

**Глава 10. Мозаичный эффект положения гена**

<b>10.1. Структура гена при эффекте положения</b>	<b>3</b>
<b>10.2. Распространение инактивации</b>	<b>3</b>
<b>10.3. Типы мозаичности</b>	<b>4</b>
<b>10.4. Уровни инактивации гена</b>	<b>5</b>
<b>10.5. Модификаторы эффекта положения</b>	<b>6</b>

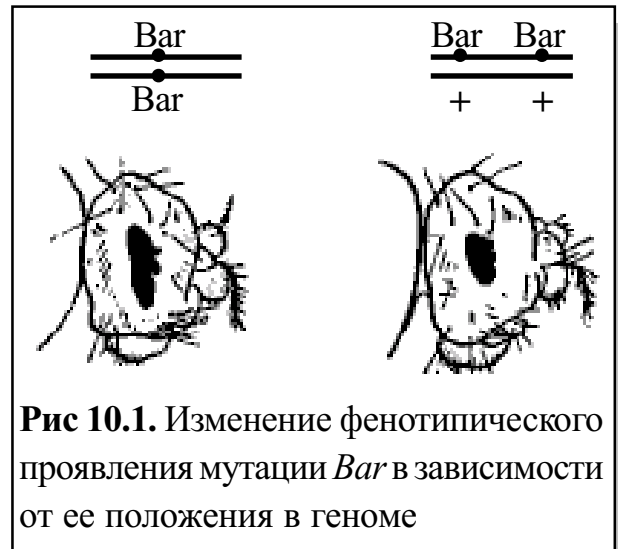
## 10. Мозаичный эффект положения гена

Изменение активности гена при изменении его положения в геноме называют эффектом положения.

В 1925 году А. Стертевант показал, что в результате неравного кроссинговера оба мутантных аллеля гена *Bar* у дрозофилы оказались в одной хромосоме (Рис. 10.1.), и это существенно повлияло на экспрессию мутантного фенотипа.

В 1980-х годах были обнаружены многочисленные примеры существенных различий в активности гена *white*, заключенного в материал транспозона, в зависимости от места встройки последнего в ту или иную часть хромосомы. Все эти примеры позиционных эффектов свидетельствуют о существенной зависимости экспрессии гена от специфического окружения.

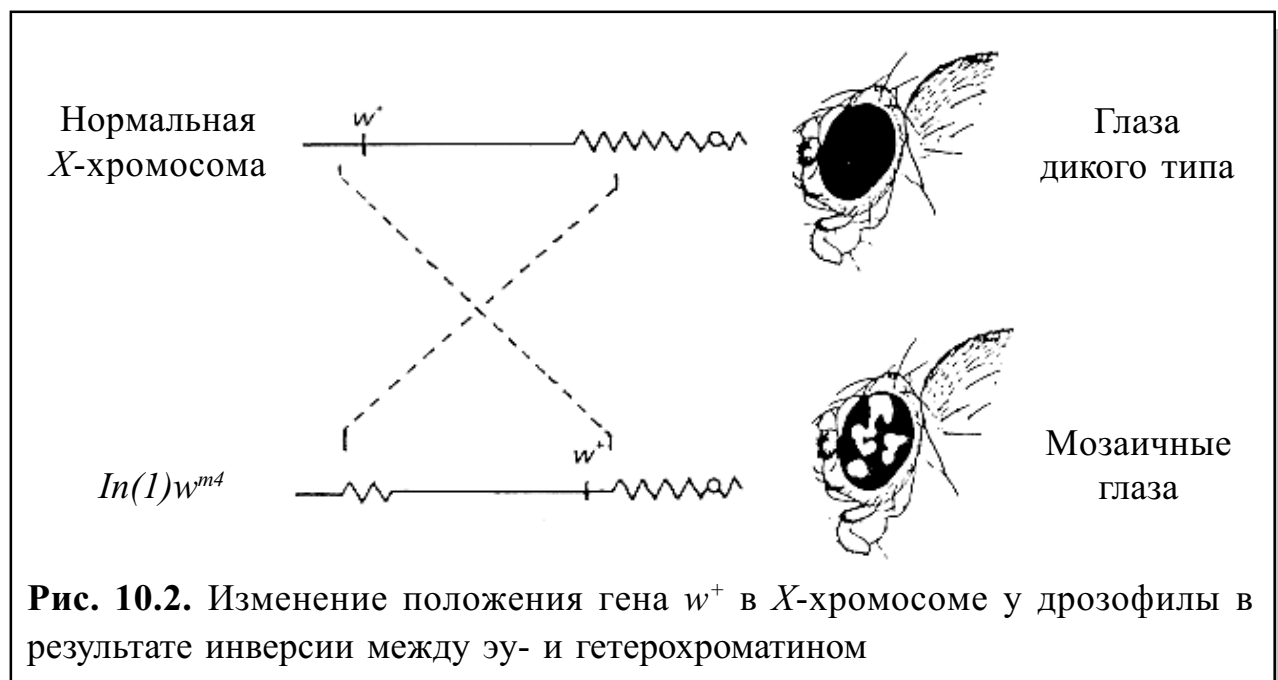
Особым случаем является эффект положения мозаичного типа. В 1930 году Г.Дж. Меллер обнаружил удивительное явление: потерю проявления



**Рис 10.1.** Изменение фенотипического проявления мутации *Bar* в зависимости от ее положения в геноме

доминантности у аллеля, расположенного в хромосомной перестройке, полученной в результате облучения, т.е. у гетерозиготы  $R(g^+)/R^+(g)$  (где  $R$  - хромосомная перестройка, а  $g$  - ген) аллель  $g^+$  не проявляется, и особь имеет мутантный  $g$ -фенотип.

Уже сам Меллер установил, что генетическая инактивация возникает, во-первых, в хромосоме с перестройкой, во-вторых, ген должен быть перенесен в окрестности прицентромерного гетерохроматина (Рис. 10.2.).



**Рис. 10.2.** Изменение положения гена  $w^+$  в  $X$ -хромосоме у дрозофилы в результате инверсии между эу- и гетерохроматином

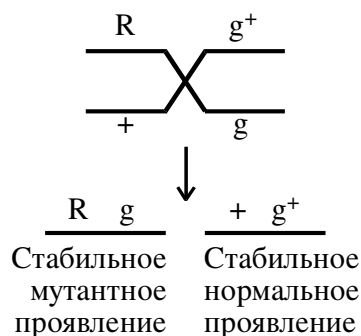
В-третьих, проявление гена мозаичное, т.е. при анализе большого числа относительно однородных клеток, например клеток, слагающих омматидии глаза и имеющих одинаковый генотип -  $R(g^+)/R^+(g)$  - в одной группе клеток проявляется мутантный аллель, в других клетках - нормальный (Рис. 10.2.).

Таким образом, эффект положения мозаичного типа можно коротко охарактеризовать следующим образом: ген инактивируется в результате переноса его в окрестности гетерохроматина, при этом в части клеток он сохраняет свою активность.

В последующие 65 лет исследователи открывали все новые и новые особенности инактивации гена при мозаичном эффекте положения. Ниже приведены наиболее интересные.

### 10.1. Структура гена при эффекте положения

Как показали Н.П. Дубинин и Б.Н. Сидоров в 1935 году, при инактивации ген не теряется а изменяется лишь состояние. С помощью кроссинговера они отделили нормальный аллель от перестройки, а следовательно, и от соседства с гетерохроматином, и ген стал стабильно формировать нормальный фенотип.



Несколько позже, в 1938 году, И.Б.Паншин получил обратные хромосомные перестройки, которые переносили ген от гетерохроматина в исходное положение в эухроматин. Активность гена также восстанавливалась.

Получение огромного числа перестроек у дрозофилы и их проверка на способность индуцировать генетическую инактивацию показали, что эффект положения мозаичного типа проявляется только в перестройках между эу- и гетерохроматином. Любой ген у дрозофилы при наличии подходящей перестройки инактивируется, т.е. может испытывать мозаичный эффект положения.

### 10.2. Распространение инактивации

У особей, в одной хромосоме которых находятся мутантные аллели нескольких близко расположенных генов (a-e), а в другой - их нормальные аллели, но перенесенные к гетерохроматину, можно зарегистрировать последовательную инактивацию нескольких генов (Рис. 10.3.).

В случае, изображенном на Рис. 10.3., в цепочке генов ( $a^+ - e^+$ ) чаще других инактивируется ген  $e^+$ , ближе расположенный к гетерохроматину, с меньшей частотой инактивированы одновременно  $d^+$  и  $e^+$ , еще с меньшей -  $c^+$ ,  $d^+$  и  $e^+$ , и т.д. Этот пример показывает, что инактивация, начавшись у точек соединения эу- и гетерохроматина, может распространяться по направлению от гетерохроматина к

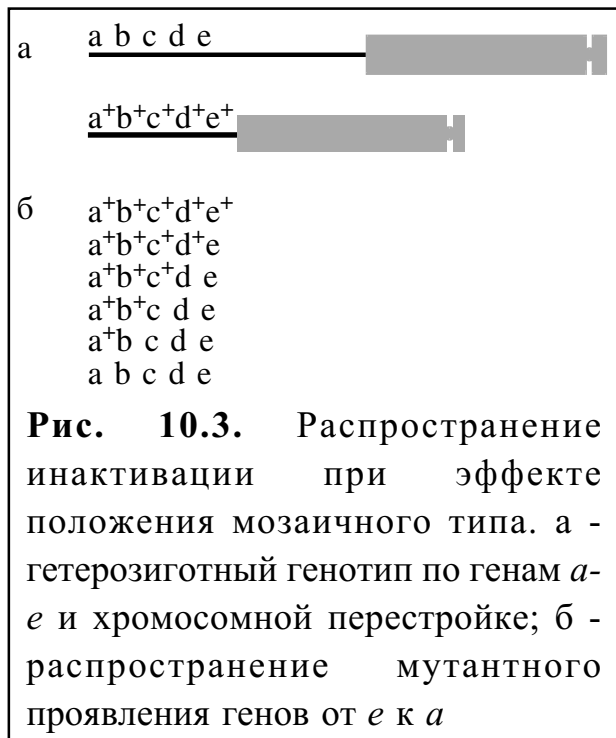
участков хромосом, перенесённых в окрестности гетерохроматина. Суть её сводится к тому, что гены инактивируются не последовательно от *e* к *a*, как это показано на Рис. 10.3., а прерывисто, например,  $e^+ d c^+ b a^+$ , или  $e d c b^+ a$  и т.д.

### 10.3. Типы мозаичности

Случайность инактивации гена, перенесенного к гетерохроматину (мозаичность) следует изучать на одинаковых группах клеток, например в сложном фасеточном глазу мухи или на ее кутикулярном покрове.

Описано два типа мозаичности в клетках глаз: секторальный и мелкопятнистый (соль-и-перец). Если в самом начале развития глаза ген  $w^+$  в системе  $R(w^+)/w$  инактивирован, такая клетка дает начало клону таких же клеток (Рис. 10.4.).

Мозаичность секторального типа может свидетельствовать о том, что инактивированное состояние гена необратимо и передается новым клеткам после каждого клеточного деления. Если гены в таких клетках инактивировались в самом конце дифференцировки глаза, возникает мозаичность типа соль-и-перец.



теломере. По мере удаления от гетерохроматина инактивация все более ослабляется. Инактивация может распространяться на очень большие расстояния. Зарегистрирован случай, когда эффект положения распространялся на расстояние до 170 дисков политенных хромосом. Если принять, что средний диск содержит около 30 т.п.н., протяженность инактивации в данном случае достигает 5000 т.п.н.

Российская исследовательница Е.С. Беляева в 1991 году открыла уникальное явление - прерывистую инактивацию



#### 10.4. Уровни инактивации гена

Долгое время обсуждали, на каком уровне происходит нарушение нормальной функции? Как уже говорили, ген при эффекте положения не повреждается. Затем было установлено, что в клетках с мутантным фенотипом уменьшено количество транскриптов с инактивируемого гена и количество белкового продукта. Значит, при эффекте положения речь идет в первую очередь об инактивации транскрипции.

При эффекте положения участок хромосомы, где расположен инактивируемый ген, испытывает компактизацию. Материал хромосомы становится плотным, сильно окрашивающимся, происходит слияние дисков в один плотный блок, начиная от точки контакта эухроматина с гетерохроматином (Рис. 10.5.). В некоторых случаях материал хромосомы компактизуется прерывисто, т.е. компактные районы чередуются с обычными районами, присущими эухроматиновым частям политеменных хромосом дрозофилы (см. выше).

Компактные районы, прежде эухроматиновые, приобретают ряд свойств, характерных для гетерохроматина: районы хромосом становятся позднепликующимися. Они вступают в эктопические контакты. В компактных районах политеменных хромосом ДНК недопредставлена так же как и в прицентромерном гетерохроматине. В блоках компактного гетерохроматина выявляется белок HP-1, являющийся структурным компонентом гетерохроматина.

Температурно-чувствительный период компактизации приходится на самое начало эмбрионной жизни, т.е. на то время, когда в хромосомах начинает выявляться гетерохроматин. Процесс компактизации имеет два свойства, присущие собственно генетической инактивации при эффекте положения:

а. компактизация мозаична, т.е. в одной клетке участок хромосомы находится в компактном состоянии, в соседней клетке район обнаруживает структуру эухроматина.



**Рис. 10.5.** Формирование блока компактного хроматина в проксимальной, контактирующей с гетерохроматином, части дупликации (Из: Жимулев, 1993, стр. 347)

б. Компактизация распространяется вдоль по хромосоме (см. Рис. 10.5.).

### 10.5. Модификаторы эффекта положения

Низкая температура (14-18°C в сравнении с нормальной 25°C, при которой проходит развитие дрозофил) резко усиливает генетическую инактивацию, что выражается как в увеличении размеров секторов неокрашенных фасеток, так и в увеличении протяженности генетической инактивации (Рис. 10.6.).

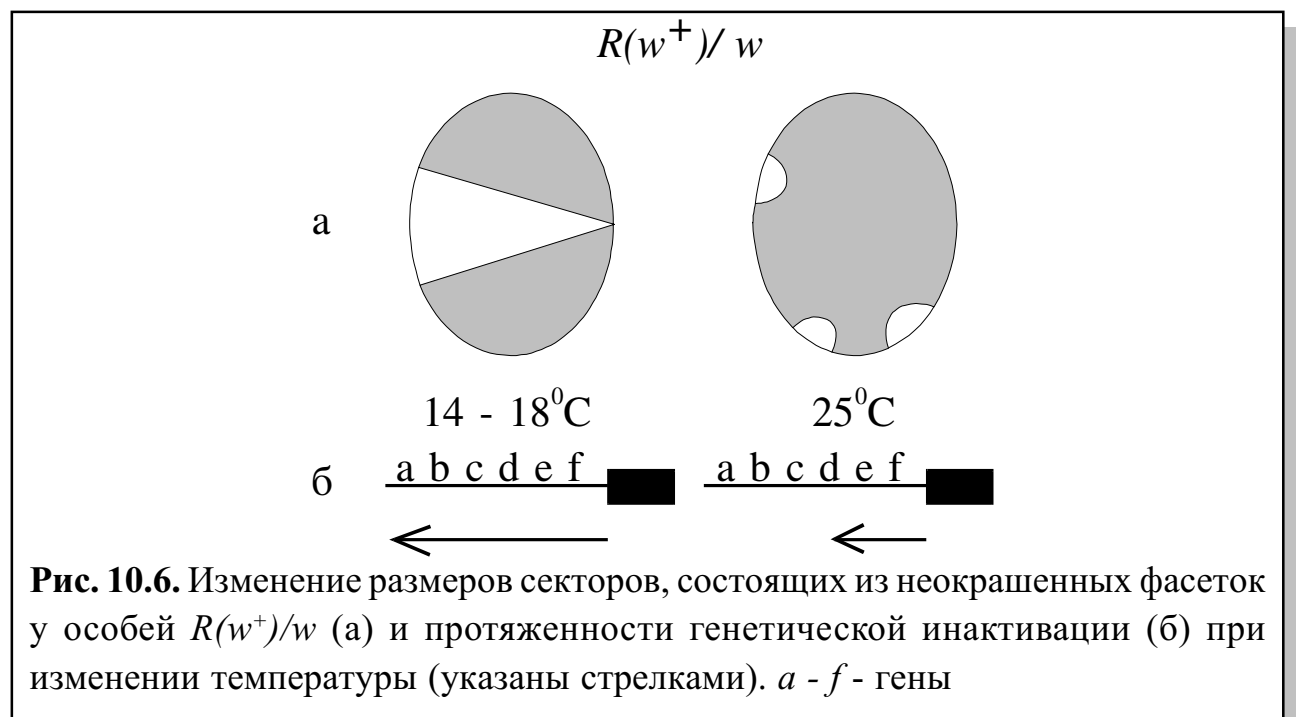
Изменение количества гетерохроматина в геноме оказывает существенное влияние на проявление эффекта положения. Легче всего варьировать количеством гетерохроматина *Y*-хромосомы. Во-первых, потому, что это самый большой гетерохроматиновый блок в геноме, а во-вторых, ее легко вводить и удалять с помощью обычных скрещиваний (Рис. 10.7.).

При удалении *Y*-хромосомы (у самцов *X0*) генетическая инактивация резко усиливается. Добавление дополнительного гетерохроматина ослабляет инактивацию.

Варьирование *Y*-хромосомой является сильнейшим модификатором эффекта положения.

Генетические модификаторы - это гены, мутации которых могут приводить к усилению или ослаблению генетической инактивации.

Используют следующую схему получения доминантных усилителей (энхансеров - enhancers - *En*) и ослабителей (супрессоров - suppressors - *Su*) (Рис. 10.8.). Для экспериментов берут линию с перестройкой, в которой эффект положения проявляется не очень сильно например, *In(1)w<sup>md</sup>*, и сектор *w* в глазу не очень большой, и подвергают ее действию сильных мутагенов. Если индуцируется энхансерная мутация, неокрашенный сектор резко увеличивается в размерах. При

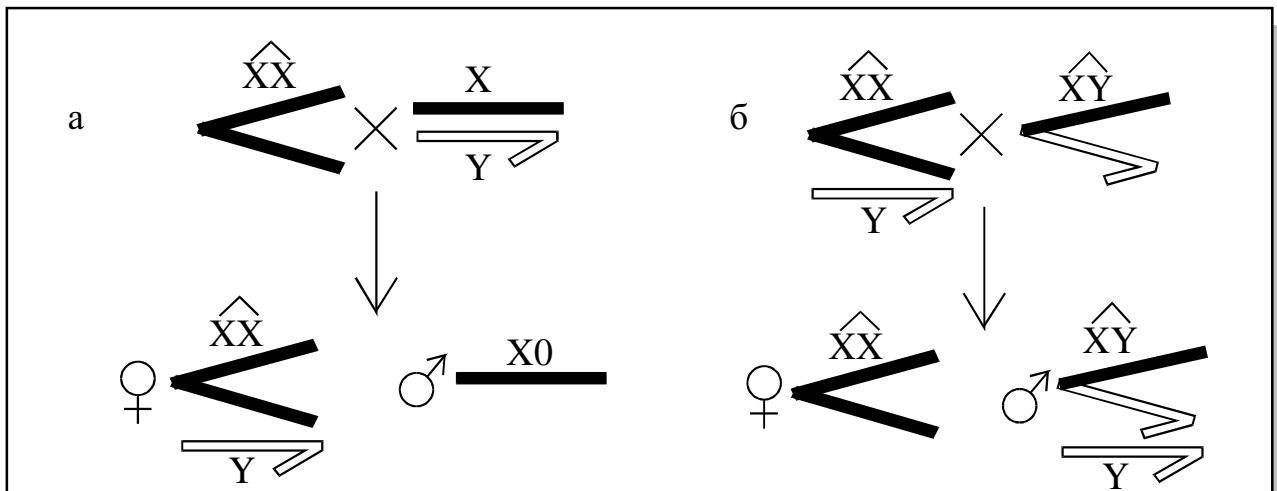


индукции супрессорной мутации сектор из неокрашенных фасеток существенно уменьшается.

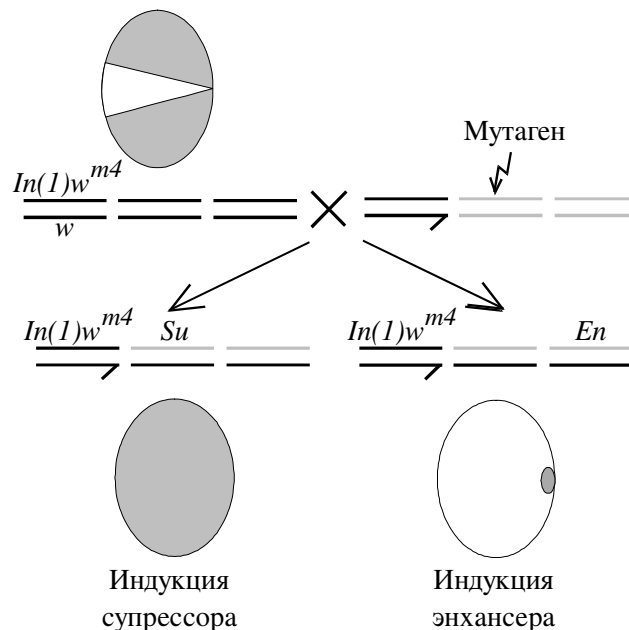
К настоящему времени обнаружены несколько десятков генов-модификаторов эффекта положения, при этом генов-супрессоров в несколько раз больше, чем энхансеров.

Модификаторы эффекта положения изменяют проявление степени

компактности инактивированного участка эухроматина: низкая температура, удаление гетерохроматина, действие генетических энхансеров резко усиливают как частоту встречаемости клеток с компактизованными участками хромосом, так и протяженность компактизации. Высокая температура, добавление гетерохроматина и действие генетических супрессоров эффекта



**Рис. 10.7.** Схемы скрещиваний, позволяющие получать самцов, не имеющих Y-хромосомы (X0) (а), и имеющих 2 Y-хромосомы (б)



**Рис. 10.8.** Схема скрещивания для получения энхансеров и супрессоров эффекта положения

положения действуют в противоположном направлении.

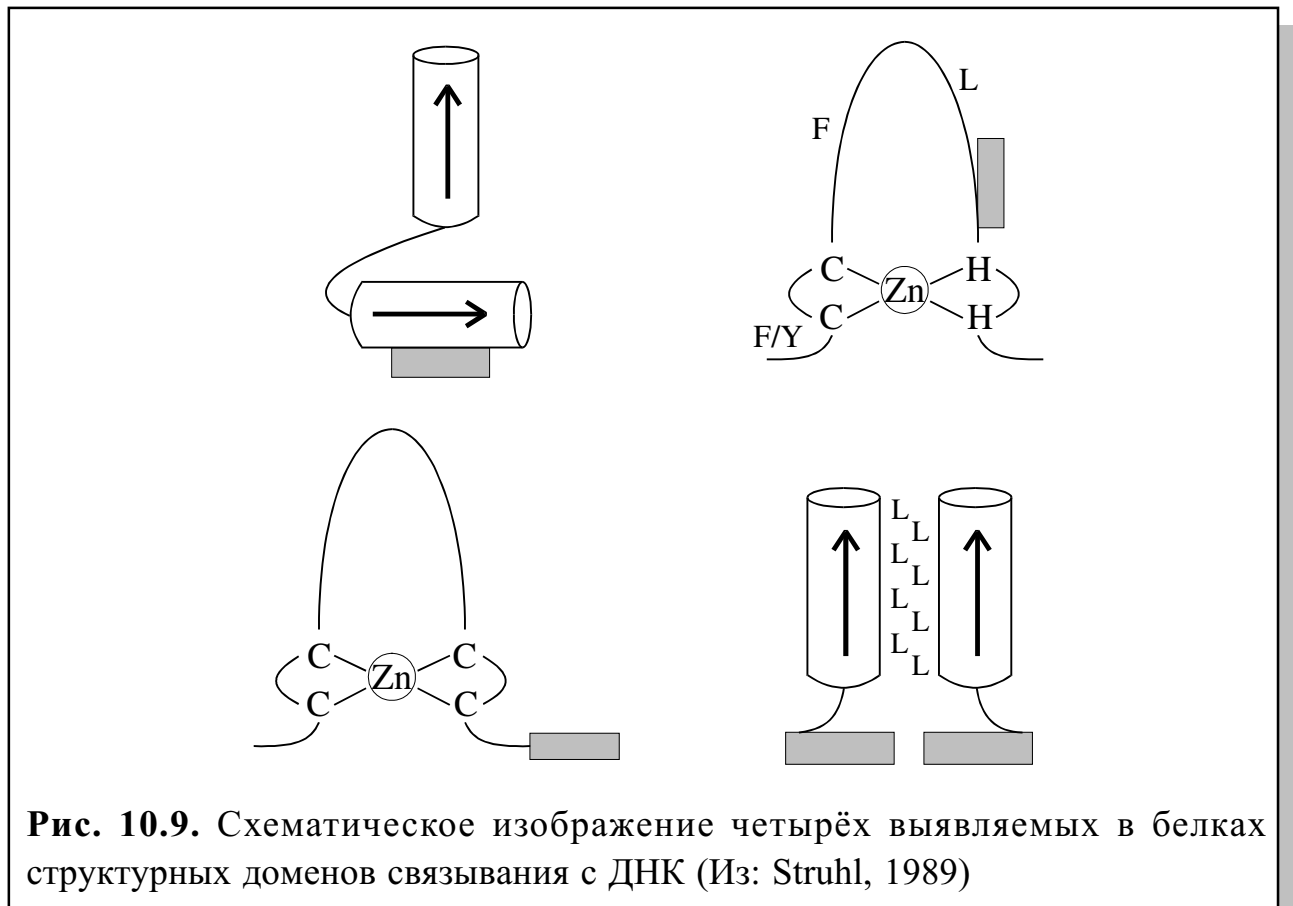
После клонирования ДНК генов-модификаторов, получения антител на кодируемые ими белки и картирования локализации этих антител в клетках, выяснилось, что эти гены кодируют белки хромосом.

Клонирован ген *Su-var(2)205*. Он кодирует белок HP1, входящий в состав гетерохроматина. Поскольку основной характеристикой гетерохроматина является его компактное состояние, можно предположить, что основная функция белка HP1 является компактизирующей.

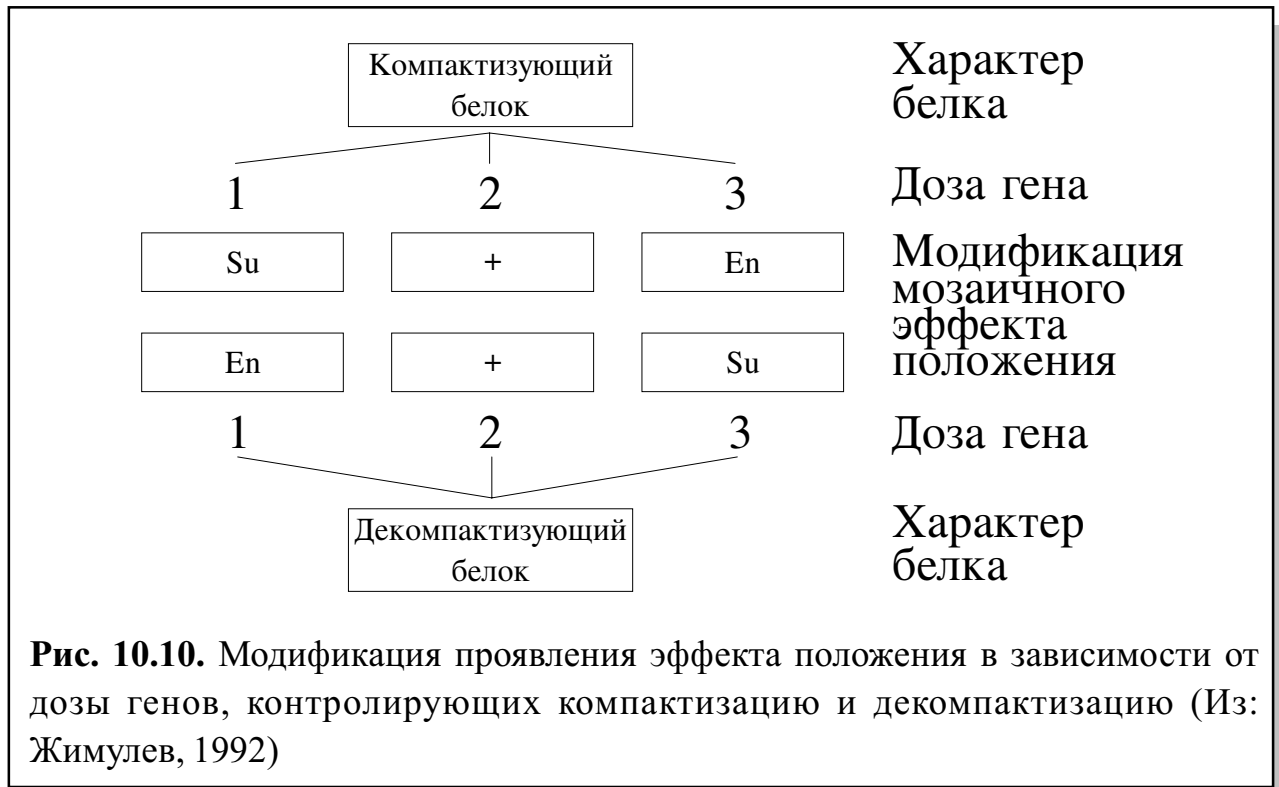
Другой ген - *Su-var(3)7* - кодирует белок, который также выявляется в гетерохроматине. Особенностью этого белка является то, что он имеет семь доменов связывания с ДНК (цинковые пальцы).

Известно несколько типов доменов связывания белков с ДНК (Рис. 10.9.). (См. детали в Lewin, 1994, pp. 886-907, Struhl, 1989, Reuter, Spierer, 1992).

В результате изучения энхансеров и супрессоров выяснилось, что один и тот же ген может быть и энхансером и супрессором. Все зависит от дозы гена. Легче всего это можно объяснить, если допустить существование белков, компактизирующих и декомпактизирующих материал хромосомы (Рис. 10.10.). Уменьшение дозы молекул белков-компактизаторов до одной должно приводить к ослаблению компактизации участка хромосомы и усилению активности гена: в результате происходит супрессия эффекта положения. Эти же белковые молекулы в трех дозах будут сильнее компактизовать хроматин и, следовательно, усиливать эффект





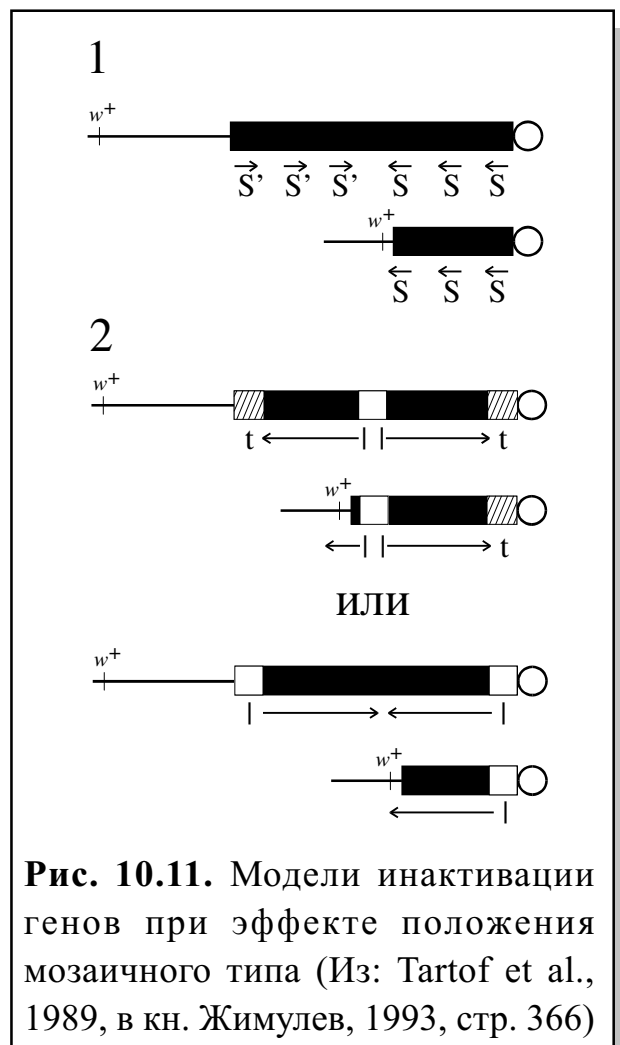


**Рис. 10.10.** Модификация проявления эффекта положения в зависимости от дозы генов, контролирующих компактизацию и декомпактизацию (Из: Жимулев, 1992)

положения. Аналогичные рассуждения можно привести о белках-декомпактизаторах хроматина (см. Рис. 10.10.).

Почему при перенесении гена в гетерохроматин происходит компактизация участка хромосомы и, как следствие, инактивация гена? Наиболее разумными кажутся гипотезы К. Тартофа и его коллег (Рис. 10.11.).

Модель 1 - блок гетерохроматина состоит из последовательностей ДНК, которые и являются собственно гетерохроматиновыми. При перенесении к ним гена, например  $w^+$ , он может вовлекаться в компактизацию вместе с гетерохроматином. Однако, по мнению авторов эта модель не даёт объяснения того, каким образом инактивация распространяется на большие расстояния в несколько десятков дисков политенных хромосом.



**Рис. 10.11.** Модели инактивации генов при эффекте положения мозаичного типа (Из: Tartof et al., 1989, в кн. Жимулев, 1993, стр. 366)

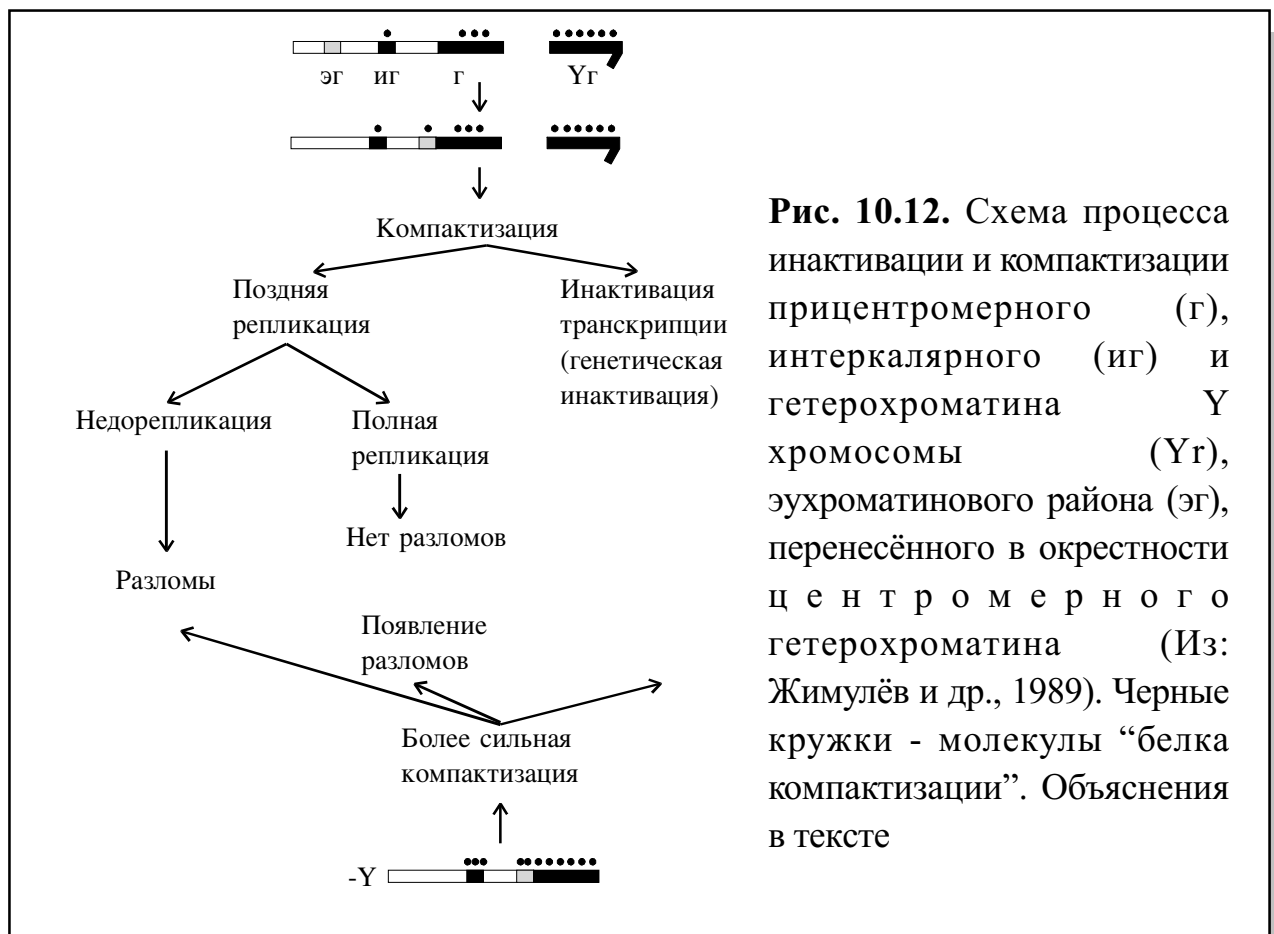
Альтернативной является модель 2. По этой модели должны быть определены края гетерохроматиновых доменов. Они могут начинаться с сайтов инициации (I), а заканчиваться сайтами терминации (t). Вся ДНК, заключённая между этими сайтами, с необходимостью компактизуется и, таким образом, участок хромосомы гетерохроматизируется. Одним из вариантов этой модели является отсутствие терминаторов, если сайты инициации ориентированы навстречу друг другу (рис. 10.11.). Согласно этой модели генетическая инактивация при эффекте положения объясняется довольно просто: хромосомная перестройка разрывает домен и переносит ген в сферу действия инициации. Компактизация, начавшись с

инициатора, переходит и на эухроматиновую часть хромосомы.

Каким образом влияет на инактивацию генов и на компактизацию районов хромосом варьирование количества гетерохроматина в ядре?

Компактизирующие белки играют существенную роль в упаковке материала гетерохроматина (Рис. 10.12.).

При удалении из генома Y-хромосомы (т.е. значительной части гетерохроматина) “белки компактизации”, не имеющие теперь адекватного количества гетерохроматина для связывания, более плотно упаковывают оставшийся прицентромерный гетерохроматин и соответственно присоединённый к нему участок эухроматина. Аналогичным образом при удалении Y-



**Рис. 10.12.** Схема процесса инактивации и компактизации прицентромерного (г), интеркалярного (иг) и гетерохроматина Y хромосомы (Yr), эухроматинового района (эг), перенесённого в окрестности центрального гетерохроматина (Из: Жимулёв и др., 1989). Черные кружки - молекулы “белка компактизации”. Объяснения в тексте

хромосомы более плотным становится и интеркалярный гетерохроматин, что ведёт к задержке репликации и, как следствие, - к усилению ломкости интеркалярного гетерохроматина.

Резюме из исследований эффекта положения мозаичного типа:

1. В основе особой структуры гетерохроматина действительно лежит более плотная компактизация, которая инициируется в особых центрах гетерохроматина и распространяется при участии особых компактизирующих белков. Сила компактизации, исходящая от гетерохроматина, столь велика, что распространяется и на эухроматин, когда он переносится в окрестности гетерохроматина.

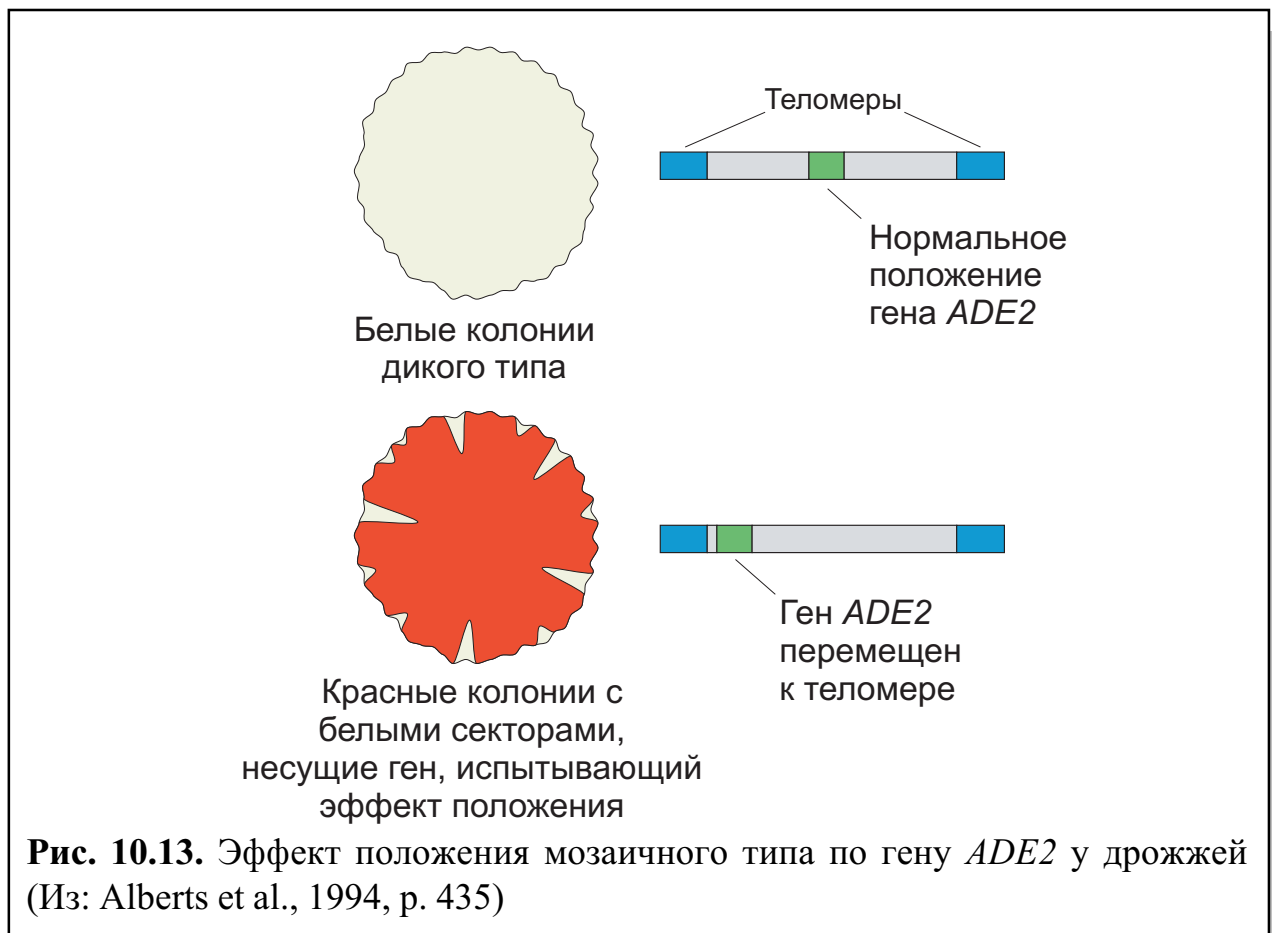
2. Явление мозаичного эффекта положения представляет собой замечательную модель для изучения действия белков, изменяющих состояние компактизации хроматина. Изучение модификаторов эффекта положения позволяет провести генетическую диссекцию компонентов хроматина.

Эффект положения мозаичного типа обнаружен у ряда других объектов. Лучше всего он изучен у дрожжей. Ген *ADE2* нормально экспрессируется во всех клетках, когда он располагается в нормальном положении в средней части хромосомы. Эти клетки образуют колонии белого цвета (Рис. 10.13.). Если ген *ADE2* инактивируется, блокируется путь биосинтеза аденина, что, в свою очередь приводит к накоплению красного пигмента. Образуется колония, состоящая из красных клеток.

Инактивация гена *ADE2* происходит при перемещении его в окрестности теломерного гетерохроматина. Белые секторы по краям красной колонии представляют клоны клеток, в которых произошла спонтанная реактивация гена *ADE2*. Инактивация гена произошла несмотря на наличие в клетках всех белков, необходимых для активирования гена. ДНК около теломерных концов дрожжевой хромосомы упакована в особенно недоступную для белков форму хроматина. И этот процесс образования особой упаковки, ответственной за поддержание транслоцированного гена *ADE2* в неактивном состоянии, называется сайленсингом (silencing). Находки таких секторов указывают что как активное, так и неактивное состояния *ADE2*, наследуются.

### **Литература**

- Жимулев И.Ф. Явление эффекта положения и исследования В.В. Хвостовой. В книге: Эффект положения гена в исследованиях В.В. Хвостовой. Новосибирск, Издательство Института цитологии и генетики СО РАН, стр. 5-22, 1992.
- Жимулев И.Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск, Наука, 1-490, 1993.
- Жимулёв И.Ф., Беляева Е.С., Мальцева Н.И., Большаков В.Н. Изменения проявления свойств интеркалярного гетерохроматина у *Drosophila melanogaster* под влиянием модификаторов эффекта



положения. Генетика т. 25, N9, 1589-1598, 1989.

Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. Москва, Мир, Том. 2, стр. 287-301, 1994.

Lewin B. Genes V. Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press, 1-1272, 1994.

Reuter G., Spierer P. Position effect variegation and chromatin proteins. BioEssays 14, N9, 605-612, 1992.

Struhl K. Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins. TIBS 14, April, pp. 137-140, 1989.

Zhimulev I.F. Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect variegation. Advances in Genetics, 37, 1-555, 1997.