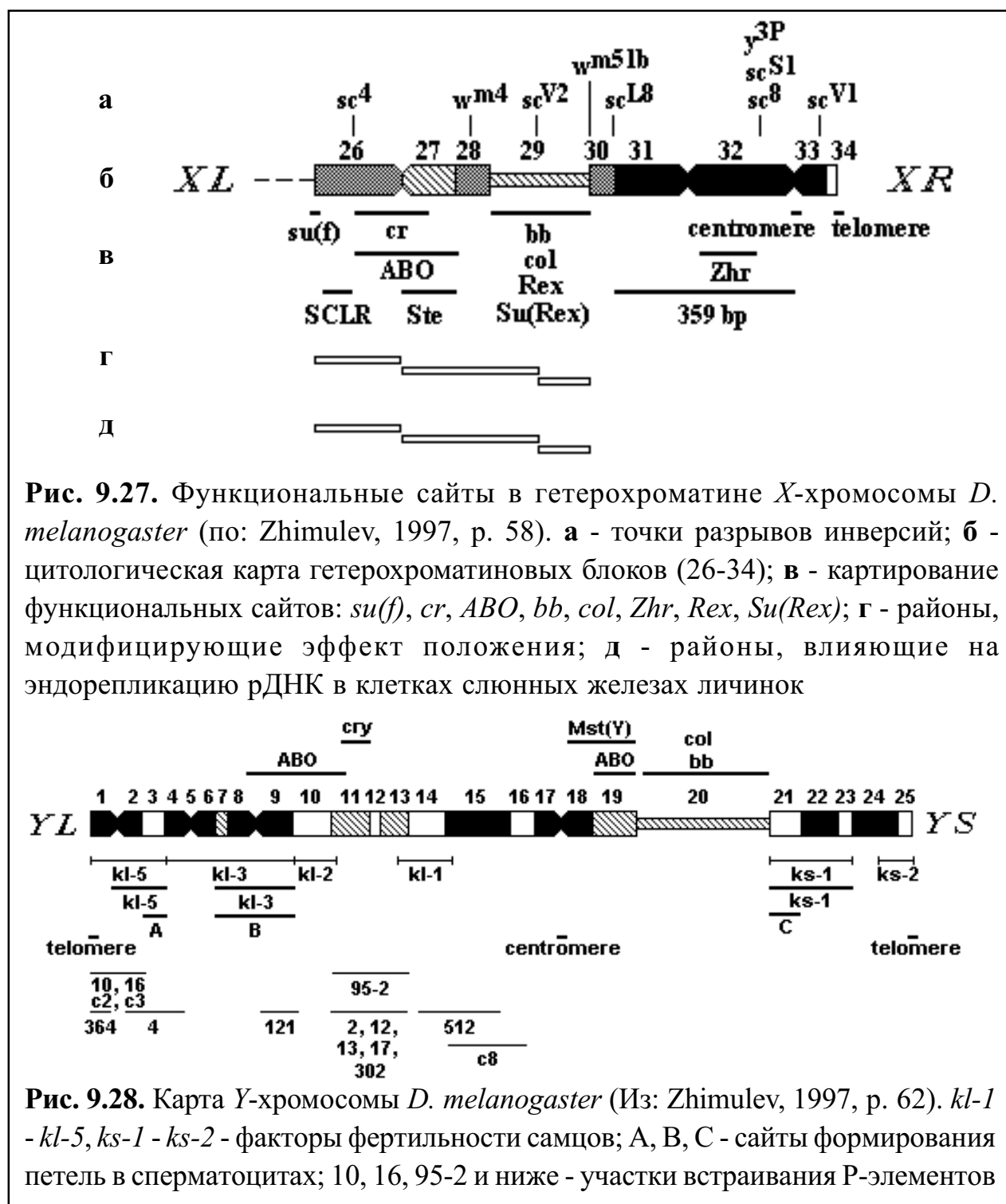
Как выяснилось локус *Rsp* является районом повторенной ДНК, где единицей повтора является фрагмент в 120 п.н. Этот фрагмент обогащен АТ-нуклеотидами, имеет общую структуру сателлитной ДНК и организован как димер, ограниченный с обоих концов ТСТАГА последовательностью (сайт



рестрикции *Xba*I эндонуклеазы). В целом около 600 т.п.н. приходится на локус *Rsp* в линии sensitive. Хромосома *Sd* имеет делецию района *Rsp* и менее 20 копий *Xba*I-сателлита. *Rsp-ss* (super sensitive) может иметь 3000 и более копий (Рис. 9.26.).

ДНК, расщепленная *Xba*I рестриктазой, из линий: *supersensitive* (*lpcb*), *sensitive* (*cn, bw*) и частично чувствительной (*CantonS*), гибридизовалась с радиоактивно меченым клоном ДНК, содержащим *Xba*I-повтор.

Другой ген этой системы *Sd*, расположенный в эухроматиновом районе 37D5, картируется в *Eco*RI фрагменте длиной 7 т.п.н., с которого считывается транскрипт длиной 4 т.п.н.

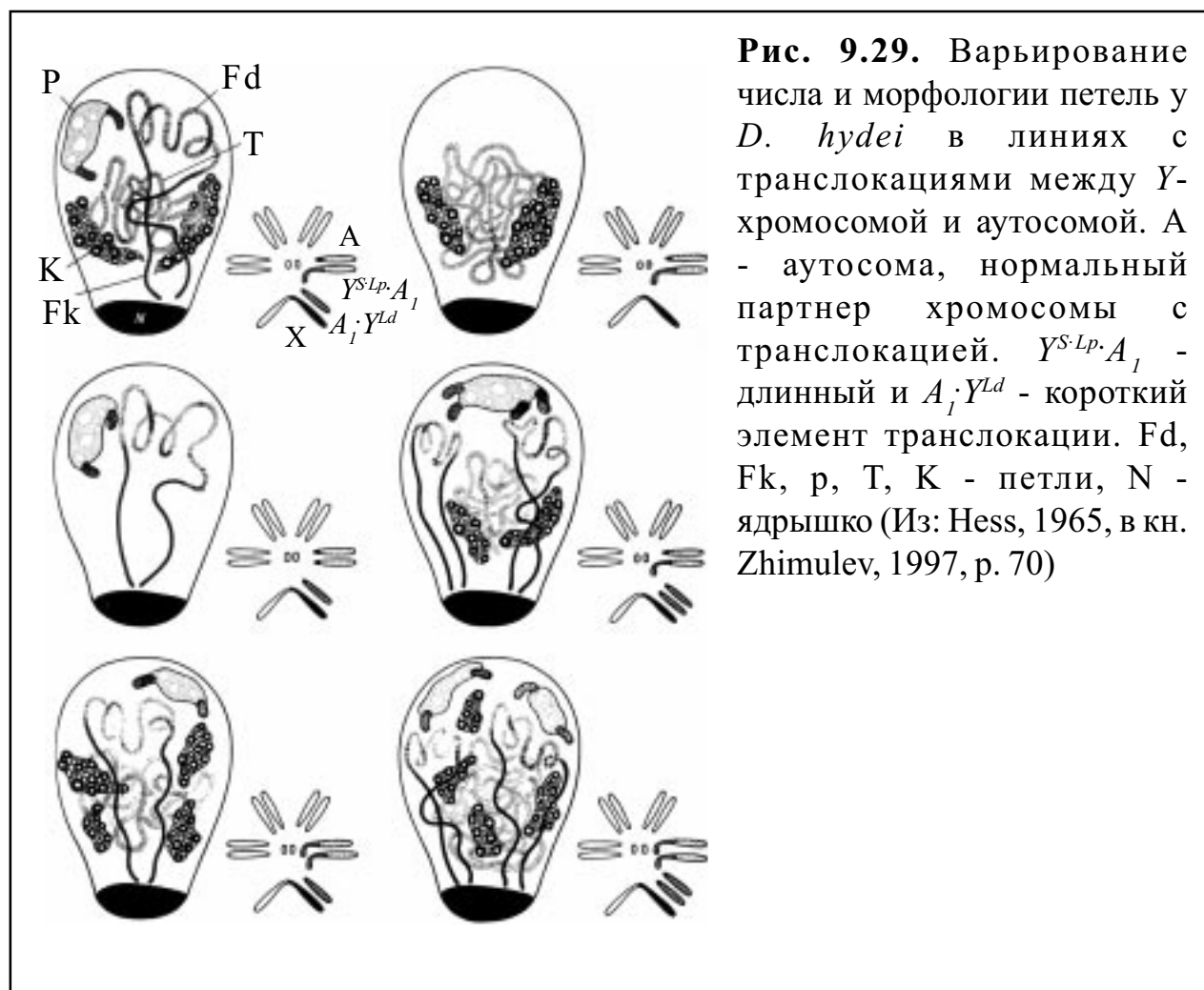


Согласно представлениям некоторых авторов ген *Sd* синтезирует белок, обладающий высокой способностью связываться с ДНК *Rsp*. Поэтому у клеток *Rsp-s* много XbaI-сателлитной ДНК и мало белков (*Sd*<sup>+</sup>), связывающихся с ней и компактизирующих её в ходе спермиогенеза, в результате чего

уменьшается число гамет *Sd*<sup>+</sup>, *Rsp-s* (Из: Zhimulev, 1997, p. 61-66).

Цитогенетические карты гетерохроматина X- и Y-хромосом представлены на Рис. 9.27. и 9.28.

Краткая характеристика некоторых генов, расположенных в гетерохроматине X и Y хромосом:



**Рис. 9.29.** Варьирование числа и морфологии петель у *D. hydei* в линиях с транслокациями между Y-хромосомой и аутосомой. А - аутосома, нормальный партнер хромосомы с транслокацией.  $Y^{S-Lp.A_1}$  - длинный и  $A_1;Y^{Ld}$  - короткий элемент транслокации. Fd, Fk, p, T, K - петли, N - ядрышко (Из: Hess, 1965, в кн. Zhimulev, 1997, p. 70)

*bb* - bobbed - участки локализации генов, повторенных 150-250 раз и кодирующих рибосомную 18 и 28S РНК.

*cr* - (compensation response) - увеличивают политенизацию генов рДНК, при потере одного из гомологов.

*abo/ABO*-система - (abnormal oocyte). Возможно контролируют количество рибосомной РНК в клетке.

*Rex* - (ribosomal exchange) - локус, индуцирующий митотический обмен между двумя кластерами рДНК.

*cry* - crystal/Stellate (не рассказывал).

### Факторы фертильности самцов

В начале 1960-х годов Мейер, Хесс и Беерманн описали особые стадиеспецифичные ните-подобные структуры ("петли") в ядрах сперматоцитов *D. melanogaster*. Через несколько лет пришло понимание того, что "петли" это декомпактизованные участки Y-хромосомы. На этих петлях синтезируется РНК и накапливаются белки. Каждая петля уникальна т.к. имеет определенные размеры и морфологию. У самцов *X0* этих петель нет, зато у самцов *XYY* они присутствуют в двойном числе. Если произошла дупликация какого-то участка Y-хромосомы, какая-то из петель будет также дублирована (Рис. 9.29.). Петли связаны с функциями плодовитости

самца, т.к. потеря любой из них приводит к стерильности самца. Обнаружено семь петель, что примерно соответствует числу генов фертильности (7-16). Функция одного из этих генов выяснена: ген *kl-5* контролирует формирование наружных микротрубочек хвоста сперматозоида.

Общая длина петель у *D. hydei* доходит до 1000 мкм или 1/12 всей длины ДНК в Y-хромосоме. Функции остающихся 11/12 неизвестны. Гены фертильности, таким образом, имеют громадную длину: до 4000 т.п.н. В их состав входит большое количество сателлитных ДНК, не кодирующих полипептиды.

Y-хромосома *D. hydei* содержит 2 типа ДНК.

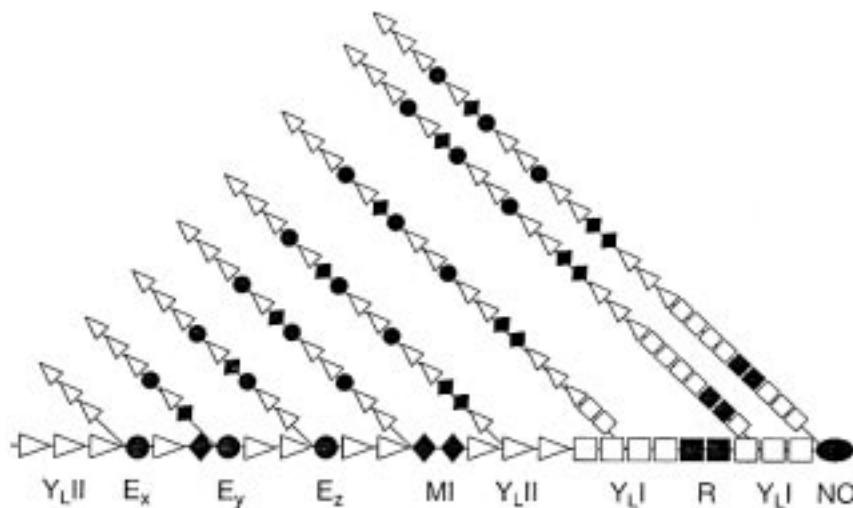
1. Y-специфические, сателлитоподобные последовательности, которые встречаются только в этой хромосоме. Они располагаются семействами по 200-2000 копий в виде тандемных повторов.
2. Y-связанные повторы, которые

встречаются как в этой, так и в других хромосомах. Как правило, это мобильные элементы генома.

Каждая петля является гигантским транскриптом, содержащим главным образом повторенные последовательности - сателлиты, дефектные и нормальные мобильные элементы.

В одной из петель у *D. melanogaster*, длина которой около 1300 т.п.н., расположен ген *kl-5*, у мутантов по которым нарушено функционирование микротрубочек в сперматозоидах. Длина экзона гена составляет примерно 14 т.п.н., и эти экзоны расположены среди сателлитов AAGAG и AAGAC и мобильных элементов.

В другой петле, *thread* у *D. hydei*, расположен ген фертильности *A*. В пределах петли (Рис. 9.30.) блок гомогенных повторов  $Y_L I$  длиной в 1.5 м.п.н. прерывается блоками повторов, называемых *rally* (всего 400 т.п.н.).



**Рис. 9.30.** Схема организации петли *thread* у *D. hydei* (Из: Hackstein and Hochstenbach, 1995). Различными символами внизу показаны семейства последовательностей ДНК:  $Y_L I$  и  $Y_L II$  большие семейства повторов, R - семейство *rally*, MI - ретротранспозон *micropia*, E - предполагаемые экзоны гена, кодирующего тяжелую  $\beta$ -цепь динеина. NO - ядрышковый организатор. Направление транскрипции слева направо

Оставшаяся часть транскрипта состоит из повторенных ретротранспозонов из семейства *microplia* и повторов  $Y_LII$ .

Петли очень активны в транскрипции: около 50% включения  $^3H$ -уридина в ядро приходится на  $Y$ -хромосому, оставшиеся 50% - на все остальные хромосомы.

Огромные массы белков, кодируемых генами, расположенными в различных (не  $Y$ ) хромосомах, накапливаются на петлях.

Гипотезы о роли петель:

1. Регулируют развитие сперматид.
2. Связывают большие массы белков.
3. Петли существуют только для образования необычно длинного хвоста сперматозоида (Из: Zhimulev, 1997, p. 66-74).

#### 9.4.11. Заключение

Из рассмотрения всех приведенных фактов довольно очевидно, что эу- и гетерохроматин сильно различаются по молекулярной и генетической организации слагающей их ДНК (Табл. 9.3.).

Встает 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 довольно трудно найти разумные объяснения существования гетерохроматина. Можно 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.

Все это может свидетельствовать о том, что гетерохроматин необходим для осуществления каких-то функций в жизни клеток зародышевого пути.

#### Литература к разделу 9.4.

- Жимулев И.Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск, Наука, 1-490, 1993.
- Прокофьева-Бельговская А.А. Гетерохроматические районы хромосом. Москва, Наука, 1-431, 1986.
- Heitz E. Die somatische Heteropyknose bei *Drosophila melanogaster* und ihre genetische Bedeutung. Z. Zellforsch. 20, 237-287, 1934.

**Табл. 9.3.** Различия свойств эу- и гетерохроматина у дрозофилы

Свойства	Эухроматин	Гетерохроматин
Доля генома	67%	33%
Расположение в хромосомах	Плечи хромосом	В прицентромерных 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 (C-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

- Hackstein J.H.P., Hochstenbach R. The elusive fertility genes of *Drosophila*: the ultimate haven for selfish genetic elements. Trends in Genetics 11, 195-200, 1995.
- Jobling M.A., Tyler-Smith C. Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution. Trends in Genetics 11, N11, 449-456, 1995.
- Muller H.J., Painter T.S. The differentiation of the sex chromosome of *Drosophila* into genetically active and inert regions. Z. Indukt. Abstamm. Vererb. 62, 316-365, 1932.
- Zacharias H. Emil Heitz (1892-1965): chloroplast, heterochromatin and polytene chromosomes. Genetics 141, 7-14, 1995.
- Zhimulev I.F. Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect variegation. Advances in Genetics 37, 1-550, 1997.

## **9.5. Теломеры и теломерный гетерохроматин**

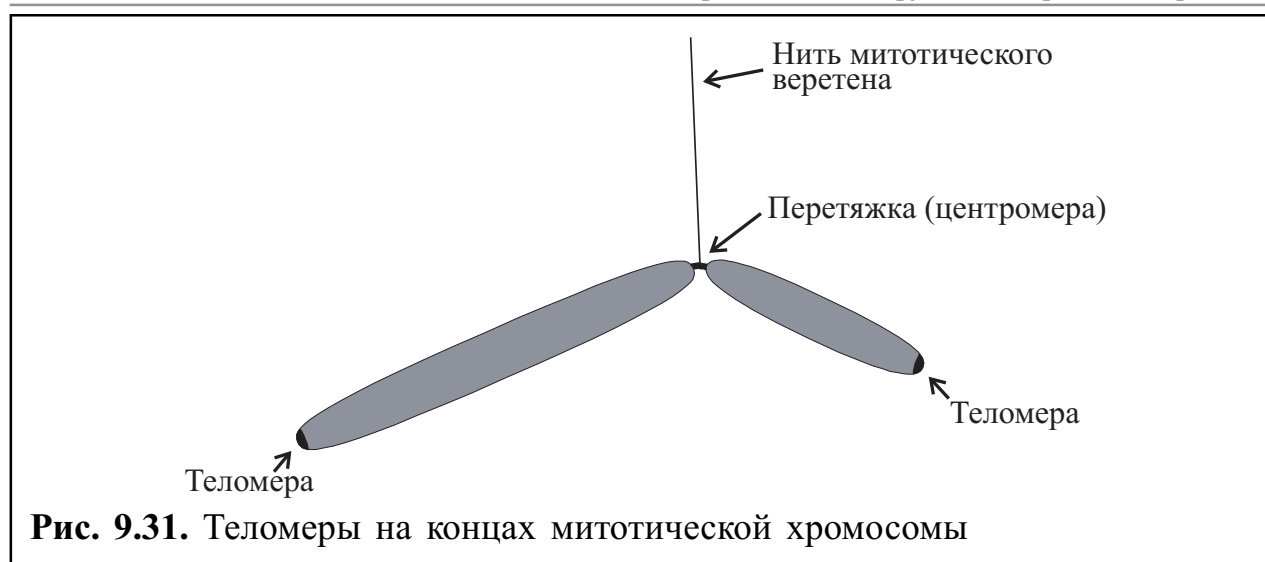
### **9.5.1. Концепция теломеры**

Три группы фактов, полученных к началу 1980-х годов, свидетельствовали о наличии на концах хромосом особых структур:

1. Цитологи, изучавшие кариотипы растений или животных, отмечали, что морфология отдельных хромосом и наборы хромосом в целом являются постоянными. Если бы была возможность хромосомам склеиваться “конец - в конец”, такого постоянства бы не было. Значит существует некая структура, запрещающая объединение теломерных концов.
2. Г.Дж. Меллер в 1927 году открыл возможность получения мутаций в

результате облучения клеток дрозофилы рентгеновскими лучами. При этом мутации могут быть точковыми или сопровождаться перестройками хромосом (инверсиями, транслокациями, делециями и дупликациями). Перестройки образуются в результате разрывов в различных участках хромосом под действием излучения и последующего воссоединения фрагментов в новом порядке.

Исследуя закономерности образования хромосомных перестроек Г. Меллер в 1932 году пришел к двум важным выводам о поведении наиболее дистальных частей нормальных хромосом: 1. Искусственно образовавшиеся концы фрагментов хромосом объединяются только с такими же искусственно образовавшимися и никогда - с концевыми фрагментами, существующими в нормальных хромосомах. 2. В свою очередь концевые участки нормальных хромосом в результате облучения никогда не перемещаются во внутренние районы хромосом. Для объяснения результатов этих наблюдений Меллер предположил, что участки хромосом (или “гены”, как он их называл), расположенные во внутренних районах хромосом, обладают свойством “биполярности”, т.е. они могут соединяться с другими фрагментами каждым из двух своих свободных концов. Тот “ген” (или фрагмент хромосомы), который в нормальной хромосоме расположен на самом ее конце, по мнению Меллера, “униполярен”, т.е. способен к объединению только с той стороны, которая обращена к внутренней части хромосомы. Меллер предположил, что этот концевой “униполярный” ген необходим для особой функции,



**Рис. 9.31.** Теломеры на концах митотической хромосомы

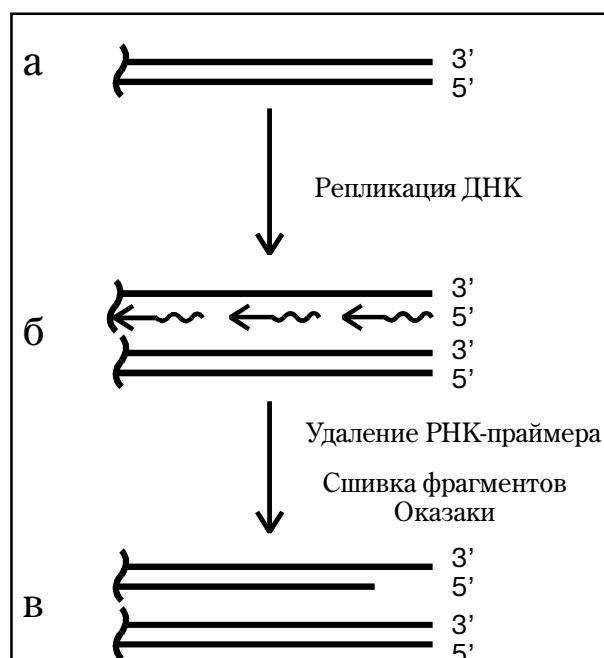
“запечатывания конца хромосомы”. Такой “ген” был назван специальным термином - “теломерой” (по-гречески “телос” - означает конец, “мерос” - часть) (Рис. 9.31.).

(см. также Blackburn, Greider, 1995, pp. 1-10).

Барбара Макклинток в 1941 году на основании полученных ею результатов по индукции хромосомных перестроек у кукурузы пришла к тем же выводам, что и Меллер. Более того, она постулировала, что пассивность теломер в объединении с другими участками хромосом играет исключительно важную роль, поскольку предотвращает склеивание хромосом конец - в конец, а это в свою очередь, способствует сохранению их индивидуальности и всего кариотипа в целом.

3. После открытия структуры ДНК и механизмов ее репликации А.М. Оловникова в России, заинтересовала загадка организации репликации на конце молекулы ДНК. Дело в том, что каждая хромосома содержит единственную непрерывную молекулу ДНК, и концы этой молекулы соответствуют концам хромосомы. В соответствии со стандартной моделью

репликации ДНК процесс удвоения отстающей цепи ДНК начинается с синтеза коротких РНК-праймеров, или затравок (показаны волнистыми линиями на Рис. 9.32.б), с 3'-концов которых синтезируются отрезки ДНК - фрагменты Оказаки (прямая линия со стрелкой на Рис. 9.32.). Затем отрезок РНК удаляется, образовавшиеся бреши (гэпы) заполняется фрагментами ДНК.



**Рис. 9.32.** Схема недорепликации конечной части молекулы ДНК (на рисунке обращен вправо) (Из: Blackburn, Greider, 1995, p. 37)



Последние синтезируются, используя в качестве праймеров 3'-концы фрагментов Оказаки. Поскольку для крайнего гэта нет праймера, вновь синтезированная цепь оказывается на 8-12 нуклеотидов (длина РНК-праймера) короче исходной (Рис. 9.32.в). В результате, после каждого цикла репликации молекула ДНК должна становиться все короче: одна из четырёх цепей, образовавшихся в результате раунда репликации стала короче на 8-12 п.н., т.е. на одном из концов хромосомы средняя длина четырёх цепей ДНК уменьшилась на 2-3 п.н.

Поэтому А.М. Оловников пришел к выводу, что если в клетке нет особых механизмов, компенсирующих эти потери нуклеотидов с каждого конца нити ДНК, то хромосома начнет сокращаться: сначала должны исчезнуть теломерные районы, затем ближайшие к теломерам гены, потом более удаленные гены и т.д. Очевидно, что этот процесс должен, в конце концов, привести к гибели клетки.

Действительно, у клеток, растущих в культуре (*in vitro*), есть лимит на число делений. Американским ученым Л. Хейфликом в 1965 году было показано, что если для культивирования взять клетки у новорожденных, они могут пройти 80-90 делений; клетки, взятые у 70-летних, делятся только 20-30 раз. Ограничение на число клеточных делений называют барьером Хейфлика. Обычно клетки не преодолевают барьер из 2-90 делений, по мнению Хейфлика –  $50 \pm 10$ . А.М. Оловников в 1971 году предложил следующую формулу для расчета продолжительности жизни любого

клона клеток *in vitro*:

$$T = k \left( \frac{lt}{lm} - M \right), \text{ где}$$

$T$  – срок предстоящей жизни клеток

$k$  – коэффициент корреляции между сроком жизни клона клеток и числом репликаций ДНК

$lt$  – длина теломерного участка

$lm$  – длина фрагмента ДНК, утрачиваемого в ходе каждого цикла репликации

$M$  – число уже прошедших репликаций.

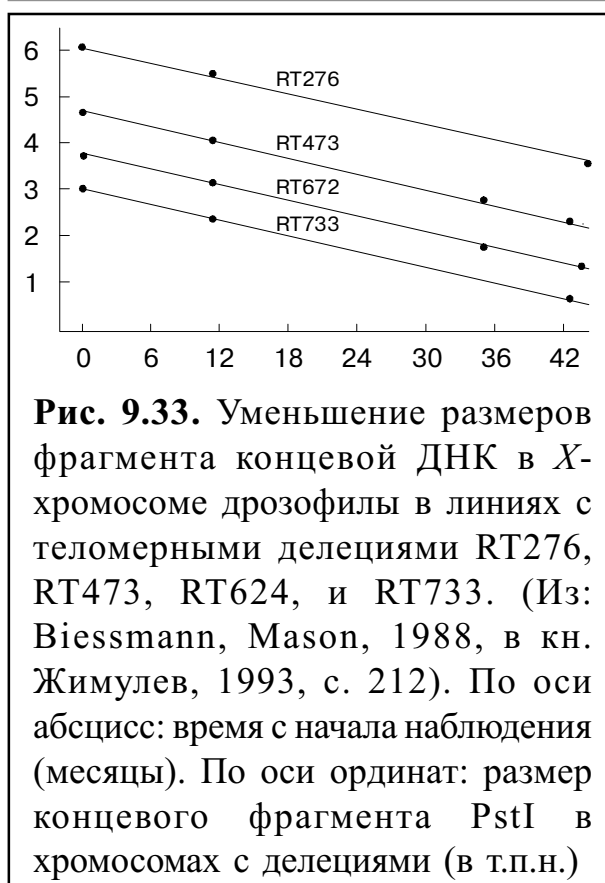
Таким образом, Оловников напрямую связал срок жизни клеточных клонов с длиной теломерной ДНК.

О том, что укорочение концевого фрагмента ДНК реально, свидетельствуют результаты следующего опыта.

При мобилизации перемещений транспозона из теломерного района  $X$ -хромосомы дрозофилы в последнем обнаружены терминальные делеции, удаляющие наиболее дистальные последовательности ДНК. В последующих поколениях в линиях с такими делециями монотонно уменьшается длина концевых фрагментов ДНК (от теломеры к центромере) со скоростью 50-100 (в среднем 75) пар нуклеотидов за одно поколение (Рис. 9.33.).

Полагают, что размер утрачиваемого фрагмента коррелирует с размером октонуклеотида РНК-праймера, иницирующего синтез фрагментов Оказаки при репликации ДНК.

Если учесть, что клетки полового пути у этого вида в течение одного поколения делятся примерно 35 раз, совпадение расчетной длины фрагментов, утерянных за одно поколение, и экспериментальных данных оказалось поразительным. В нормальных же хромосомах, в которых теломеры



**Рис. 9.33.** Уменьшение размеров фрагмента концевой ДНК в X-хромосоме дрозофилы в линиях с теломерными делециями RT276, RT473, RT672, и RT733. (Из: Viessmann, Mason, 1988, в кн. Жимулев, 1993, с. 212). По оси абсцисс: время с начала наблюдения (месяцы). По оси ординат: размер концевой фрагмента PstI в хромосомах с делециями (в т.п.н.)

присутствуют, укорочение длины молекулы ДНК не происходит.

### 9.5.2. Строение теломер

Молекулярно-генетическое изучение теломер осложняется тем, что концентрация теломерной ДНК в ядрах эукариот очень низка (8 теломер в  $1,7 \times 10^8$  п.н. генома дрозофилы или 46 теломер в  $3 \times 10^9$  п.н. генома человека) (см. Blackburn, Greider, 1995, p. 8).

Подход к решению проблемы выделения теломерной ДНК был найден неожиданно. Цитологи, изучавшие развитие простейших одноклеточных животных из класса *Ciliata*, таких как например всем известная инфузория туфелька, обнаружили у каждого организма по два ядра - микронуклеус и макронуклеус. Микронуклеус является покоящимся ядром, в котором хромосомы находятся в компактном состоянии, и служащим для передачи

наследственного материала от одного поколения другому. Другое дело - макронуклеус. Это трофическое ядро. Хромосомы там находятся в активном состоянии - на них синтезируется РНК, кодирующая белки, необходимые для роста и жизнедеятельности этого одноклеточного организма. На начальных этапах развития инфузории хромосомный материал макронуклеуса испытывает серию сложных превращений. Сначала хромосомы политенизируются, т.е. каждая хромосома реплицируется примерно десять раз и все вновь образованные хромосомы остаются тесно связанными друг с другом, образуя пучок хромосом или, как в таких случаях говорят, политенную хромосому с характерным рисунком темных хромомеров и светлых межхромомерных участков. Затем политенная хромосома как бы разрезается поперек на тысячи долек, в каждой из которых находится один или несколько хромомеров. Каждая долька обтянута особой белковой оболочкой, формируя пузырек. Таким образом, на этой стадии развития в созревающем макронуклеусе находятся тысячи пузырьков, в каждом из которых находится один или несколько хромомеров. В пузырьках происходит "созревание" наследственного материала: из фрагмента хромосомы удаляется и переваривается вся ДНК, не имеющая прямого отношения к кодированию наследственной информации, например, межгенные фрагменты, внутренние участки генов, не кодирующие белки (интроны), а так же мобильные элементы генома. Затем пузырьки разрываются, и их содержимое выходит в полость макронуклеуса,



Рис. 9.34. Джозеф Голл

который превращается по образному выражению Д.М. Прескотта - исследователя этих процессов - в “мешок с генами”. И наконец, самое важное: к каждому из этих генов присоединяется по одной теломерной последовательности с каждого конца. В итоге всех этих процессов в макронуклеусе в общей сложности присутствует несколько миллионов теломер.

Наличие “мешка с генами”, в котором находятся только индивидуальные гены, предоставляет уникальные возможности для их выделения, последующего клонирования (т.е. размножения многих миллионов идентичных копий гена в клетках живых бактерий или дрожжей) и последующего биохимического анализа.

В 1978 г. Е. Блакберн и Дж. Голл, (Рис. 9.34.) выделив из макронуклеуса инфузории тетрахимены (“мешка с генами”) фрагмент ДНК длиной 22 т.п.н., содержащий два сцепленных друг с другом гена рибосомной РНК и применив только еще набирающую популярность методику

определения последовательностей нуклеотидов в молекулах ДНК, установили, что на обоих концах этой пары генов находится относительно простая последовательность из цитидина (С) и аденозина (А), а во второй цепи ДНК, соответственно гуанидина (G) и тимидина (Т): т.е. на концах генов была последовательность CCCCAA/GGGGTT, повторенная несколько раз подряд. У двух других видов, *Stylonychia* и *Oxytricha* как было показано несколько позже, они похожи: CCCCAAAA/GGGGTTTT. (Из: Blackburn, Greider, 1995, pp. 8-9).

В последние годы с помощью различных биохимических методик теломеры были выделены из ДНК многих организмов. Оказалось, что у большинства видов животных и растений теломерные районы имеют в целом очень похожий тип строения. Как правило, в состав теломерного района входят два типа фрагментов: собственно конечная часть хромосомы (или теломерный концевой повтор - TR) и “последовательность, связанная с теломерой” (TAS), которые располагаются вглубь хромосомы (Рис. 9.35.).



Рис. 9.35. Схема организации теломерного конца хромосомы.

- 1 - повтор из гуаниновых нуклеотидов
- 2 - теломерный концевой повтор (TR)
- 3 - последовательности, связанные с теломерой (TAS)
- 4 - собственно хромосома
- 5 - центромера

**Табл. 9.4.** Теломерные повторы в хромосомах некоторых видов (частично из: Blackburn, Greider, 1995, p. 12-13)

Вид	Последовательность нуклеотидов (5'-3')	
Простейшие <i>Euplotes</i>	TTTTGGGG	
Слизневые грибы <i>Phusarum</i>	TTTAGGG	
Жгутиковые <i>Trypanosoma</i>	TTAGGG	
Споровики <i>Plasmodium</i>	TT(T/C)AGGG	
Грибы <i>Neurospora</i>	TTAGGG	
	<i>Candida maltosa</i>	ACGGATGCAGACTCGCTTGGTGT
Нематоды <i>Ascaris</i>	TTAGGC	
Насекомые <i>Bombyx mori</i>	TTAGG	
Водоросли <i>Chlamidomonas</i>	TTTTAGGG	
Высшие растения <i>Arabidopsis</i>	TTTTAGGG	
Позвоночные животные <i>Homo sapiens</i>	TTAGGG	

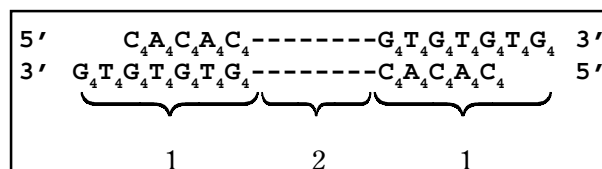
Как уже было отмечено выше, у инфузории тетрахимены самая концевая часть ДНК содержит многократно повторенную последовательность гексануклеотида ССССAA/TTGGGG, при этом последовательность ориентирована так, что TTGGGG-нить находится на 3' конце ДНК, в то время как ССССAA-нить формирует 5' конец. Для удобства первую из вышеупомянутых нитей называют G-нитью, вторую - C-нитью.

К настоящему времени известно, что теломерные фрагменты у большинства живых существ очень похожи друг на друга, они обогащены нуклеотидами G и C, которые располагаются в определенной, похожей у всех организмов последовательности (Табл. 9.4.). Несколько отличается структура TR у некоторых видов грибов и особенно сильно - у дрозофилы (см. ниже).

Кроме инфузории тетрахимены, теломерные повторы изучены у двух других представителей простейших,

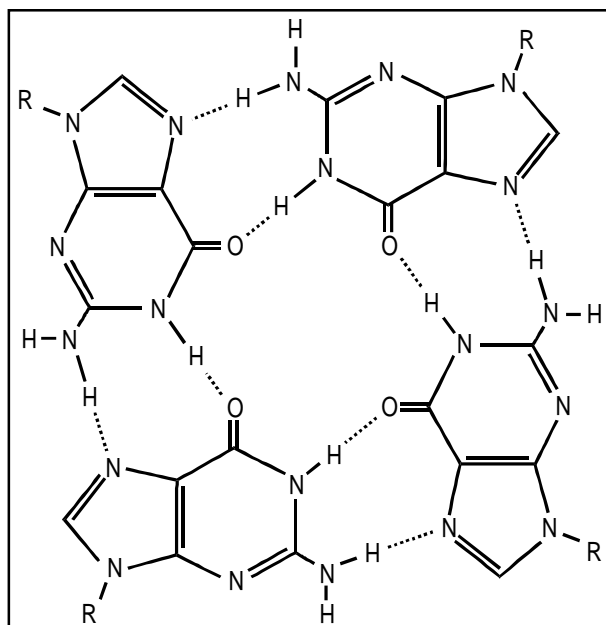
стилонихии и окситрихи. У них структура теломерного повтора несколько отличается, в частности единицей повторенности является октамер ССССAAAА/GGGGTTTT. Этот октануклеотид расположен на концах хромосом особым образом, так что часть G-цепи ДНК остается одиночной из-за отсутствия второй цепи, в результате чего теломерные концы хромосомы выглядят следующим образом (Рис. 9.36.).

Видно, что на нити ДНК, 3'-конец которой является концом хромосомы, основной повторяющейся единицей

**Рис. 9.36.** Структура теломерного концевого повтора в хромосомах инфузории окситрихи.

- 1 - теломерный концевой повтор  
2 - вся хромосома

является октонуклеотид  $T_4G_4$ , если считать от 5'- к 3'-концу. Этот октонуклеотид, выступающий за обычную двойную Уотсон-Криковскую двойную спираль, называют “однонитчатым свободным G-концом”. Длина простого повторенного дуплекса, расположенного проксимальнее (см. Рис. 9.35.), может варьировать от <50 п.н. (у *Euplotes*) до >100 т.п.н. (у мыши). Интересно, что теломерные однонитчатые свободные G-концы фактически одинаковы у представителей совершенно различных филогенетических таксонов. Анализ показал что четыре молекулы гуанина, не имеющие второй цепи ДНК и таким образом - возможности контактировать с молекулами цитозина, как это бывает в обычной молекуле ДНК, все же спариваются. Они располагаются в



**Рис. 9.37.** Плоскостное расположение молекул гуанина в теломерном повторе. Каждая молекула гуанина соединена с двумя соседними (Из: Blackburn, Greider, 1995, p. 19)

одной плоскости и образуют водородные связи между собой (Рис. 9.37.). Особенность формирования этой структуры заключается в том, что соединение нуклеотидов происходит не по принципу комплементарности оснований Уотсона и Крика, а между молекулами одного и того же основания - гуанина. С этой структурой связываются особые белки, образуя ДНК-белковый комплекс - *теломеру*. Она действительно как бы запечатывает хромосому с каждого конца.

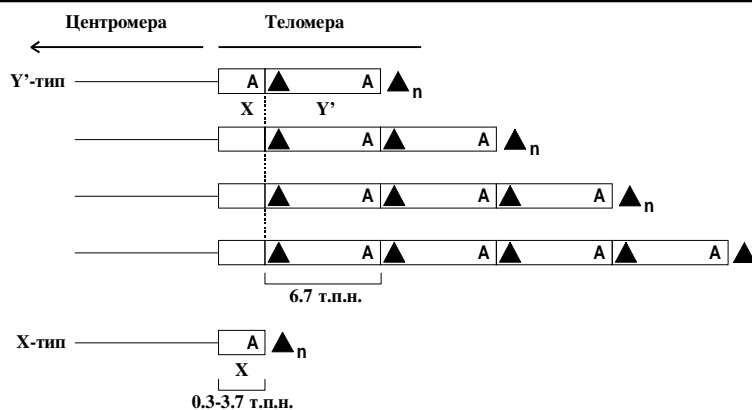
Как уже отмечалось выше, рядом с теломерным повтором располагаются участки ДНК большой протяженности, называемые субтеломерными повторами-TAS.

У дрожжей описано два субтеломерных повтора, X и Y'. X - имеет размеры 0,3-3,75 т.п.н. и менее консервативен, чем Y' (5,2-6,7 т.п.н.). Они чередуются или могут состоять только из Y'-элементов (Рис. 9.38).

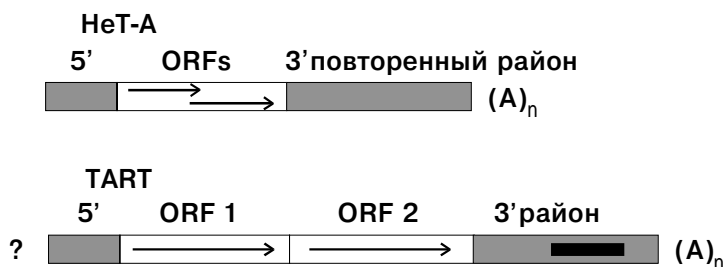
Последние имеют открытые рамки считывания. На основе слабой гомологии в первичных последовательностях с мобильными элементами, предположили, что Y'-элементы возникли из одиночной инсерции в предковый геном дрожжей (Из: Blackburn, Greider, 1995, p. 23, там же много других примеров).

Субтеломерные повторы обнаружены у многих видов. Общая длина тракта может быть очень большой - у хирономуса до 300 т.п.н. в каждой теломере (Из: Жимулев, 1993, стр. 219).

По иронии судьбы, термин “теломера” возник в результате исследований на дрозофиле. В то же время, до сих пор нет никаких доказательств того, что в геноме



**Рис. 9.38.** Два типа, X и Y', хромосом дрожжей *S. cerevisiae*, различающихся строением прителомерного повтора (Из: Chan, Tye, 1983, в кн. Жимулев, 1993, с. 217). Черным треугольником обозначен концевой теломерный повтор, А - автономно реплицирующаяся последовательность (ARS). Субтеломерный повтор может состоять только из X-элементов или различного числа Y'-элементов и X-элементов



**Рис. 9.39.** Схема строения двух теломерных ретротранспозонов HeT-A и TART, найденных у дрозофилы (Из: Blackburn, Greider, 1995, p. 340)

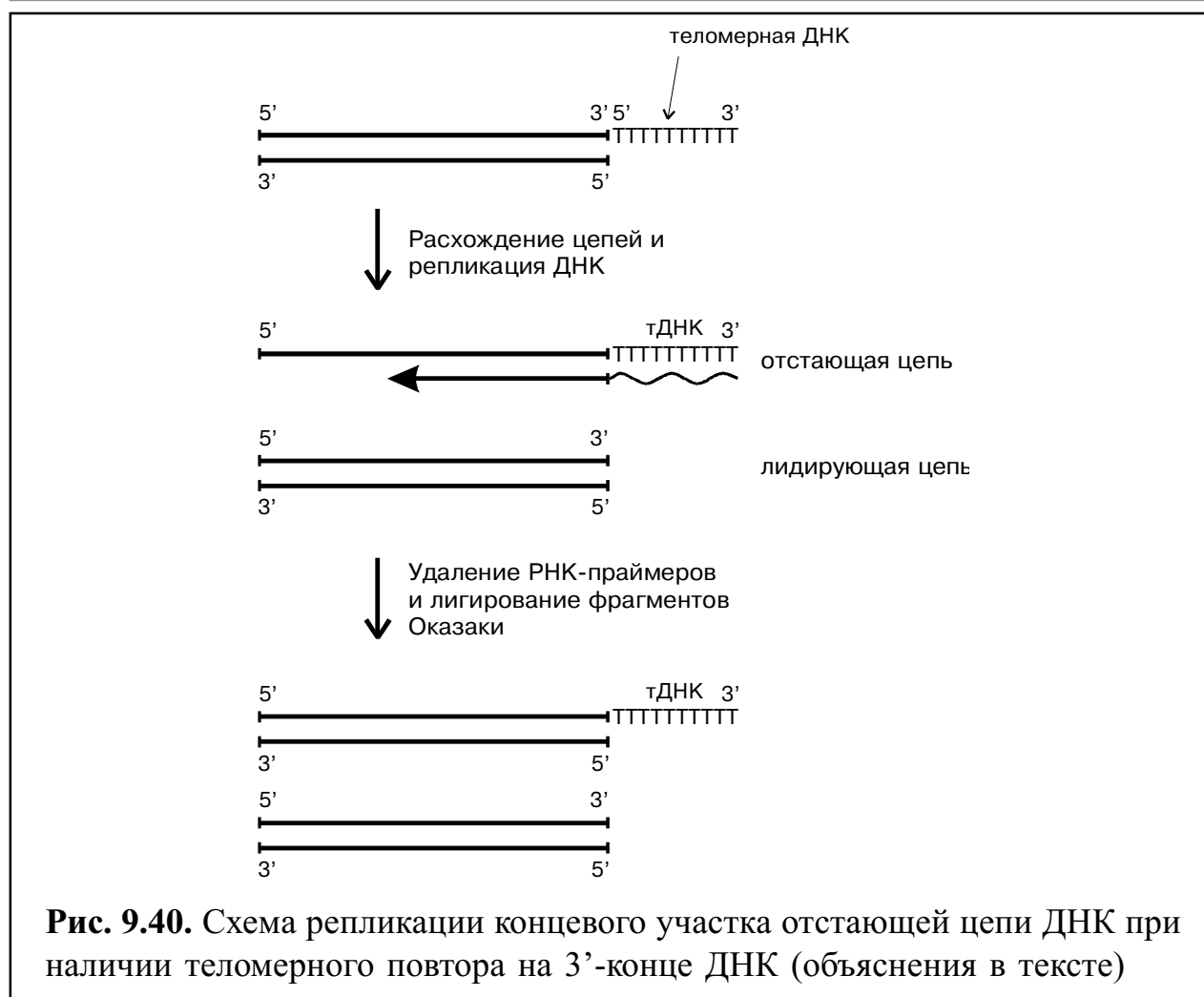
дрозофилы есть короткие теломерные G-богатые последовательности, характерные для теломер большинства других видов.

У дрозофилы на концах хромосом расположены теломеро-специфичные ретротранспозоны, HeT-A и TART (Рис. 9.39.).

Обнаруженные два типа ретротранспозонов, He-T и TART, имеют в общих чертах похожее строение. У обоих на 5'-конце расположены небольшие повторенные последовательности, а на 3'-конце - более длинный повтор, завершающийся длинным фрагментом, содержащим только нуклеотиды с аденином:  $A_n$  (Рис. 9.39.). Различаются

они тем, что He-T имеет две частично наложенные одна на другую последовательности (ORF), кодирующие белки (указаны стрелками на Рис. 9.39.), в то время как TART - две, ORF1 и ORF2, расположенные тандемно. Оба транспозона присутствуют во многих копиях, главным образом в прицентромерных районах. Они могут перемещаться по геному и в случае утраты теломерного района, встраиваются на самый конец хромосомы, восстанавливая теломерную структуру.

Несмотря на то, что молекулярная структура теломеры была к началу 1990-х годов, в основном расшифрована, проблема неполной репликации на конце



линейной молекулы ДНК (см. Рис. 9.32.) осталась. В последние несколько лет выяснилось, что природа выработала механизм удлинения (или элонгации) самого конца хромосомы - т.е. теломерного концевой повтора.

Это связано с активностью особого фермента - теломеразы - рибонуклеопротеида, т.е. белка, содержащего в своем составе короткую молекулу РНК (примерно 150 нуклеотидов, среди которых 2 копии теломерного повтора).

Теломераза выполняет две функции:

1. Перед началом цикла репликации ДНК теломераза добавляет несколько копий теломерных повторов на 3' конец ДНК (Рис. 9.40.). После этого репликация идет в обычном порядке. На отстающей цепи

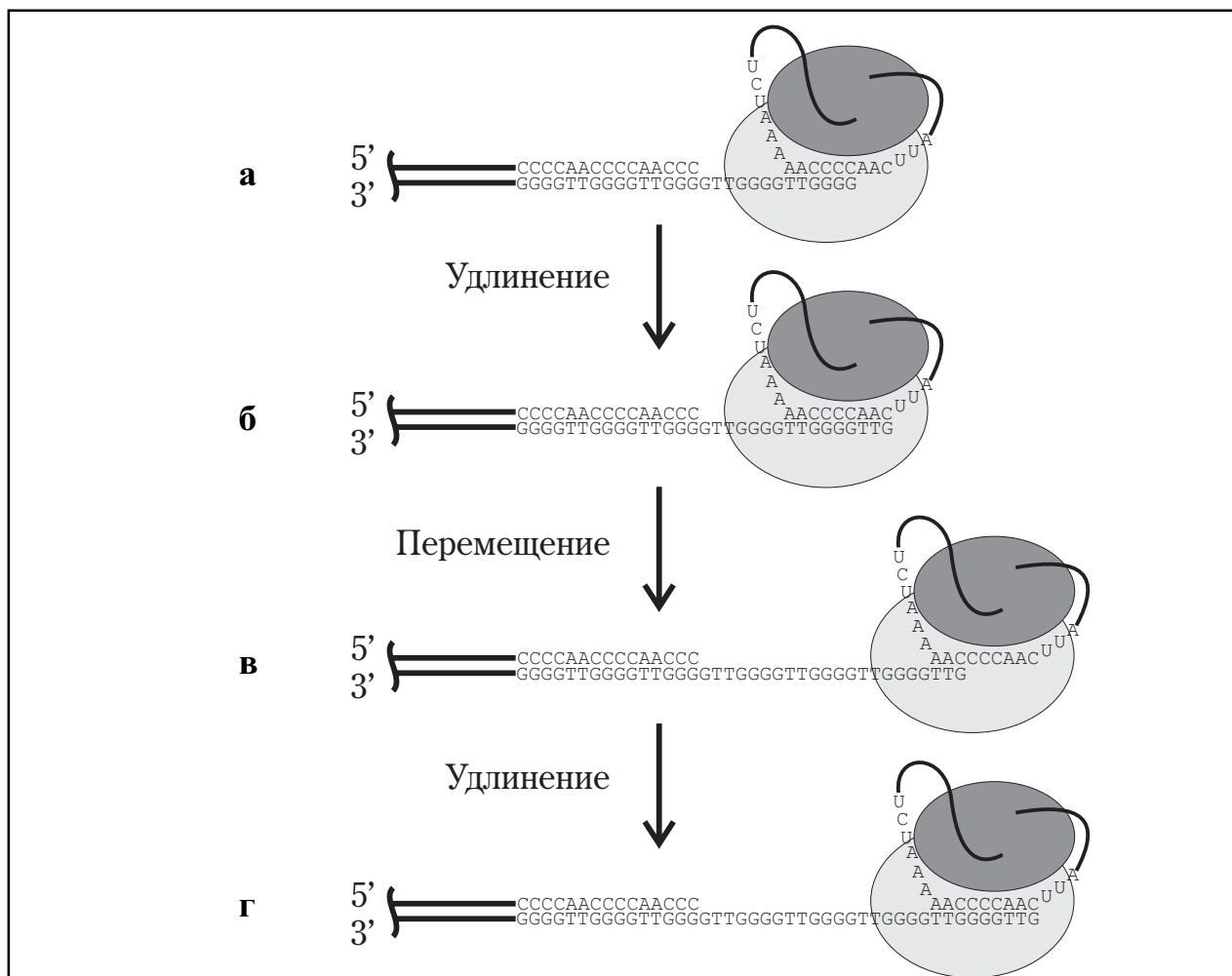
синтезируются РНК-праймеры, при этом наиболее важно то, что самый концевой праймер синтезируется на теломерном повторе. После заполнения гэпов и завершения репликации остается незаполненным только участок РНК-праймера, синтезированного на теломерной последовательности. В результате дочерние цепи ДНК получают той же длины, что и родительские цепи (см. Рис. 9.40.).

2. Нетрудно заметить, что часть нуклеотидов на 3' конце отстающей цепи все же не будет реплицироваться. Но эта неполная репликация произойдет в зоне теломерного повтора, что не причинит никакого вреда генам, расположенным рядом.

Однако, через несколько циклов репликации теломерный повтор “растет” и недорепликация начнет затрагивать гены. Поэтому второй функцией теломеразы является постоянное наращивание G-нити. Теломераза имеет свою матричную молекулу РНК (Рис. 9.41.), с помощью которой фермент распознает теломерный повтор. Последовательность 5'-СААССССАА-3' в молекуле теломеразы спаривается с последовательностью теломерного повтора 5'-ТТGGGG-3' (Рис. 9.41.а). Нуклеотиды ААС в РНК теломеразы остаются неспаренными, и на них достраиваются нуклеотиды ТТG (Рис. 9.41.в). Фермент перемещается на

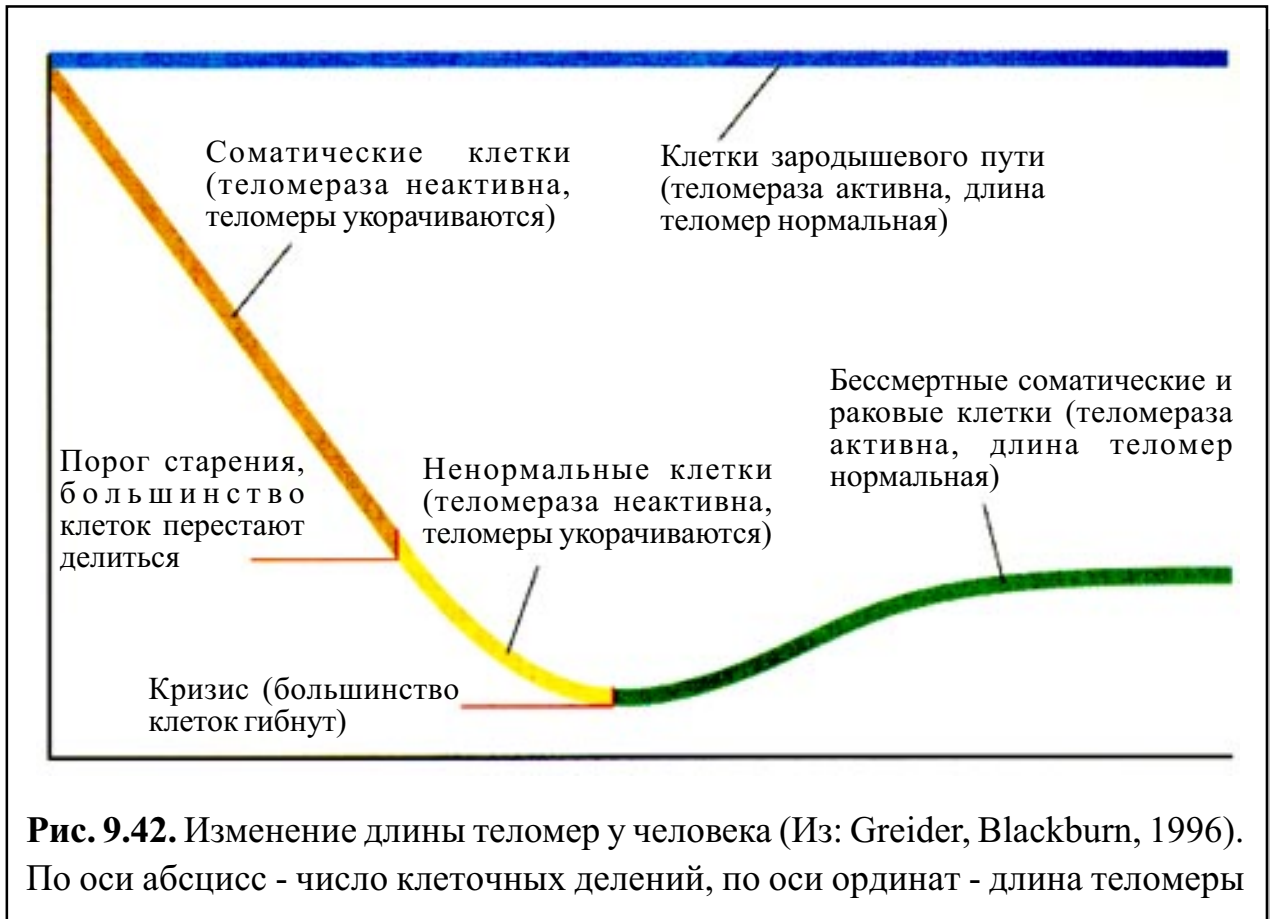
самый конец теломерной последовательности т.е. на всю длину ТТGGGGТТG, и нуклеотиды ААС из молекулы теломеразы спариваются с ТТG теломеры (Рис. 9.41.в), после чего достраивается вся последовательность повтора. [Сведения о репликации теломер у дрозофилы - см. Pardue et al., 1996].

Таким образом, очевидно, что конец хромосомы как бы “запечатан” особой ДНК-белковой структурой, которая позволяет нормально реплицироваться ДНК всей хромосомы. В последнее время накапливаются данные о том, что нарушения в механизме удлинения



**Рис. 9.41.** Удлинение теломерного повтора с помощью фермента теломеразы (по: Blackburn, Greider, 1995) (Объяснения в тексте)





**Рис. 9.42.** Изменение длины теломер у человека (Из: Greider, Blackburn, 1996). По оси абсцисс - число клеточных делений, по оси ординат - длина теломеры

теломерного повтора непосредственно связаны с формированием злокачественных новообразований, а также играют важную роль в процессе старения.

Теломеры в клетках зародышевого пути, благодаря постоянно высокой активности теломеразы сохраняют нормальную длину. Однако, в соматических клетках, культивируемых *in vitro*, теломераза неактивна, и теломеры постоянно укорачиваются (Рис. 9.42.). Это и объясняет существование барьера Хейфлика. В раковых клетках, которые также являются соматическими, клеточные деления не прекращаются, и теломеры у них не укорачиваются. Оказалось, что почти во всех образцах опухолевых клеток, взятых как из культуры, так и из целого организма, активность

теломеразы сохраняется на высоком уровне (Рис. 9.42.). Это обстоятельство позволило ученым пофантазировать на следующую тему: если бы удалось найти химический реагент, избирательно инактивирующий теломеразу, то при его применении опухолевые клетки быстро достигали бы барьера Хейфлика и погибали, в то время как в соматических клетках действие этого агента не ощущалось бы, т.к. в них теломеразы нет.

И наконец, в середине января 1998 года в американском журнале *Science* (N5349) появилась статья, взбудоражившая общественное мнение. Ее авторы сообщили об успешном эксперименте, в ходе которого удалось преодолеть Хейфлика в культуре клеток человека. Группе американского исследователя Дж. Шея с помощью

генно-инженерных методов удалось ввести в геном соматических клеток человека ген теломеразы, снабженный регулируемыми фрагментами ДНК, которые и заставили этот ген активно работать в тех клетках, в которых он обычно не работает. Авторы обнаружили, что длина теломер в этих клетках начала увеличиваться, так же как и продолжительность жизни клеточных культур: сверх обычных 50 делений клетки прошли 20 дополнительных.

Результаты, приведенные выше, показывают, какую огромную роль в жизни организма играют маленькие фрагменты ДНК, расположенные на концах хромосом.

Теломерные районы хромосом имеют следующие свойства, сближающие их с гетерохроматином:

1. В состав теломер входят повторенные последовательности, число копий в кластере варьирует.

2. Теломеры обычно расположены на ядерной обложке (Blackburn, Greider, 1995, p. 302-304).

3. Теломерные концы хромосом чаще всего создают ассоциации, т.е. теломеры разных хромосом конъюгируют (множество примеров в: Жимулев, 1993, стр. 225-239; Blackburn, Greider, 1995, p. 307-326).

4. Теломеры вступают в ассоциации с многими другими районами генома, в первую очередь с прицентромерным гетерохроматином и интеркалярным гетерохроматином (см. раздел (12. ).

5. В некоторых случаях (очень редко) в теломерных районах выявляется слабая С-окраска (см. Жимулев, 1993, стр. 241).

6. В политенных хромосомах теломерные районы представлены неполно т.е. теломерная ДНК недореплицирована (неполная политенизация (см. Жимулев, 1993, стр. 242-243).

7. Белок HP1 выявляется в теломерах (там же, стр. 243).

8. Гены могут инактивироваться если перенесены в окрестности прицентромерного гетерохроматина (это свойство имеет название эффекта положения генов - см. раздел 10).

9. Есть данные о действии модификаторов эффекта положения на проявления свойств теломер (там же, стр. 243).

### **Литература к разделу 9.5.**

- Жимулев И.Ф. Политенные хромосомы: морфология и структура. Новосибирск, Наука, 1-479, 1992.
- Жимулев И.Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск, Наука, 1-490, 1993.
- Жимулев И.Ф. Теломеры - особые структуры на концах хромосом. Соросовский образ. журнал. 1998 (в печати).
- Blackburn E.H., Greider C.W. (eds.) Telomeres. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1-396, 1995.
- Greider C.W., Blackburn E.H. Telomeres, telomerase and cancer. Scientific American 274, N2, 80-85, 1996.
- Pardue M.L., Danilevskaya O.N., Lowenhaupt K., Slot F., Traverse K.L. *Drosophila* telomeres: new views of chromosome evolution. Trends in Genetics 12, N2, 48-52, 1996.
- Zhimulev I.F. Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect

variegation. *Advances in Genetics* 37, 1-500, 1997.

## 9.6. Диминуция хроматина и хромосом

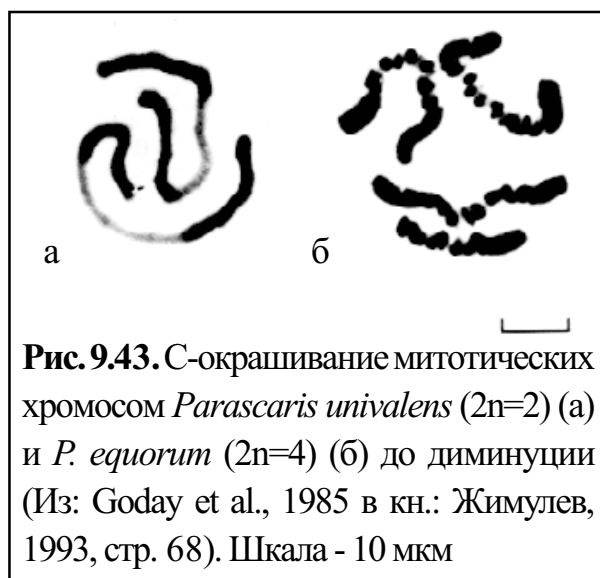
(Из: Жимулев, 1993, стр. 67-77).

Явления дифференцировки клеток зародышевого пути и сомы, связанные с потерей части генетического материала в раннем эмбриональном развитии (диминуция хроматина, элиминация хромосом), довольно широко распространены в природе. Диминуция хроматина в той или иной степени известна у некоторых видов аскарид, циклопов, инфузорий, клещей, жуков, бабочек, мух и рыб.

### 9.6.1. Диминуция хроматина у аскарид

У аскариды *Parascaris univalens* зигота содержит две хромосомы, в каждой из которых можно выделить тонкий прицентромерный и утолщенные концевые районы. У другого вида *P. equorum*  $2n=4$ . Хромосомы содержат небольшие участки слабо-окрашивающегося материала, которые вкраплены в огромные массы С-гетерохроматина (Рис. 9.43.).

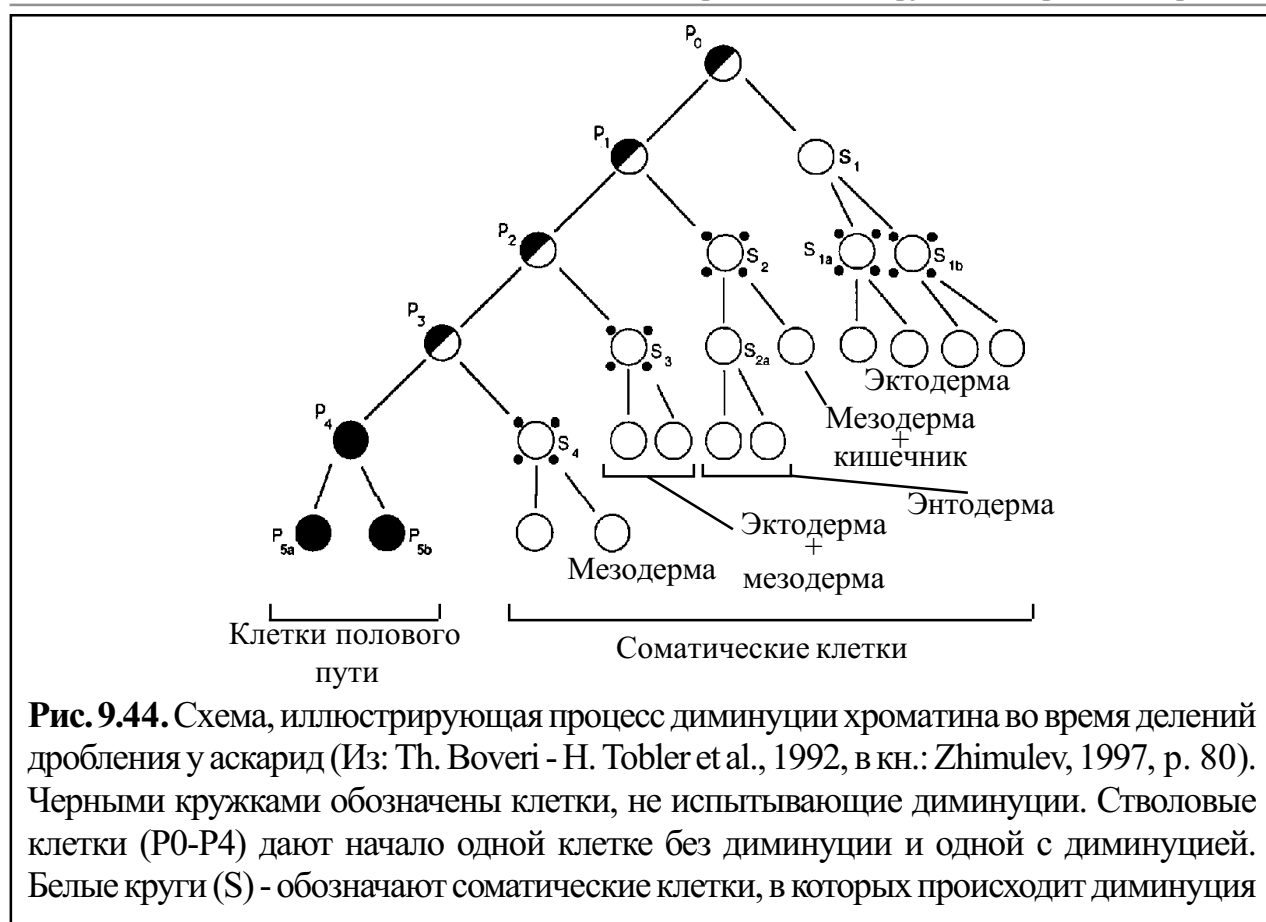
В 1887 году Теодор Бовери (Th. Boveri) обнаружил, что уже во время второго деления дробления в одной из клеток *P. univalens* утолщенные концы хромосом отделяются от средней части и, не имея центромер, остаются в районе экватора, где дегенерируют. В результате утрачивается существенная часть хромосом, происходит, по определению Бовери, диминуция хроматина. Клетка, прошедшая диминуцию, дает начало клону клеток (Рис. 9.44.), имеющих значительно укороченные хромосомы.



**Рис. 9.43.** С-окрашивание митотических хромосом *Parascaris univalens* ( $2n=2$ ) (а) и *P. equorum* ( $2n=4$ ) (б) до диминуции (Из: Goday et al., 1985 в кн.: Жимулев, 1993, стр. 68). Шкала - 10 мкм

Что касается второй дочерней клетки, в ней диминуция не происходит, и она дает начало двум новым клеткам: одна опять будет испытывать диминуцию, другая - нет. В результате этого у эмбриона, состоящего из 32 клеток, две имеют полный набор последовательностей ДНК. Из них затем формируются клетки зародышевого пути. Из оставшихся 30 клеток развиваются соматические клетки. Похожая картина диминуции описана и для другого вида - *A. lumbricoides*. У *Parascaris equorum* при диминуции выпадают многочисленные внутренние утолщенные участки хромосом. Оставшиеся сегменты объединяются в одну общую хромосому. Показано, что у аскарид центромера голоцентрическая, и нити веретена прикрепляются к многочисленным районам по всей длине хромосом. В клетках до диминуции микротрубочки митотического веретена прикрепляются только к районам хромосом, не удаляемым при диминуции.

У *P. univalens* отделяемые при диминуции концевые районы хромосом (до 80% всего материала хромосом)



имеют ярко выраженные характеристики гетерохроматина, такие как Н и С окрашиваемость, гибридизуемость *in situ* с сателлитной ДНК. Центральная часть хромосом у *P. univalens*, не удаляемая при диминуции, не окрашивается на Н- и С-гетерохроматин и не гибридизуется с сателлитной ДНК. В хромосомах *P. equorum* все утолщения хромосом обнаруживают С- и Н-окрашивание и удаляются при диминуции.

Элиминируемая в ходе диминуции ДНК обогащена повторами. Так, у *P. equorum* клетки зародышевого пути содержат два легких сателлита, которые вместе составляют около 85% ДНК зиготы. Именно эти сателлиты и элиминируются в соматических клетках.

У *Ascaris lumbricoides* удаляется высокоповторенная ДНК с единицами повторности длиной 125 и 131 п.н.

В целом 99% сателлитной ДНК, присутствующей в клетках зародышевого пути, удаляется в ходе диминуции. Блоки умеренных повторов рДНК не удаляются. Элиминируются мобильные элементы, часть уникальных последовательностей. В результате диминуции образуются соматические ядра, в которых только ~10% генома повторены и только 0,01-0,05% ДНК повторены высоко.

После удаления концевых гетерохроматиновых фрагментов хромосом на них формируются новые теломеры (повтор ТTAGGC).

### 9.6.2. Диминуция хроматина у циклопов

Кроме аскарид диминуция хроматина обнаружена у нескольких видов циклопов. Она происходит во время 4-7 делений дробления (у разных

видов). Хроматин элиминируется из различных участков хромосом: терминальных гетеропикнотических фрагментов у *Cyclops divulsus*, *C. furcifer* или из интеркалярных - у *C. strenuus* и остается в виде крупных блоков, капель или гранул в экваториальной части веретена деления.

Работами А.П. Акифьева и А.К. Гришанина наиболее полно описан процесс диминуции у *C. kolensis*. Диминуция у этого вида происходит во время 4-го деления дробления в 6 клетках зародыша из 8 и характеризуется тем, что в конце значительно удлиненной интерфазы в ядрах этих шести клеток появляются мелкие Фельген-положительные гранулы или капли (около 600 в каждой клетке). Гранулы имеют диаметр 0.5-3.5 мкм. По мере наступления профазы и следующих стадий диминуционного деления хроматиновые гранулы сливаются, вокруг них формируется плотная однослойная лишенная пор мембрана толщиной около 50 нм. Лизис элиминируемой ДНК (эДНК) происходит, вероятно, внутри этих гранул. Такая неординарная структура мембраны, по-видимому, неслучайна. Элиминируемая ДНК представлена циклическими структурами, и если бы вокруг гранул формировалась обычная ядерная мембрана, компоненты которой присутствуют в делящихся клетках, то внутри гранул с началом телофазы мог бы свободно поступать фактор(ы) декомпактизации. В таком случае гранулы эДНК превратились бы в обычные микроядра, которые в сумме содержали бы большую часть генетического материала клетки. Уникальная мембрана гранул эДНК

обеспечивает надёжную изоляцию материала, подлежащего лизису, и таким образом предотвращает возникновение хаоса в постдиминуционных клетках.

Расположение гранул, их ориентация по отношению к экватору клетки и веретену настолько характерны для данного вида, что служит надёжным критерием в цитотаксономии рода *Cyclops*.

Число сайтов эксцизии, по которым идет вырезание элиминируемого хроматина, должно быть равно числу гранул или больше, появляющихся в конце преддиминуционной интерфазы, т.е. минимум 500-600 у *C. kolensis*, минимум 160 у *C. strenuus*.

Значительно увеличена продолжительность интерфазы перед теми делениями дробления, в ходе которых формируются гранулы, т.е. происходит диминуция (Табл. 9.4.). После диминуционного деления интервалы вновь укорачиваются.

Содержание ДНК в соматическом геноме *C. kolensis* после диминуции оказалось равным  $0,14+0,02$  пг, что составляет примерно 5-7% от генома зародышевых клеток данного вида.

В ходе диминуции число хромосом не изменяется, однако размеры их, например у *C. kolensis*, резко уменьшаются: длина с 11-20 до 2.6 мкм, а диаметр - с 1 до 0.5 мкм (Из: Гришанин, 1996). В самых первых делениях дробления и в особенности во время преддиминуционного митоза в хромосомах циклопов, у которых доля эДНК достаточно велика (50% и более), спонтанно, без предфиксационной обработки обнаруживается поперечная исчерченность, весьма напоминающая G-полосы в хромосомах млекопитающих.

**Табл. 9.4.** Длительность интервалов времени между делениями дробления зародышей *Cyclops kolensis* и *C. strenuus strenuus* (Из: Гришанин, 1996, стр. 9-10)

Интервал между делениями	Длительность интервала (в минутах)	
	<i>Cyclops kolensis</i>	<i>C. strenuus strenuus</i>
1-2	70-90	40-50
2-3	70-90	40-50
3-4	480-540*	40-50
4-5	50-60	170-190*
5-6	50-60	80-90
6-7	50-60	35-40
7-8	50-60	35-40

\* Начиная с этого интервала и дальше имеются в виду соматические клетки.

Первоначально, С. Беерман в 1977 г. предположила, что эти полосы соответствуют сегментам эДНК и состоят из гетерохроматина. Она назвала их Н-сегментами, и, по существу, представила всю диминуцию хроматина (ДХ) у *Cyclops*, как процесс выброса гетерохроматина из генома зародышевых клеток. Такое предположение, постулирующее необычайно большую долю гетерохроматина в геноме *Cyclops* (у *C. kolensis* она, следовательно, должна быть около 90%, а максимальная доля сателлитной ДНК в геномах ракообразных оценивается в 30%), было опровергнуто Д. Стандифордом в 1989, которому удалось с помощью С-окраски сравнить Н-сегменты и С-полосы, представляющие собой истинный конститутивный гетерохроматин. Совпадение локализации тех и других полос оказалось лишь частичным, и автор заключил, что некоторые Н-сегменты имеют структуру и состав оснований, отличные от С-полос. В то

же время большинство С-полос в хромосомах зародышевых клеток не обнаруживаются в постдиминуционных хромосомах (Из: Акифьев и др., 1998).

### 9.6.3. Элиминация хроматина у инфузорий

Инфузории имеют сложный половой процесс: у них формируется микронуклеус (Ми) - носитель наследственной информации и макронуклеус (Ма) - трофическое ядро.

При созревании Ма диминуция хроматина происходит дважды: первый раз удаляются целые хромосомы (см. Рис. 12.. ниже): через 10-15 час после расхождения эксконъюгантов у *Stylonychia lemnae* примерно 140 хромосом становятся более компактными, перемещаются к внутренней мембране оболочки ядра и затем дегенерируют.

Оставшиеся 35-36 хромосом постепенно политенизируются и еще через сутки происходит внутривнутрихромосомная элиминация ДНК.

Происходит она следующим образом: диски политенных хромосом поодиночке или небольшими группами окружаются мембраноподобным материалом, образуя пузырьки. Вся политенная хромосома распадается на множество независимых пузырьков, в которых лизируется большая часть ДНК: элиминируется большая часть высокоповторенных последовательностей, межгенные промежутки-спейсеры, мобильные элементы генома, а также внутренние (фактически внутригенные) элиминируемые последовательности (ВЭП). Все изученные до сих пор гены *Oxytricha nova* и *Euplotes crassus*, а их более 20, содержат ВЭП. В целом число ВЭП в Ми составляет порядка десятков тысяч. ВЭП имеют на флангах короткие - 2-19 пар нуклеотидов - повторы, при участии которых, возможно, и происходит сплайсинг кодирующих последовательностей Ма.

Представляет интерес судьба транспозоноподобных элементов во время ДХ у простейших. Показано, что у *Euplotes crassus* два родственных семейства таких последовательностей - *TEC1* и *TEC2*, представленных примерно тридцатью тысячами копий, полностью элиминируются из генома в ходе созревания Ма. Подобное явление описано и у *O. fallax*.

Наконец, нельзя не упомянуть ещё об одном неординарном событии, происходящем во время созревания Ма. Порядок чередования кодирующих областей (вероятно, в основном соответствующих экзонам) в одних и тех же генах Ми и Ма может быть идентичным, иначе говоря эти гены коллинеарны. Однако в ряде случаев,

например, в гене, кодирующем ДНК-полимеразу у *O. nova*, состоящем из 44 ВЭП и 45 последовательностей, “предназначенных для Ма”, в ходе созревания Ма происходят многочисленные перестановки, даже с инверсиями кодирующих участков. Только в таком перетасованном виде ген приобретает функциональную активность в Ма (Из: Акифьев и др., 1998). Остаются только генетически значимые последовательности. К ним с обоих концов присоединяется теломерная ДНК, затем оболочки пузырьков распадаются и Ма превращается в “мешок с генами”.

В результате двух актов диминуции только 2% последовательностей ДНК, имеющиеся в Ми, остается в зрелом Ма.

#### **9.6.4. Элиминация хромосом у двукрылых насекомых**

В 1908 году W. Kahle обнаружил диминуцию хроматина у галловой мушки *Miastor*, которая, как оказалось позднее, связана с потерей целых хромосом. Это явление встречается у представителей трех семейств отряда Diptera. У них были обнаружены два типа хромосом - E (eliminated) - хромосомы, которые ограничены только клетками полового пути и не встречаются в соматических клетках, и S - (somatic) - хромосомы, которые составляют основной набор хромосом в соматических клетках.

Число E-хромосом может быть значительным: у представителей сем. Cecidomyiidae при основном наборе хромосом 8, число хромосом, ограниченных клетками полового пути, варьирует в пределах от 8 до 60, у хириноид - от 1-4 до 26, у сциарид - 1-3 хромосомы.



**Рис. 9.45.** Элиминация хромосом в телофазе третьего деления дробления у *Miastor sp.* (Cecidomyiidae) (Из: ... в кн.: Жимулев, 1993, стр. 76). Шкала - 5 мкм

Процесс элиминации у хирономид происходит в ходе 5-7 деления дробления. Е-хромосомы остаются на экваторе и дегенерируют (Рис. 9.45.).

Ряд фактов указывает на обогащенность элиминируемых хромосом гетерохроматином. (Получение транслокаций, детали см.: Жимулев, 1993, стр. 72-75, стр. 261-263).

(См. также White книга; Stuart, Hatchett, 1988; J. Heredity 79, 190-199).

#### **9.6.5. Физиологическое значение диминуции хроматина и хромосом**

Наиболее популярной является точка зрения, что гены, находящиеся в той части ДНК, которая сохраняется только в клетках полового пути, не участвуют непосредственно в генетическом контроле эмбриогенеза, личиночного развития и

регуляции функций взрослого организма. Кажется естественным предположить, что эти гены участвуют в процессах оогенеза и сперматогенеза.

W. Hennig полагает, что и гетерохроматин в целом должен быть прямо связан с особыми функциями клеток зародышевого пути. А. Прокофьева-Бельговская полагает, что гетерохроматиновые районы хромосом аскарид нужны только для осуществления мейотических процессов.

Однако, есть и противоположные точки зрения. Так, по мнению А. Акифьева и А. Гришанина крайне маловероятно, что до 94% генома у циклопов и 98% у стилонихии кодируют только функции, специфичные для половых клеток, а остающаяся часть - все остальное.

Многочисленные гипотезы, предлагавшиеся ранее для объяснения биологической роли избыточной ДНК, оказались неверными в первую очередь из-за того, что они опирались на представления о её соматических функциях, чаще всего - участии в генетической регуляции. Явление диминуции хроматина ясно показывает, что подлинное значение избыточной ДНК ограничено зародышевыми клетками. Возможно, что в эДНК содержатся гены, контролирующие процессы созревания половых клеток, в том числе мейоз, но всё же едва ли они составляют значительную часть эДНК у *C. kolensis* и многих других видов, у которых известна ДХ.

По мнению Акифьева с сотруд. (1998) единственным непротиворечивым на сегодняшний день объяснением возможной роли избыточной ДНК в клетках



зародышевого пути является представлением о том, что она специально предназначена в качестве фактора генетической изоляции видов. Одной из наиболее изученных составляющих избыточной ДНК является гетерохроматин. Данные по ДХ, приводимые выше, так же как и другие новые факты, убедительно свидетельствуют о том, что функции большей части гетерохроматина ограничены клетками зародышевого пути. Чем более значительна разница в молекулярной структуре некодирующих участков, тем вероятнее нарушение конъюгации гомологов у гибридов со всеми вытекающими последствиями. Определение отдельных видов *Cyclops* трудно даже для опытных систематиков, что говорит о большом сходстве генов, т.е. уникальной ДНК. Однако отличие в организации большей или меньшей доли эДНК предотвращает гибридизацию этих близких видов (разумеется, наряду с другими изолирующими механизмами).

Эти представления далеки от теорий “мусорной” ДНК, “эгоистичной” ДНК и т.п. Данная концепция подчеркивает эволюционную роль избыточной ДНК (Из: Акифьев и др. 1998).

Очевидно, что ДХ находится под генетическим контролем. Перечень этапов ДХ, которые даны для инфузорий Дж. Шапиро, а для циклопов - С. Беерман и А. Акифьевым с сотрудниками, убедительно показывает, что для её осуществления требуется координированная последовательная работа батарей из многих генов, скорее всего даже десятков генов. На уровне хромосомного фенотипа ДХ,

безусловно, соответствует представлению о макромутациях. В то же время морфологические различия между видами циклопов, имеющих или лишенных ДХ, либо с ДХ, резко различающейся по цитологической картине и календарю, порой настолько ничтожны, что даже опытные систематики предпочитают иметь дело с самой ДХ, как критерием видовой самостоятельности, нежели с морфологическими особенностями особей (Из: Акифьев и др., 1998).

### **Литература к разделу 9.6.**

- Акифьев А.П., Гришанин А.К. Некоторые биологические аспекты диминуции хроматина. Журн. общ. биол. т. 54, N1, 5-16, 1993.
- Акифьев А.П., Гришанин А.К., Дегтярёв С.В. Диминуции хроматина, сопровождающиеся реорганизацией молекулярной структуры генома: эволюционные аспекты. Генетика т. 34, N , стр. , 1998.
- Глазер В.М. Запрограммированные перестройки генетического материала в онтогенезе. Соросовский образовательный журнал, N 8, стр. 22-29, 1998.
- Гришанин А.К. Сравнительное изучение хромосом и интерфазных ядер в клетках зародыша *Cyclops kolensis* (Copepoda, Crustacea) до и после диминуции хроматина при помощи электронной микроскопии. Онтогенез т. 26, N3, 188-195, 1995.
- Гришанин А.К. Особенности диминуции хроматина у *Cyclops kolensis* и *Cyclops strenuus strenuus* (Crustacea, Copepoda). Автореферат

- канд. дисс. Институт Биол. Разв. РАН, Москва, 1996.
- Гришанин А.К., Акифьев А.П. Диминуция хроматина и организация хромосом у *Cyclops strenuus strenuus*. Генетика т. 29, N7, 1099-1107, 1993.
- Гришанин А.К., Бродский В.Я., Акифьев А.П. Соматические клетки *Cyclops strenuus* (Copepoda, Crustacea) теряют при диминуции хроматина более 90% генома. Докл. РАН. т. 338, N5, 708-710, 1994.
- Жимулев И.Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск, Наука, 1-490, 1993.
- Zhimulev I.F. Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect variegation. *Advances in Genetics*, 37, 1-550, 1997.

### 9.7. Строение центромеры

Центромера - специфическая область эукариотической хромосомы, которая играет фундаментальную роль в движении хромосом к полюсам деления и точного распределения вновь реплицировавшихся хроматид по дочерним клеткам во время митоза и мейоза. Частота ошибок в этих процессах невелика, но значительна. У дрожжей, например, частота нерасхождения хромосом составляет  $10^{-5}$  или ниже. У человека частота нерасхождения хромосом выше, хотя большинство зигот с нерасшедшимися хромосомами гибнет во время эмбрионального развития. Нерасхождение хромосом происходит в тех случаях, когда центромера нормально не функционирует.

На ранних этапах подготовки хромосом к митозу центромера становится видимой как отчетливая

морфологическая структура и выглядит как перетяжка хромосомы. Функция центромеры, по крайней мере частично, заключается в обеспечении прикрепления к хромосоме нитей веретена. Центромера имеет свой цикл поведения в митозе и мейозе. В митозе и во втором делении мейоза у сестринских хроматид центромеры сохраняют тесную связь друг с другом дольше других участков хромосомы и разделяются только в начале анафазы. В первом делении мейоза, напротив, центромеры гомологичных хромосом в каждом биваленте начинают отталкиваться первыми с началом анафазы I, при этом центромеры сестринских хроматид ведут себя как единое целое.

Участок центромеры содержит кинетохор - обособленную структуру, контактирующую с центромерным районом, к которому прикрепляются микротрубочки-нити митотического веретена. Сформированный кинетохор метафазных хромосом представляет собой трёхслойную пластину, состоящую из внутреннего слоя толщиной 40-60 нм, светлоокрашенного среднего слоя приблизительно 25-30 нм толщиной и внешнего слоя 40-60 нм. Внутренние слои кинетохорной пластины располагаются рядом с хроматиновыми тяжами и его внутренняя поверхность взаимодействует с центромерным хроматином. Тонкие хроматиновые нити проходят сквозь средние слои и, оказывается, связаны с внутренним и внешним слоями (Rattner, 1987). Микротрубочки, связанные с кинетохором, заканчиваются во внешнем слое, и редко протягиваются до среднего и внутреннего слоёв. Помимо микротрубочек, внешние слои содержат "пушистую поверхность" или корону,

состоящую из фибрилл, которые формируют петли наподобие ламповых щеток (Brinkley et al., 1986). В конце митоза кинетохор как специализированная структура исчезает.

С молекулярно-биологической стороны организация кинетохора изучена очень слабо. Однако известно, что кинетохор содержит ДНК, ДНК-связывающие белки, возможно РНК и тубулин (Brinkley et al., 1986). Показано, что обработка ДНКазой хромосом млекопитающих специфично конденсирует структуру пластинки кинетохора, тогда как обработка РНКазой не влияет на неё.

В настоящее время изучение организации центромерного района хромосом эукариот ведётся лишь на некоторых объектах.

В 1980-е годы в центромерах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* были обнаружены последовательности, делеции которых приводят к утрате центромерной функции, что позволяет определить зону локализации центромеры на молекулярной карте. Центромерные районы у дрожжей называют районами CEN (от centromere) с добавлением цифры, обозначающей номер хромосомы. Сравнительный анализ центромер разных хромосом выявил важные закономерности в их структуре - центромерная ДНК всех хромосом дрожжей перекрёстно гибридизуется, что свидетельствует об их гомологии. Результаты полного секвенирования всего генома дрожжей показали наличие в центромерных районах всех 16 хромосом консервативных доменов CDEI (centromere DNA element I), CDEII и CDEIII (Рис. 9.46.). Хотя все центромеры имеют одну и ту же функцию, и центромерные районы очень

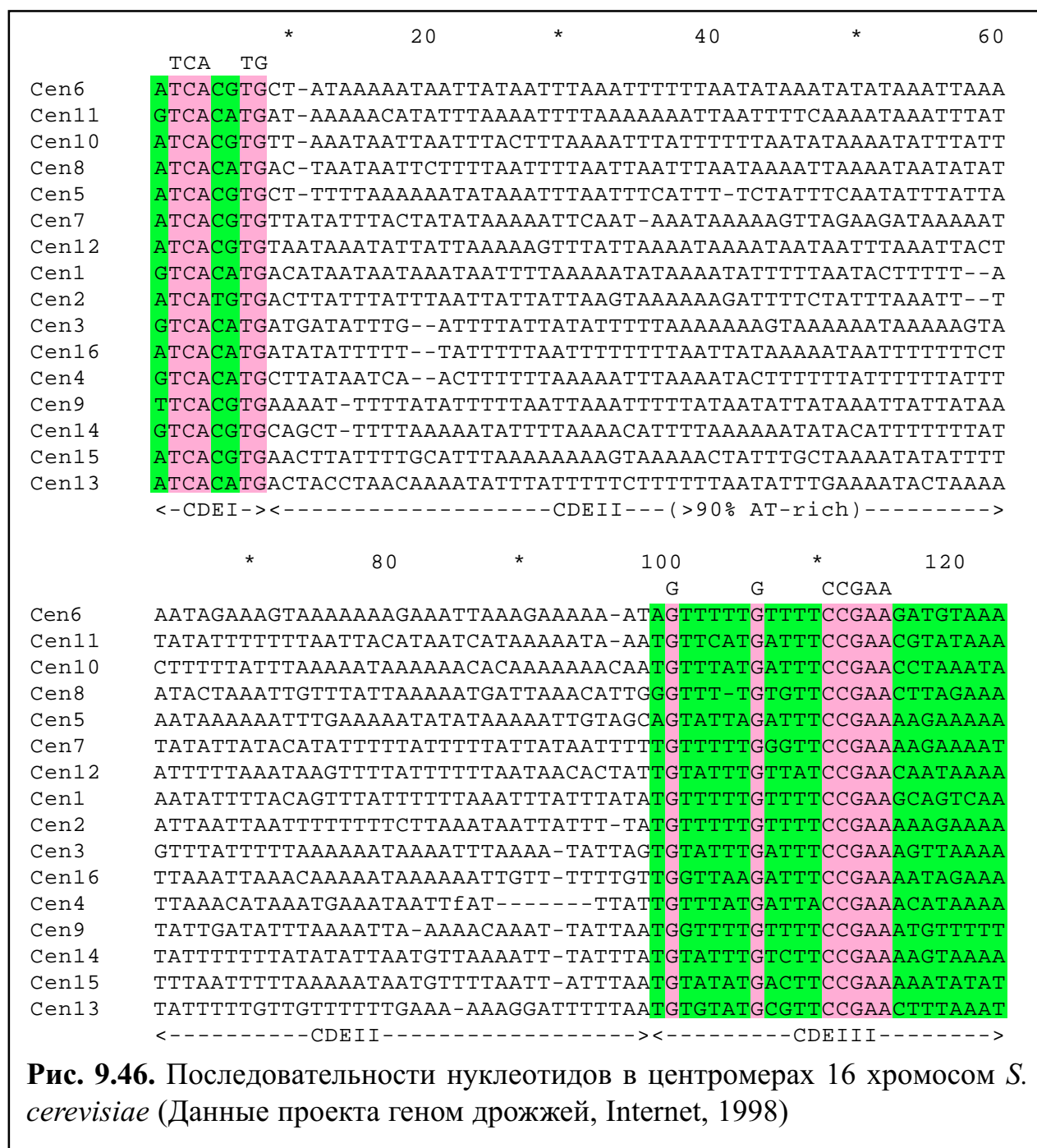
похожим образом устроены, все же последовательности нуклеотидов в них не полностью идентичны.

Элемент, называемый CDEI, во всех хромосомах имеет 7 консервативных нуклеотидов TCACATG. Далее следует фрагмент из 76-86 п.н. (число нуклеотидов в разных хромосомах разное). Это CDEII. Собственно нуклеотидные последовательности в каждой хромосоме разные, но в каждой из них доля AT-пар превышает 90% (в среднем 93-94%).

Элемент CDEIII состоит из 25 п.н., из которых последовательность -G----G---CCGAA-----, присутствует во всех 16 хромосомах (Рис. 9.46).

Делеционный анализ, выполненный на плаزمиде, содержащих центромеры дрожжей, однозначно свидетельствует, что районы I-III необходимы для митотической стабильности автономно реплицирующихся последовательностей (ARS) плазмиды. Для осуществления центромерной функции необходимы не целые выше описанные элементы, а консенсусные группы. Так, делеция 5 левых нуклеотидов элемента I существенно не влияет на активность центромеры CENII, тогда как удаление AT-богатой области (CDEII) полностью инактивирует центромерную активность. Высоко консервативный третий элемент (CDEIII) также принципиально необходим для осуществления центромерной функции. В нескольких работах было показано, что даже единичные делеции в этом районе полностью инактивируют центромеру.

Центромерные последовательности ДНК определены для ряда других организмов. Они оказались отличными от тех, что были найдены у *S. cerevisiae*, и различаются у разных видов. Так, у

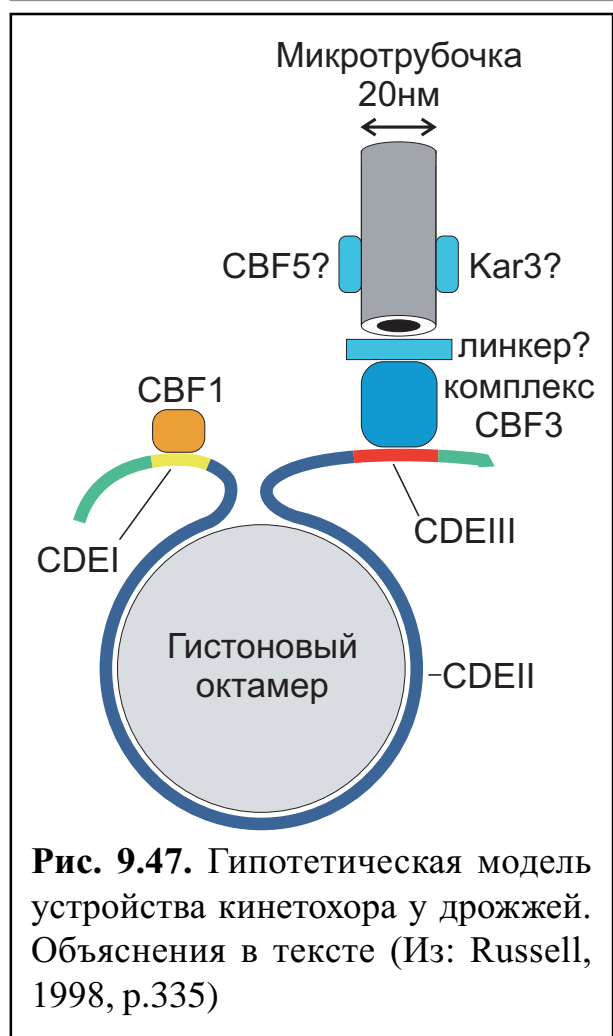


**Рис. 9.46.** Последовательности нуклеотидов в центромерах 16 хромосом *S. cerevisiae* (Данные проекта геном дрожжей, Internet, 1998)

другого вида дрожжей, *S. pombe*, центромеры имеют длину от 40 до 80 т.п.н. со сложным чередованием различных повторенных последовательностей. Таким образом, несмотря на то, что центромеры имеют одну и ту же функцию у всех живых организмов, не существует одинаковой последовательности ДНК, ответственной за выполнение этой функции.

Каким образом центромерная ДНК организована в хроматин и каким образом происходит прикрепление микротрубочек? К настоящему времени выявлены некоторые типы белков, которые взаимодействуют с центромерой с микротрубочками (Рис. 9.47.).

В этой модели CBF1 (centromere binding factor 1) связывается с мотивом CDE1; комплекс белков CBF3 связывается с CDEIII. Более длинная



последовательность CDEII может быть предположительно обернута вокруг гистонового октамера. По-видимому, посредством линкерного белка, фактор CBF3 связывается с концом микротрубочки (Текст по: Russell, 1998, p. 333-335).

### Литература к разделу 9.7.

- Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. Москва, Мир, Том. 2, 1994.
- Bloom et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. v. 47, p. 1175-1185, 1984.
- Brinkley et al., 1986
- Rattner, 1987
- Russell P.J. Genetics. Fifth edition, Menlo Park, California, 655-678, 1998.

### 9.8. В-хромосомы

(Текст по: Жимулев, 1993, стр. 244-261).

Добавочными, или В-хромосомами, называют группу хромосом, различных по структурным и функциональным особенностям и сверхчисленных по отношению к хромосомам основного (А) набора. В-хромосомы встречаются как в клетках полового пути, так и в соматических.

В-хромосомы обнаружены у 510 видов двудольных растений (2.6% от числа видов, у которых описаны кариотипы) и у 1007 видов однодольных (3.6%). Из 263 видов животных, у которых обнаружены В-хромосомы, более 40% составляют насекомые.

Число В-хромосом у разных особей сильно варьирует, в подавляющем большинстве случаев встречается 1-2 В-хромосомы, редко до 6, иногда их число доходит до 12.

Авторы большинства обзоров полагают, что В-хромосомы состоят в основном из гетерохроматина. У видов, имеющих политенные хромосомы, В-хромосомы часто тоже политенизируются. Выявлено большое разнообразие морфологии В-хромосом. Это могут быть бесструктурные глыбы рыхлого или компактного хроматина. В некоторых случаях это небольшие округлые или вытянутые сильно гетеропикнотичные тельца. Иногда В-хромосомы имеют характерный для политенных хромосом рисунок дисков, пuffs и очень часто ядрышки.

В В-хромосомах с дисковым рисунком часто наблюдают 1-2 очень крупных блока компактного материала, очень напоминающего гетерохроматин.

Об обогащенности В-хромосом гетерохроматином свидетельствуют

следующие факты: в клеточном ядре они расположены на внутренней стороне ядерной оболочки, участвуют в эктопических контактах, часто они не политенизируются (свойство, характерное для гетерохроматина), окрашиваются на С-гетерохроматин, фрагменты В-хромосом обнаруживают позднюю репликацию (Из: Жимулёв, 1993, стр. 244-261).

Очень часто В-хромосомы обогащены сателлитными ДНК. Семейства этих повторов могут быть специфичными только для В-хромосом, или же встречаются как в В-хромосомах, так и в других хромосомах.

По мнению многих учёных В-хромосомы возникли из А-хромосом: 1) в результате гибридизации разных видов, 2) в результате нерасхождения некоторых А-хромосом и возникновения трисомии.

После того как прото-В-хромосома возникла, начинается инактивация расположенных там генов и потеря материала в результате делеций, фиксация в этих хромосомах сателлитных ДНК и мобильных элементов (Из: Hackstein et al., 1996).

### **Литература к разделу 9.8.**

Жимулёв И.Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск, Наука, 1-490, 1993.

Прокофьева-Бельговская А.А. Гетерохроматические районы хромосом. Москва, Наука, 1-431, 1986.

Hackstein J.H.P., Hochstenbach, R., Hauschten-Jungen, E., Beukeboom, L.W. Is the Y chromosome of *Drosophila* an evolved supernumerary chromosome? BioEssays 18, N4, 317-323, 1996.

### **9.9. Генетическая инактивация хромосомы у *D. miranda***

(не читал)

### **9.10. Факультативный и конститутивный гетерохроматин**

(не читал)

### **9.11. Гетерохроматин и клетки зародышевого пути**

(не читал)