

---

**Глава 12. Политенные хромосомы**

<b>12.1. Общие положения</b>	<b>2</b>
<b>12.2. Морфологические характеристики политенных хромосом</b>	<b>4</b>
<b>12.3. Встречаемость политенных хромосом в природе</b>	<b>7</b>
<b>12.4. Многонитчатость политенных хромосом</b>	<b>7</b>
<b>12.5. Синапсис и асинапсис гомологов</b>	<b>9</b>
<b>12.6. Хромомерный рисунок в политенных хромосомах</b>	<b>9</b>
<b>12.7. Особенности политении</b>	<b>13</b>
<b>12.8. Архитектоника ядра</b>	<b>14</b>
<b>12.9. Генетическая организация морфологических структур политенных хромосом</b>	<b>14</b>
<b>12.9.1. Диски</b>	<b>14</b>
<b>12.9.2. Междиски</b>	<b>17</b>
<b>12.9.3. Пуфы</b>	<b>18</b>
<b>12.10. Гормональный контроль пуфов</b>	<b>20</b>
<b>12.11. Пуфы теплового шока</b>	<b>25</b>
<b>12.12. ДНК-пуфы</b>	<b>26</b>
<b>12.13. Кольца Бальбиани</b>	<b>26</b>
<b>12.14. Ядрышки</b>	<b>26</b>
<b>12.15. Прицентромерный гетерохроматин в политенных хромосомах</b>	<b>26</b>
<b>12.16. Теломерный гетерохроматин в политенных хромосомах</b>	<b>26</b>
<b>12.17. Интеркалярный гетерохроматин в политенных хромосомах</b>	<b>26</b>
<b>12.18. Репликация ДНК в политенных хромосомах</b>	<b>26</b>
<b>12.19. Использование политенных хромосом в генетическом анализе</b>	<b>26</b>

## 12. Политенные хромосомы

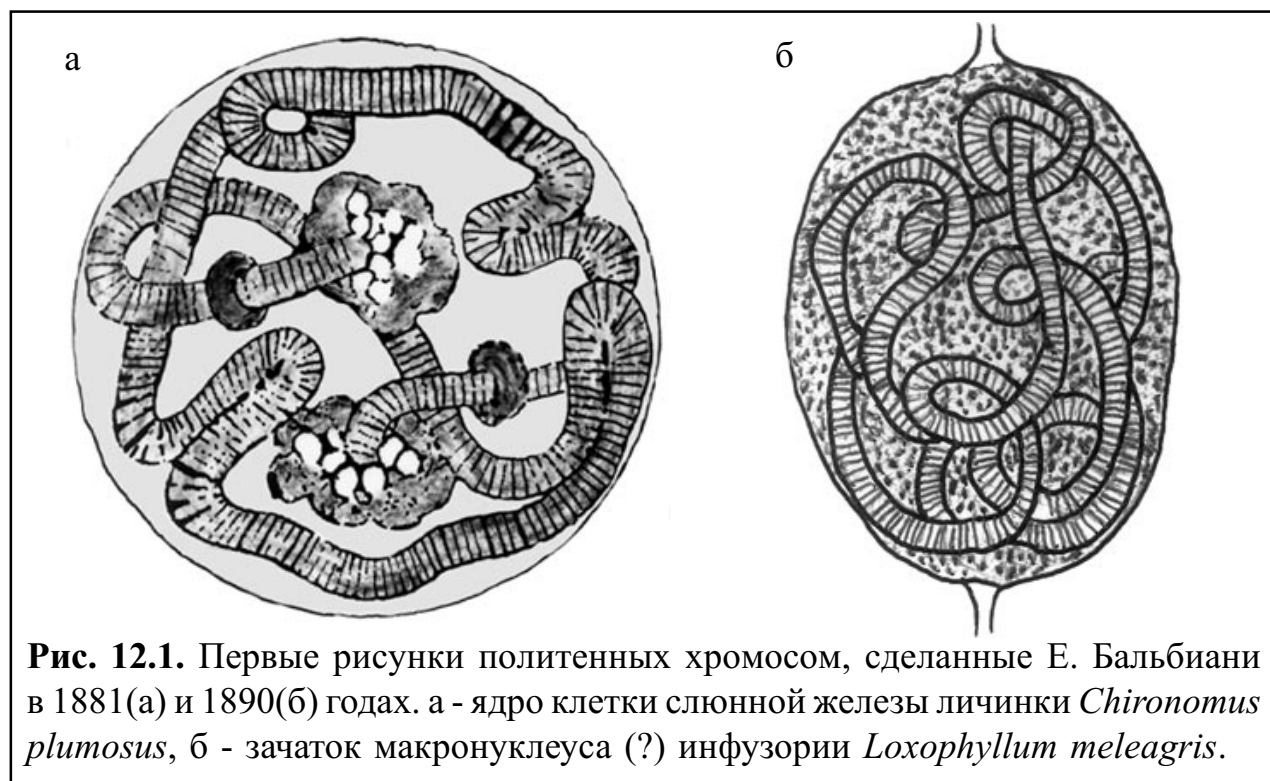
### 12.1. Общие положения

Политенные хромосомы были открыты Е. Бальбиани (E. Balbiani) в 1881 году в клетках слюнных желез, Мальпигиевых сосудов, кишечника, гиподермы и мышц личинок *Chironomus plumosus*. Они были описаны как длинные цилиндрические шнуры, которые многократно изгибаясь заполняют весь объем ядра. Шнуры эти были названы “перманентной спиремой”, поскольку, по мнению автора, в каждом ядре был только один такой шнур и он напоминал слегка закрученную спиральную нить - спирему. Девять лет спустя, в 1890 году Е. Бальбиани открыл перманентную спирему в развивающемся зачатке макронуклеуса инфузории *Loxophyllum meleagris* (Рис. 12.1.).

В 1933-1934 гг. три группы исследователей: Т. Пайнтер, Э.Хайц и

Х. Бауэр, Р. Кинг и Х. Бимс (T. Painter, E. Heitz and H. Bauer, R. King and H. Beams), используя метод давленных препаратов, показали, что “спирема” не является сплошным одиночным шнуром, а состоит из отдельных элементов, число которых было близким к гаплоидному числу митотических хромосом. По мнению этих исследователей, каждый элемент “спиремы” является результатом плотного синапсиса гомологичных хромосом.

О том, что спирема имеет непосредственное отношение к обычным митотическим хромосомам впервые предположил Ф. Рамбоусек (F. Rambousek) в 1912 году, затем Д. Костов в 1930, Н.К. Кольцов в 1934 и Х. Бауэр - в 1935. Важнейшие доказательства в пользу хромосомной природы спиремы получил Т. Пайнтер в середине 1930-х годов. Используя серию хромосомных перестроек с точками разрывов в известных районах



**Рис. 12.1.** Первые рисунки политенных хромосом, сделанные Е. Бальбиани в 1881(а) и 1890(б) годах. а - ядро клетки слюнной железы личинки *Chironomus plumosus*, б - зачаток макронуклеуса (?) инфузории *Loxophyllum meleagris*.

хромосом он прокартировал 22 гена и продемонстрировал полное линейное соответствие между их расположением на генетической карте, а так же на цитологических картах митотических хромосом и спиремы. Гигантские размеры хромосом слюнных желез согласно гипотезе Н.К. Кольцова объяснялись их многонитчатостью. Термин “политенные хромосомы” был предложен П. Коллером (P. Koller) в 1935 году и был принят по рекомендации К. Дарлингтона (C. Darlington) в 1937 году.

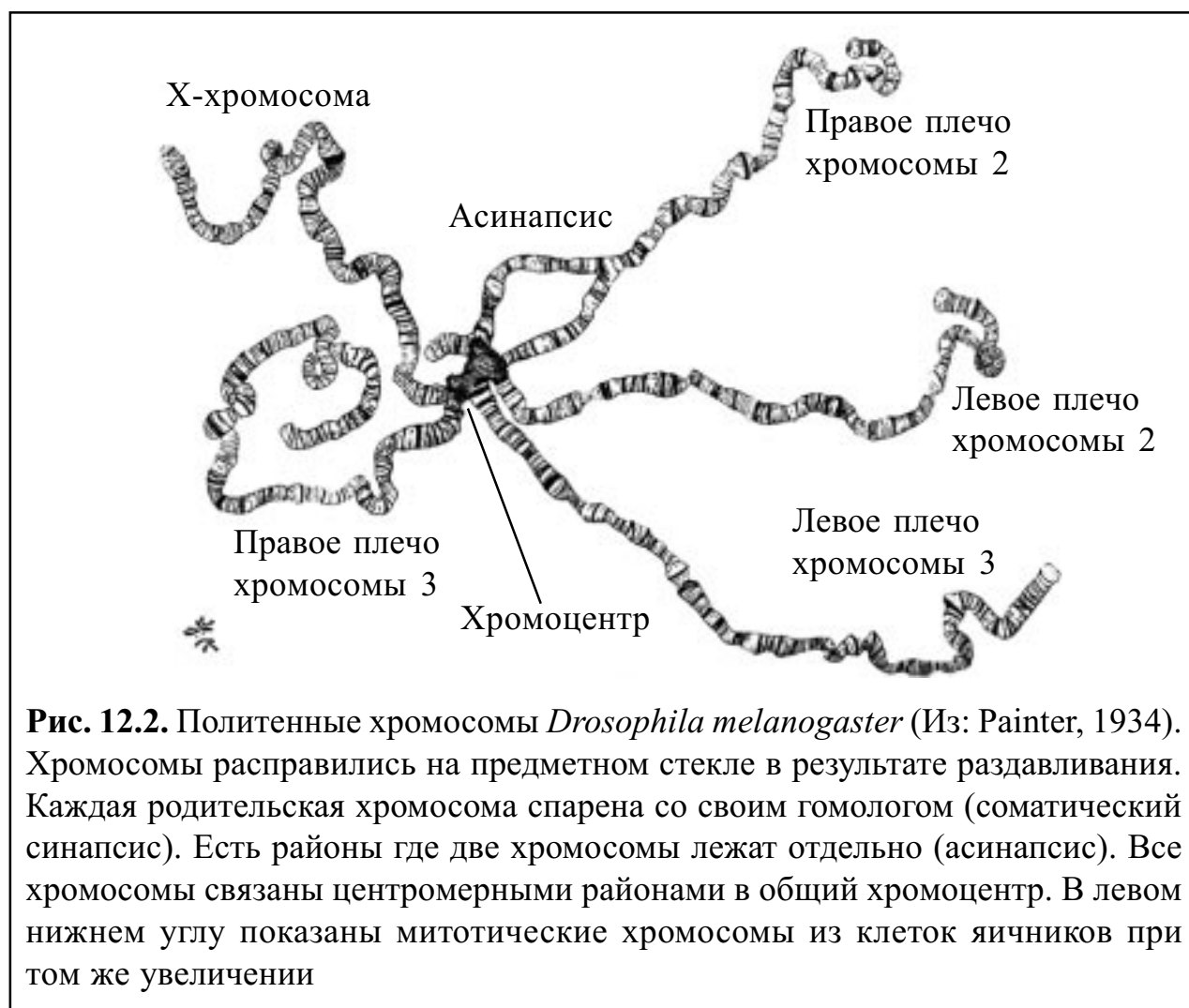
Итак, политенные хромосомы имеют следующие характерные особенности: 1. Это интерфазные хромосомы, т.е. максимально декомпактизованные и

находящиеся в состоянии, когда гены имеют максимальные возможности для экспрессии. Это активно функционирующие хромосомы.

2. Они имеют гигантские размеры, т.к. они состоят из тысяч гомологичных нитей - хроматид.

3. Эти хромосомы имеют характерный рисунок поперечной исчерченности - рисунок хромомеров (Рис. 12.2.).

4. Число хромосомных элементов в ядрах с политенными хромосомами чаще всего гаплоидное, т.к. гомологичные хромосомы каждой пары тесно конъюгируют друг с другом, в результате чего общее число хромосом уменьшается вдвое.



**Рис. 12.2.** Политенные хромосомы *Drosophila melanogaster* (Из: Painter, 1934). Хромосомы расправились на предметном стекле в результате раздавливания. Каждая родительская хромосома спарена со своим гомологом (соматический синапсис). Есть районы где две хромосомы лежат отдельно (асинапсис). Все хромосомы связаны центромерными районами в общий хромоцентр. В левом нижнем углу показаны митотические хромосомы из клеток яичников при том же увеличении

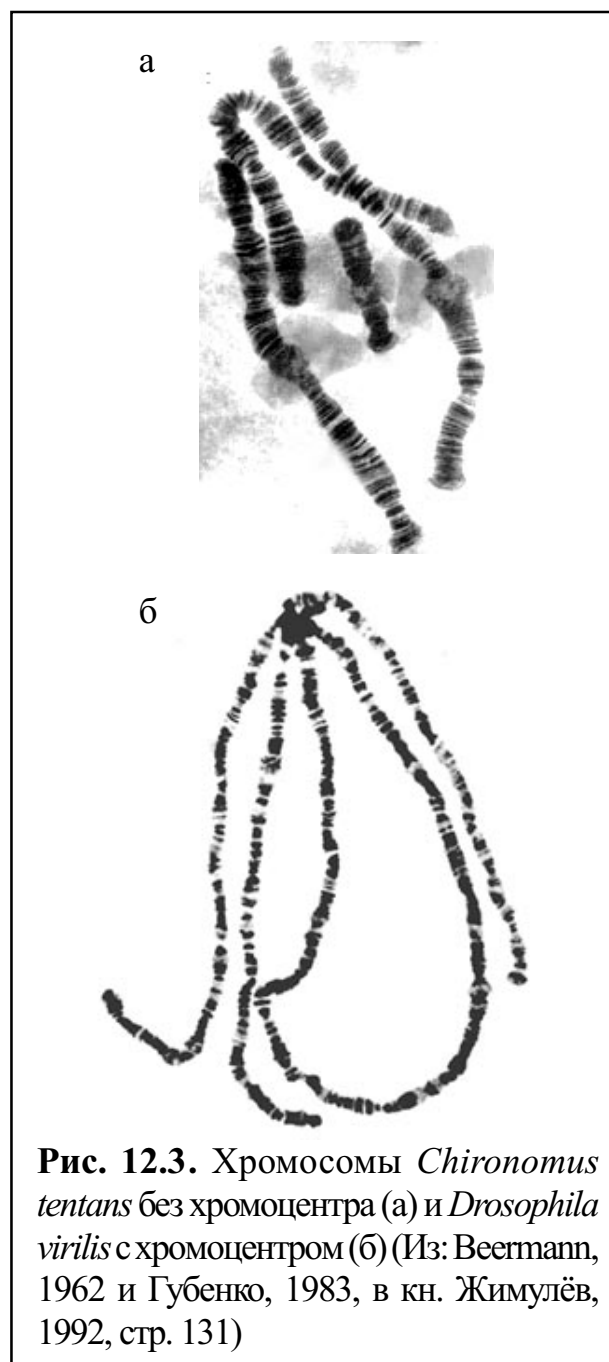
## 12.2. Морфология политенных хромосом

Политенные хромосомы изучают на давленных препаратах: слюнные железы личинок (чаще всего) или других органов фиксируют в кислых фиксаторах, красят в кислотном растворе орсеина или кармина и затем раздавливают между предметным и покровным стеклами. Хромосомы при этом расправляются.

Выделяют два типа расположения хромосом в ядре: независимое друг от друга и связанное: с объединением прицентромерных районов всех хромосом в общий хромоцентр (Рис. 12.3.).

Какой-либо эволюционной связи между видовой принадлежностью и наличием или отсутствием хромоцентра не обнаружено.

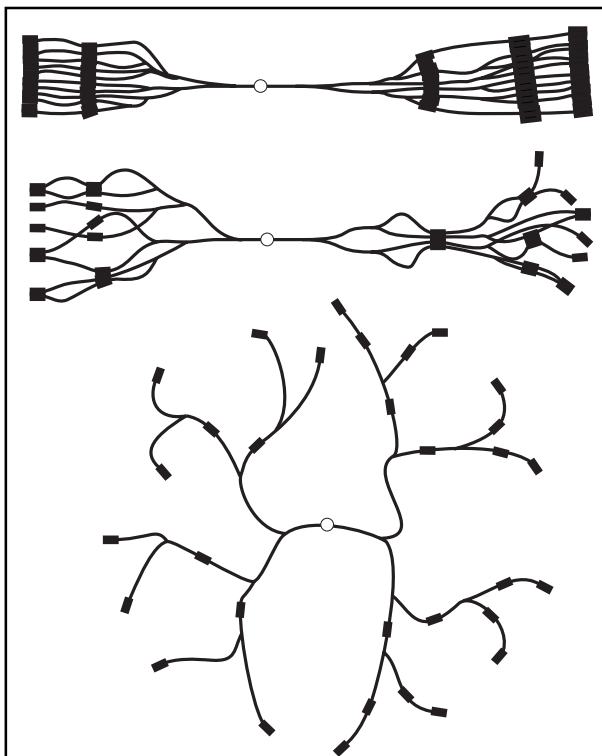
Морфология политенных хромосом может широко варьировать в зависимости от степени синапсиса хроматид. Политенные хромосомы развиваются из хромосом диплоидных ядер за счет последовательных дупликаций каждого хромосомного элемента. Если конъюгация гомологичных хроматид максимальна, образуются “классические” политенные хромосомы, т.е. цилиндрические жгуты с отчетливым рисунком дисков, такие как были описаны у *Chironomus tentans* или *Drosophila melanogaster* (Рис. 12.3.). Если степень конъюгации хроматид минимальна, образуется полиплоидное ядро с ретикулярной структурой. Это так называемая скрытая политения (Рис. 12.4.). В некоторых случаях конъюгация хроматид нарушается очень сильно, но только в некоторых



**Рис. 12.3.** Хромосомы *Chironomus tentans* без хромоцентра (а) и *Drosophila virilis* с хромоцентром (б) (Из: Veermann, 1962 и Губенко, 1983, в кн. Жимулёв, 1992, стр. 131)

хромосомах из всего набора. Эти хромосомы затем полностью утрачивают рисунок дисков, становятся диффузными, как “помпоны” (Рис. 12.4.).

Как “классические”, так и скрытые политенные хромосомы должны рассматриваться в единстве. Существует огромная литература о возможностях переходов из одной формы политении в другую. Рассмотрим некоторые примеры:



**Рис.12.4.** Степень конъюгации и расположение хроматид в политенных хромосомах классического типа (а), при скрытой политении (б) и в “помпоно”-подобных хромосомах (в). Индивидуальные хроматиды с хромомерами, обозначенными черными прямоугольниками, плотно контактируют друг с другом, при этом хромомеры формируют диски (а). Хроматиды контактируют друг с другом только в некоторых участках, формируя структуру наподобие метлы (б). Конъюгация хроматид нарушена полностью, формируется “помпон” (в). Кружком помечен центромерный район

1. В питающих клетках ооцитов взрослых мух-представителей большинства семейств отряда Diptera классические политенные хромосомы не образуются. Однако, у некоторых видов, например, у комаров рода *Anopheles* политенные хромосомы имеют наиболее четкий рисунок дисков именно в

питающих клетках. У дрозофил классические политенные хромосомы в питающих клетках образуются только у мутантов, при этом четкость рисунка дисков увеличивается при понижении температуры и введении в геном дополнительного гетерохроматина (Y-хромосомы). Классические политенные хромосомы в питающих клетках ооцитов *D. melanogaster* формируются у мутантов *otu* (*ovarian tumor*) и *fs(2)B*. И совсем поразительные результаты были получены в результате генетических экспериментов на мясной мухе *Calliphora erythrocephala*. После 14 поколений тесного инбридинга с отбором на улучшение “качества” хромосом были получены две сублинии с четким рисунком дисков. После скрещивания этих линий между собой классические политенные хромосомы полностью исчезают (Рис. 12.5.), т.е. хроматиды полностью теряют конъюгационные способности.

2. Помпоноподобные X-хромосомы у дрозофилы образуются в результате мутаций, т.е. при нормальной конъюгации хроматид формируется классическая политенная хромосома, а у мутантов - “помпон”. Многочисленные случаи переходов от классических хромосом к помпоноподобным известны у многих видов как результат различных физиологических нарушений, например, мутаций, инкубаций *in vitro* или *in vivo*, а также инфекций.

3. У родственных видов ногохвосток (отряд Collembola) обнаружено варьирование структуры политенных хромосом: у одного вида, *Pseudachorutes palmiensis*, все ядро заполнено помпоноподобными хромосомами, у которых конъюгация хроматид

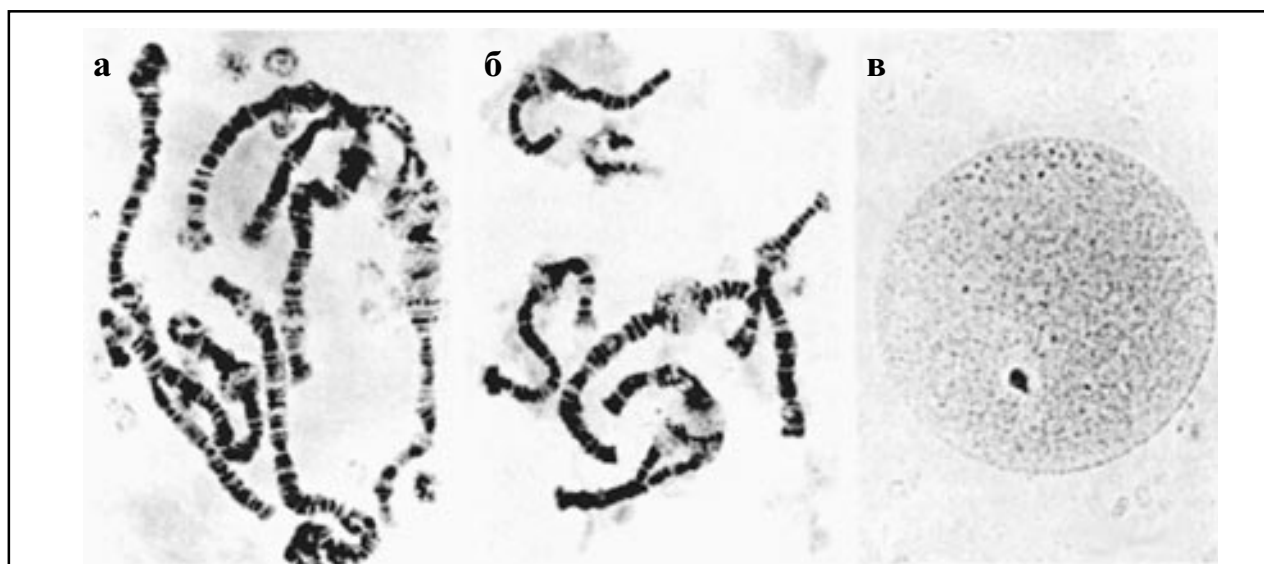
сохраняется лишь в области блоков прицентромерного гетерохроматина. У другого вида, *Protachorutes*, конъюгацию сохраняют хроматиды в прицентромерных и проксимальных частях хромосом, более удаленные участки хроматид расконъюгированы.

4. Особенно интересным является обнаружение зависимости конъюгации хроматид от температуры.

С середины 1930-х годов известно, что более четкая картина дисков получается, если все процедуры (выращивание личинок для опыта, температура фиксатора и физраствора) проводятся при низких температурах. Еще более сильное влияние температуры на морфологию политенных хромосом было обнаружено в опытах с фасолью. У растений давно известны политенные хромосомы, образующиеся в различных типах клеток, однако это хромосомы без рисунка дисков (скрытая политения). Такой тип хромосом возникает если выращивать растения при температуре

22°C. Если изменить температурный режим (8°C ночью и 12°C - днем), политенные хромосомы приобретают четкий рисунок дисков.

В общем морфология политенных хромосом у самок и самцов одинакова. Однако, у самцов дрозофилы X-хромосома имеет отличия: она более разрыхлена, слабее окрашивается и площадь ее почти такая же как у двух X-хромосом самок. Количество негистоновых белков в X-хромосоме самца примерно в полтора раза выше, чем в одной хромосоме самки. X-хромосома самца синтезирует вдвое больше РНК, чем X-хромосома самки. Это явление называется дозой компенсации (см. детали в разд. 13.). Гены *Sxl*, *mle* и *msl* играют главную роль в создании особой морфологии X-хромосомы самца. Белки, кодируемые генами группы *msl*, в сочетании с особой ацетилированной формой гистона H4, разрыхляют X-хромосому самца.



**Рис. 12.5.** Возникновение ретикулярной структуры (в) в ядрах питающих клеток ооцитов у *Calliphora erythrocephala* в результате скрещивания двух инбредных (а, б) линий с классическими политенными хромосомами (Из: Ribbert, 1979, в кн. Zhimulev, 1996, p. 56)

### 12.3. Встречаемость политенных хромосом в природе

С учетом данных о классической и скрытой политении ниже приведены сведения о распространении политенных хромосом в природе (Табл. 12.1.) (см. след. стр.).

### 12.4. Многонитчатость политенных хромосом

Предположение о многонитчатости только что открытых гигантских хромосом, высказанное Н.К. Кольцовым в 1934 году, вскоре получило многочисленные экспериментальные подтверждения. К настоящему времени имеются многочисленные и разнообразные доказательства того, что хромосомы этого типа являются пучком индивидуальных нитей - хроматид.

Самым простым доказательством политенности хромосом является, по-видимому, измерение количества ДНК в ядрах с политенными хромосомами и отнесение этого количества к содержанию ДНК в обычном диплоидном или гаплоидном ядре. Это отношение будет характеризовать степень плоидности (политенности) хромосом в данном типе клеток на данной стадии развития. Для этого чаще всего используют методики цитофотометрии или спектрофотометрии. Использование этих методов основано на измерении поглощения света определенной длины волны при прохождении через окрашенный или неокрашенный препарат.

Сведения о степени политенизации ДНК в клетках некоторых типов представлены в Табл. 12.2.

**Табл. 12.2.** Степени политении в клетках некоторых типов (Из: Жимулев, 1992, стр. 175-178)

Вид	Орган	Степень политении (n)
<i>Chironomus plumosus</i> <i>Ch. tentans</i> <i>Drosophila melanogaster</i>	Слюнные железы личинок	1024-4096
	Слюнные железы личинок	8192-32768
	Слюнные железы личинок	1024-2048
	Средняя кишка личинок	512-1024
	Мальпигиевы сосуды имаго	2-256
	Жировые тела личинок	16-512
	Протаракальная железа личинок	64-512
<i>Rhynchosciara angelae</i>	Питающие клетки ооцитов имаго	512-8192
	Слюнные железы личинок	4000-16000
Млекопитающие Растения	Слюнные железы личинок после внутриклеточной инфекции микроспоридиями	512000-1024000
	Трофобласт	64-4096
	Суспензор, гаусторий, антиподы и синергиды	2-8192

Табл. 12.1. Встречаемость политенных хромосом в природе

Организм	Орган	Тип политении	
		классическая	скрытая
Эмбрион			У мутанта <i>gnu</i> у <i>D. melanogaster</i>
Насекомые отряда Diptera	Личинки: слюнные железы, кишечник, желудок, Мальпигиевы сосуды, жировые тела, ядовитая железа, анальные папиллы	В нормальном развитии	
	Куколки: Мальпигиевы сосуды, жировые тела, прямая кишка, пулвиллы, трихогенные клетки	В нормальном развитии	
	Имаго: Мальпигиевы сосуды, задняя кишка	В нормальном развитии	
	Питающие клетки ооцитов	У комаров <i>Anopheles</i> у <i>Calliphora</i> после инбридинга у мутантов <i>otu</i> <i>D. melanogaster</i>	У большинства двукрылых
Насекомые отряда Orthoptera	Эноциты		Возможно, в нормальном развитии
Насекомые отряда Lepidoptera	Шелкоотделительная железа		- “ -
Насекомые отряда Collembola	Слюнная железа	В нормальном развитии	
Инфузории	Зачаток макронуклеуса	В нормальном развитии	
Аскариды	Пищеварительная железа		Возможно, в нормальном развитии
	Эпителий матки		- “ -
Моллюски	Гигантский нейрон		- “ -
Млекопитающие	Клетки трофобласта		В нормальном развитии
	Раковые клетки		В гигантских раковых клетках
Растения	Антиподы, синергиды, эндосперм, гаусторий	При низкой температуре	В нормальном развитии



Степени политении существенно различаются как в разных клетках одного органа, так и в клетках разных органов.

Удивительно высокие степени политении были обнаружены в клетках двукрылых насекомых, подвергнувшихся внутриклеточной инфекции. Число хроматид в таких супергигантских политенных хромосомах достигает миллиона, и они становятся видимыми невооруженным глазом.

### **12.5. Синапсис и асинапсис гомологов**

(Соматическая конъюгация в митозе - расширить).

Явление соматического синапсиса состоит в том, что гомологичные хромосомы каждой пары объединяются. Оба элемента конъюгируют диск к диску максимально точно, так что создается впечатление единой хромосомы. В результате этого число политенных хромосом в ядре уменьшается до гаплоидного.

Соматический синапсис не является обязательной характеристикой политенных хромосом. Если у двукрылых насекомых гомологичные хромосомы всегда в той или иной степени конъюгируют, то для растений или первичнобескрылых насекомых в норме характерно отсутствие синапсиса. Не совсем ясно, синаптируют ли политенные гомологи у инфузорий и млекопитающих, так как имеющиеся данные противоречивы.

Синапсис может быть на том или ином протяжении нарушен (около 20% ядер клеток в слюнных железах у разных видов двукрылых). Особый интерес представляет открытый уже в первой статье Е. Бальбиани (см. Рис. 12.1.), а

затем Х. Бауэром в 1936 году факт специфического асинапсиса: у *Chironomus plumosus* четвертые хромосомы не конъюгируют и располагаются в ядре отдельно.

Интересно проявляется нарушение конъюгации у некоторых межвидовых гибридов. Давно было замечено, что у гибридов разных видов дрозофил уровень асинапсиса гомеологов выше, чем родительских видов, участвовавших в скрещиваниях. Удивительным было обнаружение Добжанским в 1957 году факта полного отсутствия конъюгации у гибридов *D. insularis* × *D. tropicalis*. У потомков гомеологи конъюгируют только в области хромоцентра. При этом рисунок дисков в политенных хромосомах идентичен.

Участки, в которых состояние асинапсиса переходит в состояние синапсиса не случайны. Чаще это районы интеркалярного гетерохроматина.

Частота асинапсиса может значительно изменяться под действием различных факторов, являющихся модификаторами эффекта положения, такими как варьирование температурой и количеством гетерохроматина в ядре (число Y-хромосом).

### **12.6. Хромомерный рисунок в политенных хромосомах**

Политенные хромосомы классического типа имеют характернейшую особенность - поперечную исчерченность. Вдоль каждой отдельно взятой хроматиды расположены, чередуясь, участки более (хромомеры) или менее (межхромомеры) плотной упаковки ДНП. Когда многочисленные сестринские хроматиды тесно конъюгируют, гомологичные

хромомеры, сближаясь, образуют поперечную полосу (диск) (см. Рис. 11...). Деконденсированные участки хроматид между хромомерами в политенной хромосоме образуют междиски.

Одновременно с открытием политенных хромосом обнаружили и такое фундаментальное их свойство как уникальность рисунка дисков. Было замечено, что в случае локального асиапсиса гомологов образец поперечной исчерченности, т.е. порядок дисков разной толщины, был одинаковым на обоих гомологах.

Размеры и морфология дисков, расстояния между соседними дисками строго индивидуальны для каждого, даже небольшого фрагмента хромосомы. В результате отдельные группы дисков могут служить маркерами не только районов, но и целых хромосом, например, у дрозофилы сдвоенные крупные пуфы, названные “китайскими фонарями” (Chinese lanterns), группа из четырех близко расположенных черных дисков - “четыре брата”, длинный участок очень малого диаметра - “гусиная шея” и т.д. Все эти названия были даны К. Бриджесом еще в 1935 году. Неудивительно, что если тот или иной фрагмент хромосомы принесен перестройкой в новое положение, точки разрывов хромосом могут быть точно определены, а перенесенный сегмент - идентифицирован в новом положении. Все это позволяет строить цитологические карты, очень удобные тем, что по отношению к каждому диску можно определить положение того или иного гена, точки разрыва хромосомной перестройки, участка локализации ДНК методом гибридизации *in situ* или меченых антител на различные компоненты хромосом.

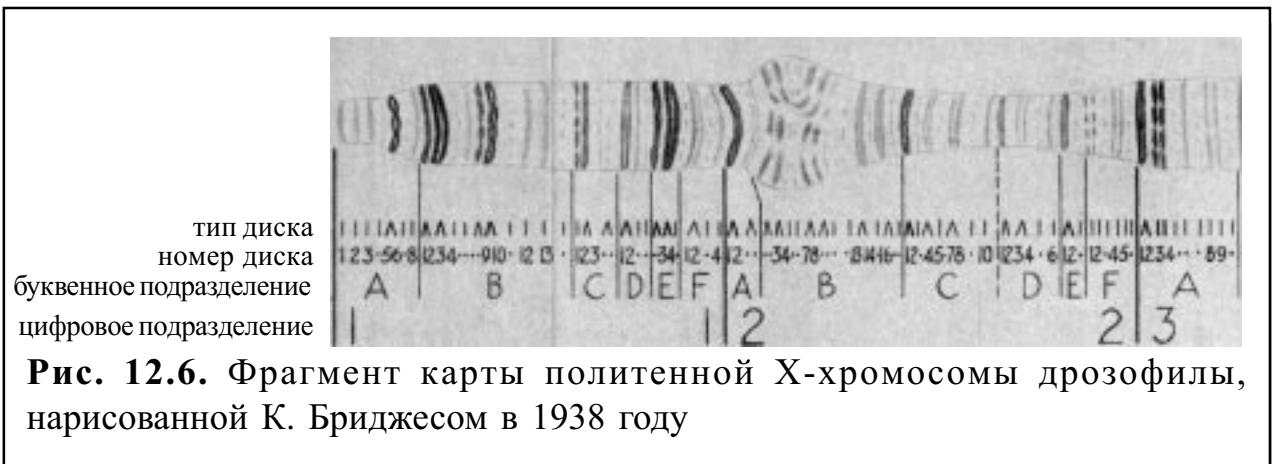
Построение цитологических карт обычно включает два этапа:

а) выявление, зарисовку или фотографирование дисков и особенностей морфологии хромосом и б) нанесение наименований дисков на изображение хромосомы. Что касается собственно изображения хромосом, то в ходу у цитогенетиков долгое время были исключительно рисованные карты, позднее появились фотографические.

К. Бриджес предложил принцип обозначения дисков на картах. С некоторыми вариациями он использовался всеми последующими исследователями: каждое из пяти длинных плеч хромосом дрозофилы он поделил на 20 примерно равных по длине сегментов, начинающихся с крупного хорошо заметного диска. Четвертая, микрохромосома, поделена на два таких сегмента. В итоге получается 102 района, обозначенных цифрами (Рис. 12.6.). Это цифровые подразделения карты, каждое из которых поделено еще на 6 участков, обозначенных буквами (А-Е) и содержащих по несколько дисков. Внутри буквенных подразделений каждый диск вновь обозначен цифрами. Таким образом, положение любого диска можно совершенно точно описать, например, диск 2С1-2 - это первый “дублет” в подразделении С второго района X-хромосомы.

При раздавливании органов, содержащих политенные хромосомы, в жидкостях, содержащих уксусную, молочную или пропионовую кислоты, хромосомы хорошо расправляются и диски выглядят как хорошо известные сплошные поперечные полосы.

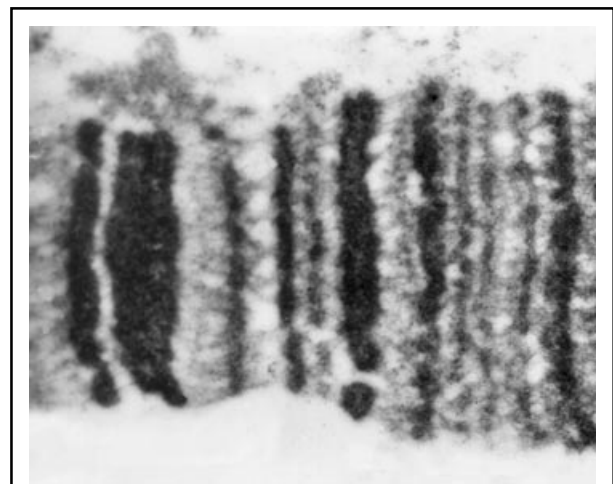
Морфология дисков при фиксации хромосом в спирт-уксусных смесях может варьировать, по словам



Бриджеса, “от едва заметных тонких, почти гладких линий до плотных широких полос, от тонких точек, формирующих поперечную полосу, до крупных точек, создающих диски, напоминающие ячеистые цепи, от тонких пунктиров до толстых дисков”.

В 1930-1940 годы, когда были построены карты политенных хромосом *Drosophila melanogaster*, препараты готовили путем простого раздавливания в красителе, разведенном на 45% уксусной кислоте. По-видимому, именно поэтому, (т.е. из-за большого содержания воды) большинство крупных дисков, которые выглядят сплошными на прижизненных фотографиях, теряют гомогенность в распределении материала, скапливающегося по краям диска, образуя пузырь или капсулу, полые внутри. Если каждую стенку капсулы считать отдельным диском, то на месте каждого из них, одиночного до фиксации, можно нарисовать два - или “дублет” по Бриджесу. На Рис. 12.6. “дублеты” помечены галочками и имеют двойное обозначение (две цифры через дефис, например, диск 2В1-2). Общепринято, что дублеты являются артефактами фиксации (на ЭМ фотографии, представленной на

Рис. 12.7., никакой двойственности дисков не видно), однако общий рисунок карт был сделан настолько хорошо, и так много генов и хромосомных перестроек уже были картированы именно на дублетах, что все генетики до сих пор пользуются только картами Бриджеса. Всего на картах Бриджеса изображено чуть более 5000 дисков, однако если считать, что около 1.5 тыс. из них изображены дублетами, общее число дисков должно быть уменьшено примерно до 3.5 тыс.



**Рис. 12.7.** Электронномикроскопическая фотография части 3R хромосомы *Drosophila melanogaster*. Диски и междиски выглядят как темные и светлые поперечные полосы. (Фотография любезно представлена В.Ф. Семешиным)

Вдоль оси политенной хромосомы хроматида варьирует в степени компактности ДНК и связанных с ней молекул белков. Районы с высокой концентрацией ДНК и являются дисками (Рис. 12.7.).

Для каждой хроматиды рисунок хромомеров в высшей степени специфичен, так что в политенной хромосоме гомологичные хромомеры, объединяясь друг с другом, образуют полосу поперек хромосомы. В межхромомерных участках, или междисках, концентрация ДНК существенно ниже.

Рисунок дисков и междисков каждой политенной хромосомы является видоспецифичным и характерен для каждой хромосомы в различных тканях или стадиях развития.

Тщательный анализ рисунка дисков в четырех органах *Chironomus*



**Рис. 12.8.** Вольфганг Беерман (род. 1920)

*tentans* привели В. Беермана (Рис. 12.8.) в 1950-1970 гг. к заключению, что данный рисунок дисков в значительной степени одинаков. Он выделил 4 типа различий:

1. “Присутствие-отсутствие”. В одной ткани диск хорошо виден, в другой - нет.
2. “Одиночный-дублетный”. Имеются два диска в одной ткани и только один диск - в другой.
3. “Разное расстояние”. Расстояния между отдельными гомологичными дисками в хромосомах разных тканей различны (удлинения-укорочения междисков).
4. “Тканеспецифичное усиление окраски междисков”, соединяющих два или более близлежащих толстых диска.

Данные В. Беермана показали, что наряду со значительной стабильностью и повторяемостью рисунков дисков в разных тканях, существует и некоторая вариабельность.

В настоящее время получены и многочисленные данные о существенных различиях в рисунке дисков в клетках нормально функционирующих органов. В результате сравнения рисунков дисков в трихогенных клетках и питающих клетках ооцитов не было найдено хоть какой-то гомологии.

Удивительные факты сезонных изменений длины политенных хромосом и рисунка дисков в них, были описаны Н.Б. Ильинской в 1978-1980 гг. для некоторых видов хирономусов. Оказалось, что перед началом холодов, в сентябре, хромосомы резко укорачиваются, уменьшается число пуфов, соседние диски во многих районах сливаются в

блоки хроматина, фактически в новые диски. Удлинение хромосом начинается в январе-феврале, в результате чего в хромосомах личинок, выловленных в марте, число дисков в четыре раза больше, чем в сентябре: “зимние” блоки хроматина расщепляются на диски и междиски.

Похожие слияния-расщепления дисков происходят у некоторых летальных мутантов дрозофилы, при длительном инкубировании органов, содержащих политенные хромосомы, в искусственных средах или гомолимфе имаго.

Таким образом, может быть сделано общее заключение о постоянстве и вариабильности рисунка дисков: он относительно постоянен в клетках нормально функционирующих органов, однако при изменении внутриклеточных или окружающих условий диски варьируют за счет объединения (слияния) или расщепления материала на несколько дисков.

### **12.7. Особенности политении**

Клетки с политенными хромосомами отличаются от митотически делящихся клеток целым рядом особенностей. Во-первых, формирование политенных хромосом ассоциируется с потерей всего механизма клеточного деления после каждого удвоения ДНК в ядре, в результате чего клеточный цикл в клетках этого типа состоит только из двух фаз S, когда синтезируется ДНК и G - межсинтетической. Такой тип клеточного цикла у дрозофилы устанавливается в середине эмбрионального развития.

Во-вторых, в конце каждого периода репликации дочерние хроматиды не сегрегируют (т.е. не расходятся друг от друга), они остаются спаренными друг с другом. Один из генов дрозофилы, *escargot*, необходим для того, чтобы поддерживать клетки имагинальных дисков в цикле диплоидных клеток. Этот ген не функционирует в личиночных тканях с политенными хромосомами. Предполагают, что его экспрессия подавляет развитие политении.

В-третьих, сформировавшиеся политенные хромосомы не способны вступать в митотические деления.

В-четвертых, ядерная оболочка и ядрышко остаются интактными в ходе следующих один за одним циклов репликации ДНК.

Политения возникает и достигает высоких степеней в тканях, органах или на тех стадиях развития, когда есть необходимость быстрого развития органа при неизменно высоком уровне функционирования. Органы, содержащие клетки с политенными хромосомами, как правило вовлечены в процессы интенсивной секреции, осуществляемые в течение короткого времени на фоне быстрого роста. Таковы питающие клетки ооцитов, глоточные, шелкоотделительные, слюнные железы, трофобласт, антиподы, гаусторий, суспензор, эндосперм. Особенности политении создают предпосылки для выполнения этих функций. Поскольку в клеточном цикле полностью блокирован весь механизм деления ядра и клетки, процесс редупликации хромосом максимально упрощен и ускорен. В результате за счет

политенизации масса органа нарастает значительно быстрее чем за счет митотических делений диплоидных клеток. Очевидно также, что клеточный цикл по типу политении способствует сохранению высокой функциональной активности органа, так как нет перерывов, связанных с митозами.

Политения найдена у организмов, появившихся на всех этапах эволюции, например у инфузорий, появившихся еще в Докембрийскую эру, более 600 млн. лет назад, а затем политения возникла вместе с появлением моллюсков и червей (Докембрий), ногохвосток (Девон), - более 400 млн. лет назад крылатых насекомых (Карбон-Триас), двудольных (Юра) и однодольных растений и млекопитающих (Мел - 100 млн. лет назад).

## **12.8. Архитектоника ядра**

(не читал)

## **12.9. Генетическая организация политенных хромосом**

### **12.9.1. Диски**

Распределение транскрипционно активных районов в политенных хромосомах изучали с помощью многих методов: специфических окрасок на РНК, световой и ЭМ авторадиографии после включения <sup>3</sup>H-уридина, локализации РНП-продуктов транскрипции, выявления гибридов ДНК/РНК. Транскрипционно-активными в политенных хромосомах являются все структуры, обнаруживающие ту или иную степень декомпактизации: пuffed, разрыхленные диски, Кольца Бальбиани,

ядрышки, с большой долей вероятности - междиски. Поэтому генетическая организация этих структур представляет существенный интерес.

В 1970 - 1980-е годы в генетике была бурная дискуссия о генетическом содержании хромомера.

Фиксированное расположение дисков и междисковых участков в политенной хромосоме дрозофилы навело цитогенетиков на мысль, что каждый диск, возможно, соответствует отдельному гену.

Основная масса исследователей полагала, что каждый хромомер содержит только один ген. Были и редкие оппоненты этой идеологии, доказывавшие идею о полигенной организации дисков.

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

По современным представлениям число генов, уже найденных у дрозофилы, составляет около 6,8 тыс. что заметно больше, чем число дисков. Число еще неоткрытых генов по разным оценкам составляет 5-10 тыс. Эти данные свидетельствуют о том, что генов существенно больше, чем дисков и каждый диск должен содержать в среднем несколько генов.

То же самое вытекает из рассуждений другого рода. Количество ДНК, входящей в состав одного диска, варьирует как в хромосомах разных видов и в хромосомах одного и того же вида в пределах от 5 до 200 т.п.н., и составляет в среднем 30 т.п.н. В то же время гены в молекуле ДНК занимают, как правило, более короткие отрезки. В диске 10A1-2, клонированный район длиной 190 т.п.н. содержит почти 25 генов и кДНК, т.е. один ген на 7.6 т.п.н. Средняя плотность в районе генных клмплексов *achaete-scute* и *Broad* составляет 1 ген на 8 т.п.н. В результате полного определения последовательности нуклеотидов в участке ДНК длиной 2700 т.п.н., выделенной из района 34C4-36A2 второй хромосомы дрозофилы, проведенного в лаборатории Дж. Рубина в 1998 году, показано, что плотность генов 1 на 13.7 т.п.н. Эти данные свидетельствуют о том, что средний диск должен содержать 3-5 генов.

Молекулярный и генетический анализ показал, что есть диски с очень большим числом генов, например, блоки из 160-200 идентичных последовательностей генов 5S рРНК, каждая длиной 385 п.н., занимают группу из 4х дисков. Сотни копий генов 18S и 28S рибосомной РНК локализованы в ядрышковом организаторе, который у многих видов двукрылых выглядит как одиночный диск. Аналогичным образом организованы диски, содержащие многочисленные копии генов гистонов.

Единственное проведенное до сих пор генетическое и молекулярное исследование индивидуального диска (Рис. 12.9.) показало наличие в нем около 25 генов. Часть из них выявляется с помощью мутаций, другие гены обнаружены по их

активности в синтезе РНК. Некоторые отрезки ДНК, входящей в состав диска 10A1-2 (см. Рис. 12.9г.), обогащены повторами, т.е. одинаковыми последовательностями нуклеотидов, встречающимися в геноме десятки и сотни раз. Повторы, найденные в диске 10A1-2, характерны только для половой X-хромосомы. Они расположены гнездами по несколько копий подряд, и эти гнезда распределены вдоль по длине X-хромосомы примерно в двух десятках районов. Роль этих повторов не выяснена.

Можно было бы предположить, как это и делали многие генетики, что гены, расположенные в одном диске, участвуют в осуществлении какой-то одной функции, или они находятся под общим контролем, т.е. функционируют координированно. Однако, это оказалось не так. На рисунке 12.9д. показаны точки разрывов многочисленных хромосомных перестроек, таких как инверсии, делеции и транслокации. С их помощью часть материала диска может быть перенесена в другое место в этой же хромосоме или в другие хромосомы, или даже удалена. В результате одна группа генов диска переносится в соседство с другими генами, и целостность генной группировки диска нарушается. Однако это не отражается на их активности: даже будучи разобщенными, все гены диска функционируют нормально. Еще интереснее оказались результаты эволюционного исследования диска 10A1-2. Клонированные последовательности ДНК, составляющие этот диск у *D. melanogaster* - основного объекта исследований, были картированы в хромосомах у других видов эволюционно разошедшихся около 10 млн. лет назад: у *D. virilis*, *D. repleta*, *D. hydei*. У этих видов

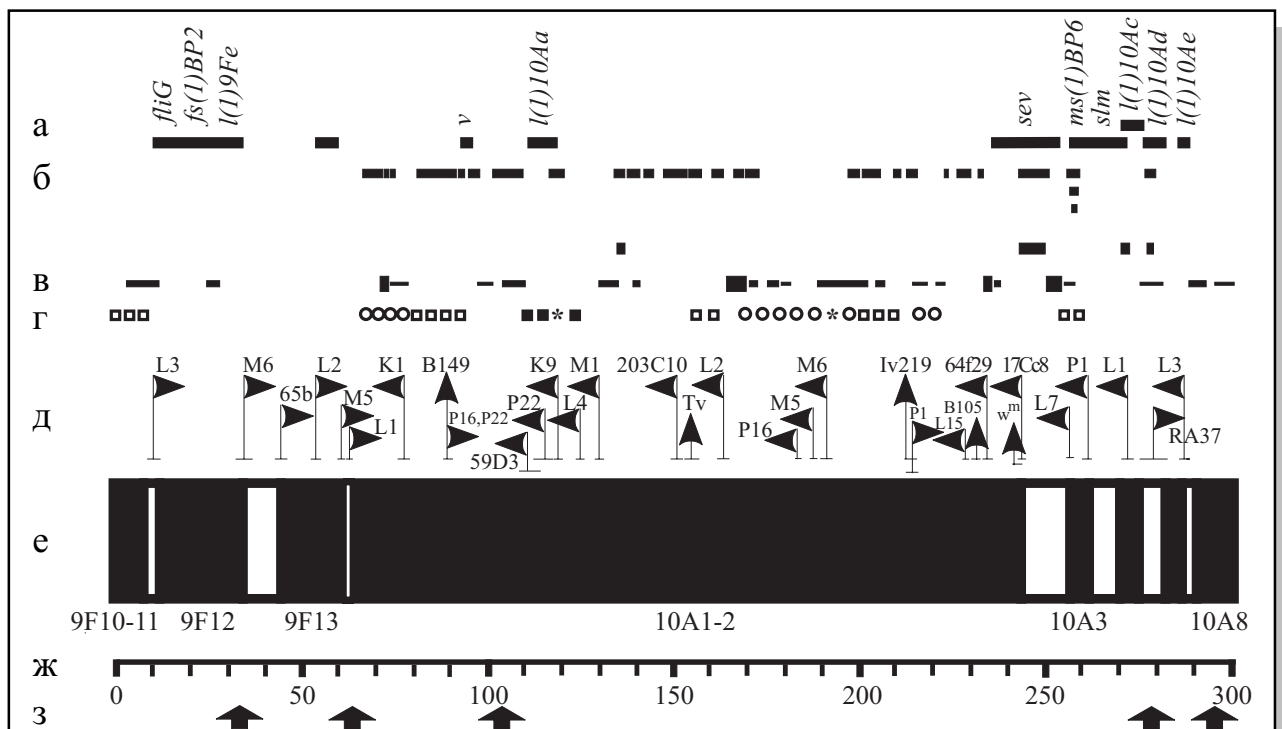
ДНК диска 10A1-2 оказалась представленной в двух независимых дисках X-хромосомы: ДНК диска между второй и третьей стрелками слева на Рис. 12.9з. У этих видов локализована в одном (тонком) диске, а ДНК из района между третьей и четвёртой стрелками - в другом (более толстом) диске. Таким образом нормально работающая группа генов, заключенных в одном диске у *D. melanogaster*, также нормально работает в составе разных дисков у других видов. Все это свидетельствует об отсутствии функциональной сцепленности различных генов, входящих в состав диска.

Оригинальный подход к исследованию организации дисков дает

метод трансформации, использование которого позволяет встраивать в геном фрагменты ДНК с известными молекулярно-генетическими характеристиками.

В состав трансформирующих конструкций входят различные фрагменты ДНК: мобильного Р-элемента, маркерные гены (*rosy*, *Adh*, гены теплового шока, В-галактозидаза *E. coli*), экспрессирующиеся гены ДНК плазмиды.

Согласно данным ЭМ анализа в 10 из 13 изученных районов, в котором произошла инсерция, образуется по одному новому диску, возникшему из ДНК транспозона. Последовательности



**Рис. 12.9.** Молекулярно-генетическая организация диска 10A1-2 политенной хромосомы дрозофилы (Из: Жимулёв, 1994, стр. 126).

**а** - гены выявляемые с помощью мутаций; **б** - гены, выявленные по локализации матричных РНК; **г** - повторенные участки ДНК; **д** - вертикальные линии с флажками указывают точку разрыва ДНК хромосомными перестройками, стрелка флажка - направление перестройки; на Рис. "е" изображены диски (9F10-10A8) изучаемого района; ниже (**ж**) показана физическая карта ДНК (от 0 до 300 тысяч пар нуклеотидов). Границы дисков соответствуют протяженности ДНК, входящей в тот или иной диск. Например, диск 10A1-2 занимает около 180 т.п.н.; **з** - стрелками указаны точки "эволюционных" разрывов ДНК у близких видов: *D. virilis*, *D. repleta*, *D. hydei*



ДНК, заключенные в таких искусственных дисках, полностью сохраняют функциональную активность: маркерные гены нормально функционируют, а гены теплового шока легко активируются с образованием пуфа. Эти факты позволяют сделать следующие важные выводы:

1. Поскольку из разнородной в функциональном смысле ДНК образуется единственный диск, очевидно, что вся ДНК подвергается сплошной компактизации, без диск-междискового рисунка. Это означает, что расположение гена в обеих структурах (диск и междиск) не является необходимым и диски функционально не связаны с междисками, т. е. нет оснований говорить о цитогенетической единице, состоящей из диска и междиска. Если в нормальной политенной хромосоме какой-то из генов, например, *rosy* был бы связан с прилежащим междиском, и эта связь была бы функционально необходимой, то в составе трансформирующей конструкции рядом с компактной ДНК гена *rosy* должен был бы возникнуть междиск. Аналогичные рассуждения справедливы и по отношению к другим генам, а раз так, то в результате трансформации на месте инсерции должна была возникнуть серия дисков и междисков в соответствии с числом генетических единиц в инсерции. Однако этого не наблюдается.

2. Все гены, взятые из разных дисков и междисков, и даже из ДНК *E. coli* находящиеся в инсерции, компактизуются в один диск, значит механизмы компактизации неспецифичны для разных генов.

### 12.9.2. Междиски

Участки политенных хромосом, расположенные между дисками (хромомерами), называют междисками (межхромомерами). По данным, полученным на многих видах двукрылых, длина междисков колеблется в пределах 0,05-0,38 мкм, чаще всего 0,1-0,2 мкм, или 0,3-3,8 т.п.н. Количество ДНК, приходящееся на все междиски, составляет 3-5% от ее общего количества в политенных хромосомах.

О генетической функции междисков еще предстоит узнать, т.к. до настоящего времени в этой области известно мало. Было показано, что при инсерции транспозонов в междиски, жизнеспособность у гомозигот по инсерциям не изменяется. Не было найдено и какого-то другого мутантного фенотипа.

Недавно была выделена ДНК одного из междисков и расшифрована ее первичная структура. Использовали следующий оригинальный подход: из ДНК дрозофил, имеющих встройку транспозона в междиск, была изготовлена библиотека клонов, проскринировав которую на зонд (ДНК транспозона), выделили ДНК, имеющую фрагменты транспозона и междиска. Последний фрагмент использовали в качестве зонда для поиска клона ДНК, содержащей полноразмерный междиск.

Последовательности нуклеотидов междиска были секвенированы и проанализированы по компьютерным программам. Оказалось, что фрагмент ДНК длиной 1289 п.н. и заключающий в себе материал междиска, имеет следующие особенности (Рис. 12.10):

1. Является уникальным, поскольку в геноме нет других фрагментов, гомологичных ДНК междиска.
2. Обогащен (53,4%) АТ-парами нуклеотидов
3. В его пределах найдено 14 мотивов различных регуляторных элементов и две перекрывающиеся рамки считывания, одна длиной 555 п.н., другая 354 п.н. Один из мотивов гомологичен сайту посадки топоизомеразы II и участку прикрепления ядерного скаффолда.
4. Анализ частот использования кодонов в рамках считывания, найденных в ДНК междиска, а также тех, которые участвуют в кодировании аминокислот у дрозофилы, показал достоверные различия. Это может свидетельствовать либо о том, что эти рамки считывания не кодируют информацию для синтеза, либо о том, что они кодируют белки с использованием редких кодонов.

### 12.9.3. Пуфы

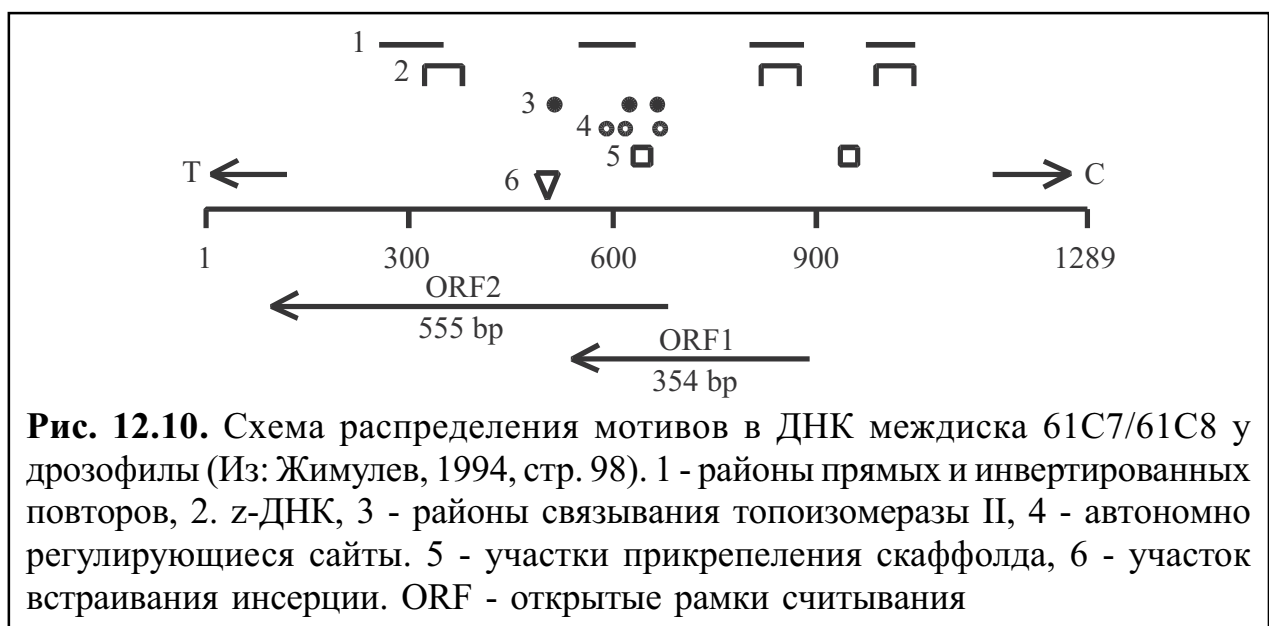
Вздутия в политенных хромосомах были описаны одновременно с политенными хромосомами: Бальбиани в

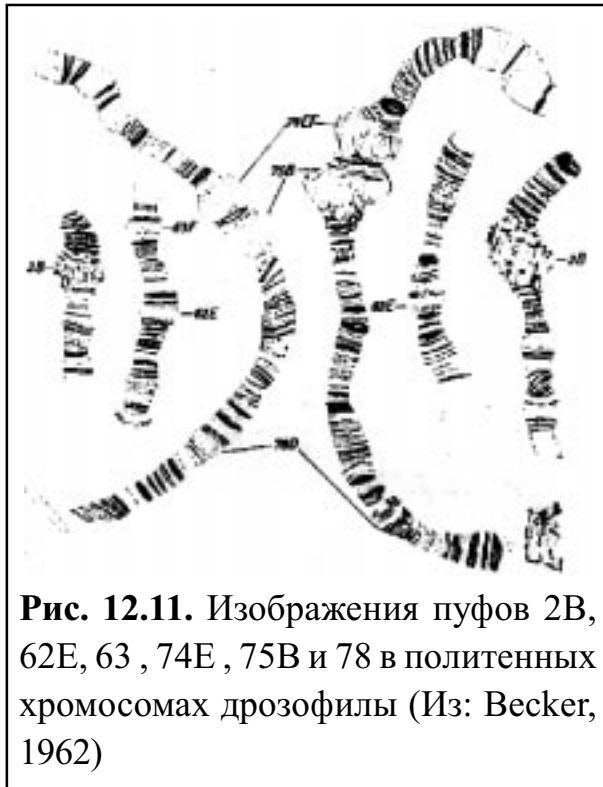
1881 году нашел огромные муфтоподобные вздутия в политенных хромосомах *Ch. plumosus*, которые в 1910-1912 гг. Эрхард и Альвердез назвали Кольцами Бальбиани.

Одной из выдающихся особенностей третьей хромосомы дрозофил Пайнтер в 1935 году назвал серию слабо окрашенных сегментов. Эти сегменты обнаруживают поразительное варьирование диаметра, хотя у каждой конкретной личинки их форма и размеры довольно константны (см. для примера Рис. 12.11. и 12.12.).

У некоторых особей они могут быть в три раза толще, чем остальная часть хромосомы, у других личинок утолщений в данных районах нет, в них обычные диски. К. Бриджес в том же году назвал некоторые из вздутий, например в районе 2В, пуфами (“вздутиями”). Работая с хромосомами личинок сциарид Д.Ф. Полсон и К.В. Метц нашли, что гигантские вздутия, характерные для этого вида, формируются из дисков, а затем вздутия вновь превращаются в диски.

Детальные исследования В. Беермана, К. Павана, М. Бройер и Ф.



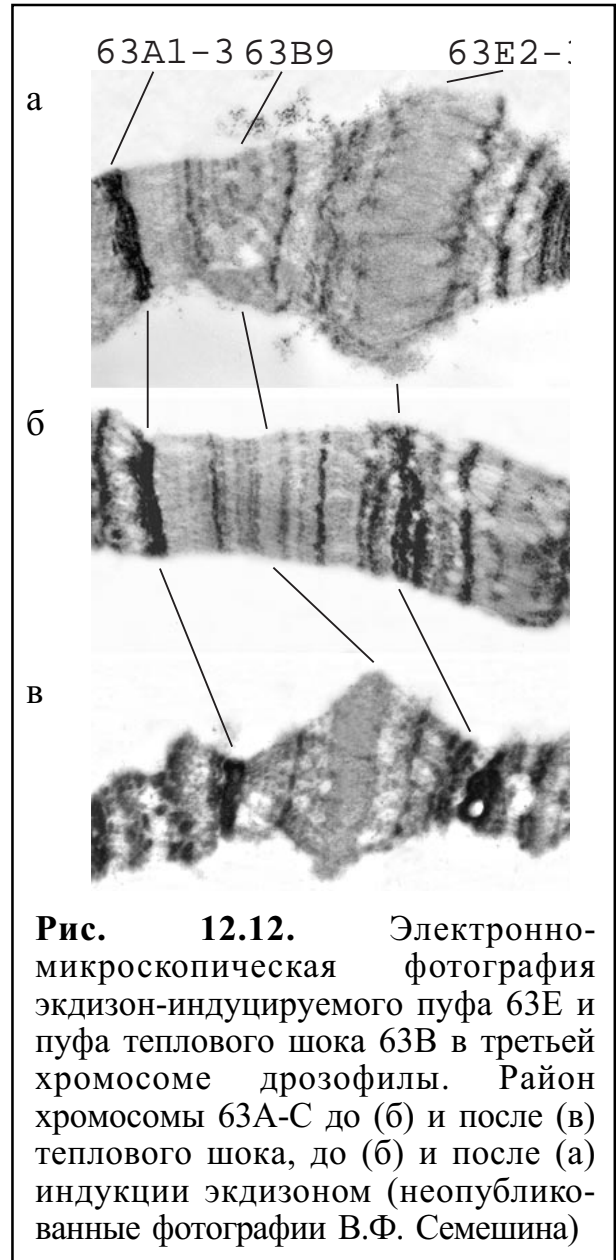


**Рис. 12.11.** Изображения пуфов 2В, 62Е, 63, 74Е, 75В и 78 в политенных хромосомах дрозофилы (Из: Becker, 1962)

Мехельке в начале 1950-х годов привели авторов к заключению о том, что пuffedы и кольца Бальбиани являются районами хромосом, в которых гены находятся в активном состоянии, т.е. разрыхление материала диска и формирование из него специфического пuffedы - является морфологическим проявлением активирования гена и коррелирует с определенным состоянием дифференцировки.

Разрыхление материала диска связано с тем, что в области активируемого гена происходит сначала накопление различных белков, входящих в транскрипционные комплексы, затем из-за накопления вновь синтезируемой РНК и белков, упаковывающих эту РНК в специфические гранулы, в составе которых она транспортируется из ядра в цитоплазму.

В 1961 году В. Беерман нашел корреляцию между появлением особых гранул секреции в клетках особой доли



**Рис. 12.12.** Электронно-микроскопическая фотография экдизон-индуцируемого пuffedы 63Е и пuffedы теплового шока 63В в третьей хромосоме дрозофилы. Район хромосомы 63А-С до (б) и после (в) теплового шока, до (б) и после (а) индукции экдизоном (неопубликованные фотографии В.Ф. Семешина)

слюнной железы *Ch. pallidivittatus* и активностью дополнительного Кольца Бальбиани в клетках этой доли. Таким образом впервые была обнаружена связь между активностью пuffedы и продукта, синтезируемого клеткой.

За последние 10 лет выведена и клонирована ДНК примерно двух десятков пuffedов. Эта ДНК, как оказалось, содержит гены, имеющих очень большую протяженность - 50-120 т.п.н. В составе генов многочисленные экзоны, вступающие в альтернативный сплайсинг, и очень длинные (до 40 т.п.н.) интроны.

### 12.10. Гормональный контроль пуфов

У многих видов отряда Diptera, у которых личиночное развитие проходит быстро (за несколько дней), изменения картин пуфов очень динамичны и легко наблюдаются. У наиболее изученного вида - дрозофилы - детально описано пуфирование всех хромосом на протяжении последних 24 часов личиночного развития и 12 часов - предкуколочного. Все пуфы можно разделить на два типа: крупные, т.е. собственно вздутия и малые, в которых увеличения диаметра хромосомы нет, однако диски данного района уже разрыхлены, деконденсированы, т.е. транскрипционно активны.

Каждая стадия развития личинки или предкуколочки характеризуется определенным набором (паттерном) крупных пухов. В ходе развития эти наборы закономерно изменяются (Рис. 12.13.).

У наиболее молодых личинок, у которых политенные хромосомы уже достаточно крупные и доступны для анализа, присутствуют только так называемые межлинечные пуфы (68С на Рис. 12.13.). В самом конце личиночного развития, примерно за 6 часов до формирования предкуколочки (пупариума), на фоне резкого повышения титра гормона экдистерона эти пуфы инактивируются и начинают формироваться другие пуфы, сначала "ранние", т.е. раньше других (примерно через 30 минут) среагировавшие на поступление гормона (74ЕF и 75В на Рис. 12.13.), затем "поздние" - реагирующие с задержкой на несколько часов (78D, 66В, 71СЕ на Рис. 12.13.).

У 0-час предкулолок активность пухов наивысшая, в том смысле, что в геноме наибольшее число пухов активны именно на этой стадии развития. Размеры многих пухов максимальны именно на этой стадии развития.



**Рис. 12.13.** Изменения активности пухов 3L хромосомы дрозофилы в конце третьего возраста - предкуколочном развитии. По оси абсцисс: стадии развития (в часах). У личинок - время до формирования 0-час предкуколочки. (Из: Becker, 1962, в кн. Жимулев, 1994, стр. 209)

После достижения пика активности в последующие 2-3 часа происходит быстрый спад активности пухов, когда в хромосомах присутствуют единичные пухы. В конце стадии предкуолки опять на фоне повышенного титра экдистерона проходит повторная волна ранних и поздних пухов (Рис. 12.13.).

Исследования У. Клевера и П. Карлсона, проведенные на хирономусе в 1960 году, и Х.И. Беккера - на дрозофиле в 1962, продемонстрировали, что активность многих пухов, возникающих в конце личиночного развития, индуцируется гормоном экдизоном, контролирующим метаморфоз у насекомых. Несколько позже У. Клевер в работах на хирономусе показал, что экдизон вызывает целый каскад взаимосвязанных изменений, в которых гены, активируемые гормоном раньше, влияют на индукцию генов более поздно реагирующих на гормон.

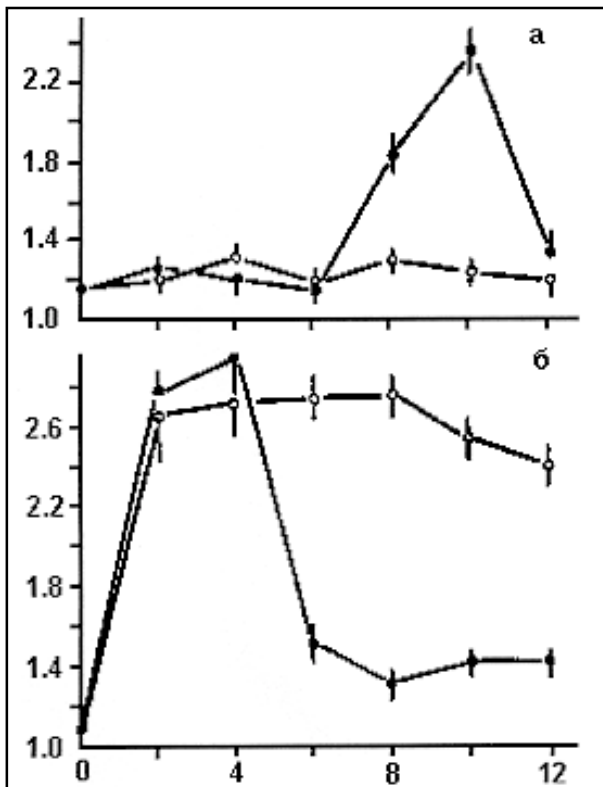
Наиболее фундаментальные исследования процесса активирования генов (пухов) под действием гормона провел английский генетик М. Эшбернер (M. Ashburner) (Рис. 12.14.).

Исследования гормональной регуляции активности генов удобнее проводить не на живом организме, а в системе *in vitro*, т.е. инкубируя органы в пробирке, благодаря чему можно по усмотрению экспериментатора изменять условия обработки гормонами, т.е. варьировать их концентрации, продолжительность воздействия, использовать вещества, прерывающие протекание различных процессов (ингибиторы). В результате серии остроумных экспериментов М. Эшбернер показал, что ранние и поздние пухы различаются по многим признакам.



**Рис. 12.14.** Майкл Эшбернер  
род. 1942

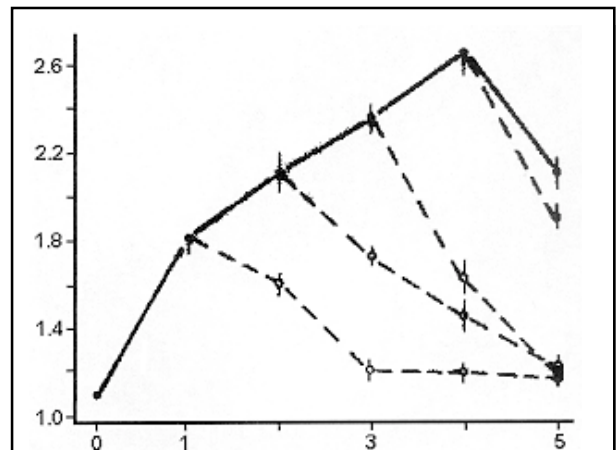
Во-первых, это реакция на ингибиторы синтеза РНК и белков. Если через час после начала инкубации клеток слюнных желез с ингибитором синтеза белков - циклогексимидам - добавить гормон экдистерон, ранние пухы все же образуются, т.е. для их индукции не требуется предварительного синтеза белков. Они используют те белки, которые были синтезированы задолго до этого. В поведении ранних пухов обнаружилась еще одна удивительная особенность. Обычно они быстро реагируют на гормон - активируются, через четыре часа развиваются до максимальных размеров, затем полностью инактивируются, и материал пуха, компактизуясь, превращается в диск. Под действием ингибитора синтеза белка ранние пухы нормально активируются, но их обычной инактивации не происходит (Рис. 12.15б.). Этот факт может свидетельствовать только об одном:



**Рис. 12.15.** Развитие позднего пуфа 82F (а) и раннего пуфа 75В (б) под воздействием экдистерона или экидстерона с ингибитором синтеза белка циклогексимидом (Из: Ashburner, Richards, 1976, в кн. Жимулев, 1994, с. 264). Черные кружки - обработка одним экидстероном. Светлые кружки - Обработка экидстероном вместе с циклогексимидом. Ось абсцисс - время обработки слюнных желез в часах, ось ординат - размер пуфов в условных единицах

инактивация ранних пуфов - такой же гормон-индуцируемый процесс, как и их индукция. Отсюда вытекает другой важный вывод: белки, выключающие активность ранних пуфов, кодируются в самих ранних пуфах.

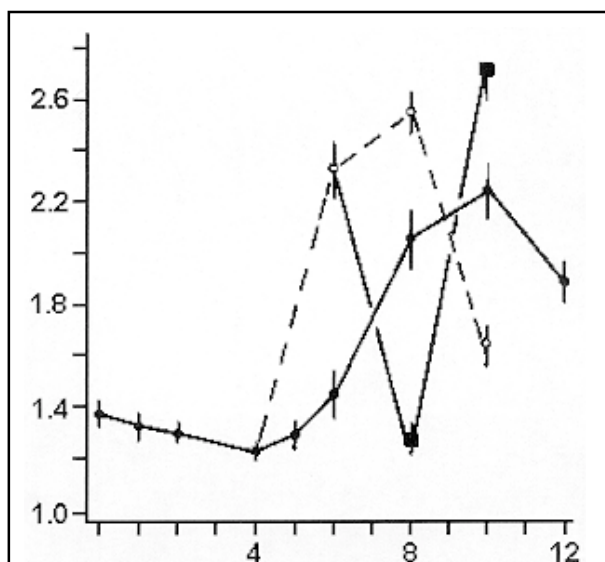
Поздние пуфы на фоне ингибирования синтеза белка не индуцируются (Рис. 12.15а.). Это означает, что для их индукции необходимы белки, синтезируемые под действием гормона экидизона, т.е. в ранних пуфах.



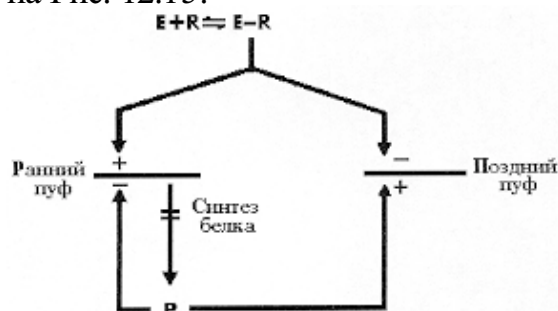
**Рис. 12.16.** Влияние удаления экидстерона из инкубационной среды на размеры раннего пуфа 74EF (Из: Ashburner, Richards, 1976, в кн. Жимулев, 1994, с. 267). Сплошная линия - изменение размера пуфа в среде с гормоном, штриховая - при отмывке экидстерона. По осям - как на Рис. 12.15.

Во-вторых, как оказалось, ранние и поздние пуфы еще более различаются по реакции на удаление гормона из клеток. Если некоторое время инкубировать железы в пробирке в растворе, содержащем гормон, а затем поместить в новый раствор, но уже без гормона, ранние пуфы быстро уменьшаются в размерах и исчезают совсем (Рис. 12.16.). На индукцию поздних пуфов отмывка гормона влияет очень специфично. Если удалять гормон после 1, 2, 3-х часов от начала инкубации, то ничего не происходит. Если инкубация протекала 4 и более часов, то удаление гормона приводит к быстрой преждевременной индукции поздних пуфов (Рис. 12.17.). Эти эксперименты означают, что для поддержания активности ранних пуфов гормон нужен постоянно. Этот же гормон блокирует развитие поздних пуфов до определенного времени.

Для объяснения результатов своих опытов М. Эшбернер предложил



**Рис. 12.17.** Преждевременная индукция позднего пуфа 82F в результате отмывки экдистерона после 4 часов инкубации с гормоном (Из: Ashburner, Richards, 1976, в кн. Жимулев, 1994, с. 268). Сплошная линия - инкубация слюнных желез в среде с гормоном, штриховая - инкубация без гормона. По осям - как на Рис. 12.15.

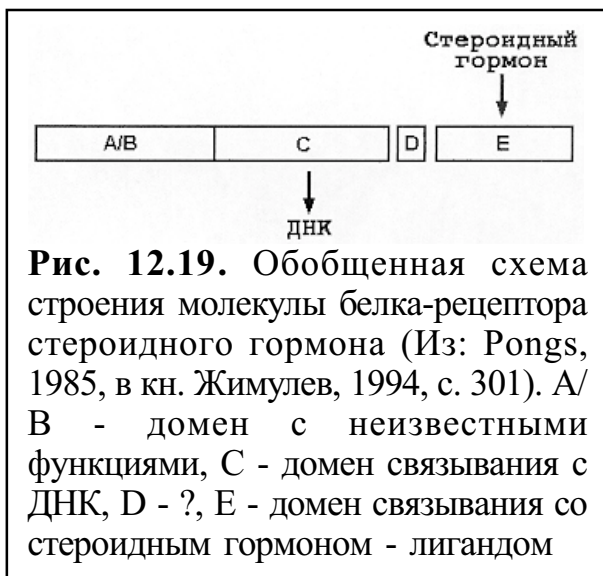


**Рис. 12.18.** Модель индукции ранних и поздних пуфов экдистероном (Из: Ashburner et al., 1974, в кн. Жимулёв, 1994, с. 268)

следующую модель (Рис. 12.18.). Гормон (E) обратимо связывается с молекулой белка рецептора (R). Рецептор облегчает проникновение гормона в клетку и связывание гормона с генами. Гормон-рецепторный комплекс взаимодействует с регуляторными областями генов, расположенных в ранних пуфах, и активирует их. Для активности ранних пуфов нужно постоянное присутствие

гормона. Отмывка его приводит к инактивации этих генов. В то же время гормон-рецепторный комплекс взаимодействует с регуляторными районами генов, расположенных в поздних пуфах, и инактивирует их. По прошествии некоторого времени после начала действия гормона ранние пуфы нарабатывают белковые продукты (P), которые действуют двояко. Некоторые из этих белков инактивируют прежде активные ранние пуфы (см. Рис. 12.18.). Поэтому подавление синтеза белка предотвращает инактивацию ранних пуфов. Другие белки из этой категории (P на Рис. 12.18.) связываются с регулируемыми зонами поздних генов, вытесняют экдизон-рецепторный комплекс, в результате чего активируются поздние пуфы. Очевидно, что если подавить синтез белка, то поздние пуфы развиваться не будут: в клетках еще не синтезированы белки P.

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



пробирку, откуда гормон уже удален, вновь добавить экдизон, поздние пуфы вновь инактивируются (см. Рис. 12.17.).

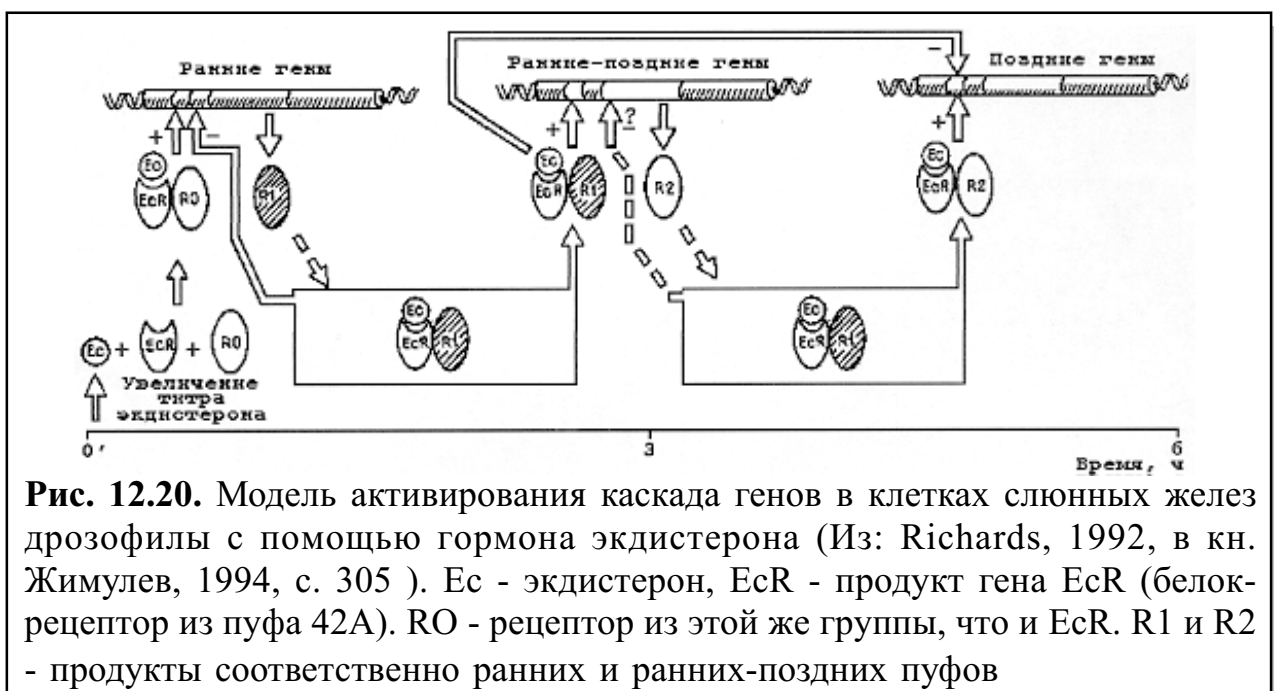
Как выяснилось, многие пуфы политенных хромосом кодируют белки-рецепторы. Интересно, что гены рецепторов располагаются как в межлинейных (42A), так и в ранних (74EF), поздних (2C) и даже предкуколичных (75CD) (93F) пуфах.

Выяснилось также, что белковые молекулы-рецепторы весьма консервативны, т.е. независимо от того

какой это рецептор и даже какой из стероидных гормонов он связывает, все рецепторы имеют общий принцип строения (Рис. 12.19.). Все молекулы белков-рецепторов имеют 4-5 доменов, т.е. специфических участков. Один из доменов ("С" на Рис. 12.19.) отвечает за связывание комплекса ER с ДНК, т.е. находит именно тот ген, который необходимо активировать. Этот домен содержит 66-68 аминокислот.

Другой домен ("Е" на Рис. 12.19.) отвечает за удержание гормона в комплексе. Он содержит 220 аминокислот. Функции доменов A/B и D пока не определены.

С учетом этих факторов модель протекания каскада активирования генов под влиянием гормона экдистерона была дополнена другим английским генетиком Дж. Ричардсом (Рис. 12.20.). Согласно новому варианту модели, когда увеличивается титр экдистерона, его молекулы связываются с двумя молекулами белков-рецепторов: EcR и RO (см. Рис. 12.20.). Этот комплекс поступает на регуляторные участки ранних генов и активирует их.





Продуктом раннего гена является другой рецепторный белок - R1, который в гормон-рецепторном комплексе замещает место белка RO, или EcR, или оба этих белка. Образовавшийся в результате этого новый гормон-рецепторный комплекс Ec-EcR-R1 подавляет активность ранних генов и активирует пuffy, возникающие несколько позже ранних. В научной литературе их называют ранними-поздними. Кроме активирования ранних-поздних генов этот вновь образованный комплекс связывается с регулируемыми участками поздних генов и инактивирует их. Одним из продуктов активности ранне-поздних пuffy является новый белок-рецептор R2, который образует гормонрецепторный комплекс с гормоном (см. Рис. 12.20.), заменяя в старом комплексе EcR или R1 или оба их. Новый комплекс отключает гены, которые произвели сам R2, и одновременно включает поздние гены.

В этой схеме многое еще остается невыясненным, в частности неизвестно, в каких пuffy расположены гены, кодирующие рецепторы R1 и R2. Неясно также какую роль играют остальные пuffy. Известно, что в политенных хромосомах функционирует около 120 крупных пuffy и 220 мелких. Пока выяснена роль только примерно 20 пuffy. Но и эти данные позволили сформулировать модель процесса гормональной регуляции активности генов в клетках эукариот. Это оказалось возможным только потому, что в качестве модели использовали политенные хромосомы, на которых

весь процесс можно непосредственно наблюдать под микроскопом.

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

### 12.11. Пuffy теплового шока

Когда пришло понимание того, что пuffy являются морфологическим проявлением генетической активности, начались многочисленные эксперименты, в которых пытались модифицировать активность пuffy с помощью различных соединений и факторов среды. Фактически сразу же были получены результаты. Помещая личинок *Drosophila busckii* в условия повышенной температуры, Ф. Ритосса (Рис. 12.21.) в 1962 году индуцировал несколько новых пuffy, (см. Рис. 12...), которые возникали также в ответ на обработку клеток ферментными ядами, блокирующими окислительное фосфорилирование. Эти данные привели к открытию новой клеточно-физиологической системы, отвечающей



**Рис. 12.21.** Ферручио Ритосса

на различные типы стрессов на клеточном уровне - так называемый синдром теплового шока.

### **12.12. ДНК-пуфы**

В 1954 году бразильские ученые К. Паван и М. Бройер установили, что в некоторых пуфах сциарид в ходе их развития происходит амплификация ДНК. В результате декомпактизации и, следовательно, уменьшения концентрации ДНК в объеме пуфа, обычные РНК-пуфы теряют окрашиваемость и выглядят на препаратах светлыми и прозрачными. Напротив, ДНК-пуфы остаются темноокрашенными из-за накопления дополнительной ДНК. Такие “ДНК-пуфы” возникают только в слюнных железах на поздних стадиях развития. Они кодируют белки секреции слюнных желез.

Одновременно с амплификацией ДНК в пуфах этого типа происходит активная транскрипция.

### **12.13. Кольца Бальбиани**

### **12.14. Ядрышки**

### **12.15. Прицентромерный гетерохроматин в политенных хромосомах**

(не читал)

### **12.16. Теломерный гетерохроматин в политенных хромосомах**

(не читал)

### **12.17. Интеркалярный гетерохроматин в политенных хромосомах**

(не читал)

### **12.18. Репликация ДНК в политенных хромосомах**

(не читал)

### **12.19. Использование политенных хромосом в генетическом анализе**

Как продемонстрировали в 1932 году Дж. Паттерсон и в 1934-1935 гг. О. МакКензен, маленькие делеции можно успешно использовать для точного картирования генов (Рис. 12.22.).

Используя этот метод, в 1930х годах были прокартированы гены с очень большой точностью, вплоть до единственного диска и даже частей диска. К настоящему времени сотни генов дрозофилы точно прокартированы на картах политенных хромосом.

Этот метод цитогенетического картирования в настоящее время дополняется методом гибридизации in



situ, который позволяет картировать гены с точностью до нескольких десятков тысяч пар нуклеотидов.

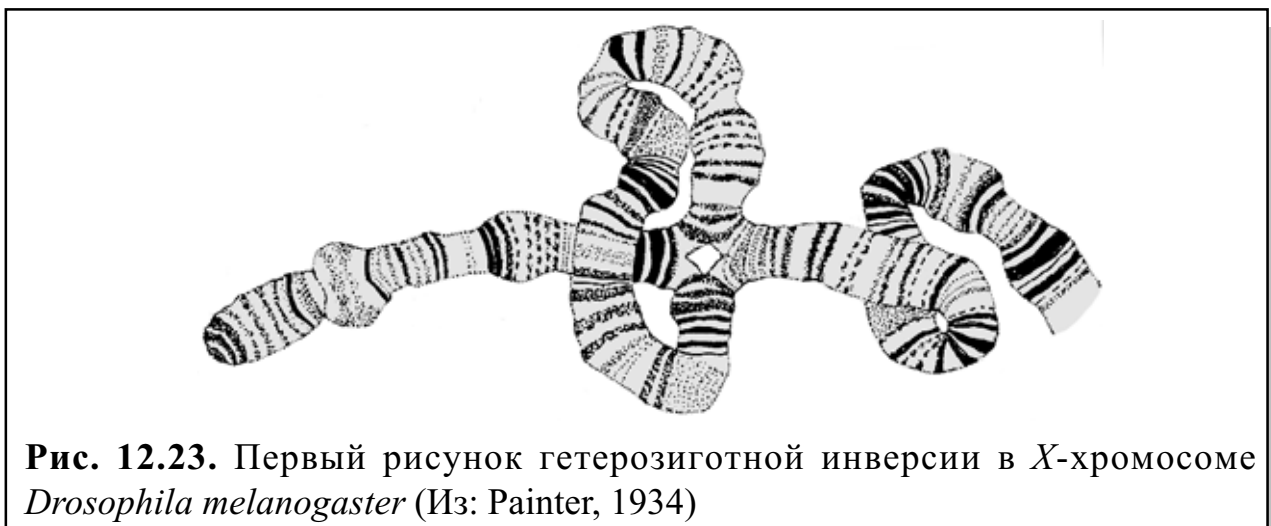
Использование политенных хромосом, среди других преимуществ такого объекта как дрозофила, оказалось

решающим фактором в быстром развитии методов клонирования (“ходьбы” и “прыжков”), а также в анализе структуры и экспрессии генов.

Крупным шагом в понимании организации и функции хромосом и генома в целом был сделан с развитием приемов микроклонирования, что позволяет выбирать район хромосомы, вырезать его с помощью микроманипулятора и создавать библиотеку микроклонов из данного района политенной хромосомы. С помощью этого метода проклонирована существенная часть X-хромосомы и левого плеча второй хромосомы, созданы библиотеки клонов из прицентромерного гетерохроматина.

Гетерозиготные инверсии очень хорошо видны в политенных хромосомах (Рис. 12.23.). Их исследование очень важно в генетическом анализе популяций.

Частота асинапсиса может значительно изменяться под действием различных факторов, являющихся модификаторами эффекта положения, такими как варьирование температурой и количеством гетерохроматина в ядре (число Y-хромосом).



**Литература**

- Жимулев И.Ф. Политенные хромосомы: морфология и структура. Новосибирск, Наука, 1-479, 1992.
- Жимулев И.Ф. Хромомерная организация политенных хромосом. Новосибирск, Наука, 1-564, 1994.
- Жимулёв И.Ф. Современные представления об организации и функционировании политенных хромосом. Соросовский образов. журн. N10, 1- , 1997.
- Ashburner M. Function and structure of polytene chromosomes during insect development. *Advances in Insect Physiology* V. 7, p. 1-95, 1970.
- Ashburner M., Berendes H.D. Puffing of polytene chromosomes. In: "The Genetics and Biology of *Drosophila* (M. Ashburner and T.R.F. Wright, eds.), V. 2b, 316-395, Academic Press, London, New York, San Francisco, 1978.
- Becker H.J. 1962
- Beermann W. Riesenchromosomen. *Protoplasmatologia* 6D, 1-161, Wien, Springer Verlag, 1962.
- Berendes H.D. Synthetic activity of polytene chromosomes. *Int. Rev. Cytol.* 35, p. 61-116, 1973.
- Painter T. J. *Hered.* V. 25, p. 465-476, 1934&
- Richards G. The ecdysone regulatory cascades in *Drosophila*. *Advances in Developmental Biology* V. 5, p. 81-135, 1997.
- Russel S. and Ashburner M. Ecdysone-regulated chromosome puffing in *Drosophila melanogaster*. In: *Metamorphosis*. Academic Press, p. 109-144, 1996.
- Zhimulev I.F. Morphology and structure of polytene chromosomes. *Advances in genetics* V. 34, p. 1-497, 1996.
- Zhimulev I.F. Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect variegation. *Advances in Genetics* V. 37, p. 1-566, 1997.
- Zhimulev I.F. Genetic organization of polytene chromosomes. *Advances in genetics* V. 39, p. 1-599, 1998.
- Zhimulev I.F., Belyaeva E.S., Semeshin V.F. Informational content of polytene chromosome bands and puffs. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* V. 11, p. 303-340, 1981.