

УДК 576.315:576.316

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2014 г. **Н.Б. Рубцов**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: rubt@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 10 мая 2013 г. Принята к публикации 1 февраля 2014 г.

В марте 2000 г. было сделано заявление, которое произвело огромное впечатление даже на людей, далеких от биологии: геном человека секвенирован! Комментируя его, Бил Клинтон сказал, что это событие для человечества имеет значение большее, чем изобретение колеса, и он горд, что это произошло во время его нахождения на посту президента США. Секвенирование генома человека, несомненно, является огромным успехом современной биологии, но следует отметить, что секвенирование генома не означает его расшифровку. Сегодня геном человека и ряда других видов уже представлен в базах данных в виде последовательностей нуклеотидов, но оказалось, что можно и читать, и писать, понимая лишь небольшую часть написанного. В тексте «геном человека» мы понимаем отдельные «слова», а иногда и целые фразы. Однако выяснение правил языка, определяющих разбиение текста на абзацы, главы и отдельные тома, представляет собой отдельную задачу, которая, похоже, оказалась более сложной, чем простое секвенирование: «чтение–записывание» в длинные цепочки символов А, Т, G, С.

Некоторые проблемы обусловлены тем, что в реальной жизни геном является трех- или даже, учитывая время, четырехмерным, а записали его пока лишь в одномерном варианте, потеряв не только информацию, связанную с его пространственной организацией, но и оставив на будущее изучение самих принципов этой организации. Возможно, ситуация является еще более сложной. В ДНК записаны не только наследственная информация в виде последовательности нук-

леотидов, необходимая для построения белков, но и программа ее реализации: когда и в каких клетках будет считываться информация с различных участков ДНК. Уже сейчас известно множество механизмов и систем кодирования, используемых для управления работой генов не только последовательности нуклеотидов в определенных участках генома. К таким механизмам относятся метилирование ДНК и модификации гистонов, доменная организация хромосомы и другие особенности генома, которые определяют различия между индивидуальными клетками, возникающие в ходе их дифференцировки в клетки различных тканей. То есть генетический код, определяющий аминокислотную последовательность белков через последовательность нуклеотидов, является только одним из существующих кодов.

В настоящей статье мы рассмотрим только одну из проблем – пространственную организацию генома. Более того, для упрощения решения этой задачи ограничимся рассмотрением генома соматических клеток млекопитающих, что позволит оставить за рамками настоящей статьи такие особые варианты организации генома, как политенные хромосомы, хромосомы типа ламповых щеток, а также специфическую реорганизацию генома в мейозе.

ХРОМОСОМА КАК СТРУКТУРНЫЙ ЭЛЕМЕНТ ГЕНОМА

Геномы практически всех эукариот представляют собой совокупность материала отдельных

хромосом и внехромосомные нуклеиновые кислоты. Рассматривая геном как огромную библиотеку, хромосому можно представить как отдельный том, в котором записана часть наследственной информации. Эти тома имеют все необходимые элементы, определяющие их индивидуальность: теломеры и центромеры представляют обложки и внешнюю часть их переплета, матрикс и скэффолд-ассоциированные районы – внутреннюю часть переплета, к которым присоединены петли ДНК – страницы книги с написанным на них текстом. Длительное время представления об организации хромосом человека формировались главным образом на основании данных, полученных при изучении метафазных хромосом, так как существующие в то время методы не позволяли визуализировать в интерфазном ядре индивидуальные хромосомы. Интерфазные хромосомы в ядре расположены слишком плотно друг к другу и представляют собой очень нежные структуры. Только в митозе и мейозе хромосомы млекопитающих преобразуются в элементы, способные сопротивляться внешним воздействиям и сохранять свои целостность и форму. Без таких изменений в их организации развести хромосомы по дочерним клеткам было бы просто невозможно.

В изучении хромосом и в формировании представлений об их организации можно выделить несколько этапов. Первый из них был посвящен главным образом поиску адекватных подходов и разработке соответствующих методик для проведения анализа морфологии хромосом. Значительный вклад в развитие цитогенетики на этом этапе внесли такие выдающиеся отечественные исследователи, как П.И. Живаго, А.Г. Андрес, М.С. Навашин. Началом второго этапа заслуженно считается 1956-й г. – год опубликования работ, в которых впервые были представлены качественные метафазные хромосомы человека, правильно подсчитано их число и дано детальное описание их морфологии (Ford, Hamerton, 1956; Tjio, Levan, 1956). Данный этап развития цитогенетики характеризуется интенсивными исследованиями морфологии митотических и мейотических хромосом млекопитающих, началом работ, посвященных изучению структурно-функциональной организации хромосомы. В это же

Хромосомы млекопитающих – нуклеопротеидные структуры клетки, в которых сосредоточена большая часть наследственной информации и которые предназначены для ее хранения, реализации и передачи. Обязательным элементом хромосомы является центромера.

время были проведены первые работы по изучению репликации хромосом и их отдельных районов, разработаны методы введения в ДНК хромосом радиоактивных предшественников, методы радиографии хромосомных препаратов. Были описаны первые примеры хромосомных патологий у человека, показано значение нарушения хромосомного баланса.

Начало следующего этапа (конец 1960-х – начало 1970-х годов) было обусловлено появлением принципиально новых методов идентификации хромосом млекопитающих и их отдельных районов. Цитологический анализ с помощью дифференциального окрашивания (GTG-, RBG-, QFQ-бэндинг) позволил идентифицировать участки хромосом по разнице в интенсивности окрашивания входящих в их состав сегментов (ISCN, 2009). **Выявленные** в хромосомах чередующиеся сегменты (бэнды) отличались не только по интенсивности окрашивания, но и еще по целому ряду характеристик. Так, интенсивно окрашиваемые GTG-методом сегменты хромосом (**G-бэнды**) оказались обогащены АТ-парами (аденин-тимидин), длинными диспергированными повторами (LINEs – Long Interspersed Nuclear Elements), их хроматин был более конденсирован, репликация ДНК происходила в середине и второй половине S-фазы. **G-бэнды характеризуются меньшей** концентрацией генов, а гены, локализованные в этих бэндах, кодируют факультативные биохимические маркеры. Сегменты хромосом, менее интенсивно окрашиваемые этим методом, (R-бэнды) обогащены GC-парами (гуанин-цитозин), короткими диспергированными повторами ДНК (SINEs – Short Interspersed Nuclear Elements), их хроматин менее конденсирован, репликация ДНК происходит в начале S-фазы. В R-бэндах **выше концентрация генов, много** активно работающих генов, кодирующих

конститутивные биохимические маркеры (Chakalova *et al.*, 2005). Появление технологий получения и анализа межвидовых гибридов соматических клеток положило начало картированию геномов млекопитающих (Kamarck *et al.*, 1984).

В 1970-е годы началось изучение принципов организации хромосом человека в интерфазном ядре не на модельных объектах, а в прямых экспериментах (Cremer *et al.*, 1993). В первых исследованиях использовали луч лазера для индукции микроповреждений хромосом в интерфазе. Выявление этих повреждений проводили спустя несколько часов, анализируя метафазные хромосомы. Полученные результаты привели к формированию представлений о существовании внутри интерфазного ядра территорий, занятых материалом отдельных хромосом, однако настоящий прорыв в этой области стал возможен лишь благодаря огромным успехам в развитии молекулярной биологии и микроскопической техники в конце XX и начале XXI вв.

Следующий этап характеризовался широким внедрением в практику хромосомного анализа молекулярно-цитогенетических методов, в первую очередь гибридизации нуклеиновых кислот, иммуоокрашивания и новой микроскопической техники. В результате были проведены обширные исследования, базирующиеся на локализации в составе хромосомы конкретных последовательностей ДНК, РНК и белков. Быстрое развитие лазерной сканирующей микроскопии и успехи генной инженерии обеспечили изучение трехмерной и прижизненной организации хромосомы, анализ архитектоники всего интерфазного ядра, пространственного взаимодействия хромосомных районов и макромолекулярных комплексов. Исследования, проводимые в этом направлении, варьировали от одновременной визуализации в ядре всех хромосом человека до слежения за организацией и локализацией индивидуальных локусов в ядре живой клетки (Robinett *et al.*, 1996; Cremer *et al.*, 2008). Развитие технологии сравнительной геномной гибридизации, биочипов и высокопроизводительных методов секвенирования легло в основу анализа хромосомных аномалий человека с помощью детального анализа геномной ДНК пациента. Развитие новых технологий позволило приступить к изучению принципов пространственной

организации ядра с помощью компьютерного анализа расположенных близко друг к другу участков ДНК и определенных белков.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМОСОМ И ИНТЕРФАЗНОГО ЯДРА В ЦЕЛОМ

В результате разработки методов получения препаратов метафазных хромосом стали возможными проведение анализа числа хромосом, описание их морфологии и размеров. Правда, физические размеры и морфология хромосомы на цитологических препаратах очень сильно зависели от стадии митоза и условий приготовления соответствующего цитологического препарата. Прошло много лет, прежде чем было показано, что размеры и морфология хромосом в G2 стадии клеточного цикла мало отличаются от реальных митотических хромосом (рис. 1). Развитие клеточной и молекулярной биологии сделало возможными визуализацию индивидуальных хромосом в интерфазном ядре, их трехмерную микроскопию и даже идентификацию отдельных районов. Исследования в этом направлении были проведены как на фиксированной, так и на живых клетках (Robinett *et al.*, 1996; Cremer *et al.*, 2008). Оказалось, что длинные профазные и прометафазные хромосомы, хорошо знакомые биологам по цитологическим препаратам, представляют собой просто результат растяжения хромосом в процессе расплывания их на стекле. На более поздних стадиях митоза хромосомы более эффективно сопротивляются растяжению и сохраняют свои естественные размеры. Механизм изменения растяжимости хромосом недавно был достаточно подробно описан (Рубцов, 2007). В исследованиях фиксированных клеток преимущественно используют 3D-FISH и 3D-микроскопию. В экспериментах на живых клетках используются разнообразные способы флюоресцентного мечения и 4D-микроскопия. Так, для прижизненных наблюдений за индивидуальными хромосомами флюоресцентную метку сначала вводили в ДНК всех хромосом культивируемых *in vivo* клеток, а затем питательную среду заменяли на свободную от флюорохромоов, клеткам давали возможность пройти несколько клеточных циклов. В результате в культуре появлялись клетки

с разным числом меченых хромосом. Последующая трех- или четырехмерная микроскопия, выполненная с мультифотонным возбуждением флюорохрома, позволяла проследить за индивидуальной хромосомой или хромосомным районом (результатом сестринских хроматидных обменов) несколько клеточных циклов (Visser *et al.*, 2000). Несомненным преимуществом прижизненных наблюдений является полное сохранение изучаемого образца, что, к сожалению, не может быть обеспечено в случае фиксации клетки и последующего проведения FISH или иммуноокрашивания.

Были созданы системы наблюдения в живой клетке за отдельными локусами хромосомы, например, специальные клеточные линии, в одной из хромосом которых был встроены кластер из 256 копий *lac*-оператора, а в другой хромосоме — ген, кодирующий *lac*-репрессор, слитый с геном зеленого флюоресцентного белка (GFP). Сигнал GFP позволял следить в живой клетке за хромосомным районом, несущим кластер копий *lac*-оператора (Robinett *et al.*, 1996).

Результаты изучения пространственной организации интерфазного ядра с использованием FISH, флюоресцирующих белков и конфокальной микроскопии привели к формированию представления об интерфазном ядре как совокупности хромосомных территорий и межхроматинового пространства (Cremer T., Cremer M., 2010).

Широкое использование терминов «хромосомная территория» и «межхроматиновое пространство» заставляет более внимательно рассмотреть их смысловое значение. Это тем более важно, что термин «хромосомная территория» в современной литературе не означает ни интерфазную хромосому, ни занимаемое ею пространство. Обычно термин «хромосомная территория» означает ту часть интерфазного ядра, в которой после проведения трехмерной FISH с хромосомоспецифичной ДНК-пробой при 3D-микроскопии выявляется соответствующий сигнал. Отдельные петли ДНК хромосомы могут оказаться далеко за пределами «хромосомной территории» (Mahy *et al.*, 2002). Индивидуальная нить ДНК, которая не выявляется при 3D-FISH хромосомоспецифичной ДНК-пробы и 3D-микроскопии, в то же время хорошо видна на оптических срезах при исполь-

зовании в FISH ДНК-проб, созданных на основе больших клонированных фрагментов ДНК.

В «межхроматиновом пространстве» находится основная часть ферментов, обеспечивающих транскрипцию и сплайсинг РНК (Schermetelleh *et al.*, 2001). Концентрация хроматина в «межхроматиновом пространстве» значительно меньше, чем в хромосомных территориях, что не позволяет визуализировать его с помощью обычных методов. Тем не менее в «межхроматиновом пространстве» находится значительная часть транскрипционно активного хроматина. Его комплексы с факторами транскрипции и сплайсинга РНК называют «фабриками транскрипции» (Chakalova *et al.*, 2005). Транскрипционно активный хроматин часто находится на периферии хромосомных территорий, где уровень его упаковки ниже, чем внутри хромосомных территорий (Cremer T., Cremer M., 2010). Для отдельных генов показано, что транскрипционная активность связана с положением генов относительно межхроматинового пространства и периферийного, менее плотно конденсированного хроматина хромосомных территорий. Предложен ряд гипотез, учитывающих различные варианты дифференциальной конденсации хроматина. Возможно, что хромосомы действительно содержат домены, отличные по своей пространственной организации. Пространственная организация некоторых из них может лучше всего описываться в терминах: гигантские блуждающие петли, складчатый характер поверхности хромосомных терри-

Хромосомная территория – часть интерфазного ядра, в которой после проведения трехмерной FISH с хромосомоспецифичной ДНК-пробой при 3D-микроскопии выявляется соответствующий сигнал. Хромосомная территория содержит большую часть материала соответствующей хромосомы.

Межхроматиновое пространство – пространство интерфазного ядра, в котором при использовании общих методов окраски хроматина он не выявляется в ходе 3D-микроскопии. Содержит факторы репликации, транскрипции, сплайсинга; вновь синтезированную РНК, отдельные петли деконденсированного хроматина.

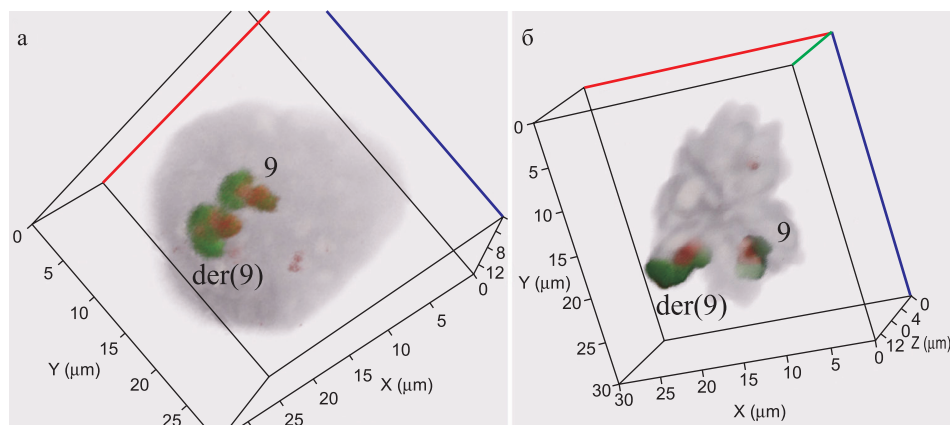


Рис. 1. Интерфазные (а) и метафазные (б) хромосомы эмбриональной стволовой клетки человека. Трехмерная реконструкция результатов лазерной сканирующей микроскопии. 3D-флуоресцентная гибридизация *in situ*.

Зеленый сигнал – С-негативные районы хромосом 9 и der(9), красный сигнал – С-позитивные районы хромосом 9 и der(9). Общая окраска хромосом красителем DAPI представлена серым цветом.

торий или плотность упаковки их хроматина. На структурно-функциональную организацию других влияет их удаленность от гетерохроматиновых районов хромосом. Стоит также отметить, что размер доменов обычно варьирует в пределах одного млн п.о., но они могут быть объединены в более крупные комплексы, определяющие взаимоотношение участков хромосомных территорий с межхроматиновым пространством (Cremer T., Cremer M., 2001).

Сравнение интерфазной хромосомы с привычной метафазной хромосомой, распластанной на стекле или визуализированной с помощью 3D-FISH и конфокальной микроскопии (рис. 1), выявило значительное сходство в их организации: плечи хромосом в интерфазе формируют свои территории; внутри плеч крупные районы расположены в одинаковом порядке (Dietzel *et al.*, 1998; Lemke *et al.*, 2002). Различия проявляются при рассмотрении районов меньшего размера и увеличиваются в период репликации ДНК этих районов. Вероятно, это обусловлено общим для большинства клеток правилом: локализацией рано реплицирующейся ДНК рядом с межхроматиновым пространством и непосредственно внутри него, тесным контактом поздно реплицирующегося хроматина с ядерной ламинной. Такое распределение хроматина в ядре кажется вполне функциональным, так как рано реплицирующийся хроматин является транскрипционно активным и следует ожидать его локализацию в

районах с оптимальными условиями для взаимодействия хроматина с факторами транскрипции. Поздно реплицирующийся и транскрипционно неактивный хроматин может быть доступен для ферментов репликации лишь в относительно короткий период **S-фазы**, когда происходит удвоение его ДНК. Описаны примеры такого хроматина. Было показано, что во время репликации ДНК происходят его перемещение во внутренний компартмент ядра и уменьшение уровня его конденсации (Li *et al.*, 1998).

Рассматривая пространственную организацию интерфазной хромосомы млекопитающих, необходимо учитывать ее продольную дифференциальную организацию и существование принципиальных различий в организации границ хромосомы с окружающим ее пространством ядра. В тесном контакте с ядерной ламинной находится конденсированный, поздно реплицирующийся и транскрипционно неактивный хроматин, входящий главным образом в **С- и G-бэнды хромосом**. В межхроматиновом пространстве и в прилегающих к нему участках хромосомных территорий находится преимущественно слабо конденсированный, рано реплицирующийся и транскрипционно активный хроматин, в основном материал **R-сегментов** хромосом, обогащенный генами. Такое распределение хроматина приводит к формированию асимметрии интерфазной хромосомы относительно ее оси. Если в фиксированной метафаз-

ной хромосоме, распластанной на стекле, за счет ее растяжения мы наблюдаем чередование R- и G-бэндов, то в сохранивших свою исходную пространственную организацию интерфазной и метафазной хромосомах имеет место частичное пространственное объединение хроматина R-бэндов и G-бэндов (Рубцов, 2007).

Для большинства клеток характерна локализация материала R-бэндов во внутреннем компартменте интерфазного ядра, тогда как материал G-бэндов локализован преимущественно на периферии ядра, в контакте с инвагинациями ядерной ламины и на периферии ядрышек. ДНК C-бэндов локализована на периферии ядра, в контакте с ядерной оболочкой, и на периферии ядрышек (Sadoni *et al.*, 1999). Последнее обусловлено тем, что кластеры рибосомных генов фланкированы кластерами повторяющихся последовательностей ДНК. На рис. 2 приведена схема наиболее типичного расположения материала R-, G- и C-бэндов в метафазных хромосомах и ядрах клеток млекопитающих (стандартный тип). В этом отношении неожиданными оказались результаты И. Соловей с коллегами (Solovei *et al.*, 2009), которые обнаружили в определенных клетках сетчатки глаза у видов с ночным типом зрения

Бэнды хромосом – участки хромосом, четко отличающиеся от соседних при окраске хромосом соответствующими методами.

Сегментный принцип организации хромосом млекопитающих – хромосомы представляют собой чередование R- и G-бэндов со вставками C-бэндов. Данные сегменты отличаются по уровню конденсации на разных стадиях клеточного цикла, времени репликации, проценту GC-пар, обогащению различными типами повторов, концентрации и типу входящих в их состав генов.

«инвертированный тип» локализации материала R-, G- и C-бэндов: в центре ядра находилась собранная в единый блок ДНК C-бэндов хромосом, их окружал материал G-бэндов, материал R-бэндов находился на периферии ядра. Такой тип организации ядра снижал рассеяние света при его прохождении к рецепторам.

Анализ филогенетических отношений между видами, у которых в клетках сетчатки глаза был обнаружен такой «инвертированный тип» локализации материала R-, G- и C-бэндов, указывает на его неоднократное и независимое возникновение. Последнее возможно лишь в

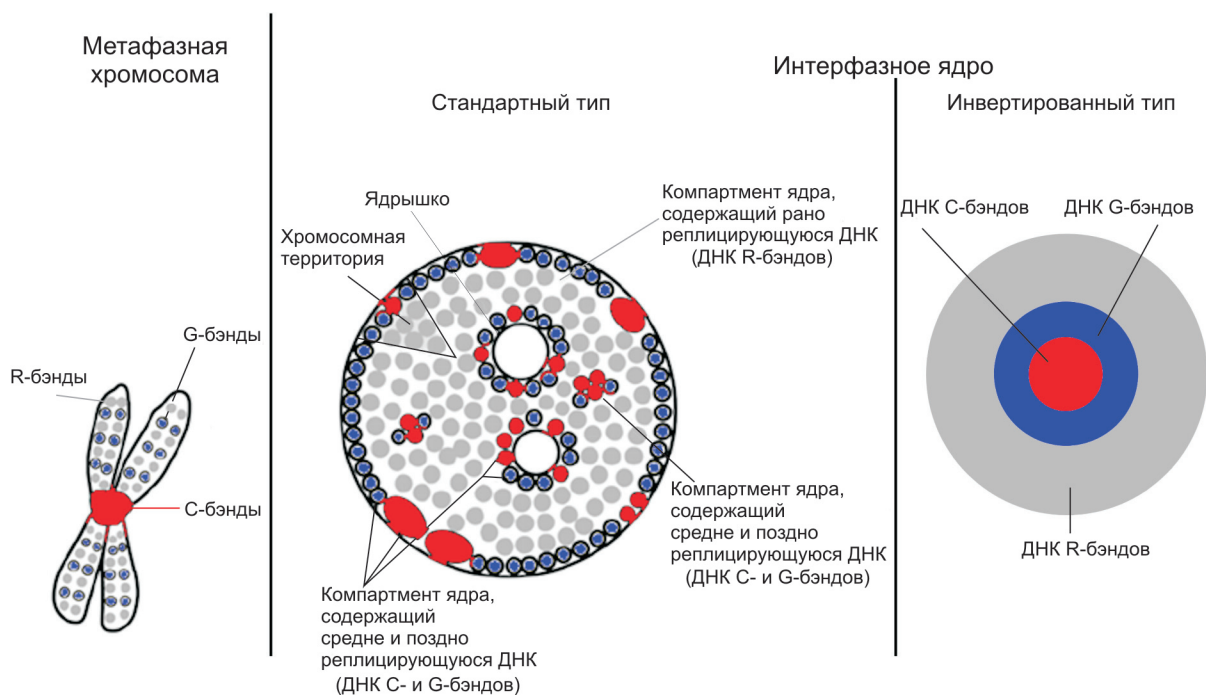


Рис. 2. Распределение материала C-, G- и R-бэндов в метафазной хромосоме и интерфазных ядрах (пояснения в тексте).

«Стандартный тип» локализации хроматина в интерфазном ядре – локализация материала R-бэндов во внутреннем компартменте интерфазного ядра, тогда как материал G-бэндов локализован преимущественно на периферии ядра, в контакте с инвагинациями ядерной ламины, и на периферии ядрышек. ДНК C-бэндов локализована на периферии ядра в контакте с ядерной оболочкой и на периферии ядрышек. Последнее обусловлено тем, что кластеры рибосомных генов фланкированы кластерами повторяющихся последовательностей ДНК.

«Инвертированный тип» локализации хроматина в интерфазном ядре – в центре ядра находится собранная в единый блок ДНК C-бэндов хромосом, их окружает материал G-бэндов, материал R-бэндов находится на периферии ядра. Такой тип организации ядра выявлен в определенных клетках сетчатки глаза у видов млекопитающих с ночным типом зрения. Он снижает рассеяние света при его прохождении к рецепторам.

том случае, если в клетках млекопитающих уже имеются механизмы, способные перестроить архитектуру ядра соответствующим образом. Действительно, известно, что на определенной стадии мейоза в сперматогенезе происходит пространственное сближение районов прицентромерного гетерохроматина с формированием единого хромоцентра, а организация хромосомы, при которой происходит пространственное объединение материала R-бэндов и G-бэндов, уже обсуждалась выше. Для возникновения «инвертированного типа» организации интерфазного ядра, вероятно, требуется еще формирование в центре ядра плотной сети из инвагинаций ядерной ламины.

РЕОРГАНИЗАЦИЯ МАТЕРИАЛА ХРОСОМ В КЛЕТОЧНОМ ЦИКЛЕ

После завершения секвенирования генома человека и ряда других видов могло показаться, что вопрос о пространственной организации индивидуальных хромосом и всего интерфазного ядра может быть быстро решен с помощью биоинформатических методов построения соответствующих моделей. Однако он остается

открытым и актуальным по настоящее время. Было показано, что локализация конкретной последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК, в хромосоме как таковой и в фиксированной хромосоме, распластанной на стекле, может значительно отличаться. Более того, порядок расположения фрагментов ДНК вдоль ее оси в фиксированной и распластанной на стекле хромосоме может отличаться от порядка соответствующих им последовательностей нуклеотидов, определенного в результате секвенирования. Это обусловлено как технической проблемой уплощения хромосомы при приготовлении цитологического препарата, так и процессами «набухания и растяжения» хромосомы, происходящими в это время. Данный феномен наглядно проявляется при анализе хромосомных транслокаций с помощью многоцветной FISH: в районах разрывов-соединений хромосомных районов наблюдается общая зона сигналов, относящихся к разным хромосомам. Детальный анализ зависимости физического расстояния между конкретными фрагментами ДНК на препарате метафазных хромосом показал существование различных механизмов, определяющих физическое расстояние между участками ДНК, локализованными в пределах 2 млн п.о., и участками ДНК, удаленными друг от друга (Yokota *et al.*, 1995). Данные результаты хорошо укладываются в представления о существовании базовых элементов эухроматиновых районов хромосом, имеющих близкую внутреннюю структурно-функциональную организацию, отличную от таковой соседних элементов. Если в пределах хромосомного района размером около 2 млн п.о. основной вклад в определение физического расстояния между участками ДНК вносит структурно-функциональная организация базовых элементов, то для удаленных районов более важными являются механизмы, определяющие расстояние между этими элементами хромосомы.

Попытки построения простых моделей хромосомы на основании данных о соотношении GC/AT пар оказались малоэффективными. Вероятно, для определения статуса бэнда имеют значение также соотношение GC/AT пар соседних бэндов и существование иерархии внутри бэндов одного типа. Последнее ярко проявляется в дифференциальной конденсации

ДНК хромосомных районов в ходе митоза. Следует отметить, что при приготовлении цитологических препаратов изменение конденсации ДНК проявляется как изменение способности хромосомного района сопротивляться внешним воздействиям. В конце интерфазы размеры и морфология хромосомы мало отличаются от размера и морфологии митотической хромосомы.

БАЗОВЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ЭУХРОМАТИНОВЫХ РАЙОНОВ ХРОМОСОМ

Длительное время полагали, что полногеномное секвенирование должно позволить очень точно описать различия в составе ДНК базовых элементов эухроматиновых районов хромосом и подтвердить уже написанное в многочисленных учебниках: хромосомные бэнды отличаются по концентрации генов, локализации генов, кодирующих конститутивные и факультативные биохимические маркеры, времени репликации ДНК, проценту GC-пар, обогащению SINEs и LINEs. Базовые элементы имеют общую регуляцию репликации, уровня конденсации хроматина и, как следствие, некий общий уровень организации, определяющий возможности транскрипционной активности входящих в их состав генов. Размер базовых элементов эухроматиновых районов хромосом составляет около 1 млн п.о. (в ряде работ по изучению структурно-функциональной организации хромосомы для этого базового элемента используется термин «1 Mb субструктура»).

К сожалению, надежды на то, что контекстный анализ последовательности оснований в составе хромосомы позволит точно определить границы «1 Mb субструктур», оправдались далеко не полностью. Соответствующие исследования были проведены, но полученные данные наглядно демонстрировали, что хромосома, построенная *in silico* при использовании простых критериев обогащенности ДНК GC-парами, имеет очень мало общего с реальной хромосомой. Существенно лучшие результаты были получены при попытках сравнения соседних участков хромосом. Эффективность анализа хромосомных районов *in silico* во многом зависела от того, насколько точно можно отнести

«1 Mb субструктура» – базовые элементы хромосом млекопитающих имеют общую регуляцию репликации, уровня конденсации хроматина и, как следствие, некий общий уровень организации, определяющий возможности транскрипционной активности входящих в их состав генов; часто размер базовых элементов эухроматиновых районов хромосом близок к 1 млн п.о.

определенные последовательности нуклеотидов к конкретным элементам структурно-функциональной организации хромосомы. Проблема заключалась в том, что в эксперименте точность локализации конкретного района или события на препаратах митотических хромосом обычно измеряется в миллионах пар оснований. Тем не менее результаты некоторых исследований позволили провести детальное сравнение состава ДНК индивидуальных соседних бэндов и их пограничного района. Примером могут служить районы хромосом человека и мыши, прилежащие к гену *NFI*. Этот участок хромосом человека и мыши представлял собой часть G-бэнда, переходную зону и часть R-бэнда. Часть G-бэнда соответствует ДНК, обедненной GC-парами, часть R-бэнда – ДНК, обогащенной GC-парами, переходная зона умещалась на 5 тыс. п.о. (Schmegner *et al.*, 2005). Доказательство того, что переход от GC бедной к GC богатой ДНК является границей между G- и R-бэндами, было получено в тщательно выполненных экспериментах, показавших, что именно в этом месте происходит задержка репликации ДНК. Благодаря этому исследованию, можно было считать установленным, что пограничные зоны, по крайней мере некоторых соседних G- и R-бэндов, контрастно отличаются по содержанию AT и GC пар. К сожалению, так детально исследованных районов хромосом очень мало даже в настоящее время. Проверить, насколько широко распространены выявленные закономерности структурно-функциональной организации хромосомы, долгое время не представлялось возможным.

В мае 2012 г. Jesse R. Dixon с соавт. опубликовали работу (Dixon *et al.*, 2012), основной идеей которой было изучение пространствен-

ной организации хромосомы с помощью анализа относительного расположения различных участков ДНК, а точнее нитей хроматина. Для этого участки хроматина, расположенные в ядре так, что между ними возможны физические взаимодействия, были сшиты друг с другом обработкой формальдегидом. Далее проводилась серия процедур (подробнее в подписи к рис. 3), в результате которых близко расположенные участки ДНК оказывались участками одного фрагмента ДНК (рис. 3). Частота, с которой разные участки ДНК оказываются объединенными в один фрагмент, зависит от того, как часто они взаимодействуют в ядре. Для получения результата авторам статьи пришлось выполнить фантастическую по объему работу по секвенированию этих фрагментов и не менее большую работу по биоинформатическому анализу полученных последовательностей нуклеотидов. Анализ пространственной организации генома был выполнен для ядер эмбриональных стволовых клеток мыши и человека и ядер фибробластов человека. Он позволил выявить и охарактеризовать топологические домены хромосом. Их размер оказался, как и следовало ожидать, около 1 млн п.о. Границы

были определены с очень высокой точностью. Выявлялись одни и те же топологические домены при анализе разных клеточных типов. Более того, их сходство у человека и мыши указывало на высокий консерватизм в эволюции млекопитающих. Оказалось, что границы топологических доменов обогащены генами домашнего хозяйства, короткими диспергированными повторами, сайтами связывания CTCF, сайтами начала транскрипции и преимущественными местами локализации РНК-полимераз, а также генами транспортных РНК. Модифицированные гистоны также чаще ассоциированы с ДНК пограничных районов. Далеко не для всех границ свойственны все эти характеристики. Возможно, что именно их комбинации и определяют структурно-функциональное значение конкретного топологического элемента.

Значение полученных результатов еще предстоит осознать, но уже сейчас очевидно, что появился реальный шанс привлечь мощные биоинформатические методы для того, чтобы закрыть ряд «брешей», существующих в наших представлениях о хромосоме. Вероятно, что скоро для большинства хромосомных районов появится возможность их детального рассмот-

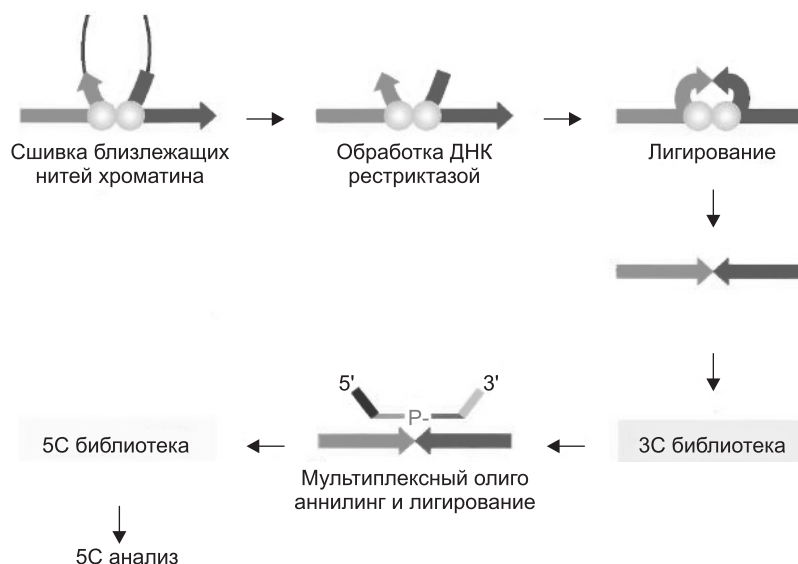


Рис. 3. Выявление топологических доменов в геномах млекопитающих.

Работа основана на анализе взаимного расположения нитей хроматина. Для этого участки хроматина, расположенные в ядре так, что между ними возможны физические взаимодействия, связывают между собой обработкой формальдегидом (cross-linking). Далее ДНК обрабатывается рестриктазой, а затем проводится лигирование. Таким образом, ДНК сначала оказывается разрезанной по определенным сайтам, а затем сшита по ним. В результате пространственно близко расположенные участки ДНК оказываются участками одного фрагмента. Полученные фрагменты ДНК амплифицируются в полимеразной цепной реакции. Проводятся их секвенирование и биоинформатический анализ.

рения на любом уровне разрешения: от бэнда метафазной хромосомы размером около 10 млн п.о., до индивидуальных нуклеотидов. Причем для каждого уровня разрешения будет доступна информация о структурно-функциональной организации рассматриваемого района.

ЛИТЕРАТУРА

- Рубцов Н.Б. Хромосома человека в четырех измерениях // Природа. 2007. № 8. С. 3–10.
- Chakalova L., Debrand E., Mitchell J. A. *et al.* Replication and transcription: shaping the landscape of the genome // Nat. Rev. Genet. 2005. V. 6. P. 669–677.
- Cremer M., Grasser F., Lanctôt C. *et al.* Multicolor 3D fluorescence in situ hybridization for imaging interphase chromosomes // Methods Mol. Biol. 2008. V. 463. P. 205–239.
- Cremer T., Cremer M. Chromosome territories // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010. V. 2. No. 3. a003889.
- Cremer T., Kurz A., Zirbel R. *et al.* Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1993. V. 58. P. 777–792.
- Dietzel S., Jauch A., Kienle D. *et al.* Separate and variably shaped chromosome arm domains are disclosed by chromosome arm painting in human cell nuclei // Chromosome Res. 1998. V. 6. P. 25–33.
- Dixon J.R., Selvaraj S., Yue F. *et al.* Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions // Nature. 2012. V. 485. No. 7398. P. 376–380.
- Ford C., Hamerton J. The chromosomes of man // Nature. 1956. V. 178. P. 1010–1013.
- ISCN (2009): International System of Human Cytogenetic Nomenclature / Eds L.G. Shaffer, M.L. Slovak, L.J. Campbell. Basel: S. Karger AG, 2009.
- Kamarck M., Barker P., Miller R. *et al.* Somatic cell hybrid mapping panels // Exp. Cell Res. 1984. V. 152. P. 1–14.
- Lemke J., Claussen J., Michel S. *et al.* The DNA-based structure of human chromosome 5 in interphase // Am. J. Hum. Genet. 2002. V. 71. P. 1051–1059.
- Li G., Sudlow G., Belmont A. Interphase cell cycle dynamics of a late-replicating, heterochromatic homogeneously staining region: precise choreography of condensation/decondensation and nuclear positioning // J. Cell Biol. 1998. V. 140. P. 975–989.
- Mahy N., Perry P., Bickmore W. Gene density and transcription influence the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH // J. Cell Biol. 2002. V. 159. P. 753–763.
- Robinett C., Straight A., Li G. *et al.* *In vivo* localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition // J. Cell Biol. 1996. V. 135. P. 1685–1700.
- Sadoni N., Langer S., Fauth C. *et al.* Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments // J. Cell Biol. 1999. V. 146. P. 1211–1226.
- Schermelleh L., Solovei I., Zink D., Cremer T. Two-color fluorescence labeling of early and mid-to-late replicating chromatin in living cells // Chromosome Res. 2001. V. 9. P. 77–80.
- Schmegner C., Berger A., Vogel W. *et al.* An isochores transition zone in the NF1 gene region is a conserved landmark of chromosome structure and function // Genomics. 2005. V. 86. No. 4. P. 439–445.
- Solovei I., Kreysing M., Lanctot C. *et al.* Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution // Cell. 2009. V. 137. P. 356–368.
- Tjio J.-H., Levan A. The chromosome number of man // Hereditas. 1956. V. 42. P. 1–6.
- Visser A., Jaunin F., Fakan S. *et al.* High resolution analysis of interphase chromosome domains // J. Cell Sci. 2000. V. 113. Pt 14. P. 2585–2593.
- Yokota H., van den Engh G., Hearst J. *et al.* Evidence for the organization of chromatin in megabase pair-sized loops arranged along a random walk path in the human G0/G1 interphase nucleus // J. Cell Biol. 1995. V. 130. P. 1239–1249.