

УДК 575.113 : 004.94 : 004.925.8+57:539.12.08; 615.8490

3D-МОДЕЛИРОВАНИЕ МАКРОАРХИТЕКТУРЫ ГЕНОМА НА ОСНОВЕ ЕГО СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ РАДИАЦИИ

*И. Д. Александров^{а, б}, М. В. Александрова^{а, б}, Н. С. Заикин^а,
В. В. Кореньков^а, О. В. Первушова^а, В. А. Степаненко^{а, 1}*

^а Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

^б Институт общей генетики РАН им. Н. И. Вавилова, Москва

В настоящее время, после 120 лет теоретических и экспериментальных исследований, вопрос о макроархитектуре генома, т. е. наиболее высоком уровне организации интерфазных хромосом в ядре соматических клеток, все еще остается нерешенным. Проблема же пространственной укладки интерфазных хромосом в гаплоидном ядре зародышевых клеток никогда даже не изучалась. Проведено 3D-моделирование укладки в пространстве части гаплоидного генома (вторая хромосома) в зрелых спермиях *Drosophila melanogaster* с использованием математических методов и методов визуализации макромолекулярных биоструктур. В качестве генетических маркеров для моделирования использовали частоту и локализацию на этой хромосоме сайтов инверсионных разрывов для 72 структурных мутантов *vg*, предполагая, что оба конца каждой инверсии сближены и образуют петли соответствующего размера. Для учета степени пространственной близости и визуализации петлевых структур хромосомы использовались современные методы 3D-моделирования с применением сплайнов, библиотеки Open GL, языка Delphi, программы Gmax. Согласно разработанной модели вся вторая хромосома в ядре зрелых спермиев упакована, по-видимому, в виде мегарозеточно-петлевой структуры, которая, можно полагать, является принципиальной и упорядоченной формой макроорганизации генома гаплоидных зародышевых клеток у высших организмов.

At present, after 120 years of the theoretical and experimental works, the issue of the genome macroarchitecture as the highest level of interphase chromosome organization in somatic cell nuclei remains still unresolved. The problem of the spatial arrangement of interphase chromosomes in haploid germ cells has never even been studied. A 3D simulation of packaging of the entire second chromosome in *Drosophila* mature sperms has been performed by using mathematical approaches and visualization methods to present macromolecular structure data. As genetic markers for simulation, frequency and location of the second inversion breakpoints for 72 structural *vg* mutants induced by ionizing radiation were used supposing that both ends of each inversion are topologically brought together forming loop of appropriate size. For the account of a degree of spatial affinity and visualization of chromosomal loops modern 3D-modeling methods with application of splines, libraries OpenGL, language Delphi, program Gmax were used. According to the model proposed, the entire second chromosome within mature sperm nuclei seems to be packaged in the form of a megarosette-loop structure which may be a basic principle of organization of the genome macro-architecture in animal haploid germ cells.

¹ Автор для корреспонденции: E-mail: vstep@jinr.ru

ВВЕДЕНИЕ

Понятие «геном», введенное классической генетикой для определения гаплоидного набора хромосом с локализованными в нем генами у многоклеточных организмов [1], в современной биологии и генетике распространено на генетический материал любого организма, наполнено новым, молекулярным содержанием и обозначает всю совокупность кодирующей (гены) и некодирующей («молчащая» или «избыточная») ядерной ДНК [2], ставшей главным предметом изучения нового научного направления — геномики. Среди главных задач геномики наряду с изучением структуры и функции кодирующей и некодирующей ДНК в их взаимосвязи в системе генома данного организма — выяснение общих принципов компактизации ДНК в интерфазных хромосомах (микроархитектура генома) и укладки самих хромосом в ограниченном пространстве клеточного ядра (макроархитектура генома).

Масштабные исследования последних трех десятилетий по микроархитектуре генома разных многоклеточных организмов завершили к настоящему времени идентификацией пяти основных и общих для всех эукариот иерархических уровней компактизации ДНК с образованием интерфазных хромосом (нити хроматина) — это нуклеосомный, нуклеомерный, соленоидный, микропетлевой и хромомерный уровни [3, 4].

Представления о макроорганизации или макроархитектуре генома на более высоких, чем хромомерный, уровнях до сих пор остаются весьма неопределенными, а существующие гипотезы, касающиеся исключительно генома соматических клеток, противоречивыми.

1. МАКРОАРХИТЕКТУРА ГЕНОМА: 120 ЛЕТ СПУСТЯ

Первая попытка реконструкции положения интерфазных хромосом в пространстве клеточного ядра относится к 1885 г., когда К. Рабл, исследуя положение хромосом в митозе растительных клеток, предложил модель полярной ориентации хромосом [5]. Согласно модели центромеры (и прицентромерный гетерохроматин) хромосом группируются в одной зоне ядра, их плечи лежат параллельно друг другу, а свободные (теломерные) концы сцеплены между собой в противоположной зоне ядра. Эта так называемая Rabl-ориентация интерфазных хромосом в последующие годы вплоть до настоящего времени находила свое подтверждение в работах целого ряда исследователей, имевших дело с быстро делящимися соматическими клетками животных или растений, тогда как на клетках другого типа получены прямо противоположные результаты [5]. Как справедливо отмечает Г. Саумвебер в заключение своего обзора, «...неопределенность наших знаний, касающихся расположения хромосом в пространстве интерфазного ядра, в настоящее время, в основном, обусловлена отсутствием подходящих методов для детального наблюдения и анализа без разрушения существующей организации». Истекшие со времени этого утверждения почти 20 лет мало что изменили в наших представлениях о пространственной организации интерфазной хромосомы, о чем свидетельствует обилие гипотез этой организации, главным образом, в соматических клетках. В частности, описывают ее в виде хаотично сложенных либо мелких (~ 100 тыс. пар оснований ДНК) петель [6, 7], либо более крупных радиальных петель, перемежаемых спиралевидными структурами [8], или гигантских (из нескольких млн пар оснований ДНК) петель [9].

Вопрос о макроархитектуре генома в гаплоидном ядре зародышевых клеток у высших организмов до сих пор остается малоизученным, главным образом, из-за отсутствия надлежащих методических подходов, которые позволили бы вести анализ, не нарушая характерную для этого генома организацию (более плотная упаковка нитей хроматина по сравнению с таковой в соматических клетках). Между тем понимание макроархитектуры гаплоидного генома представляет не только самостоятельный интерес ввиду важнейшей его функции (передача генетической информации в чреде поколений, обеспечивающая существование и эволюцию вида), но имеет, вероятно, и более общее значение, если иметь в виду утверждение М. Беннетта, что «...простой гаплоидный геном является базовой структурной единицей в ядерной архитектуре. Но каков порядок организации внутри этой структурной единицы?» [10].

В этой связи заметный интерес (как определенный прогресс в изучении обсуждаемого вопроса) представляет мегасоленоидо-розеточная модель надхромомерной организации интерфазного хроматина в зрелых гаметах (спермиях) самцов *D. melanogaster* [11], основанная на цитогенетических закономерностях образования радиационно-индуцированных мультилокусных делеций (локальные потери смежных дисков-хромомеров величиной 0,1–1,5 млн пар оснований ДНК) в области уникальных генов из трех разных районов генома этого многоклеточного организма. Если полагать, что постулируемая модель правильно описывает надхромомерный уровень организации «простого» гаплоидного генома, по-прежнему остается неясным, каким образом уложена вся мегасоленоидная нить интерфазной хромосомы в ограниченном пространстве ядра зародышевой клетки.

2. МАКРОАРХИТЕКТУРА ГЕНОМА: НОВЫЕ ПОДХОДЫ

Перспективным для изучения этого вопроса мог бы стать, по нашему мнению, анализ закономерностей образования более крупных, чем мультилокусные делеции, внутрихромосомных перестроек типа инверсий (перевертывание внутрихромосомных сегментов разной величины на 180°), формирование которых, как известно, требует пространственной близости двух двунитевых разрывов ДНК на обоих концах данной инверсии. Использование ионизирующего излучения для этих целей представляется наиболее перспективным перед другими генотоксикантами физической или химической природы вследствие прямого и локального действия радиации на «чувствительную» мишень (основание хромосомной петли, трансформируемой излучением в инверсию) без нарушения всей остальной молекулярной структуры генома. Одновременно другим важным и новым подходом к изучению рассматриваемого вопроса является анализ инверсий, которые имеют один и тот же по локализации на хромосоме (как бы фиксированный) двунитевой разрыв. Отбор таких инверсий возможен, если названный разрыв находится в области гена-репортера и он сопровождается мутационным изменением этого гена, которое идентифицируется традиционным генетическим анализом.

С учетом сказанного в серии радиационно-генетических экспериментов по облучению спермиев самцов γ -квантами ^{60}Co или нейтронами деления ($E_{\text{ср}} = 0,85 \text{ МэВ}$) в дозах 5–40 Гр нами впервые была получена для второй хромосомы генома *D. melanogaster* достаточно репрезентативная выборка (72) инверсий разной величины, отличительной особенностью которых является локализация одного из инверсионных разрывов всегда в области гена *vestigial* (*vg*, секция 49, 2R), а их вторые разрывы определенным неслучай-

ным образом распределены по длине всей хромосомы [12] (рис. 1). Это подтверждают результаты статистического анализа данных, подчиняющихся распределению Пуассона (частота возникновения таких инверсий составляет $\sim 2 \cdot 10^{-3}$ при дозе γ -излучения 10 Гр). Сравнение наблюдаемых частот разрывов с теоретически ожидаемыми для распределения Пуассона дает значение $\chi^2 \sim 50$, $p = 0,0026$ при $n = 4$ степенях свободы [13, 14].

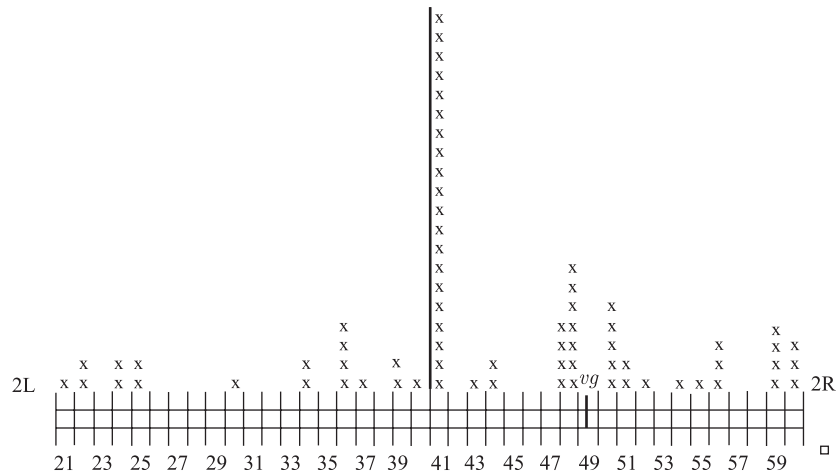


Рис. 1. Посекционное распределение второго инверсионного разрыва на карте политенной хромосомы 2 генома *D. melanogaster* для 72 независимо полученных в зрелых спермиях и наследуемых радиационно-индуцированных инверсий с первым разрывом в области гена *vg* (секция 49, 2R)

Как следует из рисунка, наиболее часто (20 случаев из 72 или $\sim 27,7\%$) в гаплоидном геноме зародышевых клеток самцов *D. melanogaster* пространственно сближены маркированный как *vg* (район хромосомы 2R, секция 49) и область гетерохроматина (секция 41) этой же хромосомы, что определяет петлевую структуру значительной величины (девять секций или почти 8 млн пар оснований ДНК, 8 Mb). Петли еще более крупного размера следует ожидать, если рассматривать инверсии с разрывами в дистальных концах 2L (секции 22–25) и 2R (секции 59–60) плеч хромосомы 2 (рис. 1). Размер инверсий в первом случае (секции 24–27) составляет около 31 Mb, а во втором случае (секций 10–11) около 12 Mb, если иметь в виду, что физическая длина ДНК эухроматина 2L-плеча хромосомы составляет 23 Mb, а 2R-плеча — 21,4 Mb и каждая секция содержит около 1,2 Mb в среднем [15]. Следовательно, и эти области хромосомы пространственно относительно близки (но находятся дальше, чем гетерохроматин) к району гена *vg*. В то же время в геноме других спермиев регулярно возникают и более мелкие инверсии (разрывы в секциях 48 и 50), свидетельствующие о наличии микропетель размером 0,5–1,5 Mb и, следовательно, о возможности индуцированного контакта и этих районов с геном *vg*.

Таким образом, результаты анализа локализации и частоты событий разрывов соединений для индуцированного радиацией набора инверсий позволяют полагать, что наиболее часто в гаплоидном ядре спермиев *D. melanogaster* пространственно сближены секция 49 с геном *vg* (средняя часть плеча 2R) и гетерохроматин (начало плеча 2R). Поскольку последний в блоке с гетерохроматином других хромосом локализуется на ядерной обо-

лочке [16], его можно рассматривать как своего рода «якорь» (или «точку опоры») для всей хромосомы, в области которого группируются основания петель, трансформируемых радиацией в инверсии. Эту область можно определить как «чувствительный микрообъем», в пределах которого район хромосомы с геном *vg* с разной степенью свободы вступает в индуцированный радиацией контакт с остальными, находящимися в пределах этого микрообъема, внутренними участками хромосомы, включая гетерохроматин. При этом частота данной инверсии должна, очевидно, отражать степень пространственной близости ее двух концов, а тип «альтернативного» партнера (гетерохроматин или секция хромосомы), с которым взаимодействует район гена *vg*, указывает на реализованную вероятность контакта с этим партнером в данной клетке.

Собранные воедино все наблюдаемые инверсии позволяют получить обобщенную двумерную картину макроархитектуры второй хромосомы в гаплоидном геноме зародышевой клетки (спермий) *D. melanogaster* в виде одной мегарозеточно-петлевой структуры, сердцевинной (кором) которой является «чувствительный микрообъем» с находящимися в нем гетерохроматином и районами хромосомы — основаниями петель, трансформируемых радиацией в инверсии. Следовательно, можно полагать, что для гаплоидного генома зрелых спермиев животных несвойственна полярная *Rabl*-ориентация интерфазных хромосом, описанная для некоторых типов быстро делящихся соматических клеток животных и растений, а характерна, по-видимому, специфическая, определяемая функцией гамет, макроорганизация в виде постулируемой нами мегарозеточно-петлевой структуры. Для построения 3D-модели этой постулируемой структуры и ее визуализации проведено компьютерное моделирование положения в пространстве всех инверсионных петель, обнаруженных в радиационно-генетическом эксперименте и описанных выше.

3. ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ МОДЕЛИРОВАНИЯ

Главной задачей моделирования в данном случае является создание геометрической модели пространственной организации хромосомной нити как части клетки живого организма. Для этого необходимо было подобрать базовые элементы, соблюдая масштаб структурных элементов зародышевой клетки. Область ядра, где возможны контакты гена *vg* с другими участками этой хромосомы, была определена как «чувствительный объем» с максимальным радиусом $R = 180$ нм. При этом минимальное расстояние взаимодействия при наиболее частых инверсиях гена *vg* с гетерохроматином r было принято равным 20 нм при толщине нити хромосомы ~ 60 нм и длине одной секции $\sim 1,5$ мкм. Для наглядного представления близости объектов используется режим полупрозрачности для сферы с центром в районе расположения гена *vg*. Моделируемая нить хромосомы представляется в виде 40 цилиндрических непересекающихся секций приблизительно равной длины с возможностью их идентификации по меткам или цвету (для каждого плеча своя цветовая гамма). Расстояние от очередной секции до секции с геном *vg* должно было быть обратно пропорционально частоте наблюдаемых разрывов нити.

С целью обеспечения наглядности при работе с пространственной моделью требовалось иметь возможность последующего редактирования, вращения, масштабирования, перемещения в пространстве как всей нити, так и любого выбранного объекта на ней, включения/отключения визуализации выбранного подмножества объектов модели, регулировка дополнительной подсветки сцены.

Разработка методики и построение 3D-модели (макроорганизации) второй хромосомы в гаплоидном геноме мужских зародышевых клеток *D. melanogaster* проводилась на персональном компьютере следующей конфигурации: процессор P4-1,6 ГГц, память 512 Мбайт, графическая плата nVIDIA GeForce2-MX400 (64 Мбайт).

4. ПОСТРОЕНИЕ МОДЕЛИ

Первоначальным этапом построения 3D-модели хромосомной нити стало исследование возможности среды программирования Delphi с использованием графической библиотеки OpenGL [17]. Базовой единицей информации является вершина, из них состоят более сложные объекты. Программист создает вершины, указывает, как их соединять (линиями или многоугольниками), устанавливает координаты и параметры раскраски.

Программа GenModViewN была нами разработана, она предназначена для реализации трехмерного построения модели с использованием функционального задания точек кривой в пространстве. Нить представляла собой последовательное соединение цилиндрами сферами в заданных точках пространства (рис. 2).

В программе нить моделируется гармонической функцией в полярной системе координат:

```
\procedure L.MakeMol;
const ss:GLfloat=0.781;
const aa:GLfloat=1.150;
vari : Integer;
begin
mol := glGenLists(\ref{eq1});
glNewList(mol, GL{\_}COMPILE);
glCallList(sphere1);
glPushMatrix;
glRotatef(33.0,1.0,0.0,0.0);
glPushMatrix;
glRotatef(31.0,1.0,0.0,0.0);
For i := 0 to 19 do
begin
glCallList(cyl);
glTranslatef(0.0,0.0,L);
glRotatef(33,(aa*cos(i*ss)+aa*ss*i+sin(i*ss)),
(aa*sin(i*ss)-aa*ss*i+cos(i*ss)),aa*(Sqr(cos(i*ss))));
glCallList(sphere);
glCallList(cyl);
glTranslatef(0.0,0.0,L);
glRotatef(33,(aa*cos(i*ss)+aa*ss*i+sin(i*ss)),
(aa*sin(i*ss)-aa*ss*i+cos(i*ss)),aa*(Sqr(cos(i*ss))));
glCallList(sphere1);
end;
glPopMatrix;
glPopMatrix;
glEndList;end;
```

Была получена зависимость сжатия хромосомной нити от одного параметра ss (угол изменения кривизны нити), который можно интерпретировать как влияние изменения внутренней среды в клетке. Однако при такой реализации трудно было решать вопросы независимого наложения и вращения изображений нескольких хромосомных нитей, размещения специальных меток в пространстве.

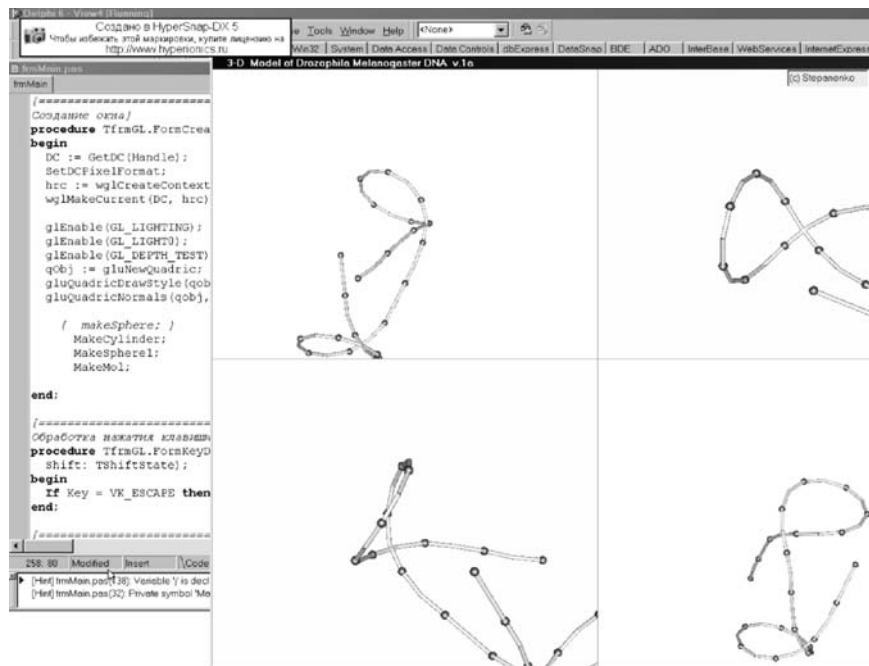


Рис. 2. Пример аналитического моделирования в Delphi (четыре проекции)

Ввиду сказанного выше были исследованы возможности применения демонстрационной версии программы проектирования Rhinoceros [18] с использованием режима интерполяции кривой В-сплайном по заданным точкам в пространстве с последующим смещением линии (EXTRUDE). Но этот подход был связан с дорогим лицензионным пакетом и давал плоское изображение хромосомной нити. Кроме этого, требовалось как-то дополнительно раскрашивать сегменты приблизительно равной длины.

В 2003 г. появился бесплатный программный продукт фирмы Discreet под названием Gmax v.1.2, который является упрощенной версией известного пакета 3DSMAX [19, 20] и используется для создания сцен в играх. В этих программных пакетах есть удобный для решения поставленной задачи режим построения скелета фигуры из сплайнов. Данное свойство позволяет раскрашивать, деформировать, вращать, перемещать, скрывать или фиксировать выбранный объект с меткой. Это существенно упростило процесс моделирования хромосомной нити [21].

В этих программах под геометрической моделью понимают объект, состоящий из совокупности более мелких подобъектов. Манипулируя геометрическими моделями на уровне объектов и подобъектов, можно создавать конструкции любой требуемой формы.

Инструменты трехмерного моделирования поддерживают следующие методы:

- моделирование линейных объектов на основе сплайнов;
- моделирование поверхностей на основе сеток или многоугольников;
- параметрическое моделирование.

Сплайн (Spline) — линия, обычно кривая, форма которой контролируется при помощи управляющих векторов, расположенных при вершине сплайна [19, 20]. Впервые их описал Шоенберг [22]. В дальнейшем они нашли широкое применение в математике и проектировании [23, 24–26]. Объект-сплайн состоит из вершин и сегментов. У каждого сплайна есть одна специальная вершина, называемая первой. Каждая вершина сплайна имеет касательные векторы (tangents), снабженные на концах управляющими точками, или маркерами (handles). B -сплайном k -го порядка называется функция $M_{i,k}(x)$, равная нулю на данном множестве узлов, за исключением k последовательных отрезков.

Аппроксимация кривой с помощью B -сплайнов позволяет сгладить недостатки метода Безье, в котором форма и степень кривой зависят от количества опорных точек. Эти недостатки можно полностью устранить, если при конструировании кривых использовать модифицированные нормализованные B -сплайны [23]. Нормализованная B -сплайн функция определяется выражением

$$N_{i,k}(u) = \frac{u-i}{k-1}N_{i,k-1}(u) + \frac{i+k-u}{k-1}N_{i+1,k-1}(u) \quad (1)$$

и обладает следующими свойствами:

$$\sum_{i=0}^k N_{i,k}(u) = 1 \quad (\text{выпуклая оболочка}); \quad (2)$$

на каждом отрезке $N_{i,k}(u)$ — многочлен степени $(k-1)$; на интервале $(0, n)$ $N_{i,k}(u)$ является $(k-2)$ дифференцируемой функцией:

$$\begin{aligned} N_{i,k}(u) &= 0 \quad \text{для } u < i; \\ N_{i,k}(u) &= 0 \quad \text{для } u \leq i+k. \end{aligned} \quad (3)$$

Свойства кривой, построенной с использованием B -сплайнов:

- кривая определяется линейной комбинацией сплайн-функций, коэффициентами которой являются координаты опорных точек $P_i = (P_x, P_y, P_z)$;
- кривая является кусочно-полиномиальной;
- локальное изменение опорных точек не приводит к модификации всей формы кривой;
- кривая находится внутри выпуклой оболочки;
- кривая может содержать прямолинейные отрезки;
- возможно задание координат вершин характеристической ломаной;
- возможно распознавание нежелательных экстремумов и петель кривой по виду характеристической ломаной.

Достоинства B -сплайна: между точками коэффициенты постоянны; локальное изменение не влечет за собой вычисление заново всего сплайна. Так как хромосомная

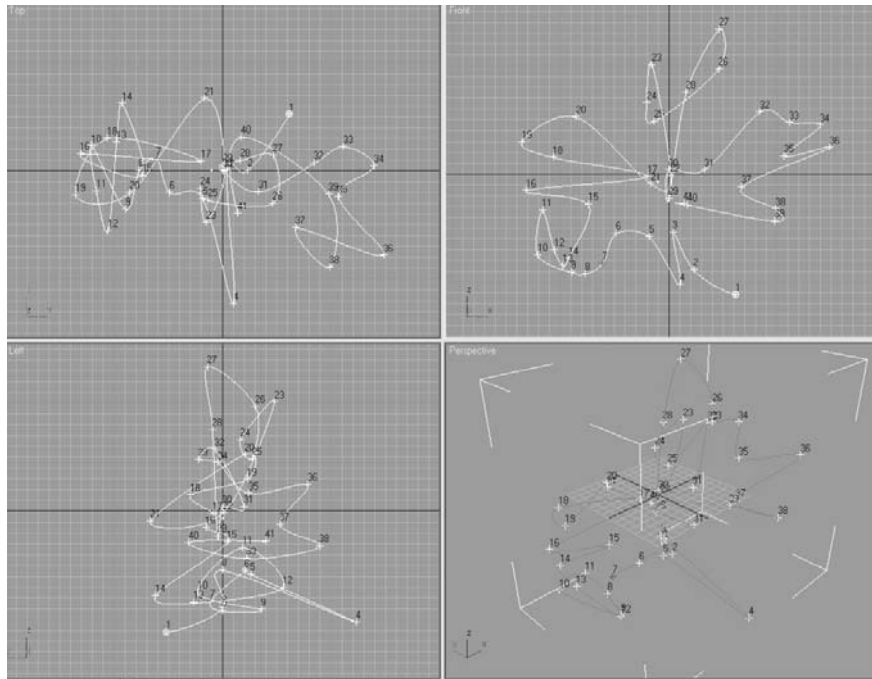


Рис. 3. Пример построения сплайна в программе Gmax

нить — гладкая кривая без разрывов, для реализации построения ее трехмерной модели метод *B*-сплайнов признан наиболее приемлемым. В современных программах 3D-моделирования обычно имеются методы выделения, редактирования и визуализации под-объектов сплайна, как это видно на рис. 3.

4.1. Двумерная модель хромосомной нити. На предварительном этапе построения трехмерной модели макроорганизации рассматриваемой хромосомной нити в методических целях была реализована модель визуализации нити в виде двумерного образа.

Этот этап включал в себя условное разбиение нити на 40 равных секций, согласно классической цитологии. При этом стоял вопрос визуализации всех номеров сегментов или выделения их градациями двух цветов, соответствующих плечам 2L и 2R исследуемой хромосомы. Предпочтение было отдано второму представлению.

При построении модели требуется учесть не только масштабы и пропорции исходных данных, но и частоты, с которыми наблюдаются те или иные инверсии. Как видно из схемы распределения точек разрывов инверсий (рис. 1), отдельные инверсии возникают с относительно высокой частотой, а другие — с низкой. Это предполагает и разную пространственную близость (радиус взаимодействия). Чем больше событий наблюдается в районе отдельной секции, тем больше точка экстремума петли стремится к центру, к гену *vg*. Для наглядности блок гетерохроматина (секции 40–41) выделен на рис. 4 и последующих рисунках черным цветом.

При построении модели участок гена *vg* располагали наиболее близко к гетерохроматину в пределах «чувствительного микрообъема», где и возможны взаимодействия по-

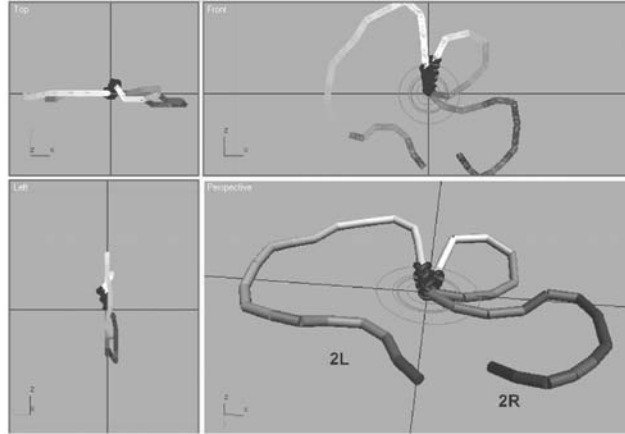


Рис. 4. 2D-модель моделирования близости гетерохроматина с районом гена *vg* (секция 49)

врежденных секций хромосомы с образованием инверсий. В основу критерия выбора радиуса R самой большой сферы положены случаи единичных инверсий R_1 . Затем производился расчет радиусов поверхностей вложенных сфер для каждого типа инверсий исходя из частоты их возникновения. Из результатов проведенных экспериментов [21] следует, что чем больше независимых событий разрывов-соединений, детерминирующих образование данной инверсии, тем меньше рассчитываемый радиус вложенной сферы.

Таблица 1. Радиусы расстояний секций до секции с геном *vg*

Радиус окружности, нм	Номера секций	Кол-во событий разрыв-соединение
$R_1 = 170$	21, 37, 43, 52, 54, 55	1
$R_2 = 120$	22, 24, 25, 34, 39, 44, 51	2
$R_3 = 98$	56 и 60	3
$R_4 = 85$	36 и 59	4
$R_4 = 76$	50	5
$R_5 = 51$	47 и 48	11
$R_{11} = 37$	40 и 41	21

Близость независимых событий разрывов-соединений, представленных в табл. 1, рассчитывали по формуле

$$R_k = \sqrt{\frac{N_{\max}}{N_K}} 20 \text{ нм}, \quad (4)$$

где N_{\max} — общее количество событий разрывов соединений; N_K — количество событий разрывов соединений в определенной секции.

После этого вручную строится плоская проекция с центрами концентрических окружностей в районе гетерохроматина и гена *vg*, а опорные точки сплайна для хромосомной

нити располагаются для правого и левого плеча по разные стороны с учетом частоты инверсий-взаимодействий секций. Масштаб изображения выбирали таким образом, чтобы с нитью удобно было работать и она была развернута в радиальной системе координат на $\sim 345^\circ$. Для контроля действий использовался довольно удобный механизм визуализации и редактирования опорных точек сплайна, имелась возможность изменения толщины построенной нити. Некоторое неудобство состоит в том, что 21-й секции хромосомной нити при этом соответствует 1-я точка сплайна и т. д. Приходится по таблице устанавливать соответствие точек и сегментов сплайна, но это не принципиально. Дальше строятся концентрические окружности в центре плоской проекции и с помощью мышки опорные точки сплайна последовательно редактируются в соответствии с таблицей частот инверсий таким образом, чтобы расстояние между соседними точками сплайна оставалось постоянным. Для этой цели удобно на заключительном этапе редактирования опорных точек произвести процедуру нормализации сплайна. Следует особо отметить, что пока что ввиду отсутствия данных некоторые секции моделируются в релаксированном состоянии, т. е. плавной петлей сплайна. Петли в модели хромосомной нити строились последовательно: сначала к центру, то есть к гетерохроматину, «подтянули» район нахождения гена *vg*, дальше расположили конец плеча 2L, а потом и основания остальных петель. На следующем этапе требуется раскрасить секции хромосомной нити. Для этого удобно использовать два подхода с применением мощного механизма нанизывания дополнительных 3D-объектов на построенный сплайн с контролем количества, начального расположения или расстояния между ними под названием Spacing Tools. В простейшем случае в качестве вспомогательного 3D-объекта задается цилиндр с параметрами единичной секции хромосомной нити. Цвет цилиндров после наложения их на сплайн вручную изменяется и редактируется их положение на плоских проекциях для более точного совпадения торцов (рис. 4).

4.2. Методика построения 3D-модели хромосомной нити. В случае построения пространственной модели в программе Gmsh экран дисплея делится на четыре равных окна проекций таким образом, что внизу справа располагается изометрическая перспективная проекция сцены, а рядом слева плоская проекция (вид справа). Плоскую фронтальную проекцию нити удобно располагать над перспективной проекцией. Левее вверху экрана располагали проекцию сверху. Для наглядности трехмерной модели хромосомной нити участки разрывов-соединений объединяются в более крупные кластеры: 21–25, 30, 34–39, 40–41, 43–44, 48–49, 50–52, 54–56, 59–60 (события разрывов-соединений на данных участках складываются). Радиус вложенной сферы, вычисляемый по формуле (4), станет меньше, и основания большинства петель «подтянутся» к гену *vg*. Для каждого выделенного кластера производился расчет радиусов вложенных сфер (табл. 2).

Концентрические окружности в соответствии с таблицей первоначально изображались в центре всех плоских проекций. Дальше на фронтальной проекции строится сглаженный адаптивный сплайн порядка $n = 6$. В отличие от случая построения 2D-модели опорные точки последовательно редактировались по меткам на всех трех проекциях внутри самой большой сферы с радиусом $r_0 = 180$ нм.

При построении 3D-модели также использовались экспериментальные данные о независимых контактах, которые ведут к другим типам инверсий (не связанных с геном *vg*). Действительно, в этих же радиационно-генетических экспериментах среди гамет с инверсиями, вовлекающими ген *vg*, обнаружены клетки с инверсиями, свидетельствующими о пространственной близости секции 42 плеча 2R с секциями 57 и 59 того же плеча

Таблица 2. Радиусы сфер расстояний кластеров секций до секции с геном *vg*

Радиус окружности, нм	Номера секций в кластере	Кол-во событий разрыв-соединение
$r_1 = 170$	30	1
$r_3 = 98$	43–44	3
$r_5 = 76$	54–56	5
$r_7 = 64$	21–25	7
	59–60	
$r_8 = 60$	50–52	8
$r_9 = 57$	34–39	9
$r_{11} = 51$	48 и 49	11
$r_{21} = 37$	40 и 41	21

хромосомы, а также секции 30 плеча 2L с областью гетерохроматина плеча 2R (секция 41). Наличие этих независимых инверсий с указанными точками разрыв-соединение прямо указывает на контакты, детерминированные этой моделью, хотя они и занимают частично другую вложенную сферу по сравнению с геном *vg* и гетерохроматином в пределах одного и того же постулируемого «чувствительного микрообъема». На перекрытие вложенных сфер прямо указывает инверсия с разрывом-соединением в секциях 30 и 41, с которыми, как показано выше, имеют пространственную близость секция 49 с геном *vg* и гетерохроматин. Отсюда следует, что середина плеча 2L также может быть «подтянута» к гетерохроматину. По этим данным было скорректировано пространственное расположение трехмерной модели 2-й хромосомной нити (рис. 5). Для раскрашивания секций 3D-модели большей наглядностью обладает метод построения сильно спирализованного компактного дополнительного 3D-объекта в виде Torus Knot. Эти клубки в достаточно большом количестве располагаются (как и цилиндры) на сплайне, но более



Рис. 5. Пример построения пространственной модели 2-й хромосомной нити с использованием дополнительного объекта в виде спиралевидного узла вдоль сплайна и источников света (внизу)

плавно повторяют все его изгибы (на рис. 5 вспомогательный 3D-объект виден в правом верхнем углу). По этой причине в дальнейшем требуется только изменить цвет клубочков. Это удобно делать с помощью операции группового выбора объектов под названием `SelectbyNAME`. В дальнейшем обычно требуется подправить освещение сцены с помощью различных светильников, развернуть нить в удобном ракурсе и добавить метки секций при необходимости. Очень удобно использовать механизм временного удаления из сцены выбранных объектов (`hide`) для раздельной визуализации гетерохроматина или какого-либо одного плеча хромосомной нити, а также режим прозрачности для сферы чувствительного объема (рис. 6).

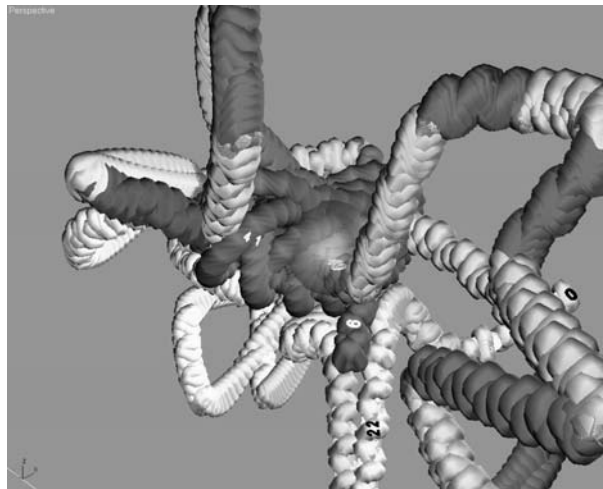


Рис. 6. Пример построения пространственной модели 2-й хромосомной нити с использованием дополнительных операций: `loft`, `lattice`, `wave`, `twist` — вдоль сплайна

При моделировании 3D-сцен не надо пытаться задавать очень большое число дополнительных объектов с большой детализацией, т. к. это может существенно увеличить количество элементарных многоугольников. Например, для формирования боковой поверхности цилиндра достаточно использовать правильный многоугольник с числом вершин $5 < n < 10$. Иначе работа программы даже на сравнительно мощном компьютере может существенно замедлиться из-за необходимости пересчета большого числа нормалей к элементарным поверхностям, которые используются во всех программах 3D-моделирования для определения освещенности и затенения объектов. Аналогичное замечание относится и к выбору степени многочлена для построения сплайна. Целесообразно использовать режим адаптивного подбора степени многочлена, тогда программа автоматически повышает/понижает степень интерполяционного многочлена в зависимости от изменения локальной кривизны линии. Не следует сильно изменять параметр упругости огибающей линии вблизи опорных точек сплайна, т. к. это может испортить вид плавной кривой.

Анализ этой модели показывает, что она детерминирует пространственную близость и других секций хромосомы, не связанных с секцией, содержащей ген *vg*, и, следовательно, возникновение инверсий с разрывами-соединениями в иных секциях хромосомы по сравнению с обнаруженными и описанными выше.

Следует отметить, что лицензионная программа 3DStudioMAX имеет несравненно больше возможностей, чем программа Gmax. В частности, для нашего случая подходит loft-операция и измерительная рулетка [20]. Операция loft позволяет надеть оболочку заданного профиля на весь сплайн (или выдельный сегмент) и получить эффект витой нити после применения операций twist, lattice, wave или их произвольной комбинации (последние три операции есть и в программе Gmax) (рис. 6).

При моделировании 2-й хромосомной нити, представленной на рис. 4–6, пересчет параметров сцены занимал 3–5 с. Об исключительной трудоемкости моделирования биологических структур свидетельствует факт применения для этих целей самых мощных многопроцессорных систем в ведущих индустриально развитых странах мира. В последнее время наметилась тенденция использовать для этих целей сеть персональных компьютеров из числа добровольцев в рамках Интернет. Такая грид-технология позволяет, например, исследовать белковые структуры человеческого организма с использованием PDB-банка данных [27]. На ПК с процессором P4-2ГГц за 10 ч непрерывной работы обрабатывается порция данных $\sim 1,5$ Мбайт. Суммарная мощность этой грид-сети оценивается в 80000 лет вычислений на одном персональном компьютере [28]. О важности исследований свидетельствует и тот факт, что в журнале «Science» за 2005 г. в списке 25 наиболее значимых научных загадок, стоящих перед человечеством, почти половина относится к биологии и генетике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, подводя итог проведенной экспериментально-теоретической работы, главные результаты которой изложены выше, необходимо отметить следующие принципиальные особенности самоорганизации (укладки) второй хромосомы гаплоидного набора в пространстве ядра зрелых зародышевых клеток *D. melanogaster*:

1. Часто повторяющаяся конфигурация среди облученных гамет и пространственная близость середины плеча 2R (секция 49 с геном-маркером *vg*) со своим прицентромерным гетерохроматином (секция 41) в пределах «чувствительного объема» с малым радиусом, детерминирующим наблюдаемую наиболее высокую вероятность их контакта и взаимодействия с образованием крупной инверсионной петли после действия радиации;

2. Усложнение этой конфигурации за счет формирования «букета» петлевых структур варьирующего размера на базе пространственной сближенности средней части плеча 2R (секция 49 с геном-маркером *vg*) со свободными теломерными концами хромосомы (секции 21–25 и 59–60) и смежными с геном *vg* ее районами (секции 48–51) в пределах того же «чувствительного микрообъема», но большего радиуса и/или сближенностью в иной плоскости его пространства, где названные секции-районы хромосомы (основания потенциальных инверсионных петель) с разной степенью свободы, определяемой, вероятно, радиусом и плоскостью расположения основания петель, вступают в контакт и рекомбинацию после действия радиации.

В обобщенном виде пространственную организацию всей нити хромосомы можно представить в виде мегарозеточно-петлевой структуры, являющейся, по-видимому, принципиальной для всех интерфазных хромосом в гаплоидном ядре зародышевых клеток у высших организмов.

Выяснение молекулярных механизмов самоорганизации этой структуры — задача дальнейших исследований.

Разработанная методика построения 3D-модели использует наглядный математический аппарат сплайнов для описания представлений пространственной укладки этой нити и содержит простую схему внесения изменений в процессе моделирования.

Представленная нами 3D-модель требует, естественно, своего уточнения и проверки. В этом отношении весьма перспективным представляется построение 3D-модели этой же хромосомы на базе имеющихся данных по инверсиям с инвариантным разрывом в районе гена *black* (секция 34) в 2L-плече хромосомы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Winkler H.* Vererbung und Ursache der Parthenogenese im Pflanzen-und Tierreich. Jena: Fischer, 1920.
2. *Льюин Б.* Гены. М.: Мир, 1987.
3. *Friedland W., Perzl M.* Target model of chromatin fiber for DNA damage modeling // Book of Abstr. of Proc. of the 10th Intern. Congress of Rad. Research, Wurzburg, Germany, Aug. 27–Sept. 1, 1995 / Eds. U. Hagen, H. Jung, C. Streffer. V. 1. P. 17–19.
4. *Кикнадзе И. И.* Функциональная организация хромосом. Л.: Наука, 1972.
5. Цит. по *Saunweber H.* Arrangement of chromosomes in interphase cell nuclei // Results and Problems in Cell Differentiation 14. Structure and Function of Eukaryotic Chromosomes / Ed. W. Henning, Berlin; Heidelberg: 1987. P. 223–234.
6. *Du Praw E. J.* Macromolecular organization of nuclei and chromosomes: a folded fibre model based on whole-mount electron microscopy // Nature. 1965. V. 206. P. 338–343.
7. *Tsanev R. et al.* Replication and Transcription of Chromatin. Boca Raton: CRC, 1993.
8. *Manuelidis L.* A new of interphase chromosomes // Science. 1990. V. 250, No. 4987. P. 1533–1540.
9. *Sachs R. K. et al.* A random-walk/giant-loop model for interphase chromosomes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 2710–2714.
10. *Bennett M. D.* The spatial distribution of chromosomes // Proc. of the 2nd Kew Chromosome Conf. Allen and Unwin / Eds. P. Brandham, M. Bennett. London, 1983. P. 71–79.
11. *Александрова М. В. и др.* Радиационная цитогенетика мультилокусных делеций и принципы надхромомерной организации эухроматина эукариот // Радиационная биология. Радиоэкология. 1996. Т. 36, вып. 6. С. 805–814.
12. *Alexandrov I. D., Zakharov I. A., Alexandrova M. V.* Stock List: The Moscow Regional Drosophila melanogaster Stock Center // J. Drosophila Information Service. Dubna, 1997. V. 80. P. 109–130.
13. *Бейли Н.* Статистические методы в биологии. М: Иностран. лит, 1962.
14. *Тюрин Ю. Н., Макаров А. А.* Статистический анализ данных на компьютере / Под ред. В. Э. Фигурнова. М.: ИНФА-М, 1998.
15. *Adams M. D. et al.* The genome sequence of Drosophila melanogaster // Science. 2000. V. 287. P. 2185–2195.

16. Жимулев И. Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск: ВО Наука. Сиб. изд. фирма, 1993. 491 с; <http://www.nsu.ru/education/biology/genetics/>
17. <http://www.borland.com>
18. <http://www2.rhino3d.com/beta/>
19. <http://www.discreet.com/products/gmax/>
20. Чумаченко И. Н. 3ds max. М.: ДМК Пресс, 2004.
21. Заикин Н. С. и др. Макроархитектура генома: разработка подходов к 3D-моделированию структуры с учетом ее радиационно-индуцированных преобразований (на примере генома *Drosophila melanogaster*) // Ann. Rep. 2003. P. 59–65.
22. Schoenberg I. J. On Spline Function Inequalities. Acad. Press, 1967. P. 255–291.
23. Шнур Г., Краузе Ф.-Л. Автоматизированное проектирование в машиностроении / Пер. с нем. Г. Д. Волковой и др.; Под ред. Ю. М. Соненцева, В. П. Диденко. М.: Машиностроение, 1988.
24. Cline A. K. Scalar and planar-valued curve fitting using splines under tension // Commun. ACM. 1974. V. 17, No. 4. P. 218–220.
25. de Boor C. A practical guide to splines // App. Math. Sc. Berlin, 1978. V. 27.
26. Математика и САПР: В 2 кн. Кн. 1 / Пер. с фр. П. Шенен и др. М.: Мир, 1988.
27. <http://www.grid.org/projects/hpf/rosetta.htm>
28. PC WEEK. 2005. No. 8. P. 54.

Получено 17 августа 2005 г.