

ИНТЕРКАЛЯРНЫЙ ГЕТЕРОХРОМАТИН И ПРОБЛЕМА САЙЛЕНСИНГА**И.Ф. Жимулёв, Е.С. Беляева, Т.Д. Колесникова, Е.И. Волкова***Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*
e-mail: zhimulev@bionet.nsc.ru

Ещё в начале прошлого века немецкий ученый Теодор Бовери высказал предположение, что развитие организма происходит в результате включения и выключения наборов генов, оно строго специфично для каждой фазы онтогенеза и типа ткани. Эта гипотеза активно развивалась и получила в последующие годы мощное фактическое обоснование. Два основных фундаментальных механизма обеспечивают дифференциальную активность генов: индукция активности (транскрипции) и генетическое "молчание" (сайленсинг). Эпигенетический сайленсинг – это форма репрессии генетической активности, которая устанавливается в строго определённое время онтогенеза и затем наследуется во многих клеточных поколениях. Этому явлению и будет посвящено настоящее сообщение.

Известно, что ДНК в живой клетке упакована в нуклеопротеиновые комплексы, важным компонентом которых являются гистоны. N-концевые участки гистонов подвергаются различным модификациям. Современные исследования модификаций ДНК и гистонов (гипоацетилирование, убиквитинирование и фосфорилирование гистонов, метилирование гистонов и ДНК и др.) показали, что такие ковалентные модификации приводят к инактивации генетического материала, делая его недоступным для факторов транскрипции (гипотеза гистонового "кода" (Turner, 2000)). Модификации происходят в строго определённых местах молекул ДНК и гистонов. Схематично это можно описать следующим образом (рис. 1). Первым этапом является деацетилирование гистонов с помощью деацетилаз – ферментов, кодируемых высококонсервативными генами. Деацетилированные гистоны способны к взаимодействию с трансметилазами, которые метилируют в них определённые аминокислоты (например, лизин K9 или лизин K27). Метилированные сайты являются маркерами, которые опознаются другими белковыми комплексами, компактизирующими

ми хроматин на уровне структуры высшего порядка, в результате чего образуются "молчащие" домены, не способные к транскрипции. Комплексы, модифицирующие хроматин, могут распространяться вдоль хроматиновой фибриллы на большие расстояния – десятки тысяч пар нуклеотидов. Распространение сайленсинга ограничивается специфическими участками – барьерами, природа которых сейчас активно изучается. Эта схема, конечно, будет в последующем уточняться, но уже сейчас можно говорить, что в основе эпигенетически наследуемого сайленсинга лежит фундаментальный молекулярный механизм, работающий у всех эукариот от дрожжей до человека.

На цитологическом уровне сайленсинг проявляется в формировании гетерохроматина. Этим термином со времен Хайца (Heitz, 1929) называют плотно компактизованные участки генома, которые сохраняют в отличие от эухроматина компактное состояние на протяжении всего клеточного цикла. Это прежде всего прицентромерный гетерохроматин, состоящий в основном из разных типов повторённой ДНК; часто гетерохроматиновыми бывают целые хромосомы (инактивированная X-хромосома в геноме самок млекопитающих, Y-хромосома в геноме дрозофилы, В-хромосомы) и даже целые геномы (отцовский геном кокцидий). Молекулярные механизмы сайленсинга были изучены главным образом для прицентромерного гетерохроматина и тесно связанной с ним гетерохроматизации эухроматина при эффекте положения гена. Можно ли увидеть на цитологическом уровне уникальные "молчащие" гены, инактивированные в ходе онтогенеза? Политенные хромосомы дрозофилы в этом отношении являются уникальным объектом, как будто специально созданным природой для изучения данной проблемы.

Уже давно, с 1930-х гг., было известно, что в политенных хромосомах имеются районы, по своим свойствам очень похожие на прицен-

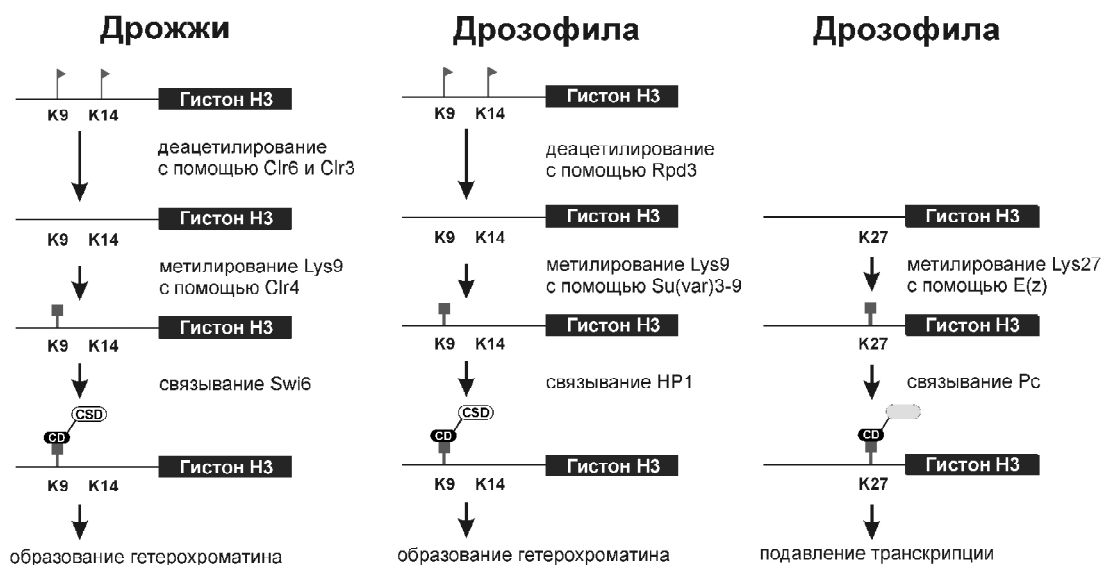


Рис. 1. Схема формирования сайленсинга в инактивированных районах с участием белков HP1 и Pc. Изображены молекулы гистона H3, в N-концевых участках которых аминокислоты лизин (K) в положениях 9 и 14 на первом этапе деацетируются с помощью деацетилаз. У дрожжей в этих процессах участвуют продукты генов *Clr6* и *Clr3*, у дрозофилы – *Rpd3*. На следующем этапе происходит метилирование этих аминокислот (обозначено квадратом) с помощью продуктов генов *Clr4* и *Su(var)3-9*. Затем с метилированными аминокислотами связывается белок, гомологичный у дрожжей и дрозофилы соответственно Swi6 и HP1 с образованием особого состояния – гетерохроматина. У дрозофилы обнаружен ещё один механизм формирования инактивированного состояния – с участием белков группы Polycomb (Pc). В этих районах метилирование лизина в положении 27 осуществляется с помощью продукта гена *E(z)*. По: (Д.Е.Коряков, неопубл.).

тромерный гетерохроматин (ПГ). Они были названы интеркалярным гетерохроматином (ИГ) (Kaufmann, 1939).

В предыдущие годы в лаборатории молекулярной цитогенетики ИЦиГ СО РАН была проделана большая работа по описанию и инвентаризации районов ИГ. Было установлено, что кроме плотной упаковки и транскрипционной неактивности, оба типа районов (ПГ и ИГ) демонстрируют позднюю репликацию в S фазе, недорепликацию в ходе циклов политенезации; в результате локальной недорепликации ДНК хромосомы в районах ИГ часто образуют разломы, "слабые" точки. Было выделено 240 отдельных районов, которые по этим критериям следует относить к ИГ.

В последние годы изучение инактивации уникальных генов, проводимое на модели гомеозисных генов, показало, что этот тип сайленсинга в принципе сходен с таковым для ПГ; он осуществляется с помощью структурно и

функционально сходных белковых комплексов, в состав которых входят белки Pc-группы. Оказалось, что по крайней мере два комплекса гомеозисных генов *BX-C* и *ANTP-C* локализируются в сайтах ИГ. Это позволило предположить, что и другие сайты ИГ содержат "молчашие" уникальные гены (большие тракты повторов в ИГ не обнаружены).

Толчком для дальнейшего развития этого представления послужило открытие в нашей лаборатории в 1997 г. гена *SuUR*. Продукт этого гена локализован как в ПГ, так и в ИГ; мутация *SuUR* супрессирует полностью недорепликацию ДНК в ИГ, частично в ПГ, в результате исчезают разломы в ИГ, а из ПГ возникают новые полностью политенизированные участки в основании плеч хромосом (Belyaeva *et al.*, 1998).

Напротив, добавочные дозы *SuUR* усиливают недорепликацию, о чём говорит увеличение частоты разломов в ИГ, усиление экто-

пических контактов между ними. Следует подчеркнуть, что *SuUR* на настоящий момент времени – единственный известный ген, продукт которого локализован во всех сайтах ИГ и ПХ; он контролирует репликацию в обоих типах гетерохроматиновых районов. Одинаковый эффект на ПГ и ИГ наблюдается при гиперэкспрессии гена *SuUR* в клетках слюнных желез с помощью системы трансгенных конструкций *Sgs-GAL4/UAS-SuUR*. В обоих типах районов структура хромосом резко изменяется – образуются гигантские вздутия, пузыри (рис. 2). Возникает вопрос, насколько функция *SuUR* в

SWI/SNF2, обладающим способностью ремоделировать нуклеосомы (рис. 3).

Для выяснения роли отдельных доменов мы провели функциональную диссекцию гена *SuUR*. Были получены мутации этого гена, находящегося в составе *UAS-SuUR⁺* транспозона, затрагивающие разные участки белка (рис. 3). В результате мы получили возможность гиперэкспрессировать разные фрагменты белка в системе *GAL4-UAS* и изучать их эффекты, способность к связыванию с хромосомами, взаимодействие с эндогенным белком и сравнивать эти характеристики с таковыми

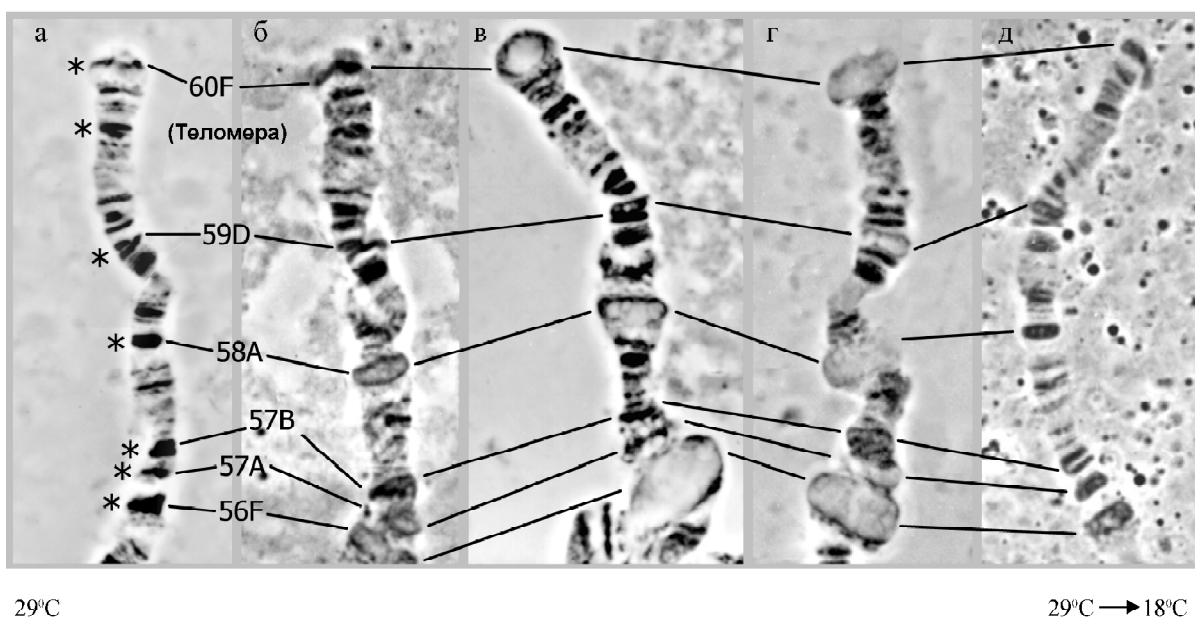


Рис. 2. Обратимая модификация структуры (а-д) материала политенных хромосом в участках сайленсинга в результате повышенной экспрессии (гиперэкспрессии) гена *SuUR⁺*.

В геноме дрозофилы с помощью трансформации введены два транспозона, один из которых содержит промотор гормона-регулируемого гена *Sgs3* и активатор транскрипции *GAL4* из генома дрожжей, второй транспозон содержит участок *UAS*, воспринимающий сигнал от *GAL4*, и подшитый к нему изучаемый ген *SuUR* дрозофилы. Под действием гормона промотор активируется и начинается синтез белка-активатора транскрипции *GAL4*, который связывается с последовательностью *UAS*, инициируя и многократно усиливая транскрипцию гена *SuUR*. Белок *SuUR* усиленно связывается с участками его нормального расположения (помечены звездочками на рис. а), в результате чего хроматин этих районов декомпактизуется с образованием специфических вздутий. При понижении температуры до 18 °С интенсивность синтеза белка *GAL4* снижается и вновь происходит компактизация материала хромосомы – вздутия исчезают.

репликации связана с механизмами генетического сайленсинга?

Ген *SuUR* был клонирован, определена его структура и первичная последовательность. Хотя не было выявлено его полной гомологии ни с одним из известных генов, *SuUR* имеет домен с частичной гомологией к белкам типа

полноразмерного белка. Были использованы антитела на разные участки белка *SuUR*, драйверы *GAL4* разной "силы", разные генетические фоны (присутствие или отсутствие эндогенного белка *SuUR*).

Результаты этой работы позволили выделить в структуре белка два домена, обеспечи-

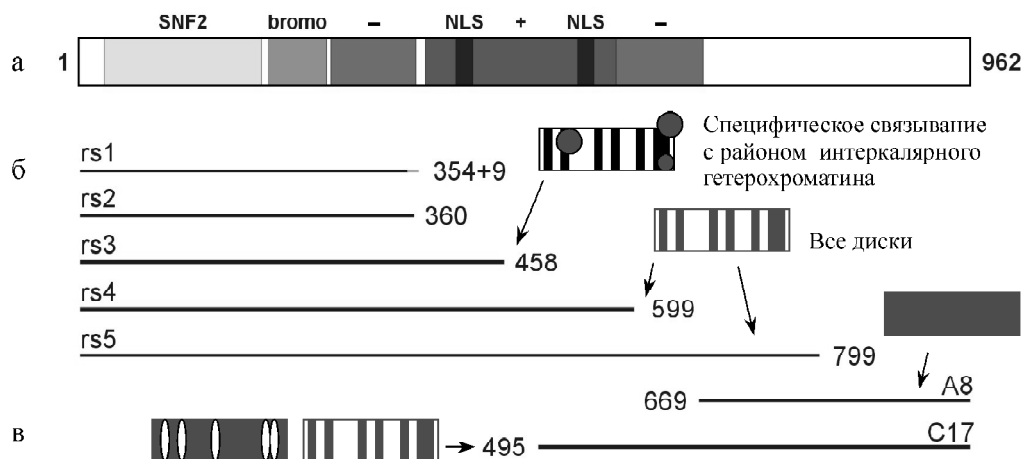


Рис. 3. Функциональная организация молекулы белка SuUR.

По результатам определения последовательности нуклеотидов в ней выделены домены: SNF2, bromo-домен, сигналы ядерной локализации (NLS) (а). С помощью мутагенеза были получены фрагменты гена *SuUR*, кодирующие различные участки белка – от первой до 354, 360, 458, 599 или 799 аминокислоты от N-конца белка (б). Отдельно были синтезированы 3'-участки гена *SuUR*, кодирующие аминокислоты от 669 или 495 до С-конца (962 аминокислота) белковой молекулы. Эти фрагменты гена *SuUR* были подшиты под UAS-последовательность и с помощью трансформации введены в геном дрозофилы. Затем с помощью подхода, описанного на рис. 2, заставили эти фрагменты сверхэкспрессироваться. Показано, что сверхэкспрессия различных функциональных доменов белковой молекулы приводит к существенным сдвигам в локализации белка в хромосомах (поперечно исчерченные фрагменты) (в).

вающих связывание с хромосомами, регистрируемое по появлению антител на белок SuUR – один в N-концевой части (домен гомологии с SWI/SNF2), другой – в С-концевой. N-концевой участок необходим для специфического связывания с ИГ, для формирования пузырей. В С-концевом фрагменте белка находится последовательность, обеспечивающая функцию задержки репликации ДНК и эндорепликации в клетках слюнных желез.

Полученные конструкции позволяют вести дальнейший анализ функциональной роли продукта *SuUR*, в частности его взаимодействие с белками сайленсинговых комплексов Pc-G, HP1 и др.

Уникальные свойства гена *SuUR* позволили использовать его как инструмент для изучения информационного содержания районов ИГ. Этот вопрос остро стоял на протяжении нескольких десятков лет; кроме данных о локализации двух комплексов гомеозисных генов и кластера гистоновых генов в ИГ, мы ничего не знали о том, что представляют собой районы ИГ в генетическом

плане. Для решения этого вопроса мы разработали новый экспериментальный подход, используя линии дрозофилы с разными дозами гена *SuUR* и мiсгоаггау-анализ для получения профиля завершения репликации в политенных хромосомах слюнных желез. На микрочипы были нанесены ДНК около 11 тысяч генов дрозофилы, т.е. почти весь геном. Затем их гибридизовали с ДНК, выделенной из слюнных желез линий с 4 дозами *SuUR*⁺ (ДНК в ИГ в этих хромосомах сильно недопредставлена) и с нулевой дозой *SuUR*⁺ (у гомозигот по нулевому аллелю *SuUR* вся ДНК в ИГ реплицируется полностью). ДНК этих двух генотипов метилась разными цветами – красным и зелёным. По наличию сигналов разного цвета можно было судить о том, какие гены не представлены в хромосомах с 4 дозами *SuUR*, т.е. поздно реплицируются и недореплицируются. Было выявлено около 1200 таких генов.

Используя в дальнейшем компьютерный анализ и данные по локализации генов, полученные на основе полного секвенирования генома дрозофилы, мы "собрали" эти

гены в цитологических сайтах, которые оказались, как и предполагалось, сайтами ИГ. Мы получили протяжённость отдельных районов ИГ и состав генов в них. Всего было выявлено 70 таких районов. Все они имеют большую протяжённость – от 92 до 568 тысяч пар нуклеотидов и содержат от 6 до 41 гена. Таким образом, мы обнаружили, что районы ИГ представлены кластерами генов. Интересно отметить, что примерно 80 % этих кластеров из клеток слонных желез являются позднореплицирующимися в Кс клетках, что свидетельствует о сходстве репликационных программ, отражающих состояние сайленсинга в разных типах тканей. Наиболее важной особенностью кластеров генов в ИГ является специфика профилей их экспрессии. Недавно было обнаружено (Spellman, Rubin, 2002), что около 20 % генома дрозофилы представлено группами из 10–30 сходно экспрессируемых генов, хотя эти гены не обязательно функционально связаны. Такие корегулируемые группы генов были названы транскрипционными территориями.

Оказалось, что 54 % генных кластеров ИГ, выявленных в нашем исследовании, являются транскрипционными территориями, т.е. содержат гены со сходным профилем экспрессии. Таким образом, мы не только выявили информационное содержание 70 конкретных цитологически видимых районов ИГ в политенных хромосомах дрозофилы, но и обнаружили, что гены в кластерах ИГ координированно реплицируются и экспрессируются.

Можно сказать, что мы открыли новую особенность организации генома – кластерирование корегулируемых генов. Это открытие ставит много новых вопросов: о

формировании таких кластеров в эволюции, о механизмах, обеспечивающих координированную репликацию и экспрессию, и, наконец, что кажется наиболее интересным, о взаимоотношении систем, определяющих процессы репликации и состояние экспрессии генов. В этом плане кажется весьма перспективным дальнейшее исследование функциональной роли белка SuUR, обязательного компонента белков в сайтах поздней репликации, содержащих репрессированный генетический материал. В последние годы появились данные о взаимодействии белков, участвующих в ремоделировании хроматина и репликации (McNairn, Gilbert, 2003). Выявленные нами кластеры генов представляют удобную модель для изучения всех этих вопросов.

Литература

- Belyaeva E.S., Zhimulev I.F., Volkova E.I. *et al.* *Su(UR)ES* a gene suppressing DNA underreplication in intercalary and pericentric heterochromatin of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 7532–7537.
- Heitz E. Heterochromatin, Chromocentren, Chromomeren // Ber. Dtsch. Bot. Ges. 1929. V. 47. P. 274–284.
- Kaufmann B.P. Distribution of induced breaks along the X chromosome of *Drosophila melanogaster* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1939. V. 25. P. 571–577.
- McNairn A.J., Gilbert D.M. Epigenomic replication: linking epigenetics to DNA replication // BioEssays. 2003. V. 25. P. 647–656.
- Spellman P.T., Rubin G.M. Evidence for large domains of similarly expressed genes in the *Drosophila* genome // J. Biol. 2002. V. 1. P. 5.
- Turner B.M. Histone acetylation and an epigenetic code // BioEssays. 2000. V. 22. P. 836–845.