ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

ОСНОВАН В 1997 г.

Том 15
2
июнь 2011

Содержание

МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ ДРОЗОФИЛЫ: ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ И СУДЬБА ПЕРВООТКРЫВАТЕЛЕЙ
О.Н. Данилевская 215

РОЛЬ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ В ГЕНОМЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER*
Л.А. Васильева, О.В. Антоненко, И.К. Захаров 225

МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ: НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНОВ И ГЕНОМОВ
Н.Н. Юрченко, Л.В. Коваленко, И.К. Захаров 261

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ИНТЕГРАЗЫ РЕТРОТРАНСПОЗОНА *GYPSY DROSOPHILA MELANOGASTER IN VITRO*
М.М. Маннанова, Л.Н. Нефедова, А.И. Ким 271

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИНТЕГРАЗЫ РЕТРОТРАНСПОЗОНА *GYPSY DROSOPHILA MELANOGASTER*
Л.Н. Нефедова, М.М. Маннанова, Н.Б. Гусев, А.И. Ким 277

АНАЛИЗ ТКАНЕ- И СТАДИЕСПЕЦИФИЧНОСТИ ТРАНСКРИПЦИИ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ ГРУППЫ *GYPSY* У *DROSOPHILA MELANOGASTER*
Ф.А. Урусов, Л.Н. Нефедова, А.И. Ким 283

ВЛИЯЮЩИЕ НА МАЛЫЕ РНК МУТАЦИИ В ГЕНАХ *spn-E*, *piwi*^{2} И *aub* НЕ СКАЗЫВАЮТСЯ НА МУТАБИЛЬНОСТИ *hobo*-ИНСЕРЦИОННОГО АЛЛЕЛЯ ГЕНА *yellow DROSOPHILA MELANOGASTER*
Л.П. Захаренко, М.А. Волошина 289

МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ В СОСТАВЕ ДНК ХРОМОЦЕНТРА ТРОФОЦИТОВ *DROSOPHILA ORENA* (DIPTERA, DROSOPHILIDAE)
К.Е. Усов, В.Н. Стегний 296

МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ РАЙОНОВ ПРИКРЕПЛЕНИЯ ХРОМОСОМ К ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКЕ ТРОФОЦИТОВ МАЛЯРИЙНЫХ КОМАРОВ
Г.Н. Артемов, О.Ю. Фисенко, В.Н. Стегний 304

ЭВОЛЮЦИОННО НЕДАВНИЕ ГРУППЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА
К.К. Баскаев, А.А. Буздин 313

миРНК-СОДЕРЖАЩИЕ ТРАНСПОЗОНЫ ЧЕЛОВЕКА
И.И. Титов, П.С. Ворожейкин 323

СТАТИСТИЧЕСКИЕ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ КЛИНИЧЕСКИХ ДАННЫХ ЭКСПРЕССИОННЫХ МИКРОЧИПОВ
Ю.Л. Орлов, В.М. Ефимов, Н.Г. Орлова 327

ЭНДОГЕННЫЕ РЕТРОВИРУСЫ СВИНЬИ: НАСКОЛЬКО ВЕЛИК РИСК ИНФЕКЦИИ ПРИ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ?
Н.С. Юдин, Р.Б. Айтназаров, В.И. Ермолаев 340

LTR-РЕТРОТРАНСПОЗОНЫ РАСТЕНИЙ
И.Д. Сормачева, А.Г. Блинов 351

МОБИЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ И ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА РАСТЕНИЙ
Е.М. Сергеева, Е.А. Салина 382

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ *CACTA* ДЛЯ УТОЧНЕНИЯ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ ВНУТРИ ВИДА *BRASSICA RAPA* L.
А.М. Артемьева, Х. Будан, Э. Клоке, Ю.В. Чесноков 398

P*-ЭЛЕМЕНТ КАК ИНСТРУМЕНТ АНАЛИЗА ГЕНОМА И ПРОТЕОМА *DROSOPHILA MELANOGASTER
Е.В. Мариловцева, Л.В. Омельянчук 412

THE UNITY OF THE WHOLE AND FREEDOM OF PARTS: FACULTATIVENESS PRINCIPLE IN THE HEREDITARY SYSTEM
M.D. Golubovsky 423

VAVILOV JOURNAL
OF GENETICS AND BREEDING
FOUNDED IN 1997

Vol. 15
2
June 2011

Content

TRANSPOSABLE ELEMENTS OF DROSOPHILA: DISCOVERY AND DISCOVERERS' FATE
O.N. Danilevskaya 215

ROLE OF TRANSPOSABLE ELEMENTS IN THE *DROSOPHILA MELANOGASTER* GENOME
L.A. Vasil'eva, O.V. Antonenko, I.K. Zakharov 225

TRANSPOSABLE ELEMENTS: INSTABILITY OF GENES AND GENOMES
N.N. Yurchenko, L.V. Kovalenko, I.K. Zakharov 261

***IN VITRO* CATALYTIC ACTIVITY OF THE *DROSOPHILA MELANOGASTER GYPSY* RETROTRANSPOSON INTEGRASE**
M.M. Mannanova, L.N. Nefedova, A.I. Kim 271

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE *DROSOPHILA MELANOGASTER GYPSY* RETROTRANSPOSON INTEGRASE
L.N. Nefedova, M.M. Mannanova, N.B. Gusev, A.I. Kim 277

ANALYSIS OF THE TISSUE- AND STAGE-SPECIFIC TRANSCRIPTION OF THE *DROSOPHILA MELANOGASTER GYPSY* RETROTRANSPOSON
F.A. Urusov, L.N. Nefedova, A.I. Kim 283

MUTATIONS IN GENES *spn-E*, *piwi*^{2}, AND *aub*, INFLUENCING SMALL RNA PRODUCTION, DO NOT INFLUENCE THE RATE OF MUTATIONS ASSOCIATED WITH A *hobo* INSERTION IN THE *yellow* GENE OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*
L.P. Zakharenko, M.A. Voloshina 289

TRANSPOSABLE ELEMENTS IN THE NURSE CELL CHROMOCENTER DNA OF *DROSOPHILA ORENA* (DIPTERA, DROSOPHILIDAE)
K.E. Usov, V.N. Stegniy 296

TRANSPOSABLE ELEMENTS IN THE REGIONS OF CHROMOSOME ATTACHMENT TO THE NUCLEAR ENVELOPE IN NURSE CELLS OF MALARIA MOSQUITOES
G.N. Artemov, O.Yu. Fisenko, V.N. Stegniy 304

EVOLUTIONARILY RECENT GROUPS OF TRANSPOSABLE ELEMENTS IN THE HUMAN GENOME
K.K. Baskaev, A.A. Buzdin 313

TRANSPOSONS CONTAINING HUMAN miRNAS
I.I. Titov, P.S. Vorozheykin. 323

STATISTICAL ESTIMATES OF TRANSPOSABLE ELEMENT EXPRESSION IN THE HUMAN GENOME BASED ON CLINICAL MICROARRAY DATA ON EXPRESSION
Yu.L. Orlov, V.M. Efimov, N.G. Orlova 327

PORCINE ENDOGENOUS RETROVIRUSES: IS THE RISK OF TRANSMISSION IN XENOGRAFTING GREAT?
N.S. Yudin, R.B. Aitnazarov, V.I. Ermolaev 340

LTR RETROTRANSPOSONS IN PLANTS
I.D. Sormacheva, A.G. Blinov 351

TRANSPOSABLE ELEMENTS AND PLANT GENOME EVOLUTION
E.M. Sergeeva, E.A. Salina. 382

USE OF *CACTA* MOBILE GENETIC ELEMENTS FOR THE REFINEMENT OF PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AMONG *BRASSICA RAPA* L. SPECIES
A.M. Artemyeva, H. Budahn, E. Klocke, Yu.V. Chesnokov. 398

***P* ELEMENT AS A TOOL FOR ANALYSIS OF THE *DROSOPHILA MELANOGASTER* GENOME AND PROTEOME**
E.V. Marilovtseva, L.V. Omel'yanchuk 412

THE UNITY OF THE WHOLE AND FREEDOM OF PARTS: FACULTATIVENESS PRINCIPLE IN THE HEREDITARY SYSTEM
M.D. Golubovsky 423

МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ ДРОЗОФИЛЫ: ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ И СУДЬБА ПЕРВООТКРЫВАТЕЛЕЙ

О.Н. Данилевская

Pioneer Hi-Bred International, A DuPont Company Johnston, USA,
e-mail: olga.danilevskaya@pioneer.com

Открытие мобильных генетических элементов дрозофилы является самым значительным и выдающимся достижением советской молекулярной биологии. Именно в СССР впервые были получены прямые молекулярные доказательства перемещения генетического материала у эукариот. В статье рассказывается история открытия, основанная на переписке и личных дневниках непосредственных участников этой работы.

Ключевые слова: мобильные генетические элементы, дрозофила.

Биология не была приоритетной наукой в Советском Союзе. Это подтверждается хотя бы таким простым наблюдением, что ни один советский ученый не был награжден Нобелевской премией в области физиологии и медицины, тогда как в области физики 12 российских ученых являются Нобелевскими лауреатами (http://nobelprize.org/nobel_prizes/). Со времени учреждения Нобелевской премии в 1901 г. она была присуждена всего двум русским биологам: в 1904 г. И.П. Павлову – за открытие условного рефлекса и в 1908 г. И.И. Мечникову – за открытие иммунитета. По существу, за целое столетие в России не было сделано ни одного исследования в области биологии, которое было бы признано международным научным сообществом как выдающийся вклад в развитие этой области знаний. Однако это не означает, что в российской науке не было талантливых ученых, которые генерировали идеи и обладали достаточным интеллектом, чтобы их развивать. Мы знаем имена многих ученых-биологов, чьи идеи и открытия были абсолютно оригинальными и новаторскими, но в условиях организации советской биологической науки они не могли получить полноценного развития, и часто их идеи были реализованы за рубежом.

История открытия мобильных элементов дрозофилы является ярким примером нереализованного преимущества и упущенного приоритета. Теперь, спустя более 30 лет, очевидно, что это открытие является самым значительным и выдающимся достижением советской молекулярной биологии. Первые наблюдения «прыгающих» генов у плодовой мушки дрозофилы были началом нового представления о структурной организации генетического материала высших организмов. Классическая хромосомная теория наследственности утверждала, что положение генов на хромосомах строго фиксировано, подобно бусинкам, нанизанным на нитку. Тот факт, что некоторые кусочки ДНК не имеют фиксированого положения на хромосомах, положило начало принципиально новому представлению о структурной организации генома. Мобильные элементы оказались обязательным компонентом геномов высших организмов. Они составляют основную массу хромосом. Так, до 60 % генома человека состоят из мобильные элементов, а на долю белок-кодирующих генов, которых у человека всего около 20 тыс., приходится только около 1,4 % генома. (http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml).

В открытии мобильных элементов дрозофилы было пять главных действующих лиц, работавших в 1976 г. в двух институтах. В Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта АН СССР: заведующий лабораторией Георгий Павлович Георгиев (Г.П., как его звали в лабора-

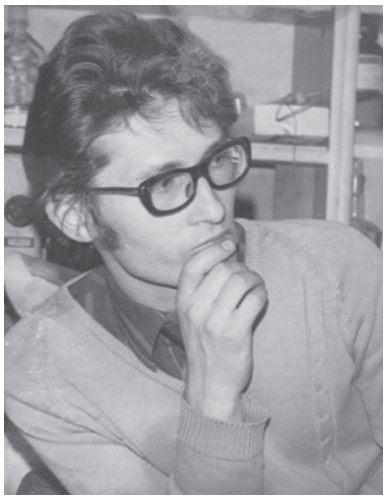
тории), его сотрудник Юрий Викторович Ильин и их аспирант Николай Андреевич Чуриков. В Институте атомной энергии им. И.В. Курчатова – Владимир Алексеевич Гвоздев, заведующий лабораторией в радиобиологическом отделе, и его недавно защитившийся сотрудник Евгений Витальевич Ананьев. Это сотрудничество было не случайно, так как оба Института были центрами возрождения генетики и молекулярной биологии в Советском Союзе после разгрома биологии в 1948 г. В обоих институтах были собраны сильные ученые, которые разрабатывали новые проблемы, и, соответственно, в эти институты тянулась талантливая молодежь.

К началу 1970-х гг. Г.П. Георгиев уже был членом-корреспондентом Академии наук СССР, интересовался проблемами синтеза ядерной РНК и выдвинул гипотезу о структурной организации генов животных. В своей гипотезе Георгий Павлович пытался разрешить парадокс, который он и другие ученые наблюдали в животных клетках: первичный продукт генов, ядерная РНК, намного превышает размеры цитоплазматической РНК, которая на рибосомах производила конечный продукт генов белок. Георгиев предложил стройную и логичную модель: у животных ген состоит из гигантской акцепторной зоны, не несущей структурной информации, но выполняющей регуляторную функцию, а относительно небольшая структурная часть гена, кодирующая белок, находится в конце регуляторной зоны (Georgiev, 1969; Georgiev *et al*., 1974). Но в то время не было методов, чтобы эксперименталь но проверить эту модель. Поэтому, когда в начале 1970-х гг. появился метод клонирования ДНК, который позволял выделять индивидуальные гены, Георгиев стал активно развивать клонирование ДНК в своей лаборатории. Принцип метода заключается в том, что с помощью «молекулярных ножниц» (рестрикционных ферментов) молекулу ДНК можно «разрезать» на кусочки, а затем «сшить» с молекулой ДНК-вектора, что дает возможность размножать эти фрагменты ДНК в неограниченном количестве в бактериальных клетках кишечной палочки (*Escherichia coli*). Метод был революционным и позволял непосредственно изучать структуру индивидульных генов практически любого организма.

Г.П. Георгиев был одним из немногих советских ученых, кому разрешали в то время ездить за границу. Так, в 1974 г. он принимал участие в самой престижной конференции по молекулярной биологии – симпозиуме в Колд Спринг Харбор (США). Благодаря этому Георгиев был одним из первых в Советском Союзе, кто узнал о методе клонирования ДНК и развернул активную деятельность по клонированию генов мыши и дрозофилы в своей лаборатории. Кроме того, он был знаком с зарубежными учеными, и многие выполняли его просьбы, когда он к ним обращался. Дрозофила была особенно привлекательным объектом для Георгиева по двум причинам. Во-первых, гигантские – многократно реплицировавшиеся молекулы ДНК – политенные хромосомы слюнных желез давали возможность видеть линейно организованное расположение генов на хромосоме под микроскопом (чередование дисков и междисков – специфически организованных последовательностей ДНК), во-вторых, уникальная культура клеток, полученная в Институте атомной энергии в лаборатории В.А. Гвоздева, была идеальным источником для выделения ДНК. С 1976 г. началось сотрудничество между Г.П. Георгиевым и В.А. Гвоздевым.

Клонирование ДНК дрозофилы было диссертационной темой Коли Чурикова, аспиранта в лаборатории Георгиева. Его прямым руководителем был Ю.В. Ильин. Это была очень сложная задача, так как в то время никто клонировать ДНК еще не умел, учиться было не у кого, и Коле пришлось самому налаживать экспериментальные подходы и разрабатывать методическую базу. Вот как он описывает то время: «Фаг λ (вектор для клонирования – *О.Д.*) прислал по почте Рон Дэвис – (Thomas *et al*., 1974) – по просьбе Г.П. Помню, что большую коробку с банками Difco прислал, также по просьбе Г.П., Боб Черч, из Канады. Я тогда часто о чем-то просил Г.П. Он всегда выполнял просьбы. Вообще в то время не у кого было консультироваться по генной инженерии. В PNAS'е публиковали первые такие работы, например, Merts and Davis. У меня было два руководителя, но я им говорил: мой учитель – PNAS. Они действительно не могли дать советы». Очень надеюсь, что со временем Коля Чуриков напишет свои воспоминания об открытии мобильных элементов.

В январе 1976 г. у Коли получилось удачное клонирование. Он получил 286 клонов в фаге λ,

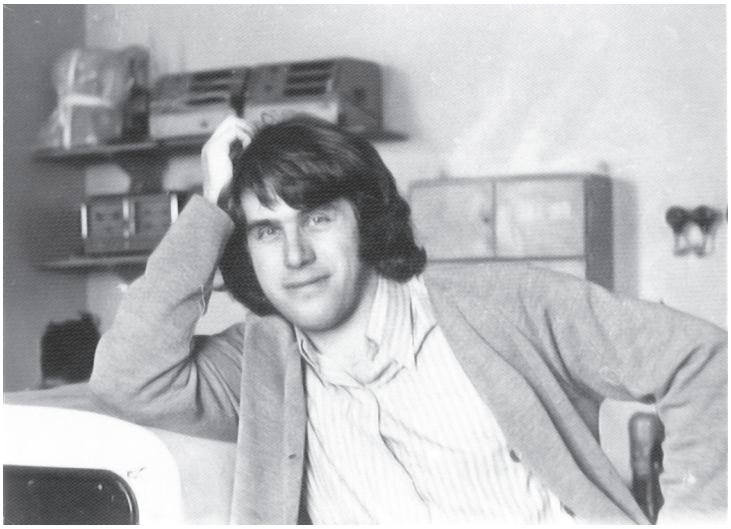


Николай Андреевич Чуриков в лаборатории Института молекулярной биологии АН СССР. 1976 г. (семейный архив Чуриковых).

выделил все ДНК и отобрал несколько клонов, которые пометил тритием для гибридизации на политенных хромосомах. К тому моменту Георгиев договорился с Гвоздевым, чтобы его сотрудники определили местоположение фрагмента на политенных хромосомах с помощью *in situ* гибридизации. Один такой фрагмент, Dm225 (от лат. *Drosophila melanogaster*), 15 марта 1976 г. Коля отвез в Институт атомной энергии Жене Ананьеву. Коле было 26 лет, а Жене 29. Это были молодые, умные, талантливые, полные энергии и преданные науке энтузиасты.

Спустя много лет, в 2010 г., по моей просьбе Коля описал эту встречу. «Отлично помню, я поехал в Курчатовский институт к Жене. Привез пробы в маленьких стеклянных пробирках (Epindorff тогда еще не изобрели). Женя показал мне свой фотоатлас. – Ты лучше меня знаешь его тщательность. – Поэтому картинки у меня до сих пор перед глазами. Помню, что он тогда сказал, что, судя по его фотографиям ядер слюнных желез, политенные хромосомы имеют постоянную трехмерную структуру. После Женя меня проводил до метро. Потом я его до Института – обратно. Я даже напомнил Жене, что это похоже на прогулки из фильма “Третья молодость”. – Помнишь такой фильм о Чайковском и Петипа?» Эта встреча в действительности оказалась исторической, так как результат гибридизации на политенных хромосомах получился совершенно неожиданным и не укладывался ни в какие логичные гипотезы. Этот простой эксперимент был началом нового направления в молекулярной генетике – исследования мобильности генома.

От Жени 26 июня 1976 г. Коля получил ответ: «Препарат клона Dm225 хорош, есть около 40 мест гибридизации». В своих воспоминаниях Евгений Витальевич подробно описал свои первые наблюдения и логику последующего анализа: «К этому времени я уже освоил методику *in situ* гибридизации на политенных хромосомах дрозофилы. На моем первом и единственном



Евгений Витальевич Ананьев в лаборатории Института атомной энергии АН СССР. 1976 г. (семейный архив Ананьевых).

препарате я увидел, что, действительно, этот кусочек ДНК гибридизуется примерно с 40 участками на политенных хромосомах. При сравнении одной и той же хромосомы, например, Х-хромосомы из разных ядер, можно было видеть, что набор гибридизующихся участков и их местоположение в хромосоме были сходны. Одно ядро, однако, привлекло мое внимание. В этом ядре отцовская и материнская хромосомы, составляющие пару гомологичных хромосом, не были тесно сконъюгированы, как обычно наблюдается в большинстве ядер, а несколько разошлись друг от друга. Распределение гибридизующихся участков (так называемых сайтов гибридизации) на этих гомологичных хромосомах оказалось полностью различным. Это было что-то совершенно новое! Согласно классической генетике, гомологичные хромосомы содержат идентичный набор генов, расположенных в строго определенном порядке. А в данном случае ген (в то время мы еще не знали настоящую природу этого кусочка ДНК) находился в разных местах гомологичных хромосом, т. е. был способен “перемещаться” по хромосоме.

Это была загадка! Что это? Мобильные элементы, которые недавно были найдены у бактерий, или мистические контролирующие элементы, обнаруженные у кукурузы Барбарой Мак-Клинток? А может, просто некая особенность генома дрозофилы?

Я подумал, что разгадка может крыться в том, что для проведения эксперимента я использовал особо крупные личинки дрозофилы, которые получал путем скрещивания двух родительских линий этой мушки. Каждая из родительских линий несла мутацию *gt* (от английского giant – гигант), приводящую к увеличению размера личинки и, соответственно, увеличению размеров политенных хромосом. Поэтому асимметричное распределение сайтов гибридизации могло быть связано с изначально существующими различиями в хромосомах родителей. Чтобы подтвердить свою догадку, я сфотографировал все примеры расхождения гомологичных хромосом, и после дополнительного анализа стало очевидно, что закономерность действительно есть: например, в одной гомологичной хромосоме было 5 сайтов, а в другой – ни одного. Это было первое указание на то, что картина гибридизации на гомологичных хромосомах воспроизводится. Как только я увидел, что последовательность генов не совпадает, мне пришла в голову мысль, что это “прыгающие” гены. Стало очевидно, что надо повторить точно такую же гибридизацию, но на этот раз на родительских линиях дрозофилы.

Я поделился своими наблюдениями с Владимиром Алексеевичем Гвоздевым. То, что эти элементы представлены многими копиями и ”рассыпаны” по геному, вполне укладывалось в гипотезу Георгиева, который полагал, что разные гены могут иметь одинаковые регуляторные элементы. Однако то обстоятельство, что эти элементы могли “прыгать”, лишало их регуляторной функции. Согласно оценкам Коли Чурикова, число копий этих генов (или элементов) должно было быть в 10 раз больше, чем сайтов гибридизации. В.А. Гвоздев предположил, что эти гены образуют группы или локальные кластеры, которые соответствуют особым районам хромосом дрозофилы, так называемым районам интеркалярного гетерохроматина. Эти районы имеют ряд особенностей, в том числе некоторые из них перестают реплицироваться в процессе формирования политенных хромосом. Владимир Алексеевич предположил, что наблюдаемое различие между гомологичными хромосомами связано как раз с недорепликацией ДНК в этих районах. Более того, он проанализировал имеющиеся данные других авторов и составил список таких районов. Этот список он запечатал в конверт и вручил мне, с тем чтобы я сравнил оба списка, но только после того как закончу собственный анализ сайтов гибридизации.

Цитогенетическая карта политенных хромосом дрозофилы в то время имелась двух видов: рисованная и очень подробная карта Бриджеса 1936 г. и фотографичекая карта Лефевра 1976 г. Хромосомы на этих картах были представлены лентами с поперечными полосами, что-то вроде штрих-кода. На рисованной карте число таких полосок приближалось к 5000, а на фотографической было около 2000. Если первая карта была слишком подробной и ею нельзя было пользоваться, то вторую надо было еще учить. Я в то время умел четко распознавать на цитологических препаратах только Х-хромосому, точнее, ее конец, примерно 10 % от длины хромосомы.

Без знания карты было невозможно ответить на ряд наиболее существенных вопросов:

1. Каковы различия между родительскими линиями дрозофилы?

2. Есть ли различия между родительскими хромосомами одного и того же индивидуума?

Решение этой задачи потребовало от меня мобилизации всех моих сил. Я наготовил препаратов политенных хромосом, сфотографировал большое число ядер с хорошо расправленными политенными хромосомами, напечатал фотографии и засел за их анализ. Постепенно, через две недели, я наконец-то научился распознавать все хромосомы и каждую из их 100 секций. Первое, что я установил, – это существенные различия между родительскими линиями. Две линии дрозофилы, с которыми я работал, имели всего 1 или 2 общих сайта гибридизации. Все остальные сайты, чуть больше 20 в каждой линии, оказались в неродственных участках хромосом. Второе – разные клетки одного и того же организма имели одно и то же расположение сайтов гибридизации. Третье – действительно, часть сайтов гибридизации совпадала с районами интеркалярного гетерохроматина, которые, как оказалось впоследствии, и были мне даны в запечатанном конверте».

Георгиев спешил опубликовать полученные результаты. Статья поступила в редакцию журнала «Science» 14 декабря 1976 г. и была опубликована в его январском номере 1977 г. (Georgiev *et al*., 1977). То есть с момента получения клонов дрозофилы в январе 1976 г. до опубликования статьи прошел всего один год. Это фантастическая скорость выполнения эксперимента и публикации статьи даже по меркам сегодняшнего времени. Статья называлась «Выделение эукариотических фрагментов ДНК со структурными генами и прилежащими фрагментами». Как следует из названия, главная идея статьи была в том, что клонированные фрагменты ДНК дрозофилы подтверждают гипотезу Георгиева о структуре гена. Это было прямо сформулировано в реферате статьи: «структурные гены дрозофилы находятся рядом с умеренно повторяющимися последовательностями». Кроме того, в статье описывались методические приемы для выделения структурных генов из дрозофилы и мыши, которые в дальнейшем не нашли применения, так как были разработаны более эффективные методы в других лабораториях. Но самый главный результат – варьирующая локализация фрагментов на политенных хромосомах – был описан очень кратко со ссылкой на подробную статью, которая была в процессе подготовки. Однако результаты по *in situ* гибридизации требовали своего объяснения. И тут возникла новая идея о том, что некоторые фрагменты имеют отношение к «интеркалярному гетерохроматину» и поэтому проявляют индивидуальные различия между линиями дрозофилы. В обсуждении результатов Георгиев написал единственную фразу относительно возможной мобильности новых элементов: «Нестабильная локализация повторяющейся последовательности на политенных хромосомах может быть связана с феноменом миграции генов, который был показан на кукурузе (McClintock, 1965) и дрозофиле (Green, 1969)» (см.: McClintock, 1956; Green, 1977; Fedoroff, 1989). Но никакого развития гипотеза о «прыгающих генах» в этой статье не получила, хотя варьирующая локализация фрагментов была первым доказательством существования мобильных элементов на молекулярном уровне. На рис. 1 этой статьи приведены фотографии политенных хромосом, где в местах асинапсиса Жениной рукой подписаны сайты гибридизации.

Следующая подробная статья с детальным описанием сайтов гибридизации и всей цитологической работы была опубликована через полтора года после статьи в «Science». Статья поступила в редакцию журнала «Chromosoma» 20 мая 1978 г. и была принята к печати 21 июля, а опубликована в декабре 1978 г. Такое запоздание объясняется тем, что статью долго писали и правили на русском языке, переводили на английский язык, а потом отправляли на утверждение в Государственный Комитет по атомной энергии, так как работа была сделана в биологическом отделе Института атомной энергии, засекреченной организации.

Статья была написана В.А. Гвоздевым, хотя Е.В. Ананьев был первым автором. Название статьи носило описательный характер: «Повторяющиеся гены с варьирующей локализацией в районах интеркалярного гетерохроматина на политенных хромосомах *Drosophila melanogaster*» (Ananiev *et al*., 1978). Статья содержала подробнейшее описание результатов гибридизации двух фрагментов ДНК – Dm225 и Dm234B, с

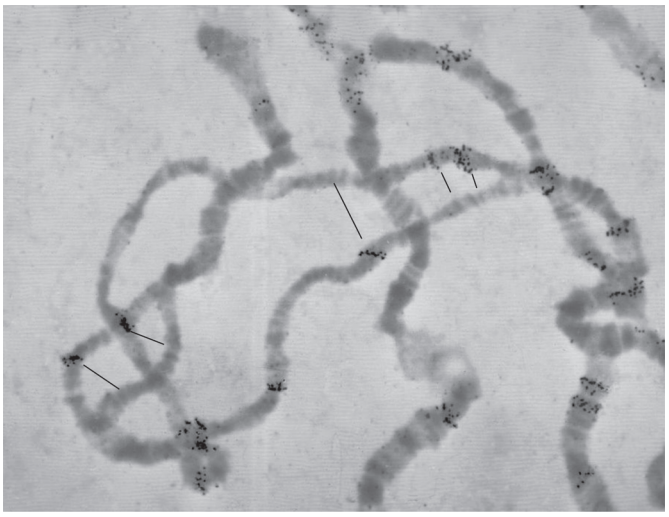


Рис. 1. Гибридизация фрагмента Dm225 с политенными хромосомами, опубликованная в журнале «Science» в 1977 г.

таблицей всех сайтов гибридизации на двух родительских линиях, схемой распределения их на хромосомах и великолепными цитологическими картинками политенных хромосом. В своих воспоминаниях Евгений Витальевич Ананьев писал: «Я довольно сильно настаивал на том, чтобы статью назвать по существу: мобильные элементы или прыгающие гены. Я с интерпретацией Гвоздева не мог согласиться». Однако мнение Владимира Алексеевича превалировало, и гипотеза о мобильности элементов в статье не обсуждалась. Статья заканчивалась словами: «наши результаты дают возможность для прямого и широкого исследования структуры и функции интеркалярного гетерохроматина». На самом деле статья была первым подробным классическим описанием мобильных элементов на цитологическом уровне. Впоследствии метод сравнения двух неродственных линий был повторен в многочисленных публикациях по мобильным элементам не только у дрозофилы, но и других высших организмов.

В том же 1978 г. была опубликована статья Ю.В. Ильина с соавт. «Новый тип организации генетического материала у эукариот» (Ильин и др., 1978). И в этой статье гипотеза о «прыгающих генах» не обсуждалась, хотя мобильные элементы и были в действительности «новым типом генетического материала». Ильин пытался разрешить парадоксальное различие между относительно небольшим числом сайтов гибридизации (20 сайтов), наблюдаемых на политенных хромосомах, с гораздо бóльшим числом копий (около 250 сайтов), определяемых в ДНК культуры клеток. Он справедливо предположил, что «в среднем должно быть 10 копий гена на каждый сайт для генов Dm225 и Dm224. Это может объяснить их бóльшую нестабильность». Однако логическая ошибка заключалась в том, что сравнивалось число копий генов в политенных хромосомах личинок, одной из стадий развия целостного организма, с числом копий в ДНК культуры клеток, которая представляет собой искусственнную систему поддержания клеток вне организма. И, как было показано позже, мобильные гены оказались способными накапливать свои копии в культуре клеток вне хромосом, тогда как в хромосомах их число ограничено.

Летом 1977 г. Г.П. Георгиев представил результаты работы на симпозиуме по молекулярной биологии в Колд Спринг Харборе (США). Как всегда, в докладе были смешаны результаты по клонированию ДНК животных (мыши и человека) и насекомых (дрозофилы). Но в этом докладе уже приводились данные по гибридизации *in situ* на родительских линиях и рассматривалась гипотеза о «прыгающих генах» как одном из возможных объяснений варьирующего расположения генов между разными родительскими линиями (Ilyin *et al*., 1978). На этой же конференции докладывали свои

данные на сходных генетических элементах у дрозофилы и ученые из США: Дэвид Хогнесс и его ученик Джеральд Рубин, которые были главными конкурентами в этой области. Однако американские коллеги проводили работу только на одной линии дрозофилы и весьма скептически отнеслись к различиям между линиями. Несмотря на свой первоначальный скептицизм, Хогнесс и Рубин правильно оценили идею о «прыгающих генах». Через два года, в 1979 г., Рубин с соавторами опубликовали две статьи в журнале «Cell», в которых они показали, что в культуре клеток число копий элементов многократно увеличено, и они перемещаются по геному (Potter *et al*., 1979). Чтобы понять, что же происходит на уровне организма, авторы провели *in situ* гибридизацию с политенными хромосомами 4 линий дрозофилы, полученными из отдаленных географических мест (Strobel *et al*., 1979). На четырех линиях Рубин с соавторами увидели то же, что и Евгений на двух – межлинейную вариацию. В своей статье Рубин с соавторами не привели точной локализации сайтов на цитологической карте, как это сделал Евгений, а подсчитали только общее число сайтов гибридизации. Наверное, в лаборатории Рубина не нашлось энтузиаста, который смог бы выучить цитогенетическую карту дрозофилы на память. Но Рубин использовал прием Ананьева – он скрестил две линии дрозофилы и выискивал на препаратах участки с разошедшимися хромосомами. Таких участков встречается мало, но в них легче было видеть различия по сайтам гибридизации на родительских хромосомах, что и использовалось как доказательство перемещения элементов на уровне организма. Основываясь на полученных результатах, Рубин смело назвал свои элементы «мобильными».

Начиная с 1977 г. изучение мобильных элементов носило взрывной характер. Они были клонированы и исследованы у многих организмов. Мистические контролирующие элементы, описанные у кукурузы Б. Мак-Клинток в 1950-х гг., тоже были клонированы и перестали быть генетической абстракцией. Мак-Клинток получила Нобелевскую премию «за открытие мобильных элементов» только в 1983 г. Здесь уместно отметить, что в 1993 г. была вручена Нобелевская премия Ричарду Робертсу и Филиппу Шарпу за открытие «расщепленных генов», которое было сделано ими в 1977 г. Они разрешили парадокс избыточной ядерной РНК, который так волновал Георгия Павловича в 1970-х гг. Структура гена у животных не соответствовала его модели. Оказалось, все наоборот. К относительно небольшой регуляторной зоне прилегает гигантская структурная часть, которая расщеплена на кодирующие (экзоны) и некодирующие (интроны) сегменты. Из гигантской ядерной РНК некодирующие сегменты вырезаются, образуя маленькую цитоплазматическую РНК, которая на рибосомах направляет синтез белка. Такое «абсурдное» строение гена невозможно было предсказать, основываясь только на простой логике.

Симпозиум 1979 г. в Колд Спринг Харборе уже назывался «Мобильные генетические элементы». На этом симпозиуме из лабораторий Гвоздева и Георгиева были представлены 4 доклада. Георгиев сделал программный доклад, в котором наконец-то назвал открытые новые элементы МДГ – мобильные диспергированные гены (Georgiev *et al*., 1981). Но в литературе прижились другие, менее формальные наименования, такие, как *copia* и *gypsy* («цыган», первоначально описанный как МДГ4). Название МДГ в научной литературе встречается крайне редко. Лаборатория Георгиева продолжала интенсивное изучение механизмов перемещения МДГ, их структуры и роли в генетических процессах и внесла значительный вклад в эту отрасль молекулярной биологии, однако пальма первенства осталась за Хогнессом и Рубиным, и мобильные элементы дрозофилы вошли в учебники с их именами. Но хронология событий, записанная в статьях 1977–1979 гг., свидетельствует о том, что Е.В. Ананьев был первым, кто понял природу этих элементов и выполнил тонкий цитогенетический анализ, доказывающий, что были найдены «прыгающие гены», хотя имя его в обширной литературе по мобильным элементам уже давно не упоминается.

В 1983 г. коллективу авторов в составе 10 человек была присуждена Государственная премия СССР за цикл работ «Мобильные гены животных» (газета «Правда» 7 ноября 1983 г. № 311 23837). После этого события сотрудничество между двумя лабораториями постепенно прекратилось, но мобильные элементы и по сей

день остаются объектом генетических исследований в обеих лабораториях. Лаборатория Г.П. Георгиева в 1990 г. была реорганизована в Институт биологии гена АН СССР.

В 1983 г. Е.В. Ананьев защитил докторскую диссертацию «Цитогенетика мобильных элементов дрозофилы» и перешел в Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова АН СССР на должность заведующего лабораторией. Но ему пришлось изменить объект своих исследований и заняться изучением генома ячменя. С тех пор он больше к дрозофиле не возвращался. В 1992 г., в разгар перестойки, мы переехали в США, чтобы продолжать научную работу, которой в те годы на Родине уже заниматься было невозможно. С 1995 по 1998 гг. Евгений Витальевич работал в Университете Миннесоты США с линиями овса, несущими дополнительные хромосомы кукурузы. Здесь первый и единственный раз за всю свою 40-летнюю научную карьеру у него были абсолютная свобода и замечательные условия работы. Здесь он мог реализовать свои идеи. За три года он опубликовал 10 статей, в каждой из которой был экспериментальный материал, наработанный его собственными руками. Здесь он сделал свое второе фундаментальное открытие: клонирование структурного элемента растительной центромеры (Ananiev *et al*., 1998). На основе этого элемента в его лаборатории уже в компании «Pioneer Hi-Bred International» в 2006 г. была собрана первая искусственная хромосома растений (Ananiev *et al*., 2009; Данилевская, 2010). Это был счастливейший момент его жизни, когда разработанная стратегия оказалась правильной и идея сработала. «Создание искусственной хромосомы венчает мою научную карьеру. Выше этого ничего быть не может». Но 2006 г. оказался трагическим годом его жизни. У него была обнаружена опухоль мозга, и дни его жизни были сочтены. Он это очень хорошо понимал и старался как можно больше сделать за тот кроткий срок, который ему был отведен. Он писал воспоминания, чтобы история его жизни осталась для потомков. «После человека остается только слово» – так начинаются его воспоминания. И только недавно я поняла, почему он так написал. Ведь это перекликается с Библией: «вначале было слово». И в конце остается только слово.

До конца жизни Евгений Витальевич с горечью вспоминал события того времени, когда были открыты мобильные элементы. Его мучил вопрос, почему его наблюдение и гипотеза о прыгающих генах не нашли поддержки. Уже будучи тяжело больным, он диктовал мне (О.Н. Данилевская – супруга Е.В. Ананьева – *ред*.) свои воспоминания в больнице в новогоднюю ночь уходяшего 2006 г.

«Возможность была все правильно сделать в 1976 году, как только я обнаружил это явление. И сил, и средств для того чтобы развивать это направление, было больше чем достаточно. Суммарно лаборатории Гвоздева и Георгиева имели около 20 выдающихся молодых научных сотрудников с большим научным потенциалом. Но в силу разнонаправленных интересов Гвоздева и Георгиева это открытие не получило правильного теоретического объяснения и экспериментальной разработки, хотя для этого были все условия и ресурсы. Гвоздев пытался приспособить эти данные для объяснения структуры интеркалярного гетерохроматина, который, по его мнению, состоит из кластеров повторяющихся элементов, в то время как Георгиев пытался приспособить эти данные для потверждения своей гипотезы о том, что рассеянные повторяющиеся элементы служат для регуляции разных генов под действием неких общих факторов. Ни тот, ни другой в упор не хотели видеть главного факта, что эти элементы способны перемещаться по геному дрозофилы. После того как Хогнесс и Рубин прямо назвали элементы тем, чем они являлись, – мобильными элементами – наконец-то и Гвоздев, и Георгиев вышли из-под гипноза собственных идей, но два года были уже упущены, чтобы захватить абсолютное лидерство в этой области».

Николай Чуриков узнал о том, что Женя смертельно болен в конце 2007 г. Он позвонил нам в Америку 2 января 2008 г. Это были последние дни, когда Женя был в сознании. Вот так в Колиной памяти остался этот разговор: «Действительно, Женя меня узнал. Мы все же немного поговорили. Я ему сказал, что всегда помню и ценю, что мы вместе с ним своими руками сделали эту работу. Конечно, я осознавал, что это, может быть, наш последний разговор. Поэтому эти слова были очень взвешенными и правдивыми. Буквально – перед лицом смерти.

Мне даже сейчас трудно об этом писать. Без Жени это открытие не состоялось бы».

Евгений Витальевич ушел из жизни 10 января 2008 г., не дожив трех дней до своего дня рождения. Ему исполнился бы 61 год (Данилевская, 2008; Mirkin, 2008; Rafalski; 2009).

Литература

Данилевская О.Н. Вклад Е.В. Ананьева и исследование центромеры и конструирование искусственной хромосомы растений // Генетика. 2010. Т. 46. № 9. С. 1214–1216.

Данилевская О.Н. От мобильных элементов к искусственной хромосоме // Природа. 2008. № 12. С. 61–71.

Ильин Ю.В., Ананьев Е.В., Чуриков Н.А., Гвоздев В.А., Георгиев Г.П. Новый тип организации генетического материала у эукариот // Изв. АН СССР. Сер. биологическая. 1978. № 5. С. 761–764.

Ananiev E.V., Gvozdev V.A., Ilyin Yu.V., Tchurikov N.A., Georgiev G.P. Reiterated genes with varying location in intercalary heterochromatin regions of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes // Chromosoma. 1978. V. 70. N 1. P. 1–17.

Ananiev E.V., Phillips R.L., Rines H.W. Chromosome-specific molecular organization of maize centromeric regions // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. N 22. P. 13073–13078.

Ananiev E.V., Wu C., Chamberlin M.A., Svitashev S., Schwartz C., Gordon-Kamm W., Tingey S. Artificial chromosome formation in maize (*Zea mays* L.) // Chromosoma. 2009. V. 118. N 2. P. 157–177.

Fedoroff N. Maize transposable elements // Mobile Elements / Eds D. Berg, M. Howe. American Society of Microbiology. Washington, D.C. 1989. P. 371–411.

Georgiev G.P. On the structural organization of operon and the regulation of RNA synthesis in animal cells // J. Theor. Biol. 1969. V. 25. N 3. P. 473–490.

Georgiev G.P., Varshavsky A.J., Ryskov A.P., Church R.B. On the structural organization of the transcriptional unit in animal chromosomes // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1974. V. 38. P. 869–884.

Georgiev G.P., Ilyin Y.V., Chmeliauskaite V.G., Ryskov A.P., Kramerov D.A., Skryabin K.G., Krayev A.S., Lukanidin E.M., Grigoryan M.S. Mobile dispersed genetic elements and other middle repetitive DNA sequences in the genomes of Drosophila and mouse: transcription and biological significance // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1981. V. 45. Pt 2. P. 641–654.

Georgiev G.P., Ilyin Y.V., Ryskov A.P., Tchurikov N.A., Yenikolopov G.N., Gvozdev V.A., Ananiev E.V. Isolation of eukaryotic DNA fragments containing structural genes and the adjacent sequences // Science. 1977. V. 195. N 4276. P. 394–397.

Green M.M. A case for DNA insertion mutants in *Drosophila melanogaster* // DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes / Eds A.I. Bukhari, J.A. Shapiro, S.L. Adhya. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1977. P. 437–445.

http://nobelprize.org/nobel_prizes/

http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml

Ilyin Y.V., Tchurikov N.A., Ananiev E.V., Ryskov A.P., Yenikolopov G.N., Limborska S.A., Maleeva N.E., Gvozdev V.A., Georgiev G.P. Studies on the DNA fragments of mammals and Drosophila containing structural genes and adjacent sequences // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1978. V. 42. Pt 2. P. 959–969.

McClintock B. Controlling elements and the gene // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1956. V. 21. P. 197–216.

Mirkin S.M. A tribute to Evgenii V. Ananiev, 1947–2008 // PLoS Genet. 2008. V. 4. N 8. e1000122.

Potter S.S., Brorein W.J. Jr, Dunsmuir P., Rubin G.M. Transposition of elements of the *412*, *copia* and *297* dispersed repeated gene families in Drosophila // Cell. 1979. V. 17. N 2. P. 415–427.

Rafalski A. In memoriam – Evgueni Ananiev // Chromosoma. 2009. V. 118. N 2. P. 153–155.

Strobel E., Dunsmuir P., Rubin G.M. Polymorphisms in the chromosomal locations of elements of the *412*, *copia* and *297* dispersed repeated gene families in Drosophila // Cell. 1979. V. 17. N 2. P. 429–439.

Thomas M., Cameron J.R., Davis R.W. Viable molecular hybrids of bacteriophage lambda and eukaryotic DNA // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1974. V. 71. N 11. P. 4579–4583.

TRANSPOSABLE ELEMENTS OF DROSOPHILA: DISCOVERY AND DISCOVERERS' FATE

O.N. Danilevskaya

Pioneer Hi-Bred International, A DuPont Company Johnston, USA,
e-mail: olga.danilevskaya@pioneer.com

Summary

The discovery of transposable genetic elements in Drosophila was the most important achievement of Soviet molecular biology. Just Soviet scientists obtained the first molecular proof of the existence of mobile elements in eukaryotes. The history of the discovery is narrated on the base of personal diaries and letters of the key contributors to the work.

Key words: transposable elements, Drosophila.

РОЛЬ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ В ГЕНОМЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Л.А. Васильева[1, 2], О.В. Антоненко[1], И.К. Захаров[1, 2]

[1] Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: ratner@bionet.nsc.ru;
[2] Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Открытие мобильных генетических элементов (МГЭ) породило проблему выяснения их роли в геномах генетических объектов. Накопившиеся за три последних десятилетия экспериментальные данные позволяют сделать ряд выводов, касающихся поведения и роли МГЭ в геномах. Так, в настоящее время известно, что спонтанная скорость инсерций транспозиций мобильных генетических элементов у дрозофилы в целом на 1–2 порядка величин выше спонтанной скорости возникновения рецессивных мутаций и составляет 10^{-4}–10^{-5} событий на сайт на геном за поколение. Считается, что большинство олигогенных (майор-генных) мутаций – результат инсерций МГЭ. Кроме того, МГЭ могут изменять функцию и активность мажорных и минорных генов, так как в своей структуре содержат мотивы систем управления и энхансеры, состоящие из нескольких модулей и поэтому способные связываться с различными регуляторными белками, активирующими процесс транскрипции. В результате кроссинговера между LTR (длинные концевые повторы) могут возникать хромосомные перестройки различных типов: делеции, дупликации, инверсии. МГЭ могут достраивать теломерные концы хромосом, участвовать в горизонтальном переносе генов. МГЭ откликаются вспышкой транспозиций при различных стрессовых воздействиях на геномы.

В работе представлены данные по оценке скоростей индукции транспозиций при внешних стрессовых воздействиях, таких, как холодовой и тепловой шок, пары этанола, γ-облучение. Показано, что внешние стрессовые воздействия увеличивают скорость индукции транспозиций МГЭ на 1–2 порядка величин по сравнению со спонтанной скоростью и составляют 10^{-2}–10^{-3} на сайт на геном за поколение. Кроме того, в результате действия таких генетических факторов, как аутбридинг, инбридинг и селекция, также происходит существенное изменение паттерна мобильных генетических элементов в геноме.

Таким образом, можно заключить, что система мобильных генетических элементов в геномах столь же реальна и универсальна, как система SOS-репарации и система гормонального контроля. Можно предположить, что МГЭ выполняют функцию своего рода рецепторов стрессирующих сигналов, инициирующих вспышки транспозиционной изменчивости в критические периоды эволюции популяций. Это может приводить к быстрому преобразованию гомеостатической видовой нормы и, возможно, к видообразованию. Можно предположить, что наличие МГЭ, в частности в геномах эукариот, дает возможность популяциям в целом выживать в резко измененных условиях среды. Следовательно, можно считать, что МГЭ непосредственно участвуют в экспрессии генов, контролирующих признаки, в селекции и эволюции.

Ключевые слова: ДНК, мобильные генетические элементы, изогенизация, инбридинг, аутбридинг, селекция, стрессовые условия, индукция транспозиций МГЭ, *Drosophila melanogaster*.

Мобильные генетические элементы (МГЭ) – это дискретные сегменты ДНК, имеющие нефиксированную локализацию на хромосоме и способные перемещаться по геному.

Мобильные элементы были обнаружены в 1950 г. Б. Мак Клинток (McClintok, 1950, 1951; Federoff, 1994), изучавшей изменчивость окраски зерен кукурузы. За открытие мобильных ге-

нетических элементов в 1983 г. Б. Мак-Клинток была удостоена Нобелевской премии. В 1960-х гг. МГЭ были обнаружены у микроорганизмов, в конце 1970-х гг. – у дрозофилы, практически одновременно в США и в СССР. В США МГЭ были обнаружены группой генетиков, возглавляемых Д. Хогнессом (Rubin *et al.*, 1976; Finnegan *et al*., 1978; Strobel *et al*., 1979; Young, 1979), в СССР – коллективом генетиков во главе с Г.П. Георгиевым (Ananiev *et al*., 1978; Ilyin *et al*., 1978; Георгиев, Гвоздев, 1980). Высокогомологичные последовательности МГЭ к настоящему времени обнаружены у различных видов, даже таких далеко отстоящих друг от друга по эволюционному статусу, как нематоды и млекопитающие (Arkhipova *et al*., 1995; Zupunski *et al*., 2001; Mobile DNA, 1989). МГЭ у видов таких родов, как *Drosophila* и *Arabidopsis*, могут занимать до 30 % всего генома (Biemont, Vieira, 2005), у млекопитающих – около половины генома, а у амфибий и растений – от 70 до 90 % (Иващенко, Гришаева, 2009). Показано, что у дрозофилы МГЭ являются существенной частью генома прокариот и эукариот и составляют 4–6 % эухроматина и 50–60 % гетерохроматина (Kaminker *et al*., 2002). Одним из первоначальных предположений было то, что МГЭ играют роль «эгоистических геномных паразитов» (Doolittle, Sapienza, 1980; Orgel, Crick, 1980). Однако к настоящему моменту многочисленные исследования преумножают значение МГЭ как в геноме, так и в эволюции. Показано, что инсерции (внедрение) и эксцизии (вырезание) МГЭ могут вызывать значительные изменения в функционировании генома (Strand, McDonald, 1989). Следовательно, они могут преобразовывать генетическое разнообразие в популяциях и, тем самым, быть участниками селекционных процессов и эволюции в целом (Engels, 1989; Finnegan, 1992).

МГЭ обладают собственными механизмами перемещения в геноме или могут их утрачивать в процессе размножения в геноме. Они выполняют разнообразные функции, и активация различных семейств МГЭ может иметь как отрицательные, так и положительные последствия для генома хозяина (Strand, McDonald, 1989; Гвоздев, 1998). Однако до сих пор вопрос о функциях МГЭ в геноме остается до конца невыясненным и требует дальнейшего изучения. В настоящее время в круге научных интересов находится ряд весьма существенных проблем: проблема взаимоотношения МГЭ с геномом хозяина, механизмы транспозиций МГЭ, активация перемещений МГЭ в ответ на действие неблагоприятных (стрессовых) факторов, участие в селекционном процессе, а также проблема роли МГЭ в эволюции (см. обзоры: Mobile DNA, 1989; Евгеньев, 2007; Чересиз и др., 2008).

Изучение роли МГЭ в геномах осуществляется с использованием современных информационных технологий. Имеются базы данных по секвенированным фрагментам геномной ДНК ряда организмов, и это значительно облегчает как поиск самих повторяющихся последовательностей в структуре отдельных геномов, так и выявление общих закономерностей их поведения. Изучена структура многих мобильных элементов. Это позволило выявить в МГЭ такие структурные элементы, благодаря действию которых МГЭ способны оказывать влияние на экспрессию генов, подпадающих под их контроль. Изучение роли МГЭ в геномах облегчается тем, что общее число МГЭ у дрозофилы относительно мало – около 10^3 копий на гаплоидный хромосомный набор, а сходство нуклеотидных последовательностей внутри каждого семейства очень велико. Кроме того, частоты транспозиций при стрессовых воздействиях, которым подвергаются геномы и популяции в целом, так существенно отличаются от частот спонтанных транспозиций, что удается безошибочно зафиксировать все происходящие изменения паттернов МГЭ.

Одним из наиболее удобных экспериментальных объектов для изучения роли МГЭ в геноме является *Drosophila melanogaster*, при работе с которой можно использовать уникальные методы исследования. С разработкой метода гибридизации *in situ* МГЭ на политенных хромосомах дрозофилы стало доступно изучение поведения мобильных генетических элементов в различных ситуациях. Например, анализ паттерна МГЭ у потомков, родители которых были подвергнуты внутренним физиологическим стрессам, таким, как селекционное давление, инбридинг, изогенизация, аутбридинг, и стрессам от внешних факторов: гамма-облучения, шоковой температуры, алкоголя, детергентов и др.

Классификация мобильных генетических элементов

Классификация мобильных генетических элементов основана на различиях в их структуре и связанных с ней механизмах перемещения в геноме. По основным признакам все обнаруженные до настоящего времени семейства МГЭ представлены 3 классами (табл. 1).

Таблица 1

Классификация мобильных элементов (Иващенко, Гришаева, 2009)

Классы мобильных элементов	Мобильные элементы
Класс I: ДНК-транспозоны	IS *P*, *hobo* *Tc-1* *mariner* *Tc1*/*mariner* *Helitron* (*Y2*) *MITEs* (*miniature inverted-repeat transposable elements*)
Класс II: автономные ретротранспозоны	
I подкласс: ретротранспозоны с LTR включая ретровирусы	*gypsy*, *copia* *Ty3*, *Ty5* *HIV*, *MLV* *МДГ1*, *МДГ2*
II подкласс: ретротранспозоны без LTR, или ретропозоны	*I, jockey* *L1* (*LINE*), *Alu* (*SINE*) *другие SINEs* *R1* *R2* *he-TA*, *TART* *TRAS1*, *SART1* *IAP*
III подкласс	*Penelope-like elements* (*PLEs*)
Класс III: Пассивные элементы типа fold-back	FB TU

Класс I. ДНК-транспозоны или классические транспозоны

К классу I относят МДГ, кодирующие фермент транспозазу, которая способна узнавать концы «своего» элемента и по этим концам вырезать его из хромосомы или встраивать в хромосомы генома хозяина. Такой механизм перемещения МГЭ получил название «ДНК–ДНК перемещение» (Capy *et al*., 1998). ДНК-транспозоны первоначально были открыты у бактерий, но к настоящему времени обнаружены в геномах многих эукариот включая дрожжи, насекомых, червей, животных и человека. Транспозоны имеют небольшие размеры, ограничены с двух сторон короткими инвертированными повторами (ITR). Таким образом, ITR фланкируют открытую рамку считывания (ORF), определяющую синтез транспозазы, которая необходима для перемещения элемента. ITR сближаются, узнаются транспозазой и точно отрезаются от соседних участков ДНК хозяина. Первичная структура ITR у разных семейств ДНК-транспозонов различна.

Класс II. Ретротранспозоны

К этому классу относят элементы, которые в процессе своего перемещения сначала синтезируют цепь РНК, с которой затем с помощью фермента обратной транскриптазы синтезируется комплементарная цепь ДНК. После удвоения двуцепочечная ДНК способна встраиваться в различные районы хромосом хозяина. Такой способ встраивания получил название ДНК–РНК–ДНК механизма (Finnegan, 1989).

Класс ретротранспозонов включает три подкласса: **LTR-ретротранспозоны и ретровирусы, non-LTR-ретротранспозоны и ретроэлементы (*Penelope-like elements*)**.

Подкласс LTR-ретротранспозонов и ретровирусов. В подкласс LTR-ретротранспозонов входят и ретровирусы, сходные с ними по строению. Центральные районы элементов этого подкласса с обоих концов фланкированы длинными терминальными повторами (LTR). Для каждого семейства характерны свои терминальные повторы. Они отличаются длиной, варьирующей в пределах от 250 до 500 п.о. (Arkhipova *et al*., 1995) и нуклеотидной последовательностью,

которая обычно много консервативнее, чем остальные части элемента (Kulguskin *et al*., 1991). Основной чертой этих элементов является активная транскрипция РНК. Ретротранс-позоны и ретровирусы содержат гены *gag* и *pol*, которые кодируют антигены групповой специфичности, обратную транскриптазу, рибонуклеазу и интегразу для обеспечения обратной транскрипции кДНК с РНК. Различия между семействами ретротранспозонов и ретровирусов связаны с геном *env*, который кодирует белок оболочки вирусов, давая вирусам возможность перемещаться между клетками. У ретротранспозонов с LTR имеются только остатки этого гена, что обусловливает их внедрение только в тот геном, из которого они были вырезаны (Иващенко, Гришаева, 2009). LTR-ретротранспозоны распространены в геномах практически всех эукариот: в ДНК растений, грибов, позвоночных и беспозвоночных животных.

Подкласс non-LTR-ретротранспозонов или ретропозонов. К подклассу non-LTR-ретротранспозонов или ретропозонов относятся *LINE*- (long interspersed nuclear element) и *SINE*- (short interspersed nuclear element) элементы. Известно около 20 семейств элементов группы LINE, в частности *F*, *G*, *Doc*, *jockey*, *Helena*, *Het-A*, *TART* у дрозофилы, *L1* у млекопитающих, *ingi* у трипаносомы и cin4 у кукурузы и т. д. Длина полноразмерных ретропозонов составляет 3,5–8 т.п.н. Они обладают двумя рамками считывания (ORF), которые кодируют ферменты, необходимые для их перемещения. Основными продуктами ORF являются белок, а также эндонуклеаза и обратная транскриптаза. У ретропозонов в отличие от LTR-ретротранспозонов процесс обратной транскрипции происходит на ядерной ДНК с использованием сайта-мишени в качестве праймера (Cost *et al*., 2002). Большинство ретропозонов не являются сайт-специфичными и могут мигрировать в очень большое число сайтов (Иващенко, Гришаева, 2009). Надсемейство ретроэлементов *SINE* включает короткие (около 300 п.н.) и рассеянные по геному последовательности. Они найдены в геномах человека, грызунов, рыб, лягушек, растений и насекомых. Для этого семейства характерно присутствие центрального района, повторяющего 3′-нетранслируемый участок элементов *LINE* (Kapitonov, Jurka, 2003). Предполагается, что *LINE* могут влиять на подвижность *SINE*-элементов (Cary, 1998).

Подкласс ретроэлементов (Penelope-like elements). *Penelope*-подобные элементы представляют собой необычный класс ретротранспозонов, которому присущи характеристики всех ретроэлементов. *Penelope* был впервые обнаружен в геноме *Drosophila virilis* как элемент, играющий основную роль в процессе гибридного дисгенеза. Позже *Penelope*-подобные элементы были найдены в геномах многих эукариот: у ракообразных, червей, рыб, амфибий и пресмыкающихся. Как и у ретропозонов, у них часто прослеживается наличие усеченного 5′-конца и варьирующих по длине дупликаций сайтов-мишеней. С другой стороны, некоторые из них имеют LTR либо в прямой, либо в инвертированной ориентации. Важным обстоятельством является то, что у всех элементов этого нового семейства найден классический интрон в гене, кодирующем обратную транскриптазу (Иващенко, Гришаева, 2009).

Класс III. Пассивные элементы типа fold-back

К этому классу относят семейство элементов FB (fold-back). Размеры этих МГЭ варьируют от нескольких сотен до нескольких тысяч пар оснований. Длинные инвертированные повторы, расположенные на концах FB-транспозонов, имеют достаточно сложную внутреннюю организацию из более мелких повторов, которые представляют собой тандемные копии простых последовательностей, разделенных длинными участками различающихся последовательностей (Иващенко, Гришаева, 2009).

Такие элементы обнаружены у дрозофилы (Vivas *et al*., 1999), растений (Macas *et al*., 2003). Было показано, что некоторые нестабильные мутации у дрозофилы были вызваны инсерциями FB (Caceres *et al*., 2001). Механизм перемещения FB элементов пока не известен.

Структура МГЭ *mdg2* и *hobo*

На наш взгляд, наибольший интерес среди всех типов МГЭ представляют ретротранспозоны, такие, как *mdg1*, *mdg2*, *copia* и др. Они являются наиболее широко и разнообразно

представленной группой МГЭ. Кроме того, в большом количестве экспериментов использованы транспозоны, такие, как *P*-элемент, *hobo* и др. В нашей работе исследованы паттерны ретротранспозонов *mdg1* и *mdg2*, относящихся к надсемейству *gypsy-Ty3* элементов подкласса LTR-ретротранспозонов, а также для контраста – транспозон *hobo* (бродяга). В качестве примера на рис. 1 и 2 представлены схемы строения ретротранспозона *mdg2* и транспозона *hobo*.

Показано, что МГЭ содержат широкое разнообразие регуляторных мотивов, среди которых наиболее интересны энхансеры и сайты теплового шока или, вернее сказать, мотивы этих сайтов. Известно, что энхансеры способны в десятки и сотни раз усиливать транскрипцию генов, находящихся на расстоянии до 5000 н.п. от этих генов (Maniatis *et al*., 1987). Так, И.А. Шахмурадов с соавт. (1989) методом контекстного анализа показали, что в структуре многих МГЭ (в том числе *mdg1*, *mdg2*, *mdg4*, *copia*) имеются мотивы энхансероподобных сайтов. Кроме того, обнаружены регуляторные сайты теплового шока (РСТШ), присутствующие в 5′-областях перед началом транскрипции эукариотических генов и проявляющие эффект теплового шока. Несмотря на то что у *mdg2* дрозофилы такой вариант РСТШ не обнаружен, это не исключает возможного присутствия в структуре этого МГЭ других РСТШ (см. также: McDonald *et al*., 1987). Отметим, однако, что наличие РТСШ-подобного сайта еще не гарантирует его функционирование. Однако появление вблизи функционального гена в результате инсерции дополнительного энхансера способно резко активизировать или супрессировать этот ген. Инсерция МГЭ, содержащая РСТШ, способна подчинить соседние гены системе теплового шока и сделать их чувствительными к стрессовым факторам окружения.

Индукция транспозиций МГЭ внешними средовыми и физиологическими стрессовыми воздействиями

Впервые предположение о том, что увеличение скоростей перемещения МГЭ в геномах в результате воздействия неблагоприятных средовых и физиологических факторов было высказано первооткрывательницей мобильных элементов Б. Мак-Клинток (McClintock, 1956, 1978, 1980, 1984). Индукция транспозиций МГЭ стрессовыми внешними и физиологическими воздействиями также изучалась Д. Стрендом и Дж. Макдональдом (Strand, McDonald, 1989), Н. Юнаковичем с соавторами (Junakovic *et al*., 1986), К. Бьемоном с сотрудниками (Arnault, Biemont, 1989), Л.З. Кайдановым с соавт. (Гвоз-

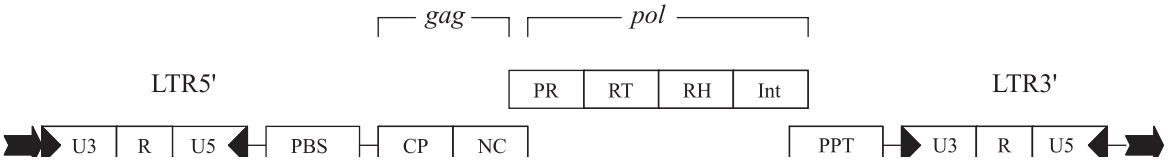


Рис. 1. Структура МГЭ надсемейства *gypsy-Ty3* (по: Will *et al*., 1981; Yuki *et al*., 1986; Capy *et al*., 1998).

LTR5′(3′) – прямые длинные концевые повторы, содержащие три функциональных домена (U3, R, U5); PBS – тРНК-праймер-связывающийся сайт; *gag* – первая открытая рамка считывания, имеющая гомологию с геном *gag* ретровирусов, который кодирует белковые компоненты нуклеопротеиновой сердцевины вириона (CP – белок суперкапсида, NC – белок ядерного капсида); *pol* – вторая открытая рамка считывания, напоминающая вирусный ген *pol*, который кодирует все белки, необходимые для транскрипции (PR – протеаза, RT – ревертаза, RH – РНКза H, Int – интеграза); PPT – обогащенная пуринами последовательность.

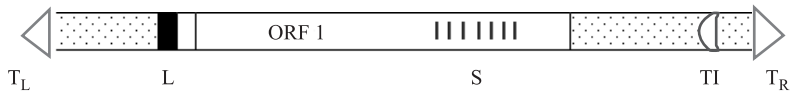


Рис. 2. Структура мобильного элемента *hobo* (по: Гришаева, Иващенко, 1997).

ORF – открытая рамка считывания; T_L и T_R – левый и правый концевые инвертированные повторы; TI – усеченная копия концевого повтора; S – 15 копий короткого повтора; L – 2 копии длинного повтора.

дев, Кайданов, 1986; Кайданов и др., 1996а, б), Л.А. Васильевой и В.А. Ратнером с соавторами (Васильева и др., 1987а, б, 2004; Ratner *et al*., 1992; Аникеева и др., 1994; Бубенщикова и др., 2002). В исследованиях было обнаружено, что стрессовые воздействия в той или иной степени увеличивают скорость индукции транспозиций мобильных генетических элементов. П. Барсанти и Г. Палумбо показали, что действие теплового шока значительно увеличивает частоту реверсий к дикому типу инсерционных мутантов w^a и что эти реверсии коррелируют с эксцизиями элемента *copia* из локуса *white* (Barsanti, Palumbo, 1985).

Т.И. Герасимовой с соавторами описаны «транспозиционные взрывы» в отдельных генеративных клетках, которые могут возникать после генетического воздействия или спонтанно в линиях дрозофил, скорости транспозиций МГЭ могут флуктуировать от времени года (Герасимова и др., 1984; Gerasimova *et al*., 1984; Герасимова, 1985, 1990). Эта же группа исследователей изучала действие химических агентов, в частности митомицина *C*, анализируя рисунок распределения МГЭ *gypsy* в политенных хромосомах. В результате были обнаружены одиночные транспозиции *gypsy*, которые, по мнению авторов (Георгиев и др., 1988), возникли при активации процесса гомологичной рекомбинации митомицином *C*. Кроме того, транспозиции некоторых МГЭ индуцируются в *P-M*- и *I-R*-системах дрозофилы при дисгенных скрещиваниях (Engels, 1989). Т. Маккей с сотрудниками (Shrimpton *et al*., 1987; Mackay, 1988) путем дисгенных скрещиваний в *P-M*-системе индуцировали изменчивость числа абдоминальных и стерноплевральных щетинок у дрозофилы. Затем производили отбор в течение ряда поколений на увеличение или уменьшение этих количественных признаков. В результате в селекционных линиях было найдено значительное число транспозиций *P*-элемента, в том числе вновь приобретенных локализаций, многие из которых были «горячими», т. е. встречались многократно в повторных экспериментах. В этом случае признаки не были непосредственно связаны с приспособленностью.

В работах Стренда и Макдональда (Strand, McDonald, 1985), Юнаковича (Junakovic *et al*., 1986) было показано, что на активность МГЭ, в частности, влияют такие факторы, как шоковая тепловая обработка, ультрафиолетовое излучение (УФ) и γ-облучение. Получены результаты по инсерционному перемещению МГЭ *copia*, позволяющие авторам сформулировать гипотезу о том, что позиция и регуляторная активность ретроподобных элементов внутри локусов могут значительно повлиять на фенотип мутационного признака. Прямое доказательство индукции транспозиций МГЭ *mdg2* при помощи различных стрессовых воздействий было получено сотрудниками лаборатории молекулярно-генетических систем ИЦиГ СО РАН. В изогенных линиях, самцы которых были подвергнуты температурному шоку или γ-облучению, или были обработаны парами этанола, многочисленные транспозиции были обнаружены в следующем поколении потомков (табл. 2–4). При обработке самцов температурным шоком (табл. 2) в 18 сайтах политенных хромосом присутствуют инсерции транспозиций *mdg2*.

При обработке самцов γ-облучением (30 Гр) в первом поколении потомков, полученных от облученных самцов, транспозиции обнаружены только в 3 сайтах. Однако в 12-м поколении число сайтов, в которых зафиксирована метка, увеличилось до 17. На основании полученных данных можно заключить, что однократное γ-облучение приводит к увеличению скорости перемещения МГЭ, и в последующих поколениях эффект облучения не только сохраняется, но и усиливается.

После обработки самцов парами этанола (от 1,5 до 3 мин) эффект перемещения МГЭ в потомстве этих самцов был отмечен во всех случаях (табл. 4). По-видимому, даже самые незначительные дозы паров этанола (1,5 мин) способны активизировать перемещение МГЭ.

Кроме того, было изучено влияние таких физиологических факторов, как изогенизация, инбридинг, аутбридинг (табл. 5) и селекция на увеличение скоростей индукции транспозиций МГЭ (Горячковская, Васильева, 1991; Васильева и др., 1995; Ратнер, Васильева, 1996; Фурман, Бухарина, 1996а, б, 1997; Васильева, Ратнер, 2003). Результаты исследования влияния процесса изогенизации на транспозиционную активность МГЭ выявили, во-первых, что наибольшее число транспозиций возникает при аутбридинге – 68 из 138 событий. Во-вторых, достаточно большое

Таблица 2

Паттерн локализации *mdg2* в изогенной линии № 51 до и после температурного шока (ТТШ)*

Политенные хромосомы и их сайты	Изогенная линия № 51	
	до ТТШ $n = 17$	после ТТШ $n = 85$
X 3C	–	♦(1)
4B	–	♦(1)
2L 22B	–	♦(1)
28A	–	♦(8)
34B	–	♦(4)
2R 43B	–	♦(58)
56E	–	♦(4)
60B	–	♦(17)
3L 63A	–	♦(1)
67A	–	♦(1)
75C	–	♦(2)
3R 83D	–	♦(1)
86D	–	♦(6)
87B	–	♦(2)
87F	–	♦(2)
94D	–	♦(1)
97DE	–	♦(7)
98E	–	♦(6)

Примечание. * Здесь и далее приведены только те сайты, в которых зафиксированы инсерции или эксцизии. ♦ Здесь и далее транспозиции МГЭ.

Таблица 3

Рисунок mdg2 в линии № 49 до и после γ-облучения в (F_1 и F_{12})

Сайты карты Бриджеса	F_0 до облучения $n = 167$	F_1 после облучения $n = 44$	F_{12} после облучения $n = 10$
X 12B	–	–	♦(1)
19A	–	♦(2)	–
2L 21D	–	–	♦(6)
25A	–	♦(4)	–
2R 43B	–	♦(4)	♦(5)
51D	–	–	♦(6)
56E	–	–	♦(8)
3L 63A	–	–	♦(6)
64C	–	–	♦(6)
66A	–	–	♦(7)
69E	–	–	♦(2)
3R 83D	–	–	♦(1)
84D	–	–	♦(7)
85D	–	–	♦(7)
86D	–	–	♦(4)
94B	–	–	♦(4)
95A	–	–	♦(1)
98E			♦(8)
99B	–	–	♦(7)

число транспозиций обнаружено в результате рекомбинационного заноса из балансерной линии (27 из 138). Это означает, что все 3 хромосомы, ранее считавшиеся облигатными запирателями кроссинговера, таковыми не являются. В-третьих, на долю инбридинга приходится также достаточно большое число транспозиций (43 из 138). Таким образом, процесс изогенизации на всех этапах так же, как и внешние стрессовые воздействия, является фактором, увеличивающим число инсерций транспозиций.

В табл. 6 приведены суммарные данные по нескольким различным типам стрессовых воздействий (Васильева и др., 1987а, б, 2000, 2007; Колесникова и др., 1991; Ratner *et al*., 1992; Забанов и др., 1994, 1995; Ратнер и др., 2001; Васильева, Ратнер, 2003; Гаврилова и др., 2004). При этом можно отметить, что вероятности транспозиций МГЭ *mdg2* возрастали на 1–2 порядка величин по сравнению со спонтанной скоростью транспозиций.

Как видно, спонтанная скорость транспозиций МГЭ во всех экспериментах находилась на уровне порядка величин 10^{-3}–10^{-4}, тогда как при любом типе воздействия скорость транспозиций достоверно возрастала на 1–2 порядка величин (10^{-1}–10^{-2}) по сравнению со спонтанными скоростями транспозиций (Васильева, 2007).

Кроме того, исследовали стадию сперматогенеза самцов, «наиболее чувствительную» к стрессовому воздействию тепловым (ТШ) и холодовым (ХШ) шоком (табл. 7). Практически все исследованные стадии сперматогенеза в той или иной мере откликаются массовыми перемещениями МГЭ при тепловом и холодовом воздействиях. Однако имеются некоторые различия в действии холодового и теплового

Таблица 4

Паттерн МГЭ *mdg2* до и после обработки самцов парами этанола

Хромосомы и их сайты	Контроль $n = 27$	Время обработки, мин			Суммарное число транспозиций $n = 53$
		1,5 $n = 21$	2,0 $n = 13$	3,0 $n = 19$	
X 12B	–	*(1)	*(1)	–	*(2)
2L 34B	–	*(1)	–	*(2)	*(3)
36E	–	–	–	*(1)	*(1)
2R 42B	–*(1)	–	–	*(1)	*(2)
43B	–	*(1)	*(3)	*(2)	*(6)
43F	–	–	*(1)	–	*(1)
47B	–	*(1)	*(2)	*(3)	*(6)
48B	–	*(1)	–	*(1)	*(2)
51D	–	–	*(1)	*(2)	*(3)
56B	–	*(3)	*(2)	*(1)	*(6)
56E	–	*(3)	*(4)	*(4)	*(11)
57B	–	–	*(1)	–	*(1)
3L 62F	–	–	*(1)	–	*(1)
65A	–	–	*(1)	–	*(1)
75C	–	*(1)	*(1)	*(3)	*(5)
3R 97DE	–	*(5)	–	*(3)	*(8)
100B	–	–	–	*(4)	*(4)
Число новых сайтов	< 1	8	12	10	17
Всего событий	< 1	16	18	24	58
Среднее число событий	0,037	0,76	1,38	1,26	1,28

шока. При тепловом шоке наиболее чувствительны стадии митотических и мейотических делений, а также стадия спермиогенеза, а при холодовом стрессе – стадии роста сперматоцитов и мейотических делений.

Для объяснения температурных эффектов было сделано предположение, что стрессовое температурное воздействие (тепловой и холодовой шок) индуцирует вспышку множественных транспозиций у отдельных особей и массовых транспозиций в популяции МГЭ, которые выявляются уже в следующем поколении (Arnault, Biemont, 1989; Ratner *et al*., 1992). Сходное влияние на транспозиционную активность обнаружено и других внешних стрессовых воздействий, таких, как различные дозы гамма- и рентгеновского облучения (Забанов и др., 1995; Зайнуллин и др., 2000; Ратнер и др., 2001) и различные дозы паров этанола (Васильева и др., 2003; Гаврилова и др., 2004).

Установлено, что частота внедрения МГЭ в разные сайты хромосом неодинакова (Васильева и др., 1998а, б). Имеются сайты с постоянным присутствием МГЭ в любых линиях и при любом воздействии, имеются места в хромосомах, в которых не обнаружено встраивание МГЭ и, наоборот, куда встраивание МГЭ происходит с более высокой частотой. Такие сайты были названы «горячими». Неслучайный характер температурно индуцированных транспозиций можно связать с существованием каких-то достаточно жестких ограничений на локализацию этих транспозиций в геноме. Имеется в виду, что в рамках группы выделенных сайтов, обладающих гомологией к МГЭ, имеются дополнительные ограничения на транспозиции, связанные со свойствами хромосом или клеточного ядра. Эти ограничения должны быть различны на разных «чувствительных» этапах онтогенеза. Последствия температурных воздействий могут

Таблица 5

Рисунок инсерций транспозиций *mdg2* в 18 изогенных линиях и оценка вклада в рисунок различных стадий процесса изогенизации

Хромосомы и сайты	Число новых сайтов в 18 изогенных линиях	Сайты балансерной линии	Рекомбинационный перенос	Аутбридинг	Инбридинг
X 4D	1				1
12B	2			2	
18C	1	+	1		
19A	3			3	
19C	1	+	1		
19F	3				3
2L					
21D	7			7	
24E	2	+	2		
25F	2	+	2		
34A	5				5
40A	2				2
2R					
43A	4	+	4		
43B	5			5	
43F	1	+	1		
45CD	12	+	12		
47B	1	+	1		
50E	2				2
51D	2				2
54A	1			1	
55D	2			2	
56A	3			3	
56B	2				2
3L					
62C	1				1
63C	1				1
64B	1				1
64C	1				1
64E	1				1
65E	14			14	
66A	11			11	
70E	2				2
70F	5				5
3R					
86C	1	+	1		
87B	2				2
87E	2			2	
93E	2			2	
96C	1				1
96E	2				2
97E	5			5	
98B	4				4
98C	2	+	2		
98E	11			11	
98F	1				1
99A	2				2
99D	1				1
99E	1				1
45 сайтов в 18 линиях	138 событий в 45 сайтах	10 сайтов	27 событий в 10 сайтах	68 событий в 13 сайтах	43 события в 24 сайтах

быть весьма разнообразны. Непосредственная активация системы генов, подчиненных РСТШ, по-видимому, должна привести к усилению транскрипции и синтеза ферментов транспозиции (транспозаз, ревертаз и др.) и к увеличению вероятности транспозиции. В свою очередь, это может вызвать «вспышку» инсерционного мутагенеза. Наличие энхансеров в структуре МГЭ приводит к заметной активации олигогенов и полигенов, в окрестности которых совершаются транспозиции. Иначе говоря, возможно массовое и множественное изменение экспрессии различных генетических систем. Кроме того, повышение синтеза ревертазы может усилить процесс амплификации различных генов через прямую и обратную транскрипцию. Следует подчеркнуть, что система теплового шока индуцируется не только повышенной температурой, но и воздействиями других весьма разнообразных внешних факторов: нарушением энергетического обмена клеток, вирусным заражением клеток, химическими факторами (например, обработкой ядами, детергентами) и т. д. Все эти воздействия являются стрессовыми, неблагоприятными, а реакция системы теплового шока (РСТШ) – генерализованной (Васильева и др., 2007). Геномы эукариот можно рассматривать как систему разнообразных паттернов МГЭ, которая может быстро перестраиваться под влиянием внешних и геномных стрессовых воз-

Таблица 6

Сводные данные оценки скоростей индукции транспозиций МГЭ *mdg2* в изогенных линиях *Drosophila melanogaster* до и после стрессового воздействия

Линии	Способ обработки	Число препаратов	*n*	Δ*n*	λ – скорость транспозиций
Изогенная линия № 51	Без обработки (контроль)	27	< 1	< 0,037	$< 1{,}8 \cdot 10^{-3}$
	ТТШ (1)	54	38	0,75	$3{,}8 \cdot 10^{-2}$
	ТТШ(2)	85	193	2,27	$1{,}1 \cdot 10^{-1}$
	Пары этанола:				
	1,5 мин	21	8	0,38	$3{,}7 \cdot 10^{-2}$
	2,0 мин	13	12	0,92	$6{,}9 \cdot 10^{-2}$
	3,0 мин	19	10	0,53	$6{,}2 \cdot 10^{-2}$
Изогенная линия № 49	Без обработки (контроль)	167	< 1	< 0,006	$< 3{,}3 \cdot 10^{-4}$
	ЛТШ	49	30	0,61	$3{,}4 \cdot 10^{-2}$
	ТТШ	312	408	1,31	$7{,}2 \cdot 10^{-2}$
	γ-облучение:				
	3 Гр	42	3	0,071	$0{,}4 \cdot 10^{-2}$
	8 Гр	52	10	0,192	$1{,}1 \cdot 10^{-2}$
	30 Гр	44	15	0,340	$1{,}9 \cdot 10^{-2}$
Изогенные линии	18 линий	90	138	0,67	$3{,}8 \cdot 10^{-1}$
(*riC*)	Контроль	42	< 1	< 0,024	$< 1{,}3 \cdot 10^{-3}$

Примечание. ЛТШ – легкий температурный шок, ТТШ – тяжелый температурный шок, *n* – число новых позиций МГЭ на выборку, Δ*n* – среднее число транспозиций МГЭ на один сайт на геном за поколение.

Таблица 7

Скорости индуцированных транспозиций *mdg1* после теплового (ТШ) и холодового (ХШ) воздействий на разных стадиях сперматогенеза самцов *Drosophila melanogaster*

Скорости индукции	Митотические деления	Рост сперматоцитов	Мейотические деления	Спермиогенез
ТШ				
Δ*n*	1,4	1,25	2,4	1,8
λ	$1{,}0 \cdot 10^{-1}$	$8{,}9 \cdot 10^{-2}$	$1{,}7 \cdot 10^{-1}$	$1{,}3 \cdot 10^{-1}$
ХШ				
Δ*n*	1,3	1,6	2,3	1,4
λ	$8{,}9 \cdot 10^{-2}$	$1{,}1 \cdot 10^{-1}$	$1{,}6 \cdot 10^{-1}$	$9{,}6 \cdot 10^{-2}$
Контроль				
λ	$< 7{,}8 \cdot 10^{-3}$			

Примечание. Δ*n* – среднее число транспозиций на сайт на спермий за поколение; λ – скорость индуцированных транспозиций на сайт на геном за поколение.

действий (McDonald *et al*., 1987; Ратнер, Васильева, 1987; Ratner, Vasilyeva, 1989; Engels, 1989). В этом смысле МГЭ можно рассматривать как своеобразные рецепторы стрессирующих сигналов из внешней или генетической среды, «запускающие» системные вспышки наследуемой изменчивости в критические периоды эволюции популяций. Это влечет за собой множественные генетические последствия: быстрое изменение видовой нормы лимитирующих признаков, воз-

можно, изменение лимитирования, изменение спектра дальнейших мутаций и перестроек, становление нового генетического гомеостаза и др. Участие в этих событиях ретропозонов означает, что их собственный генетический материал при репликации проходит РНК-стадию с частотами мутирования 10^{-3}–10^{-4}, что на 2–3 порядка величин выше, чем в ДНК-геномах эукариот. Таким образом, гены и функциональные сайты самих ретропозонов подвержены более высоким скоростям мутагенеза. Это касается также генов, «захваченных» ретропозонами из генома хозяина. В разных случаях транспозиции могут быть как случайными, так и жестко канализованными по своим сайтам локализации, но они, по-видимому, могут порождать и новый вариант изменчивости для генетических систем, контролирующих фенотипическое проявление количественных признаков или, другими словами, полигенных систем. Рисунок локализации МГЭ в каждом случае относительно стабилен; позиции, доступные для инсерции, вероятно, мечены на длительный срок «молекулярной памятью», существование которой в частном случае показано в работе Л.Ю. Мизрохи с соавт. (1988). Возможно, что список доступных позиций зависит от компактизации хромосом и других явлений ядерно-хромосомного уровня (Babenko *et al*., 2010). Скорее всего, рисунок МГЭ более или менее случайно наложен на топографию локализации олигогенов и полигенов и активирует их. В рамках концепции лимитирующих факторов (Ratner, Vasilyeva, 1989) необходимо также предположить, что влияние как полигенов, так и МГЭ проявляется фенотипически только в тех случаях, которые влияют на лимитирующие олигогены. Тогда их эффект оценивается отбором: вариабельность рисунков будет создавать вариабельность лимитирующих признаков, отбор по признакам будет приводить к отбору полигенов и рисунков модифицирующих их МГЭ. Определенный вклад в изменчивость признаков будут вносить также новые редкие транспозиции МГЭ. Ясно, однако, что селективное изменение рисунков не будет равномерным, поскольку это не нейтральный процесс фиксации перемещений МГЭ.

Критические, стрессовые условия существования часто сопряжены с резким сокращением эффективной численности популяций, с ее прохождением через стадию «бутылочного горлышка», которое может быть связано либо с массовым вымиранием, либо с освоением новых экологических ниш по «принципу основателя». В этих условиях новые формы, индуцированные через вспышки транспозиций, могут стать основателями новых популяций с резко измененным фенотипом по лимитирующим количественным или качественным признакам (Ratner, Vasilyeva, 1989). Здесь возможны как адаптивные, так и случайные варианты быстрого преобразования. В результате эти события могут стать одной из главных компонент изменчивости и эволюции генома дрозофил и других объектов. Не исключено, что изменение системы рисунков локализации МГЭ является одним из механизмов видообразования (Fontdevila, 1992). Во всяком случае, гибридный дисгенез, индуцирующий транспозиции *P*-фактора, является изолирующим механизмом между скрещиваемыми линиями дрозофил (Хесин, 1984).

Таким образом, к настоящему времени известно, что:

1. Большая часть олигогенных (майоргенных) мутаций у дрозофилы – результат инсерций МГЭ.

2. Инсерции МГЭ могут изменять активность мажорных и минорных генов, так как в своей структуре содержат мотивы систем управления и энхансеры, состоящие из нескольких модулей и поэтому способные связываться с различными регуляторными белками, активирующими процесс транскрипции.

3. В результате рекомбинаций между LTR могут возникать хромосомные перестройки различных типов: делеции, дупликации, инверсии.

4. МГЭ могут достраивать теломерные концы хромосом.

5. МГЭ могут участвовать в горизонтальном переносе генов.

6. МГЭ откликаются вспышкой транспозиций при различных стрессовых воздействиях на геномы (Gerasimova и др., 1984; Герасимова, 1990; Ratner *et al*., 1992).

Кроме того, в серии работ было показано, что селекция может приводить не только к существенному изменению фенотипического проявления селектируемого признака, но к значительному изменению рисунка МГЭ (Гвоз-

дев, Кайданов, 1986, 1990; Васильева и др., 1987а, б; Ratner, Vasilyeva, 1989; Забанов и др., 1990; Ратнер, Васильева, 1993).

Количественные признаки и мобильные генетические элементы

В настоящее время проблема взаимодействия мобильных генетических элементов и генов, контролирующих количественные признаки, привлекает внимание многих исследователей.

Отклик рисунков локализации МГЭ на позитивный (s+) и негативный (s–) отбор по количественному признаку, на инбридинг и аутбридинг изучали Т. Маккей с соавт. (Mackay, 1985, 1988, 1989, 2002; Shrimpton *et al*., 1987, 1990; Mackay *et al*., 1992, 1994), В.А. Гвоздев и Л.З. Кайданов с соавт. (Беляева и др., 1981; Gvozdev *et al*., 1981; Пасюкова и др., 1984, 1985; Pasyukova *et al*., 1986; Гвоздев, Кайданов, 1990; Кайданов, и др., 1996а, б). К. Бьемон с соавт. (Biemont, Terzian, 1988; Biemont *et al*., 1990; Biemont, 1992) провели серию селекционных экспериментов на инбредных линиях, выведенных из особей, выловленных из природных популяций. Осуществлялся разнонаправленный отбор на низкую и высокую выживаемость *Drosophila melanogaster*. Анализ результатов селекции осуществляли после 18 поколений отбора. Было показано, что отбор сопровождается не только изменением фенотипа признака, но и изменением рисунка МГЭ. В финальных поколениях селекции каждая селектируемая линия приобрела новые специфические локализации *mdg1*. Показано, что при выращивании линий **без отбора (контроль)** рисунки проанализированных МГЭ (*mdg1*, *hobo* и др.) не изменяются в процессе культвирования линий. Авторы заключают, что поскольку в результате отбора сопряженно формируются фенотип признака и рисунок МГЭ, вероятнее всего, транспозиции различных МГЭ оказывают влияние на фенотипическое проявление количественных признаков.

Е.С. Беляева с соавторами показали, что параллельная селекция нескольких отводок инбредной линии в направлении увеличения жизнеспособности *Drosophila melanogaster* приводит к сходным изменениям рисунка локализации *mdg1* (Belyaeva *et al*., 1982). Направленный характер транспозиций МГЭ и их неслучайная локализация в геноме отмечены в цикле работ по исследованию генетических изменений, возникающих в инбредных линиях *Drosophila melanogaster* при длительном отборе по адаптивно важным признакам (Гвоздев, Кайданов, 1986, 1990; Беляева и др., 1989; Кайданов, и др., 1996а, б). В работах Е.Г. Пасюковой с соавт. было обнаружено увеличение числа транспозиций *mdg1*, *mdg2*, *copia* при замещении отдельных хромосом инбредной низкоактивной (НА) линии *Drosophila melanogaster* на хромосомы из других линий (Пасюкова и др., 1985; Pasyukova *et al*., 1986, 1988; Беляева и др., 1989). Генетический анализ различных полигенных систем в их взаимоотношении с МГЭ осуществлен в лаборатории Т. Маккей (Mackay, 1985, 1988, 1989, 2002; Mackay *et al*., 1992, 1994; Nuzhdin, Mackay, 1995), а также Г.П. Георгиевым, Е.С. Беляевой, Е.Г. Пасюковой, В.А. Гвоздевым и Л.З. Кайдановым (Георгиев и др., 1980; Беляева и др., 1981; Belyaeva *et al*., 1982; Пасюкова и др., 1984, 1985; Pasyukova *et al*., 1986; Гвоздев, Кайданов, 1986, 1990).

В.А. Гвоздев и Л.З. Кайданов рассмотрели случаи внезапных и координированных транспозиций мобильных элементов, сопряженных с резким увеличением приспособленности (селективной ценности) особей *Drosophila melanogaster*, и показали, что транспозиции характеризуются неслучайной локализацией мобильных элементов в новых сайтах на хромосомах. В связи с этим авторы формулируют представление о том, что структурно-функциональное состояние ряда районов хромосом, где могут концентрироваться мобильные элементы, связано с уровнем приспособленности популяции. Предполагается, что приспособленность может определяться системой адаптивных транспозиций по различным семействам мобильных генетических элементов (Гвоздев, Кайданов, 1986).

Попытки выявить и охарактеризовать систему генов, контролирующих отдельные компоненты приспособленности у *Drosophila melanogaster*, обычно приводили к следующим результатам. Оказывалось, что исследуемые количественные признаки определяются рядом взаимодействующих и рассеянных по хромосомам генов, каждый из которых дает определенный, но не решающий вклад в развитие признака

(Mather, 1941). Поэтому локализация этих генов и их идентификация представляется трудной задачей. Задача усложняется вследствие высокой фенотипической изменчивости анализируемых признаков, поэтому оценка и анализ таких признаков требует привлечения биометрических и генетико-статистических методов. Имеется обширная литература, посвященная генетическому анализу компонентов приспособленности, которые рассматриваются как полигенные признаки, определяемые системой целого ряда взаимодействующих генов (полигенов). Широкое использование термина «полигены» (Mather, 1941), к сожалению, не подкрепляются конкретными экспериментальными материалами. Отсутствуют четкие экспериментальные данные физической идентификации и локализации полигенов. Структура и функциональная организация описываемых полигенных комплексов остаются неразгаданными, несмотря на то что в ряде случаев, несомненно, удается обнаружить связь между степенью выраженности ряда количественных признаков и состоянием отдельных генов с известной функцией. Подтверждением тому является цикл работ, выполенных по маркированию локусов количественных признаков (QTL) (Basten *et al*., 1994; Nuzhdin *et al*., 1998).

Анализ литературных источников, в которых описана динамика изменения приспособленности, показывает, что в ряде случаев действительно наблюдается чрезвычайно быстрое изменение этого свойства под давлением селекции. Столь быстрые изменения очень трудно объяснить только «мутированием» или рекомбинацией полигенов, создающей благоприятные генетические сочетания полигенов. В качестве возможного объяснения подобных явлений можно привлечь механизм транспозиции мобильных элементов. Перемещение МГЭ у *Drosophila melanogaster* может осуществляться в генеративных клетках, предшественниках гамет, и, следовательно, процесс перемещения МГЭ будет происходить сразу в группе формирующихся половых клеток, т. е. эффективность направленных транспозиций МГЭ будет очень высока, так как сможет охватить сразу большое количество особей в популяции. В исследованиях, направленных на выявление стадии сперматогенеза, наиболее «чувствительной» к хит-шоку и парам алкоголя, было показано, что наибольшая скорость перемещения МГЭ отмечена на мейотических стадиях (Васильева и др., 2007). Также важно отметить, что у особей инбредной линии транспозиции МГЭ *mdg1* возникали в одних и тех же сайтах (исследовано 100 препаратов политенных хромосом). Следовательно, можно предположить, что транспозиции МГЭ являются той молекулярной основой, которая обеспечивает значительную генетическую гетерогенность гамет у особей инбредной линии (Гвоздев, Кайданов, 1986).

В экспериментах Л.З. Кайданова с соавт. (1996а, б) объектом исследования служили родственные линии *Drosophila melanogaster*, селектируемые около 700 поколений на различия по репродуктивной функции. В результате низкоактивная в отношении времени и продолжительности спаривания линия (LA) приобрела и другие отличительные особенности от родственных ей высокоактивных линий (HA). Между линиями, селектируемыми в противоположных направлениях, сохраняются качественные различия по составу мутаций, влияющих на жизнеспособность. Низкоактивные линии несут большой генетический груз «вредных» мутаций. В родственных им высокоактивных линиях такие мутации выявляются редко, зато около 50 % хромосом несут супервитальные мутации, повышающие жизнеспособность. С другой стороны, в серии работ было показано, что в геномах высокоактивной линии (HA) и родственных ей линий содержится несколько *copia*-подобных МГЭ. Их распределение по хромосомам было стабильно в течение сотен поколений поддержания линий. Анализ линий, родственных линии HA, но различающихся по уровню приспособленности, выявил определенные закономерности транспозиций МГЭ в геномах этих линий. Отмечалась сопряженность перемещений МГЭ с направлением отбора по количественному признаку (Gvozdev *et al*., 1981; Пасюкова и др., 1984). Уменьшение приспособленности линий сопровождалось уменьшением числа сайтов локализации *mdg1*. Во всех исследованных линиях с более высокой приспособленностью наблюдался неслучайный характер транспозиций МГЭ: были обнаружены сайты, являющиеся специфическими мишенями при транспозициях *mdg1* в высокоадаптивных линиях, полученных из линии HA.

Предполагается, что при вынужденном прекращении селекции вследствие снижения жизнеспособности мобилизуются генетические гомеостатические механизмы, обеспечивающие возврат к высокой приспособленности. Нельзя исключить, что такой возврат к высокой приспособленности реализуется при участии определенных программ транспозиций МГЭ.

Авторы считают, что перемещения МГЭ реализуются с помощью ограниченного числа программ транспозиций, отобранных в процессе эволюции вида. В результате удается наблюдать неслучайность этих транспозиций в линиях с измененным уровнем приспособленности. В то же время нельзя полностью исключить возможность того, что существенная часть транспозиций в генеративных клетках первоначально затрагивает достаточно случайные места, после чего в результате отбора (не ясно, на каком уровне он происходит) сохраняются наиболее выгодные для вида места локализации МГЭ. Полученные результаты позволили сделать предположение о том, что неслучайные координированные транспозиции не только *mdg1*, но и ряда других семейств мобильных элементов приводят к разнообразным мощным фенотипическим эффектам и являются причиной изменения приспособленности особей. Эти преобразования в геноме можно рассматривать как отражение функционирования существующей системы адаптивных транспозиций (САТ) мобильных элементов.

Рассмотренные результаты эксперимента позволили авторам предложить новый подход к анализу важнейшей биологической характеристики – приспособленности. Возможно, анализ уровня приспособленности или ее компонентов можно оценивать, рассматривая в качестве одного из показателей число и характер распределения МГЭ в «горячих точках» их локализации (Pasyukova *et al*., 1986). «Горячие точки» локализации МГЭ можно уподобить компонентам полигенного комплекса, отдельные единицы которого взаимодействуют между собой и вносят вклад в определение селективной ценности. По крайней мере, это предположение не противоречит накопленным результатам генетического анализа приспособленности и ее компонентов. В то же время отчетливо проявляется сложность проблемы, и можно сказать, что распространение подобного метода анализа, примененного авторами на искусственной и специализированной системе лабораторных линий, на природные популяции вызывает большие трудности или даже может быть невозможным. Тем не менее такие попытки необходимо предпринимать с целью выявления конкретных молекулярных механизмов внезапных перестроек в геноме, которые могут иметь место в природе. Выявление таких механизмов может способствовать разрешению споров о роли сальтационных изменений в эволюционной судьбе популяции. На основе полученных экспериментальных данных Е.Г. Пасюкова с соавт. (1985) сделали ряд выводов, касающихся анализа приспособленности: 1) существует ограниченное число определенных и характерных способов распределения МГЭ, соответствующих состоянию низкой приспособленности, которая сформировалась в результате селекции на повышенную и пониженную приспособленность; 2) при разных векторах отбора, направленных на изменение приспособленности или ее компонент, наблюдались сопряженные изменения локализации целого комплекса мобильных элементов и приспособленности в вариантах отбора (позитивного или негативного). Следовательно, можно говорить о направленных системных изменениях структуры генома при отборе, которые осуществляются в результате координированных перемещений мобильных элементов. В ряде экспериментов показано, что отбор по одному признаку сопровождается изменением целого комплекса корреляционно связанных с ним признаков и предположительно определяемых «полигенными комплексами». Система мобильных элементов и, возможно, прилегающих к ним генов рассматриваются авторами как гипотетические полигены или полигенные комплексы, структура и свойства которых корреляционно изменяется в процессе селекции (Кайданов и др., 1996а, б). Усиление индукционного потенциала линии, селектируемой на снижение репродуктивной способности и характеризующейся комплексом аномальных признаков и высокими частотами спонтанного мутирования (линия LA), достигается изогенизацией больших хромосом, что особенно четко проявляется в условиях дисгенных скрещиваний в системе *H-E*-гибридного дисгенеза.

В изогенных высокоактивных сублиниях (HA) обнаружено увеличенное число копий *hobo*-элемента, при этом транспозиции *hobo* носят направленный характер. Значительная доля инсерций *hobo* обнаружена в одних и тех же сайтах различных линий. Авторы считают, что такая ситуация может возникать только тогда, когда существует генетически детерминированная программа перемещений МГЭ *hobo* в геноме, сформировавшаяся в ходе длительной селекции линии HA (Кайданов и др., 1996а, б).

В исследованиях Л.З. Кайданова совместно с В.А. Гвоздевым и сотрудниками показано, что при возвратном отборе низкоактивной линии LA на восстановление адаптивно важных признаков приспособленности происходит неслучайное перемещение ряда ретротранспозонов в геноме. При этом набор сайтов-мишеней достаточно ограничен (Belyaeva *et al*., 1982; Pasyukova *et al*., 1986; Гвоздев, Кайданов, 1990). Полученные данные послужили основой для разработки авторами системы скрещиваний, приводящей к резкому усилению индукционного потенциала линии HA в *H-E*-системе гибридного дисгенеза. Сохранение генетической гетерогенности в линиях, длительное время находящихся под давлением отбора, а также высокий уровень мутабильности, по-видимому, связаны с существенными изменениями в спектре локализации ретротранспозонов *mdg1* и *mdg3* и транспозона *hobo*. Была сформулирована гипотеза о существовании системы адаптивных транспозиций: изменение приспособленности селекционных линий сопряжено с внезапными и координированными неслучайными транспозициями МГЭ в геноме. В целом показано (Гвоздев, Кайданов, 1986; Bolshakov *et al*., 1994; Кайданов и др., 1996а, б; Кайданов и др., 1997), что длительный отбор, направленный на снижение репродуктивной функции дрозофилы, приводит к резкому усилению нестабильности генома. Уровень генотипической изменчивости зависит от направления отбора. В линиях, прошедших около 700 поколений инбридинга и отбора на повышенную приспособленность, сохраняются полноразмерные и неполноразмерные копии *hobo* элемента, которые определяют межлинейные различия по скорости мутирования.

В инбредной низкоактивной (LA) линии выявляется инвариантная особенность распределения трех *copia*-подобных элементов (*mdg1*, *mdg3* и *copia*) (Belyaeva *et al*., 1982; Pasyukova *et al*., 1986). Было показано, что редкие, спонтанные, сложные (неоднократные, разнообразные) транспозиции в низкоадаптивной LA линии иногда сопровождались возрастанием приспособленности. Линии с измененным паттерном мобильных элементов (LA) служили объектами для обратной селекции на повышенную приспособленность. В линиях, приобретших высокую приспособленность к финальным поколениям отбора, были обнаружены транспозиции мобильных элементов в строго определенных хромосомных сайтах (горячие сайты). Было показано, что изменения в локализации трех мобильных элементов согласуются с возрастанием приспособленности. Особенности распределения *mdg1* были также изучены в двух линиях с низкой приспособленностью, отобранных из линий с высокой приспособленностью. Снижение приспособленности в этих линиях сопровождалось эксцизиями *mdg1* из тех горячих сайтов, которые обычно выявлялись в линиях с высокой приспособленностью. На основе этих экспериментальных данных авторы предположили, что инсерции транспозиций мобильных элементов в определенные локусы хромосом могут способствовать изменению приспособленности геномов. Таким образом, впервые была установлена связь между направлением отбора и перемещением в геноме мобильных элементов – ретротранспозонов.

Главный вывод, сделанный на основе обобщений результатов многолетних селекционно-генетических экспериментов на *Drosophila melanogaster*, свелся к тому, что отбор, осуществляемый по разным компонентам приспособленности, приводил к сходным результатам (Иовлева, Мыльников, 2007). Впервые представлены данные о величине частот мутаций по генам жизнеспособности в инбредных линиях HA, HA^+, HA^- после 400 поколений отбора, а также динамика генетических изменений при отборе в линии Убинская низкоактивная. Результаты изучения генетической гетерогенности и спонтанного мутационного процесса в инбредных линиях дрозофилы согласуются с идеей М.Е. Лобашева (1947) о том, что «изменение направления отбора или ускорение его темпов одновременно сопровождается обязательным

повышением мутационной изменчивости». Одним из положений этой идеи было признание глубокой связи между процессами адаптации и возникновением мутаций.

В процессе эволюции «отрабатываются» программы перемещений копий МГЭ. Адаптивный смысл таких перемещений состоит в регуляторном влиянии на экспрессию соседних генов. Копии *mdg1* локализуются в участках интеркалярного гетерохроматина, нередко вблизи генов, контролирующих синтез транспортных РНК, гистонов, других жизненно важных компонентов генома. Перемещение копий МГЭ осуществляется кооперативно, целыми блоками, т. е. в транспозиции вовлекается одновременно комплекс мобильных генов. Данный процесс может иметь важное значение в экстремальных ситуациях, на провокационных фонах, например, при селекции по адаптивно важным признакам или в естественных условиях в малочисленных популяциях на краю ареала, испытывающих жесткое давление отбора. Эта идея была подтверждена экспериментально. Финальный паттерн «селекционных» линий в эксперименте по длительной разнонаправленной селекции в линии, сформированной из смеси 4 изогенных линий, формировался целыми блоками хромосом (Горячковская, Васильева, 1991).

Неслучайные транспозиции МГЭ в геноме могли быть причиной высокой изменчивости, наблюдаемой в линии НА и родственных ей инбредных линиях. Однако окончательно доказать такую связь не удалось, авторы продолжают экспериментальный поиск источников генетической нестабильности линий.

В процессе селекции линии НА по поведенческому признаку – половой активности самцов – сформировались механизмы, определяющие направленный характер транспозиций *hobo*-элемента в геноме. Этот вывод сделан на основании неожиданного результата, полученного после проведения процедуры одновременной изогенизации больших хромосом линии НА (Кайданов и др., 1996а, б). Изогенизация привела к резкому увеличению потенциала индукции линии НА в *H-E*-системе гибридного дисгенеза. Такого эффекта не наблюдали при изогенизации хромосом высокоактивной линии ВА. Локализация *hobo*-элемента, проведенная методом гибридизации *in situ*, показала, что число копий в изогенных сублиниях увеличилось по сравнению с исходной линией НА примерно в 1,5 раза. Индукция *H-E*-гибридного дисгенеза сопровождалась возникновением большого числа мутаций у гибридного потомства.

Таким образом, на высокоинбредных линиях, имеющих общее происхождение, но различающихся по приспособительным свойствам, было продемонстрировано, что в процессе селекции накапливается новая генетическая изменчивость, что может являться причиной высокой генетической нестабильности линий. Важно отметить, что изменение приспособительных свойств селектируемых линий является следствием перемещения МГЭ. Картина воспроизводима.

Однако подобная ситуация имеет место не только для признаков, контролирующих приспособленность или коррелирующих с приспособленностью, но, как будет видно ниже, для любых категорий количественных признаков, как связанных с приспособленностью, так и для морфологических признаков, не связанных с приспособленностью (Васильева и др., 1987а, б; Mackay, 1988; Ratner, Vasilyeva, 1989; Горячковская, Васильева, 1991; Mackay *et al*., 1992; Забанов и др., 1995; Васильева, Ратнер, 2000). На генетической системе, формирующей неполную радиальную жилку крыла дрозофилы, были получены новые интересные факты (Васильева и др., 1987а, б, 1998а, б, 2000, 2008; Горячковская, Васильева, 1991; Васильева, Ратнер, 1994, 2000, 2004; Ратнер, Васильева, 2000; Васильева, 2005; Антоненко, Васильева, 2006, Васильева, Антоненко, 2010). Удалось картировать районы локализации полигенов, выявить «полигены большого эффекта» и обнаружить сильнейшее взаимодействие между рецессивными олигогенами системы жилкования крыла, а также в серии селекционно-генетических экспериментов показать наличие сопряженного ответа на отбор количественного признака и паттерна МГЭ.

Гипотеза участия мобильных генетических элементов в экспрессии полигенов, действующих на фоне рецессивного гена *radius incompletus*, была проверена в нескольких вариантах селекционно-генетических экспериментов, которые представляли собой разнонаправленную длительную массовую селекцию по фенотипу количественного признака.

В эксперименте была использована гетерогенная лабораторная линия *Drosophila melanogaster* (*riC*), особи которой несут рецессивную мутацию *radius incompletus*, *ri*, являющуюся репрессором центрального участка радиальной жилки крыла, L2. Кроме того, в селекционных экспериментах использованы изогенные линии № 5, 9, 24, 40, 49 и 51, выведенные из линии *riC* с помощью балансерной линии *M5*; *CyPm*; *DSb* (Васильева, 2004). Во всех экспериментах использовался метод разнонаправленной селекции по фенотипу количественного признака. С одной стороны, селекция была направлена на восстановление радиальной жилки крыла до фенотипа «дикого типа», позитивный отбор (s+), с другой стороны, отбор осуществлялся на полную элиминацию L2, негативный отбор (s–).

Всего проведено четыре эксперимента по длительной массовой разнонаправленной селекции:

1. Селекция в гетерогенной линии (*riC*) в течение 80 поколений.

2. Селекция в линии, полученной из смеси 4 изогенных линий, в течение 50 поколений.

3. Селекция в изогенной линии № 49 после γ-облучения в течение 70 поколений.

4. Селекция в изогенной линии № 51 после тяжелого температурного шока. При этом и позитивный (s+), и негативный (s–) варианты отбора осуществляли в двух независимых повторностях. Эксперимент продолжался 70 поколений.

Средние фенотипические значения проксимального и дистального фрагментов радиальной жилки крыла всех линий-участников эксперимента представлены в табл. 7. Из данных табл. 7 видно, что родоначальник всех экспериментальных линий – гетерогенная линия *riC* достоверно отличается по величине проксимального и дистального фрагментов радиальной жилки крыла от «селекционных» линий, и все изогенные линии значительно различаются по величине обоих фрагментов (рис. 3, а). Кроме того, следует отметить, что во всех селекционно-генетических экспериментах отбор завершался одинаковым образом, т. е. в позитивном направлении отбора все особи в финале отбора имели сомкнутый жилочный луч, как в «диких» популяциях (рис. 3, б). В негативном направлении отбора в финале все опытные особи практически были лишены радиальной жилки крыла (рис. 3, в). Поэтому в табл. 8 приводятся размеры дистального и проксимального фрагментов радиальной жилки крыла только однажды.

При этом следует учесть, что все представленные в табл. 8 линии размножаются в лабораторных условиях десятки и сотни поколений и не изменяют характерного для них фенотипического выражения фрагментов. Это означает, что фенотипическое проявление размеров фрагментов радиальной жилки крыла зависит от генетического окружения в виде полигенов. Следовательно, можно с уверенностью говорить о том, что ген *radius incompletus* контролирует морфогенез радиальной жилки крыла *Drosophila melanogaster* и существует генетическая система экспрессии в виде полигенов, действие которой проявляется только тогда, когда ген главного эффекта лимитирует морфогенез.

Селекционные эксперименты сопровождались не только анализом изменения количественных признаков (размер проксимального и дистального фрагментов L2), но и анализом рисунка МГЭ в начальных и финальных поколениях отбора.

Методами исследования паттернов (рисунков) МГЭ являлись гибридизация *in situ* зондов, содержащих фрагменты ДНК МГЭ *mdg2*, встроенных в вектор и меченных радиоактивной меткой (H^3–T) (рис. 4).

Паттерны *mdg1* и *hobo* исследовали методом флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) (рис. 5). Оба типа гибридизации осуществляли с политенными хромосомами клеток давленых препаратов, приготовленных из слюнных желез личинок, взятых из контрольной и селекционных линий *Drosophila melanogaster*.

Скорость транспозиций МГЭ оценивали по формуле:

$$\lambda = \frac{\Delta n \times m}{n \times (m - n)},$$

где λ – скорость индукции транспозиций МГЭ на сайт на геном за поколение; Δn – среднее число возникших новых транспозиций на выборку, n – число сайтов с копиями МГЭ в исходной изогенной линии, m – общее число позиций конкретного МГЭ в геномах всех линий: в гетерогенной линии *riC* до обработки; в гетерогенной линии *riC* после стрессовой обработки и в 18 изогенных линиях, выведенных из *riC*.

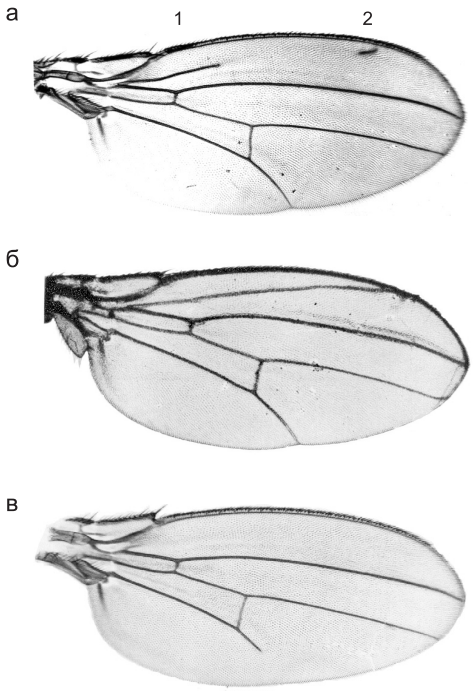


Рис. 3. Крыло *D. melanogaster* с различной экспрессией гена *radius incompletus*, *ri*.

Крыло в контрольной линии, *riC* (а): проксимальный фрагмент (1); дистальный фрагмент радиальной жилки крыла, L2 (2); крыло в линии позитивной селекции (s+) (б); крыло в линии негативной селекции (s–) (в).

Идея экспериментов проста. Если в геноме дрозофилы полигены, контролирующие экспрессию гена *ri*, и копии МГЭ дисперсно распределены по сегментам политенных хромосом (цитологическая карта Бриджеса), то можно представить, что имеются:

1. Сегменты хромосом, не содержащие ни полигенов, ни копий МГЭ.

2. Сегменты хромосом, содержащие только полигены, откликающиеся на давление отбора.

3. Сегменты хромосом, содержащие независимые друг от друга полигены и копии МГЭ, не участвующие в ответе на отбор.

4. Сегменты хромосом, содержащие полигены и копии МГЭ, изменяющие (усиливающие или ослабляющие) экспрессию полигенов. Такие копии МГЭ могут играть роль модификаторов и адаптивно откликаться на отбор.

Если в результате разнонаправленной селекции по фенотипу количественного признака «селекционные» линии (s+) и (s–) в финале будут характеризоваться не только контрастными значениями признака, но и контрастным рисунком МГЭ, то с определенной долей вероятности можно будет считать, что МГЭ принимают участие в экспрессии гена *ri*, контролирующего

Таблица 8

Среднее значение проксимального (*px*) и дистального (*dt*) фрагментов радиальной жилки крыла (L2) в различных линиях *Drosophila melanogaster*

Линия	*n*	Проксимальный фрагмент, *px* $\overline{X} \pm S_{\overline{X}}$	Дистальный фрагмент, *dt* $\overline{X} \pm S_{\overline{X}}$
riC	300	1,96 ± 0,02	0,30 ± 0,03
ris^{-}	300	0,39 ± 0,01	0,00
ris^{+}	300	3,77 ± 0,01	2,20 ± 0,01
Изогенная линия № 51 до хит-шока	100	2,09 ± 0,06	0,78 ± 0,05
Изогенная линия № 51 после хит-шока	100	2,36 ± 0,06	1,87 ± 0,07
Изогенная линия № 5	100	1,88 ± 0,03	0,67 ± 0,06
Изогенная линия № 40	100	2,02 ± 0,05	1,13 ± 0,07
Изогенная линия № 24	100	1,66 ± 0,04	0,00
Изогенная линия № 9	100	1,00 ± 0,04	0,00
Изогенная линия № 49 до γ-облучения	100	1,86 ± 0,04	0,00
Изогенная линия № 49 после γ-облучения	100	2,15 ± 0,03	1,22 ± 0,04

селекционируемый признак. В таком случае в ходе отбора будет отмечен сопряженный ответ признака и рисунка МГЭ.

Еще раз подчеркнем, что во всех экспериментах селекция и в позитивном, и негативном направлениях по фенотипу проксимального и дистального фрагмента радиальной жилки крыла была эффективной.

Первый эксперимент, выполненный на гетерогенной лабораторной линии *riC*, показал (табл. 9), что всего в исходной линии *riC* обнаружено 39 сайтов, из них в 16 сайтах *mdg2* стабильно присутствует на всех препаратах, на остальных 23 препаратах метка нестабильна, т. е. отсутствует в некоторых сайтах. В табл. 9 представлен сокращенный вариант паттерна МГЭ. Рисунок приведен только по тем сайтам карты Бриджеса, в которых произошли изменения рисунка в «селекционных» линиях по сравнению с контролем. Таким образом, судя по данным табл. 9, в результате разнонаправленной селекции в финальных поколениях отбора сформировался совершенно иной паттерн МГЭ по отношению к исходной линии. Более того, контрастные «селекционные» линии приобрели практически контрастный паттерн МГЭ. Особо следует под-

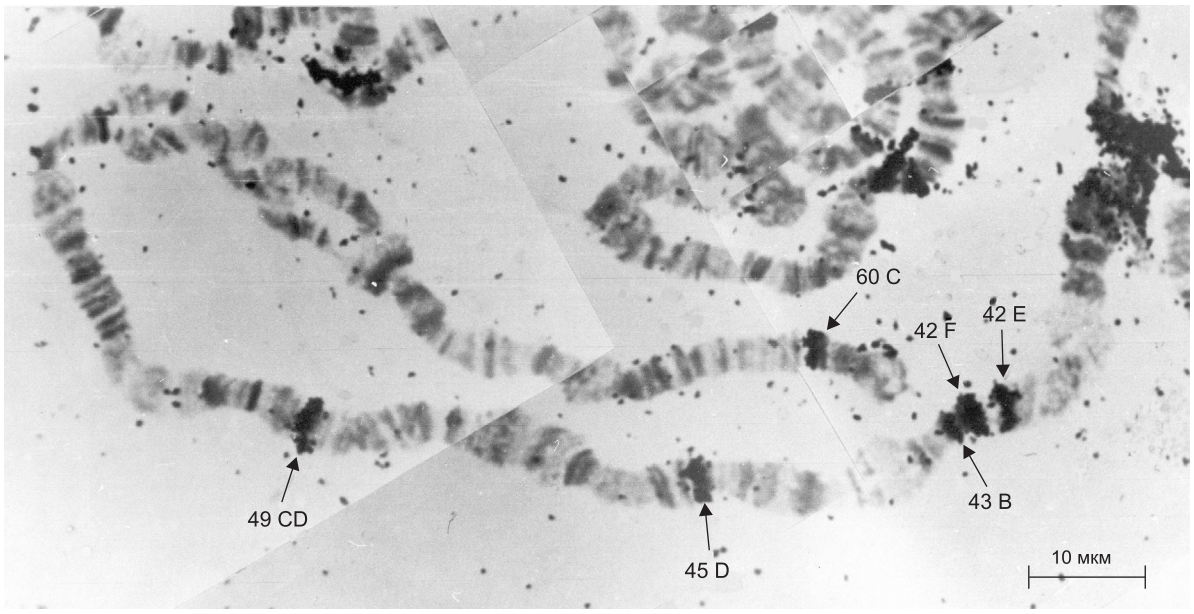


Рис. 4. Результаты гибридизации *in situ* зонда, содержащего фрагмент ДНК *mdg2*, с гомологичными участками политенных хромосом *D. melanogaster* линии № 51.

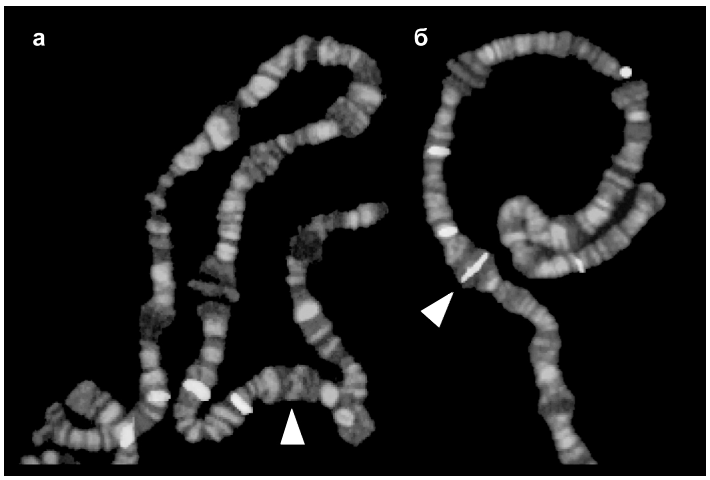


Рис. 5. Результаты флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) зонда, содержащего фрагмент ДНК мобильного генетического элемента с гомологичными участками политенных хромосомы (2R) *Drosophila melanogaster*.

Стрелкой отмечены отсутствие (а) и наличие (б) сайта 47B.

Таблица 9

Паттерн локализации *mdg2* в контрольной линии (*riC*) и финальные рисунки после 80 поколений негативной (s−) и позитивной (s+) селекции

Сайты карты Бриджеса	Контроль (*riC*) *n* = 33	Селекция	
		(s–) *n* =18	(s+) *n* =16
X 3C	*(2)	–	–
4B	*(4)	–	–
6F	*(7)	–	+
16F	*(9)	–	+
17C	*(9)	–	+
18EF	*(9)	–	+
2L 25A	*(4)	–	–
30A	–	–	+
40A	–	+	–
42E	*(11)	–	+
42F	*(11)	–	+
43B	–	–	+
46A	–	+	–
47D	*(4)	–	–
56A	–	+	–
3L 62D	–	–	+
63A	–	+	–
64A	*(5)	+	–
64D	*(5)	–	–
65E	–	+	–
66A	–	–	+
69A	–	+	–
70E	–	*(2)	–
76A	–	+	–
79E	*(6)	+	–
3R 84	*(5)	–	+
85D	*(3)	–	+
86D	*(8)	+	–
87E	–	+	–
88E	*(2)	–	–
88F	*(3)	–	–
89A	*(4)	–	–
93B	*(7)	–	–
93F	–	+	–
94D	*(5)	+	–
96F	*(5)	–	–
97E	–	* (7)	–
98E	–	–	+
99B	*(8)	–	–

Примечание. Здесь и в тексте «+» означает стабильное (т. е. на всех препаратах) наличие копии МГЭ в сайтах, «−» – отсутствие копии МГЭ во всех сайтах, *() – число препаратов с полиморфными сайтами.

черкнуть, что паттерн локализации *mdg2* между (s+)- и (s–)-линиями в финальных поколениях селекции различался по 27 сайтам.

При этом практически в половине случаев те сайты, которые были зафиксированы в позитивном варианте отбора, были элиминированы в негативном варианте отбора и наоборот. По сайту 70E различие незначительно, по-видимому, элиминация в варианте (s–)-отбора еще не завершилась. Такое резкое различие в паттернах МГЭ в двух противоположных вариантах селекции за ограниченное число поколений вряд ли могло сложиться по случайным причинам. Возможно, рисунок МГЭ имеет отношение к экспрессии гена, контролирующего фенотип количественного признака, находящегося под селекционным давлением.

Однако в силу того что в экспериментах всегда имеет место ограниченное число анализируемых политенных хромосом, можно предположить, что сайты, в которых копии МГЭ локализуются с низкой частотой, не были обнаружены в линии *riC*. Кроме того, селекция сопровождается процессами инбридинга и дрейфа. При этом полиморфные сайты либо фиксируются, т. е. становятся «стабильными», либо элиминируются. Процессы фиксации и элиминации сайтов локализации МГЭ могут происходить как по адаптивным, так и по случайным причинам. Таким образом, можно предположить, что различный паттерн МГЭ в «селекционных» линиях есть результат селекции, но можно предполагать, что изменение паттерна МГЭ не имеет прямого отношения к селекционному процессу.

Поэтому решено было построить эксперимент на принципиально другом генетическом материале. Эксперимент был организован на 4 изогенных линиях, которые характеризовались стабильным паттерном МГЭ по всем сайтам и у которых предварительно были зафиксированы рисунки МГЭ. Особи этих линий были в равных пропорциях смешаны в одну выборку, и потомки F_2 от такой смеси были разделены на две выборки, каждая из которых подвергалась разнонаправленному отбору, как и в предыдущем эксперименте. В табл. 10 представлены рисунки *mdg2* в 4 изогенных линиях, в F_2 и в 2 «селекционных» линиях после 30 и 60 поколений селекции.

Таблица 10

Паттерн локализации *mdg2* в изогенных линиях,
в F_2 от смеси 4 изогенных линий и в (s+)- и (s–)-селекционных линиях

Сайты карты Бриджеса	Изогенные линии				F_2	Селекция			
						(s+)		(s–)	
	№ 5	№ 40	№ 24	№ 9		$F_{30–32}$	$F_{56–62}$	$F_{30–32}$	$F_{56–62}$
X 4C	–	+	–	–	+	–	+	+	–
6F	+	+	+	–	+	+	+	+	+
16EF	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18EF	+	+	+	–	+	+	+	+	+
2L 26C	+	–	+	–	+	*(3)	*(1)	+	+
30A	+	–	+	+	+	+	+	+	+
32C	+	+	+	+	+	*(3)	+	+	+
34A	–	–	–	+	+	–	–	+	–
39C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2R 41B	+	–	–	+	+	+	+	–	+
42E	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43B	+	+	–	–	+	+	+	–	–
45D	–	–	+	+	+	–	–	*(1)	+
49D	+	–	–	–	+	+	+	+	+
51D	–	+	–	–	–	–	–	–	–
56A	+	+	–	–	+	+	+	–	–
56E	+	+	–	–	+	+	+	–	–
3L 60C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
62B	–	–	–	–	–	♦	+	–	–
62D	–	–	–	–	–	♦	+	–	–
63A	–	–	–	–	–	♦	–	–	–
64A	–	–	–	–	–	♦	–	–	–
65A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
65E	–	–	+	+	+	+	–	+	+
66A	+	+	–	–	+	+	+	–	–
67E	+	+	+	+	+	+	+	+	+
75A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
76A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
79E	–	–	–	–	–	♦	+	–	–
3R 82E	+	+	+	+	+	+	+	+	+
85D	+	–	+	+	+	+	+	+	+
86D	+	–	+	+	–	–	–	–	–
87E	–	–	–	–	–	♦	–	♦	+
88E	–	–	–	+	+	–	–	+	+
88F	–	+	–	+	+	–	–	–	–
89A	–	–	+	–	+	–	–	–	–

Окончание таблицы 10

Сайты карты Бриджеса	Изогенные линии				F_2	Селекция			
						(s+)		(s–)	
	№ 5	№ 40	№ 24	№ 9		$F_{30–32}$	$F_{56–62}$	$F_{30–32}$	$F_{56–62}$
90B	+	–	–	+	+	+	+	+	+
93F	–	–	–	–	–	♦	–	–	–
96A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
96E	–	–	+	+	+	–	–	+	+
98E	+	–	+	–	–	*(1)	+	–	–
98F	+	–	–	–	–	+	+	–	–
99B	–	–	+	–	–	–	–	*(1)	*(1)
100C	–	–	–	+	–	+	+	*(1)	*(1)
Общее число сайтов	**28**	**22**	**25**	**25**	**33**	**36**	**32**	**29**	**28**

Примечание. * Полиморфные сайты; ♦ – инсерции МГЭ.

Результаты этого эксперимента позволили сделать ряд выводов, касающихся характера формирования рисунка *mdg2* в «селекционных» линиях:

1. Каждая из 4 участвующих в эксперименте изогенных линий обладала стабильным и специфическим рисунком локализации *mdg2* и различным фенотипическим проявлением L2 (столб. 2–5 в табл. 10 и столб. 3–4 в табл. 8).

2. У двух изогенных линий (№ 9 и № 24) отсутствовал дистальный фрагмент, а у двух других изогенных линий (№ 5 и № 40) величина дистального фрагмента была выше, чем в контрольной линии *riC*. Среднее значение длины проксимального фрагмента радиальной жилки крыла соответственно в линиях № 9, 24, 5 и 40 было равно 1,26 ± 0,03; 1,54 ± 0,07; 2,73 ± 0,08; 3,13 ± 0,08. Средняя длина дистального фрагмента в этих линиях соответственно была равна 0,00; 0,00; 0,67 ± 0,06; 1,13 ± 0,07. В линии *riC* размеры *px* и *dt* соответственно равны 1,96 ± 0,02; 0,30 ± 0,03.

3. Рисунок локализации *mdg2* в F_2 представлял собой суммарный рисунок мобильного элемента во всех 4 изогенных линиях, исключение составил только сайт 51D.

4. В финальных поколениях отбора по количественному признаку в позитивном (s+) и негативном (s–) направлениях сформировался различный рисунок *mdg2*. Коэффициент корреляции между рисунком МГЭ в позитивном (s+) и негативном (s–) вариантах равен 0,018 ± 0,147. Такая величина коэффициента корреляции свидетельствует о том, что в финальных поколениях в двух противоположных направлениях отбора сформировался различный паттерн МГЭ.

5. Позитивный отбор (s+) сопровождался формированием специфического рисунка *mdg2*, в котором были обнаружены инсерции в сайтах 62B, 62D, 63A, 64A. В финальных поколениях отбора произошла фиксация двух сайтов (62B и 62D), а сайты 63A и 64A были утрачены. Кроме того, были обнаружены инсерции в сайтах 79E, 87E и 93F, но они остались полиморфными, вероятнее всего, потому, что они возникли с очень низкой частотой, поэтому в финальных поколениях оставались полиморфными более продолжительное время.

6. Негативный отбор (s–) в основном сопровождался утратой многих сайтов локализации *mdg2* по сравнению с исходным рисунком. В этом направлении отбора новых сайтов локализации МГЭ не было обнаружено.

7. Темп ответа на отбор признаков и в позитивном, и в негативном направлениях был гораздо выше, чем при отборе на гетерогенном материале. В этом варианте отбора селекционные линии достигли своего плато по количественным признакам к 60-му поколению, тогда как на гетерогенном материале селекция продолжалась в негативном направлении отбора более 80 поколений. Это может свидетельствовать о том,

что селекция осуществляется не по отдельным генам, а по рекомбинационным фрагментам хромосом. Таким образом, по итогам этого эксперимента можно сделать вывод о наличии сопряженного ответа на отбор количественного признака и рисунка МГЭ.

Однако требовалось получить еще более убедительные аргументы в пользу выдвинутого предположения об участии МГЭ в ответе на отбор. С этой целью был организован селекционный эксперимент, в котором в качестве участника была использована изогенная линия № 49. Данные представлены в табл. 11.

Гомозиготность изогенной линии подтверждается и тем, что все сайты локализации *mdg2* в ней мономорфны, т. е. копии МГЭ присутствуют на всех исследованных давленых препаратах слюнных желез личинок. В такой ситуации генетическое разнообразие полигенов, контролирующих экспрессию гена главного эффекта *ri*, практически отсутствует, и в такой ситуации вряд ли можно было ожидать эффективного генетического тренда на отбор по количественному признаку.

Поэтому линия предварительно была подвергнута γ-облучению как возможному источнику, вызывающему транспозиции МГЭ, а следовательно, и способному создавать новое генетическое разнообразие по полигенам. В потомстве F_1 от облученных самцов было зафиксировано несколько новых инсерций МГЭ. В течение 12 последующих поколений облученную линию (без дополнительного облучения) размножали путем свободного скрещивания, и в F_{12} вновь был зафиксирован рисунок МГЭ. Оказалось, что к этому моменту число транспозиций резко возросло (табл. 11, столбец 4). Это явление назвали пролонгацией действия радиации. С F_{12} был начат селекционный эксперимент. Мы приводим финальные паттерны *mdg2* в двух вариантах селекционного эксперимента (табл. 11, столбцы 5 и 6) для тех сайтов, в которых произошли какие-либо изменения. Селекция по количественным признакам (размеры двух фрагментов радиальной жилки крыла) была эффективна и завершилась через 50 поколений. Поскольку в изогенной линии селекция была успешной, можно предположить, что в результате облучения изменился не только паттерн МГЭ, но и полигенная система генетического контроля количественных признаков. Следовательно, γ-облучение генерировало новую генетическую изменчивость полигенной системы, контролирующей экспрессию количественного признака. Индукция генетической изменчивости γ-облучением и отклик полигенной системы на отбор не вызывают удивления. Удивительно то, что селекция признака в (s+)- и (s–)-направлениях

Таблица 11

Рисунок *mdg2* в линии № 49 до γ-облучения, в F_1 и F_{12} после γ-облучения, в (s+)- и (s–)-отборе после F_{50}

Районы политенных хромосом	F_0 до облучения $n = 167$	F_1 после облучения $n = 44$	F_{12} после облучения $n = 10$	Селекция	
				(s–) $n = 10$	(s+) $n = 10$
X 6F	+	+	+	–	+(10)
12B	–	–	♦(1)	–	–
16F	+	+	+	–	–
17C	+	+	+	–	+(10)
18EF	+	+	+	–	–
19A	–	♦(2)	–	–	–
2L 21D	–	–	♦(6)	**(10)	*(1)
25A	–	♦(4)	–	–	–
26C	+	+	+	–	+(10)
2R 43B	–	♦(4)	♦(5)	–	+(10)
51D	–	–	♦(6)	–	*(2)
56E	–	–	♦(8)	**(10)	+(10)
3L 63A	–	–	♦(6)	*(1)	–
64C	–	–	♦(6)	–	–
66A	–	–	♦(7)	–	+(10)
69E	–	–	♦(2)	–	+(10)
3R 83D	–	–	♦(1)	–	–
84D	–	–	♦(7)	–	*(5)
85D	–	–	♦(7)	–	*(7)
86D	–	–	♦(4)	–	–
94B	–	–	♦(4)	–	–
95A	–	–	(1)	–	–
98E			♦(8)	(10)	–
99B	–	–	♦(7)	*(1)	**(10)

Примечание. Здесь и в табл. 12 *( ) – число полиморфных сайтов; **( ) – число сайтов, имеющих достоверно противоположный рисунок в двух вариантах отбора.

отбора сопровождалась быстрыми изменениями паттернов *mdg2* (табл. 11, столбцы 5 и 6). В течение 50 поколений отбора из 17 исходно полиморфных сайтов, возникших в F_{12} после γ-облучения, в 9 сайтах произошли фиксация копий *mdg2* в (s+)-отборе и элиминация копий МГЭ в этих сайтах в (s–)-отборе. В сайтах 84D и 85D такая же картина противоположного ответа, хотя в (s+)-отборе фиксация еще не завершена.

Для сравнения укажем, что отбор на гетерогенном материале был более длителен (более 80 поколений) и сопровождался в негативном варианте отбора резким падением приспособленности линии, так что для поддержания приспособленности приходилось изменять тактику отбора вплоть до прекращения давления отбора в некоторые особенно критические моменты.

Для подтверждения того, что стрессовое воздействие вызывает транспозиции МГЭ и генерирует генетическое разнообразие количественного признака, был организован селекционный эксперимент на другой изогенной линии и с другим стрессовым фактором. Использована изогенная линия № 51, которая имела также мономорфный рисунок *mdg2*, *mdg1* и *hobo*. Предварительно самцы линии были подвергнуты тяжелой стрессовой температурной обработке, как и ранее (Ратнер, Васильева, 1992). Через двое суток обработанных самцов скрещивали с необработанными виргинными самками этой же линии. Полученную линию размножали, материал был разделен на 4 части. Селекционный эксперимент осуществляли в двух повторностях в позитивном направлении [51–1(s+), 51–2(s+)] и в двух повторностях в негативном направлении [51–1(s–), 51–2(s–)]. Селекционный процесс, как и ранее, контролировали исследованием рисунка локализации *mdg2* в исходной линии и в финальных поколениях селекции. Результаты эксперимента представлены в табл. 12–14. После хит-шока у потомков F_1 выявлено 18 сайтов, в которых присутствуют инсерции копий *mdg2*. Все новые сайты были полиморфными. В процессе селекции произошли существенные изменения в паттерне анализируемого МГЭ. Во-первых, отмечается быстрая элиминация сайтов, в которых *mdg2* локализован с очень низкой исходной частотой. Это сайты 3C, 4B, 22B, 63A, 67A, 75C, 83B, 87B, 87F и 94D, которые достаточно быстро в процессе селекции утрачиваются в обоих вариантах отбора (табл. 12). Во-вторых, финальные рисунки *mdg2* после 80 поколений разнонаправленного отбора заметно отличаются от исходного рисунка. Однако наиболее интересны другие факты. Отмечена очень высокая степень сходства паттернов в двух повторностях как позитивной, так и негативной селекции.

Коэффициент корреляции по паттерну между независимыми повторностями 51–1(s–) и 51–2(s–) равен 0,946, $p < 0,001$, между независимыми повторностями 51–1(s+) и 51–2(s+) $r = 0,912$, $p < 0,001$. Это означает, что в одних и тех же сайтах в двух независимо селектируемых повторностях в обоих направлениях отбора фиксировались и элиминировались практически одни и те же сайты. Особый интерес представляют районы хромосом, в которых зафиксирован противоположный рисунок МГЭ в противоположных направлениях отбора. Коэффициент корреляции между рисунками в (s+)- и (s–)-вариантах селекции равен – 0,567, $p < 0,001$. Подобная ситуация сложилась и по МГЭ *mdg1* (табл. 13).

В негативном направлении отбора в двух повторностях по 22 сайтам сформировался в финальных поколениях селекции одинаковый рисунок (коэффициент корреляции по рисунку МГЭ между повторностями равен 0,982, $p < 0,001$). В позитивном направлении подобная картина отмечена по 14 сайтам (коэффициент корреляции равен 0,571, $p < 0,001$). При этом между вариантами отбора сформировался резко различный паттерн *mdg1* (коэффициент корреляции между вариантами отбора равен 0,021). Сходная картина изменения рисунка МГЭ при длительной разнонаправленной селекции обнаружена и по транспозону *hobo* (табл. 14). Отмечается положительная связь между независимыми повторностями селекции и по рисунку мобильного элемента *hobo*. Так, коэффициент корреляции между повторностями 51−1(−) и 51−2(−) равен 0,259, $p < 0,001$, между повторностями 51−1(+) и 51−2(+) $r = 0,405$, $p < 0,001$. В то же время корреляция между двумя противоположными вариантами отбора (s−) и (s+) равна 0,092, $p < 0,05$.

Следовательно, можно констатировать, что система МГЭ эукариотического генома обла-

Таблица 12

Паттерн локализации *mdg2* в изогенной линии № 51
до и после хит-шока и в селекционном эксперименте

Районы политенных хромосом	Изогенная линия № 51 до ТТШ *n* = 17	Изогенная линия № 51 после ТТШ *n* = 85	Негативная селекция		Позитивная селекция	
			51–1(s–) *n* = 10	51–2(s–) *n* = 10	51–1(s+) *n* = 10	51–2(s+) *n* = 10
X 3C	–	♦(1)	–	–	–	–
4B	–	♦(1)	–	–	–	–
6E	+	+	*(8)	*(8)	*(8)	*(8)
16F	+	+	Δ	Δ	Δ	Δ
17C	+	+	*(8)	*(8)	*(8)	*(8)
19A	+	+	Δ	Δ	Δ	Δ
20A	+	+	Δ	Δ	Δ	Δ
2L 22B	–	♦(1)	–	–	–	–
24E	+	+	+	+	+	+
25F	+	+	+	+	+	+
26C	+	+	+	+	+	+
28A	–	♦(8)	–	–	–	–
30A	+	+	Δ	Δ	Δ	Δ
32C	+	+	Δ	Δ	Δ	Δ
34B	–	♦(4)	**(–)	**(–)	**(5)	**(6)
39C	+	+	Δ	Δ	Δ	Δ
2R 42E	+	+	Δ	Δ	Δ	Δ
42F	+	+	Δ	Δ	Δ	Δ
43B	–	♦(58)	+	+	+	+
45C	+	+	+	+	+	*(7)
49C	+	+	Δ	Δ	Δ	Δ
56A	–	–	–	–	–	*(3)
56E	–	♦(4)	**(–)	**(–)	**(2)	**(7)
60B	–	♦(17)	**(–)	**(–)	**(10)	**(10)
60C	+	+	**(–)	**(–)	**(10)	**(10)
3L 63A	–	♦(1)	–	–	–	–
64A	+	+	**(–)	**(–)	**(10)	**(10)
65E	+	+	Δ	Δ	Δ	Δ
67A	–	♦(1)	–	–	–	–
67DE	+	+	Δ	Δ	Δ	Δ
75A	+	+	+	+	+	+
75C	–	♦(2)	–	–	–	–
76A	+	+	Δ	Δ	Δ	Δ
3R 82E	+	+	Δ	Δ	Δ	Δ
83D	–	♦(1)	–	–	–	–
84D	+	+	–	+	+	–
85E	+	+	–	+	+	+
86D	–	♦(6)	–	–	–	–

Окончание таблицы 12

Районы политенных хромосом	Изогенная линия № 51 до ТТШ $n = 17$	Изогенная линия № 51 после ТТШ $n = 85$	Негативная селекция		Позитивная селекция	
			51–1(s–) $n = 10$	51–2(s–) $n = 10$	51–1(s+) $n = 10$	51–2(s+) $n = 10$
87B	–	♦(2)	–	*(1)	–	–
87F	–	♦(2)	–	–	–	–
88E	+	+	Δ	Δ	Δ	Δ
88F	+	+	Δ	Δ	Δ	Δ
90B	+	+	Δ	Δ	Δ	Δ
94D	–	♦(1)	–	–	–	–
96A	+	+	Δ	Δ	Δ	Δ
97DE	–	♦(7)	**(10)	**(7)	**(–)	**(1)
98CD	+	+	Δ	Δ	Δ	Δ
98E	–	♦(6)	–	–	–	*(1)
99A	+	+	Δ	Δ	Δ	Δ
99B	+	+	Δ	Δ	Δ	Δ
Всего сайтов	31	49	9	12	15	18

Примечание. Δ – эксцизии.

дает по крайней мере следующими общими функциями: 1) является источником инсерционной изменчивости генов; 2) откликается на внешние стрессовые воздействия, в частности, шоковая температурная обработка, γ-облучение и этанол вызывают вспышки транспозиционной изменчивости; 3) откликается изменением рисунков локализации многих МГЭ при переводе гетерогенного материала на изогенную основу и на селекцию по количественным признакам.

Гипотезы и современная концепция генетического контроля количественных признаков

Полученные факты ставят много новых вопросов. В отсутствие отбора фиксации и утраты копий МГЭ должны происходить медленно, по законам генетического дрейфа (Crow, Kimura, 1970). Можно ли считать, что скорость фиксаций и утрат копий МГЭ при отборе означает адаптивность этого процесса, т. е. участие МГЭ в экспрессии отбираемых генов и полигенов? В связи с поставленным вопросом можно рассмотреть несколько гипотез.

1. Гипотеза «чистого» генетического дрейфа МГЭ при отборе. Предполагается, что копии МГЭ никак не влияют на экспрессию полигенов и не сцеплены с ними, а потому не участвуют в отклике на отбор. Тогда в популяции «конечной численности» они должны быть подвержены «чистому» генетическому дрейфу. Согласно стохастической теории эволюции (Crow, Kimura, 1970), среднее условное время фиксации (без учета утрат) нейтрального аллеля в конечной популяции равно:

$$\bar{t}_{fix} = -\frac{4N_e(1-f)}{f}\ln(1-f) = 3{,}06,$$

$N_e > 600$ поколений.

$$\text{Среднее } \bar{t}_{loss} = -\frac{4N_e f}{(1-f)}\ln(f) = 2{,}4,$$

$N_e > 400$ поколений, при эффективной численности популяции $N_e \approx 200$ особей и начальной частоте аллеля (копии МГЭ) $f = 0{,}39$. Эти параметры соответствуют данным нашей экспериментальной популяции. Однако непосредственная оценка $\bar{t}_{fix}$ и $\bar{t}_{loss}$ в (s+)- и (s–)-направлениях отбора дает значения в интервале 50–60 поколений (в самом крайнем случае 80 поколений в гетерогенной популяции), что на порядок меньше величины, ожидаемой при случайном генетическом дрейфе. Таким образом, эта гипотеза не способна объяснить свойства реального отклика паттерна МГЭ на отбор по количественному признаку.

Таблица 13

Паттерн локализации МГЭ *mdg1* в контрольной изогенной линии № 51 и в селекционном эксперименте

Сегменты политенных хромосом карты Бриджеса	Контроль до отбора, линия № 51 $n = 10$	Негативная селекция (s–)		Позитивная селекция (s+)	
		51−1(s–) $n = 10$	51−2(s–) $n = 10$	51−1(s+) $n = 10$	51−2(s+) $n = 10$
X 20A	+	+	+	+	*(8)
2L 24E	+	+	+	+	*(8)
26C	+	+	+	+	*(7)
34D	–	*(5)	*(4)	–	*(4)
2R 42E	–	*(6)	*(5)	–	*(6)
42F	–	*(6)	*(5)	–	*(6)
43B	–	–	–	–	*(3)
45C	–	–	–	–	*(7)
47B	–	*(5)	+	*(3)	–
49C	+	Δ	Δ	Δ	Δ
51D	–	–	–	**(10)	**(10)
56E	–	–	–	**(8)	**(7)
3L 65C	–	–	*(1)	–	–
66B	+	Δ	Δ	Δ	Δ
69D	–	–	–	–	*(3)
71A	+	**(10)	**(9)	–	–
75A	–	*(3)	–	*(3)	–
76B	–	–	–	*(3)	–
3R 82F	–	–	–	*(3)	–
86D	–	–	–	*(1)	–
87B	+	–	–	**(10)	**(10)
92A	–	–	*(1)	–	–
97E	–	**(4)	**(1)	–	–
98D	–	*(10)	*(10)	*(7)	*(9)
99B	–	–	–	*(1)	–
Всего сайтов	8	11	12	12	13

Таблица 14

Паттерн локализации *hobo*-элемента в изогенной линии № 51 в двух направлениях селекции

Районы политенных хромосом	Позитивная селекция (s+)		Негативная селекция (s−)		Районы политенных хромосом	Позитивная селекция (s+)		Негативная селекция (s−)	
	51−1(+)	51−2(+)	51−1(−)	51−2(−)		51−1(+)	51−2(+)	51−1(−)	51−2(−)
X 2B	+				63F	+			
4C	+				64D	+	+		
4F	+				65A	+			
6A		+	+		65B	+			
6EF		+			66B	+	+		
7C		+			66C	+			

Продолжение таблицы 14

Районы политенных хромосом	Позитивная селекция (s+)		Негативная селекция (s−)		Районы политенных хромосом	Позитивная селекция (s+)		Негативная селекция (s−)	
	51−1(+)	51−2(+)	51−1(−)	51−2(−)		51−1(+)	51−2(+)	51−1(−)	51−2(−)
8E			+	+	67A		+		
9A	+	+			67C	+			
9B		+			67D	+			+
9ED	+				67F		+		
11CD	+				68DE				+
12A	+	+			68F				+
12ED	+	+			69C	+			
13A	+	+			69F	+	+		
14B	+				70C	+	+		
14D		+			71C		+		
18F-19A	+				73C	+			
20	+	+			74B	+	+		+
2L 21D	+				75A	+			
22F	+	+	+		75C	+			
26A	+	+		+	76F	+	+		
26C	+	+			78E		+		
26E		+			79C	+			
27A	+				***3R*** 80A	+			
28D		+			82F			+	
30B		+			84A			+	
33B			+		84BC		+		+
33C			+		84D		+	+	
33D		+			85A	+			
33F			+		85B				+
34C		+			85C	+			
35C	+				85F	+			
36A	+				86A		+		
37BC	+				86C	+	+		
38C				+	86D	+	+		
39E		+			87F	+			+
2R 42B				+	88A	+	+	+	+
45D		+			89A	+			
46B		+			92A	+	+		
46F	+				92E	+	+		
47D	+	+			93D	+			
49B	+				94D	+			
49D	+				95A	+			
50B	+		+		95D	+			
50C	+	+	+		95E	+			+
50F			+		95F	+			

Окончание таблицы 14

Районы политенных хромосом	Позитивная селекция (s+)		Негативная селекция (s−)		Районы политенных хромосом	Позитивная селекция (s+)		Негативная селекция (s−)	
	51−1(+)	51−2(+)	51−1(−)	51−2(−)		51−1(+)	51−2(+)	51−1(−)	51−2(−)
51F	+				96A	+	+		
53BC	+	+			96D	+	+		
53EF			+		96F	+			
53DE	+	+			97A	+			
57AB	+				97E	+	+		
57E	+				98E		+		
58D	+				98D		+		
59A	+				99A	+	+		
3L 61DE	+				100B		+		
62D		+			100EF	+			
63ED			+	+	Итого сайтов	71	55	13	17

2. Гипотеза маркерного эффекта. Предполагается, что копии МГЭ тесно сцеплены с полигенами, попадающими под селекционное давление, но не модифицируют их экспрессию. В такой ситуации отбираемые аллели (полигены) фиксируются достаточно быстро. Однако, если маркер (копия МГЭ) исходно полиморфен, то он должен оставаться полиморфным и после завершения отбора. Когда отбор завершен, наступает фаза нейтрального медленного генетического дрейфа маркеров, которые попадают в ситуацию предыдущей гипотезы. Сцепление маркера (МГЭ) и отбираемого полигена способно лишь несущественно изменить скорости фиксации и утрат копий МГЭ.

3. Гипотеза модифицирующего влияния копий МГЭ на характер проявления полигенов. Гипотеза предполагает, что МГЭ фиксируются или теряются в основном адаптивно, совместно со смежными полигенами. Фиксируемые рисунки МГЭ в «селекционных» линиях тоже должны быть адаптивными. Средние времена фиксации и утраты копий МГЭ должны быть ограничены рамками завершения отбора, т. е. десятками, а не сотнями поколений. Ясно, что эта гипотеза способна объяснить быструю фиксацию паттернов МГЭ при отборе количественного признака (Ратнер и др., 2003). Однако в этом случае финальные паттерны МГЭ как бы предопределены свойствами полигенной системы, т. е. должны быть строго детерминированы. В то же время вряд ли стоит ожидать, что подавляющее большинство копий МГЭ локализовано рядом с полигенами одной конкретной системы. Поэтому в финальных паттернах слишком большого числа адаптивных фиксированных и утраченных сайтов МГЭ не может быть.

Однако, если паттерны МГЭ содержат различные копии: нейтральные копии МГЭ, МГЭ-маркеры, МГЭ-модификаторы, то лишь последняя группа копий будет фиксироваться быстро, а две первые, число которых преобладает, будут откликаться на отбор крайне медленно. Такое поведение копий МГЭ не соответствует экспериментальным данным, где фактически быстро фиксируется вся выявляемая часть паттерна копий МГЭ.

4. Гипотеза участия паттерна-«чемпиона» полигенов, вносящего существенный вклад в фенотип количественного признака. Предполагается, что среди комбинаторных паттернов полигенов имеется аллельное разнообразие, в котором особое место в селекции занимают «экстремальные» варианты. Такие аллели всегда в первую очередь подхватываются отбором. Если особи многоплодны, как дрозофила, то пара родителей может дать сотни потомков. Тогда отбор аллелей родителя-«чемпиона» будет сопровождаться бессистемным семейным инбридингом, особенно в условиях жесткого отбора. Существенно, что инбридинг возрастает только в ходе отбора и захватывает и гомозиго-

тизирует все локусы генома, в том числе и все семейства МГЭ. Если гомозиготизация будет глубокой, то средние времена фиксации и утраты копий МГЭ-паттерна будут ограничены только временем завершения ответа на отбор. Паттерны МГЭ «селекционных» линий должны быть случайными или адаптивными только в меру участия соответствующих групп МГЭ в селекционном процессе. Поскольку предполагается, что доля МГЭ-модификаторов невелика и финальные паттерны МГЭ должны быть в основном случайны, нейтральны, эта гипотеза не является альтернативной по отношению к трем предыдущим. В ней появляется новый преобладающий фактор – инбридинг, зависящий от жесткости отбора. Инбридинг способен ускорить фиксацию всех групп МГЭ: маркеров, независимых копий и копий-модификаторов полигенов. Эта гипотеза кажется нам наиболее реалистичной.

Особо отмечаем, что индукция транспозиций МГЭ сопровождалась возникновением новой генетической изменчивости по полигенам, контролирующим экспрессию олигогенной мутации *ri*. Доказательством того, что транспозиции МГЭ являются источником дополнительного генетического разнообразия, служит успешный «генетический тренд» при разнонаправленной селекции по количественному признаку в изогенных линиях. Селекция по количественному признаку была эффективной после обработки самцов дрозофилы γ-облучением, и это неудивительно, поскольку γ-облучение всегда считалось жестким мутагеном. Однако выявление сопровождающих γ-облучение транспозиций МГЭ может означать, что мутагенность γ-облучения частично или полностью реализуется через индукцию транспозиций МГЭ. Оказалось также, что температурный шок и пары этанола являются активаторами транспозиций МГЭ. Обнаружение того факта, что этанол является своеобразным индуктором транспозиций МГЭ, является важным аргументом при объяснении причин возникновения различных патологий у детей родителей, злоупотребляющих алкоголем. Температурные шоковые воздействия всегда считались немутагенными. Однако наличие эффективного отклика количественного признака на отбор в изогенной линии после ТТШ говорит о том, что ТТШ индуцирует генетическую изменчивость полигенов. В данном случае отклик на отбор в гомозиготной изогенной линии можно объяснить только наличием индукции транспозиций МГЭ, которые изменяют активность полигенов, контролирующих селектируемый признак. МГЭ способны модифицировать активность полигенов, участвующих в экспрессии олигогенов, т. е. прямое энхансерное или иное усиление или ослабление их экспрессии. В принципе аллели полигенов могут вносить положительный и отрицательный вклад в признак или быть нейтральными, т. е. по-разному откликаться на отбор в каждом из направлений селекции или не откликаться на отбор совсем. Модифицирующий эффект должен проявляться только у отбираемых аллелей полигенов, т. е. по результату эквивалентно специфической локализации МГЭ, которые усиливают экспрессию смежных полигенов в направлении селекции.

Таким образом, усиление транспозиционной активности мобильных генетических элементов в геномах в ответ на стрессовые воздействия носит, по-видимому, повсеместный характер. В таком случае паттерны различных семейств МГЭ можно рассматривать как универсальную геномную систему «мягкой» модификации полигенного контроля любых количественных признаков и в том числе признаков приспособленности.

Суммируя все вышеизложенное, можно заключить, что система мобильных генетических элементов в геномах столь же реальна и универсальна, как и система SOS-репарации и система гормонального контроля. Таким образом, система МГЭ эукариотических геномов является источником инсерционной изменчивости, влияет на экспрессию генов, контролирующих количественные и качественные признаки, изменяет рисунки локализации в ответ на селекцию по признакам, на действие инбридинга и аутбридинга и на внешние стрессовые воздействия (шоковая температура, γ-облучение, алкоголь, детергенты и др.). МГЭ выполняют функцию своего рода рецепторов внешних стрессирующих сигналов, инициирующих вспышки транспозиционной изменчивости в критические периоды эволюции популяций, что может приводить к быстрому преобразованию гомеостатической видовой нормы и, возможно, к видообразованию.

Наличие мобильных генетических элементов, в частности в геномах эукариот, дает воз-

можность популяциям в целом выживать в резко измененных условиях среды. Следовательно, можно считать, что МГЭ непосредственно участвуют в экспрессии и изменчивости признаков, селекции и эволюции.

Работа частично поддержана грантами РФФИ № 09-04-00213а и № 09-04-00872а и грантом «Биологическое разнообразие» № 27.30.

Литература

Аникеева Н.В., Забанов С.А., Васильева Л.А., Ратнер В.А. Влияние теплового шока на транспозиции МГЭ *Dm412* в трех изогенных линиях *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1994. Т. 30. № 2. С. 212–217.

Антоненко О.В., Васильева Л.А. Изменение рисунка локализации МГЭ *mdg1* и *mdg2* при разнонаправленной селекции по количественному признаку в изогенной линии *Drosophila melanogaster* // Докл. АН. 2006. Т. 406. № 1. С. 129–133.

Беляева Е.С., Пасюкова Е.Г., Гвоздев В.А. и др. Транспозиции мобильных диспергированных генов у *Drosophila melanogaster*, выявляемые с помощью селекции // Генетика. 1981. Т. 17. С. 1566–1580.

Беляева Е.С., Пасюкова Е.Г., Глушкова И.В. и др. Приспособленность особей и горячие точки локализации мобильного элемента МДГ1 в хромосоме 2 в линиях *Drosophila melanogaster*, имеющих общее происхождение // Генетика. 1989. Т. 25. № 6. С. 1047–1058.

Бубенщикова Е.В., Антоненко О.В., Васильева Л.А., Ратнер В.А. Индукция транспозиций МГЭ 412 раздельно тепловым и холодовым шоком в сперматогенезе у самцов дрозофилы // Генетика. 2002. Т. 38. № 1. С. 46–55.

Васильева Л.А. Влияние изогенизации на фенотипическое проявление количественных признаков у *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2004. Т. 40. № 8. С. 1053–1057.

Васильева Л.А. Изменение системы жилкования крыла *Drosophila melanogaster* под действием температурного шока и селекции // Журн. общ. биологии. 2005. Т. 66. № 1. С. 68–74.

Васильева Л.А. Статистические методы в биологии, медицине и сельском хозяйстве. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2007. 127 с.

Васильева Л.А., Антоненко О.В. Анализ изменения рисунка мобильных генетических элементов (МГЭ) в геноме *Drosophila melanogaster* под действием отбора // Вестник НГАУ. 2010. № 3(15). С. 62–68.

Васильева Л.А., Антоненко О.В., Выхристюк О.В., Захаров И.К. Индукция транспозиций мобильных генетических элементов *Drosophila melanogaster* различными стрессовыми факторами // Информ. вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 3/4. С. 662–671.

Васильева Л.А., Антоненко О.В., Выхристюк О.В., Захаров И.К. Селекция изменяет паттерн мобильных генетических элементов в геноме *Drosophila melanogaster* // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 3. С. 412–425.

Васильева Л.А., Бубенщикова Е.В., Антоненко О.В., Ратнер В.А. Отклик паттерна МГЭ 412 на отсекающий отбор количественного признака в изогенной линии дрозофил после тяжелого теплового шока (ТТШ) // Генетика. 2000. Т. 36. № 6. С. 774–781.

Васильева Л.А., Забанов С.А., Ратнер В.А. и др. Экспрессия количественного признака *radius incompletus*, температурные эффекты и локализация мобильных элементов у дрозофилы. Сообщение II. Мобильные генетические элементы *Dm412* // Генетика. 1987а. Т. 23. № 1. С. 81–92.

Васильева Е.В., Захаренко Л.П., Ратнер В.А. Популяционная динамика отклика геномного паттерна МГЭ *Dm412* на отбор по количественному признаку // Генетика. 1998а. Т. 34. № 7. С. 929–940.

Васильева Л.А., Ратнер В.А. Генетический анализ полигенной системы количественного признака после негативной и позитивной селекции: вклады хромосом в экспрессию фрагментов радиальной жилки // Генетика. 1994. Т. 30. № 2. С. 185–191.

Васильева Л.А., Ратнер В.А. Полигенная система количественного признака *radius incompletus* у дрозофилы: генетические особенности, взаимодействие с другими генами и паттерном МГЭ, эволюционные свойства // Современные концепции эволюционной генетики / Ред. В.К. Шумный, А.Л. Маркель. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2000. С. 117–127.

Васильева Л.А., Ратнер В.А. Сравнительный анализ паттернов МГЭ 412 в 18 изогенных линиях *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2003. Т. 39. № 3. С. 349–356.

Васильева Л.А., Ратнер В.А. Анализ системы экспрессии гена *radius incompletus* у *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2004. Т. 40. № 5. С. 624–630.

Васильева Л.А., Ратнер В.А., Антоненко О.В. и др. Индукция транспозиций МГЭ 412 различными дозами паров этанола в изогенной линии *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2003. Т. 39. № 5. С. 717–720.

Васильева Л.А., Ратнер В.А., Бубенщикова Е.В. Сравнительные вклады различных генетических

факторов в индукцию транспозиций МГЭ при изогенизации // Генетика. 1998б. Т. 34. № 11. С. 1484–1492.

Васильева Л.А., Ратнер В.А., Забанов С.А. Экспрессия количественного признака *radius incompletus*, температурные эффекты и локализация мобильных элементов у дрозофилы. Сообщение I. Свойства исследуемых субпопуляций // Генетика. 1987б. Т. 23. № 1. С. 71–80.

Васильева Л.А., Ратнер В.А., Забанов С.А., Юданин А.Я. Сравнительный анализ паттернов локализации мобильных генетических элементов в селекционно-генетических экспериментах на *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1995. Т. 31. № 7. С. 920–931.

Гаврилова Е.Д., Антоненко О.В., Васильева Л.А. Пары этанола индуцируют транспозиции МГЭ 412 у *Drosophila melanogaster* // Экол. генетика. 2004. Т. 2. № 3. С. 3–7.

Гвоздев В.А. Подвижная ДНК эукариот // Сорос. образовательный журнал. 1998. Т. 33. № 8. С. 8–22.

Гвоздев В.А., Кайданов Л.З. Геномная изменчивость, обусловленная транспозициями мобильных элементов, и приспособленность особей *Drosophila melanogaster* // Журн. общ. биологии. 1986. Т. 47. № 1. С. 51–63.

Гвоздев В.А., Кайданов Л.З. Системные изменения локализации мобильных элементов в геноме *Drosophila melanogaster*, сопровождающие процессы селекции // Молекулярные механизмы генетических процессов / Под ред. А.А. Созинова, Н.Г. Шуппе. М.: Наука, 1990. С. 81–92.

Георгиев Г.П., Гвоздев В.А. Мобильные диспергированные гены эукариот // Вестник АН СССР. 1980. № 8. С. 19–27.

Георгиев Г.П., Корочкина С.Е., Могила В.А., Герасимова Т.И. Индукция одиночных транспозиций мобильных генетических элементов у *Drosophila melanogaster* с помощью митомицина С // Генетика. 1988. Т. 24. № 3. С. 461–467.

Герасимова Т.И. «Транспозиционные взрывы» при дестабилизации генома у *Drosophila melanogaster* // Молекулярные механизмы генетических процессов: молекулярная генетика, эволюция и молекулярно-генетические основы селекции. М.: Наука, 1985. С. 13–20.

Герасимова Т.И. Транспозиционные взрывы, транспозиционная память и их возможное эволюционное значение // Ред. А.А. Созинов, Н.Г. Шуппе. М.: Наука, 1990. С. 99–109.

Герасимова Т.И., Мизрохи Л.Ю., Георгиев Г.П. Транспозиционные взрывы в отдельных зародышевых клетках при генетической дестабилизации у *Drosophila melanogaster* // Докл. АН СССР. 1984. Т. 274. № 6. С. 1473–1476.

Горячковская Т.Н., Васильева Л.А. Анализ спектра локализации МГЭ *Dm-412* в линиях *Drosophila melanogaster*, подвергавшихся длительной селекции по количественному признаку // Генетика. 1991. Т. 27. № 8. С. 1350–1358.

Гришаева Т.М., Иващенко Н.И. Проблемы структурно-функционального взаимодействия в системах гибридного дисгенеза // Усп. соврем. биологии. 1997. Т. 117. № 1. С. 52–67.

Евгеньев М.Б. Мобильные элементы и эволюция генома // Молекуляр. биология. 2007. Т. 41. № 2. С. 234–345.

Забанов С.А., Васильева Л.А., Ратнер В.А. Экспрессия количественного признака *radius incompletus* у дрозофилы и локализация мобильных элементов *МДГ-1* и *copia* // Генетика. 1990. Т. 26. № 7. С. 1144–1153.

Забанов С.А., Васильева Л.А., Ратнер В.А. Множественная индукция транспозиций МГЭ *B104* у дрозофилы тяжелым тепловым шоком // Генетика. 1994. Т. 30. № 2. С. 218–224.

Забанов С.А., Васильева Л.А., Ратнер В.А. Индукция транспозиций МГЭ *Dm 412* при помощи γ-облучения в изогенной линии *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1995. Т. 31. № 6. С. 798–803.

Зайнуллин В.Г., Шапошников М.В., Юранева И.Н. Генетические эффекты у *Drosophila melanogaster*, индуцированные хроническим облучением в малых дозах // Радиац. биол. радиоэкол. 2000. Т. 40. С. 567–575.

Иващенко Н.И., Гришаева Т.М. Современные представления о роли разных семейств мобильных элементов в геномах эукариот // Усп. соврем. биологии. 2009. Т. 129. № 2. С. 115–123.

Иовлева О.В., Мыльников С.В. Последствия отбора в высокоинбредных линиях дрозофилы // Генетика. 2007. Т. 43. № 10. С. 1328–1340.

Кайданов Л.З., Галкин А.П., Иовлева О.В., Сиделова О.Г. Направленные перемещения по геному мобильного элемента *хобо* в длительно селектируемой линии НА *Drosophila melanogaster* // Цитология и генетика. 1996а. Т. 30. № 1. С. 23–30.

Кайданов Л.З., Мыльников С.В., Иовлева О.В., Галкин А.П. Направленный характер генетических изменений при длительном отборе линий *Drosophila melanogaster* по адаптивно важным признакам // Генетика. 1996б. Т. 30. № 8. С. 1085–1096.

Кайданов Л.З., Мыльников С.В., Галкин А.П. и др. Генетические эффекты дестабилизирующего отбора при селекции по адаптивно важным признакам в линиях *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1997. Т. 33. № 8. С. 1102–1109.

Колесникова О.В., Забанов С.А., Васильева Л.А., Ратнер В.А. Индукция транспозиций МГЭ *Dm 412* в

геноме дрозофилы при помощи теплового шока // Генетика. 1991. Т. 27. № 9. С. 1547–1555.

Лобашев М.Е. Физиологическая (паранекротическая) гипотеза мутационного процесса // Вестн. ЛГУ. 1947. № 8. С. 10–29.

Мизрохи Л.Ю., Георгиева С.Г., Оболенскова Л.А. и др. Природа нестабильных инсерционных мутаций и реверсий в локусе *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1988. Т. 24. № 2. С. 216–226.

Пасюкова Е.Г., Беляева Е.С., Коган Г.Л. и др. Транспозиции мобильных диспергированных генов (мдг), коррелирующие с изменением приспособленности у *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1984. Т. 20. № 11. С. 1772–1782.

Пасюкова Е.Г., Коган Г.Л., Иовлева О.В. и др. Согласованные изменения локализации мобильных элементов в геноме *Drosophila melanogaster*, отражающие результат направленного отбора по количественным признакам // Докл. АН СССР. 1985. Т. 283. № 6. С. 1476–1480.

Ратнер В.А., Бубенщикова Е.В., Васильева Л.А. Пролонгация индукции транспозиций МГЭ 412 после γ-облучения в изогенной линии *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2001. Т. 37. № 4. С. 485–493.

Ратнер В.А., Васильева Л.А. Количественный признак у дрозофилы: генетические, онтогенетические, цитогенетические и популяционные аспекты // Генетика. 1987. Т. 23. № 6. С. 1070–1081.

Ратнер В.А., Васильева Л.А. Мобильные генетические элементы и количественные признаки у дрозофилы: факты и гипотезы // Генетика. 1992. Т. 28. № 11. С. 15–27.

Ратнер В.А., Васильева Л.А. Мобильные генетические элементы (МГЭ) и эволюция геномов // Современные проблемы теории эволюции / Под ред. Л.П. Татаринова. М.: Наука, 1993. С. 43–59.

Ратнер В.А., Васильева Л.А. Индукция транспозиций и эксцизий мобильных генетических элементов у дрозофилы в процессе изогенизации // Генетика. 1996. № 7. Т. 32. С. 933–944.

Ратнер В.А., Васильева Л.А. Мобильные генетические элементы (МГЭ): «эгоистическая ДНК» или функциональная часть генома? // Современные концепции эволюционной генетики / Под ред. В.К. Шумного, А.Л. Маркеля. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2000. С. 128–150.

Ратнер В.А., Егорова А.В., Юданин А.Я. Стабилизирующий отбор в компьютерной модели совместной эволюции паттернов полигенов, МГЭ и МИП // Генетика. 2003. Т. 39. № 4. С. 550–561.

Фурман Д.П., Бухарина Т.А. Увеличение частоты перемещений *copia*-подобных элементов в процессе получения изогенных линий // Докл. АН. 1996а. Т. 348. С. 711–715.

Фурман Д.П., Бухарина Т.А. Мобильные элементы генома дрозофилы как маркеры кроссинговера в изогенизирующих скрещиваниях с балансерной линией // Генетика. 1996б. Т. 32. № 9. С. 1291–1294.

Фурман Д.П., Бухарина Т.А. Увеличение частоты транспозиций *copia*-подобных элементов при изогенизирующих скрещиваниях с балансерной линией // Генетика. 1997. Т. 33. № 11. С. 1510–1516.

Хесин Р.Б. Непостоянство генома. М.: Наука, 1984. 472 с.

Чересиз С.В., Юрченко Н.Н., Иванников А.В., Захаров И.К. Мобильные элементы и стресс // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 1/2. С. 217–242.

Шахмурадов И.А., Капитонов В.В., Колчанов Н.А., Омельянчук Л.В. Эволюция повторов *Alu*: динамика распространения в геноме // Генетика. 1989. Т. 25. № 9. С. 1682–1689.

Ananiev E.V., Gvozdev V.A., Ilyin Y.V. *et al*. Reiterated genes with varying location in intercalary heterochromatin of *Drosophila melanogaster* polytenic chromosomes // Chromosoma. 1978. V. 70. P. 1–17.

Arkhipova I.R., Lyubomirskaya N.V., Ilyin Y.V. Drosophila Retrotransposons. Berlin: Springer-Verlag, 1995. 134 p.

Arkhipova I.R., Pyatkov K.I., Meselson M. *et al*. Retroelements containing introns in diverse invertebrate taxa // Nat. Genet. 2003. V. 33. N 2. P. 123–124.

Arnault C., Biemont C. Heat shock do not mobileze mobile elements in genome of *Drosophila melanogaster* // J. Mol. Evol. 1989. V. 28. P. 388–390.

Babenko V.N., Makunin I.V., Brusentsova I.V. *et al*. Paucity and preferential suppression of transgenes in late replication domains of the *D. melanogaster* genome // BMC Genomics. 2010. V. 11. P. 318–332. (http:biomedcentral.com/1471-2164/11/38)

Barsanti P., Palumbo G. Heat Shock or hybrid dysgenesis induced instability in the w^a mutation of *Drosophila melanogaster* // Proc. of the IX Eur. *Drosophila* Research Conf. 1985. P. 53.

Basten C.J., Weir, Zeng Z.-B. Zmap-a QTL cartographer // Proc. 5th world Congr. on Genetics Applied to Livestock Production: Computing strategies and sofeware / Eds C. Smith, Y.S. Gavora, B. Benkel *et al*. 1994. V. 22. P. 65–66.

Belyaeva E.S., Pasyukova E.G., Ilyin Y.V. *et al*. Transposition of mobile dispersed genes in *Drosophila melanogaster* and fitness of stocks // Mol. Gen. Genet. 1982. V. 185. P. 324–328.

Biemont C. Population genetics of transposable DNA elements. A Drosophila point of view // Genetica (Ned.). 1992. V. 86. P. 67–84.

Biemont C., Arnault C., Heirzmann A. *et al*. Massive changes in genomic location of *P* elements in an inbred line of *Drosophila melanogaster* // Naturwissenschaften. 1990. V. 77. P. 485–488.

Biemont C., Terzian C. MDG-1 mobile element polymorphism in selected *Drosophila melanogaster* population // Genetica (Ned.). 1988. V. 76. N 1. P. 7–14.

Biemont C., Vieira C. What transposable elements tell us about genome organization and evolution: the case of *Drosophila* // Cytogenet. Genome Res. 2005. V. 110. N 1/4. P. 25–34.

Bolshakov V.N., Galkin A.P., Kaidanov L.Z. *et al*. Closely related *Drosophila melanogaster* strains with altered fitness also depict changes in their *hobo* element properties // Genet. Sel. Evol. 1994. V. 26. P. 205–216.

Caceres M., Puig M., Ruiz A. Molecular characterization of two natural hotspots in the *Drosophila buzzatii* genome induced by transposon insertions// Genome Res. 2001. V. 11. N 8. P. 1353–1364.

Capy P., Bazin C., Hiquet D., Langin T. Dynamics and Evolution of Transposable Elements. USA. N.Y.: Landes Bioscience, 1998. 197 p.

Cost G.J., Feng Q., Jacquier A., Boeke J.D. Human L1 element target-primed reverse transcription *in vitro* // The EMBO J. 2002. V. 21. N 21. P. 5899–5910.

Crow J., Kimura M. An Introduction to Population Genetic Theory. N.Y.: Harper and Row, 1970. 591 p.

Doolittle W.F., Sapienza C. Selfish genes the prototype paradigm and genome evolution // Nature. 1980. V. 23. P. 252–287.

Engels W.R. *P*-elements in Drosophila // Mobile DNA / Eds D.E. Berg, M.M. Howe. Washington D.S.: Amer. Soc. Microbiol. 1989. P. 437–484.

Evgen'ev M.B., Arkhipova I.R. Penelope-like elements – a new class of retroelements: distribution, function and possible evolutionary significance // Cytogenet. Genome Res. 2005. V. 110. N 1/4. P. 510–521.

Federoff N.V., Barbara McClintok (June 16, 1902–September 2, 1992) // Genetics. 1994. V. 136. P. 1–10.

Finnegan D.J. Eucaryotic transposable elements and genome evolution // Trends in Genet. 1989. V. 5. P. 103–107.

Finnegan D.J. Transposable elements // The Genome of *Drosophila melanogaster* / Eds D.L. Lindsley, G. Zimm. San-Diego: Acad. Press, 1992. P. 1096–1107.

Finnegan D.J., Rubin G.M., Young M.W., Hogness D.S. Repeated gene families in *Drosophila melanogaster* // Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol. 1978. V. 42. P. 1053–1063.

Fontdevila A. Genetic instability and rapid speciation: are they coupled? // Genetica. 1992. V. 86. P. 247–258.

Gerasimova T.I., Mizrokhi L.J., Georgiev G.P. Transposition burns in genetically unstable *Drosophila melanogaster* // Nature. 1984. V. 309. P. 714–716.

Gvozdev V.A., Belyaeva E.S., Ilyin Y.V. *et al*. Selection and transposition of mobile dispersed genes in *Drosophila melanogaster* // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1981. V. 65. P. 673–685.

Ilyin Y.V., Tchurikov N.A., Ananiev E.V. *et al*. Studies on the DNA fragments of mammals and *Drosophila* containing structural genes and adjacent sequences // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1978. V. 42. P. 959–969.

Junakovic N., Di Franco C., Barsanti P. *et al*. Transpositions of *copia*-like elements can be induced by heat shock // J. Mol. Evol. 1986. V. 24. P. 89–93.

Kaminker J.S., Bergman C.M., Kronmiller B. *et al*. The transposable elements of the Drosophila melanogaster euchromatin: a genomics perspective // Genome Biol. 2002. V. 3. N 12. RESEARCH0084.

Kapitonov V.V., Jurka J. Molecular paleontology of transposable elements in the *Drosophila melanogaster* genome // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. N 11. P. 6569–6574.

Kulguskin V.V., Ilyin V., Georgiev G.P. Mobile dispersed genetic element mdg1 of *Drosophila melanogaster*: nucleotide sequence of long terminal repeats // Nucl. Acids Res. 1991. V. 9. N 14. P. 3451–3463.

Macas J., Neumann P., Pozarkova D. *Zaba*: a novel miniature transposable element present in genomes of legume plants // Mol. Genet. Genomics. 2003. V. 269. N 5. P. 624–631.

Mackay T.F.C. Transposable element-induced response to artificial selection in *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1985. V. 111. N 2. P. 351–374.

Mackay T.F.C. Transposable element-induced quantitative genetic variation in Drosophila // Proc. of the 2nd Intern. Conf. on Quant. Genet. Sunderland: Sinauer. Mas, 1988. P. 219–235.

Mackay T.F.C. Transposable elements and fitness in *Drosophila melanogaster* // Genome. 1989. V. 31. P. 284–295.

Mackay T.F.C. The nature of quantitative genetic variation for Drosophila longevity // Mech. Ageing Dev. 2002. V. 123. P. 95–104.

Mackay T.F.C., Fry J.D., Lyman R.F., Nuzhdin S.V. Polygenic mutation in *Drosophila melanogaster*: estimates from response to selection of inbred strains // Genetics. 1994. V. 136. N 3. P. 937–951.

Mackay T.F.C., Lyman R.F., Jackson M.S. Effects of *P*-element insertion on quantitative traits in *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1992. V. 130. P. 315–332.

Maniatis T., Goodbourn S., Fischer J.A. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression // Science. 1987. V. 236. N 4806. P. 1237–1245.

Mather K. Variation and selection polygenic characters // J. Genet. 1941. V. 41. P. 159–193.

McClintock B. The origin and behavior of mutable loci in maize // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1950. V. 36. P. 344–355.

McClintok B. Chromosome organization and genetic expression // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1951. V. 16. P. 13–47.

McClintok B. Controlling elements and gene // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1956. V. 21. P. 196–216.

McClintock B. Mechanisms that rapidly reorganize the genome // Stadler Symp. 1978. V. 10. P. 25–48.

McClintock B. Modified gene expressions induced by transposable elements // Miami Winter Symp. / Eds W.A. Scott, R. Werner, D.R. Joseph, J. Schultz. N.Y.: Acad. Press, 1980. V. 17. P. 11–19.

McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge // Science. 1984. V. 226. N 4676. P. 792–801.

McDonald J.F., Strand D.J., Lambert M.E. *et al*. The responsive genome: Evidence and evolutionary implication // Development as an Evolutionary Process / Eds R.A. Raff, E.C. Raff. N.Y.: Alan R. Liss Inc, 1987. P. 239–263.

Mobile DNA / Eds D.E. Berg, M.M. Howe. Washington D.S.: Amer. Soc. Microbiol, 1989.

Nuzhdin S.V., Mackay T.F.C. The genomic rate of transposable element movement in *Drosophila melanogaster* // Mol. Biol. Evol. 1995. V. 21. P. 180–181.

Nuzhdin S.V., Pasyukova E.G., Morozova E.A., Flavell A.J. Quantitative genetic analysis of copia retrotransposon activity in inbred *Drosophila melanogaster* lines // Genetics. 1998. V. 150. N 2. P. 755–766.

Orgel L.E., Crick F.H.C. Selfish DNA: the ultimate parasite // Nature. 1980. V. 284. N 5757. P. 604–607.

Pasyukova E.G., Belyaeva E.S., Ilyinskaya L.E. *et al*. Outcrossdependent transpositions of *copia*-like mobile genetic element in chromosomes of an inbred *Drosophila melanogaster* stocks // Mol. Genet. 1988. V. 212. P. 281–286.

Pasyukova E.G., Belyaeva E.S., Kogan G.L. *et al*. Concerted transpositions of mobile genetic elements coupled with fitness chagnes in *Drosophila melanogaster* // Mol. Biol. Evol. 1986. V. 3. P. 299–312.

Ratner V.A., Vasilyeva L.A. Mobile genetic elemenets and quantitative character in Drosophila: quick inheritable changes after temperature treatment // Evolutionary Biology of Transient Unstable Populations / Ed. A. Fontdevila. Berlin e.a.: Springer-Verlag, 1989. P. 165–189.

Ratner V.A., Zabanov S.A., Kolesnikova O.V. *et al*. Induction of mobile genetic element *Dm 412* transposition in Drosophila genome by heat shock treatment // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. N 12. P. 5650–5654.

Rubin G.M., Finnegan D.J., Hogness D.S. The chromosomal arrangement of coding sequences in a family of repeated genes // Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol. 1976. V. 19. P. 221–226.

Shrimpton A.E., Mackay T.F.C., Leigh Brown A.J. A molecular genetic analysis of the response to selection for bristle number in Drosophila // Abstr. 2nd Intern. Conf. Quant. Genet. Raleigh, 1987. P. 102.

Shrimpton A.E., Mackay T.F.C., Leigh Brown A.J. Transposable element induced response to artificial selection in *Drosophila melanogaster* molecular analysis of selection lines // Genetics. 1990. V. 125. N 4. P. 803–811.

Strand D.J., McDonald J.F. *copia* is transcriptionally responsive to environmental stress // Nucl. Facids Res. 1985. V. 13. P. 4401–4410.

Strand D., McDonald J.F. Insertion of a *copia* element 5′ *D. melanogaster* (adh) – alcohol degydrogenase gene is associated with altered developmental and tissue specific patterns of expression // Genetics. 1989. V. 121. N 4. P. 787–794.

Strobel E., Dunsmuir P., Rubin G.M. Polymorphisms in the chromosomal locations of elements of the *412*, *copia* and *297* dispersed repeated gene families in *Drosophila* // Cell. 1979. V. 17. P. 429–439.

Vivas M.V., Garcia-Planells J., Ruiz C. *et al*. GEM, a cluster of repetitive sequences in the *Drosophila subobscura* genome // Gene. 1999. V. 229. N 1/2. P. 47–57.

Will B.M., Bayev A.A., Finnegan D.J. Nucleotide sequence of terminal repeats of *412* transposable elements of *Drosophila melanogaster*. A similarity to proviral long terminal repeats and its implications for the mechanism of transposition // J. Mol. Biol. 1981. V. 153. N 4. P. 897–915.

Yuki S., Inouye S., Ishimaru S., Saigo K. Nucleotide sequence characterization of a Drosophila retrotransposon *412* // Eur. J. Biochem. 1986. V. 158. N 2. P. 403–410.

Young M.W. Middle repetitive DNA: a fluid component of the *Drosophila* genome // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 6274–6278.

Zupunski V., Gubensek F., Kordis D. Evolutionary dynamics and evolutionary history in the RTE clade of non-LTR retrotransposons // Mol. Biol. Evol. 2001. V. 18. N 10. P. 1849–1863.

ROLE OF TRANSPOSABLE ELEMENTS IN THE *DROSOPHILA MELANOGASTER* GENOME

L.A. Vasil'eva[1, 2], O.V. Antonenko[1], I.K. Zakharov[1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia; e-mail: ratner@bionet.nsc.ru;
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

The discovery of transposable elements (TEs) generated the problem of their role in host genomes. The experimental data accumulated for the last three decades have brought scientists to some conclusions as to TE behavior and role in genomes. Presently it is known that the spontaneous rate of TE insertions/transpositions in Drosophila is 10^{-4}–10^{-5} events per site per genome per generation, which exceeds the rate of spontaneous recessive mutations by one or two orders of magnitude. It is believed that most of oligogenic (major-genic) mutations result from TE insertion. Moreover, TEs can modulate the function and activity of major and minor genes, because they contain control system motifs and enhancers, which consist of several modules and thereby can bind to various regulatory proteins initiating transcription. Crossover between long terminal repeats can give rise to various types of chromosomal rearrangements: deletions, duplications, and inversions. Transposable elements can fill chromosome telomeres and take part in horizontal gene transfer. Various stress factors acting on genomes are responded by outbreaks of transpositions.

In this work, rates of transposition induction in response to various external stress factors are estimated: cold and heat shock, ethanol vapor, and γ irradiation. It has been shown that external stress factors increase the rate of TE transpositions by one or two orders of magnitude in comparison to the spontaneous rate. They reach 10^{-2}–10^{-3} events per site per genome per generation. Also, the pattern of TEs in a genome is altered significantly by genetic factors: outbreeding, inbreeding, and selection.

Thus, we conclude that the system of transposable elements in genomes is as substantial and universal as the mechanisms for SOS repair and hormonal control. It is reasonable to suggest that TEs play the role of stress signal receptors, which trigger transpositional variability outbreaks during critical phases of population evolution. This may cause a rapid adjustment of the specific homeostatic norm and, probably, speciation. It is conceivable that the presence of TEs, in particular, in eukaryotic genomes, assists population survival under dramatically altered environmental conditions. Hence, TEs are directly involved in the expression of genes encoding traits in the course of selection and evolution.

Key words: DNA, transposable elements, isogenization, inbreeding, outbreeding, selection, stress factors, induction of TE transposition, *Drosophila melanogaster*.

МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ: НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНОВ И ГЕНОМОВ

Н.Н. Юрченко[1], Л.В. Коваленко[1], И.К. Захаров[1, 2]

[1] Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия,
e-mail: yurchen@bionet.nsc.ru; zakharov@bionet.nsc.ru;
[2] Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Рассматриваются мобильные генетические элементы (МГЭ) в качестве контролирующих и дестабилизирующих факторов генома генеративных и соматических клеток. Анализируется возможность индукции транспозиций МГЭ различными стрессовыми факторами: как внутригеномными процессами – гибридным дисгенезом, инбридингом, аутбридингом, так и факторами внешней среды – повышенной температурой, радиоактивным излучением.

Ключевые слова: нестабильность генома, мобильные генетические элементы, транспозиции, *Drosophila melanogaster*.

Введение

Мобильные генетические элементы (МГЭ) были открыты Б. Мак-Клинток в конце 1940-х гг. (McClintock, 1956; Fedoroff, 1989). Сегодня известно, что они распространены повсеместно и составляют существенную часть геномной ДНК многих изученных организмов (Mobile DNA, 1989, 2002). Так, геном кукурузы наполовину состоит из транспозонов, а в геноме человека при общем уровне содержания МГЭ 30 % насчитывается свыше 4 млн отдельных копий (Kidwell, Lisch, 1997). Поиск, открытие и многостороннее исследование структуры и функции МГЭ у дрозофилы и других организмов позволили понять их роль и значение в геноме и эволюции (Green, 1977; Finnegan *et al*., 1978; Ilyin *et al*., 1978; Georgiev, 1984; Хесин, 1984; Mobile DNA, 1989, 2002; Charlesworth, 1992; Kidwell, Lish, 2002; Alonso-Gonzales, 2003; Kazazian, 2004; Евгеньев, 2007).

Транспозиционная активность МГЭ является основной причиной возникновения спонтанных мутаций (Spradling *et al*., 1999). МГЭ имеют определенную структурную организацию, благодаря которой могут перемещаться в геноме как в пределах одной хромосомы, так и между хромосомами. МГЭ имеют способность увеличивать число копий в геноме хозяина, вызывать мутации, встраиваясь в гены или окрестности генов, служить причиной хромосомных перестроек, влиять на фертильность особей и даже приводить организм к гибели (Хесин, 1984; Mobile DNA, 1989, 2002). Достаточно неожиданной оказалась способность мобильных элементов изменять – как понижать, так и повышать – уровень активности близлежащих генов (Kidwell, Lisch, 1997). Изучение первичной последовательности МГЭ выявило, что в их структуре есть большое количество регуляторных сайтов и сигнальных последовательностей, а это означает, что МГЭ могут очень интенсивно воздействовать на работу гена, не разрушая сам ген (Гвоздев, 1998).

Возникающие мутации могут не сказываться на жизнеспособности организма, если они возникли в гене, который отвечает, например, за формирование фенотипического признака. В редких случаях мутационные изменения могут иметь адаптивное значение и особи с такими мутациями получают преимущество перед другими сородичами для выживания и оставления

потомства. Однако чаще всего мутации вредны для организма и приводят к стерильности или гибели особи.

Вопрос о том, какова роль МГЭ, являются ли они паразитами или выполняют ряд важнейших функций в геноме, до сих пор не решен. Мобильные элементы долгое время рассматривались как представители так называемой эгоистичной ДНК, перед которой стоит единственная цель – размножиться в геноме и паразитировать на нем. Эта точка зрения предполагает, что геном «вынужден» бороться с эгоистичной ДНК и ограничивать ее размножение.

В то же время не лишены основания представления о том, что естественному отбору подвергаются не только хозяйские гены, но и эгоистичная ДНК. Нельзя исключить, что в результате естественного отбора представители паразитической ДНК будут использованы для нужд генома, если появятся полезные функции этих эгоистичных фрагментов ДНК. Такое предположение начинает получать подтверждения. Показано, что МГЭ могут выполнять ряд полезных функций в геноме хозяйской клетки. МГЭ незаменимы при выполнении таких функций, как V(D)J-рекомбинация в клетках иммунной системы млекопитающих, в поддержании теломер у дрозофилы и в процессе репарации двунитевых разрывов ДНК у дрожжей (Kidwell, Lisch, 1997). Ряд исследований показал, что МГЭ участвуют в реакции на стрессовые воздействия (Strand, McDonald, 1985; Junakovic *et al*., 1986; Ратнер и др., 1992; Аникеева и др., 1994; Забанов и др., 1995; Ратнер, Васильева, 1996; Васильева и др., 1997, 2003, 2007; Шоханов и др., 1997; Handler, Gomez, 1997; Ратнер и др., 2001; Бубенщикова и др., 2002; Журавель, Борейко, 2002;Чересиз и др., 2008). Исходя из этого можно полагать, что МГЭ играют важную роль в геноме как контролирующие элементы.

Контролирующие мобильные элементы

Несмотря на то что многие геномы содержат большое число активных элементов, они остаются довольно стабильными, может быть, из-за того что в организмах с высокоактивными МГЭ, такими, как мышь и человек, ~ 10 % генома содержат белок-кодирующие и регуляторные последовательности (Initial sequencing and analysis …, 2001; Initial sequencing and comparative analysis … , 2002). Также только малая часть генома кукурузы приходится на кодирующие гены и регуляторные последовательности (San-Miguel *et al*., 1996). Хотя мобильные элементы постоянно внедряются в новые геномные сайты и мутации, вызванные их инсерциями, выявляются с частотами, сравнимыми с образованием точковых мутаций в большинстве организмов, за исключением дрозофилы, кукурузы и пшеницы. За исключением дрозофилы, активность мобильных элементов низка в малых геномах, в которых кодирующие гены составляют заметную его часть. В больших же по размеру геномах с более активными элементами только малая доля генома будет менее чувствительна к «повреждающим» инсерциям. Здесь следует подчеркнуть, что в обоих случаях клетка хозяина контролирует мобильность генетических элементов. Известно два таких механизма контроля: косупрессия, обычно опосредуемая малыми интерферирующими РНК (siRNA), и метилирование. При косупрессии подавляется экпрессия вновь встроенных трансгенов и их эндогенных гомологов.

Была показана транскрипционная и посттранскрипционная косупрессия *Ty1*-ретротранспозонов у *Saccharomyces cervisiae*, хотя механизмы этой косупрессии остаются неизвестными (Jiang, 2002; Garfinkel *et al*., 2003). Наблюдалась косупрессия I-фактора Drosophila не-LTR-ретротранспозоном, вероятно, по siRNA-механизму (Jensen *et al.,* 1999). Наиболее хорошо изучена регуляция активности *Tc1*-транспозона у *Caenorhabditis elegans* под действием siRNA (Sijen, Plasterk, 2003). *Tc-1*-транспозиция происходит только в соматических клетках и полностью супрессирована в половых клетках. У мутантов по супрессии отсутствует Tc1-siRNA, при этом снимаются ограничения на транспозицию в половом пути.

Метилирование мобильных элементов – другой механизм контроля, используемый природой (Bestor, 2003). У беспозвоночных животных повторенная ДНК, включающая многочисленные копии *LTR*-ретратранспозонов, в основном не метилирована, тогда как транскрипционно-активные гены метилированы (Simmen *et al*., 1999). У мыши, например, А-частицы (IAPs), являясь LTR-ретротранспозонами, при своей

инсерции в гены часто оказываются первопричиной болезни (Ostertag, Kazazian, 2001). Существует прямая корреляция между деметилированием IAPs мыши и увеличением уровня их экспрессии (Walsh *et al.*, 1998). Известно, что транспозоны млекопитающих гипометилированы в зародышевых клетках и на самых ранних стадиях развития, тогда они способны к транспозиции; и гиперметилированы в соматических клетках, где не происходит их экспрессии и мобилизации. В целом же роль метилирования в контроле транспозиции остается неясной.

Мобильные генетические элементы и дестабилизация генома

Некоторые МГЭ обладают способностью вызывать гибридный дисгенез. Это явление впервые было обнаружено в 1960-х гг. при скрещивании мух из природных популяций и лабораторных линий *Drosophila*. Гибридный дисгенез проявляется у потомства в виде повышенной частоты генных мутаций, хромосомных аббераций и нерасхождения хромосом, явления рекомбинации у самцов, а также стерильности гибридов (Kidwell *et al*., 1977; Kidwell, 1985). У *D. melanogaster* хорошо известны несколько систем, обусловливающих гибридный дисгенез: I-R, P-M, H-E (Bingham, 1982; Blackman *et al*., 1987; Yannopoulos *et al*., 1987; Bucheton, 1990). В системах P-M и I-R большое значение имеет направление скрещивания: только скрещивания типа: самцы I (inducer) с самками R (reactive) или самцы P (paternal) с самками M (maternal) вызывают дисгенез, а реципрокные скрещивания – нет. При H-E-гибридном дисгенезе возникает тот же комплекс специфических нарушений, что и в P-M-системе. Однако H-E дисгенез может проявляться не только в потомстве классического дисгенного скрещивания E-самки × H-самцы, но также в скрещиваниях между H-самцами и H-самками или H-самками и E-самцами (Blackman *et al*., 1987; Lim, 1988; Bazin, Higuet, 1996; Гришаева, Иващенко, 1997; O′Hare *et al*., 1998; Коваленко и др., 2006а).

Дисгенные скрещивания сразу же активируют транспозиции МГЭ, и уже через несколько поколений транспозиционная активность возвращается к нормальному низкому уровню. Однако в некоторых работах показано, что дисгеннные скрещивания могут вызывать процессы длительной дестабилизации генома. Данная нестабильность может сохраняться на протяжении многих поколений, и ее сопровождают хромосомные перестройки, аномальная рекомбинация, длительная транспозиционная активность МГЭ, соматические транспозиции.

Такая система нестабильности описана для МГЭ *Stalker*. После проведенных скрещиваний между относительно стабильной линией $y^2sc^1w^{aG}$ и ее производными с балансерной линией *FM4* в F_3–F_5 была получена неожиданно высокая частота инсерционного мутагенеза 2×10^{-3}, которая сохранялась в течение десятков поколений после инициирующих скрещиваний, причем мутации происходили в клетках разных типов и на разных стадиях развития (Georgiev *et al*., 1990).

Подобные результаты были получены и для МГЭ *hobo* – он проявлял высокую транспозиционную активность в $y^{2\text{-}717}$-производных после серии последовательных скрещиваний с балансерной линией C(I)DX,ywf/Y. Частота транспозиций *hobo* составила 1×10^{-2} и сохранялась в течение многих десятков поколений. Это сопровождалось увеличением числа копий *hobo*-элемента, возникновением инверсий, эктопическими рекомбинациями. Более того, в $y^{2\text{-}717}$-производных была снижена продолжительность жизни мух. Авторы связывают это с возрастанием числа сайтов *hobo* в X-хромосомах этих линий (Коваленко и др., 2006а). Предполагается, что различия в местах расположения и числе мобильных элементов могут коррелировать с жизнеспособностью (Гвоздев, Кайданов, 1986). Также считается, что при скоплении большого числа МГЭ одного семейства могут активизироваться процессы эктопической рекомбинации между этими МГЭ, расположенными в негомологичных участках хромосом, что может приводить к снижению жизнеспособности организмов с большим числом элементов одного семейства (Montgomery *et al*., 1987; Charlesworth *et al*., 1992).

Еще в одной работе была описана картина нестабильности, где в системе скрещиваний, активизировавших транспозиции *hobo* и *Stalker*, наблюдали большое количество мутаций по разным локусам. Анализ полученных мутантов показал, что многие из этих мутаций вызва-

ны перемещениями различных МГЭ (*hobo*, *Stalker*, *МДГ1*, *МДГ 2*, *МДГ3*, *МДГ4*, *copia*). Также в описываемой системе нестабильности показаны случаи аномальной рекомбинации, различные хромосомные перестройки, соматические транспозиции. Авторы считают, что существует общий механизм дестабилизации генома дрозофилы, вовлекающий процессы рекомбинаций и транспозиций МГЭ, и именно *hobo*-элементу может принадлежать решающая роль в запуске процесса дестабилизации (Буфф и др., 1992, 1993).

Транспозиции МГЭ в соматических клетках

Многочисленные исследования на дрозофиле показали, что мобильные элементы чаще перемещаются в половых клетках (Thompson *et al*., 1977; Engels, 1979; Bingham *et al*., 1982; McElwain, 1986). Большая часть этих работ была проведена с использованием генетических методов и моделей на линиях *Drosophila melanogaster* при P-M-гибридном дисгенезе. Молекулярными методами было подтверждено, что перемещения *P*-элемента в клетках соматических тканей заблокированы за счет особенностей сплайсинга: м-РНК *P*-элемента в клетках соматических тканей вовлекается в тканеспецифичный сплайсинг, в результате которого последний интрон (2–3) не удаляется из транскрипта и вместо активной транспозазы образуется неактивный пептид (Laski *et al*., 1986). Для *hobo*-элемента также предполагается тканеспецифичная регуляция продукции транспозазы, но на уровне транскрипции (Calvi, Gelbart, 1994).

Однако в ряде работ были описаны случаи перемещения ретротранспозонов в соматических клетках у высших организмов (Georgiev *et al.*, 1990; Kim, Belyaeva, 1991; Driver, McKechnie, 1992) и приведены единичные данные, косвенно свидетельствующие о соматической активности транспозонов (Lim, 1981; Yannopoulos *et al*., 1983; Geyz, van Schaik, 1991; Kovalenko *et al*., 2002; Belancio *et al*., 2010). Также был отмечен повреждающий эффект соматических перемещений *P*-элемента (Engels *et al*., 1987; Woodruff, 1992).

Прямые доказательства транспозиций в клетках соматических тканей были получены для *hobo* при изучении нестабильной мутаторной линии (МЛ) (Ким, Беляева, 1991). При *in situ* гибридизации в Х-хромосомах слюнных желез самцов *Drosophila melanogaster*, полученных от скрещивания самца мутаторной линии с самками со сцепленными Х-хромосомами, среди потомков одного самца авторами были обнаружены различия в характере распределения *hobo*-элементов как в слюнных железах самцов-братьев, так и клетках одной железы. Обнаруженное явление соматических транспозиций *hobo*, по мнению авторов, может быть специфичным для исследованной линии и вызвано нарушениями каких-либо регуляторных механизмов, запрещающих транспозиции МГЭ. В другой работе методом флуоресцентной *in situ* гибридизации показано перемещение *hobo*-элемента на политенных хромосомах клеток слюнных желез личинок линии $y^{2\text{-}846}$ *D. melanogaster* (Коваленко и др., 2006б). Частота *hobo*-транспозиций составила $3{,}5 \times 10^{-2}$ на сайт на Х-хромосому. При этом данная линия содержала полноразмерную копию *hobo*-элемента, но никогда не подвергалась дисгенным скрещиваниям. Для индукции перемещений *hobo*-элемента в данном случае достаточно наличия в геноме его полноразмерной копии.

Индукция транспозиций МГЭ стрессовыми факторами

Показано, что индуцировать массовые перемещения МГЭ могут различные факторы. Наиболее мощное влияние на индукцию транспозиций оказывают внутригеномные процессы: гибридный дисгенез, изогенизация, инбридинг, аутбридинг (Biemont *et al*., 1987, 1990; Pasyukova *et al*., 1988; Kaidanov *et al*., 1991; Di Franco *et al*., 1992; Guerreiro, Biemont, 1995; Ратнер, Васильева, 1996; Коваленко и др., 1996а). Есть данные, свидетельствующие о влиянии различных химических соединений, например этанола (Васильева и др., 2003) и физических факторов: низких и высоких температур (Strand, McDonald, 1985; Junakovic *et al*., 1986; Бубенщикова и др., 2002), гамма-радиации (Забанов и др., 1995; Шоханов и др., 1997; Handler, Gomez, 1997; Ратнер и др., 2001; Журавель, Борейко, 2002).

Влияние инбридинга, аутбридинга и особенно изогенизации линий на частоту транспози-

ций показано в ряде работ. Бьемонт с соавторами обнаружили «взрывы» транспозиций *copia*- и *P*-элемента в некоторых высоко инбредных линиях дрозофил (Biemont *et al*., 1987, 1990). Ди Франко с соавторами обнаружили избыточную гетерозиготность *copia*, *gypsy*, *jockey* и *I* в инбредных линиях, что объяснили индукцией транспозиций (Di Franco *et al*., 1992). Очень мощную индукцию транспозиций и эксцизий *Dm412* обнаружили при изогенизации по трем большим хромосомам дрозофилы. Скорость транспозиций *Dm412* составила 0,35, а эксцизий – 0,13 на сайт на гаплоидный геном на изогенизацию (Ратнер, Васильева, 1996). Также разными авторами было обнаружено индуцирующее влияние аутбридинга (Pasyukova *et al*., 1988; Kaidanov *et al*., 1991; Guerreiro, Biemont, 1995).

Очень мощная индукция транспозиций МГЭ может происходить в системах гибридного дисгенеза (Mackay, 1987; Васильева и др., 1997; Коваленко и др., 2006а). Скорость транспозиций при гибридном дисгенезе может достигать величин порядка 10^{-1} (Васильева и др., 1997).

Возможность воздействия температуры на транспозиции МГЭ исследовали в работе Strand и McDonald (1985). Авторами показана индукция транскрипции ретротранспозона *copia* тепловым шоком у дрозофилы. Н. Юнакович с соавторами продемонстрировали индукцию транспозиций и эксцизий ретротранспозонов *Dm412*, *297*, *B104*, *mdg1* и *copia* тепловым шоком (Junakovic *et al*., 1986). Е. Бубенщикова с соавторами исследовали влияние температурных воздействий в изогенной линии на индукцию транспозиций МГЭ *412*. Авторы продемонстрировали, что транспозиции индуцируют как тепловой, так и холодовой шок, причем влияние холодового шока гораздо более выражено. После теплового шока на стадии мейоза скорость транспозиций составляет 0,1 а после холодового – 0,5 событий на исходную копию МГЭ на спермий за сутки скрещиваний (Бубенщикова и др., 2002). В других работах этих авторов также показана индукция транспозиций различными вариантами теплового шока (Ратнер и др., 1992; Аникеева и др., 1994; Васильева и др., 1997; Vasilyeva *et al*., 1999).

При изучении влияния гамма-излучения на мобильность ретротранспозона *Dm412* демонстрируется индукция транспозиций с частотой, находящейся в зависимости от дозы облучения (линейная зависимость), а именно при дозах γ-облучения 300, 800, 1300 Р скорости индуцированных транспозиций оценены 4×10^{-3}, 1×10^{-2}, 2×10^{-2} событий на сайт на гаплоидный геном за поколение (Забанов и др., 1995). В другой работе этой группы исследовалась скорость γ-индуцированных транспозиций МГЭ *412* в изогенной линии в поколениях F_1, F_{12}, F_{140}, F_{170} после облучения дозой 1300 Р. В период F_1–F_{12} устанавливается максимальная скорость транспозиций – 2×10^{-2} событий на копию на гаплоидный геном за поколение. В поздних поколениях (F_{140}–F_{170}) устанавливается остаточный уровень индукции ~ 10^{-3} порядка величин. Авторы считают, что радиационное облучение запускает процесс нестабильности генома, который сохраняется длительное время. Сам механизм индукции транспозиций после воздействия радиацией они интерпретируют следующим образом: под действием радиации в ДНК происходит разрыв цепей и копии ретротранспозона *412* «залечивают» двухцепочечные разрывы ДНК, т. е. их индукция является ответом на разрывы ДНК (Ратнер и др., 2001). Также есть и другие работы, где показано, что увеличение уровня повреждений ДНК ведет к индукции репаративных процессов, а некоторые ретроэлементы способны сами участвовать в восстановлении разрывов ДНК (Moore, Haber, 1996; Tengs *et al*., 1996).

В работе С.О. Шоханова с соавторами также показано перемещение ретротранспозонов под воздействием радиации. Авторы исследовали частоту возникновения и спектр мутаций у *Drosophila melanogaster* при индуцированном мутагенезе. После воздействия радиацией на линию y^2w^{a4} был получен мутант с лимонными глазами. С помощью FISH на Х-хромосомах радиомутантов исследовали локализацию сайтов *copia* и *mdg1*. *copia* имел те же сайты, что и исходная необлученная линия, *mdg1* исходно имел 3 сайта локализации, у мутанта один из этих сайтов исчез, один появился (Шоханов и др., 1997).

Влияние γ-радиации на транспозоны мало изучено. Описана эксцизия транспозона *Tn10* в клетках *rec*-мутантных бактерий *Escherichia coli* (Журавель, Борейко, 2002). Показано влияние гамма-радиации на эксцизию *P*-элемента в пре-

бластодерме эмбрионов (Handler, Gomez, 1997). Обнаружено возможное воздействие радиации на появление новых вариантов делетированных *hobo*-последовательностей при 4-кратном воздействии излучением дозой 30 Гр на имаго *D. melanogaster* (Захаренко и др., 2006).

Представляет интерес изучение вопроса взаимодействия радиации и гибридного дисгенеза. В работе J. Margulies с соавт. (1987, 1989) показан синергетический эффект между активностью *P*-элемента и γ-облучением. При совместном действии этих двух факторов наблюдались более сильное проявление стерильности гибридов и хромосомных потерь, а также возникновение рецессивных сцепленных с полом и доминантных летальных мутаций, чем каждого фактора по отдельности. Н.И. Иващенко с соавторами следили за влиянием γ-облучения на чувствительность половых клеток дрозофилы на премейотической стадии в системе дисгенного скрещивания (Иващенко и др., 1990). Было показано, что облучение мух дозой 150 Р до момента дисгенного скрещивания приводило к достоверному увеличению в F_2 частоты доминантных леталей на стадии яиц, личинок и куколок и к возрастанию доли неоплодотворенных яиц, а после скрещивания – к значительному снижению отрицательных последствий комбинированного действия этих факторов. Авторы объясняют это тем, что, возможно, повреждения, вызываемые MR-фактором и радиацией, могут взаимодействовать на уровне репарации ДНК, и поэтому после дисгенного скрещивания могли активизироваться ферменты репарации, что при последующем облучении могло обеспечить «залечивание» многих хромосомных нарушений и способствовать увеличению фертильности особей.

В работе Н.И. Иващенко и Т.М. Гришаевой (2002) оценивались частоты возникновения доминантных летальных мутаций и хромосомных перестроек, изменения частоты кроссинговера и уровни смертности на стадиях личинок и куколок под влиянием двух факторов – радиации и дисгенного скрещивания. Облучение дозой 0,15 сГр вызывало достоверное увеличение частот доминантных летальных мутаций и гибели на стадиях личинки и куколки в F_2, если после облучения следовало H-E-дисгенное скрещивание. Облучение вызывает различные повреждения хромосом – более грубые (нерепарабильные) и потенциальные, которые, по-видимому, могут реализовываться в последующих поколениях. Возможно, что транспозиция *hobo* после облучения значительно увеличивает эффективность мутационного процесса, способствуя не только увеличению частот доминантных летальных мутаций, но и ускорению реализации потенциальных изменений. В то же время наблюдалось достоверное уменьшение (в 3 раза) на стадиях личинки и куколки в F_2, если применяли облучение в момент или сразу после скрещивания типа H-E. Только облучение дозой 0,15 сГр одной из контрольных линий оказалось неэффективным. Само по себе дисгенное скрещивание вызывает достоверное увеличение частот доминантных леталей и гибели личинок и куколок.

Можно выделить несколько наиболее значимых последствий активации мобильных генетических элементов в ответ на облучение. К ним прежде всего относится многократное увеличение количества повреждений ДНК. В то время как непосредственное повреждение ДНК немедленно репарируется или фиксируется в качестве стабильной мутации, мобильные элементы формируют циклы инсерций и эксцизий долгое время после активации, что может быть причиной возникновения генетической нестабильности (Шапошников, 2002).

Таким образом, очевидно, что МГЭ участвуют в индукции и поддержании процессов нестабильности генома, причем на разных уровнях как генеративных, так и соматических клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-00872-а и программой Президиума РАН «Биоразнообразие» Б 23.29.

Литература

Аникеева Н.В., Забанов С.А., Васильева Л.А., Ратнер В.А. Влияние теплового шока на транспозиции МГЭ *Dm412* в трех изогенных линиях *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1994. Т. 30. № 2. С. 212–217.

Бубенщикова Е.В., Антоненко О.В., Васильева Л.А., Ратнер В.А. Индукция транспозиций МГЭ *412* раздельно тепловым и холодовым шоком в сперматогенезе у самцов дрозофилы // Генетика. 2002. Т. 38. № 1. С. 46–55.

Буфф Е.М., Петрук С.Ф., Герасимова Т.И. Множественная нестабильность в системе взаимодействия мобильных элементов *hobo* и *Сталкер* у *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1993. Т. 29. № 11. С. 1784–1792.

Буфф Е.М., Симонова О.Б., Петрук С.Ф., Герасимова Т.И. Участие мобильного элемента *hobo* в транспозиционных событиях в системе продленной нестабильности у *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1992. Т. 28. № 12. С. 73–79.

Васильева Л.А., Выхристюк О.В., Антоненко О.В., Захаров И.К. Индукция транспозиций мобильных генетических элементов (МГЭ) в геноме различными стрессовыми факторами // Информ. вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 3/4. С. 662–671.

Васильева Л.А., Ратнер В.А., Антоненко О.В. и др. Индукция транспозиций МГЭ *412* различными дозами паров этанола в изогенной линии *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2003. Т. 39. № 5. С. 717–720.

Васильева Л.А., Ратнер В.А., Бубенщикова Е.В. Стрессовая индукция транспозиций ретротранспозонов дрозофилы: реальность явления, характерные особенности и возможная роль в быстрой эволюции // Генетика. 1997. Т. 33. № 8. С. 1083–1093.

Гвоздев В.А. Подвижная ДНК эукариот. Часть 2. Роль в регуляции активности генов и эволюции генома // Сорос. образоват. журнал. 1998. № 8. С. 15–21.

Гвоздев В.А., Кайданов Л.З. Геномная изменчивость, обусловленная транспозициями мобильных элементов, и приспособленность особей *Drosophila melanogaster* // Журн. общ. биологии. 1986. Т. 47. № 1. С. 51–63.

Гришаева Т.М., Иващенко Н.И. Проблемы структурно-функционального взаимодействия в системах гибридного дисгенеза // Усп. соврем. биологии. 1997. Т. 117. Вып. 1. С. 52–67.

Евгеньев М.Б. Мобильные элементы и эволюция генома // Молекуляр. биология. 2007. Т. 41. № 2. С. 234–245.

Журавель Д.В., Борейко А.В. Закономерности эксцизии транспозона *Th 10* в клетках rec-мутантов *E. coli* при γ-облучении // Радиац. биология. Радиоэкология. 2002. Т. 42. № 6. С. 636–638.

Забанов С.А., Васильева Л.А., Ратнер В.А. Индукция транспозиций МГЭ *412* при помощи γ-облучения в изогенной линии *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1995. Т. 31. № 6. С. 798–803.

Захаренко Л.П., Коваленко Л.В., Перепелкина М.П., Захаров И.К. Влияние γ-радиации на индукцию транспозиций *hobo*-элемента у *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2006. Т. 42. № 6. С. 763–767.

Иващенко Н.И., Гришаева Т.М. Особенности индуцированного мутагенеза в системах гибридного дисгенеза у *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2002. Т. 38. № 10. С. 1351–1356.

Иващенко Н.И., Гришаева Т.М., Богданов Ю.Ф. Влияние γ-облучения на гониальные клетки *Drosophila melanogaster* в разных условиях гибридного дисгенеза // Генетика. 1990. Т. 26. № 11. С. 1969–1979.

Ким А.И., Беляева Е.С. Прямая демонстрация транспозиций мобильного элемента *МДГ4* в половых и соматических клетках нестабильной мутаторной линии *Drosophila melanogaster* // Докл. АН СССР. 1991. Т. 314. № 4. С. 965–968.

Коваленко Л.В., Захаренко Л.П., Волошина М.А. и др. Поведение транспозонов *hobo* и *P* в нестабильной линии $yellow^{2\text{-}717}$ *Drosophila melanogaster* и ее производных после скрещиваний с лабораторной линией // Генетика. 2006а. Т. 42. № 6. С. 748–756.

Коваленко Л.В., Захаренко Л.П., Захаров И.К. Транспозиции *hobo*-элемента в соматических клетках *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2006б. Т. 42. № 2. С. 177–184.

Ратнер В.А., Бубенщикова Е.В., Васильева Л.А. Пролонгация индукции транспозиций МГЭ *412* после γ-облучения в изогенной линии *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2001. Т. 37. № 4. С. 485–493.

Ратнер В.А., Васильева Л.А. Индукция транспозиций и эксцизий мобильных генетических элементов у дрозофилы в процессе изогенизации // Генетика. 1996. Т. 32. № 7. С. 933–944.

Ратнер В.А., Забанов С.А., Колесникова О.В., Васильева Л.А. Анализ множественных транспозиций МГЭ *Dm412*, индуцированных тяжелым тепловым шоком, у дрозофилы // Генетика. 1992. Т. 28. № 3. С. 68–86.

Хесин Р.Б. Непостоянство генома. М.: Наука, 1984. 472 с.

Чересиз С.В., Юрченко Н.Н., Иванников А.В., Захаров И.К. Мобильные элементы и стресс // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 1/2. С. 217–242.

Шапошников М. Роль мобильных элементов генома в формировании клеточного ответа на облучение // 2002. (http://ib.komisc.ru/add/old/t/ru/ir/vt/02-55/04.html).

Шоханов С.О., Щербата Г.Р., Черник Я.И. Геномная изменчивость лабораторных линий и природных популяций *Drosophila melanogaster* при действии рентгеновского излучения // Генетика. 1997. Т. 33. № 1. С. 25–30.

Alonso-Gonzales L., Dominguez A., Alboronos J. Structural heterogeneity and genomic distribution

of *Drosophila melanogaster* LTR retrotransposons // Mol. Biol. Evol. 2003. V. 20. P. 401–409.

Bazin C., Higuet D. Lack of correlation between dysgenic traits in *hobo* system of hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster* // Genet. Res. 1996. V. 67. P. 219–226.

Belancio V.P., Roy-Engel A.M., Pochampally R.R., Deininger P. Somatic expression of *LINE-1* elements in human tissues // Nucl. Acids Res. 2010. V. 38. N 12. P. 3909–3922.

Bestor T.H. Cytosine methylation mediates sexual conflict // Trends Genet. 2003. V. 19. P. 185–190.

Biemont C., Aouar A., Arnault C. Genome reshuffling of the *copia* element in an inbred line of *Drosophila melanogaster* // Nature. 1987. V. 329. N 6141. P. 742–744.

Biemont C., Arnault C., Heizmann A. Massive changes in genomic locations of *P* elements in an inbred line of *Drosophila melanogaster* // Naturwissenschaften. 1990. V. 77. N 10. P. 485–488.

Bingham P.M., Kidwell M.G., Rubin G.M. The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: the role of the *P*-element, a P-strain-specific transposon family // Cell. 1982. V. 29. P. 995–1004.

Blackman R.K., Grimaila R., Koehler M.M., Gelbart W.M. Mobilization of *hobo* elements residing within the decapentaplegic gene complex: suggestion of a new hybrid dysgenesis system in *Drosophila melanogaster* // Cell. 1987. V. 49. N 4. P. 497–505.

Bucheton A. *I* transposable element and I–R hybrid dysgenesis in *Drosophila* // Trends Genet. 1990. V. 6. N 1. P. 16–21.

Calvi B.R., Gelbart W.M. The basis for germline specificity of the *hobo* transposable element in *Drosophila melanogaster* // EMBO J. 1994. V. 13. P. 1636–1644.

Charlesworth B., Lapid A., Canada D. The distribution of transposable elements within and between chromosomes in a population of *Drosophila melanogaster*. II. Inferences on the nature of selection against elements // Genet. Res. 1992. V. 60. P. 115–130.

Di Franco C., Galuppi D., Junakovic N. Genomic distribution of transposable elements among individuals of an inbred *Drosophila* line // Genetica. 1992. V. 86. N 1/3. P. 1–11.

Driver C.J., McKechnie S.W. Transposable elements as a factor in the aging of *Drosophila melanogaster* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1992. V. 673. P. 83–91.

Engels W.R. Extra-chromosomal control of mutability in *Drosophila melanogaster* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 4011–4015.

Engels W.R., Benz W.K., Preston C.R. *et al*. Somatic effects of *P* element activity in *Drosophila melanogaster*: pupal lethality // Genetics. 1987. V. 117. P. 745–757.

Fedoroff N. Maize transposable elements // Mobile Elements / Eds D. Berg, M. Howe. American Society of Microbiology. Washington, D.C. 1989. P. 371–411.

Finnegan D.J., Rubin G.M., Young M.W., Hogness D.S. Repeated gene families in *Drosophila melanogaster* // Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol. 1978. V. 42. Pt 2. P. 1053–1063.

Garfinkel D.J., Nyswaner K., Wang J., Cho J.-Y. Post-transcriptional cosuppression of *Ty1* retrotransposition // Genetics. 2003. V. 165. P. 83–99.

Georgiev G.P. Mobile genetic elements in animal cells and their biological significance // Eur. J. Biochem. 1984. V. 145. P. 203–220.

Georgiev P.G., Kiselev S.L., Simonova O.B., Gerasimova T.I. A novel transposition system in *Drosophila melanogaster* depending on the *Stalker* mobile genetic element // EMBO J. 1990. V. 9. P. 2037–2044.

Geyz C., van Schaik N. Somatic mutation in the wings of *Drosophila melanogaster* females dysgenic due to *P*-elements when reared at 29 °C // Mutat. Res. 1991. V. 248. P. 187–194.

Green M.M. A case for DNA insertion mutants in *Drosophila melanogaster* // DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes / Eds A.I. Bukhari, J.A. Shapiro, S.L. Adhya. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1977. P. 437–445.

Guerreiro M.P.A., Biemont C. Changes in the chromosomal insertion pattern of the *copia* element during the process of making chromosomes homozygous in *Drosophila melanogaster* // Mol. Gen. Genet. 1995. V. 246. P. 206–211.

Handler A.M., Gomez S.P. *P* element excision in *Drosophila* is stimulated by gamma-irradiation in transient embryonic assays // Genet. Res. 1997. V. 70. N 1. P. 75–78.

Ilyin Y.V., Tchurikov N.A., Ananiev E.V. *et al.* Studies on the DNA fragments of mammals and Drosophila containing structural genes and adjacent sequences // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1978. V. 42. Pt 2. P. 959–969.

Initial sequencing and analysis of the human genome and International Human Genome Sequencing Consortium // Nature. 2001. V. 409. P. 860–921.

Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome and Mouse Genome Sequencing Consortium // Nature. 2002. V. 420. P. 520–562.

Jensen S., Gassama M.-P., Heidmann T. Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing // Nat. Genet. 1999. V. 21. P. 209–212.

Jiang Y.W. Transcriptional cosuppression of yeast *Ty1* retrotransposons // Genes Developm. 2002. V. 16. P. 467–478.

Junakovic N., di Franco C., Barsanti P., Palumbo G. Transpositions of *copia*-like elements can be in-

duced by heat shock // J. Mol. Evol. 1986. V. 24. P. 89–93.

Kaidanov L.Z., Bolshakov V.N., Tzygvintzev P.N., Gvozdev V.A. The sources of genetic variability in highly inbred long-term selected strains of *Drosophila melanogaster* // Genetica. 1991. V. 85. N 1. P. 73–78.

Kazazian H.H. Mobile elements: drivers of genome evolution // Science. 2004. V. 303. P. 1626–1632.

Kidwell M.G. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: Nature and inheritance of *P* element regulation // Genetics. 1985. V. 111. P. 337–350.

Kidwell M.G., Kidwell J.F., Sved J.A. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: a syndrome of aberrant traits including mutation, sterility and male recombination // Genetics. 1977. V. 86. P. 813–833.

Kidwell M.G., Lisch D. Transposable elements as sources of variation in animals and plants // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. N 15. P. 7704–7711.

Kidwell M.G., Lisch D.R. Transposable elements as sources of genomic variation // Mobile DNA II. 2002. P. 59–93.

Kim A.I., Belyaeva E.S. Transpositions of mobile elements *gypsy* (*mdg4*) and *hobo* in germ-line and somatic cells of genetically unstable mutator strain of *Drosophila melanogaster* // Mol. Gen. Genet. 1991. V. 229. P. 437–444.

Kovalenko L.V., Zakharenko L.P., Zakharov I.K. Possible influence of *hobo* mobile element on the frequency of somatic mutations in the wing cells of *Drosophila melanogaster* // Drosophila Inform. Serv. 2002. N 85. P. 72–75.

Laski F.A., Rio D.C., Rubin G.M. Tissue specificity of *Drosophila P* element transposition is regulated at the level of mRNA splicing // Cell. 1986. V. 44. N 1. P. 7–19.

Lim J.K. Intrachromosomal rearrangements mediated by *hobo* transposons in *Drosophila melanogaster* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. N 23. P. 9153–9157.

Lim J.K. Site-specific intrachromosomal rearrangements in *Drosophila melanogaster*: cytogenetic evidence for transposable elements // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1981. V. 45. P. 553–560.

Mackay T. Transposable element-induced polygenic mutations in *Drosophila melanogaster* // Genet. Res. 1987. V. 49. P. 225.

Margulies L., Briscoe D.I., Wallace S.S. The relationship between radiation-induced and transposon-induced genetic damage during *Drosophila* spermatogenesis // Mutat. Res. 1987. V. 179. N 2. P. 183–195.

Margulies L., Griffith C.S., Dooley J.C., Wallace S.S. The interaction between X-rays and transposon mobility in *Drosophila*: hybrid sterility and chromosome loss // Mutat. Res. 1989. V. 215. N 1. P. 1–14.

McClintock B. Controlling elements and the gene // Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. 1956. V. 21. 197 p.

McElwain M.C. The absence of somatic effects of P-M hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1986. V. 113. P. 897–918.

Mobile DNA / Eds D.E. Berg, M.M. Howe. American Society for Microbiology, Washington, DC. 1989.

Mobile DNA II / Eds N.L. Craig, R. Craigie, R. Gellert, A.M. Lambowitz. American Society for Microbiology, Washington, DC. 2002.

Montgomery E., Charlesworth B., Langley C.H. A test for the role of natural selection in the stabilization of transposable element copy number in a population of *Drosophila melanogaster* // Genet. Res. 1987. V. 49. P. 31–41.

Moore J.K., Haber J.E. Capture of retrotransposon DNA at the sites of chromosomal double-strand breaks // Nature. 1996. V. 383. N 6601. P. 644–646.

O'Hare K., Tam J.L., Lim J.K. *et al*. Rearrangements at *hobo* element inserted into the first intron of the singed gene in the unstable sn^{49} system of *Drosophila melanogaster* // Mol. Gen. Genet. 1998. V. 257. N 4. P. 452–460.

Ostertag E.M., Kazazian H.H. Genome reserch twin priming: a proposed mechanism for the creation of inversions in *L1* retrotransposition // Genome Res. 2001. V. 11. P. 2059–2065.

Pasyukova E.G., Belyaeva E.S., Ilyinskaya L.E., Gvozdev V.A. Outcross-dependent transpositions of *copia*-like mobile genetic elements in chromosomes of an inbred *Drosophila melanogaster* stock // Mol. Gen. Genet. 1988. V. 212. P. 281–286.

SanMiguel P., Tikhonov A., Jin Y.K. *et al*. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome // Science. 1996. V. 274. P. 765–768.

Sijen T., Plasterk R.H.A. Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi // Nature. 2003. V. 426. P. 310–314.

Simmen M.W., Leitgeb S., Charlton J. *et al*. Nonmethylated transposable elements and methylated genes in a chordate genome // Science. 1999. V. 283. P. 1164–1167.

Spradling A.C., Stem D., Beaton A. *et al*. The Berkeley Drosophila Genome Project gene disruption project: single P-element insertions mutating 25 % of vital Drosophila genes // Genetics. 1999. V. 153. P. 135–177.

Strand D.J., McDonald J.F. *copia* is transcriptionally responsive to environtmental stress // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. P. 4401–4410.

Tengs S.-C., Kim B., Gabriel A. Retrotransposon reverse-transcriptase-mediated repair of chromosomal breaks // Nature. 1996. V. 383. N 6601. P. 641–644.

Thompson J.N., Woodruff R.C., Schaefer G.B. An apparent lack of somatic chromosome breakage in male

recombination lines of *Drosophila melanogaster* // Genetics (Suppl). 1977. V. 86. P. 64–65.

Vasilyeva L.A., Bubenshchikova E.V., Ratner V.A. Heavy heat shock induced retrotransposon transpositions in drosophila // Genet. Res. 1999. V. 74. N 2. P. 111–119.

Walsh C.P., Chaillet J.R., Bestor T.H. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation // Nat. Genet. 1998. V. 20. P. 116–117.

Woodruff R.C. Transposable DNA elements and life history traits. I. Transposition of *P* DNA elements in somatic cells reduces the lifespan of *Drosophila melanogaster* // Genetica. 1992. V. 86. P. 143–154.

Yannopoulos G., Stamatis N., Monastirioti M. *et al*. *hobo* is responsible for the induction of hybrid dysgenesis by strains of *Drosophila melanogaster* bearing the male recombination factor 23.5 MRF // Cell. 1987. V. 49. P. 487–495.

Yannopoulos G., Stamatis N., Zacharopoulou A., Pelecanos M. Site-specific breaks induced by the male recombination factor 23.5 MRF in *Drosophila melanogaster* // Mutat. Res. 1983. V. 108. P. 185–202.

TRANSPOSABLE ELEMENTS: INSTABILITY OF GENES AND GENOMES

N.N. Yurchenko[1], L.V. Kovalenko[1], I.K. Zakharov[1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: yurchen@bionet.nsc.ru; zakharov@bionet.nsc.ru;
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

The role of transposable elements as controlling factors and genome destabilization in germ and somatic cells are considered. The ability of various stress factors, both intragenomic (hybrid dysgenesis, inbreeding, and outbreeding) and environmental (heat and ionizing radiation) to induce transposable element transposition is analyzed.

Key words: genome instability, transposable elements, transposition, *Drosophila melanogaster*.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ИНТЕГРАЗЫ РЕТРОТРАНСПОЗОНА *GYPSY DROSOPHILA MELANOGASTER IN VITRO*

М.М. Маннанова, Л.Н. Нефедова, А.И. Ким

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра генетики, Москва, Россия, e-mail: aikim@mail.ru

Встраивание ретротранспозона *gypsy* в геном *Drosophila melanogaster* происходит специфично и осуществляется интеразой этого мобильного элемента. Интеграза *gypsy* способна не только встраивать, но и точно вырезать ДНК ретротранспозона из сайта-мишени. В настоящей работе изучена эндонуклеазная активность рекомбинантной интегразы *gypsy in vitro*. Показано, что фермент гидролизует субстрат с образованием однонитевых и двунитевых разрывов. Большое влияние на гидролиз оказывает конформация субстрата: интеграза производит двунитевые разрывы только в суперскрученных кольцевых молекулах ДНК. Полученные данные позволяют понять механизм интеграции ретровирусов и транспозиции мобильных элементов.

Ключевые слова: интеграза, ретротранспозоны, *gypsy*, ДКП.

У ретровирусов и ретротранспозонов, содержащих длинные концевые повторы (ДКП-ретротранспозонов), интеграза является ключевым компонентом ферментного комплекса, обеспечивающим встраивание в хромосому хозяина ДНК-копии, считываемой с РНК (Goff, 1992). Механизм интеграции обусловлен распознаванием и сайт-специфическим связыванием вирусной ДНК (субстрата) и хромосомной ДНК (ДНК-мишени).

Известно, что на распознавание ДНК-мишени и связывание с ней интегразы помимо нуклеотидного состава мишени влияют ее конформация (Kitamura *et al*., 1992; Muller *et al*., 1994; Pruss *et al*., 1994; Katz *et al*., 1998; Глухов и др., 2000), нуклеосомная организация (Pryciak *et al*., 1992), а также клеточные белки (Engelman *et al*., 2008). Однако точный механизм сайт-специфической интеграции ретровирусов до конца не изучен. Удобной моделью для исследования этого механизма может служить интеграза хорошо изученного ДКП-ретротранспозона *gypsy*, который является уникальным ретровирусом *Drosophila melanogaster* (Kim *et al*., 1994; Song *et al*., 1994).

Известно, что мишенями *gypsy y D. melanogaster* служат специфические палиндромные последовательности ATRYAT (Y-пиримидин, R-пурин), при этом во время встраивания происходит удвоение 4 нуклеотидов (подчеркнуты) (Nefedova *et al*., 2011).

Подтверждением сайт-специфической активности интегразы *gypsy* служит точная эксцизия этого ретротранспозона из генома хозяина с полным восстановлением исходной нуклеотидной последовательности (Kuzin *et al*., 1994). В экспериментах *in vivo* на модельной биплазмидной системе в клетках *E. coli* было показано, что интеграза *gypsy* способна вырезать из векторной конструкции один ДКП *gypsy*, окруженный последовательностями мишени TATA (Нефедова и др., 2006). Однако механизм распознавания интегразой дуплицированных сайтов-мишеней и последующей эксцизии ДНК-копии ретровируса из генома хозяина остается неясным.

Целью настоящей работы было изучение сайт-специфической активности рекомбинантной интегразы *gypsy D. melanogaster in vitro*.

Материалы и методы

Конструирование плазмиды, кодирующей интегразу *gypsy*

Для амплификации фрагмента, кодирующего полноразмерную интегразу *gypsy* (IN), методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали праймеры 5′-ATCCATGGCAAGCTTCCAACA-3′ и 5′-AGGATCCTTGAGGTTGTCCTT-3′ (Евроген). Матрицей служила конструкция pUCgypsy, содержащая полноразмерную функционально активную копию *gypsy* (Глухов и др., 2000). Для реакции использовали смесь High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas). ПЦР проводили в амплификаторе Amply4 (Biokom) в течение 25 циклов по схеме: денатурация 95 ºС – 30 с, отжиг праймеров 55 ºС – 1 мин, синтез 72 ºС – 2 мин. Полученный фрагмент клонировали в векторе pET30 (Novagen) по сайтам *Bam*HI и *Nco*I. В результате была получена плазмида pET30int, содержащая под промотором фага T7 открытую рамку трансляции, кодирующую рекомбинантную интегразу *gypsy*.

Экспрессия и выделение рекомбинантной интегразы *gypsy*

Плазмидой pET30int трансформировали клетки *Escherichia coli* Rosetta (Novagen) и выращивали культуру в 500 мл среды LB, содержащей 30 мкг/мл канамицина и 10 мкг/мл хлорамфеникола, при 37 °С до оптической плотности OD600 = 0,5–1,0. Экспрессию индуцировали добавлением IPTG в конечной концентрации 1 mM с последующим культивированием в течение 3 ч при 37 °С или в течение ночи при 24 °С. Все дальнейшие процедуры выделения рекомбинантного белка проводили при 4 °С. Осадки клеток суспендировали в буфере для лизиса (50 mM NaH_2PO_4 pH8, 300 mM NaCl, 10 mM имидазол) и разрушали ультразвуком на дезинтеграторе (Cole-Parmer 4710 Series). Супернатанты очищали на хроматографических колонках, заряженных Ni-агарозой (Qiagen). Рекомбинантные белки смывали с колонок буфером для элюции (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl, 1 M имидазол) и анализировали в 12 %-м SDS-ПААГ. Концентрация белков составляла 200–400 мкг/мл. Белки концентрировали на колонках Microcon green top-YM-10 (Millipore) и хранили при 4 °С.

Эндонуклеазная реакция

В качестве субстрата для изучения эндонуклеазной активности интегразы использовали конструкцию pBSLTR (Нефедова и др., 2006), полученную на основе вектора pBluescript II KS(+) и содержащую ДКП *gypsy*, фланкированный сайтами TATA. Плазмиду использовали как в кольцевой, так и линеаризованной по сайту рестрикции *Sca*I форме. Контролем служил полноразмерный вектор pBluescript II KS(+), а также два его фрагмента в линейной и кольцевой формах. Фрагменты были получены путем линеаризации вектора pBluescript II KS(+) по сайтам *Sca*I и *Sma*I с последующим восстановлением кольцевой структуры каждого фрагмента при помощи T4 ДНК-лигазы.

Для проведения эндонуклеазной реакции готовили реакционную смесь (20 мкл), содержащую рекомбинантную интегразу в конечной концентрации 50 мкг/мл, ДНК-субстрат в концентрации 5 нг/мкл в буфере 10 мМ Трис-HCl pH 7,5, 10 мМ $MgCl_2$ и 0,1 мг/мл БСА. Реакционную смесь инкубировали 1,5 ч при 30 ºС. ДНК-продукты разделяли при помощи электрофореза в 1 %-м агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,01 %) и анализировали в ультрафиолете.

Анализ продуктов активности рекомбинантной интегразы

Для анализа продуктов эндонуклеазной реакции проводили амплификацию ДКП (праймеры P1: 5′-GGATCCTATAAGTTAACA ACTAACA-3′, и P2: 5′-CGGCCGTATAAATTA TATAAGTTCC-3′, где подчеркнута последовательность дупликации сайта-мишени) и фрагмента 1000 п.н., содержащего ДКП (праймеры P3: 5′-TTCAGGCTGCGCAACTGTTG-3′ и P4: 5′-CCAATACGCAAACCGCCTCT-3′). ПЦР проводили в амплификаторе Amply4 (Biokom) в течение 30 циклов по схеме: денатурация 95 ºС 30 с, отжиг праймеров 55 ºС 1 мин, синтез 72 ºС 2 мин. В качестве матрицы использовали ДНК-продукты реакции с интегразой, разделенные в

агарозном геле и элюированные методом многократного замораживания и размораживания.

Результаты и обсуждение

Получение рекомбинантной интегразы *gypsy*

На основе экспрессионного вектора pET30 была получена рекомбинантная плазмида pET30int, содержащая фрагмент, кодирующий полноразмерную интегразу *gypsy*. В результате очистки клеточного лизата *E. coli* после индукции IPTG была выделена рекомбинантная интеграза с молекулярной массой ~45 кДа (рис. 1). Белок был получен в растворимой форме в нативных условиях, что приближено к условиям *in vivo*.

Эндонуклеазная активность интегразы *gypsy*

Для изучения сайт-специфической активности рекомбинантной интегразы в качестве субстрата использовали конструкцию pBSLTR, полученную на основе вектора pBluescript II KS(+) и содержащую один ДКП *gypsy*, фланкированный сайтами TATA (Нефедова и др., 2006).

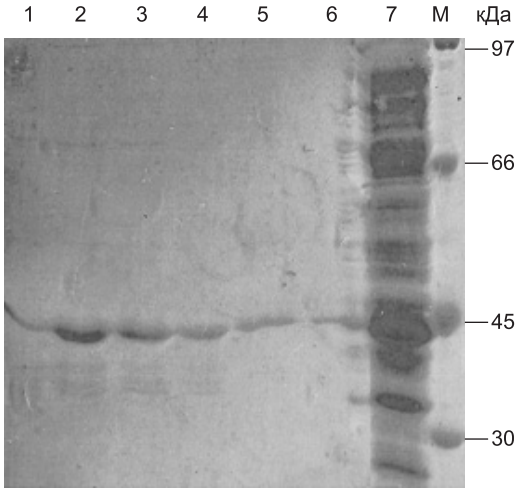


Рис. 1. Электрофоретический анализ рекомбинантной интегразы *gypsy*.

1–6 – фракции белка, полученные в результате аффинной хроматографии на колонке с Ni после элюции имидазолом; 7 – неочищенный лизат из клеток *E. coli*, содержащих рекомбинантную интегразу *gypsy*; M – белки-маркеры.

Данная конструкция имитирует фрагмент *gypsy* в виде ДКП, встроенный в сайт интеграции. В качестве контроля использовали вектор pBluescript II KS(+), не несущий вставки ДКП. Были подобраны оптимальные условия для специфической эндонуклеазной активности интегразы: время реакции и температура, соотношение концентрации фермента и ДНК-мишени, присутствие кофакторов (ионов металлов).

В результате анализа продуктов реакции в агарозном геле было показано, что интеграза изменяет конформацию обеих кольцевых молекул ДНК (рис. 2). Переход от суперскрученной формы плазмиды к релаксированной, по-видимому, обусловлен однонитевыми разрывами (никами), вносимыми интегразой. Интеграза также производила двунитевые разрывы в плазмиде pBSLTR.

Никирование интегразой плазмиды Bluescript II KS(+), не несущей ДКП с TATA-сайтами, свидетельствует о том, что фермент распознает другую мишень, которая должна

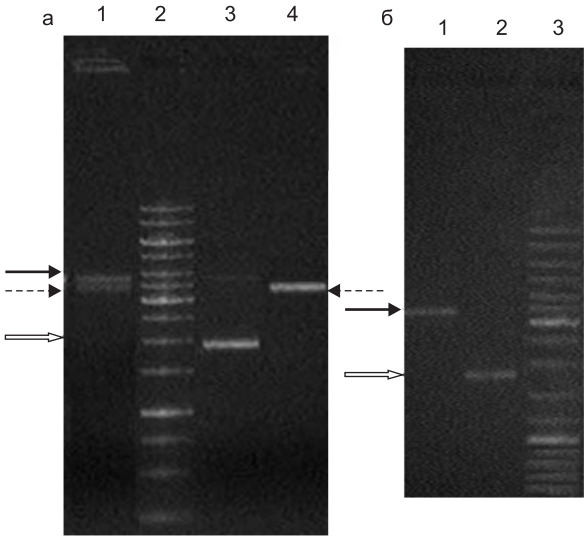


Рис. 2. Электрофоретический анализ продуктов эндонуклеазной активности интегразы с pBSLTR.

а: 1 – плазмида после реакции с интегразой; 2 – ДНК-маркер GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); 3 – плазмида, инкубированная с реакционной смесью без интегразы (контроль); 4 – плазмида, линеаризованная по сайту *Sca*I; и pBluescript II KS(+). б: 1 – плазмида после инкубирования с интегразой; 2 – плазмида, инкубированная с реакционной смесью без интегразы (контроль); 3 – ДНК-маркер GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). Черной стрелкой указана кольцевая релаксированная форма плазмиды, белой – суперскрученная, пунктирной – линейная форма плазмиды.

присутствовать в обеих плазмидах. Такими сайтами-мишенями могут быть последовательности ATATAT и ATACAT, которые присутствуют в векторе и в ДКП (рис. 3).

Для того чтобы выяснить, по каким сайтам происходит гидролиз ДНК, обе плазмиды были линеаризованы по уникальному сайту рестрикции *Sca*I (рис. 3).

Предполагалось, что в результате эндонуклеазной реакции линейная ДНК будет расщепляться на один или несколько фрагментов, по размеру которых можно определить расположение сайта-мишени. Однако интеграза не разрезала ни одну из линейных молекул. Это можно объяснить влиянием конформации ДНК на активность интегразы. Ковалентно замкнутые плазмиды находятся в сверхспирализованном состоянии, при котором общее число витков спирали топологически фиксировано, в то время как в линейной молекуле ДНК обе цепи свободно вращаются одна вокруг другой. Вероятно, в данном случае гидролиз ДНК происходит с образованием только одноцепочечных разрывов. Такие формы ДНК на электрофореграмме неотличимы от интактных. Подтверждением в пользу вышеперечисленных доводов служит тот факт, что после замыкания в кольцо при помощи T4 ДНК-лигазы (Fermentas) плазмид, разрезанных по сайту *Sca*I, рекомбинантная интеграза снова могла их гидролизовать с образованием линейной формы.

В случае с кольцевыми молекулами ДНК, тем не менее, не наблюдалось вырезания интегразой ДКП из плазмиды pBSLTR и гена устойчивости к ампициллину из плазмиды pBluescript II KS(+). Вероятно, гидролиз одновременно двух сайтов-мишеней с образованием двуцепочечных разрывов происходит с более низкой частотой, чем гидролиз одного из сайтов. Это может быть связано с особенностью интегразы *gypsy*, а именно со способностью функционировать в мультимерной форме. Двунитевой ступенчатый разрыв должен производиться двумя молекулами интегразы, которые собираются в димер благодаря конформации ДНК мишени. Это объясняет разрезание плазмид только в одном из сайтов: при внесении даже одного разрыва в кольцевую молекулу ДНК сверхспирализация снимается и на этой ДНК новые димеры интегразы образовываться уже не могут. Комплексы ДНК+IN-мономер и ДНК+IN-димер

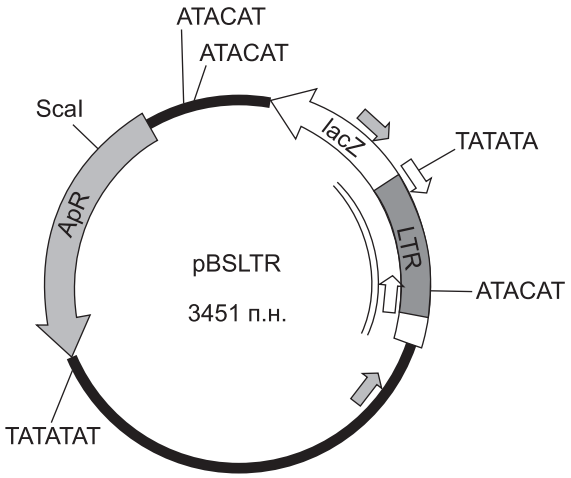


Рис. 3. Схема плазмиды pBSLTR с обозначением сайтов-мишеней.

Прямыми стрелками обозначены праймеры: белыми – P1 и P2, серыми – P3 и P4. Двойной линией отмечена область, вырезаемая интегразой (данные секвенирования).

достаточно непрочные и разрушаются при разделении ДНК в агарозном геле.

В том случае если на кольцевой молекуле ДНК одновременно собираются сразу два димера интегразы, происходит разрезание молекулы ДНК по двум сайтам, при этом два димера могут образовывать тетрамер (Cherepanov *et al*., 2003). В результате участок ДНК между сайтами-мишенями должен вырезаться, а оставшаяся часть плазмиды замыкается в кольцо. Однако такого рода продукты на электрофореграммах не наблюдаются. Возможно, тетрамер прочнее взаимодействует с ДНК-мишенью, чем димер или мономер, в результате чего гидролизованная плазмида не мигрирует в геле, удерживаемая тетрамером интегразы. Подтверждением этому может служить ДНК, которая остается на уровне лунок агарозного геля после разделения продуктов реакции интегразы с плазмидой pBSLTR при помощи электрофореза (рис. 4). Кроме того, как видно на электрофореграмме, такая ДНК мигрирует в геле к катоду, что может свидетельствовать о ее комплексе с белком (интеграза по своему аминокислотному составу обладает положительным зарядом). Такой комплекс остается стабильным даже при нагревании реакционной смеси при 65 ºС в течение 20 мин. Известно, что тетрамер более устойчив, чем димер (Baranova *et al*., 2007).

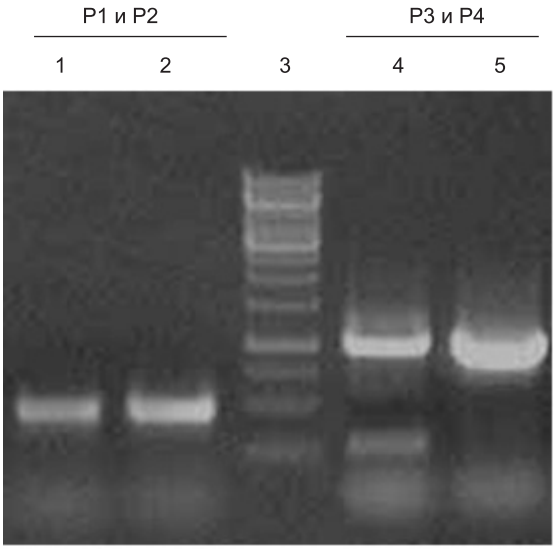


Рис. 4. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР с парами праймеров P1, P2 и P3, P4.

1, 4 – ПЦР-продукты, полученные после амплификации pBSLTR, элюированной из агарозного геля из области лунок после разделения в геле продуктов реакции с интегразой; 2, 5 – ПЦР-продукты, полученные после амплификации линейной формы плазмиды pBSLTR, элюированной из агарозного геля после реакции с интегразой; 3 – ДНК-маркер GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).

С ДНК, элюированной из агарозного геля из области лунок, был проведен ПЦР-анализ с парами праймеров P1, P2 и P3, P4 (рис. 3). В результате ПЦР с праймерами P1 и P2 амплифицировался продукт размером около 500 п.н., что свидетельствует о наличии в реакционной смеси ДКП *gypsy*. С праймерами P3 и P4, помимо продукта размером около 1000 п.н., аплифицируется продукт размером около 300 п.н., что свидетельствует о вырезании фрагмента ДНК (рис. 4).

Для сравнения ПЦР с праймерами P3 и P4 в контроле (pBSLTR без интегразы) и с линейной формой плазмиды pBSLTR, полученной при разделении на электрофорезе и элюированной из геля тем же способом, позволяет получить только продукт размером 1000 п.н. Это означает, что при разрезании одновременно по двум сайтам-мишеням интеграза образует прочный комплекс с ДНК, который гомологичен комплексу интегразы с ДНК-субстратом и ДНК-мишенью при интеграции ретровирусной ДНК *in vivo*.

Нуклеотидная последовательность ПЦР-продукта размером 300 п.н. была определена при помощи секвенирования (рис. 3). Согласно полученным данным, интеграза вырезает ДКП *gypsy*, захватывая по 100 п.н. с каждой стороны. Таким образом, интеграза распознает ДКП, но вырезает его из плазмиды неточно.

Полученные нами данные свидетельствуют о сайт-специфической активности рекомбинантной интегразы *in vitro* и о влиянии конформации ДНК-мишени на ее гидролиз. Показано, что интеграза *gypsy* способна вырезать ДКП *gypsy* в системе не только *in vivo*, но и *in vitro*. В дальнейшем предстоит выяснить структурную и пространственную организацию комплекса ДНК-мишени с интегразой, чтобы установить, каким образом происходит связывание интегразы с клеточной ДНК при эксцизии ретротранспозонов.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 08-04-00693-а, 11-04-00403-а и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.».

Литература

Глухов И.Л., Ильин Ю.В., Иванов В.А. Специфическая эндонуклеазная активность интегразы ретротранспозона МДГ4 (*gypsy*) // Молекуляр. биология. 2000. Т. 34. № 2. С. 277–284.

Нефедова Л.Н., Любомирская Н.В., Ильин Ю.В., Ким А.И. Точные эксцизии длинных концевых повторов ретротранспозона МДГ4 (*gypsy*) *Drosophila melanogaster*, регистрируемые в клетках *Escherichia coli*, обусловленные его интеразной функцией // Генетика. 2006. Т. 42. № 12. С. 1–8.

Baranova S., Tuzikov F.V., Zakharova O.D. *et al*. Small-angle X-ray characterization of the nucleoprotein complexes resulting from DNA-induced oligomerization of HIV-1 integrase // Nucl. Acids Res. 2007. V. 35. N 3. P. 975–987.

Cherepanov P., Maertens G., Proost P. *et al*. HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. N 1. P. 372–381.

Engelman A., Cherepanov P. The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication // PLoS Pathogens. 2008. V. 3. N 3. P. 1–9.

Goff S. P. Genetics of retroviral integration // Annu. Rev. Genet. 1992. V. 26. P. 527–544.

Katz R.A., Gravuer K., Skalka A.M. A preferred target DNA structure for retroviral integrase *in vitro* // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 24190–24195.

Kim A., Terzian C., Santamaria P. *et al*. Retroviruses in

invertebrates: the *gypsy* retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. N 4. P. 1285–1289.

Kitamura Y., Lee Y.M.H., Coffin J.M. Nonrandom integration of retroviral DNA *in vitro*: Effect of CpG methylation // Proc. Natl Acad. Sci. 1992. V. 89. P. 5532–5536.

Kuzin A.B., Lyubomirskaya N.V., Khudaibergenova B.M. *et al*. Precise excision of the retrotransposon *gypsy* from the *forked* and *cut* loci in a genetically unstable *D. melanogaster* strain // Nucl. Acid Res. 1994. V. 22. P. 4641–4645.

Muller H.P., Varmus H.E. DNA bending creates favored sites for retroviral integration: an explanation for preferred insertion sites in nucleosomes // EMBO J. 1994. V. 13. N 19. P. 4704–4714.

Nefedova L.N., Mannanova M.M., Kim A.I. Integration specificity of LTR-retrotransposons and retroviruses in the *Drosophila melanogaster* genome // Virus Genes. 2011. V. 42. N 2. P. 297–306.

Pruss D., Bushman F.D., Wolffe A.P. Human immunodeficiency virus integrase directs integration to sites of severe DNA distortion within the nucleosome core // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 5913–5917.

Pryciak P.M., Varmus H.E. Nucleosomes, DNA-binding proteins, and DNA sequence modulate retroviral integration target site selection // Cell. 1992. V. 69. N 5. P. 769–780.

Song S.U., Gerasimova T., Kurkulos M. *et al*. An env-like protein encoded by a Drosophila retroelement: evidence that *gypsy* is an infectious retrovirus // Genes Dev. 1994. V. 8. N 17. P. 2046–2057.

IN VITRO CATALYTIC ACTIVITY OF THE *DROSOPHILA MELANOGASTER GYPSY* RETROTRANSPOSON INTEGRASE

M.M. Mannanova, L.N. Nefedova, A.I. Kim

Lomonosov Moscow State University, Department of Genetics, Moscow, Russia,
e-mail: aikim57@mail.ru

Summary

The integration of the *gypsy* retrotransposon in the *Drosophila melanogaster* genome is DNA-specific. It is catalyzed by the integrase of this transposable element. *Gypsy* integrase is able not only to integrate, but also to excise retrotransposon DNA from a target site. In the present work, the endonuclease activity of recombinant *gypsy* integrase has been investigated *in vitro*. It is shown, that the enzyme hydrolyses the substrate to form single-strand and double-strand breaks. The substrate conformation influences the hydrolysis: Integrase produces double-strand breaks only in supercoiled circular DNA molecules. The data obtained add to the understanding of mechanisms controlling retrovirus integration and TE transposition.

Key words: integrase, retrotransposons, *gypsy*, LTR.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИНТЕГРАЗЫ РЕТРОТРАНСПОЗОНА *GYPSY DROSOPHILA MELANOGASTER*

Л.Н. Нефедова, М.М. Маннанова, Н.Б. Гусев, А.И. Ким

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия,
e-mail: aikim@mail.ru

Ключевым ферментом у ретротранспозонов и ретровирусов, осуществляющим встраивание их ДНК-копий в хромосому, является интеграза. Известно, что интегразы ретровирусов позвоночных содержат в своем составе три консервативных домена: центральный каталитический, осуществляющий процесс интеграции, N-концевой, участвующий в димеризации фермента, и С-концевой, играющий важную роль в связывании с ДНК-мишенью. С целью функционального анализа доменов интегразы ретротранспозона-ретровируса *gypsy Drosophila melanogaster* в настоящей работе были получены ее рекомбинантные формы – полноразмерная, с делецией N-концевого домена, с делецией С-концевого домена – и изучена активность этих форм *in vitro*. Показано, что интеграза связывается с ДНК-мишенью и гидролизует ее как в полноразмерной форме, так и при отсутствии N- и С-концевых доменов с одинаковой эффективностью, что свидетельствует о ключевой роли центрального домена в этих процессах. Выявлено, что интеграза образует устойчивые димеры.

Ключевые слова: интеграза, домен, *gypsy*, *Drosophila melanogaster*.

Интеграция в геном хозяина является важным этапом в жизненном цикле ретровирусов и ретроэлементов. Процесс интеграции можно разделить на следующие этапы: 1) процессинг длинных концевых повторов (ДКП) ДНК-копии ретроэлемента; 2) узнавание и ступенчатый разрез ДНК-мишени в геноме хозяина; 3) встраивание ДКП-последовательностей ретроэлемента в ДНК-мишень. Этот процесс осуществляется интегразой, в составе которой выделяют три функциональных домена: центральный (коровый), С- и N-концевой (Engelman *et al*., 1993). По крайней мере, для интегразы ВИЧ показано, что N-концевой домен задействован в связывании ионов Zn^{2+}, коровый домен отвечает за связывание концов ДКП вирусной ДНК (субстрата), кофакторов и выбор участка интеграции, С-концевой – за неспецифическое связывание ДНК (Gao *et al*., 2001). При исследовании делеционных форм интегразы ВИЧ было обнаружено, что для обеспечения процессинга концов ДНК-копии вируса и переноса ее цепей к сайту мишени необходимо наличие всех 3 доменов (Bushman *et al*., 1993).

В составе интегразы ретротранспозона *gypsy D. melanogaster* на основании сравнительного анализа с интегразами других ретровирусов также можно выделить три домена (Нефедова и др., 2006). С целью изучения функциональной роли отдельных доменов в проявлении сайт-специфической активности интегразы была исследована эндонуклеазная активность форм интегразы, не содержащих либо N-концевой домен, либо С-концевой домены.

Материалы и методы

Конструирование плазмид

Границы предполагаемых функциональных доменов были определены на основании предварительно полученных данных (Нефедова и др., 2006). Выделение плазмидной ДНК, трансформацию и рестрикционный анализ проводили по стандартным методикам (Maniatis *et al*., 1982).

Плазмида pET30int, кодирующая рекомбинантную интегразу *gypsy*, была сконструирована на основе вектора pET30 (Novagen), в котором был клонирован ПЦР-фрагмент (праймеры 5′-ATCCATGGCAAGCTTCCAACA-3′ и

5′-AGGATCCTTGAGGTTGTCCTT-3′, Евроген) плазмиды pUCgypsy, содержащей полноразмерную функционально активную копию *gypsy* (Нефедова и др., 2006). *Sac*I-*Bam*HI-фрагмент из этой конструкции клонировали в векторе pET30, в результате чего была получена плазмида pETintΔN, кодирующая интегразу *gypsy* без N-концевого домена (INΔN, рис. 1). Для амплификации фрагмента, кодирующего интегразу без С-концевого домена (INΔC, рис. 1), использовали плазмиду pUCgypsy в качестве матрицы и праймеры 5′-ACCTCAATTGGTCTCTCACG-3′ и 5′-ATCCATGGCAAGCTTCCAACA-3′ (Евроген). Полученный фрагмент клонировали в векторе pET30 (Novagen) по сайтам *Nco*I и *Eco*RI. В результате получена плазмида pET30intΔC (рис. 1).

Экспрессия и выделение рекомбинантной интегразы *gypsy* и ее форм, содержащих делеции С- и N-концевых участков

Полученными плазмидами трансформировали клетки *E. coli* штамма Rosetta (Novagen) и выращивали каждую культуру в 500 мл среды LB, содержащей 30 мкг/мл канамицина и 10 мкг/мл хлорамфеникола, при 37 °С до оптической плотности OD_{600} = 0,5–1,0. Экспрессию трансгенов индуцировали добавлением IPTG

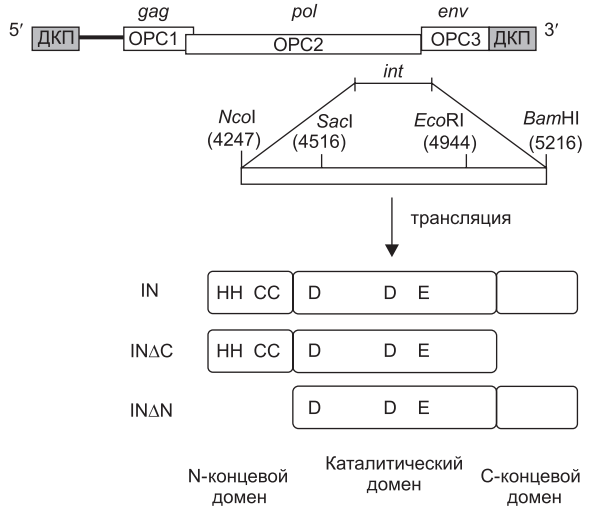


Рис. 1. Карта мобильного элемента *gypsy D. melanogaster* (GenBank AF033821) с областью ОРС2 (*pol*), кодирующей интегразу.

Показана предполагаемая доменная структура фермента.

в конечной концентрации 1 мМ и продолжали культивирование в течение 3 ч при 37 °С или в течение ночи при 24 °С. Все последующие процедуры выделения рекомбинантных белков проводили при 4 °С. Осадки клеток суспендировали в буфере для лизиса (20 мМ NaH_2PO_4 pH 7,4, 500 мМ NaCl, 5 мМ имидазол) и разрушали ультразвуком на дезинтеграторе (Cole-Parmer 4710 Series). Супернатанты очищали на хроматографических колонках, заряженных Ni-агарозой (Qiagen). Рекомбинантные белки смывали с колонок буфером для элюции (20 мМ Tris-HCl pH 7,9, 500 мМ NaCl, 1 М имидазол) и анализировали в 12 %-м SDS-ПААГ. Фракции, содержащие рекомбинантные белки, хранили при 4 °С. Часть белков подвергали диализу против буфера для лизиса или концентрировали на колонках Microcon green top-YM-10 (Millipore) и хранили при 4 °С. Рекомбинантные белки использовали для последующих реакций в одинаковых концентрациях.

Анализ ДНК-связывающей активности интегразы *gypsy*

Для изучения связывания интегразы и ее делеционных форм с ДНК использовали полученные при помощи ПЦР длинный концевой повтор (ДКП) *gypsy* и фрагмент плазмиды pBSLTR, содержащей ДКП (Нефедова и др., 2006). Для амплификации ДКП использовали праймеры P1 (5′-GGATCCTATAAGTTAACAACTAACA-3′) и P2 (5′-CGGCCGTATAAATTATATAAGTTCC-3′), для амплификации фрагмента плазмиды pBSLTR, несущего ДКП, использовали праймеры P3 (5′-TTCAGGCTGCGCAACTGTTG-3′) и P4 (5′-CCAATACGCAAACCGCCTCT-3′). ПЦР проводили в амплификаторе Amply4 (Biokom) в течение 25 циклов по схеме: денатурация 95 ºС – 30 с, отжиг праймеров 55 ºС – 1 мин, синтез 72 ºС – 2,5 мин.

Реакционная смесь для анализа ДНК-белковых взаимодействий содержала белок (IN, INΔC или INΔN) в конечной концентрации 50 мкг/мл, ДНК в концентрации 23 нг/мкл в буфере 10 мМ Трис-HCl pH 7,5, 10 мМ $MgCl_2$ и 0,1 мг/мл БСА. Реакционную смесь инкубировали 1 ч при 30 ºС. Продукты реакции разделяли при помощи электрофореза в 6,4 %-м полиакриламидном геле. ДНК детектировали в ультрафиолете после

окрашивания гелем Sybr Green I (BioDye). Белки в геле окрашивали красителем Coomassie brilliant blue G-250 в течение 2 ч.

Эндонуклеазная реакция

В качестве субстрата для изучения эндонуклеазной активности интегразы использовали молекулярную конструкцию pBSLTR (Нефедова и др., 2006), полученную на основе вектора pBluescript II KS(+) и ДКП *gypsy*, фланкированный сайтами TATA. В качестве контроля использовали полноразмерный вектор pBluescript II KS(+).

Для проведения эндонуклеазной реакции готовили реакционную смесь (20 мкл), содержащую белок (IN, INΔC или INΔN соответственно) в конечной концентрации 50 мкг/мл, ДНК-субстрат в концентрации 5 нг/мкл в буфере 10 мМ Трис-HCl pH 7,5, 10 мМ $MgCl_2$ и 0,1 мг/мл БСА. Реакционную смесь инкубировали 1,5 ч при 30 ºС. ДНК-продукты разделяли при помощи электрофореза в 1 %-м агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,01 %) и анализировали в ультрафиолете.

Результаты и обсуждение

Получение рекомбинантной интегразы *gypsy* и ее форм, содержащих делеции С- и N-концевых участков

В результате генно-инженерных экспериментов на основе экспрессионного вектора pET30 нами были получены рекомбинантные плазмиды pET30intΔC и pET30intΔN, содержащие фрагменты, кодирующие интегразу без С-концевого фрагмента и интегразу без N-концевого фрагмента соответственно.

В результате очистки клеточных лизатов *E. coli* после индукции IPTG были получены две Δ-формы рекомбинантной интегразы *gypsy* с молекулярной массой ~30 кДа каждая (рис. 2). Оба рекомбинантных белка получены в растворимой форме в нативных условиях, что приближено к условиям *in vivo*.

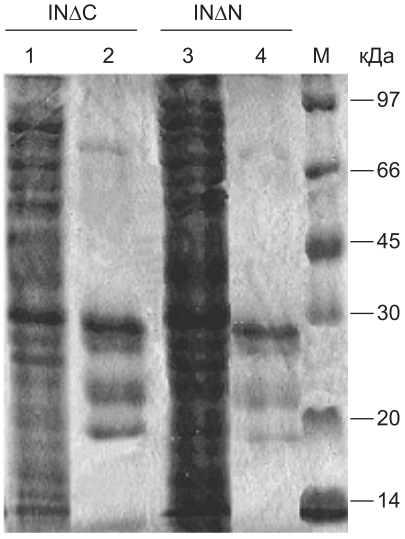


Рис. 2. Электрофоретический анализ Δ-форм рекомбинантной интегразы *gypsy* без С- (1, 2) и N-концевых доменов (3, 4).

1, 3 – неочищенный лизат из клеток *E. coli*, 2, 4 – фракции белков, полученные в результате аффинной хроматографии на колонке с Ni-агарозой после элюции имидазолом. М – белки-маркеры (Fermentas). Справа указаны размеры маркерных белков в кДа.

ДНК-связывающая активность интегразы *gypsy* и ее форм

Для интегразы ВИЧ установлено, что способностью связывать ДНК обладают каталитический и С-концевой домены (Woerner *et al*., 1993; Katzman *et al*., 1998). С целью выяснения активности доменов интегразы *gypsy* при взаимодействии с ДНК-мишенью был проведен анализ на способность ее различных форм связывать ДНК. В качестве матрицы использовали ДКП *gypsy* и фрагмент плазмиды pBSLTR размером 1000 п.н., несущий ДКП *gypsy* (рис. 3). Контролем служили каждый из фрагментов ДНК без добавления белка, а также сами белки без добавления ДНК.

В результате реакции было показано, что и полноценная интеграза *gypsy*, и ее дельта-формы образуют ДНК-белковые комплексы с обоими типами фрагментов ДНК (рис. 4), что свидетельствует о ведущей роли каталитического домена в связывании ДНК-мишени. Однако данные результаты не позволяют судить о специфичности связывания интегразы с ДНК.

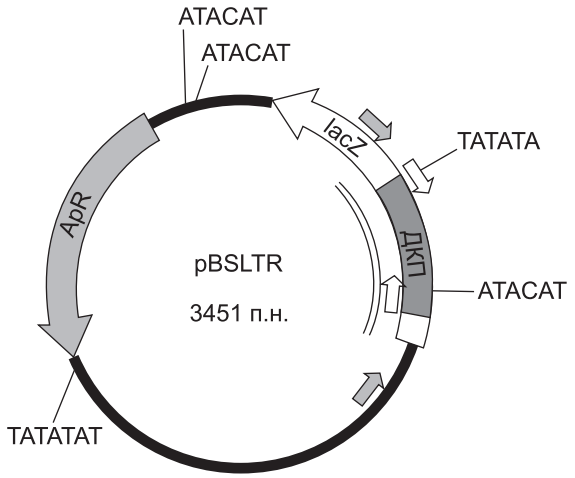


Рис. 3. Схема плазмиды pBSLTR с обозначением сайтов-мишеней интеграции *gypsy*.

Прямыми стрелками обозначены праймеры: белыми – P1 и P2, использованные для амплификации ДКП *gypsy*, серыми – P3 и P4, использованные для амплификации фрагмента плазмиды pBSLTR, включающего ДКП *gypsy*. Показаны сайты распознавания интегразы *gypsy* (ATATAT и ATACAT), ген устойчивости к ампициллину (*ApR*), фрагмент гена *lacZ*.

Эндонуклеазная активность форм интегразы *gypsy*, содержащих делеции С- и N-концевых участков

Ранее нами были получены данные, свидетельствующие о сайт-специфической активности рекомбинантной интегразы *gypsy* (Нефедова и др., 2006). Для изучения роли структурных доменов интегразы в ее эндонуклеазной активности в качестве субстрата использовали конструкцию pBSLTR (рис. 3). Данная конструкция имитирует фрагмент *gypsy* в виде ДКП, встроенный в сайт интеграции. В качестве контроля использовали вектор pBluescript II KS(+), не несущий вставки ДКП.

В результате реакции с плазмидой pBSLTR было показано, что обе Δ-формы интегразы распознают и разрезают ДНК с образованием одно- и двунитевых разрывов так же, как и целый фермент (рис. 5).

Полученные результаты свидетельствуют о ведущей роли каталитического домена интегразы *gypsy* в осуществлении эндонуклеазной реакции. Подтверждением тому служит также и тот факт, что реакция протекает в отсутствие ионов цинка, которые у интегразы ВИЧ связываются с

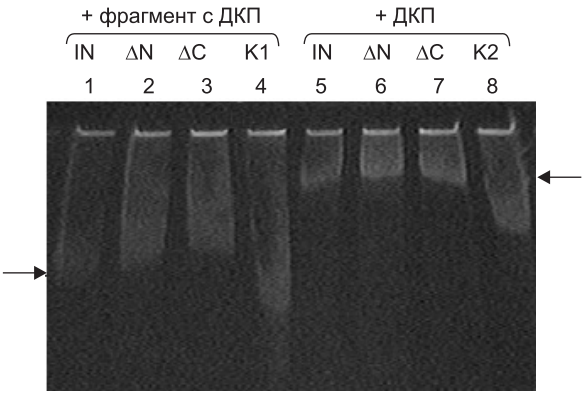


Рис. 4. Электрофоретический анализ ДНК-белковых комплексов интегразы *gypsy* и ее Δ-форм с ДКП (5–7) и фрагментом плазмиды pBSLTR, несущим ДКП *gypsy* (1–3).

К1, К2 – соответствующие ДНК-субстраты без белка. Положение на геле ДНК-белковых комплексов отмечено стрелками.

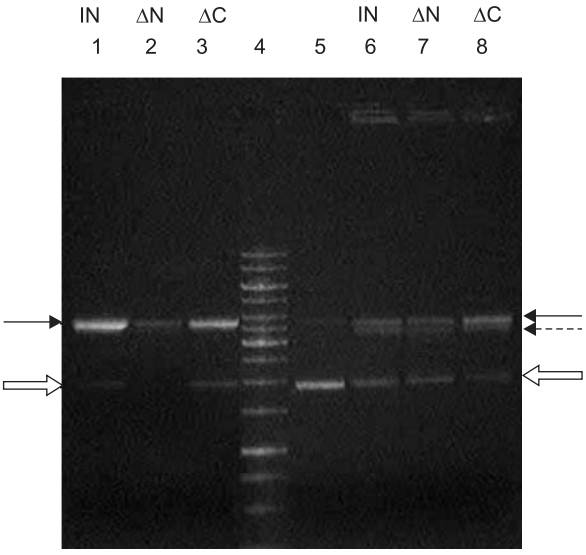


Рис. 5. Электрофоретический анализ продуктов эндонуклеазной активности интегразы и ее форм с pBSLTR.

1, 6 – плазмида после реакции с полноразмерной интегразой; 2, 7 – с интегразой без N-конца; 3, 8 – с интегразой без С-конца. 5 – плазмида, инкубированная с реакционной смесью без интегразы (контроль), 4 – ДНК-маркер GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). В пробах 1–3 использовали белки, которые не были сконцентрированы на колонке Microcon green top-YM-10 (Millipore). Черной стрелкой указана кольцевая релаксированная форма плазмиды, белой – суперскрученная; пунктирной – линейная форма плазмиды.

N-концевым доменом (Gao *et al*., 2001). В наших экспериментах при добавлении ионов цинка активность интегразы *gypsy* и ее дельта-форм не изменялась. Отсутствие С-конца также не снижало эндонуклеазную активность интегразы.

Стоит отметить, что способность связывать ДНК, а также эндонуклеазная активность у всех 3 форм интегразы повышались после очистки их от имидазола при помощи концентрирования на колонках. Об этом свидетельствует наличие в реакционной смеси линейных форм плазмиды pBSLTR и ДНК-белковых комплексов в лунках геля. Электрофоретический анализ интегразы после диализа против буфера с меньшим содержанием имидазола и солей выявил продукт, который мигрировал в геле с ожидаемой массой димера фермента (рис. 6).

Димерная форма белка оставалась стабильной при нагревании в течение 30 мин при 90 ºС в присутствии 8 М мочевины и 1 М дитиотреитола, однако деградировала в присутствии ЭДТА, что свидетельствует об участии двухвалентных катионов в формировании белкового комплекса. Вероятно, появление линейной формы плазмиды pBSLTR в буфере с меньшей ионной силой обусловлено активностью интегразы в димерной форме.

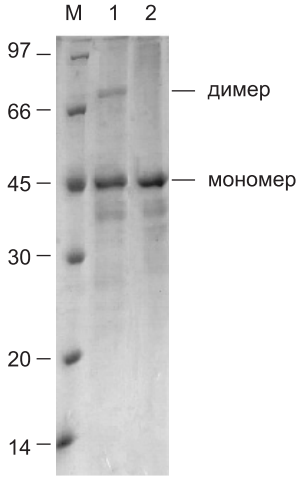


Рис. 6. Электрофоретический анализ рекомбинантной интегразы *gypsy* после диализа против буфера для лизиса (1) и без диализа (2).

М – белки-маркеры (Fermentas). Слева указаны размеры маркерных белков.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что ключевую роль в связывании и гидролизе интегразой *gypsy* ДНК-мишени играет коровый домен фермента. При этом рекомбинантная интеграза способна самопроизвольно образовывать димеры в системе *in vitro*. Однако еще предстоит выяснить, какую структуру принимает интеграза при полном вырезании мобильного элемента из генома, а также изучить структурные особенности корового домена, позволяющие интегразе точно распознавать сайты-мишени при интеграции и эксцизии *gypsy*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 11-04-00403-а и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.».

Литература

Нефедова Л.Н., Любомирская Н.В., Ильин Ю.В., Ким А.И. Точные эксцизии длинных концевых повторов ретротранспозона МДГ4 (*gypsy*) *Drosophila melanogaster*, регистрируемые в клетках *Escherichia coli*, обусловленные его интегразной функцией // Генетика. 2006. Т. 42. № 12. С. 1–8.

Bushman F.D., Engelman A., Palmer I. *et al*. Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding // Biochemistry Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 3428–3432.

Engelman A., Bushman F.D., Craigie R. Identification of discrete functional domains of HIV-1 integrase and their organization within an active multimeric complex // EMBO J. 1993. V. 12. N 8. P. 3269–3275.

Gao K., Butler S.L., Bushman F. Human immunodeficiency virus type 1 integrase: arrangement of protein domains in active cDNA complexes // EMBO J. 2001. V. 20. N 13. P. 3565–3576.

Katzman M., Sudol M. Mapping viral DNA specificity to the central region of integrase by using functional human immunodeficiency virus type 1/visna virus chimeric proteins // J. Virol. 1998. V. 72. N 3. P. 1774–1753.

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Press, 1982.

Woerner A.M., Marcus-Sekura C.J. Characterization of a DNA binding domain in the C-terminus of HIV-1 integrase by deletion mutagenesis // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 3507–3511.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE *DROSOPHILA MELANOGASTER GYPSY* RETROTRANSPOSON INTEGRASE

L.N. Nefedova, M.M. Mannanova, N.B. Gusev, A.I. Kim

Lomonosov Moscow State University, Department of Genetics, Moscow, Russia,
e-mail: aikim57@mail.ru

Summary

The key enzyme of retrotransposons and retroviruses, which integrates their DNA copies into chromosomes, is integrase. It is known that molecules of vertebrate retrovirus integrases contain three conserved domains: the central catalytic domain, performing integration; N-terminal, responsible for the dimerization of the enzyme; and C-terminal, which plays an important role in binding to the DNA target. In the present study, recombinant species of the integrase from *Drosophila melanogaster gypsy* retrotransposon retrovirus have been obtained for functional analysis of its domains: (1) full-size, (2) with a deletion of the N-terminal domain, and (3) with a deletion of the C-terminal domain. The activities of these species have been studied *in vitro*. It has been shown that integrase efficiently binds to DNA target and cleaves it, being full-size or truncated. Thus the central domain plays the main role in this process. It has been found that integrase forms stable dimers.

Key words: integrase, domain, *gypsy*, *Drosophila melanogaster*.

АНАЛИЗ ТКАНЕ- И СТАДИЕСПЕЦИФИЧНОСТИ ТРАНСКРИПЦИИ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ ГРУППЫ *GYPSY* У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Ф.А. Урусов, Л.Н. Нефедова, А.И. Ким

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия,
e-mail: aikim@mail.ru

Исследована стадиеспецифичность транскрипции 11 мобильных генетических элементов группы *gypsy* в линии *Drosophila melanogaster* SS (Stable Strain), мутантной по гену *flamenco*, контролирующему транспозиции элемента *gypsy*. В отличие от контрольной линии flamenco^{+} в линии SS выявлен повышенный уровень транскрипции большинства изученных элементов на эмбриональной стадии и стадии имаго. На личиночной стадии экспрессия не выявлена ни в одной из линий. Полученные результаты могут свидетельствовать о существовании общих механизмов контроля экспрессии/транспозиции для всех элементов группы *gypsy*. При исследовании тканеспецифичности экспрессии элементов в линии SS установлено, что элемент *Tirant* транскрибируется исключительно в яичниках взрослых самок. Для других элементов такой зависимости обнаружено не было.

Ключевые слова: мобильные генетические элементы, ретротранспозоны, *gypsy*, экспрессия.

Мобильные генетические элементы (МГЭ) составляют значительную часть генома эукариот, например, у *Drosophila melanogaster* на их долю приходится более 20 % (Pimpinelly *et al*., 1995). Классификация МГЭ основана на способах их перемещения. Различают транспозоны (перемещение по механизму вырезания/встраивания) и ретротранспозоны (перемещение происходит через РНК-интермедиат, образованный в результате обратной транскрипции). Ретротранспозоны с длинными концевыми повторами (ДКП-ретротранспозоны) проявляют значительное структурное и функциональное сходство с ретровирусами. Элемент *gypsy* является типичным ДКП-ретротранспозоном, содержащим три открытые рамки считывания (ОРС), в том числе активную ОРС3 (Marlor *et al*., 1986). Неудивительно, что *gypsy* является первым ретровирусом, обнаруженным у беспозвоночных (Kim *et al*., 1994). Позже в геноме *D. melanogaster* были обнаружены и другие родственные gypsy ретроэлементы (Kaminker *et al*., 2002). Их филогенетические отношения установлены с помощью биоинформатического анализа (Нефедова, Ким, 2009). Несмотря на то что некоторые из них содержат ОРС3, инфекционные свойства экспериментально показаны пока только для *gypsy* (Kim *et al*., 1994) и ZAM (Leblanc *et al*., 2000).

Транспозиции МГЭ вносят значительный вклад в формирование наследственной изменчивости, однако их высокая частота, являясь причиной геномной нестабильности, может быть опасна для жизни особи, поэтому в клетке существуют механизмы, ограничивающие перемещение элементов. Исследования данных механизмов удобно проводить на модельных системах, представляющих собой линии, в которых повышена частота транспозиции МГЭ. Одним из таких примеров является система нестабильной мутаторной линии (MS) *D. melanogaster*, которая ведет свое происхождение от стабильной лабораторной линии (SS) и характеризуется увеличенной частотой спонтанного мутагенеза до величин порядка 10^{-3}–10^{-4}, нестабильным характером мутаций и активной транспозицией *gypsy* (фенотип flamenco) при неизменной локализации других элементов (Ким и др., 1989). Таким образом, в линии SS имеются нарушения в системе

контроля транспозиции *gypsy*, однако генетическая стабильность данной линии обусловлена отсутствием в ее геноме активной копии элемента (Lyubomirskaya *et al*., 1998).

У *D. melanogaster* транспозиция *gypsy* контролирует ген *flamenco* (Prud'homme *et al*., 1995). Ген *flamenco* картирован в районе 20A1-3 X-хромосомы. В настоящее время известно, что *flamenco*, имеющий в своем составе множество дефектных копий МГЭ, является источником антисмысловой РНК-предшественника для системы РНК-интерференции (Pellisson *et al*., 2007, Потапова, 2011). Показано, что ген *flamenco*, возможно, принимает участие в контроле транспозиции не только *gypsy*, но и элементов *ZAM* и *Idefix* (Нефедова и др., 2010). Не исключено, что его влияние может распространяться и на другие элементы, родственные перечисленным выше.

Исследовалась экспрессия на уровне транскрипции в линии SS 11 ретротранспозонов группы *gypsy*. Анализируемые элементы *ZAM*, *17.6*, *297*, *Tirant*, *springer*, *rover*, *Quasimodo*, *opus*, *Idefix* и *gypsy* содержат 3 ОРС, и только *Transpac*-элемент, имеющий в своем составе только первые две ОРС.

Материалы и методы

Линии *D. melanogaster* и их характеристики

Линия SS (Stable Strain) характеризуется фенотипом flamenco, генетическим маркером w^1; активный *gypsy* отсутствует, линия 413 имеет фенотип flamenco$^+$, сцепленные X-хромосомы, генетические маркеры *y*, *v*, *f*. Линии мух культивировали в стандартных условиях на общепринятой агаризованной питательной среде при температуре 25 °С.

Выделение тотальной РНК

Выделение РНК осуществляли с помощью набора фирмы «Promega» «RNAgents Total RNA Isolation System». Биоматериал гомогенизировали в буфере, содержащем гуанидинизотиоцианат. Далее экстракцию проводили по протоколу «Promega». Все манипуляции с РНК осуществляли на ледяной бане. Качество выделенной РНК оценивали путем электрофореза в 2 %-м агарозном геле, количество – спектрофотометрически (Nanodrop).

Обратная транскрипция

Перед реакцией обратной транскрипции проводили обработку РНК ДНКазой I («Fermentas») в 4-кратном объеме согласно протоколу фирмы-производителя. Использовали пробы, содержащие 1 мкг РНК. Смесь инкубировали при 37 °С в течение 60 мин. Реакцию останавливали добавлением EDTA до конечной концентрации 2,2 мМ. ДНКазу инактивировали прогреванием при 65 °С в течение 10 мин. Синтез кДНК осуществляли с помощью набора фирмы «Fermentas» «First Strand cDNA Synthesis Kit» по протоколу производителя, в качестве затравки для синтеза использовали случайные праймеры.

Полимеразная цепная реакция

Амплификацию проводили в амплификаторе «Biokom» в течение 30 циклов, используя *Taq*-полимеразу. Концентрация в пробе $MgCl_2$ составляла 2,5 мМ, каждого праймера – 0,4 мкМ. Параметры ПЦР: денатурация 95 °С 30 с, отжиг 54 °С 1 мин, элонгация 72 °С 1 мин. Праймеры, использованные в реакциях амплификации, имели следующий нуклеотидный состав: ZAM_RT_f (5′-aacggcatcaattgcatcaa-3′), ZAM_RT_r (5′-tgttggttctactctgcttg-3′), 17.6_RT_f (5′-cctgcgtagcacgattttgt-3′), 17.6_RT_r (5′-rctatgtccgccacaccagtt-3′), 297_RT_f (5′-cgttggttcatacgccgaat-3′), 297_RT_r (5′-ttcgacgtctgctactccgt-3′), Transpac_RT_f (5′-taacaagcgatccgatagtc-3′), Transpac_RT_r (5′-ctgagtccgcactgtgaata-3′), Tirant_RT_f (5′-ggaattgcattaacgtagtt-3′), Tirant_RT_r (5′-gggtctgttcgggtttcatt-3′), springer_RT_f (5′-gacgtagttcgacagtttcc-3′), springer_RT_r (5′-gccactattgtctgcgattt-3′), rover_RT_f (5′-gcgacttaatagggttgtcc-3′), rover_RT_r (5′-ttccgtgttacggtgttctg-3′), Quasimodo_RT_f (5′-ggaagcacatttgcaacgct-3′), opus_RT_r (5′-ttgagcactgtggggcataa-3′), Idefix_RT_f (5′-gacatgggaaaaccgcaaga-3′), Idefix_RT_r (5′-acgatcttcctgccacgatt-3′), gypsy_RT_f (5′-gtgaacgctattcactgcga-3′), gypsy_RT_r (5′-gaggtgacagtttctgagtt-3′).

Результаты и обсуждение

Критическим этапом в жизненном цикле ретротранспозонов является их транскрипция. Поэтому исследование уровня мРНК ретроэлементов в некоторых случаях может способствовать пониманию механизмов, контролирующих их перемещение.

Методом ПЦР, совмещенной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), была исследована транскрипция МГЭ группы *gypsy* в линии SS (фенотип flamenco). Линия 413, имеющая фенотип flamenco^{+}, в данном эксперименте была использована в качестве контрольной. Для анализа использовали взрослых особей (рис. 1).

На представленных электрофореграммах (рис. 1) видно, что в линии SS обнаруживается мРНК большинства МГЭ, при этом в контрольной линии 413 при данных условиях эксперимента эти транскрипты не выявляются или они едва детектируются. Исходя из полученных результатов, можно предположить, что почти для всех изучаемых элементов существует общий механизм контроля их экспрессии (ген *flamenco*), который нарушен в линии SS. Исключение составляют элементы *rover* и *ZAM*. В обеих линиях обнаруживается пониженный уровень РНК элементов *rover* и *ZAM*. Этот эффект, вероятно, связан с низкой копийностью элементов *rover* и *ZAM* в геноме линий SS и 413. Следует также обратить внимание на то, что транскрипция *gypsy* в линии SS при данных условиях эксперимента также происходит слабо.

Известно, что мобильные элементы могут проявлять дифференциальную активность на разных стадиях развития организма-хозяина, поэтому мы исследовали экспрессию МГЭ группы *gypsy* на личиночной и эмбриональной стадиях развития дополнительно к имагинальной (рис. 2).

На личиночной стадии развития экспрессия всех элементов либо отсутствует, либо происходит на очень низком уровне. Данная закономерность установлена как для линии SS (рис. 2), так и для контрольной линии 413 (результаты не представлены). Это позволяет предполагать, что на данной стадии развития, в отличие от стадии имаго, могут действовать другие механизмы регуляции экспрессии исследуемых МГЭ. Дело в том, что на стадии личинок анализу подвергается транскрипция в личиночных тканях, тогда как будущие ткани взрослых особей находятся в имагинальных дисках в ничтожно малом количестве.

Совершенно иная картина получена на эмбрионах линии SS. Экспрессия всех элементов, за исключением *Tirant* и *ZAM*, была обнаружена (рис. 3). Здесь следует обратить внимание на тот факт, что у взрослых особей достаточно четко выявлялась экспрессия элемента *Tirant* (рис. 1), значит отсутствие или крайне слабый уровень транскрипции никак не связаны с числом копий

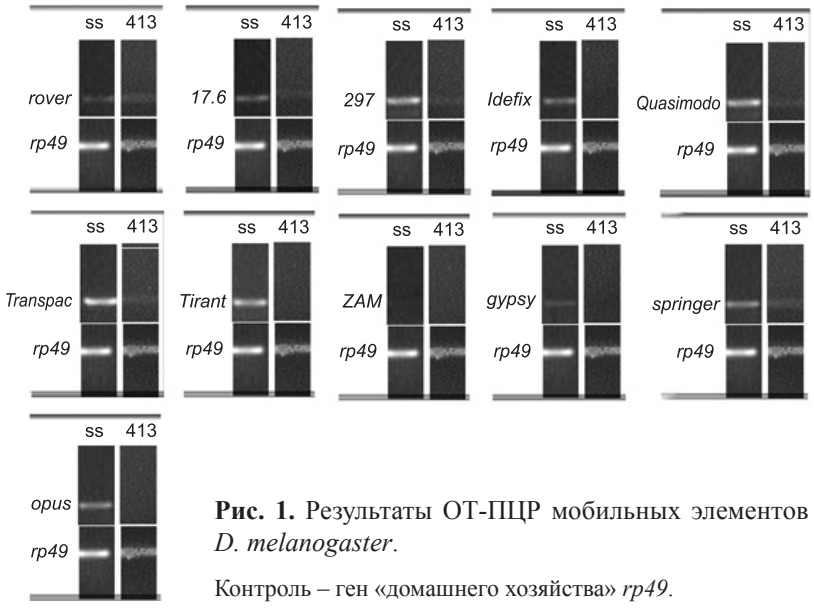


Рис. 1. Результаты ОТ-ПЦР мобильных элементов группы *gypsy* в линиях SS и 413 *D. melanogaster*.

Контроль – ген «домашнего хозяйства» *rp49*.

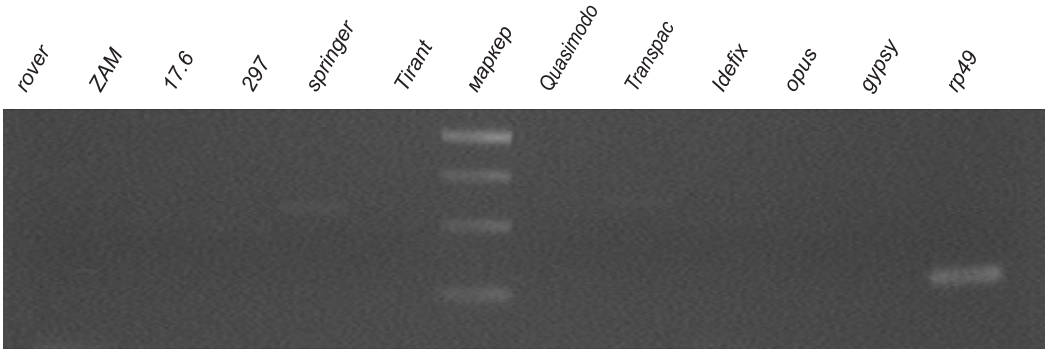


Рис. 2. Результаты ОТ-ПЦР-анализа транскрипции МГЭ на личиночной стадии развития (линия SS).

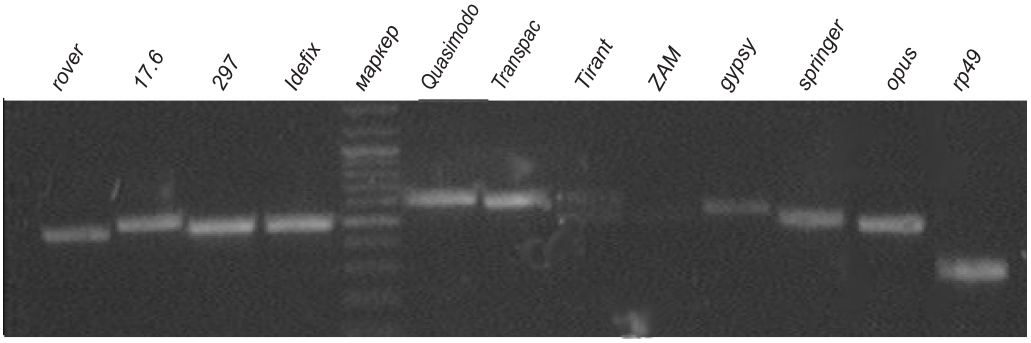


Рис. 3. Экспрессия МГЭ на эмбриональной стадии развития.

этого элемента в геноме. Вероятно, наличие его транскрипции у взрослых мух обеспечивается особыми механизмами, что и отличает элемент *Tirant* от других представителей МГЭ группы *gypsy*. Относительно элемента *ZAM* сложно сделать какие-либо выводы, поскольку его экспрессия не регистрировалась ни на одной из стадий развития, хотя в геноме всех линий, использованных в настоящей работе, этот элемент присутствует, но, вероятно, в малом числе копий и/или в виде дефектных копий, не способных к транскрипции.

Значительный интерес вызывают данные о тканеспецифичности экспрессии мобильных элементов. Мы оценили уровень экспрессии изучаемых элементов в яичниках и корпусе мух линии SS, не обнаружив при этом существенных различий практически для всех элементов (результаты не представлены). Их экспрессия регистрировалась как в корпусе, так и в яичниках. Исключением стал элемент Tirant. Как видно из рис. 4, его экспрессия не обнаруживается в корпусе мух линии SS, а в яичниках наблюдается на достаточно высоком уровне. Можно сделать вывод, что в целых мухах экспрессия данного элемента регистрируется за счет его транскрипции в яичниках.

В совокупности полученные нами данные могут свидетельствовать о существовании молекулярных механизмов, обеспечивающих тканеспецифический профиль экспрессии элемента *Tirant*, и, возможно, не функционирующих в линии SS. Кроме того, не исключено, что нарушения в линии SS, формирующие фенотип flamenco, касаются не только элемента *gypsy*,

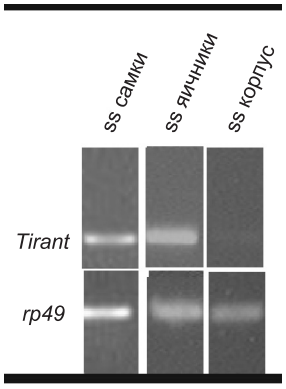


Рис. 4. Экспрессия элемента *Tirant* в разных тканях линии SS *D. melanogaster*.

но и элемента *Tirant*, что в таком случае может указывать на общность механизмов контроля экспрессии/транспозиции двух вышеуказанных элементов в генеративных тканях.

Таким образом, по результатам данной работы можно сделать выводы о существовании возможного общего механизма контроля экспрессии для большинства элементов группы *gypsy*, дифференциальной транскрипционной активности элементов на разных стадиях развития дрозофилы и эффекта тканеспецифичности для элемента *Tirant*.

Работа частично поддержана ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.» и грантом РФФИ 11-04-00403-а.

Литература

Ким А.И., Беляева Е.С., Ларкина З.Г., Асланян М.М. Генетическая нестабильность и транспозиции мобильного элемента МДГ4 в мутаторной линии *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1989. Т. 25. № 10. С. 1747–1756.

Нефедова Л.Н., Дыйканов Д.Т., Мартиросян И.А., Ким А.И. Ретротранспозоны *Idefix* и *ZAM* способны к транспозиции в линии MS *Drosophila melanogaster*, мутантной по гену *flamenco* // Вестн. Моск. ун-та. 2010. Сер. 16. Биология. № 2. С. 3–8.

Нефедова Л.Н., Ким А.И. Молекулярная филогения и систематика ретротранспозонов и ретровирусов дрозофилы // Молекуляр. биология. 2009. Т. 43. № 5. С. 807–815.

Потапова М.В. Анализ структуры и экспрессии района локализации гена *flamenco* у *Drosophila melanogaster*: Дис. … канд. биол. наук. М., 2011.

Kaminker J.S., Bergman C.M., Kronmiller B. *et al*. The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective // Genome Biol. 2002. V. 3. N 12.

Kim A., Terzian C., Santamaria P. *et al*. Retroviruses in vertebrates: the *gypsy* retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 1285–1289.

Leblanc P., Desset S., Giorgi F. *et al*. Life cycle of an endogenous retrovirus, ZAM, in *Drosophila melanogaster* // J. Virol. 2000. V. 74. N 22. P. 10658–10669.

Lyubomirskaya N.V., Smirnova Y.B., Avedisov S.N. *et al*. Comparative analysis of structure and retrotransposition activity in two Drosophila mobile element *mdg4* (*gypsy*) // Mol. Biol. 1998. V. 32. P. 689–694.

Marlor R.L., Parkhurst S.M., Corces V.G. The *Drosophila melanogaster gypsy* transposable element encodes putative gene products homologous to retroviral proteins // Mol. Cell. Biol. 1986. V. 6. P. 1129–1134.

Pellisson A., Sarot E., Payen-Groschene G., Bucheton A. A novel repeat-associated small interfering RNA-mediated silencing pathway down regulates complementary sense gypsy transcripts in somatic cells of the Drosophila ovary // J. Virol. 2007. V. 81. P. 1951–1960.

Pimpinelli S., Berloco M., Fanti L. *et al*. Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 3804–3808.

Prud′homme N., Gans M., Masson M. Flamenco a gene controlling the *gypsy* retrovirus of *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1995. V. 139. N 2. P. 697–711.

ANALYSIS OF THE TISSUE- AND STAGE-SPECIFIC TRANSCRIPTION OF THE *DROSOPHILA MELANOGASTER GYPSY* RETROTRANSPOSON

F.A. Urusov, L.N. Nefedova, A.I. Kim

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia,
e-mail: aikim57@mail.ru

Summary

This study deals with the stage-specific transcription of 11 transposable elements of the gypsy group in *Drosophila melanogaster* strain SS (Stable Strain), bearing a mutant in the *flamenco* gene, which controls *gypsy* transposition. In contrast to the flamenco^{+} strain, elevated levels of transcription of most studied elements in SS have been recorded at the embryonic and adult stages. At the larval stage, the expression was not detected in either strain. The results suggest the existence of expression/transposition-controlling mechanisms shared by all members of the *gypsy* group. Study of the tissue specificity of TE expression in the SS strain has demonstrated that the *Tirant* element is transcribed only in the ovaries of adult females. Other elements show no such dependence.

Key words: transposable elements, retrotransposons, *gypsy*, expression.

ВЛИЯЮЩИЕ НА МАЛЫЕ РНК МУТАЦИИ В ГЕНАХ *spn-E*, *piwi*^{2} И *aub* НЕ СКАЗЫВАЮТСЯ НА МУТАБИЛЬНОСТИ *hobo*-ИНСЕРЦИОННОГО АЛЛЕЛЯ ГЕНА *yellow DROSOPHILA MELANOGASTER*

Л.П. Захаренко, М.А. Волошина

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: zakharlp@bionet.nsc.ru;
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Исследовали влияние мутаций в генах *spn-E*, *piwi*^{2} и *aub Drosophila melanogaster*, причастных к продукции малых РНК, на частоту мутирования высоконестабильного аллеля y^{+h} локуса *yellow*, в регуляторную зону которого встроен *hobo*-элемент. Локус-специфическая нестабильность в y^{+h} складывается из перемещения *hobo* и рекомбинационных событий, в которые вовлечен *hobo* из регуляторной зоны гена *yellow*.Частоту мутирования оценивали, скрещивая самцов, несущих y^{+h} на фоне исследуемых аллелей *spn-E*, *piwi*^{2} и *aub*, с самками со сцепленными Х-хромосомами. По нашим данным, частота появления мутаций в гене *yellow* в большей степени зависела от скрещивания с линией со сцепленными Х-хромосомами, чем от наличия мутации в генах *spn-E*, *piwi*^{2} или *aub*. Видимо, исследуемые мутации не сказываются на активности *hobo*-элемента или же в нестабильности аллеля y^{+h} рекомбинации между *hobo*-элементами играют большую роль, чем скорость его перемещения.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, *yellow*, *hobo*, мобильные генетические элементы, *spn-E*, *piwi*^{2}, *aub*.

Введение

Мобильные генетические элементы (МГЭ) занимают около 22 % генома *Drosophila melanogaster* (Kapitonov, Jurka, 2003). У *D. melanogaster* описано около сотни семейств МГЭ, каждое из которых представлено от нескольких копий до нескольких десятков копий на геном в зависимости от линии дрозофил или типа мобильного элемента. Есть линии, в которых некоторые семейства МГЭ не представлены вовсе. По крайней мере, треть МГЭ семейства Drosophilidae видоспецифичны (Bartolomé *et al*., 2009). Одни МГЭ могут кодировать активные ферменты, участвующие в их перемещении, другие копии дефектны. В ряде случаев дефектные копии способны к перемещению при наличии в геноме полноразмерной активной копии и сохранении концевых повторов. В природной популяции дрозофил невозможно найти две хромосомы с одинаковым распределением МГЭ. Тем не менее большая часть МГЭ относительно стабильна. Спонтанная скорость перемещения МГЭ колеблется в пределах порядка величин от 10^{-1} до 10^{-5} на сайт на геном за поколение (Harada *et al*., 1990). С учетом того что в геноме число копий каждого семейства, способных к перемещению, не превышает 1–2 десятков, в среднем перемещается не более одной копии на геном за поколение. Консенсусной нуклеотидной последовательности по сайтам внедрения МГЭ, как правило, нет, но есть, по-видимому, предпочтение к некоторым конформационным состояниям ДНК (Saville *et al*., 1999). Существуют горячие и холодные сайты внедрения МГЭ, но не очень понятно, то ли в некоторые участки хромосомы легко встроиться, то ли из них трудно выщепиться (Thibault *et al*., 2004; Esnault *et al*., 2011). Большая часть МГЭ обнаруживается в межгенных пространствах и

меньшая – в интронах и экзонах (Lipatov *et al*., 2005). Внедрение МГЭ в экзон обычно сказывается на активности гена, но описаны случаи «экзонизации» МГЭ, когда фрагменты МГЭ закрепляются в гене, оказываются значимыми для генома и сохраняются в ряду поколений (Lipatov *et al*., 2005). Таким образом, мобильные элементы обеспечивают генетический полиморфизм в природных популяциях дрозофил за счет разного набора и количества МГЭ, структуры их дефектных производных и локализации МГЭ на хромосомах.

Несмотря на ярко выраженный полиморфизм по распределению МГЭ в природных популяциях, фенотип дрозофил остается неизменным, а роль МГЭ в жизни особи и в эволюции не до конца понятой. Природа факторов, индуцирующих перемещение МГЭ, так же, как и причина их сайленсинга, активно обсуждается. Одна из тенденций в этой области биологии – исследование влияния малых РНК на регуляцию активности МГЭ (Aravin *et al*., 2004; Vagin *et al*., 2006; Brennecke *et al*., 2007; Klenov *et al*., 2007). Описано несколько типов малых РНК (siRNA, miRNA, rasiRNA и др.), которые имеют разное происхождение. Одни формируются на базе шпилек из транскриптов самих МГЭ, в других случаях малые РНК имеют независимое от регулируемых МГЭ происхождение. Предполагается, что участие малых РНК в репрессии МГЭ осуществляется по принципу комплементарности к РНК-мишени (РНК интерференция) с последующим разрушением РНК МГЭ. Другой возможный механизм регуляции активности МГЭ – малые РНК блокируют транскрипцию РНК МГЭ. После формирования малые РНК связываются с белками семейства *Argonaute*, формируя эффекторный комплекс, блокирующий транскрипцию МГЭ. Считается, что этот комплекс является посредником во всех процессах, где РНК выступает регулятором активности. Гены *piwi* и *aub* (*aubergine*) – члены семейства *Argonaute*/*Dicer*, ген *spn-E* (*spindle E*) относят к классу хеликаз. Мутации в этих генах коррелируют с увеличением количества малых РНК к соответствующим МГЭ (Vagin *et al*., 2006; Brennecke *et al*., 2007).

Мы исследовали влияние мутаций в генах *spn-E*, *piwi*^{2} и *aub* на частоту мутирования в гене *yellow* в линии y^{+h} *Drosophila melanogaster*. В линии y^{+h} объединены два нестабильных гена: *yellow*$^+$-аллель из линии 743$^+$, в регуляторной зоне которого встроен дефектный *hobo*-элемент, и ген *Notch* из линии Uc-1 с полноразмерным *hobo*-элементом, внедренным в один из интронов этого гена. Внедрение *hobo* в эти гены не сказывается на фенотипе дрозофил, но обеспечивает высокую нестабильность в этих локусах как за счет перемещения *hobo*, так и за счет рекомбинаций между *hobo*-элементами, внедренными в эти гены, и другими *hobo*, расположенными на Х-хромосоме (Захаренко и др., 2000, 2004).

По нашим данным, частота появления мутаций в гене *yellow* в большей степени зависела от скрещивания с линией со сцепленными Х-хромосомами, чем от наличия–отсутствия мутации в генах *spn-E*, *piwi*^{2} или *aub*.

Материалы и методы

В работе использовали линии *Drosophila melanogaster*: y^{+h}, содержащую *hobo*-элемент в генах *yellow* и *Notch*; *spn-E* (*ru*^{1} *st*^{1} *spn-E*^{1} *e*^{1} *ca*^{1}/*TM3*, *Sb*^{1}); *piwi*^{2} (*w*^{1}; *piwi*^{2}/*CyO*); *aub* (*y ac w*^{1}; *aubQC42 cn*^{1} *bw*^{1}/*CyO*); линию со сцепленными Х-хромосомами *C*(*1*)*DX*/*Y*, *y w f*.

Путем однократного скрещивания самцов линии y^{+h} с самками из линии с доминантными маркерами Cy/L; D/Sb были синтезированы линии, где Х-хромосома содержала аллель y^{+h}, а аутосомы – доминантные маркеры либо по второй, либо по третьей аутосомам. Далее скрещивая мух этих линий с мухами линий с изучаемыми мутациями *spn-E*, *piwi*^{2} и *aub*, синтезировали линии y^{+h}; *spn-E*/*TM3*, *Sb*^{1}, y^{+h}; *piwi*^{2}/*Cy* и y^{+h}; *aub*/*Cy*.

Влияние мутации в гене *piwi*^{2} на нестабильность в гене y^{+h} анализировали по числу мутантных самцов, появившихся после скрещивания самцов с Х-хромосомой, содержащих ген y^{+h} и мутацию по гену *piwi*^{2}, с самками со сцепленными Х-хромосомами (рис. 1–3). Аналогичную работу проводили с мутантами по *spn-E* и *aub*.

Результаты и обсуждение

В работе анализировали влияние мутаций в генах *spn-E*, *piwi*^{2} и *aub* на частоту мутирования в гене *yellow*, несущем в регуляторной зоне

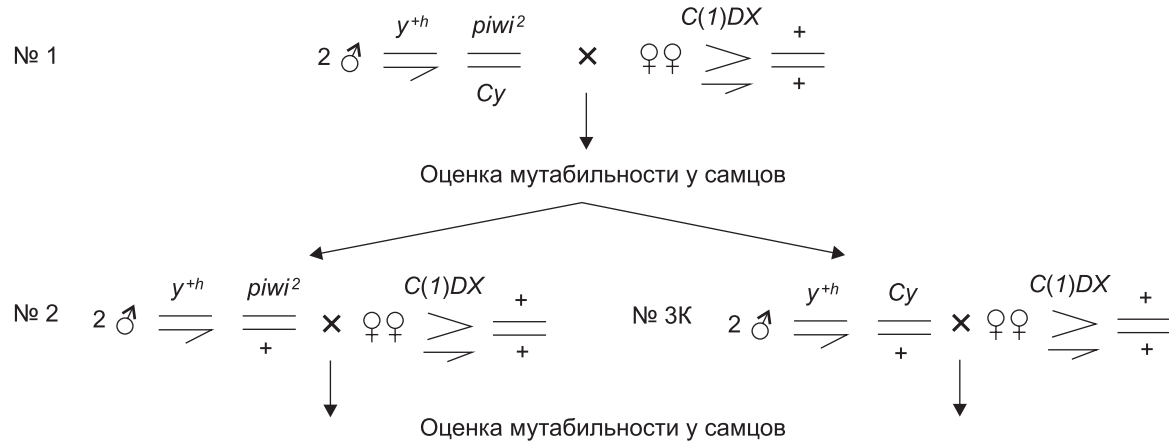


Рис. 1. Схема эксперимента по исследованию влияния гетерозигот *piwi*^{2}/+ на нестабильность y^{+h}.

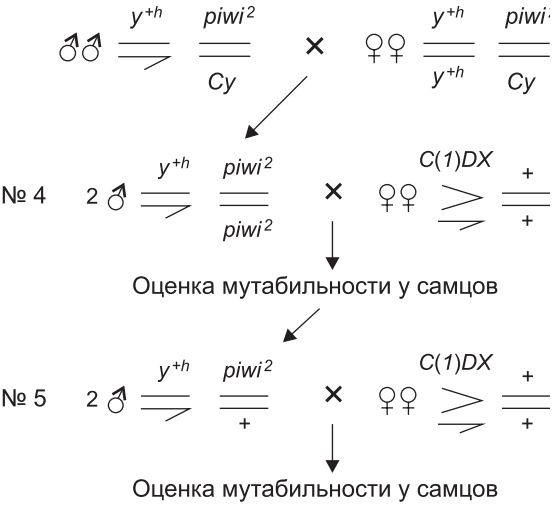


Рис. 2. Схема скрещиваний для оценки влияния гомозигот *piwi*^{2} на частоту мутирования в гене *yellow* линии y^{+h}.

Рис. 3. Схема контрольных экспериментов для *piwi* и *aub*.

Аналогично ставился контроль для *spn-E* с линией y^{+h} D/Sb.

встройку дефектного *hobo*-элемента в линии y^{+h} *Drosophila melanogaster* (табл. 1–3). Ген *yellow* в линии y^{+h} проявляет высокую локус-специфическую нестабильность за счет того, что *hobo*-элемент, внедрившийся в этот локус, мобилен и, кроме этого, вступает в цис-рекомбинацию с другими *hobo*, расположенными на Х-хромосоме (Захаренко и др., 2000, 2004; Коваленко и др., 2006). В геном линии y^{+h} вводили с помощью скрещиваний хромосомы с мутациями в генах *spn-E*, *piwi*^{2} или *aub*, участвующие в регуляции активности повторенных последовательностей (Aravin *et al*., 2004; Vagin *et al*., 2006; Brennecke *et al*., 2007; Klenov *et al*., 2007). Анализ нестабильности в гене *yellow* проводили, скрещивая самцов линии y^{+h}, гомозиготных или гетерозиготных по анализируемым генам (*piwi*^{2} и *aub*), с самками со сцепленными Х-хромосомами. Затем оценивали количество нормальных и мутантных самцов, появившихся в результате такого скрещивания, количество семей, взятых в анализ, и количество семей, несущих особей с мутантным фенотипом (табл. 1–3). Если все мутантные самцы оказывались в одной семье, то считалось, что это результат одного генетического события. Гомозиготные самцы по мутантному гену *spn-E* обладают пониженной жизнеспособностью или не выживают вовсе, поэтому анализировали лишь влияние гетерозигот *spn-E*/+ на частоту мутирования в гене *yellow*.

Когда гены *spn-E*, *piwi*^{2} и *aub* находились в гетерозиготном состоянии, частоты мутирования в гене *yellow* варьировали в проведенных экспериментах от 0,1 до 0,3 % (скрещивание № 1),

Таблица 1

Влияние мутации в гене *piwi²* на частоту мутирования аллеля y^{+h} у самцов различных генотипов

№ скрещивания	Генотип самцов-родителей	Число потомков	Число мутантов y^2, %	Число семей*	Число семей с мутациями, %
1	y^{+h}; *piwi²*/*Cy*	2812	9 (0,3)	77	4 (5,2)
2	y^{+h}; *piwi²*/+	2612	32 (1,2)	54	12 (22,2)
3К	y^{+h}; *Cy*/+	2931	23 (0,8)	69	12 (17,4)
4	y^{+h}; *piwi²*/*piwi²*	1229	9 (0,7)	38	5 (13,2)
5	y^{+h}; *piwi²*/+	1083	8 (0,7)	41	7 (17,1)
6К	y^{+h}; *Cy*/*L*	1085	0	39	0
7К	y^{+h}; *Cy*/+	1488	21 (1,4)	34	4 (11,8)

Примечание. * Здесь и в табл. 2, 3 каждая семья – все потомство двух самцов-родителей; К – контрольные скрещивания (генотип без *piwi²*).

Таблица 2

Влияние мутации в гене *aub* на частоту мутирования аллеля y^{+h} у самцов различных генотипов

№ скрещивания	Генотип самцов-родителей	Число потомков	Число мутантов y^2, %	Число семей*	Число семей с мутациями, %
1	y^{+h}; *aub*/*Cy*	2038	3 (0,2)	55	1 (1,8)
2	y^{+h}; *aub*/+	3426	25 (0,7)	64	13 (20,3)
3К	y^{+h}; *Cy*/+	3299	20 (0,6)	63	9 (14,3)
4	y^{+h}; *aub*/*aub*	509	0	15	0
5	y^{+h}; *aub*/+	2382	37 (1,6)	53	16 (30,2)

К – контрольные скрещивания (генотип без *aub*). Дополнительным контролем служили скрещивания 6К и 7К из табл. 1.

Таблица 3

Влияние мутации в гене *spn-E* на частоту мутирования аллеля y^{+h} у самцов различных генотипов

№ скрещивания	Генотип самцов-родителей	Число потомков	Число мутантов y^2, %	Число семей*	Число семей с мутациями, %
1	y^{+h}; *spn-E*/*D*	2158	2 (0,1)	60	1 (1,7)
2	y^{+h}; *spn-E*/+	2375	50 (2,1)	61	12 (19,7)
3К	y^{+h}; *D*/+	1758	61 (3,5)	56	16 (28,6)
6К	y^{+h}; *D*/*Sb*	799	0	34	0
7К	y^{+h}; *D*/+	3454	36 (1,0)	64	17 (26,6)

К – контрольные скрещивания (генотип без *spn-E*).

а в контроле (скрещивание 6К) мутантных самцов не было. В скрещивании № 2 частоты мутирования варьировали в эксперименте от 0,7 % для *aub*/+ до 2,1 % для *spn-E*, а в контроле (К3) – от 0,6 % для *aub*/+ до 3,5 % для *spn-E*. Частота семей, в которых возникали мутантные по гену *yellow* потомки, варьировала от 1,8 до 5,2 % в первом поколении

после скрещивания гетерозигот по мутациям *spn-E*, *piwi²* и *aub* с самками со сцепленными Х-хромосомами. После второго скрещивания с самками со сцепленными Х-хромосомами доля таких семей возросла в опыте до 19–22 %, в контроле – до 14–28 %.

Частота мутирования y^{+h}, когда *piwi²* находился в гомозиготе (скрещивание № 4) и в гетерозиготе (скрещивание № 5), была одинакова как по числу мутантных особей, так и по числу семей, где мутанты по гену *yellow* были обнаружены (табл. 1). Контролем для гомозигот *piwi²* служит скрещивание № 6, поскольку самцы линий y^{+h}; *Cy*/*L* впервые сталкиваются с линией со сцепленными Х-хромосомами, так же, как и гомозиготы *piwi²*. Частота мутирования в гене *yellow* в контроле № 6 равна нулю. Для гетерозигот из скрещивания № 5 контролем служит скрещивание № 7, где частота семей с вновь возникшими мутантами и частота мутантных потомков были на том же уровне, что и в эксперименте.

В случае гомозиготы *aub* (скрещивание № 4) мутантных потомков мы не обнаружили, возможно, потому, что в анализ было взято всего 15 семей, а у гетерозигот *aub*/+ (скрещивание № 5) частота семей, в которых возникли мутанты, и частота появления мутантных потомков были сопоставимы с результатами скрещивания № 2. То есть чем больше раундов скрещивания с самками из линии со сцепленными Х-хромосомами проходит Х-хромосома линии y^{+h}, тем более высокую частоту мутирования в гене *yellow* мы обнаруживаем. В первом скрещивании мы видели, что наличие гетерозиготы по мутациям в генах *spn-E*, *piwi²* и *aub* сказывалось на частоте мутирования в гене *yellow* по сравнению с контролем (скрещивание № 1 и контроль № 6). В контроле для гомозиготы по *piwi²* мы также не обнаружили мутаций по гену *yellow*. Однако получение гетеро- и гомозигот по генам *spn-E*, *piwi²* и *aub* сопровождалось дополнительным скрещиванием с особями линий, несущих эти мутации, что отличает их от контрольных линий. Возможно, повышенная по сравнению с контролем частота мутирования в гене *yellow* в первом скрещивании также не связана с наличием в геноме гетерозигот по генам *spn-E*, *piwi²* и *aub*, а обусловлена большей гетерогенностью тестируемых геномов.

Частота мутирования в нестабильном гене может варьировать со временем. Изменение частоты мутирования в исследуемом гене сопровождается изменением числа копий и местоположением *hobo* в геноме (Захаренко и др., 2004). Самцов с нестабильной Х-хромосомой часто содержат в линиях с самками со сцепленными Х-хромосомами для того, чтобы сохранить нестабильную хромосому, поскольку в каждом следующем поколении сцепленные Х-хромосомы достаются только самкам, а самцы-потомки в таких линиях могут содержать только нестабильную Х-хромосому. Утраченную локус-специфическую нестабильность в некоторых случаях удается восстановить, скрещивая самцов таких линий с посторонними самками со сцепленными Х-хромосомами. То есть имеет значение не просто нахождение хромосом с нестабильным геном в геномах таких самок, а тот факт, что в геном вносятся хромосомы, которые не контактировали ранее с хромосомой с нестабильным геном. Скрещивания с самками этой линии индуцируют генетическую нестабильность и в других линиях (Захаренко и др., 2000; Коваленко и др., 2006). В линии $y^{2\text{-}717}$ было получено несколько производных, когда за счет рекомбинаций между двумя *hobo*-элементами был получен каскад мутантных производных, менявших фенотип от нормы к yellow-2 и обратно. Однако молекулярно-генетические характеристики гена *yellow*, несмотря на фенотипическое сходство производных, не повторялись, поскольку рекомбинации всякий раз шли с разными парами *hobo* и сопровождались новыми перемещениями *hobo*. Со временем фенотипическая нестабильность затухала, хотя молекулярно-генетические события, меняющие структуру гена *yellow*, продолжались, по крайней мере, на протяжении года.

Таким образом, на частоте мутирования в гене *yellow* в большей степени сказываются скрещивания исследуемых мух с мухами линий со сцепленными Х-хромосомами, чем наличие в геноме гетерозиготности по мутациям в генах *spn-E*, *piwi²* и *aub* или даже гомозиготности по мутации в гене *piwi²*. Либо эти мутации мало сказываются на активности *hobo*-элемента, либо в локус-специфической нестабильности гена *yellow* рекомбинации между *hobo*-элементами играют гораздо большую роль, чем скорость его перемещения.

Благодарности

Работа частично поддержана грантами РФФИ № 09-04-00213а и № 09-04-00872-а, программой РАН «Биоразнообразие» Б 23.29. Линии *spn-E*, *piwi*^{2} и *aub* любезно предоставлены профессором В.А. Гвоздевым.

Литература

Захаренко Л.П., Захаров И.К., Волошина М.А. и др. Причина сохранения высокой нестабильности по гену *yellow* в линиях *Drosophila melanogaster*, выделенных в период «моды на мутацию» в популяции Умани // Генетика. 2004. Т. 40. № 3. С. 316–321.

Захаренко Л.П., Захаров И.К., Романова О.А. и др. «Мода на мутацию» в природной популяции *Drosophila melanogaster* Умани вызвана распространением индуцированной *hobo*-элементом нестабильной инверсии регуляторной части гена *yellow* // Генетика. 2000. Т. 36. № 6. С. 1–9.

Коваленко Л.В., Захаренко Л.П., Захаров И.К. Транспозиции *hobo*-элемента в соматических клетках *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2006. Т. 42. № 2. С. 177–184.

Aravin A.A., Klenov M.S., Vagin V.V. *et al*. Dissection of a natural RNA silencing process in the *Drosophila melanogaster* germ line // Mol. Cell Biol. 2004. V. 24. P. 6742–6750.

Bartolomé C., Bello X., Maside X. Widespread evidence for horizontal transfer of transposable elements across *Drosophila* genomes // Genome Biol. 2009. V. 10. N 2. R22.

Brennecke J., Aravin A.A., Stark A. *et al*. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in Drosophila // Cell. 2007. V. 128. P. 1089–1103.

Esnault C., Palavesam A., Pilitt K., O'Brochta D.A. Intrinsic characteristics of neighboring DNA modulate transposable element activity in *Drosophila melanogaster* // Genetics. 2011. V. 187. N 1 P. 319–331.

Harada K., Yukuhiro K., Mukai T. Transposition rates of movable genetic elements in *Drosophila melanogaster* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 3248–3252.

Kapitonov V.V., Jurka J. Molecular paleontology of transposable elements in the *Drosophila melanogaster* genome // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. N 11. P. 6569–6574.

Klenov M.S., Lavrov S.A., Stolyarenko A.D. *et al*. Repeat-associated siRNAs cause chromatin silencing of retrotransposons in the *Drosophila melanogaster* germline // Nucl. Acids Res. 2007. V. 35. N 16. P. 5430–5438.

Lipatov M., Lenkov K., Petrov D.A., Bergman C.M. Paucity of chimeric gene-transposable element transcripts in the Drosophila melanogaster genome // BMC Biol. 2005. 3. 24.

Saville K.J., Warren W.D., Atkinson P.W., O'Brochta D.A. Integration specificity of the *hobo* element of *Drosophila melanogaster* is dependent on sequences flanking the integration site // Genetica. 1999. V. 105. N 2. P. 133–147.

Thibalt S.T., Singer M.A., MiyazakiI W.Y. *et al*. *P* and *piggyBac* transposons display a complementary insertion spectrum in *Drosophila*: A multifunctional tool kit to manipulate an insect genome // Nat. Genet. 2004. V. 36. P. 283–287.

Vagin V.V., Sigova A., Li C. *et al*. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline // Science. 2006. V. 313. N 5785. P. 320–324.

MUTATIONS IN GENES *spn-E*, *piwi*^{2}, AND *aub*, INFLUENCING SMALL RNA PRODUCTION, DO NOT INFLUENCE THE RATE OF MUTATIONS ASSOCIATED WITH A *hobo* INSERTION IN THE *yellow* GENE OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

L.P. Zakharenko, M.A. Voloshina

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: zakharlp@bionet.nsc.ru;
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Effects of mutations in the *spn-E*, *piwi*^{2}, and *aub* genes of *Drosophila melanogaster*, involved in small RNA production, on the mutation frequency in the highly unstable y^{+h} allele, formed by an insertion of a *hobo* copy in the regulatory region of the *yellow* gene were studied. Mutation frequencies were assessed by crossing males with the genotypes y^{+h}; *piwi*/*Cy*, y^{+h}; *piwi*/*piwi*, y^{+h}; aub/Cy and y^{+h}; *spn-E*/*TM3* to females with linked X-chromosomes. The frequency of mutations in the *yellow* gene depended to a greater extent on the cross to the strain with linked X-chromosomes than on the presence of a mutation in the *spn-E*, *piwi*^{2}, or *aub* genes. The locus-specific instability in y^{+h} allele is the sum of *hobo* transpositions and recombination events involving the *hobo* from the regulatory region of *yellow*. It appears that either the mutations under study do not affect the activity of the *hobo* copy or recombinations between *hobos* are much more significant for the locus-specific instability in *yellow* than the transposition rate.

Key words: *Drosophila melanogaster*, *yellow*, *hobo*, transposable elements, *spn-E*, *piwi*^{2}, *aub*.

МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ В СОСТАВЕ ДНК ХРОМОЦЕНТРА ТРОФОЦИТОВ *DROSOPHILA ORENA* (DIPTERA, DROSOPHILIDAE)

К.Е. Усов, В.Н. Стегний

Научно-исследовательский институт биологии и биофизики
при Томском государственном университете, Томск, Россия, e-mail: usovke@rambler.ru

При помощи метода микродиссекции была получена район-специфичная библиотека ДНК хромоцентра политенных хромосом трофоцитов *Drosophila orena*. Далее фрагменты этой библиотеки клонировали в плазмидном векторе и получили 133 клона. Провели секвенирование 76 клонов. Был осуществлен поиск гомологии клонов с известными мобильными генетическими элементами из геномов различных видов рода *Drosophila* с помощью программы «RepeatMasker» в базе данных «RepBase». В результате была найдена гомология 33 клонов библиотеки с участками различных МГЭ. Из них 26 клонов были гомологичны участкам LTR-ретротранспозонов (*Gypsy*, *Idefix*, *Zam*, *Roo*, *Quasimodo*, *Stalker*, *HMS Beagle*, *Copia*, *Tv1*, *Circe*, *DM297*), 4 – участкам LINE-элементов (*DMCR1A*, *G3*, *Helena*, *I*). Для остальных показана значимая гомология с участками ДНК-транспозонов, полинтонов и гелитронов: *DNAREP1_DM*, *Polinton-1_DY*, *Helitron-1_DYak*. Один клон оказался гомологичен участку *MINIME_DN*, относящемуся к группе не-LTR-ретротранспозонов *mini-me*.

Ключевые слова: *Drosophila orena*, политенные хромосомы, гетерохроматин, трофоциты яичников, микродиссекция, секвенирование, молекулярная генетика, мобильные генетические элементы.

Введение

Хроматин определяют как комплекс геномной ДНК, гистоновых и негистоновых белков и РНК. Различают два типа хроматина – эухроматин и гетерохроматин. Последовательности ДНК гетерохроматина представлены тандемными повторами, диспергированными повторами и небольшим количеством генов (Hoskins *et al*., 2002). ДНК гетерохроматина трудно поддается секвенированию и последующему анализу из-за обогащенности повторами. Поэтому даже оконченные и опубликованные проекты по секвенированию геномов разных организмов, по сути, содержат информацию только о нуклеотидных последовательностях ДНК эухроматина. Сейчас стало очевидным, что для понимания принципов функционирования генома эукариот необходима полная информация о составе его последовательностей. Ведется работа по расшифровке нуклеотидной последовательности ДНК гетерохроматина у многих организмов. Определенный успех достигнут в расшифровке последовательности несателлитной части ДНК гетерохроматина человека (Horvath *et al*., 2000), *Arabidopsis thaliana* (Haupt, 2001) и *Drosophila melanogaster* (Carvalho, 2002).

Согласно одной из схем филогенеза подгруппы melanogaster (Стегний, Вассерлауф, 1994), *D. orena* является анцестральным видом для всей подгруппы. Для многих видов данной подгруппы (*D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. erecta*, *D. yakuba*) полностью или частично известна нуклеотидная последовательность ДНК эухроматина (Clark *et al*., 2007). Наиболее полные данные о последовательностях ДНК эухроматина и гетерохроматина к настоящему моменту опубликованы только для *D. melanogaster* (Clark *et al*., 2007; Smith *et al*., 2007). Размер генома *D. orena* больше, чем у остальных видов подгруппы, в основном за счет повышенного содержания повторенной ДНК гетерохроматина (Boulesteix *et al*., 2006), и данные о последовательностях генома этого

вида практически отсутствуют в литературе. Известно, что гетерохроматин в ядрах трофоцитов яичников дрозофилы представлен в большей степени, чем в ядрах клеток слюнных желез (Mal'ceva, Zhimulev, 1993). В связи с этим изучение состава ДНК хромоцентра трофоцитов *D. orena* может дать общее представление об организации последовательностей ДНК гетерохроматина у этого вида.

Одним из этапов анализа состава ДНК хромоцентра трофоцитов *D. orena* был поиск мобильных генетических элементов, так как известно, что они являются одним из составляющих компонентов гетерохроматина (Smith *et al*., 2007).

Материалы и методы

Приготовление препаратов политенных хромосом для микродиссекции

Для приготовления препаратов политенных хромосом для микродиссекции использовались яичники самок *D. orena* в возрасте 1–1,5 сут. Яичники выделяли в 0,7 %-м растворе NaCl и фиксировали в растворе Карнуа (96 %-й этанол и ледяная уксусная кислота – 3 : 1). Затем яичники инкубировали в 45 %-й уксусной кислоте в течение 5 мин, накрывали покровным стеклом и раздавливали. Препараты замораживали в жидком азоте, затем дегидратировали в батарее спиртов (этанол) увеличивающейся концентрации (50 % – при –20 ºС 5 мин, 70 и 100 % – при –4 ºС по 5 мин), инкубировали в растворе Карнуа при –4 ºС 5 мин, высушивали на воздухе в течение 5 мин, ополаскивали в 100 %-м этаноле и снова высушивали.

Микродиссекция хромоцентра *D. orena* и амплификация ДНК хромоцентра

Для получения набора фрагментов ДНК из хромоцентра политенных хромосом ядер трофоцитов яичников *D. orena* был использован метод микродиссекции. Микродиссекцию проводили на микроскопе AXIOVERT 10, оснащенном микроманипулятором MRmot (Zeiss, ФРГ) и механическим позиционером, в стерильных условиях специально приготовленными для этого микродиссекционными иглами. Диссектированный материал переносили в коллекционную каплю (20–40 нл), помещенную в силиконизированную микропипетку. Коллекционная капля содержала 10 мМ Трис HCl (pH 7,5), 10 мМ NaCl, 0,1 % SDS, 30 % глицерин, 500 мкг/мл протеиназы К (Boehringer Mannheim). Во время сбора микропипетка находилась во влажной камере при комнатной температуре. По завершении сбора необходимого числа копий хромосомных районов пипетку с диссектированным хромосомным материалом переносили в стальную коробку, помещенную в водяную баню (60 °С), на 2 часа. Амплификация диссектированного материала с частично вырожденным праймером – DOP-ПЦР проводилась так же, как описано ранее (Рубцов и др., 1999).

Клонирование фрагментов ДНК-библиотеки

Амплифицированную ДНК очищали с помощью колонки «QIA quick PCR Purification Column» (QIAGEN, Германия) и встраивали в плазмидный вектор pCR®4-TOPO® (TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing, Invitrogen, США). Полученную ДНК использовали для трансформации компетентных клеток *Escherichia coli*. Для этого 2,5 мкл лигазной смеси (0,5 мкл смеси солей ($NaCl + MgCl_2$), 0,5 мкл TOPO-вектора, 1,5 мкл ПЦР-продукта) добавляли к 25 мкл компетентных клеток, оставляли на льду 5 мин, затем обрабатывали клетки тепловым шоком (30 с на водяной бане при 42 °С), помещали клетки на 2 мин в лед. К клеткам добавляли 125 мкл теплой восстановительной среды, перемешивали в течение 1 ч при 37 °С. Выращивание клеток на селективной среде, отбор колоний, их выращивание на жидкой среде и экстракцию плазмидной ДНК выполняли по стандартным протоколам (Маниатис и др., 1984). Наличие встройки проверяли амплификацией с праймерами M13F (5′-GTAAAACGACGGCCAG-3′) и M13R (5′-CAGGAAACAGCTATGAC-3′) и последующим электрофоретическим разделением фрагментов в 1,5 %-м агарозном геле.

Секвенирование и анализ *in silico* последовательностей ДНК-библиотеки

Клоны библиотеки были секвенированы с помощью BigDye Terminators v. 3.1 (Applied

Biosystems, США) на секвенаторе лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).

Концентрацию плазмидной ДНК и ПЦР-продукта в растворе, а также чистоту образцов (отсутствие примесей белков и РНК) определяли при помощи спектрофотометра NanoDrop ND-100.

Для постановки секвенирующей реакции готовили смесь: 1 мкл 5 × буфера для секвенирования (400 мкМ Tris HCl pH 9,0, 10 мкМ $MgCl_2$), 2 мкл BigDye Terminators v. 3.1 (Applied Biosystems, США), праймер 0,3 мкл 10 мкМ (M13F, M13R), 500–1000 нг плазмидной ДНК или 50–150 нг ПЦР-продукта и добавляли стерильную H_2O, доводя объем смеси до 10 мкл. Реакцию проводили в режиме: денатурация при 94 °С – 2 мин; 20 циклов: денатурация при 94 °С – 15 с, отжиг при 53 °С – 20 с, элонгация цепей при 60 °С – 4 мин. Затем к смеси добавляли 10 мкл LPA (linea polyacrylamide) и 30 мкл 100 % изопропанола, перемешивали, держали 30 мин при комнатной температуре. Центрифугировали смесь 15 мин при 14 000 об/мин, супернатант удаляли. Добавляли 150 мкл 75 % изопропанола, сразу центрифугировали смесь 10 мин при 14 000 об/мин, супернатант удаляли. Подсушивали осадок в течение 30 мин при 37 °С и растворяли его в 4 мкл Loading buffer (5 : 1 деионизованный формамид и 25 мкМ EDTA). Для секвенирования использовали полиакриламидный гель, на старт наносили 2 мкл ДНК, растворенной в Loading buffer.

Анализ последовательностей ДНК *in silico*: поиск гомологии клонированных фрагментов с известными мобильными генетическими элементами из геномов видов *Drosophila* подгруппы melanogaster проводился с помощью программы «RepeatMasker» в базе данных «RepBase» (режим доступа http://repeatmasker.genome.washington.edu).

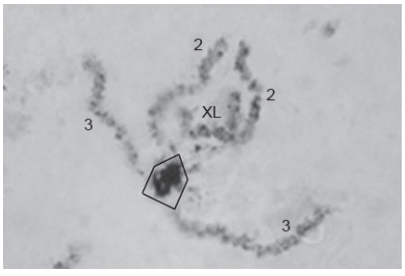


Рис. 1. Политенные хромосомы трофоцитов яичников *D. orena*.

Рамкой выделен микродиссектированный хромоцентр; XL, 2, 3 – политенные хромосомы.

Результаты и обсуждение

Получение районоспецифичной библиотеки ДНК хромоцентра политенных хромосом трофоцитов *D. orena*

При использовании метода микродиссекции политенных хромосом (Рубцов и др., 1999) было вырезано 4 хромоцентра с двух препаратов политенных хромосом трофоцитов яичников *D. orena*. Диссектированный район представлен на рис. 1.

Затем диссектированный материал амплифицировали с помощью ПЦР с частично вырожденным праймером (DOP-ПЦР) и получили смесь фрагментов (районоспецифичную библиотеку ДНК) длиной от 200 до 1 т.п.н., которой было присвоено имя «Dore1».

Анализ фрагментов библиотеки ДНК «Dore1» на наличие гомологии с известными мобильными генетическими элементами из геномов видов подгруппы melanogaster

В результате клонирования в плазмидном векторе фрагментов район-специфичной библиотеки ДНК хромоцентра политенных хромосом трофоцитов *D. orena* было получено 133 клона. Далее было отобрано 76 клонов и проведено их секвенирование. Общая длина просеквенированных фрагментов составила 23940 п.н. Нуклеотидные последовательности фрагментов библиотеки были опубликованы в базе данных «GenBank» (режим доступа: http://www.ncbi.nlm.nih.gov; индексы доступа с HM594089 по HM594162).

При использовании базы данных программы «RepeatMasker», которая постоянно обновляется при аннотировании новых повторов и мобильных элементов, была найдена гомология 33 клонов минибиблиотеки с участками различных МГЭ из геномов видов подгруппы melanogaster (табл. 1).

Таблица 1

Мобильные генетические элементы в составе ДНК хромоцентра трофоцитов *D. orena*

Название клона и его размер	SW score*	Дивер-генция, %	Область гомологии клона	Цепь	Название повтора	Класс/семейство повторов
3R (438 п.н.)	1424	16,3	17–283	+	*Gypsy3_I*	LTR/*Gypsy*
	462	21,5	316–432	C	*Gypsy9_I*	LTR/*Gypsy*
P15F (564 п.н.)	2834	12,6	4–544	+	*Gypsy10_I*	LTR/*Gypsy*
P35F (235 п.н.)	1250	12,0	18–221	C	*IDEFIX_I*	LTR/*Gypsy*
P40F (546 п.н.)	3255	12,2	17–526	C	*DM297_I*	LTR/*Gypsy*
P41F (353 п.н.)	1283	10,0	15–225	C	*DNAREP1_DM*	DNA/*Helitron*
	519	18,4	114–243	C	*MINIME_DN*	Unknown
P42F (469 п.н.)	2113	15,7	11–450	C	*Quasimodo_I*	LTR/*Gypsy*
P43F (399 п.н.)	2088	8,7	21–370	+	*Polinton-1_DY*	DNA/*Maverick*
P45F (211 п.н.)	776	19,9	18–173	+	*G3_DM*	LINE/*Jockey*
P49F (390 п.н.)	737	17,9	73–208	+	*Gypsy3_I*	LTR/*Gypsy*
P51F (205 п.н.)	643	23,0	11–187	+	*ROO_I*	LTR/Roo
P60F (200 п.н.)	856	9,8	10–188	C	*STALKER4_I*	LTR/*Gypsy*
P67F (256 п.н.)	1710	4,4	15–240	C	*ZAM_I*	LTR/*Gypsy*
P68F (333 п.н.)	182	18,4	267–315	+	*HMS BEAGLE_I*	LTR/*Gypsy*
P74F (295 п.н.)	878	26,8	14–289	C	*Gypsy_I*	LTR/*Gypsy*
P80F (225 п.н.)	457	19,5	11–206	C	*I_DM*	LINE/*I*
P81F (328 п.н.)	1268	10,5	125–318	+	*Helitron-1_DYak*	DNA/*Helitron*
P82F (300 п.н.)	1089	22,6	17–289	C	*Gypsy3_I*	LTR/*Gypsy*
P85F (451 п.н.)	269	26,9	242–427	C	*TV1I*	LTR/*Gypsy*
	175	26,6	19–121	C	*TV1I*	LTR/*Gypsy*
P88F (223 п.н.)	268	28,0	19–214	+	*QUASIMODO2-I_DM*	LTR/*Gypsy*
P91F (152 п.н.)	296	18,4	25–101	C	*DMCR1A*	LINE/*CR1*
	207	16,4	81–139	C	*DMCR1A*	LINE/*CR1*
P92F (194 п.н.)	1026	7,0	20–182	C	*STALKER4_I*	LTR/*Gypsy*
P95F (485 п.н.)	337		19–224	C	*IDEFIX_LTR*	LTR/*Gypsy*
P109F (334 п.н.)	862	13,3	16–168	C	*Gypsy3_I*	LTR/*Gypsy*
	560	10,5	167–318	+	*DNAREP1_DM*	DNA/*Helitron*
P116F (251 п.н.)	202	28,4	141–218	+	*ZAM_I*	LTR/*Gypsy*
P117F (311 п.н.)	1583	13,6	15–291	+	*ROO_I*	LTR/*Roo*
P121F (303 п.н.)	272	18,9	76–301	+	*IDEFIX_LTR*	LTR/*Gypsy*
	290	11,8	22– 75	+	*IDEFIX_I*	LTR/*Gypsy*
P123F (251 п.н.)	391	19,9	140–246	+	*CIRCE*	LTR/*Circe*
P125F (417 п.н.)	3040	6,8	19–415	+	*HELENA_RT*	LINE/*Jockey*
P126F (374 п.н.)	236	22,5	82–139	+	*ZAM_I*	LTR/*Gypsy*
P16F (249 п.н.)	989	16,9	14–236	+	*ROO_I*	LTR/*Roo*
P59F (283 п.н.)	617	20,0	71–210	+	*Gypsy3_I*	LTR/*Gypsy*
P131F (738 п.н.)	172	24,1	31– 90	+	*Copia_I*	LTR/*Copia*
P8F (413 п.н.)	933	32,7	23–403	+	*Gypsy4_I*	LTR/*Gypsy*

Примечание. * Параметр SW score – значение критерия Smith-Waterman score; C – комплементарная цепь; п.н. – пары нуклеотидов.

Среди 33 клонов, гомологичных участкам различных МГЭ, 26 клонов были гомологичны участкам LTR-ретротранспозонов, 4 – участкам LINE-элементов. Для остальных показана значимая гомология с участками недавно открытых ДНК-транспозонов полинтонов и гелитронов (Polintons и Helitrons) *D. melanogaster* и других видов: *DNAREP1_DM*, *Polinton-1_DY*, *Helitron-1_DYak*. Один клон гомологичен участку МГЭ *MINIME_DN*, относящемуся к группе не-LTR-ретротранспозонов *mini-me*.

Известно, что среди основных классов МГЭ как в эухроматине, так и в гетерохроматине *D. melanogaster* наиболее богато представлен класс LTR-ретротранспозонов, в меньшей степени представлены не-LTR-ретротранспозоны (LINE) и менее всего ДНК-транспозоны (Kaminker *et al*., 2002; Smith *et al*., 2007). Аналогичное соотношение классов МГЭ характерно и для минибиблиотеки ДНК хромоцентра *D. orena* (табл. 1).

Неожиданным оказался тот факт, что ни один клон минибиблиотеки не показал значимой гомологии с МГЭ, относящимся к таким ДНК-транспозонам, как TIR и FB. Поскольку установлено, что в геноме *D. melanogaster* и в геномах других филогенетически близких видов дрозофил они занимают существенную часть (Hoskins *et al*., 2002; Kaminker *et al*., 2002; Feschotte *et al*., 2009). Возможно, для гетерохроматина *D. orena* характерно очень низкое содержание TIR- и FB-элементов, и вследствие этого при создании минибиблиотеки они не вошли в ее состав. Интересно, что поиск FB-элементов в гетерохроматине *D. melanogaster* с помощью программы «RepeatMasker» не увенчался успехом, но их удалось обнаружить при помощи других методических подходов (Hoskins *et al*., 2002). Кроме того, была осуществлена *in situ* гибридизация (в качестве ДНК-проб выступали некоторые представители TIR-элементов *D. melanogaster*) для установления хромосомной локализации некоторых МГЭ у *D. orena* и саузерн-блот-гибридизация для установления наличия/отсутствия этих же МГЭ в геноме данного вида (Bi′emont, Cizeron, 1999). В результате и *in situ*, и саузерн-блот-гибридизации показано отсутствие TIR-элементов в геноме *D. orena*. Однако показано их высокое содержание в геномах *D. melanogaster* и *D. simulans* (Bi´emont, Cizeron, 1999).

Среди LTR-ретротранспозонов были обнаружены: *gypsy* (8 клонов), *Idefix* (3 клона), *Zam* (3 клона), *roo* (3 клона), *Quasimodo* (2 клона), *Stalker* (2 клона), *HMS Beagle* (1 клон), *copia* (1 клон), *Tv1* (1 клон), *Circe* (1 клон), *DM297* (1 клон). Четыре клона гомологичны участкам не-LTR-ретротранспозонов (LINE-элементов): *DMCR1A* (1 клон), *G3*, *Helena*, *I* (по 1 клону) (табл. 1). Таким образом, при анализе минибиблиотеки хромоцентра *D. orena* показано, что различные представители семейства *gypsy* преобладали над представителями других семейств МГЭ. Интересно, что *gypsy*-подобные ретротранспозоны содержат инсуляторные последовательности, по молекулярным свойствам являющиеся MAR/SAR ДНК и ДНК ядерной ламины (Nabirochkin *et al*., 1998; Gerasimova *et al*., 2000). Кроме того, установлено, что последовательности инсулятора *gypsy* вызывают в интерфазном ядре у *D. melanogaster* прикрепление сайтов даже единичных инсерций к ядерной оболочке.

Также показано, что у *D. melanogaster*, содержащей эти элементы в прицентромерном гетерохроматине, политенные хромосомы трофоцитов яичников образуют прочные контакты с ядерной оболочкой, причем независимые для каждой хромосомы (Стегний, Вассерлауф, 1994). Возможно, что способность района прицентромерного гетерохроматина к прикреплениям к оболочке зависит от присутствия в нем в достаточном количестве встроек *gypsy*-подобных LTR-ретротранспозонов. Принимая во внимание все вышесказанное, можно предположить, что обилие *gypsy*-подобных ретротранспозонов в хромоцентре *D. orena* дает ему возможность прикрепляться к ядерной оболочке.

Кроме того, была найдена значимая гомология клона P43F (табл. 1) с участком одного из представителей недавно открытого подкласса ДНК-транспозонов, названных полинтонами (Polintons) (Kapitonov, Jurka, 2006; Feschotte *et al*., 2009): *Polinton-1_DY D. yakuba*. Полинтоны являются самыми сложными ДНК-транспозонами эукариот, так, например, *Polinton-1_DY D. yakuba* имеет длину 14782 п.н. Необходимо отметить, что *Polinton-1_DY* обнаружен в геноме *D. yakuba* совсем недавно и пока не найден в геномах других видов *Drosophila* (Kapitonov, Jurka, 2006). Таким образом, удалось впервые

показать наличие данного полинтона в геноме *D. orena*.

Также была найдена значимая гомология трех клонов минибиблиотеки с участками сравнительно недавно открытых транспозонов, гелитронов (Helitrons), которые даже предложили выделить в отдельный подкласс ДНК-транспозонов (Kapitonov, Jurka, 2001; Poulter *et al*., 2003; Hood, 2005; Feschotte *et al*., 2009): *DNAREP1 D. melanogaster* (2 клона) и *Helitron-1 D. yakuba* (1 клон) (табл. 1). Семейство МГЭ *DNAREP1* является древним семейством МГЭ, появившимся в геноме *D. melanogaster* около 10 млн лет назад, и в настоящее время эти элементы, согласно исследованиям некоторых авторов, являются наиболее многочисленными в геноме *D. melanogaster*. На *DNAREP1* приходится до 1 % генома данного вида (Kapitonov, Jurka, 2003, 2007). Присутствие элемента *DNAREP1*, также называемого *Drosophila interspersed element 1* (*DINE-1*), свойственного геному *D. melanogaster*, в геноме *D. orena* не является необычным, так как этот элемент найден в геномах многих видов рода *Drosophila*, геномы которых были частично или полностью секвенированы. Но в то же время *DINE-1* не был обнаружен за пределами отряда Diptera (Kapitonov, Jurka, 2007). Известно, что геном *D. melanogaster* содержит огромное количество копий *DNAREP1* – до нескольких тысяч (Kapitonov, Jurka, 2003), однако подобной обогащенности гетерохроматина хромоцентра *D. orena* этим элементом найдено не было. Что касается *Helitron-1 D. yakuba*, то он обнаружен совсем недавно по сравнению с *DINE-1*, вследствие этого его присутствие в геномах других видов рода *Drosophila* изучено недостаточно. Таким образом, было впервые показано наличие в геноме *D. orena* мобильного элемента *Helitron-1 D. yakuba*.

Интересно, что степень дивергенции консенсусных последовательностей элементов *Polinton-1_DY* и *Helitron-1 D. yakuba* и последовательностей, найденных у *D. orena*, очень низка (8,7 и 10,5 % соответственно), что, очевидно, связано с филогенетической близостью *D. orena* и *D. yakuba*.

Кроме того, была обнаружена гомология одного клона (P41F) (табл. 1) минибиблиотеки «Dore1» с участком МГЭ *MINIME_DN*, который принадлежит к открытой в 2001 г. у видов *D. dunni* и *D. nigrodunni* группе ретропозонов *mini-me* (Wilder, Hollocher, 2001). Эти элементы, в настоящее время относимые к не-LTR-ретротранспозонам, принимают участие в образовании микросателлитов. Они очень многочисленны в геноме *D. melanogaster* (3395 копий на геном) и найдены в геномах 16 видов *Drosophila*, принадлежащих к различным филогенетическим группам (Wilder, Hollocher, 2001). Стоит отметить, что клон P41F имеет гомологию не только с участком элемента *mini-me*, но и с участком элемента *DNAREP1*. Согласно одной из классификаций (Yang, Barbash, 2008), эти элементы относятся к одному надсемейству (SINE-подобные элементы) и, возможно, частично гомологичны друг с другом.

В целом надо сказать, что дивергенция найденных элементов от консенсусной последовательности варьирует от 4,4 до 32,7 % (табл. 1), в среднем составляя 17 %, что несколько больше, чем составляет в норме варьирование внутри семейства МГЭ у *D. melanogaster* (13,4 %). Однако это вполне объяснимо, если принять во внимание тот факт, что *D. orena* достаточно далеко отстоит от *D. melanogaster* в филогенетическом отношении, а большинство из МГЭ, представленных в базе данных «RepBase», принадлежат геному *D. melanogaster*.

Необходимо отметить, что среди МГЭ, обнаруженных в составе минибиблиотеки ДНК «Dore1» (табл. 1), встречались как молодые МГЭ, так и древние, от которых сохранились лишь небольшие фрагменты с низким уровнем гомологии.

В настоящее время детально описаны разнообразные семейства МГЭ, входящие в состав эухроматина *D. melanogaster* (Kaminker *et al*., 2002). Кроме того, проводятся активные работы в этом направлении и для гетерохроматина *D. melanogaster* (Smith *et al*., 2007). Также были секвенированы геномы (ДНК эухроматина) 12 видов *Drosophila* (в том числе *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. erecta* и *D. yakuba*) и получены предварительные результаты по содержанию различных МГЭ (Clark *et al*., 2007). Что касается *D. orena*, то литературные данные по разнообразию МГЭ в эухроматине, а тем более в гетерохроматине, практически отсутствуют за исключением работы C. Bi´emont и G. Cizeron, (1999). В этой работе была предпринята попытка оце-

нить количество и распределение копий целого ряда МГЭ, относящихся к разным классам, в геномах 228 видов рода *Drosophila*, среди которых был и вид *D. orena*. Однако относительно полные данные представлены опять же только для *D. melanogaster*. В целом можно отметить, что самое большое число копий различных МГЭ было обнаружено в геномах *D. melanogaster* и *D. simulans*. Количество же копий МГЭ в геномах других видов подгруппы melanogaster в целом ниже, а у *D. erecta*, *D. teissieri* и *D. orena* МГЭ вообще удается локализовать только в хромоцентре. Однако преимущественная локализация в хромоцентре может быть характерна для последовательностей, гомологичных МГЭ *D. melanogaster*, использованных в экспериментах в качестве проб (Bi´emont, Cizeron, 1999).

Таким образом, в результате настоящего исследования впервые описано разнообразие мобильных генетических элементов, которые локализованы в хромоцентре трофоцитов *D. orena*. Среди обнаруженных МГЭ преобладали LTR-ретротранспозоны, но также были выявлены МГЭ, которые принадлежат к группе LINE-элементов. Кроме того, были обнаружены такие представители ДНК-транспозонов, как гелитроны и полинтоны, и один представитель не-LTR-ретротранспозонов, *mini-me* (который принимает участие в образовании микросателлитов).

Авторы выражают искреннюю благодарность Е.А. Елисафенко (лаборатория эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск) за помощь в анализе последовательностей ДНК *in silico*, а также благодарят всех сотрудников лаборатории эпигенетики развития за методическую помощь и полезное обсуждение работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке: проект ФЦП № П 801; грант РФФИ № 10-04-01059.

Литература

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.

Рубцов Н.Б., Жимулев И.Ф., Алексеенко А.А. и др. Микроклонирование и характеристика ДНК из районов прицентромерного гетерохроматина политенных хромосом *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1999. Т. 35. № 1. С. 55–61.

Стегний В.Н., Вассерлауф И.Э. Видовая архитектоника хромосом генеративной ткани и проблема филогенетических отношений в подгруппе «melanogaster» рода *Drosophila* (Sophophora) // Генетика. 1994. Т. 30. № 4. С. 478–483.

Bi´emont C., Cizeron G. Distribution of transposable elements in Drosophila species // Genetica. 1999. V. 105. P. 43–62.

Boulesteix M., Weiss M., Biémont C. Differences in genome size between closely related species: The *Drosophila melanogaster* species subgroup // Mol. Biol. Evol. 2006. V. 23. N 1. P. 162–167.

Carvalho A.B. Origin and evolution of the Drosophila Y chromosome // Curr. Opin. Genet. Dev. 2002. N 12. P. 664–668.

Clark A.G., Eisen M.B., Smith D.R., Bergman C.M. Evolution of genes and genomes on the Drosophila phylogeny // Nature. 2007. V. 450. N 8. P. 203–218.

Feschotte C., Keswani U., Ranganathan N. Exploring repetitive DNA landscapes using REPCLASS, a tool that automates the classification of transposable elements in eukaryotic genomes // Genome Biol. Evol. 2009. V. 1. P. 205–220.

Gerasimova T.I., Byrd K., Corces V.G. A chromatin insulator determines the nuclear localization of DNA // Mol. Cell. 2000. V. 6. N 5. P. 1025–1035.

Haupt W., Fischer T.C., Winderl S. *et al*. The centromere1 (CEN1) region of *Arabidopsis thaliana*: architecture and functional impact of chromatin // Plant J. 2001. V. 27. P. 285–296.

Hood M.E. Repeat-induced point mutation and the population structure of transposable elements in *Microbotryum violaceum* // Genetics. 2005. V. 170. P. 1081–1089.

Horvath J.E., Schwartz S., Eichler E.E. The mosaic structure of human pericentromeric DNA: a strategy for characterizing complex regions of the human genome // Genome Res. 2000. N 10. P. 839–852.

Hoskins R.A., Smith C.D., Carlson J.W. *et al*. Heterochromatic sequences in a Drosophila whole-genome shotgun assembly // Genome Biol. 2002. V. 3. N 12. R0085.1–R0085.16.

Kaminker J.S., Bergman C.M., Kronmiller B. *et al*. The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective // Genome Biol. 2002. V. 3. N 12. R0084.1–R0084.20.

Kapitonov V.V., Jurka J. Rolling-circle transposons in eukaryotes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 8714–8719.

Kapitonov V.V., Jurka J. Molecular paleontology of transposable elements in the *Drosophila melanogaster* genome // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. N 11. P. 6569–6574.

Kapitonov V.V., Jurka J. Self-synthesizing DNA transposons in eukaryotes // Proc. Natl Acad. Sci. USA.

2006. V. 103. N 12. P. 4540–4545.
Kapitonov V.V., Jurka J. Helitrons on a roll: eukaryotic rolling-circle transposons // Trends Genet. 2007. V. 23. N 10. P. 521–529.
Mal'ceva N.I., Zhimulev I.F. Extent of polyteny in the pericentric heterochromatin of polytene chromosomes of pseudonurse cells of otu (ovarian tumor) mutants of *Drosophila melanogaster* // Mol. Gen. Genet. 1993. V. 240. P. 273–276.
Nabirochkin S., Ossokina M., Heidmann T. Scaffold attachment region co-localizes with the *gypsy* retrotransposon insulator sequense // J. Biol. Chem. 1998. V. 23. P. 247–273.
Poulter R.T., Goodwin T.J., Butler M.I. Vertebrate *helentrons* and other novel Helitrons // Gene. 2003. V. 313. P. 201–212.
Smith C.D., Shu S.Q., Mungall Ch.J., Karpen G.H. The release 5.1 annotation of *Drosophila melanogaster* heterochromatin // Science. 2007. V. 316. P. 1586–1591.
Wilder J., Hollocher H. Mobile elements and the genesis of microsatellites in Dipterans // Mol. Biol. Evol. 2001. V. 18. N 3. P. 384–392.
Yang H.-P., Barbash D.A. Abundant and species-specific *DINE-1* transposable elements in 12 *Drosophila* genomes // Genome Biol. 2008. V. 9. N 2. R 39.

TRANSPOSABLE ELEMENTS IN THE NURSE CELL CHROMOCENTER DNA OF *DROSOPHILA ORENA* (DIPTERA, DROSOPHILIDAE)

K.E. Usov, V.N. Stegniy

Research Institute of Biology and Biophysics, Tomsk State University, Tomsk, Russia,
e-mail: usovke@rambler.ru

Summary

A region-specific library was constructed by microdissection of chromocenter DNA polytene chromosomes from *Drosophila orena* nurse cells. Fragments of the library were cloned in a plasmid vector to yield 133 clones. A total of 76 clones were sequenced. A search for similarity between the fragments cloned and transposable elements known in the genomes of different Drosophila species was performed with the RepeatMasker program in RepBase. We found that 26 of the 33 clones homologous to regions of various mobile genetic elements shared similarity with regions of LTR retrotransposons (*Gypsy*, *Idefix*, *Zam*, *Roo*, *Quasimodo*, *Stalker*, *HMS Beagle*, *Copia*, *Tv1*, *Circe*, and *DM297*) and 4, with LINE regions (*DMCR1A*, *G3*, *Helena*, and *I*). Other clones showed significant degrees of similarity to regions of DNA transposons, polintons and helitrons: *DNAREP1_DM*, *Polinton-1_DY* and *Helitron-1_DYak*. One clone was similar to a region of *MINIME-DN*, belonging to *mini-me* non-LTR retrotransposons.

Key words: *Drosophila orena*, polytene chromosomes, heterochromatin, ovary nurse cells, microdissection, sequencing, molecular genetics, transposable elements.

МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ РАЙОНОВ ПРИКРЕПЛЕНИЯ ХРОМОСОМ К ЯДЕРНОЙ ОБОЛОЧКЕ ТРОФОЦИТОВ МАЛЯРИЙНЫХ КОМАРОВ

Г.Н. Артемов, О.Ю. Фисенко, В.Н. Стегний

Научно-исследовательский институт биологии и биофизики
Томского государственного университета, Томск, Россия, e-mail: center_cu@res.tsu.ru

Изучали последовательность ДНК района прикрепления XL-хромосомы трофоцитов яичников малярийных комаров *Anopheles messeae*. Методом микродиссекции хромосом была выделена ДНК этого района, создана библиотека клонов и определена последовательность нуклеотидов. В районе прикрепления обнаружены мобильные генетические элементы *LINE*, LTR и транспозоны. Проведен поиск выявленных мобильных элементов в районах прикрепления 3R-хромосомы *An. messeae* и XL-хромосомы *An. atroparvus*, а также в прицентромерном гетерохроматине хромосомы 2 *An. messeae*, которая не крепится к ядерной оболочке. Показано, что изучаемые районы различаются по набору мобильных элементов. В некоторых клонах, содержащих мобильные элементы, локализованы SAR/MAR и ДНК ядерной ламины. Предположено, что формирование района прикрепления XL-хромосомы *An. messeae* могло быть связано с переносом мобильными элементами последовательностей ДНК, взаимодействующих с ядерной оболочкой.

Ключевые слова: мобильные генетические элементы, районы прикрепления хромосом, гетерохроматин, *Anopheles*.

Введение

Пространственная организация интерфазного ядра изучается уже более 125 лет и остается до сих пор актуальной проблемой (Rabl, 1885; Mora *et al*., 2006; Meaburn *et al*., 2007; Cremer T., Cremer M., 2010). Гены, хромосомные сегменты и геном как целое упорядочены в трехмерном пространстве ядра (Steffensen, 1977). Этот порядок обеспечивается взаимодействием хромосом с ядерной оболочкой и друг с другом (Куличков, Жимулев, 1976). У малярийных комаров *Anopheles* комплекса «*maculipennis*» в трофоцитах яичников формируются политенные хромосомы, которые образуют выраженные контакты с ядерной оболочкой (районы прикрепления, РП) (Стегний, 1979, 1993). Близкие виды малярийных комаров различаются по наличию или отсутствию РП хромосом, месту расположения этих районов на хромосоме и их морфологии. Молекулярная организация таких районов вызывает интерес, так как их последовательность ДНК или/и белковый состав обеспечивает свойство крепления к ядерным структурам.

Анализ молекулярной структуры РП хромосом необходимо проводить, сравнивая организацию РП разных хромосом и хромосом близкородственных видов. Такой подход позволит выявить общие структуры, которые обеспечивают свойство контакта хроматина с ядерной оболочкой. Работу по поиску таких структур мы решили начать с последовательности ДНК РП хромосом, так как известно, что ДНК непосредственно способна образовывать контакты с ядерной оболочкой (Rzepecki, 1998; Schirmer, Foisner, 2007). Для анализа этих районов хорошо подходит РП XL-хромосомы *An. messeae*. Из всех близкородственных видов малярийных комаров, входящих в состав комплекса «*maculipennis*», только у *An. messeae* XL-хромосома крепится к ядерной оболочке не прицентромерным районом, а районом, расположенным в середине плеча. Поэтому ДНК прицентромерных районов не будет

искажать результаты поиска специфических для районов прикрепления хромосом последовательностей ДНК. Мобильные генетические элементы (МГЭ) могут принимать непосредственное участие в формировании районов прикрепления хромосом к ядерной оболочке, так как известно, что они способны перемещать SAR/MAR (Avramova *et al*., 1998). В настоящем исследовании определена нуклеотидная последовательность фрагментов ДНК района прикрепления XL-хромосомы *An. messeae*, выявлены МГЭ и проведен поиск этих МГЭ в районах прикрепления других хромосом *An. messeae* и *An. atroparvus*.

Материалы и методы

Микродиссекция районов политенных хромосом

Микродиссекция хромосом является одним из методов исследования последовательности ДНК из интересующего участка хромосомы, когда невозможно применить иные инструменты анализа. Выделенный материал амплифицируют с использованием частично вырожденного праймера (DOP-ПЦР). Микродиссекцию районов хромосом выполняли согласно протоколу (Рубцов и др., 1999). Для проведения микродиссекции готовили давленые воздушно-сухие препараты политенных хромосом трофоцитов *An. messeae* и *An. atroparvus* по стандартной методике (Kumar *et al*., 1997). Кончик стеклянной иглы с материалом хромосомы скалывали в 0,5 мл пробирке, содержащей 10 мМ Tris HCl, 10 мМ NaCl, 1 % SDS и 500 мкг/мл протеиназы К. Затем выделенную ДНК амплифицировали в присутствии праймера MW6 (5′-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3′) последовательно в серии низкотемпературных циклов (температура отжига 30 °С) и высокотемпературных циклах (температура отжига 56 °С).

Определение нуклеотидной последовательности ДНК *An. messeae*

Для анализа нуклеотидной последовательности ДНК, полученной из района хромосомы с помощью микродиссекции, ее клонировали в плазмиде pJET 1.2/blunt (Fermentas). После лигирования и трансформации 50 нг плазмидной ДНК помещали в 20 мкл секвенирующей реакции: 40 % Terminator Ready Reaction Mix (v 3.1, Applied Biosystems) и 3,2 пмоль pJet 1.2 forward. Анализ нуклеотидной последовательности проводили с помощью прибора 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Анализ последовательности ДНК *in silico*

Полученные после секвенирования последовательности ДНК клонов анализировали *in silico*. Последовательность ДНК клонов проверяли на гомологию с геномами *An. gambiae* в базах данных BLASTN и TBLASTX VectorBase (www.vectorbase.org/Tools/BLAST/), *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, с видами *Drosophila* – в BLASTN EnsemblMetazoa (metazoa.ensembl.org/Anopheles_gambiae/blastview/) и FlyBase (flybase.org/blast/). Кроме того, был проведен поиск МГЭ с помощью программ RepeatMasker (www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker/) и Censor (www.girinst.org/censor/). Полученные последовательности также анализировали на наличие тандемных повторов в Tandem Repeat Finder (tandem.bu.edu/trf/trf.html).

In situ гибридизация

Мечение ДНК проб тетраметилродамин-5-дУТФ проводили в 25 циклах DOP-ПЦР с праймером MW6. Осадок зонда смешивали с гибридизационной смесью. Флуоресцентную гибридизацию проводили по стандартному протоколу (Lichter *et al*., 1990). Хроматин окрашивали с помощью DAPI. Препараты анализировали на люминесцентном микроскопе AxioImager Z1 (Zeiss), фиксацию и обработку изображений проводили с использованием программного обеспечения AxioVision Rel. 4.7 (Zeiss).

Дот-блот-гибридизация

В основе метода лежит гибридизация ДНК, иммобилизованной на мембране, с ДНК-зондом. В работе использовался биотинилированный зонд, а для детекции применяли систему, предложенную компанией Fermentas (Biotin Chromogenic Detection Kit, #K0661). В качестве зонда использовали ДНК-пробы районов прикрепления XL-хромосомы *An. atroparvus*,

3R-хромосомы *An. messeae* и прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *An. messeae*. Для приготовления зонда использовали ПЦР с частично вырожденным праймером MW6. Полученные зонды гибридизовали с ДНК библиотеки клонов района прикрепления XL-хромосомы к ядерной оболочке трофоцитов *An. messeae*, которая была получена ранее (Артемов, Стегний, 2010). 50 нг ДНК клонов этого района после амплификации плазмидной ДНК наносили на положительно заряженную нитроцеллюлозную мембрану (#M1001, Fermentas). Мембрану высушивали при комнатной температуре и ДНК иммобилизировали экспозицией под ультрафиолетом в трансиллюминаторе.

Мембрану помещали в 20 мл гибридизационной смеси, состоящей из 50 % формамида, 0,5 SDS, 5 × раствора Денхарда, 6 × SSC и денатурированного ДНК-зонд (200 нг/мл). Далее проводили денатурацию связанной с мембраной ДНК в водяной бане при температуре 80 °C в течение 20 мин. Гибридизация осуществлялась при температуре 37 °C 36 ч. Отмывку проводили при комнатной температуре в 2 × SSC с 0,1 % SDS дважды по 5 мин и при температуре 60 °C в 0,1 × SSC с 0,1 % SDC дважды по 20 мин. Сигнал детектировали с помощью набора Biotin chromogenic detection kit (#K0661, Fermentas) по предложенному протоколу.

Анализ результатов дот-блот-гибридизации

Анализ результатов дот-блот-гибридизации проводили в программе Adobe Photoshop CS2. Мембраны с выявленными в результате детекции пятнами сканировали на МФУ Samsung SCX-4200 с разрешением 1200 dpi. Используя инструмент «Histogram», в Adobe Photoshop CS2 оценивали яркость пятна и фона в окрестности пятна. Инструмент возвращает среднюю яркость для всех выделенных пикселей. Вычисляли отношение средней яркости пятна и средней яркости фона, т. е. относительную яркость пятна. Рассчитывали относительную яркость пятен эксперимента и контроля. В качестве порогового значения принимали относительную яркость пятна, являющегося результатом детекции 10 пг биотинилированного зонда (контроль). Если относительная яркость пятна в эксперименте была ниже порогового значения, считали, что его яркость не отличалась от яркости фона и зонд не гибридизовался с ДНК мембраны.

Результаты и обсуждение

Микродиссекция района прикрепления XL-хромосомы *An. messeae* была проведена ранее (Сайджафарова и др., 2007, 2009). Из ДНК-пробы района 2b-c XL-хромосомы получена библиотека клонов в плазмидном векторе. Из 323 клонов библиотеки просеквенированы последовательности ДНК 300 клонов. Общая протяженность области, подвергшейся анализу, составила около 72 тыс. п.н. Анализ нуклеотидной последовательности позволил выявить фрагменты 4 генов. Семь клонов содержали микро- и минисателлиты (Артемов, Стегний, 2010). Однако самой представительной группой элементов в районе прикрепления XL-хромосомы *An. messeae*, судя по результатам данной работы, оказались МГЭ (табл. 1).

Анализ последовательностей клонов проводили в программах RepeatMasker и Censor. Были обнаружены LTR-ретротранспозоны и *LINE*-элементы, а также транспозоны, перемещающиеся по принципу «вырезания–встройки». Распространенных в геноме *An. gambiae* элементов *SINE*, *MITE* и *Helitron* обнаружить не удалось, но были найдены другие МГЭ, описанные у *An. gambiae*. Обнаружено, что клоны Mes2b-c_485 и Mes2b-c_183 представляют собой *LINE*-элемент CR1-4_AG (семейство CR1), а Mes2b-c_414 является ретротранспозоном Outcast из той же группы. Были выявлены также LTR-ретротранспозоны Gypsy43-I_AG-int (семейство *Gypsy*) в фрагментах Mes2b-c_3, Mes2b-c_17, Mes2b-c_295; BEL13-I_AG (семейство *BEL*) в фрагментах Mes2b-c_238, Mes2b-c_291 и AGM1 во фрагменте Mes2b-c_376. Среди транспозонов, перемещающихся по принципу «вырезания-встройки», типичных для *An. gambiae*, выявлен транспозон P1_AG (гомология 92 %). Анализ в программе Censor показал большое разнообразие МГЭ, характерных для представителей одноклеточных, позвоночных, растений и других таксонов. Для исключения возможной ошибки анализа был проведен скрининг геномов *An. gambiae*, *Drosophila melanogaster* и *Aedes aegypti* на наличие этих МГЭ в BLAST. Оказалось, что такие МГЭ действительно при-

Таблица 1

Мобильные генетические элементы (МГЭ) района прикрепления XL-хромосомы *An. messeae*

Группа МГЭ	Семейство МГЭ	МГЭ	Число клонов	Гомология, %
LINE-элементы	NonLTR/L1	L1_SS, L1MC4_5end, L1_Mur2_orf2, L1MA6, L1MB3_EC, L1MB5, L1MEC_5, L1HS, L1-2_Ttr, L1MEf_5end	10	75,0–91,2
	NonLTR/CR1	L2A, CR1-4_AG	3	66,3–71,6
	NonLTR/RTE	RTE-9_SP	2	88,3; 91,2
	NonLTR/Penelope	Penelope-13_HM	1	91,2
	NonLTR/R4	EhRLE2	1	71,6
	NonLTR/Outcast	Outcast	1	73,9
LTR	LTR/Gypsy	Gypsy43-I_AG-int	3	70,2–70,8
	LTR/BEL	BEL13-I_AG	2	65,6; 71,3
	LTR	TONT1_LE_I, AGM1	2	66,7; 79,5
	ERV/ERV1	HARLEQUIN, ZFERV-2-I_DR	2	71,9; 79,6
Транспозоны	DNA/P	P1_AG	3	89,9–94,8
	DNA/EnSpm	ENSPM-6_DR, EnSpm-3_HV, EnSpm-6_VV	3	66,7–83,3
	DNA/Sola	Sola1-7_AP, Sola1-9_AP	2	71,8–91,2
	DNA/Polinton	Polinton-2_NV	1	72,41
	DNA/MuDR	MUDSOLT1	1	76,00
	DNA/hAT	CHARLIE3	1	85,71
	DNA/Chapaev	Chapaev3-2_AC	1	68,75
	piggyBac/Looper	LOOPERN2_DR	1	72,22

сутствуют в геномах этих насекомых, поэтому они были включены в анализ. Следует отметить, что в районе прикрепления XL-хромосомы *An. messeae* найдены МГЭ позвоночных животных (ретротранспозоны L1 и L2A), в том числе *Homo sapiens*. В этом районе были обнаружены также ретротранспозон TONT1_LE_I и транспозоны EnSpm-3_HV, EnSpm-6_VV, MUDSOLT1, описанные у растений.

Определение нуклеотидной последовательности некоторых фрагментов ДНК района прикрепления XL-хромосомы *An. messeae* показало, что в данном районе много МГЭ из разных классов. Могут ли МГЭ участвовать в специфических функциях прикрепления XL-хромосомы *An. messeae*? Сравнение последовательности ДНК РП разных хромосом позволит выявить общие элементы, характеризующие эти районы. Наибольший интерес представляло сравнение последовательности районов прикрепления XL-хромосом *An. messeae* и *An. atroparvus*. По данным В.Н. Стегния (1981), *An. atroparvus* является предковым по отношению к *An. messeae*. У *An. atroparvus* район прикрепления XL-хромосомы локализуется в прицентромерном районе, а у *An. messeae* – в середине плеча (рис. 1). Вызвано ли изменение локализации районов прикрепления XL-хромосомы инверсией? Нами была проведена *in situ* гибридизация ДНК района прикрепления XL-хромосомы *An. messeae* с хромосомами *An. atroparvus* (рис. 2).

Оказалось, что гомологичная исследуемому району ДНК локализована в двух участках XL-хромосомы *An. atroparvus* в районе прикрепления (прицентромерная область), а другой, более яркий, – в середине плеча. Если ДНК-проба преимущественно локализуется в середине плеча и у *An. messeae*, и у *An. atroparvus*, то возникновение района прикрепления в середине плеча XL-хромосомы *An. messeae* не вызвано перемещением за счет инверсии из прицентромерного района, иначе самый яркий сигнал находился

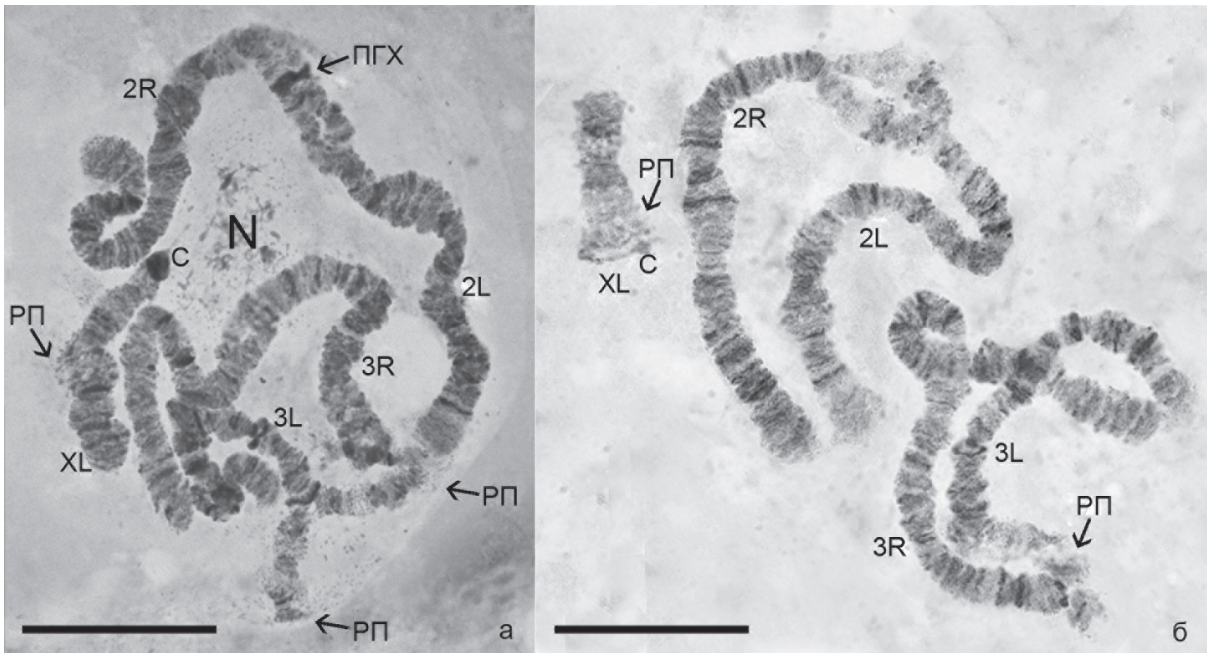


Рис. 1. Хромосомы трофоцитов яичников малярийных комаров *An. messeae* (а) и *An. atroparvus* (б).

РП – район прикрепления хромосомы к ядерной оболочке (по: Стегний, 1979), ПГХ – прицентромерный гетерохроматин, С – центромера, N – ядрышко. Масштабная линейка 20 мкм.

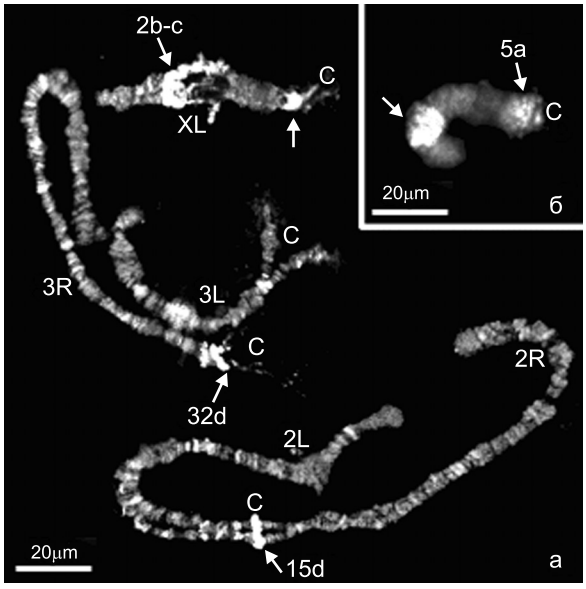


Рис. 2. Локализация ДНК района прикрепления XL-хромосомы *An. messeae* на политенных хромосомах трофоцитов *An. messeae* (а) и на XL-хромосоме *An. atroparvus* (б). С – центромера.

бы в районе прикрепления XL-хромосомы *An. atroparvus*. Видимо, свойство XL-хромосомы образовывать контакт с ядерной оболочкой возникло у *An. messeae* иным путем, нежели инверсия, и связано с реорганизацией последовательностей ДНК в будущем районе прикрепления. Таким образом, интересующий нас район в XL-хромосоме *An. messeae* содержит, по крайней мере, два типа последовательностей: те, которые уже присутствовали в этом районе до реорганизации и «новые» последовательности, возникшие в результате реорганизации и обеспечивающие контакт с ядерной оболочкой. Результат *in situ* гибридизации ДНК района прикрепления XL-хромосомы *An. messeae* с хромосомами *An. atroparvus* и *An. messeae* показал, что ситуация еще более неоднозначная – ДНК, гомологичная исследуемому району, находилась в прицентромерных районах всех хромосом, в том числе и хромосомы 2 и XL-хромосом *An. messeae*, которые не контактируют с ядерной оболочкой (рис. 2).

Гомология ДНК района прикрепления XL-хромосомы *An. messeae* с прицентромерными районами хромосом и интеркалярной областью XL-хромосомы *An. atroparvus* свидетельствует о наличии в этих районах сходных последовательностей. Задача сводится к тому, чтобы разделить последовательности, участвующие в прикреплении хромосом к ядерной оболочке,

и повторы, присутствующие во всех гетерохроматических районах.

Для поиска последовательностей ДНК, которые являются общими для районов прикрепления хромосом или, напротив, отличают их от других районов, нами было проведено сравнение ДНК библиотеки района прикрепления XL-хромосомы *An. messeae* с последовательностями районов прикрепления хромосом 3 *An. messeae* и XL *An. atroparvus* и прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *An. messeae* методом дот-блот-гибридизации.

Микродиссекция районов прикрепления 3R-хромосомы, а также района прикрепления XL-хромосомы *An. atroparvus* была проведена ранее (Артемов, Стегний, 2010). В данной работе с помощью микродиссекции были получены ДНК-пробы прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2 *An. messeae* (рис. 1, а).

Дот-блот-гибридизация позволила выяснить, какие именно последовательности содержатся в сравниваемых районах. Результат поиска МГЭ в районах хромосом представлен на рис. 3.

МГЭ, обнаруженные в результате анализа, можно условно разделить на три группы. Первая группа содержит МГЭ, локализованные во всех исследуемых районах (L1MEf_5end, L1HS). Вторая группа включает МГЭ, обнаруженные только в районах прикрепления хромосом (L1MC4_5end, Sola1-7_AP). Третья группа, довольно большая, включает в себя прочие МГЭ, встречающиеся только в районах прикрепления XL-хромосом *An. messeae* и *An. atroparvus*. Следует отметить также те МГЭ, которые не входят ни в одну из выделенных групп, но указаны в табл. 1. Эти МГЭ представляют собой специфичные последовательности, принадлежащие только РП XL-хромосомы *An. messeae*. Остается неясным, являются ли они участниками взаимодействия хромосомы со структурами ядра.

Определить, содержатся ли в библиотеке клоны, включающие и фрагменты МГЭ, и участки, хотя бы потенциально способные взаимодействовать с белками внутриядерных структур, можно, проанализировав их последовательности в программе ChrClass (Rogozin, 1999). Данная программа позволяет в анализируемой последовательности предсказывать SAR/MAR и находить элементы, гомологичные ДНК, выделенной из ядерного матрикса, синаптонемного комплекса, сердцевин розеткоподобных структур и ядерной ламины (Glazkov *et al*., 1998).

Анализ библиотеки клонов в ChrClass показал, что 6 клонов содержат и МГЭ (Gypsy43-I_AG-int, Sola1-9_AP, L1MEC_5, EhRLE2, EnSpm-3_HV, L1_SS) и SAR/MAR, а 5 клонов – МГЭ (Gypsy43-I_AG-int, L1MEC_5, HARLEQUIN, L1_SS, CR1-4_AG) и ДНК ядерной ламины. Ретротранспозоны L1MEC_5, HARLEQUIN, EhRLE2, L1_SS, CR1-4_AG присутствуют только в районе прикрепления XL-хромосомы *An. messeae*. LTR-ретротранспозон Gypsy43-I_AG и транспозон EnSpm-3_HV обнаружены только в районах прикрепления XL-хромосом *An. messeae* и *An. atroparvus*. Транспозон Sola1-9_AP найден в районах прикрепления XL-хромосом *An. messeae* и *An. atroparvus*, а также 3R-хромосомы *An. messeae*.

Клоны, содержащие ретротранспозоны L1HS и L1MEf_5end, которые были обнаружены во всех анализируемых районах включая прицентромерный гетерохроматин хромосомы 2, по результатам анализа в ChrClass не имели SAR/MAR и ДНК ядерной ламины. Только клон, содержащий ретротранспозон L1HS, оказался гомологичен ДНК ядерного матрикса.

Для нашей работы наиболее интересными являются ретротранспозон Gypsy43-I_AG и транспозоны EnSpm-3_HV и Sola1-9_AP, которые были обнаружены только в РП XL- и 3R-хромосом *An. messeae* и *An. atroparvus* и содержат SAR/MAR и ДНК ядерной ламины (только Gypsy43-I_AG). Эти МГЭ характеризуют только районы прикрепления и могут претендовать на участие во взаимодействии с оболочкой ядра.

Заключение

Опираясь на данные литературы и результаты настоящего исследования, мы можем выдвинуть гипотезу об организации ДНК в районах прикрепления хромосом к ядерной оболочке и возникновении таких районов. Районы прикреплений хромосом к ядерной оболочке у малярийных комаров являются гетерохроматическими, содержат повторенные последовательности, основную часть которых представляют МГЭ. Некоторые МГЭ района прикрепления

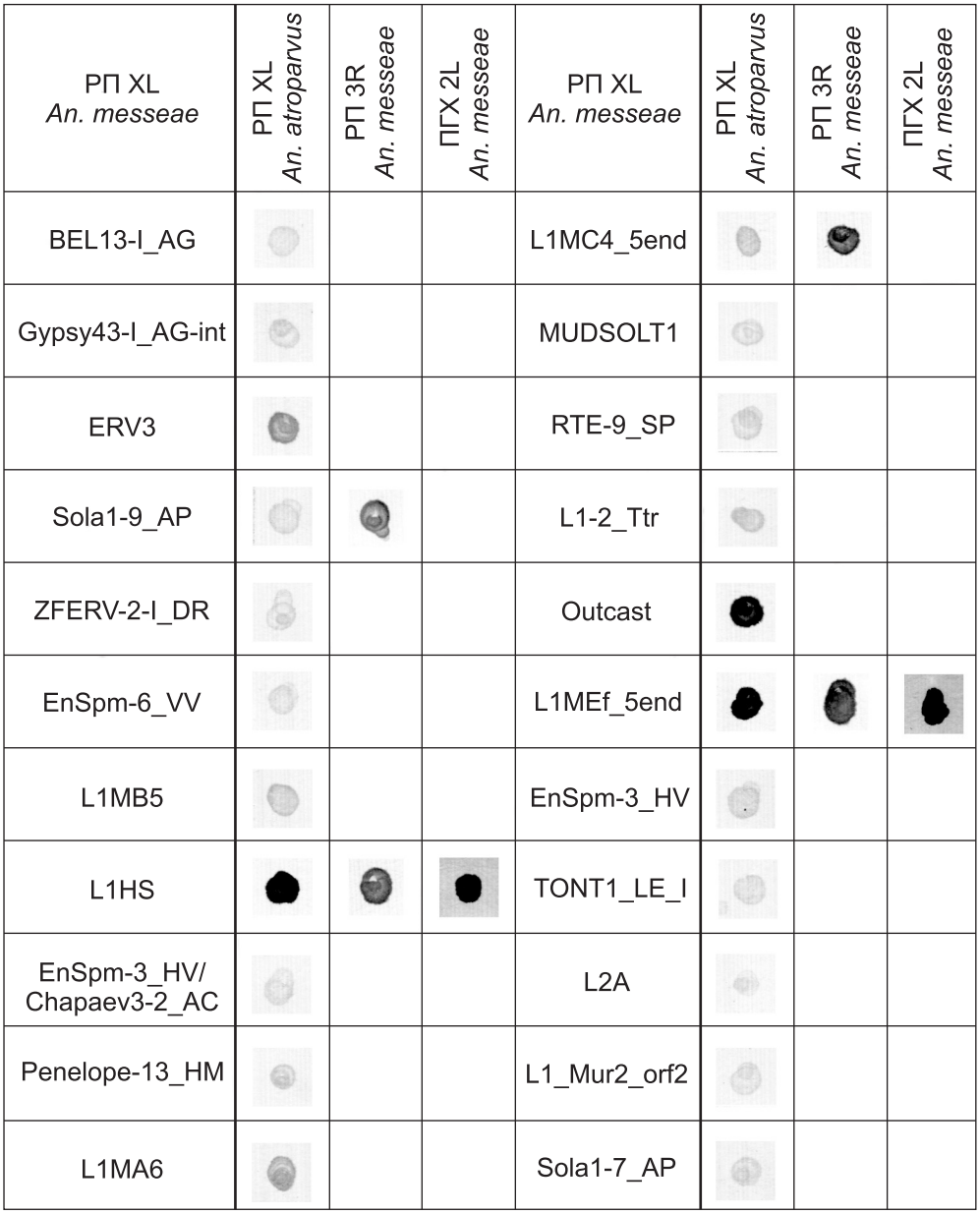


Рис. 3. Локализация МГЭ в районах прикрепления 3R-хромосомы *An. messeae*, XL-хромосомы *An. atroparvus* и прицентромерном гетерохроматине хромосомы 2 *An. messeae*.

РП – район прикрепления хромосом к ядерной оболочке, ПГХ – прицентромерный гетерохроматин.

XL-хромосомы *An. messeae* расположены во всех гетерохроматических районах, некоторые только в РП хромосом, многие только в РП XL-хромосом *An. messeae* и *An. atroparvus* и большинство – в РП XL хромосомы *An. messeae*. Некоторые МГЭ, общие для районов прикрепления хромосом малярийных комаров, содержат SAR/MAR и ДНК ядерной ламины. Мы можем предположить, что появление в РП XL-хромосомы *An. messeae* МГЭ, содержащих такие последовательности, могло произойти путем их перемещения из РП XL-хромосомы, расположенного у предкового вида в прицентромерной области, или из РП 3R-хромосомы. При этом наиболее перспективными, на наш взгляд, являются транспозоны, так как они перемещаются из одного района хромосомы в другой. Прицентромерный район XL-хромосомы при этом теряет свою функцию прикрепления, тогда как она возникает в новом районе – куда пере-

местились транспозоны, несущие SAR/MAR. Полученные в данной работе данные являются перспективными для прояснения вопроса о пространственной организации интерфазного ядра в клетках генеративной системы малярийных комаров. Однако эти результаты недостаточны для формирования окончательных выводов по проблеме формирования районов прикрепления хромосом к ядерной оболочке, которая требует дальнейших исследований.

Авторы выражают благодарность канд. биол. наук Н.В. Храбровой, канд. биол. наук Т.В. Карамышевой, д-ру биол. наук Н.Б. Рубцову.

Работа была выполнена при поддержке грантов ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» 2009–2013 гг. (ГК № П 1702, ГК № П 801), РФФИ № 10-04-01059.

Литература

Артемов Г.Н., Стегний В.Н. Молекулярно-генетический анализ районов прикрепления хромосом к оболочке ядра трофоцитов яичников малярийных комаров Anopheles комплекса maculipennis // Вест. Томского гос. ун-та. 2010. № 2. С. 123–131.

Куличков В.А., Жимулев И.Ф. Анализ пространственной организации геномов *Drosophila melanogaster* на основе данных по эктопической конъюгации политенных хромосом // Генетика. 1976. Т. 12. № 5. С. 81–89.

Рубцов Н.Б., Алексеенко А.А., Беляева Е.С. и др. Микроклонирование и характеристика ДНК из районов прицентромерного гетерохроматина политенных хромосом *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1999. Т. 35. № 1. С. 55–61.

Сайджафарова А.О., Артемов Г.Н., Карамышева Т.В. и др. Молекулярно-цитогенетическое изучение ДНК прицентромерного гетерохроматина хромосомы 2L у малярийного комара *Anopheles beklemishevi* (Culicidae, Diptera) // Генетика. 2009. Т. 45. № 1. С. 59–63.

Стегний В.Н. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция. Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та, 1993. 111 с.

Стегний В.Н. Генетические основы эволюции малярийных комаров. I. Хромосомные филогенетические связи // Зоол. журнал. 1981. Т. 60. Вып. 1. С. 69–77.

Стегний В.Н. Реорганизация структуры интерфазных ядер в онто- и филогенезе малярийных комаров // Докл. АН СССР. 1979. Т. 249. № 5. С. 1231–1234.

Avramova Z., Tikhonov A., Mingsheng C. *et al*. Matrix attachment regions and structural colinearity in the genomes of two grass species // Nucl. Acids Res. 1998. N 26. P. 761–767.

Cremer T., Cremer M. Chromosome territories // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010. N 2. P. 1–22.

Glazkov M.V., Rogozin I.B., Glazko G.V. Comparison of the chromosomal DNA fragments from nuclear lamina, cores of rosette-like structures (elementary chromomers), MARs/SARs and synaptonemal complexes based on simple nucleotide motifs // Mol. Biol. (Mosk). 1998. V. 32. P. 883–894.

Kumar V., Cornel A. J., Mukabayire O. *In situ* hybridization to Anopheles polytene chromosomes // Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A Methods Manual. London: Chapman and Hall, 1997. P. 337–345.

Lichter P., Ledbetter S.A., Ledbetter D.H., Ward D.C. Fluorescence *in situ* hybridization with Alu and L1 polymerase chain reaction probes for rapid characterization of human chromosomes in hybrid cell lines // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. N 17. P. 6634–6638.

Meaburn K.J., Misteli T., Soutoglou E. Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations // Seminars in Cancer Biol. 2007. V. 17. P. 80–90.

Mora L., Sánchez I., Garcia M. *et al*. Chromosome territory positioning of conserved homologous chromosomes in different primate species // Chromosoma. 2006. V. 115. P. 367–375.

Rogozin I.B., Glazko G.V., Glazkov M.V. Computer prediction of sites associated with various elements of the nuclear matrix // Briefings in Bioinformatics. 1999. V. 1. N 1. P. 33–44.

Rzepecki R., Bogachev S.S., Kokoza E. *et al*. *In vivo* association of lamins with nucleic acids in *Drosophila melanogaster* // J. Cell Sci. 1998. V. 111. P. 121–129.

Schirmer E.C., Foisner R. Proteins that associate with lamins: Many faces, many functions // Exptl Cell Res. 2007. V. 313. P. 2167–2179.

Steffensen D.M. Chromosome architecture and the interphase nucleus: Data and theory on the mechanism differentiation and determination // Chromosomes Today. Amsterdam: Elsevier, 1977. V. 6. P. 247–253.

TRANSPOSABLE ELEMENTS IN THE REGIONS OF CHROMOSOME ATTACHMENT TO THE NUCLEAR ENVELOPE IN NURSE CELLS OF MALARIA MOSQUITOES

G.N. Artemov, O.Yu. Fisenko, V.N. Stegniy

Research Institute of Biology and Biophysics, Tomsk State University, Tomsk, Russia,
e-mail: center_cu@res.tsu.ru

Summary

The DNA sequence of the nuclear envelope attachment region of nurse cell XL chromosome has been investigated in *Anopheles messeae* malaria mosquitoes. The DNA of this region has been isolated by the microdissection technique and used for the construction of a clone library followed by sequencing. Various transposable elements are present in the attachment region: LINE retrotransposons, LTR retrotransposons and transposons. A search for these transposable elements has been performed in other chromosome regions: the 3R chromosome attachment region of *An. messeae*, XL chromosome attachment region of *An. atroparvus*, and chromosome 2 pericentric heterochromatin of *An. messeae* with no connection to the nuclear envelope. The investigated chromosome regions have different transposable element patterns. Some DNA clones contain transposable elements, SAR/MAR, and/or nuclear lamina DNA. We suppose that the attachment region formation in XL chromosome of *An. messeae* resulted from TE-mediated transposition of specific DNA sequences connected with the nuclear envelope.

Key words: transposable elements, chromosome attachment regions, heterochromatin, *Anopheles*.

ЭВОЛЮЦИОННО НЕДАВНИЕ ГРУППЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА

К.К. Баскаев, А.А. Буздин

Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия, e-mail: bu3din@mail.ru

Мобильные элементы (МЭ) – фрагменты ДНК, способные к самовоспроизводству в геноме организма-хозяина. МЭ могут составлять ~40–50 % генома млекопитающих. Нам удалось описать два новых семейства МЭ, образовавшихся сравнительно недавно в ходе эволюции генома человека. Представители одного такого семейства присутствуют только в геноме человека и отсутствуют в ДНК других приматов. Это семейство, представленное ~80 членами, образовалось при комбинировании части CpG-островка человеческого гена *MAST2* и 3′-концевой последовательности ретротранспозона SVA. По нашим оценкам, это семейство, названное *CpG-SVA*, оказалось существенно более активно, чем предковое семейство *SVA*. Наши данные показывают, что регуляторная последовательность *MAST2* позволила членам нового семейства обеспечить эффективную транскрипцию в стволовых клетках-предшественниках сперматозоидов. Второе семейство, названное семейством химерных ретротранскриптов, возникло раньше, но сохраняет свою активность и поныне. Его представители образуются при помощи своеобразного механизма РНК-рекомбинации, в результате которой в геноме появляются объединенные ДНК-копии самых разных клеточных транскриптов. Мы показали, что сходные механизмы работают в геномах других млекопитающих и даже у грибов.

Ключевые слова: эволюция человека, генетическая нестабильность, мобильные элементы, регуляция экспрессии генов, генетические химеры, гибридное семейство ретротранспозонов.

Введение

Повторяющиеся последовательности занимают обширную часть каждого эукариотического генома. Так, они покрывают около половины геномной ДНК млекопитающих, тогда как экзоны генов и белок-кодирующие последовательности занимают соответственно только ~3 и 1 %. Существенная часть геномных повторов содержат гены, которые, как правило, кодируют «эгоистичные» белки, необходимые для размножения мобильных элементов (МЭ) в геноме хозяина.

МЭ размножаются либо непосредственно с помощью своих ДНК-копий (ДНК-транспозоны), либо через образование промежуточных РНК-посредников (ретроэлементы), в последнем случае используя механизм «обратной транскрипции» и фермент РНК-зависимую ДНК-полимеразу, называемую обратной транскриптазой (reverse transcriptase, RT). Заново сформированная копия элемента интегрируется в геном, используя комбинацию белков клетки-хозяина и ферментов, кодируемых собственной последовательностью МЭ (Temin, 1993; Dewannieux *et al*., 2003; Buzdin, 2006; Jurka, 1997).

Ретроэлементы занимают более 42 % человеческой ДНК и являются единственным классом мобильных элементов, способных к транспозиции у млекопитающих в настоящее время (Sverdlov, 2000; Buzdin, 2004). Они также играют активную роль во множестве процессов функционирования генома человека (Wessler, 1998; Sverdlov, 1998, 2000; Deininger *et al*., 2003; Buzdin, 2004). МЭ представляют собой «горячие точки рекомбинации» (например, рекомбинации между ретроэлементами *Alu* привели к делециям около 400 т.п.о. в ДНК человека (Sen *et al*., 2006)). Известно, что ретроэлементы могут модифицировать активность предсуществующих

человеческих генов (Brosius, 1999a; Deininger *et al*., 2003; Buzdin, 2004; van de Lagemaat *et al*., 2006). Треть всех МЭ картированы в составе генов (Mills *et al*., 2006).

Ретроэлементы подразделяются на автономные и неавтономные, т. е. те, которые либо сами имеют ген обратной транскриптазы, либо «заимствуют» его белковый продукт у других.

Основная группа активных ретроэлементов человека – это семейство автономных ретротранспозонов *L1*. Полноразмерные представители *L1* у приматов занимают около 6 т.п.о. и кодируют две открытые рамки считывания, одну для RT/интегразы и другую для РНК-связывающего белка. В большинстве своем вставки *L1* существенно укорочены с 5′-конца, по-видимому, вследствие часто происходящей абортивной обратной транскрипции (Boissinot *et al*., 2000). Следующие две активные группы, ретропозоны *Alu* (~ 300 п.о. длиной) и SVA (размером примерно ~ 1,5 т.п.о.), являются неавтономными мобильными элементами, которые используют «чужую» RT ретротранспозонов *L1* для размножения своих копий (Wang *et al*., 2005). Эти две группы не кодируют белков и могут рассматриваться как паразиты системы ретротранспозиции *L1* (Buzdin, 2004). Наконец, автономные эндогенные ретровирусы группы HERV-K (HML-2) являются наиболее сложно организованной группой человеческих мобильных элементов. Они несут три типичных ретровирусных функциональных гена и один дополнительный ген, кодирующий небольшой регуляторный белок.

Однако ретроэлементы часто функционируют как регуляторы транскрипции хозяйских РНК (Gogvadze, Buzdin, 2009). Повторяющиеся транскрипты также могут служить как мультифункциональные РНК, участвовать в антисмысловой регуляции генов и конкурировать с транскриптами хозяина за связывание с клеточными белками (Zabolotneva *et al*., 2010).

В экспериментах на клеточных культурах показано, что полиморфные, находящиеся в интронах человеческих генов, копии *L1*- и *Alu*-элементов снижают транскрипцию аллелей, содержащих эти ретроэлементы, по сравнению с аллелями, их не содержащими (Устюгова и др., 2006; Ustyugova *et al*., 2006; Lebedev *et al*., 2007). Геномные повторы включают также регуляторные последовательности, такие, как промоторы, энхансеры, сайты сплайсинга, сигналы полиаденилирования и инсуляторы, активно воздействующие на геном и транскриптом (Schumann *et al*., 2010).

Семейство мобильных элементов человека, образованное с помощью механизма РНК-рекомбинации

Типичный элемент *L1* кодирует два белка: РНК-связывающий белок ORF1p, который способствует обратной транскрипции в качестве шаперона нуклеиновых кислот (Martin, 2006), и ORF2p, являющийся обратной транскриптазой и эндонуклеазой (Kazazian, 2004).

Помимо собственных копий элементы *LINE* также способны к транспозиции и других последовательностей, в основном неавтономных МЭ, относящихся к классу *SINE*, а также копий различных клеточных РНК, что ведет к формированию псевдогенов (Dewannieux *et al*., 2003). Недавно нами было показано, что элементы *L1* включены в формирование двойных и тройных химерных МЭ, образующихся в процессе обратной транскрипции во многих геномах включая все геномы млекопитающих и некоторые геномы грибов (Buzdin *et al*., 2002, 2003, 2005; Fudal *et al*., 2005; Гогвадзе и др., 2005) (рис. 1).

Всего было найдено 82, 116, 66 и 31 таких химерных элементов в ДНК человека, мыши, крысы и гриба *Magnaporthe grisea* соответственно (Buzdin *et al*., 2002, 2003; Fudal *et al*., 2005; Гогвадзе и др., 2005). Эти элементы состоят из ДНК-копий клеточных транскриптов как прямо соединенных между собой, так и, более часто, объединенных с 3′-концевой частью элемента *L1*. Помимо копий МЭ в составе химер были обнаружены копии разнообразных клеточных транскриптов, соответствующих мРНК белок-кодирующих генов, рибосомной РНК, различным малым ядерным РНК и 7SL РНК. Такие химеры отвечали следующим критериям: 1) их 5′-концевые части были полноразмерными копиями клеточных РНК; 2) их 3′-концевые части были укороченными с 5′-конца копиями других РНК (чаще всего МЭ); 3) сайты прерывания находились в случайных местах соответствующей РНК; 4) обе части были объединены в одной и той же ориентации; 5) химеры имели поли(А)-

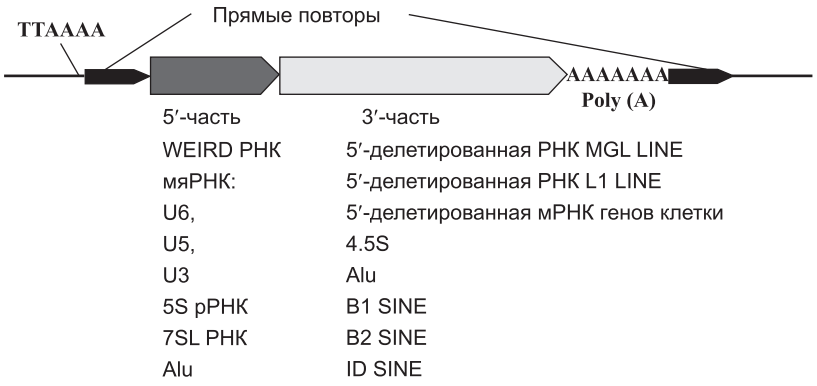


Рис. 1. Схематическое изображение двойного химерного МЭ.

Вставка МЭ фланкирована прямыми повторами длиной 10–20 п.о.

хвост на своем 3′-конце и 6) химеры были фланкированы короткими прямыми повторами.

Последний структурный признак доказывает, что эти химеры внедрялись в геном в виде единой ДНК-копии. Действительно, химеры в геноме млекопитающих несли на своих 5′-концах T_2A_4-гексануклеотиды или их варианты (Buzdin *et al*., 2002; Гогвадзе и др., 2005), отвечающие консенсусной последовательности T_2A_4, используемой элементами *L1* для инициации обратной транскрипции (Jurka, 1997). Синхронная интеграция обеих частей химер была также подтверждена данными локус-специфической ПЦР с геномной ДНК различных видов приматов (Buzdin *et al*., 2002, 2003).

Таким образом, химеры были образованы при помощи особого механизма. Этот механизм часто объединяет вместе клеточные транскрипты, не имеющие ничего общего с мобильными элементами (Buzdin *et al*., 2007). Многие химеры можно рассматривать как новые гены; так, показана их транскрипция, причем некоторые транскрибируются тканеспецифично (Buzdin *et al*., 2003; Гогвадзе и др., 2005; Gogvadze *et al*., 2007; Gogvadze, Buzdin, 2009). Мы предположили, что эти химерные ретрогены были образованы по механизму, включающему РНК-рекомбинацию в процессе обратной транскрипции клеточной РНК (рис. 2). Эта модель подразумевает «перескок» формирующейся первой цепи кДНК с одной РНК, служащей матрицей для обратной транскрипции 3′-концевой части химеры, на другую РНК-матрицу, с которой образуется 5′-часть, и последующую интеграцию химеры в геном (Buzdin, 2004).

Хотя считающаяся основной активность обратной транскриптазы направлена на непрерывный синтез кДНК на матрице РНК, фермент способен переключаться и на другие матрицы в процессе обратной транскрипции. Например, в ретровирусах обратная транскриптаза как минимум дважды «перепрыгивает» с одного сайта РНК-матрицы на другой, что необходимо для синтеза полноразмерных длинных концевых повторов (LTR). Кроме того, ретровирусные частицы обычно содержат две матричные молекулы РНК (Temin, 1993), по которым с высокой частотой происходят «перескоки» матрицы, значительно увеличивающие степень изменчивости ретровируса посредством рекомбинации между двумя матрицами (Kandel, Nudler, 2002). Похожий тип рекомбинации, но с «чужеродными» РНК-матрицами приводит и к образованию мозаичной структуры геномных вставок некоторых ретровирусов (Swanstrom *et al*., 1983; Jamain *et al*., 2001).

Данная модель образования химер впоследствии была подтверждена результатами, полученными для человеческого элемента *L1* при использовании экспериментальной системой ретротранспозиции *in vitro* (Gilbert *et al*., 2005). Авторы охарактеризовали 100 ретротранспозиций *de novo* в клеточной линии HeLa. Одна вставка (1 %) представляла собой неизвестную ранее химеру, похожую на те, которые были обнаружены нами в человеческом геноме, состоящую из полноразмерной U6 мяРНК, соединенной с 5′-укороченным элементом *L1*. Позднее похожие результаты были получены и *in vivo* на модели ретротранспозиции *L1* в транс-

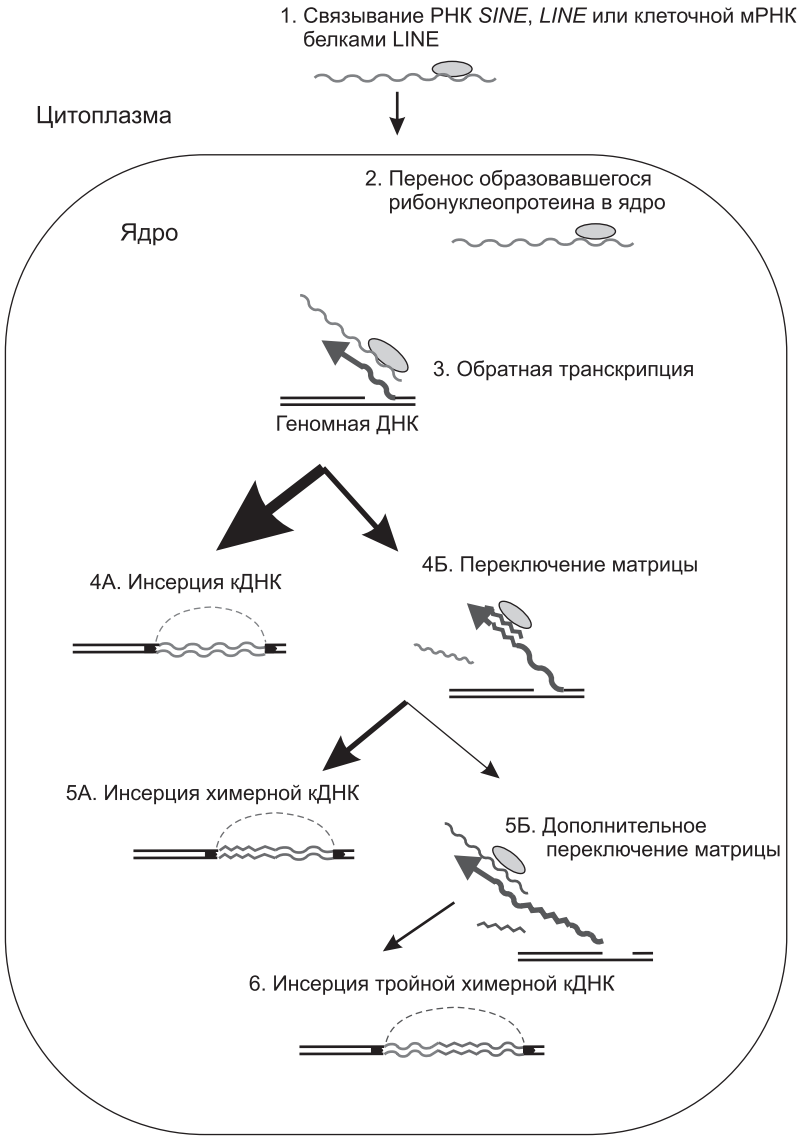


Рис. 2. Механизм образования химеры, использующий энзиматический аппарат L1.

Шаг 1 – преинтеграционный белковый комплекс L1 связывает РНК-копию *L1*, *SINE* или клеточную РНК в цитоплазме; шаг 2 – образующийся рибонуклеопротеид переносится в ядро; шаг 3 – обратная транскрипция связанной РНК, праймированная одноцепочечным разрывом геномной ДНК; шаг 4А – успешная интеграция обратно транскрибированной кДНК-копии в геномную ДНК; шаг 4Б – «перескок» на другую РНК-матрицу в процессе обратной транскрипции; шаг 5А – интеграция химеры в геномную ДНК; шаг 5Б – второй «перескок» матрицы на другую РНК с последующей ДНК-репарацией, в результате чего образуются вставки ретрогена тройной химерной структуры. Нормальный путь интеграции элемента *L1*, соответствующий его «жизненному циклу»: шаги (1)- (2)- (3)- (4А).

генных мышах: удалось охарактеризовать 33 новых ретротранспозиционных события, 13 % из которых происходили со сменой матрицы в процессе обратной транскрипции (Babushok *et al*., 2006).

Недавно было высказано предположение, что перескоки обратной транскриптазы с «собственной» матрицы *L1* на ДНК хозяина способствуют успешному прохождению интеграции копии элемента в геном и, таким образом, могут представлять собой не исключение, а правило в работе этого фермента (Bibillo, Eickbush, 2004; Babushok *et al*., 2006). Помимо образования химерных ретрогенов перескок матрицы в течение обратной транскрипции может приводить к образованию химерных неавтономных элементов *SINE* (Nishihara *et al*., 2006) и, по-видимому, к мозаицизму структуры самих

L1-элементов (Hayward *et al*., 1997; Brosius, 1999b). Эволюция отдельных семейств *L1* также может включать РНК-рекомбинацию, что приводит к объединению 3′-концевой части *L1* с новой последовательностью на 5′-конце. Как показывает сопоставление первичной структуры, 5′-нетранслируемые области человеческих, мышиных, крысиных и кроличьих семейств *L1* не гомологичны друг другу (Furano, 2000). Интересно, что также и обратная транскриптаза, кодируемая другим членом суперсемейства *LINE* (к которому относятся *L1*), R2 из геномов членистоногих, «перепрыгивает» с одной матрицы на другую в модельных экспериментах *in vitro* с образованием соответствующих химер (Bibillo, Eickbush, 2004).

Помимо этого, высказывались предположения о том, что все LTR-содержащие МЭ и многие *SINE*-элементы представляют собой сходным образом сформированные химеры (Ohshima *et al*., 1996; Kramerov, Vassetzky, 2001, 2005; Malik, Eickbush, 2001). Действительно, филогенетический анализ домена рибонуклеазы H показал, что LTR-содержащие элементы могли быть сформированы как химеры между ДНК-транспозонами и LTR-несодержащими ретротранспозонами, например, относящимися к *LINE* (Malik, Eickbush, 2001). *SINE*-элементы, происходящие из тРНК, вероятно, эволюционировали от ретровирусной так называемой «стронг-стоп ДНК» – ДНК-копии короткого первого фрагмента ретровирусного генома, образующейся в ходе обратной транскрипции (Ohshima *et al*., 1996). Такие *SINE* содержат два участка: консервативный, включающий промотор тРНК и «коровый» домен, а также вариабельный, аналогичный 3′-концевой последовательности различных семейств *LINE*. Коровый домен тРНК-подобных *SINE* содержит консервативные последовательности, похожие на фрагменты длинных концевых повторов лизин-тРНК праймирующихся ретровирусов.

Было предположено, что происходящие от тРНК *SINE*-элементы появились вследствие интеграции ретровирусной стронг-стоп ДНК вблизи 3′-концевой части *LINE*. Образовавшиеся ретроэлементы могли быть транскрибированы РНК полимеразой III и распространились по геному. Такой механизм образования *SINE* объясняет, как они могут распространяться по геному. Возможно, они привлекают для этого ферментативную систему *LINE*-элементов, «мимикрируя» под них при помощи очень похожей «хвостовой» последовательности (Ohshima *et al*., 1996).

Человек-специфичное гибридное семейство CpG-SVA

Детальный структурный анализ вставок ретротранспозонов *SVA* в геноме человека позволил обнаружить 76 элементов необычной структуры. 5′-концы таких элементов несли копии первого экзона гена *MAST2*, тогда как 3′-конец – 3′-концевую последовательность ретротранспозона *SVA*.

Граница между экзонной частью и *SVA*-частью располагалась точно между каноническим акцепторным сплайс-сайтом AG из экзонной части и неканоническим донорным сплайс-сайтом CC из *SVA*-части. Длина обеих частей химерного элемента могла существенно различаться – от 35 до 383 п.о. для 5′-концевой части и от 662 до 4255 п.о. для 3′-концевой части. Пограничная точка между двумя частями была неизменна для всех химер (рис. 3).

Элементы *CpG-SVA* были найдены только в человеческой ДНК, но не у других приматов, тогда как сами по себе ретротранспозоны *SVA* и последовательности экзонов *MAST2* существуют в геномах всех высших приматов. Таким образом, *CpG-SVA* являются единственным известным человек-специфичным семейством ретротранспозонов (Бантыш, Буздин, 2009).

В одновременно опубликованных других работах, описывающих то же самое семейство гибридных ретротранспозонов, это семейство названо также «*MAST2-SVA*» (Hancks *et al*., 2009) или «*SVA-F1*» (Damert *et al*., 2009).

Базируясь на структурных особенностях найденных членов семейства *CpG-SVA*, мы предположили механизм их образования (рис. 4).

На первой стадии ретротранспозон *SVA*, по-видимому, включился в первый интрон гена *MAST2* в прямой ориентации. При транскрипции гена *MAST2* образовалась аберрантная пре-мРНК, терминально процессированная по 3′-концевому сигналу полиаденилирования встроенного элемента *SVA*. Эта РНК была затем сплайсирована по акцепторному сплайс-сайту

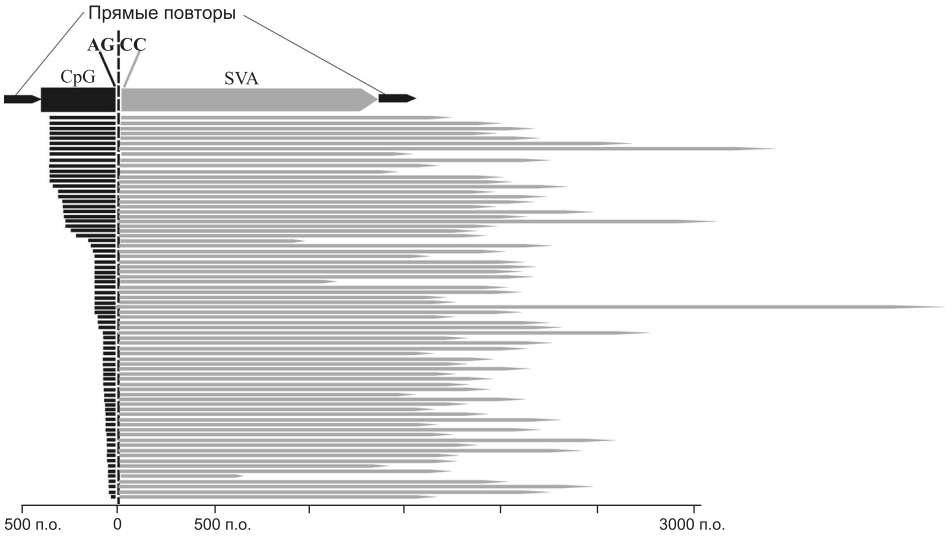


Рис. 3. Структуры химерного ретротранспозона *CpG-SVA*.

Вставки *CpG-SVA* фланкированы прямыми повторами. Длина 5′-концевой (экзонной) части составляет от 35 до 383 п.о., длина 3′-концевой (*SVA*-производной) части находится в диапазоне от 662 до 4255 п.о. 5′-концевая часть гомологична первому экзону гена *MAST2*, 3′-концевая часть – ретротранспозону *SVA*. Точка соединения между двумя частями идентична во всех элементах *CpG-SVA* (канонический акцепторный сплайс-сайт AG со стороны экзонной части и неканонический донорный сплайс-сайт CC со стороны *SVA*). Все *SVA*-фрагменты начинаются с позиции 396 консенсусной последовательности *SVA*.

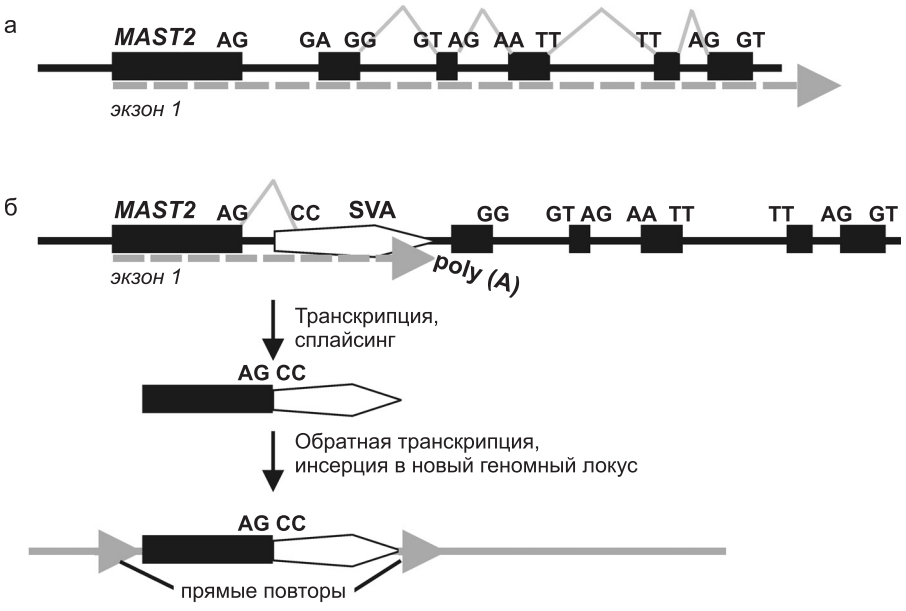


Рис. 4. Предполагаемый механизм образования семейства *CpG-SVA*.

a – схематическое изображение геномного локуса, содержащего человеческий ген *MAST2*. Пунктирной стрелкой обозначено направление транскрипции, обозначены экзоны и сайты сплайсинга. b – вставка ретротранспозона *SVA* в прямой ориентации изменила экзон-интронную структуру и привела к неправильно сплайсированной мРНК, полиаденилированной по участку *SVA*. Копия этой мРНК была вставлена в новый локус человеческого генома, что привело к образованию семейства *CpG-SVA*, продолжившего свое размножение в человеческой ДНК. Однако предковый аллель гена *MAST2*, содержащего вставку *SVA*, был потерян вследствие негативного отбора.

AG со стороны гена и по донорному сплайс-сайту CC со стороны *SVA*, вследствие чего произошло объединение последовательностей первого экзона *MAST2* с 3′-концевым фрагментом *SVA* (начинающимся с 393-й позиции консенсусной последовательности *SVA*). Донорный сайт сплайсинга CC внутри элемента *SVA* является неканоническим, что объясняется особенностями экзон-интронной структуры *MAST2*, где неканонические сайты сплайсинга присутствуют в большинстве. Сплайсированной химерной РНК затем «повезло» подвергнуться обратной транскрипции при помощи ферментативной системы L1, чему сопутствовала интеграция образовавшейся кДНК в геном. Это событие привело к появлению в человеческой ДНК так называемой «мастер-копии» элемента *CpG-SVA*. «Мастер-копия» оказалась транскрипционно активной, возможно, вследствие включения в свой состав CpG-островка гена, что привело к образованию нового семейства МЭ (рис. 4).

Интересно отметить, что в настоящее время не существует известного включения элемента *SVA* в интрон гена *MAST2* в геноме человека. По-видимому, предковый аллель, содержащий целый элемент *SVA* в интроне гена, был элиминирован отрицательным отбором, поскольку такой ген не мог образовывать функциональной РНК из-за нарушения сплайсинга пре-мРНК и/или преждевременного полиаденилирования транскрипта по последовательности *SVA*.

Среди *CpG-SVA*-элементов мы обнаружили случаи 5′- и 3′-концевой трансдукции фланкирующей уникальной геномной ДНК. Как и в классическом механизме 3′-трансдукции, нижележащие геномные фрагменты, по-видимому, были пойманы вследствие проскока слабого собственного сигнала полиаденилирования *SVA* с последующей терминацией на нижележащей уникальной геномной последовательности комплексом РНК полимеразы II. В случае с 5′-концевой трансдукцией транскрипция *CpG-SVA*-элементов была, по-видимому, инициирована с вышележащих геномных промоторов. Всего нами было идентифицировано 18 и 11 случаев для 5′- и 3′-концевой *CpG-SVA*-трансдукции соответственно. Размер перенесенной геномной последовательности колебался от 8 до 854 п.о. для 5′- и от 141 до 734 п.о. для 3′-концевой трансдукции. Замечателен факт, что четыре элемента *CpG-SVA* содержат как 5′-, так и 3′-трансдуцированные последовательности. Эти четыре элемента обладают высокой степенью идентичности и состоят из 364 п.о. фрагмента экзона *MAST2* и последовательности SVA варьирующей длины – 2143–3361 п.о. Вариации длины *SVA*-фрагмента могут быть объяснены нестабильностью его внутренних микросателлитных повторяющихся модулей. Элементы *CpG-SVA* с двойной трансдукцией были фланкированы последовательностями *Alu* (членами эволюционно древнего семейства *AluSc*) на 5′-конце и последовательностью длиной 400 п.о., включающей эволюционно древний элемент *AluSp*, на 3′-конце. Это сходство структуры – доказательство происхождения всех четырех элементов от единого предкового элемента *CpG-SVA*.

Экзонная часть химер варьирует по длине, но не по структуре, тогда как часть, произошедшая от *SVA*, сильно варьирует как по длине, так и по первичной структуре. В *SVA*-частях присутствуют различные генетические изменения, такие, как инсерции, делеции, дупликации, изменение в количестве тандемных повторов и даже вставки других МЭ.

Вместе с присутствием трансдуцированных геномных последовательностей это дает возможность построить филогенетическое древо для членов семейства *CpG-SVA* для определения степени их взаимного родства. *CpG-SVA*-элементы оказались сгруппированы в три основных кластера. Хотя существуют корреляции между размером «экзонной» части и последовательностью локализации на древе, все ветви древа содержат элементы с экзонной частью самой различной длины. Кроме того, не существует связи между позицией на филогенетическом древе и длиной *SVA*-частей. В нескольких случаях различные ветви древа включают в себя элементы с одинаковыми длинами экзонных частей. Например, ветвь 2 содержит один элемент *CpG-SVA* с экзонной частью размером 364 п.о., тогда как ветвь 1 – пять таких же элементов. Экзонная часть семи элементов из ветви 2 и один элемент из ветви 3 обладают длиной 148 п.о. Такие же совпадения обнаружены и для длин 64, 76, 88 и 361 п.о., что свидетельствует о множественных независимых событиях в ходе формирования элементов *CpG-SVA* с идентичными экзонными частями.

Наблюдаемые особенности распределения длин экзонной части *CpG-SVA* могут быть объяснены следующими факторами: 1) могли существовать множественные сайты начала транскрипции внутри *CpG-SVA* или 2) в некоторых случаях обратная транскрипция РНК *CpG-SVA* могла терминироваться преждевременно, до прохождения полного копирования последовательности матрицы. Получающиеся укороченные вставки *CpG-SVA* могли затем давать начало другим с еще более короткими экзонными частями и т. д.

Какова функция экзонной части элементов *CpG-SVA*? Учитывая, что 1) первый экзон гена *MAST2* включает в себя CpG-островок, 2) CpG-островки играют важнейшую роль в регуляции транскрипции генов, и 3) ген *MAST2* тканеспецифично экспрессируется в яичках, можно предположить, что экзонная часть может быть полезна для усиления транскрипции представителей *CpG-SVA* в яичках. Это может быть выгодно для элементов *CpG-SVA*, так как облегчает фиксацию новых вставок в геноме. Действительно, для того чтобы передаться потомству, вставка МЭ должна осуществиться в линии герминальных клеток, которые, например, могут быть локализованы в яичках.

С точки зрения распространения в геноме, открытое нами эволюционно молодое семейство *CpG-SVA* является очень успешным: ведь потомство всего одной из более чем 1 тыс. копий *SVA*-элементов, существовавших в ДНК предка человека на время расхождения с линией шимпанзе (т. е. < 0,1 %), создало 76 новых зафиксировавшихся в геноме вставок (~ 9 % из всех 860 человек-специфичных вставок *SVA*) (Бантыш, Буздин, 2009).

Дальнейшие наши исследования показали, что последовательность CpG-островка гена *MAST2* действительно способна усиливать транскрипцию 3′-концевой части *SVA*, показывая вдвое большую промоторную активность по сравнению с 5′-концевой частью *SVA* (Заболотнева и др. Неопубл. данные). Кроме того, для гена *MAST2* у млекопитающих характерна тканеспецифическая экспрессия в формирующихся сперматогониальных клетках. Там же на определенных стадиях созревания наблюдаются волны тотального деметилирования генома, что сопровождается увеличением экспрессии ретроэлементов, обычно репрессированных при помощи метилирования. Соответственно привлечение регуляторных последовательностей *MAST2* могло обеспечить элементам *CpG-SVA* транскрипционную активацию «в нужном месте в нужное время».

Заключение

Проведенные нами исследования показывают, что мобильные элементы генома интенсивно вовлечены в эволюционный процесс и далеки от существования в виде «застывших» форм. Вероятно, систематический и детальный анализ вставок как известных мобильных элементов, так и различных псевдогенов позволит в будущем обнаружить большое количество неизвестных на настоящий момент их групп. По-видимому, многие из них будут включать сложные составные элементы, подобные описанным в настоящей статье.

Благодарности

Работа была поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 10-04-00593-а, грантом Президента Российской Федерации МД-480.2010.4 и программой Президиума Российской академии наук «Молекулярная и клеточная биология».

Литература

Бантыш О.Б., Буздин А.А. Новое семейство мобильных элементов генома человека, образованное при захвате первого экзона гена MAST2 ретротранспозоном SVA // Биохимия. 2009. Т. 74. Вып. 12. С. 1709–1717.

Гогвадзе Е.В., Буздин А.А. Новый механизм образования ретрогенов в геномах млекопитающих: рекомбинация *in vivo* в ходе обратной транскрипции РНК // Молекуляр. биология. 2005. Т. 39. Вып. 3. С. 364–373.

Гогвадзе Е.В., Буздин А.А., Свердлов Е.Д. Смена матриц при *LINE*-опосредованной обратной транскрипции – наиболее вероятный механизм формирования двойных и тройных химерных ретроэлементов млекопитающих // Биоорган. химия. 2005. Т. 31. Вып. 1. С. 82–89.

Устюгова С.В., Амосова А.Л., Лебедев Ю.Б., Свердлов Е.Д. Тканеспецифическое снижение уровня

пре-мРНК *L1* и *Alu*-содержащих аллелей генов человека // Биоорган. химия. 2006. Т. 32. Вып. 1. С. 103–106.

Babushok D.V., Ostertag E.M., Courtney C.E. *et al*. *L1* integration in a transgenic mouse model // Genome Res. 2006. V. 16. N 2. P. 240–250.

Bibillo A., Eickbush T.H. End-to-end template jumping by the reverse transcriptase encoded by the R2 retrotransposon // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. N 15. P. 14945–14953.

Boissinot S., Chevret P., Furano A.V. *L1* (*LINE-1*) retrotransposon evolution and amplification in recent human history // Mol. Biol. Evol. 2000. V. 17. N 6. P. 915–928.

Brosius J. RNAs from all categories generate retrosequences that may be exapted as novel genes or regulatory elements // Gene. 1999a. V. 238. N 1. P. 115–134.

Brosius J. Genomes were forged by massive bombardments with retroelements and retrosequences // Genetica. 1999b. V. 107. N 1/3. P. 209–238.

Buzdin A.A. Retroelements and formation of chimeric retrogenes // Cell Mol. Life Sci. 2004. V. 61. N 16. P. 2046–2059.

Buzdin A. Transposable elements and their use for target site specific gene delivery // Curr. Pharmacogenomics. 2006. V. 4. N 1. P. 1–8.

Buzdin A., Gogvadze E., Lebrun M.H. Chimeric retrogenes suggest a role for the nucleolus in *LINE* amplification // FEBS Lett. 2007. V. 581. N 16. P. 2877–2882.

Buzdin A., Vinogradova T., Lebedev Y., Sverdlov E. Genome-wide experimental identification and functional analysis of human specific retroelements // Cytogenet. Genome Res. 2005. V. 1101. N 1/4. P. 468–474.

Buzdin A., Ustyugova S., Gogvadze E. *et al*. A new family of chimeric retrotranscripts formed by a full copy of U6 small nuclear RNA fused to the 3′ terminus of l1 // Genomics. 2002. V. 80. N 4. P. 402–406.

Buzdin A., Gogvadze E., Kovalskaya E. *et al*. The human genome contains many types of chimeric retrogenes generated through *in vivo* RNA recombination // Nucl. Acids Res. 2003. V. 31. N 15. 4385–4390.

Damert A., Raiz J., Horn A.V. *et al*. 5′-Transducing *SVA* retrotransposon groups spread efficiently throughout the human genome // Genome Res. 2009. V. 19. N 11. P. 1992–2008.

Deininger P.L., Moran J.V., Batzer M.A., Kazazian H.H. Jr. Mobile elements and mammalian genome evolution // Curr. Opin. Genet. Dev. 2003. V. 13. N 6. P. 651–658.

Dewannieux M., Esnault C., Heidmann T. *LINE*-mediated retrotransposition of marked *Alu* sequences // Nat. Genet. 2003. V. 35. N 1. P. 41–48.

Fudal I., Bohnert H.U., Tharreau D., Lebrun M.H. Transposition of *MINE*, a composite retrotransposon, in the avirulence gene *ACE1* of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* // Fungal. Genet. Biol. 2005. V. 42. N 9. P. 761–772.

Furano A.V. The biological properties and evolutionary dynamics of mammalian *LINE-1* retrotransposons // Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 2000. V. 64. P. 255–294.

Gilbert N., Lutz S., Morrish T.A., Moran J.V. Multiple fates of L1 retrotransposition intermediates in cultured human cells // Mol. Cell Biol. 2005. V. 25. N 17. P. 7780–7795.

Gogvadze E., Buzdin A. Retroelements and their impact on genome evolution and functioning // Cell Mol. Life Sci. 2009. V. 66. N 23. P. 3727–3742.

Gogvadze E., Barbisan C., Lebrun, M.H., Buzdin A. Tripartite chimeric pseudogene from the genome of rice blast fungus *Magnaporthe grisea* suggests double template jumps during long interspersed nuclear element (*LINE*) reverse transcription // BMC Genomics. 2007. V. 8. P. 360.

Hancks D.C., Ewing A.D., Chen J.E. *et al*. Exon-trapping mediated by the human retrotransposon *SVA* // Genome Res. 2009. V. 19. N 11. P. 1983–1991.

Hayward B.E., Zavanelli M., Furano A.V. Recombination creates novel *L1* (*LINE-1*) elements in *Rattus norvegicus* // Genetics. 1997. V. 146. N 2. P. 641–654.

Jamain S., Girondot M., Leroy P. *et al*. Transduction of the human gene *FAM8A1* by endogenous retrovirus during primate evolution // Genomics. 2001. V. 78. N 1/2. P. 38–45.

Jurka J. Sequence patterns indicate an enzymatic involvement in integration of mammalian retroposons // Proc. Natl Acad. Sci. U S A. 1997. V. 94. N 5. P. 1872–1877.

Kandel E.S., Nudler E. Template switching by RNA polymerase II *in vivo*. Evidence and implications from a retroviral system // Mol. Cell. 2002. V. 10. N 6. P. 1495–1502.

Kazazian H.H., Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution // Science. 2004. V. 303. N 5664. P. 1626–1632.

Kramerov D.A., Vassetzky N.S. Structure and origin of a novel dimeric retroposon *B1-diD* // J. Mol. Evol. 2001. V. 52. N 2. P. 137–143.

Kramerov D.A., Vassetzky N.S. Short retroposons in eukaryotic genomes // Int. Rev. Cytol. 2005. V. 247. P. 165–221

Lebedev Y.B., Amosova A.L., Mamedov I.Z. *et al*. Most recent AluY insertions in human gene introns reduce the content of the primary transcripts in a cell type specific manner // Gene. 2007. V. 390. N 1/2. P. 122–129.

Malik H.S., Eickbush T.H. Phylogenetic analysis of ribonuclease H domains suggests a late, chimeric origin

of LTR retrotransposable elements and retroviruses // Genome Res. 2001. V. 11. N 7. P. 1187–1197.

Martin S.L. The ORF1 protein encoded by *LINE-1*: structure and function during *L1* retrotransposition // J. Biomed. Biotechnol. 2006. V. 2006. P. 1–6.

Mills R.E., Bennett E.A., Iskow R.C. *et al*. Recently mobilized transposons in the human and chimpanzee genomes // Am. J. Hum. Genet. 2006. V. 78. N 4. P. 671–679.

Nishihara H., Smit A.F., Okada N. Functional noncoding sequences derived from *SINEs* in the mammalian genome // Genome Res. 2006. V. 16. N 7. P. 864–874.

Ohshima K., Hamada M., Terai Y., Okada N. The 3′ ends of tRNA-derived short interspersed repetitive elements are derived from the 3′ ends of long interspersed repetitive elements // Mol. Cell Biol. 1996. V. 16. N 7. P. 3756–3764.

Schumann G.G., Gogvadze E.V., Osanai-Futahashi M. *et al*. Unique functions of repetitive transcriptomes // Int. Rev. Cell Mol. Biol. 2010. V. 285. P. 115–188.

Sen S.K., Han K., Wang J. *et al*. Human genomic deletions mediated by recombination between *Alu* elements // Am. J. Hum. Genet. 2006. V. 79. N 1. P. 41–53.

Sverdlov E.D. Perpetually mobile footprints of ancient infections in human genome // FEBS Lett. 1998. V. 428. N 1/2. P. 1–6.

Sverdlov E.D. Retroviruses and primate evolution // BioEssays. 2000. V. 22. N 2. P. 161–171.

Swanstrom R., Parker R.C., Varmus, H.E., Bishop J.M. Transduction of a cellular oncogene: the genesis of Rous sarcoma virus // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. N 9. P. 2519–2523.

Temin H.M. Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. N 15. P. 6900–6903.

Ustyugova S.V., Lebedev Y.B., Sverdlov E.D. Long *L1* insertions in human gene introns specifically reduce the content of corresponding primary transcripts // Genetica. 2006. V. 128. N 1/3. P. 261–272.

van de Lagemaat L.N., Medstrand P., Mager D.L. Multiple effects govern endogenous retrovirus survival patterns in human gene introns // Genome Biol. 2006. V. 7. N 9. P. R86.

Wang H., Xing J., Grover D. *et al*. *SVA* elements: a hominid-specific retroposon family // J. Mol. Biol. 2005. V. 354. N 4. P. 994–1007.

Wessler S.R. Transposable elements and the evolution of gene expression // Symp. Soc. Exp. Biol. 1998. V. 51. P. 115–122.

Zabolotneva A., Tkachev V., Filatov F., Buzdin A. How many antiviral small interfering RNAs may be encoded by the mammalian genomes? // Biol. Direct. 2010. V. 5. P. 62.

EVOLUTIONARILY RECENT GROUPS OF TRANSPOSABLE ELEMENTS IN THE HUMAN GENOME

K.K. Baskaev, A.A. Buzdin

Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia,
e-mail: bu3din@mail.ru

Transposable elements (TEs) are fragments of genomic DNA able to self-reproduce in the host genome. They constitute 40–50 % of mammalian genomes. We have identified two TE families formed relatively recently in the course of human evolution. Members of the first family are present only in the human genome but are absent from other primate DNAs. This family, represented by about 80 members, was formed by fusion of a portion of the CpG-island in the human *MAST2* gene with the 3′-terminal fragment of *SVA* retrotransposon. According to our estimates, this hybrid family, termed *CpG-SVA*, is significantly more active than the ancestor *SVA* family. The regulatory region of MAST2 allows copies of the new family to be transcribed in sperm precursor cells. The second family is older but is still active today. Its representatives were formed by a rather unusual RNA recombination mechanism, which mediated formation of fused DNA copies for diverse cellular transcripts. We have shown that similar mechanisms operate in the genomes of other mammals and even in fungi.

Key words: Human evolution, genetic instability, transposable elements, regulation of gene expression, genetic chimeras, hybrid family of retrotransposons.

миРНК-СОДЕРЖАЩИЕ ТРАНСПОЗОНЫ ЧЕЛОВЕКА

И.И. Титов[1, 2], П.С. Ворожейкин[1]

[1] Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;
[2] Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail titov@bionet.nsc.ru

Недавние исследования показывают важную, если не главную, роль мобильных элементов (транспозонов и ретротранспозонов) в распространении копий миРНК по геному человека (Smalheiser, Torvik, 2005; Piriyapongsa *et al*., 2007; Титов, Ворожейкин, 2011). В работе проведена классификация миРНК-содержащих мобильных элементов (МЭ) по их встречаемости в геноме. Динамика включения соответствующих миРНК человека в базу данных miRBase свидетельствует о том, что МЭ являются главным и до сих пор недооцененным резервуаром миРНК с низким уровнем экспрессии. Хронология распространения МЭ, которые содержат последовательности миРНК человека, может свидетельствовать об их важной роли в возникновении приматов. Полученные результаты могут быть полезными для предсказания новых миРНК и понимания роли миРНК при возникновении новых видов.

Ключевые слова: миРНК, мобильные элементы, ретротранспозон, транспозон, эволюция.

Введение

Некодирующая ДНК составляет около 98 % генома человека. В свое время биологические функции большинства этой ДНК были настолько плохо изучены, что ее называли «мусорной» (Orgel, Crick, 1980). К настоящему времени установлено происхождение от мобильных элементов (МЭ) около половины некодирующей ДНК человека, а значительная часть оставшейся предположительно является неузнаваемым продуктом нейтральной эволюции давно неактивных транспозонов.

Изучение функций некодирующей ДНК привело к открытию микроРНК (миРНК) – жизненно важного класса одноцепочечных РНК, участвующих в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов (Bartel, 2004). Как показывают последние исследования, некоторые известные транспозоны содержат гены миРНК и играют главную роль в распространении миРНК по геному человека (Smalheiser, Torvik, 2005; Piriyapongsa *et al.*, 2007; Титов, Ворожейкин, 2011).

Транспозоны и ретротранспозоны

МЭ (транспозоны и ретротранспозоны) классифицируют как по структуре последовательностей, так и по способу транспозиции в геноме. В зависимости от способа транспозиции выделяют два основных класса МЭ. Класс I представляет собой МЭ (ретротранспозоны), которые включают промежуточные РНК и копируются в геноме посредством обратной транскриптазы (ревертазы). Класс II включает в себя ДНК-транспозоны, которые перемещаются с помощью своих ДНК-копий путем вырезания и вставки транспозона в новое место в геноме (Kidwell, Lisch, 1997).

Среди МЭ выделяют автономные и неавтономные. Автономные кодируют необходимые для транспозиции белки, неавтономные используют ферментный аппарат автономных МЭ (Kapitonov *et al.*, 2004)

По структуре своих последовательностей МЭ объединяются в семейства и подсемейства. Согласно базе Repbase (Jurka *et al.*, 2005), МЭ подразделяются на ДНК-транспозоны, LTR-

ретротранспозоны, non-LTR-ретротранспозоны и эндогенные ретровирусы. В non-LTR-ретротранспозонах присутствуют два широко распространенных семейства *LINE* и *SINE*.

МЭ часто рассматривают как геномных паразитов, взаимная адаптация которых с геномом хозяина привела к исполнению МЭ многообразных функций. Доместикация МЭ включает их использование в качестве источника регуляторных элементов и новых белков из транспозазы, созидателей и редакторов генных сетей (Feschotte, 2008). Подобные многочисленные примеры привели к возникновению теории о том, что МЭ играли центральную роль в эволюции эукариотической регуляции.

МЭ и миРНК

миРНК являются одними из ключевых регуляторов экспрессии генов, при этом гены миРНК человека произошли от МЭ (Smalheiser, Torvik, 2005; Piriyapongsa *et al.*, 2007; Титов, Ворожейкин, 2011). Развитие методов глубокого секвенирования приводит к постоянному обнаружению все более слабо экспрессирующихся миРНК. Динамику обнаружения миРНК можно оценить по наполнению базы данных miRBase. Более интересна динамика наполнения этой базы миРНК, произошедшими от МЭ. Оказывается, что именно эти миРНК в значительной степени ответственны за пополнение базы в последнее время (рис. 1, а). Это обстоятельство может свидетельствовать о том, что МЭ являются главными кандидатами на поиск новых миРНК. Результаты поиска копий известных миРНК, когда подавляющее число копий оказались произошедшими от МЭ, также свидетельствуют в пользу этого предположения (Титов, Ворожейкин, 2011). Среди типов МЭ, которые содержат миРНК, нельзя выделить доминирующие (рис. 1, б).

Поскольку миРНК в пре-миРНК входит в состав стебля, то миРНК-содержащие МЭ обладают такой до сих пор слабо изученной особенностью, что сами являются мишенями миРНК своих потомков. Если обычно в природе паразиты конкурируют за общий субстрат, миРНК-содержащие МЭ после превращения в гены миРНК получают возможность напрямую подавлять размножение себе подобных.

Эволюция приматов и распространение МЭ

Для того чтобы соотнести эволюцию приматов с размножением МЭ, которые содержат миРНК человека, при помощи программы repeatmasker мы провели поиск генов этих миРНК и человека, которые произошли от транспозонов. Далее число наблюдаемых транспозонов было уменьшено дополнительным ограничением на сохранение последовательности миРНК в области совпадения пре-миРНК с транспозоном. Времена экспансии МЭ были взяты из литературы (Smit, 1993; Steiper, Young, 2006; Giordano *et al*., 2007; Sellis *et al*., 2007; Pace, 2008).

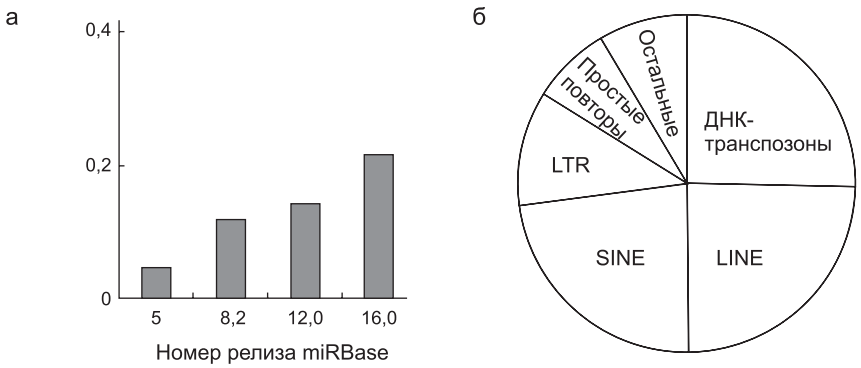


Рис. 1. Число и классификация миРНК-содержащих транспозонов в геноме человека.

а – доля генов миРНК, предположительно произошедших от мобильных элементов, от общего числа генов миРНК для четырех релизов базы miRBase: 5, 8.2 (Piriyapongsa *et al.*, 2007), 12.0, 16.0 (Yuan *et al*., 2011); б – соотношение различных типов транспозонов, от которых произошли миРНК (данные для 16.0 релиза miRBase).

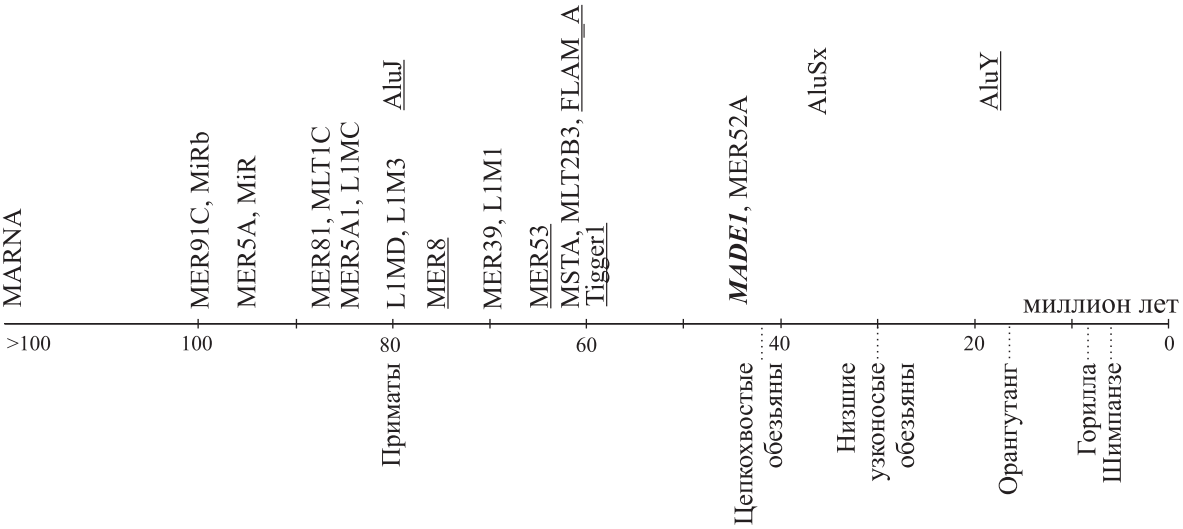


Рис. 2. Хронология распространения миРНК-содержащих транспозонов и разделения видов вдоль ветви человека.

Жирным курсивом отмечены транспозоны, соответствующие миРНК с числом копий больше 100, подчеркнуты транспозоны, соответствующие миРНК с числом копий от 100 до 10, все остальные – число копий миРНК меньше 10.

На временной шкале эволюции человека можно выделить два этапа, связанных с вторжением миРНК-содержащих МЭ (рис. 2). Первым событием, по времени совпадающим с возникновением приматов, является вторжение большого числа МЭ 60–100 млн лет назад. На втором этапе, который совпадает с началом разделения приматов на виды около 40 млн лет назад, произошла экспансия МЭ, содержащих элемент *made1*. Именно этому элементу принадлежит большинство копий миРНК в геноме человека. Совпадение времен крупномасштабных геномных и фенотипических изменений является еще одним свидетельством в пользу предположения о центральной роли МЭ в эволюции регуляции эукариот.

Заключение

После миллионов лет эволюции МЭ достигли баланса между повреждающими и благоприятными для организма эффектами. В отличие от рутинных функций роль МЭ в возникновении видов почти не изучена. Здесь мощным механизмом изменения фенотипа может оказаться перенастройка генных сетей размножением миРНК-содержащих МЭ. Если такой механизм был доминирующим, изучение остатков давно пассивных МЭ, когда-то называемых «мусорной» ДНК, прольет свет на его функционирование.

Благодарности

Работа поддержана Междисциплинарным интеграционным проектом СО РАН № 119 «Постгеномная биоинформатика: компьютерный анализ и моделирование молекулярно-генетических систем» и Госконтрактом № 10104-37/П-24/110-323/020610-004 от 02.06.10 г. по теме «Эволюция гео-биологических систем» по подпрограмме 2 программы 24 фундаментальных исследований Президиума РАН «Происхождение биосферы и эволюция гео-биологических систем».

Литература

Титов И.И., Ворожейкин П.С. Анализ дупликации генов миРНК в геноме человека и роль эволюции транспозонов в этом процессе // Вавиловский журн. генет. и селекции. 2011. Т. 15. № 1. С. 139–147.

Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function // Cell. 2004. V. 116. N 2. P. 281–297.

Feschotte C. The contribution of transposable elements to the evolution of regulatory networks // Nat. Rev. Genet. 2008. V. 9. N 5. P. 397–405.

Giordano J., Ge Y., Gelfand Y. *et al*. Evolutionary history of mammalian transposons determined by genome-wide defragmentation // PLoS Comput. Biol. 2007. V. 3. N 7. P. e137.

Jurka J., Kapitonov V.V., Pavlicek A. *et al*. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements // Cytogenet. Genome Res. 2005. V. 110. P. 462–467.

Kapitonov V.V., Pavlicek A., Jurka J. Anthology of Human Repetitive DNA // Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine / Ed. R.A. Meyers. Wiley-VCH, Weinheim, 2004. V. 1. P. 251–305.

Kidwell M.G., Lisch D. Transposable elements as sources of variation in animals and plants // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. N 15. P. 7704–7711.

Orgel L.E., Crick F.H.C. Selfish DNA: the ultimate parasite // Nature. 1980. V. 284. N 5757. P. 604–607.

Pace J.K. The evolutionary history and genomic impact of mammalian DNA transposons. Arlington: The University of Texas at Arlington, 2008.

Piriyapongsa J., Mariño-Ramírez L., Jordan I.K. Origin and evolution of human microRNAS from transposable elements // Genetics. 2007. V. 176. N 2. P. 1323–1337.

Sellis D., Provata A., Almirantis Y. *Alu* and *LINE1* distributions in the human chromosomes: evidence of global genomic organization expressed in the form of power laws // Mol. Biol. Evol. 2007. V. 24. N 11. P. 2385–2399.

Smalheiser N.R., Torvik V.I. Mammalian microRNAs derived from genomic repeats // Trends Genet. 2005. V. 21. N 6. P. 322–326.

Smit A. Identification of a new, abundant superfamily of mammalian LTR-transposons // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. N 8. P. 1863–1872.

Steiper M., Young N. Primate molecular divergence dates // Mol. Phylogenet. Evol. 2006. V. 41. P. 384–394.

Yuan Z., Sun X., Liu H., Xie J. MicroRNA genes derived from repetitive elements and expanded by segmental duplication events in mammalian genomes // PloS One. 2011. V. 6. N 3. P. e17666.

TRANSPOSONS CONTAINING HUMAN miRNAS

I.I. Titov[1, 2], P.S. Vorozheykin[1]

[1] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;
[2] Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

Summary

Recent studies show an important if not the main role of transposable elements (TEs) in miRNA expansion over the human genome (Smalheiser, Torvik, 2005; Piriyapongsa *et al*., 2007; Titov, Vorozheikin, 2011). We present a classification of miRNA-containing TEs based on their abundance in the human genome. The history of submission of corresponding miRNAs to the mirBase indicates that TEs are the main and still underestimated reservoir of low-expressed miRNAs. The chronology of expansion of TEs that contain human miRNAs suggests their important role in primate origin. Our results can be useful for prediction of miRNAs and understanding of their role in the origin of new taxa.

Key words: miRNA, mobile element, retrotransposon, DNA transposon, evolution.

СТАТИСТИЧЕСКИЕ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ КЛИНИЧЕСКИХ ДАННЫХ ЭКСПРЕССИОННЫХ МИКРОЧИПОВ

Ю.Л. Орлов, В.М. Ефимов, Н.Г. Орлова

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия,
e-mail: orlov@bionet.nsc.ru; efimov@bionet.nsc.ru; orlovanina2@mail.ru

Мобильные элементы генома человека способны экспрессироваться в соматических клетках в различных тканях. Прямая экспериментальная оценка уровня их экспрессии затруднена и не имеет большой статистической базы. В то же время огромный массив данных микрочипов, накопленный по клиническим данным экспрессии генов в геноме человека, позволяет исследовать статистические вопросы качества аннотации генов, шумов при измерении экспрессии, а также экспрессии мобильных элементов, включенных в пробы микрочипов. Такие данные по экспрессии генов при раковых заболеваниях накоплены за последние годы на основе платформы Affymetrix в связи с диагностическими и медицинскими задачами в Интернет-репозитариях данных Gene Expression Omnibus (GEO) NCBI и ArrayExpress. Статистические оценки экспрессии мобильных элементов изучались ранее в связи с проблемами качества олигонуклеотидных проб. Были исследованы геномная локализация и качество аннотации целевых последовательностей наборов проб Affymetrix U133 GeneChip и показано, что до 25 % целевых последовательностей перекрываются с мобильными элементами в хромосомных координатах.
В данной работе численно показан статистически значимый эффект изменения экспрессии в раковых тканях для наборов проб, связанных с мобильными элементами. Приведен обзор современных технологий оценки экспрессии мобильных элементов.

Ключевые слова: геном человека, мобильные элементы, экспрессионные микрочипы, статистические оценки, транскрипция.

Введение

Геном человека приблизительно на 45 % состоит из диспергированных повторяющихся элементов (Sela *et al*., 2010). *Alu*-повтор – наиболее распространенный примат-специфичный мобильный элемент, существующий в более чем миллионе копий в геноме, что составляет около 11 % общего размера генома (Zhang *et al*., 2011). *Alu*-повтор представляет семейство *SINE* коротких (до 300 п.н.) диспергированных повторов. Геном человека содержит множество копий других мобильных элементов включая *MIR* (*SINE*), длинные диспергированные повторы (*LINE*, long interspersed nuclear elements), занимающие до 17 % генома, такие, как *LINE-1* (*L1*), *LINE-2* (*L2*), и *CR1* (*L3*) и LTR-повторы. Структура и классификация мобильных элементов в геноме человека детально изучены, существуют базы данных RepBase (http://www.girinst.org/repbase/; Jurka, 2000; Jurka *et al*., 2005) и разметка (аннотация) последовательностей на хромосомах с помощью программы RepeatMasker (Smit *et al*., 1996–2010).

В ряде работ был исследован характер распределения мобильных элементов в геноме человека относительно генов (Sela *et al*., 2007, 2010; Levy *et al*., 2010). Показано, что мобильные элементы имеют тенденцию к кластеризации во внутригенных районах генов, в интронах (Sela *et al*., 2010). Исходя из суммарного размера интронов в геноме доля геномных повторов, находящихся в интронах (около 60 % в зависимости от семейства повторов), значительно превышает ожидаемую.

До 25 % промоторов генов и 4 % экзонов в геноме человека содержат последовательности, происходящие от мобильных элементов (Jordan *et al*., 2003). Известно явление экзонизации – приобретение генами новых экзонов из мобильных элементов, прежде всего *Alu*, в интронах. Показано, что доля экзонов, происходящих от мобильных элементов, в аннотированных генах составляет доли процента (в среднем 0,12 % в зависимости от класса геномных повторов, в том числе 0,2 % для *Alu*) (Sela *et al*., 2010).

Интересно отметить, что несмотря на присутствие мобильных элементов в тысячах копий, избыточность их числа в геноме по отношению к числу генов, они остаются транскрипционно молчащими в нормальных условиях в соматических клетках и не перемещаются в геноме (Hagan, Rudin, 2002). В то же время при повреждающих воздействиях на клетку, в частности при раке, может происходить активация транспозонов различных классов в геноме (Gasior *et al*., 2006; O′Donnell, Burns, 2010; Iramaneerat *et al*., 2011). Недавние исследования (Zhang *et al*., 2011) выявили, что инсерция *Alu*-элементов связана с канцерогенезом. Показано, что гены-супрессоры рака гораздо более насыщены *Alu*-повторами, чем онкогены (Zhang *et al*., 2011). В работе Banaz-Yaşar с соавт. (2010) изучались активация элементов *LINE-1* при раке, влияние ретротранспозиции на факторы системы кроветворения. Один из известных механизмов подавления спонтанной экспрессии мобильных элементов – метилирование ДНК (Daskalos *et al*., 2009; Iramaneerat *et al*., 2011). Нарушение работы этого внутриклеточного механизма, гипометилирование геномных участков, содержащих транспозоны, в частности *HERV-K*, приводят к активации их экспрессии, что может быть использовано в диагностических целях (Iramaneerat *et al*., 2011). Важнейшая задача постгеномной компьютерной генетики – исследование экспрессии мобильных элементов в клетках человека, возможности ее оценки и использования в диагностических целях и в целях тестирования медицинских препаратов (Daskalos *et al*., 2009; Balaj *et al*., 2011).

За последние годы было предложено несколько технологий анализа экспрессии генов как с помощью экзонных микрочипов (Jacox *et al*., 2010), так и с помощью тотального секвенирования (RNA-seq) (Mortazavi *et al*., 2008; Ozsolak, Milos, 2011).

Мы предлагаем оценить экспрессию мобильных элементов в опухолевых тканях статистически, по данным экспрессионных микрочиповых экспериментов, накопленных в базе данных ArrayExpress (www.ebi.ac.uk/arrayexpress). Экспрессионные микрочипы (microarray) представляют собой матрицы для количественного измерения присутствия транскриптов (мРНК) одновременно для большого числа генов в образце клеток или ткани. Микрочипы измеряют аффинность (степень связывания в процессе гибридизации) меченых нуклеотидных последовательностей образца к набору специфичных к заданному гену проб, закрепленных на твердой поверхности микроматрицы. Эксперимент проводится во многих ячейках микроматрицы (десятки тысяч проб) одновременно для заданного технологической платформой множества транскрибирующихся последовательностей генов вплоть до всех аннотированных в геноме генов. Соревнование в сфере технологий производства микрочипов, технологий измерения сигналов гибридизации дало большой толчок научным исследованиям и огромный фактический материал. Следует отметить, что за короткий период в последние 2–3 года на смену микрочипам приходят все более совершенные технологии полного секвенирования транскриптом, имеющие ряд неоспоримых преимуществ, в частности, по способности определения новых вариантов транскриптов гена, по динамической шкале измерения уровня транскрипции, но все же достаточно дорогостоящие (на порядок по сравнению с микрочипами) для широкого использования (Mortazavi *et al*., 2008; Malone, Oliver, 2011). Тем не менее микрочиповая технология позволяет достаточно надежно определять дифференциально экспрессирующиеся гены за счет репликации экспериментов (Malone, Oliver, 2011).

Технология синтеза коротких олигонуклеотидных зондов (25 п.н.) непосредственно на поверхности микрочипа *in situ* с использованием литографических масок была разработана компанией «Аффиметрикс» для изготовления микрочипов GeneChip (Affymetrix, www.affymetrix.com/). Методы измерения уровней экспрессии генов

на основе таких микрочипов получили широкое распространение в медицинских исследованиях (Liu *et al*., 2003; Dai *et al*., 2005; Harbig *et al*., 2005). Олигонуклеотидная матрица GeneChip использует наборы синтезированных *in situ* олигонуклеотидных проб, по 11–20 проб в наборе, каждая размером 25 нуклеотидов, для представления транскриптов генов или их изоформ. Для каждого гена-мишени использованы фрагменты-представители (initial target sequences) длиной 150–450 п.н. для выбора и локализации олигонуклеотидных проб. Сигнал от пробы с совершенным совпадением всех нуклеотидов учитывается после вычитания неспецифического сигнала кросс-гибридизации от пробы с одним центральным несовпадающим нуклеотидом (Affymetrix, 2002, http://www.affymetrix.com/support/).

Здесь будут рассмотрены данные микрочипов Affymetrix GeneChip, относящиеся к клиническим экспериментам на опухолевых тканях, хирургически полученных при лечении, в применении к анализу спонтанной экспрессии мобильных элементов (Orlov *et al*., 2007). Отметим, что дизайн проб этого микрочипа исходно не предназначался для такого анализа, что потребовало разработки специальных статистических оценок.

Непосредственная детекция экспрессии транспозонов, передвижений и встроек мобильных элементов в хромосомы соматических клеток технически ограничена. По методическим и техническим причинам геномные повторы обычно исключаются из дизайна микрочипов (Nellåker *et al*., 2009), в частности из-за избыточности мобильных элементов в геноме и сложности подбора уникальных проб. Таким образом, их потенциальная транскрипционная активность остается недостаточно охарактеризованной, несмотря на многочисленные наблюдения присутствия транскрипции в различных тканях при заболеваниях человека (Frank *et al*., 2008; Karlsson *et al*., 2001). С помощью технологий анализа полноразмерных «кэпированых» транскриптов была показана связь инициации транскрипции с присутствием в 5′-области генов ретротранспозонов (от 6 до 30 %) в геномах мыши и человека (Faulkner *et al*., 2009). Экспрессия генов, содержащих ретротранспозоны в 3′-НТР, уменьшена по сравнению с генами, не содержащими таких транскриптов (Faulkner *et al*., 2009).

Проблема анализа транскрипции с помощью микрочипов в целом связана с рядом технических ограничений и ошибок при создании технологии. Дизайн проб (исходный выбор производителем микрочипов локализации в гене и структуры олигонуклеотидных проб) может не соответствовать целевому транскрипту (гену-мишени) и содержать ряд технических проблем, связанных как с гибридизацией, так и с аннотацией – неверное указание гена-мишени, неоднозначность соответствия один набор проб–один ген. Такой дизайн олигонуклеотидных проб может влиять на регистрацию сигналов гибридизации, нормализацию данных, снижать воспроизводимость экспериментов, вести к противоречивым результатам анализа одних и тех же данных (Gautier *et al*., 2004; Harbig *et al*., 2005; Zhang *et al*., 2005; Okoniewski, Miller, 2006; Orlov *et al*., 2007; Stalteri, Harrison, 2007; Fasold *et al*., 2010).

Мы оценили присутствие мобильных элементов генома человека в целевых последовательностях транскриптов, представленных наборами проб на микрочипе Affymetrix, и возможность статистической оценки транскрипции классов мобильных элементов в соматических клетках.

Методы

Исходно до 2003 г. был разработан микрочип GeneChip U133A, дополненный позднее чипами U133B – U133 plus 2, более полно соответствующими всем известным и проаннотированным на тот момент генам в геноме человека. Уровень экспрессии гена определяется суммой данных всего набора проб (probeset).

Была выполнена независимая аннотация наборов проб микрочипов Affymetrix на основе картирования нуклеотидных последовательностей проб на референсные последовательности генома человека (Gautier *et al*., 2004; Dai *et al*., 2005; Harbig *et al*., 2005; Leong *et al*., 2005). Выявлен ряд несоответствий в аннотации наборов проб; изменения в идентификации генов могут затрагивать до 30–50 % наборов проб (Harbig *et al*., 2005; Okoniewski, Miller, 2006; Fasold *et al*., 2010).

В то же время вопрос картирования проб на целевые последовательности генов, содержащие мобильные элементы в геноме человека, не рассматривался детально. Статистически связь присутствия последовательностей мобильных элементов и систематических изменений в экспрессии генов была показана только в работе Orlov с соавт. (2007).

Мы использовали аннотацию наборов проб Affymetrix U133 GeneChip, выполненную ранее в работе Orlov с соавт. (2007) с целью детального изучения влияния мобильных элементов на изменение экспрессии генов в раковых тканях. Разработан ряд статистических компьютерных методов для количественных оценок изменения активности мобильных элементов через изменение экспрессионного сигнала соответствующих наборов проб. Анализ был сделан на экспрессионных данных GeneChip из больших выборок (базы данных и репозитарии GEO (Gene Expression Omnibus), http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo, и ArrayExpress, http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/) по экспрессии генов в раковых клетках, отличающихся по клиническим и генетическим параметрам, а также по степени агрессивности роста опухоли.

Анализ последовательностей олигонуклеотидных проб на микрочипах

Использовались данные о целевых нуклеотидных последовательностях (мишенях) для наборов проб Affymetrix, микрочипы серий U133A и U133B, загруженные с официального сайта разработчиков платформы NetAffx (http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx) (Liu *et al*., 2003). Эти последовательности предназначаются для однозначной детекции транскрибируемых последовательностей в геноме. Для картирования таких целевых последовательностей на референсную последовательность генома человека была использована программа BLAT (http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat) с порогом отсечения, установленным на 90 %-м уровне сходства. Затем использовалась аннотация геномного браузера UCSC Genome Browser для генов RefSeq, мРНК и сплайсированных вариантов EST на референсные последовательности хромосом генома человека по сборке NCBI Build 36 (hg18). Аннотация наборов проб выполнялась по исходным целевым последовательностям, а не по отдельным 25-мерным нуклеотидных пробам. Данные по наличию геномных повторов были получены с помощью разметки RepBase в геномном браузере UCSC (http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks, табл. RepeatMasker). Примеры расположения целевой последовательности наборов проб приведены на рис. 1.

Проверка качества целевых последовательностей Affymetrix выполнялась последовательно: сначала были отфильтрованы некартируемые и неоднозначно картируемые последовательности, затем последовательности в неверной ориентации к аннотированным генам. Затем проводилась разметка мобильных элементов из RepBase. Для каждой целевой последовательности, однозначно картированной на геноме, была получена таблица геномных повторов, классифицированных по семействам повторов и типам (*DNA*, LTR, *LINE*, *SINE* включая *MIR* и *Alu*), а также простые тандемные повторы и участки низкой сложности), определены длина и процент длины, занятый геномными повторами данных типов. Суммарная статистика приведена в табл. 1. Как отмечалось ранее, процент «экзонизированных» геномных повторов невелик (Sela *et al*., 2010). Перекрывание целевой последовательности транскрипта гена с геномным повтором не является ошибкой и не указывает на факт экзонизации.

Данные для анализа экспрессии

Было проанализировано распределение значений экспрессии транскриптов, полученных с помощью микрочипов Affymetrix U133A и U133B в 249 образцах первичных опухолей молочной железы (NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/; данные GSE4922). Выборки раковых тканей были разделены на группы, соответствующие гистологическим классам опухоли по степени агрессивности (метастазирования) рака молочной железы. Объем выборок составлял от 40 до 100 образцов (Miller *et al*., 2005). Были использованы также данные экспрессии из нескольких выборок нормальных и раковых тканей мозга (GEO GDS1962), 29 наборов микрочиповых данных Affymetrix, представляющих рак легких (GEO ID: GSE5816; http: //www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) (Shames *et al*., 2006). Все данные

Рис. 1. Примеры перекрывания целевых последовательностей наборов проб с мобильными элементами в геноме человека (визуализация UCSC Genome Browser).

а – пример целевой последовательности Affymetrix 217670_at на хромосоме 11 человека, совпадающей с повторяющимися элементами из RepeatMasker (*SINE*, семейство *Alu*-повторов). Данная целевая последовательность находится в интроне. Возможна «экзонизация» соответствующего повтора в неаннотированных изоформах транскрипта (присутствие сплайсированных мРНК) на данном участке.
б – целевая последовательность набора проб 221200_at не соответствует ни генам, ни мРНК и находится внутри протяженного геномного повтора HERVK3-int (ERVK, LTR).

Таблица 1

Классификация геномных повторов
в целевых последовательностях наборов проб Affymetrix

Группа геномных повторов	Классы повторяющихся элементов по RepBase	Число наборов проб	Доля наборов проб, %
Короткие транспозоны (< 300 п.н.)	*SINE/Alu*, *SINE/MIR*	3200	31,8
– в том числе *Alu*	*Alu*	1807	18,0
Длинные транспозоны (>300 п.н.)	*LINE/CR1*, *LINE/L1*, *L2*	2191	21,8
– в том числе *L1*	*L1*	1394	13,9
LTR	LTR/ERV1/ERVK/ERVL/MaLR	1235	12,3
DNA	*MER1*, *MER2*	1005	10,0
Другие повторяющиеся элементы и сателлитные повторы	RNA, rRNA, Satellite, scRNA, snRNA, srpRNA	52	0,5
Участки низкой сложности, простые повторы	Low_complexity	2373	23,6

прошли контроль качества сигнала экспрессии, нормализацию по алгоритму MAS5 (MAS 5.0 algorithm) (Affymetrix, 2002). Затем значения экспрессии были логарифмиче-ски нормированы для сопоставления экспрессии генов на микрочипах из разных экспериментов. Измерение уровня экспрессии проводилось без выделения отдельных проб.

Статистический анализ

Была использована эмпирическая функция распределения сигнала экспрессии на индивидуальных микрочипах. Эмпирическая функция распределения была построена также для групп наборов проб, классифицированных по степени присутствия повторов в целевых последовательностях. Для сравнения распределений использовалась компьютерная симуляция – были сгенерированы случайные группы наборов того же размера, процедура повторялась с помощью датчика случайных чисел.

Для контроля предсказательной (диагностической) способности наборов проб, содержащих мобильные элементы и не содержащих их, были использованы опубликованные ранее результаты группировки тканей (различных гистологических классов рака молочной железы). Данные группы разделяются по экспрессии около 4000 дифференциально экспрессирующихся генов (Orlov *et al*., 2007).

Для численной оценки использовалась программа SAM (Statistical Analysis of Microarrays) (Tusher *et al*., 2001). Для каждого набора проб данная программа рассчитывает «значимость различия» между двумя выборками данных (группами опухолей) с помощью оценки значения доли ложного предсказания «false discovery rate» (параметр q-value). При фиксированном пороговом уровне q-value программа SAM идентифицирует набор генов (наборов проб), позволяющих достоверно разделить выборки. Зафиксировав значение этого параметра на уровнях 0,05 и 0,015, мы оценили фракцию наборов проб, позволяющих дискриминировать типы опухолей и содержащих при этом мобильные элементы. Дискриминирующая способность проб, содержащих мобильные элементы, была оценена с помощью отношения наблюдаемой и ожидаемой доли проб, содержащих мобильные элементы. Для оценки значимости результатов использовался критерий Манна-Уитни (U-test) и односторонний точный критерий Фишера для таблиц данных.

Результаты

Статистика геномных повторов в наборах проб

В целом до 25 % целевых последовательностей для наборов проб проявляют значимое сходство с мобильными элементами (геномны-

ми повторами), распространенными в геноме человека (Orlov *et al*., 2007). Исходно дизайн микрочипа не предназначался для исследования экспрессии мобильных элементов. Но эти данные могут быть использованы для статистических оценок, так же, как и для фильтрации и калибровки измерения экспрессионного сигнала. Табл. 1 представляет число наборов проб, содержащих полностью или частично, геномные повторы.

Как видно из табл. 1, большое число целевых последовательностей наборов проб на микрочипе проявляют значимое сходство с геномными повторами, представляя, тем не менее, лишь малую часть от более чем 5 млн участков, размеченных RepeatMasker (Smit *et al*., 1996–2010) в геноме человека (таблица UCSC). Напомним, что размеры последовательностей варьируют от 100 до 500 п.н. Доля перекрывания, как правило, невысока, менее 50 % для большинства последовательностей (рис. 2). В то же время несколько тысяч целевых последовательностей перекрываются с геномными повторами более чем на 40 % от своей длины, а около 600 целевых последовательной – более чем на 90 %, что, несомненно, влияет на качество сигнала и может детектировать экспрессию мобильных элементов, а не генов, для которых исходно предназначался дизайн наборов проб. При этом часть последовательностей содержит простые тандемные повторы и участки низкой сложности, занимающие менее 10 % от общей длины целевой последовательности, что не должно оказывать влияние на сигнал экспрессии (рис. 2).

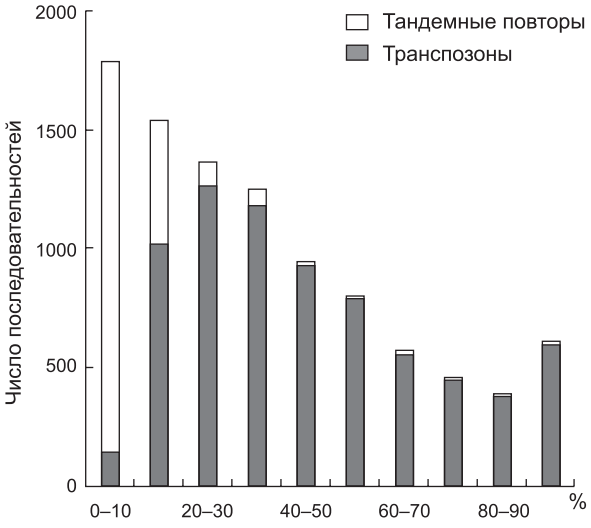


Рис. 2. Распределение числа целевых последовательностей наборов проб Affymetrix U133, пересекающихся с повторяющимися элементами в геноме человека в зависимости от процентной доли геномных повторов в последовательности (ось абсцисс – от 0 до 100 %).

Классификация целевых последовательностей Affymetrix по качеству дизайна и соответствию аннотации генов

Табл. 2 содержит общую статистику различных категорий неверно определенных целевых последовательностей проб Affymetrix U133 на основе геномной сборки Hg18. Около 6 % со-

Таблица 2

Общая классификация проблемных целевых последовательностей микрочипа Affymetrix U133 (чипы A и B)

Группа целевых последовательностей наборов проб	Число	Доля, %
Неоднозначно картируемые на геном человека	1984	4,4
Картированные в обратной ориентации к транскрипту	810	1,8
Перекрывающиеся с геномными повторами	3387	7,6
80–100 % длины последовательности	761	1,7
60–80 %	936	2,1
40–60 %	1690	3,8
Итого не рекомендуется использовать	6181	13,8
Общее число корректных (рекомендуемых к использованию) наборов проб (включая перекрывание менее 40 % длины последовательности)	38511	86,2
Общее число последовательностей микрочипов U133A и B	44692	100

ставляют последовательности, картируемые на геном в различных участках (неоднозначно картируемые), не соответствующие последовательностям генома человека, и последовательности, картируемые в противоположной ориентации к транскрибируемым последовательностям генов. Общая фракция целевых последовательностей наборов проб велика, до 25 %, но большей частью геномные повторы «присутствуют» в таких последовательностях лишь частично, и их можно считать адекватными для измерения экспрессионного сигнала. В целом 86 % наборов проб были рекомендованы к использованию (Orlov *et al*., 2007).

Сравнение средних значений экспрессии наборов проб, содержащих геномные повторы

Мы сравнили средние уровни экспрессии для групп целевых последовательностей, содержащих геномные повторы в зависимости от длины последовательности (с шагом гистограммы 10 %), и для корректных целевых последовательностей (норма). Для каждой группы наборов проб, целевые последовательности которых содержат повторы, мы определили средние значения сигнала гибридизации наборов проб (в логарифмической шкале) и коэффициент вариации (дисперсия, нормированная на среднее значение) на выборках данных опухолей (рис. 3). На рис. 3 показано уменьшение среднего значения сигнала при увеличении доли геномных повторов в целевой последовательности. В то же время коэффициент вариации имеет противоположный тренд и может быть достаточно большим, более 0,1, для последовательностей, почти полностью занятых геномными повторами.

Способность целевых последовательностей, перекрывающихся с геномными повторами, к определению дифференциально экспрессирующихся генов

Было выполнено сравнение способности наборов проб дискриминировать дифференциально экспрессирующиеся гены в выборках образцов опухолей различных типов. Гистологически опухоли молочной железы классов I и III (низко- и высокометастазирующие) различаются, что может быть статистически на микрочипах показано дифференцированной экспрессией нескольких тысяч наборов проб Affymetrix. Используя программное обеспечение SAM

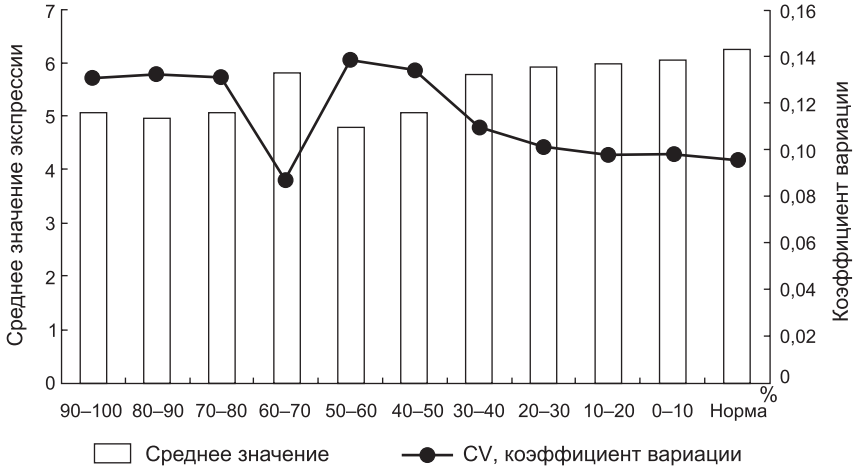


Рис 3. Среднее значение экспрессии и коэффициент вариации наборов проб, перекрывающихся с геномными повторами, по выборке опухолевых тканей.

Ось абсцисс – группа целевых последовательностей, занятых повторами на 90–100 %, 80–90 % и т. д. вплоть до 0 %, корректно определенных последовательностей (норма). По оси ординат слева – среднее значение экспрессии соответствующей группы в логарифмической шкале сигнала гибридизации (колонки гистограммы), справа – коэффициент вариации (линия), безразмерное значение. Видны противоположные тренды – уменьшение среднего значения экспрессии при увеличении доли геномных повторов и увеличение коэффициента вариации (зашумленности сигнала). Данные приведены по выборке образцов опухолей молочной железы (гистологический Grade I).

(Tusher *et al*., 2001), мы отобрали набор из 6144 дифференциально экспрессирующихся генов на микрочипах U133A&B на фиксированном уровне q-value ложного положительного предсказания, не превышающем 1,5 % .

Предполагая, что перекрывание с мобильными элементами приводит к ухудшению качества сигнала из-за неспецифического связывания проб с посторонними транскриптами и не может быть использовано для дискриминации, мы вправе ожидать, что такие наборы проб должны быть недопредставлены во множестве дифференциально экспрессирующихся генов. Было рассчитано число наборов проб, занятых повторами на 10, 20, … , 100 %, найденных в данном множестве дифференциально экспрессирующихся.

Доля дифференциально экспрессирующихся наборов проб, для которых соответствующая целевая последовательность перекрывается с геномными повторами в геноме человека, может быть рассчитана по формуле:

$$r = (R_s / R)/(N_s / N),$$

где N – общее число наборов проб микрочипа; R – число наборов проб, перекрывающихся с геномными повторами, N_s – число наборов проб, дифференциально экспрессирующихся в исследованных видах опухолей по статистическому тесту программы SAM; R_s – число наборов проб, перекрывающихся с геномными повторами и дифференциально экспрессирующихся в тех же видах опухолей по тесту SAM.

Таким образом, r – это отношение наблюдаемой доли наборов проб, связанных с геномными повторами, к ожидаемой доле, ее значение может быть как больше, так и меньше единицы. Было определено, что присутствие простых тандемных повторов и участков низкой сложности не влияет на способность наборов проб дискриминировать опухоли. Простые повторы в целом занимают незначительную часть целевых последовательностей (рис. 2), наборы проб, ассоциированные с простыми повторами, имеют малую вариабельность сигнала (коэффициент вариации по клиническим выборкам данных) и функционально не влияют на дискриминирующие свойства наборов проб при сравнении биологически различных выборок образцов тканей.

В то же время наборы проб, целевые последовательности которых содержат последовательности мобильных элементов, существенно хуже дискриминируют опухоли ($r < 1$). Более того, наблюдается тренд изменения дискриминирующего параметра r в зависимости от доли целевой последовательности, занятой мобильными элементами, особенно для протяженных геномных повторов (LTR и LINE): чем больше геномных повторов присутствует в целевой последовательности набора проб микрочипа, тем меньше отношение r (рис. 4).

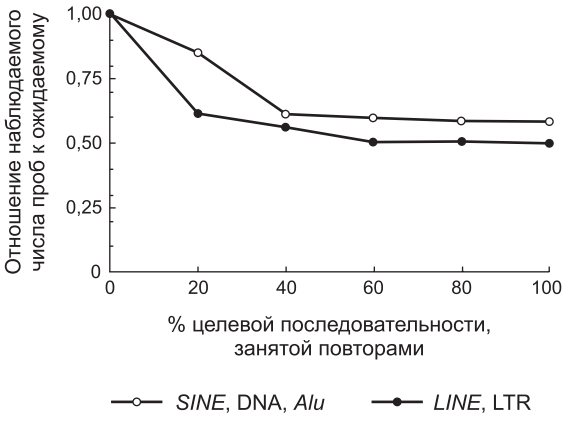


Рис. 4. Оценка отношения r дискриминирующих наборов проб к ожидаемому (при фиксированном q < 1,5 %) как функция процента целевой последовательности, занятой транспозонами.

Статистический анализ данных экспрессии наборов проб, связанных с геномными повторами, на выборках образцов опухолей (молочной железы, тканей мозга) выявил общую воспроизводимую тенденцию: 1) увеличение шума в сигнале экспрессии (коэффициента вариации); 2) уменьшение среднего уровня сигнала экспрессии и 3) увеличение числа ложных корреляций, не связанных с взаимной регуляцией транскрипции. Таким образом, при интерпретации данных экспрессионных микрочипов необходим учет особенностей геномной аннотации мобильных элементов.

Заключение

Оценка активности мобильных элементов в геноме человека может быть выполнена на основе различных технологий включая полное ресеквенирование индивидуальных геномов и

секвенирование индивидуальных транскриптом (Ewing, Kazazian, 2010). В перспективе это позволит более полно описать картину активации мобильных элементов в соматических клетках при повреждающих воздействиях различных типов, описать функционально активные копии и места встраивания мобильных элементов в геноме. Отметим, что новые технологии имеют ряд технических проблем, в частности достаточно высокий уровень ошибок секвенирования, чувствительность к GC-составу и гетерогенности последовательностей (Malone, Oliver, 2011). Это требует разработки специализированных компьютерных методов анализа.

Источники шума в численных данных микрочиповых экспериментов могут быть различны, связаны как с технологическими причинами, так и с неверной интерпретацией (аннотацией) наборов проб (Liu *et al*., 2003; Gautier *et al*., 2004; Harbig *et al*., 2005). Критика качества наборов проб, связанных с присутствием в них участков сходства с геномными повторами, была высказана ранее, однако без статистических оценок применительно к экспрессии мобильных элементов. Здесь показаны статистические оценки влияния повторов на интенсивность экспрессионного сигнала, коэффициент вариации и способность дискриминировать различные биологические классы (число дифференциально экспрессирующихся наборов проб) на больших выборках клинических данных (Orlov *et al*., 2007). Несмотря на ошибки дизайна проб и аннотации последовательностей-мишеней Affymetrix U133A&B, технологически платформа дает воспроизводимые результаты, подтвержденные большим объемом данных. Продолжаются работы по компьютерной аннотации наборов проб и сравнению микрочиповых платформ Affymetrix, основанных на генах (серия U133) и экзонах (Gene 1.0 и Exon 1.0), что позволяет получить новые результаты по экспрессии изоформ транскриптов (На *et al.*, 2009; Risueco *et al*., 2010).

Таким образом, потенциал микрочиповых данных может быть использован гораздо полнее через интеграцию геномной аннотации и клинических данных. Анализ наборов проб проводился для целевых последовательностей-мишеней. Более детальный анализ каждого набора проб на уровне индивидуальных проб только уточняет картину и увеличивает число выявленных неверно аннотированных проб, дающих ненадежный сигнал экспрессии. Дальнейшее изменение аннотации референсного генома, в частности, в связи с новыми проектами ресеквенирования генома человека, может увеличить число неверно аннотированных проб и привести к переоценке данных, накопленных при использовании данного типа микрочипов за последние годы (Fasold *et al*., 2010).

Детекция экспрессии мобильных элементов на данном типе микрочипа не была спланирована первоначально и показана только как результат статистического анализа. Исследование транскрипции в геноме человека с помощью новых технологий секвенирования, в частности RNA-seq, позволяет найти новые транскрипты в геноме, детекция которых невозможна с помощью микрочипов (Faulkner *et al*., 2009). Таким образом, измерение уровней экспрессии мобильных элементов в соматических клетках, в частности в опухолевых тканях, может быть сделано с помощью других подходов. Мы потеряем, к сожалению, огромный массив клинических данных для микрочипов, накопленный в диагностических целях.

Отметим, что гибридизационный сигнал от набора проб с обнаруженным перекрыванием целевой последовательности с каким-либо геномным повтором из RepBase, размеченным с помощью RepeatMasker, не дает информации о транскрипции конкретно этого мобильного элемента или другого гомологичного ему элемента, расположенного на других хромосомах. Таким образом, мы можем сравнивать только классы мобильных элементов и оценивать статистически их влияние на сигнал экспрессии.

Экспонирование клеток к ДНК-повреждающим воздействиям, таким, как лекарства химиотерапии или радиация, может вести к индукции транскрипции *SINE*-элементов, что подтверждает глобальную активацию транспозонов в геноме при стрессовых условиях (Hagan, Rudin, 2002). Есть данные об экспрессии в соматических клетках элементов семейства *L1* (*LINE*) (Gasior *et al*., 2006; Belancio *et al*., 2010; O′Donnell, Burns, 2010; Iramaneerat *et al*., 2011). Механизмы воздействия экспрессии мобильных элементов могут не ограничиваться встройками ДНК и структурными изменениями

генома. Показано, что РНК, транскрибируемая с *Alu*-повторов, может взаимодействовать с РНК полимеразой II и подавлять экспрессию некоторых белок-кодирующих генов (Ponicsan *et al*., 2010). Неравномерное распределение транспозонов в геноме и их активация могут вести к изменению экспрессии генов в раковых тканях и при повреждающих воздействиях, что требует дальнейшего изучения.

Благодарности

Авторы благодарны А.В. Катохину (ИЦиГ СО РАН) и Л. Липовичу (Университет Вэйн, США) за критические замечания. Работа частично поддержана грантами РФФИ 11-04-12167, 11-04-01888-а и ГК 07.514.11.4003.

Литература

Balaj L., Lessard R., Dai L. *et al.* Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences // Nat. Commun. 2011. V. 2. e180.

Banaz-Yaşar F., Steffen G., Hauschild J. *et al. LINE-1* retrotransposition events affect endothelial proliferation and migration // Histochem. Cell Biol. 2010. V. 134. N 6. P. 581–589.

Belancio V.P., Roy-Engel A.M., Pochampally R.R., Deininger P. Somatic expression of *LINE-1* elements in human tissues // Nucl. Acids Res. 2010. V. 38. N 12. P. 3909–3922.

Dai M., Wang P., Boyd A.D. *et al*. Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. N 20. e175.

Daskalos A., Nikolaidis G., Xinarianos G. *et al*. Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in non-small cell lung cancer // Int. J. Cancer. 2009. V. 124. N 1. P. 81–87.

Ewing A.D., Kazazian H.H. Jr. High-throughput sequencing reveals extensive variation in human-specific *L1* content in individual human genomes // Genome Res. 2010. V. 20. N 9. P. 1262–1270.

Fasold M., Stadler P.F., Binder H. G-stack modulated probe intensities on expression arrays – sequence corrections and signal calibration // BMC Bioinformatics. 2010. V. 11. e207.

Faulkner G.J., Kimura Y., Daub C.O. *et al*. The regulated retrotransposon transcriptome of mammalian cells // Nat. Genet. 2009. V. 41. N 5. P. 563–571.

Frank O., Verbeke C., Schwarz N. *et al*. Variable transcriptional activity of endogenous retroviruses in human breast cancer // J. Virol. 2008. V. 82. P. 1808–1818.

Gasior S.L., Wakeman T.P., Xu B., Deininger P.L. The human *LINE-1* retrotransposon creates DNA double-strand breaks // J. Mol. Biol. 2006. V. 357. P. 1383–1393.

Gautier L., Moller M., Friis-Hansen L., Knudsen S. Alternative mapping of probes to genes for Affymetrix chips // BMC Bioinformatics. 2004. V. 5. e111.

Ha K.Ch., Coulombe-Huntington J., Majewski J. Comparison of Affymetrix Gene Array with the Exon Array shows potential application for detection of transcript isoform variation // BMC Genomics. 2009. V. 10. e519.

Hagan C.R., Rudin C.M. Mobile genetic element activation and genotoxic cancer therapy: potential clinical implications // Am. J. Pharmacogenomics. 2002. V. 2. N 1. P. 25–35.

Harbig J., Sprinkle R., Enkemann S.A. A sequence-based identification of the genes detected by probesets on the Affymetrix U133 plus 2.0 array // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. N 3. P. 31.

Iramaneerat K., Rattanatunyong P., Khemapech N. *et al*. HERV-K hypomethylation in ovarian clear cell carcinoma is associated with a poor prognosis and platinum resistance // Int. J. Gynecol. Cancer. 2011. V. 21. N 1. P. 51–57.

Jacox E., Gotea V., Ovcharenko I., Elnitski L. Tissue-specific and ubiquitous expression patterns from alternative promoters of human genes // PLoS One. 2010. V. 5. N 8. e12274.

Jordan I.K., Rogozin I.B., Glazko G.V., Koonin E.V. Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements // Trends Genet. 2003. V. 19. N 2. P. 68–72.

Jurka J. Repbase Update: a database and an electronic journal of repetitive elements // Trends Genet. 2000. V. 9. P. 418–420.

Jurka J., Kapitonov V.V., Pavlicek A. *et al.* Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements // Cytogenet. Genome Res. 2005. V. 110. P. 462–467.

Karlsson H., Bachmann S., Schroder J. *et al*. Retroviral RNA identified in the cerebrospinal fluids and brains of individuals with schizophrenia // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 4634–4639.

Leong H.S., Yates T., Wilson C., Miller C.J. ADAPT: a database of affymetrix probesets and transcripts // Bioinformatics. 2005. V. 21. N 10. P. 2552–2553.

Levy A., Schwartz S., Ast G. Large-scale discovery of insertion hotspots and preferential integration sites of human transposed elements // Nucl. Acids Res. 2010. V. 38. N 5. P. 1515–1530.

Liu G., Loraine A.E., Shigeta R. *et al*. NetAffx: Affymetrix probesets and annotations // Nucl. Acids Res. 2003. V. 31. P. 82–86.

Malone J.H., Oliver B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome // BMC Biol. 2011. V. 9. e34.

MAS 5.0 algorithm. Affymetrix. Statistical Algorithms Description Document. Santa Clara, CA: Affymetrix, Inc. 2002. (http://www.affymetrix.com/ support/ technical/ whitepapers/sadd-whitepaper.pdf)

Miller L.D., Smeds J., George J. *et al*. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. N 38. P. 13550–13555.

Mortazavi A., Williams B.A., McCue K. *et al*. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq // Nat. Methods. 2008. V. 5. N 7. P. 621–628.

Nelleker C., Li F., Uhrzander F. *et al.* Expression profiling of repetitive elements by melting temperature analysis: variation in HERV-W gag expression across human individuals and tissues // BMC Genomics. 2009. V. 10. e532.

O′Donnell K.A., Burns K.H. Mobilizing diversity: transposable element insertions in genetic variation and disease // Mobile DNA. 2010. V. 1. e21.

Okoniewski M.J., Miller C.J. Hybridization interactions between probesets in short oligo microarrays lead to spurious correlations // BMC Bioinformatics. 2006. V. 7. e276.

Orlov Y.L., Zhou J., Lipovich L. *et al.* Quality assessment of the Affymetrix U133A&B probesets by target sequence mapping and expression data analysis // In Silico Biol. 2007. V. 7. N 3. P. 241–260.

Ozsolak F., Milos P.M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities // Nat. Rev. Genet. 2011. V. 12. N 2. P. 87–98.

Ponicsan S.L., Kugel J.F., Goodrich J.A. Genomic gems: SINE RNAs regulate mRNA production // Curr. Opin. Genet. Dev. 2010. V. 20. N 2. P. 149–155.

Risueco A., Fontanillo C., Dinger M.E., De Las Rivas J. GATExplorer: genomic and transcriptomic explorer; mapping expression probes to gene loci, transcripts, exons and ncRNAs // BMC Bioinformatics. 2010. V. 11. e221.

Sela N., Mersch B., Gal-Mark N. *et al*. Comparative analysis of transposed element insertion within human and mouse genomes reveals Alu‘s unique role in shaping the human transcriptome // Genome Biol. 2007. V. 8. N 6. R127.

Sela N., Mersch B., Hotz-Wagenblatt A., Ast G. Characteristics of transposable element exonization within human and mouse // PLoS One. 2010. V. 5. N 6. e10907.

Shames D.S., Girard L., Gao B. *et al*. A genome-wide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies // PLoS Med. 2006. V. 3. N 12. e486.

Smit A.F.A., Hubley R., Green P. RepeatMasker Open-3.0. 1996-2010 <http://www.repeatmasker.org>.

Stalteri M.A., Harrison A.P. Interpretation of multiple probe sets mapping to the same gene in Affymetrix GeneChips // BMC Bioinformatics. 2007. V. 15. P. 8–13.

Tusher V.G., Tibshirani R., Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 5116–5121.

Zhang W., Edwards A., Fan W. *et al. Alu* distribution and mutation types of cancer genes // BMC Genomics. 2011. V. 12. e157.

Zhang J., Finney R.P., Clifford R.J. *et al*. Detecting false expression signals in high-density oligonucleotide arrays by an *in silico* approach // Genomics. 2005. V. 85. P. 297–308.

STATISTICAL ESTIMATES OF TRANSPOSABLE ELEMENT EXPRESSION IN THE HUMAN GENOME BASED ON CLINICAL MICROARRAY DATA ON EXPRESSION

Yu.L. Orlov, V.M. Efimov, N.G. Orlova

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: orlov@bionet.nsc.ru; efimov@bionet.nsc.ru; orlovanina2@mail.ru

Summary

Transposable elements (TEs) of the human genome can be expressed in somatic cells in different tissues, but direct experimental information on this item is scarce. Nevertheless, the huge volume of clinical microarray data on TE expression in the human genome is sufficient to investigate statistical problems of gene annotation, noise in expression measurement, and expression of TEs associated with microarray probes. In recent years, data on gene expression in cancer tissues have been collected on the base of the Affymetrix microarray platform in diagnostics and medical studies and submitted to the Internet data repositories Gene Expression Omnibus (GEO) NCBI and ArrayExpress. Statistical estimates of TE expression were studied earlier in connection with probe design quality on expression arrays and genomic location of the probesets. It was shown that up to 25 % of the initial target sequences of Affymetrix U133 GeneChips had overlaps with TEs in the human genome. This work shows statistically significant effects of gene expression changes on probesets associated with TEs. A review of technologies for estimation of TE expression is given.

Key words: human genome, transposable elements, expression microchips, statistical estimates, transcription.

ЭНДОГЕННЫЕ РЕТРОВИРУСЫ СВИНЬИ: НАСКОЛЬКО ВЕЛИК РИСК ИНФЕКЦИИ ПРИ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ?

Н.С. Юдин, Р.Б. Айтназаров, В.И. Ермолаев

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: yudin@bionet.nsc.ru

В обзоре рассмотрены современные работы о биологии эндогенных ретровирусов свиньи. Обсуждаются данные о нуклеотидных последовательностях ретровирусов, их экспрессии и выделении зрелых вирионов. Подробно рассмотрены проблема тропизма эндогенных ретровирусов свиньи к клеткам человека и ретроспективные исследования на больных. Проведен критический анализ работ по межвидовому переносу эндогенных ретровирусов свиньи в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Обсуждены подходы для профилактики и лечения возможной инфекции у человека. На основании анализа литературы сделан вывод, что риск распространения инфекции от реципиентов ксенотрансплантатов на остальное население, по-видимому, чрезвычайно низок. Этот минимальный риск может быть снижен далее путем тщательного наблюдения и, вероятно, вакцинации контактирующих лиц, а также профилактическим применением антивирусных препаратов. Понижения существующего незначительного риска инфекции также можно добиться путем применения достижений биотехнологии для получения свиней, которые не обладают эндогенными ретровирусами, тропными к человеку.

Ключевые слова: эндогенные ретровирусы свиньи, ксенотрансплантация, свинья *Sus scrofa*.

Введение

Более 40 лет назад было обнаружено, что некоторые линии клеток свиньи выделяют вирусные частицы с морфологическими и иммунологическими свойствами ретровирусов типа С (Breese, 1970; Альтштейн и др., 1972). Аналогичные вирусные частицы были позднее выделены от свиней, больных лейкемией (Suzuka *et al*., 1986). Согласно номенклатуре Международного комитета по таксономии вирусов, эти вирусы отнесены к отдельному семейству Retroviridae, подсемейству Orthoretrovirinae, роду Gammaretrovirus, виду Porcine type-C oncovirus (ICTV, 2011). Однако в литературе более распространено тривиальное название Porcine Endogenous Retrovirus (PERV). PERV являются составной частью ДНК герминативных клеток свиньи и могут размножаться в клетках человека. Эти открытия вызвали многочисленные исследования потенциальной опасности PERV при ксенотрансплантации, поскольку каждая клетка ксенотрансплантата свиньи может стать потенциальным источником тропных к человеку ретровирусов, которые нельзя элиминировать путем содержания свиней в специфических свободных от патогена условиях или путем серии простых скрещиваний (см. обзоры Denner, 2008; Wilson, 2008; Ekser *et al*., 2009; Scobie, Takeuchi, 2009; Klymiuk *et al*., 2010; Meije *et al*., 2010).

Молекулярно-генетическая характеристика PERV

Первые нуклеотидные последовательности PERV были получены при исследовании линий клеток свиньи PK15 и MPK (Patience *et al*., 1997) и активированных мононуклеарных клеток периферической крови свиней (Wilson *et al*., 1998). По структуре нуклеотидных последовательностей PERV подразделяют на 3 типа – A, B и C. Представители разных типов обнаруживают высокую гомологию в генах *gag* (group-specific-antigens) и *pol* (polymerase), но не совпадают по нуклеотидной последовательности в рецептор-связывающем домене гена *env* (envelope), кодирующего белок оболочки

вируса (Le Tissier *et al*., 1997; Akiyoshi *et al*., 1998; Takeuchi *et al*., 1998). Эти несовпадения определяют другой круг хозяев вирусов, принадлежащих к разным типам.

Анализ ДНК PERV показал, что они содержат все структурные признаки способных к репликации ретровирусов (Akiyoshi *et al*., 1998; Czauderna *et al*., 2000; Tonjes *et al*., 2000; Krach *et al*., 2001; Park *et al*., 2010; Zhang *et al*., 2010a). Способность к репликации отличает эти «классические» PERV от других семейств гамма- и бета-ретровирусов, которые, вероятно, являются дефектными по репликации и поэтому не имеют большого значения для оценки риска, возникающего при трансплантации тканей свиньи (Ericsson *et al*., 2001; Patience *et al*., 2001). Было показано, что геном свиньи содержит не только дефектные провирусы, которым необходимо рекомбинировать, прежде чем они достигнут способности к производству полноценных вирионов, но также полноразмерные копии PERV (Rogel-Gaillard *et al*., 1999; Tonjes *et al*., 2000). Имеются работы по физическому картированию PERV на хромосомах свиньи путем флуоресцентной гибридизации *in situ* (Lee *et al*., 2002; Jung *et al*., 2010). В результате исследования домашних свиней пород крупная белая, ландрас и диких кабанов установлены ассоциации ретровируса PERV-A с локусами эритроцитарных антигенов *EAE*, *EAK*, *LPB* и полом животных, а также ретровируса PERV-B с локусами *aM*, *EAE* и *LPB* (Айтназаров и др., 2006). Причем у разных типов и пород свиней эти ассоциации могут присутствовать или отсутствовать. Статистический анализ встречаемости хромосом-носителей PERV-A, PERV-B и PERV-C показал, что у домашних свиней встречаемость хромосом-носителей PERV и гаплотипов, состоящих из двух и трех типов PERV, выше, чем у диких кабанов (Никитин и др., 2008).

Копии PERV в геномах свиней разных пород отличаются по нуклеотидному составу, экспрессии и способности кодировать инфекционный вирус. Считается, что геном свиньи может содержать от 6 до 10 способных к репликации провирусов, от 30 до 50 полноразмерных копий PERV и от 100 до 200 локусов, содержащих их частичную последовательность (Niebert, Tonjes, 2005). Исследование свиней крупной белой породы с целью оценки числа геномных последовательностей, которые могут кодировать полноразмерные, способные к репликации провирусы, показало, что хромосомное распределение и число копий провирусов различаются у разных особей (Rogel-Gaillard *et al*., 1999; Bosch *et al*., 2000; Herring *et al*., 2001a). Геномы PERV были также проанализированы у свиней пород вестран (Lee *et al*., 2002; Niebert, Tonjes, 2003), дюрок, ландрас, йоркширской, беркширской и их гибридов (Jin *et al*., 2000; Edamura *et al*., 2004), свиней нескольких китайских пород (Jin *et al*., 2000; Li *et al*., 2004; Ma *et al*., 2010; Zhang *et al*., 2010b), кабанов Западной Европы (Niebert, Tonjes, 2003). Как и в случае крупной белой породы, последовательности PERV у этих пород были разбросаны по геному, при этом отмечались межпородные и внутрипородные различия по числу копий, хромосомной локализации и наличию полноразмерных последовательностей.

Анализ PERV у пород домашних свиней показал, что, хотя PERV типов A и B преобладают в геномах всех исследованных пород, однако довольно часто встречаются животные, у которых отсутствуют PERV типа C (Bosch *et al*., 2000; Никитин и др., 2008; Юдин и др., 2009; Айтназаров и др., 2010; Nikitin *et al*., 2010). По встречаемости особей с хромосомами-носителями PERV разных классов и их сочетаний существуют различия между породами домашних свиней, между дикими кабанами и домашними свиньями, а также между дикими кабанами Восточной Европы и Средней Азии (Jin *et al*., 2000; Никитин и др., 2008; Айтназаров и др., 2010).

Нуклеотидные последовательности генов, кодирующих белки PERV *gag*, *pol* и *env*, имеют высокое сходство с последовательностями соответствующих генов гамма-ретровирусов приматов, кошки и мыши (Akiyoshi *et al*., 1998; Czauderna *et al*., 2000; Tonjes *et al*., 2000). Филогенетический анализ показал, что PERV наиболее близки вирусу лейкемии обезьян-гиббонов (GALV), эндогенному ретровирусу коалы (KoRV) (Hanger *et al*., 2000) и индуцируемому эндогенному ретровирусу мыши (MDEV) (Miller *et al*., 1996; Wolgamot *et al*., 1998). PERV стали неотъемлемой частью генома вида *Sus scrofa*, очевидно, еще до возникновения рода *Sus*, о чем свидетельствует их присутствие у нескольких видов кистеухих свиней и бородавочников (Niebert Tonjes, 2005).

По-видимому, PERV могут быть причиной изменений физиологических функций организма в ходе эволюции. Статистический анализ частот хромосом-носителей типов и сочетаний типов PERV показывает, что микроэволюционные процессы, связанные с частотой носительства PERV в популяциях диких и домашних форм свиней вида *S. scrofa*, имеют два основных вектора: различной интенсивности жироотложения и негативных изменений развития продуктивных признаков (Юдин и др., 2009; Nikitin *et al*., 2010).

Экспрессия РНК и выделение вирионов PERV клетками свиньи

Экспрессия РНК PERV обнаружена в нескольких типах тканей, включая почки, легкие, кожу, печень, сердце и панкреатические островки (Le Tissier *et al*., 1997; Patience *et al*., 1997; Akiyoshi *et al*., 1998; Martin *et al*., 1998a; van der Laan *et al*., 2000; Yang *et al*., 2010). Однако экспрессия вирусной РНК по ряду причин может не коррелировать с выделением инфекционных частиц. Например, большинство локусов PERV, присутствующих в геноме свиньи, вероятно, содержат мутации сдвига рамки считывания или преждевременные стоп-кодоны, что приводит к нарушению экспрессии одного или большего числа вирусных генов, делая этот локус неспособным к репликации. Эта возможность была показана на линии клеток свиньи ST-IOWA: хотя эта клеточная линия экспрессирует РНК как PERV-A, так и PERV-B, это не приводит к образованию инфекционных вирусных частиц (Patience *et al*., 1997).

Для того чтобы исключить предположение о том, что способные к репликации PERV выделяются исключительно иммортализованными клеточными линиями свиньи (Patience *et al*., 1997), были проведены эксперименты по исследованию продукции инфекционных PERV первичными клеточными культурами. Была продемонстрирована выработка вируса PERV при митогенной активации мононуклеарных клеток периферической крови мини-свиней (Wilson *et al*., 1998). Отметим, что все эти вирусы возникли в результате рекомбинации между последовательностями гена *env* политропного типа PERV-A и экотропного типа PERV-C. Способный к репликации клон PERV-A был выделен из BAC-библиотеки, полученной от свиньи крупной белой породы (Rogel-Gaillard *et al*., 1999; Tonjes *et al*., 2000). Высвобождение инфекционных вирионов PERV даже в отсутствие митогенной активации наблюдали также на первичной культуре клеток эндотелия аорты, полученной от свиней пород крупная белая, ландрас, юкатанских и геттингенских мини-свиней (Martin *et al*., 1998a). Исследование интенсивности продукции PERV в мононуклеарных клетках периферической крови, полученных от животных различных пород, выявило различия не только между породами, но также между животными внутри одной породы (Tacke *et al*., 2000). По-видимому, инфекционные вирионы PERV также продуцируются клетками свиньи *in vivo*, поскольку способный к репликации вирус был выделен из плазмы крови животных (Takefman *et al*., 2001). Более того, вирусная РНК и активность обратной транскриптазы были обнаружены в клинических препаратах фактора VIII свиньи, хотя авторы не смогли выделить из них инфекционный вирус (Takefman *et al*., 2001).

Инфекционный титр PERV, полученных из клеток свиньи, чрезвычайно низок по сравнению с титрами других ретровирусов (Blusch *et al*., 2002). Клетки свиньи способны активно сопротивляться инфекции PERV, например, с помощью белков индуцируемых цитидиновых деаминаз семейства APOBEC (Dorrschuck *et al*., 2011) или белка тетерина (Mattiuzzo *et al*., 2010). Белки семейства APOBEC играют большую роль во врожденном противовирусном иммунитете и способны индуцировать многочисленные мутации цитидина на уридин в ДНК провируса. Эти мутации нарушают экспрессию ретровируса, приводя к появлению нежизнеспособных вирионов. Искусственное заражение свиней рекомбинантами PERV A/C не приводило ни к интеграции провирусов в ДНК, ни к наработке соответствующих антител, что свидетельствует о трудности передачи ретровируса между животными (Kaulitz *et al*., 2011b).

Пассирование в линиях клеток человека быстро приводит к существенному повышению инфекционного титра PERV. В случае PERV, выделяющихся из активированных мононуклеарных клеток периферической крови свиней,

это сопровождается отбором вируса, содержащего рекомбинантный ген *env*, состоящий из последовательностей PERV-A и PERV-C (Wilson *et al*., 2000). Однако не ясно, может ли происходить такая рекомбинация *in vivo*. Если это будет показано, то способные к размножению вирусы, несмотря на чрезвычайно низкую частоту, возможно, смогут образовываться даже у животных, утративших все способные к репликации копии провирусов. Другим механизмом, отвечающим за повышение способности PERV к репликации, являются мутации в промоторных участках LTR (Czauderna *et al*., 2000; Denner *et al*., 2003).

Тропизм PERV к клеткам человека и ретроспективные исследования на реципиентах ксенотрансплантатов

Многие клетки человека экспрессируют рецепторы, специфичные для PERV типов A и B, в то время как рецепторы, специфичные для PERV-C, на них в большинстве случаев не обнаружены (Takeuchi *et al*., 1998; Ericsson *et al*., 2003; Marcucci *et al*., 2009; Nakaya *et al*., 2011a). Соответственно, политропные вирусы PERV-A и PERV-B способны инфицировать клетки человека, а экотропный вирус PERV-C инфицирует только клетки свиньи. Показано, что рекомбинанты PERV-A/C также способны инфицировать клетки человека, причем их провирусы способны интегрироваться *de novo* в геномы соматических (но не герминативных) клеток (Denner, 2008; Karlas *et al*., 2010). Исследования с использованием вируса, полученного преимущественно из клеток свиньи линии PK15, показали возможность переноса PERV в некоторые линии клеток человека (Patience *et al*., 1997; Takeuchi *et al*., 1998; Wilson *et al*., 1998; Martin *et al*., 2000; Wilson *et al*., 2000; Specke *et al*., 2001). Однако многие клеточные линии, даже если они имеют рецепторы к PERV, не поддерживают развитие вирусной инфекции (Patience *et al*., 1997; Takeuchi *et al*., 1998; Wilson *et al*., 2000; Mattiuzzo, Takeuchi, 2010).

Перенос эндогенных ретровирусов свиньи и, в некоторых случаях, даже их репликация были продемонстрированы для культур первичных эндотелиальных клеток, фибробластов и мезангиальных клеток человека (Blusch *et al*., 2000; Martin *et al*., 2000). Эндотелиальные клетки представляют особый интерес, поскольку этот тип клеток является основным тканевым барьером для PERV. Работы по изучению инфицирования мононуклеарных клеток периферической крови человека дали весьма противоречивые результаты. Некоторые исследователи получили доказательства продуктивной инфекции PERV в этих клетках (Specke *et al*., 2001), в то время как другие – не смогли зафиксировать репликацию вируса в них (Wilson *et al*., 2000). Однако, поскольку ряд важных факторов, таких, как штамм вируса и методы, использованные для обнаружения его репликации, у этих авторов различались, для объяснения этого несоответствия необходимы дальнейшие исследования.

Иммунная система человека препятствует инфекции ксенозоонозных ретровирусов через разнообразные механизмы включая гуморальный и клеточный иммунитет, специфические и неспецифические иммунные реакции. Поскольку клетки человека и приматов Старого Света не экспрессируют альфа-1,3-галактозилтрансферазу, в результате постоянного контакта с микроорганизмами, несущими альфа-1,3-галактозу, у них в крови появляются высокие титры анти-gal-антител. Эти естественные антитела, по-видимому, также эффективно нейтрализуют гамма-ретровирусы включая PERV. Поскольку PERV, продуцируемые клетками свиньи, имеют альфа-галактозил-эпитопы, ассоциированные с оболочечным гликопротеином, в экспериментах *in vitro* они инактивировались белками комплемента сыворотки крови (Rother, Squinto, 1996; Takeuchi *et al*., 1996; Reed *et al*., 1997).

Все исследования, опубликованные до настоящего времени в отношении больных, которых лечили с использованием клеток, тканей или органов свиньи, не представили ни одного доказательства развития инфекции PERV у человека *in vivo* (Heneine *et al*., 1998; Patience *et al*., 1998; Paradis *et al*., 1999; Dinsmore *et al*., 2000; Levy *et al*., 2000; Schumacher *et al*., 2000; Herring *et al*., 2001b; Di Nicuolo *et al*., 2010; Mattiuzzo Takeuchi, 2010; Valdes-Gonzalez *et al*., 2010). Хотя полученные результаты являются весьма обнадеживающими, эти исследования имеют несколько недостатков. Во всех случаях единственным типом клеток, которые анализировали на присутствие PERV, были мононуклеарные

клетки периферической крови. Поскольку еще окончательно не установлено, экспрессируют ли клетки этого типа рецепторы для PERV и способны ли они к распространению инфекции (Wilson *et al*., 1998; Specke *et al*., 2001), то нельзя исключить, что репликация PERV происходила в другом типе клеток. В большинстве случаев время контакта пациента с клетками свиньи было весьма ограниченным. Ясно, что с увеличением времени выживания трансплантата вероятность переноса PERV будет также увеличиваться. В настоящее время наибольший срок ретроспективного исследования на больных, при лечении которых использовали печень свиньи, составляет около 9 лет (Di Nicuolo *et al*., 2010). У реципиентов ксенотрансплантатов не анализировали вероятное снижение уровня белков комплемента крови в процессе лечения, которое должно усилить выживание вируса и повысить риск потенциальной инфекции PERV. Снижение титра естественных anti-gal-антител, которое должно способствовать выживанию PERV в крови, анализировали только у двух пациентов при кратковременной экстракорпоральной перфузии ксеногенной почки (Patience *et al*., 1998).

Остается неясным, являются ли обнадеживающие до настоящего времени данные результатом реального отсутствия продукции вируса клетками свиньи или результатом эффективной иммунологической инактивации высвобождаемых вирусных частиц, например, посредством анти-gal-антител или белков комплемента. Поэтому потенциальная опасность переноса PERV при клинических манипуляциях сохраняется, что делает необходимым продолжение режима жесткого вирусологического контроля.

Исследование переноса PERV на животных

Клетки некоторых видов мелких животных включая мышь, крысу, кошку и норку экспрессируют рецепторы к PERV и в некоторых случаях чувствительны к инфицированию (Patience *et al*., 1997; Takeuchi *et al*., 1998; Wilson *et al*., 1998; Specke *et al*., 2001). Поэтому мелких животных можно использовать в качестве модели для изучения факторов, влияющих на перенос PERV *in vivo*. Недостатком исследований на мелких животных является то, что наиболее важный у человека барьер против инфекции PERV – узнавание иммунной системой альфа-галактозил-эпитопов у этих видов отсутствует. Поэтому только мыши Gal-KO, у которых нокаутирован ген альфа-1,3-галактозилтрансферазы, могут считаться наиболее адекватной моделью (Gock *et al*., 2000). Однако, поскольку на мышах еще не разработаны схемы для иммуносупрессии, сравнимые со схемами для приматов, полная имитация условий клинической ксенотрансплантации на мелких животных остается труднодостижимой целью.

Например, незначительный уровень инфекции PERV отмечен после трансплантации островков поджелудочной железы мышам SCID (van der Laan *et al*., 2000). Перенос PERV мышам SCID не является неожиданностью, поскольку было показано, что некоторые клеточные линии мыши чувствительны к инфекции PERV (Takeuchi *et al*., 1998), а мыши SCID утратили как клеточный, так и гуморальный иммунитет. Более того, остается невыясненным, влияют ли на инфекцию PERV в этой модели эндогенные вирусы мыши. Критическим вопросом в оценке пригодности моделей остается определение того, могут ли PERV распространяться сами по себе или им необходимо псевдотипирование ксенотропными эндогенными ретровирусами видов-хозяев (Yang *et al*., 2004). В последнем случае рассматриваемая модель может быть неприменимой к ксенотрансплантации у человека, поскольку эти вирусы могут отсутствовать в ДНК герминативных клеток человека.

Вопрос об адекватности использования приматов в качестве модели для изучения возможного инфицирования PERV человека остается спорным. Хотя в ряде экспериментов было показано, что приматы не восприимчивы к PERV (Patience *et al*., 1997; Takeuchi *et al*., 1998; Wilson *et al*., 1998; Martin *et al*., 1999; Mattiuzzo, Takeuchi, 2010), тем не менее, в некоторых работах была показана возможность инфицирования PERV различных клеточных линий приматов *in vitro* (Blusch *et al*., 2000; Specke *et al*., 2001). Например, не было получено доказательство инфекции PERV у 15 бабуинов, подвергавшихся иммуносупрессорной терапии циклофосфамидом, через 2 года после трансплантации эндотелиальных клеток свиньи (Martin *et al*., 1998b). 12 мартышек также были

исследованы после ксенотрансплантации почек, в плазме животных не обнаружили присутствия РНК PERV. Ксенотрансплантаты в этом случае выживали в течение 15 дней, экспозиция к вирусу, выделявшемуся клетками свиньи, была незначительной (Loss *et al*., 2001).

Ключевой вопрос оценки значимости этих моделей заключается в относительной заражаемости клеток человека и приматов. Более того, интерпретация данных может быть вновь усложнена в связи с наличием псевдотипирования экотропными ретровирусами приматов, такими, как эндогенный ретровирус бабуина (BaEV). В результате необходимы более тщательные исследования клеточного тропизма и потенциального псевдотипирования, для того чтобы судить о пригодности приматов для исследования переноса PERV.

Подходы для профилактики и лечения возможной инфекции PERV у человека

Интактная иммунная система человека, вероятно, способна элиминировать инфекцию PERV, например, с участием белков APOBEC или тетерина (Mattiuzzo *et al*., 2010; Dorrschuck *et al*., 2011). Однако неизвестно, может ли инфекция PERV приводить к снижению врожденного антивирусного иммунитета пациентов с ксенотрансплантацией. Конечно, риск распространения вызванной PERV инфекции среди населения в настоящее время носит, скорее, гипотетический характер, поскольку все больные находятся под пристальным эпидемиологическим контролем. Однако эта ситуация может быстро измениться, как только ксенотрансплантация станет более рутинной процедурой. Например, такие вопросы, как согласие пациента на режим мониторинга, могут существенно повлиять на способность обнаружения ранних признаков инфекции PERV, если она возникнет. Поэтому для того чтобы исключить какой-либо риск инфекции PERV, желательно получить свиней, утративших все тропные к человеку PERV. Насколько реалистична такая возможность?

Экспрессия РНК PERV найдена практически у всех изученных пород домашних свиней. Однако секвенирование ДНК полного генома свиньи может помочь характеризовать и отбирать животных-доноров с пониженной инфекционной способностью PERV (PGSP, 2011). Поскольку большинство копий PERV, вероятно, являются дефектными и только несколько полноразмерных копий вносят вклад в репликацию компетентных вирусов, экспрессия РНК в целом не должна коррелировать с выработкой инфекционных вирионов. Поэтому контроль за способными к репликации PERV может быть достигнут путем селекции или нокаутных технологий, после того как только будут идентифицированы эти критические локусы. Обнадеживает то, что уже разрабатываются высокоэффективные технологии, которые позволяют вмешиваться в работу единичных генов свиньи. Например, получены трансгенные свиньи с мутантным геном гентингтина, который является геном-кандидатом хореи Гентингтона (Uchida *et al*., 2001) и геном зеленого флуоресцентного белка (Kurome *et al*., 2008). Недавно была получена первичная культура эмбриональных фибробластов свиньи, экспрессирующая ген эндо-бета-галактозидазы С из бактерии *Clostridium perfingens* (Himaki *et al*., 2010). В последние годы большие успехи достигнуты в повышении эффективности клонирования свиней путем переноса ядер соматических клеток в энуклеированные ооциты (Yamanaka *et al*., 2009; Lee *et al*., 2010; Li *et al*., 2010; Sugimura *et al*., 2010). Однако элиминации нескольких функционирующих интактных копий PERV еще не достаточно для исключения выделения инфекционных PERV из-за потенциальной рекомбинации усеченных вариантов. Тем не менее удаление способных к репликации PERV из генома существенно снизит этот риск.

В дополнение к вышеперечисленным подходам можно ингибировать экспрессию и выделение PERV, используя другие методы, например генно-инженерные технологии с антисмысловыми РНК или ингибирующими антителами (Kaulitz *et al*., 2011a; Nakaya *et al*., 2011b). Однако маловероятно, что эти технологии будут в состоянии полностью предотвратить экспрессию вирусной РНК или нейтрализовать функцию вирусных белков. Если у пациента с ксенотрансплантатом возникнет инфекция, которая приведет к развитию заболевания, одним из средств ее лечения будет применение антивирусной лекарственной терапии. В настоящее время для того чтобы избежать появления

устойчивых к лекарствам линий ретровирусов, наиболее эффективно применение терапии, воздействующей на вирус несколькими путями, например, конкурентное использование нескольких ингибиторов обратной транскриптазы и протеаз. Существенная анти-PERV-активность была обнаружена для азидотимидина. Все другие ингибиторы, которые уже применяются для лечения человека, неэффективны против PERV (Qari *et al*., 2001). Поскольку азидотимидин обладает рядом токсических побочных эффектов, в настоящее время неясно, может ли пациент с тяжелой иммуносупрессивной терапией выдержать дополнительную антиретровирусную терапию и будет ли оправдано использование таких препаратов для профилактического подавления вируса, который, как, возможно, будет доказано, является полностью апатогенным.

Для профилактики, вероятно, также следует использовать различные стратегии иммунизации. Активная вакцинация, вероятно, менее подходит для использования в ксенотрансплантации, поскольку реципиенты трансплантатов свиньи будут подвергаться продолжительной лекарственной иммуносупрессии, особенно эффективной в отношении В-клеток. Хотя возможно, что анти-PERV антитела могут быть индуцируемыми, вероятно, что их титры, несмотря на предыдущую вакцинацию, будут низкими. Более того, поскольку белки PERV, вероятно, экспрессируются в ксенотрансплантате, как активная, так и пассивная иммунологическая борьба с PERV будет вносить вклад в отторжение трансплантата и будет малопригодна.

Таким образом, наиболее перспективной является концепция использования свиней, которые не обладают PERV, тропными к человеку. Такие свиньи должны гарантировать снижение существующего незначительного риска инфекции PERV у реципиентов ксенотрансплантатов. Риск распространения «очеловеченных» PERV от инфицированных пациентов на тесно контактирующий с ними медперсонал и далее на общую популяцию, вероятно, чрезвычайно низок. Этот минимальный риск развития заболевания может быть далее снижен путем тщательного наблюдения и, вероятно, вакцинации контактирующих лиц, а также профилактическим применением антивирусных препаратов. По-видимому, проблема потенциальной опасности PERV для человека будет успешно решена уже в ближайшие годы.

Литература

Айтназаров Р.Б., Ермолаев В.И., Никитин С.В. и др. Ассоциации эндогенных ретровирусов разных типов с генетическими маркерами в популяциях домашних и диких свиней // Докл. РАСХН. 2006. № 4. С. 39–43.

Айтназаров Р.Б., Никитин С.В., Князев С.П. и др. Распространение свиных эндогенных ретровирусов у разных форм *Sus scrofa* L. 1758 (Suidae, Mammalia) // Сиб. вестн. с.-х. науки. 2010. № 9. С. 49–54.

Альтштейн А.Д., Герасина С.Ф., Захарова Л.Г. и др. Онкорнавирус типа С в культуре перевиваемых клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) // Вопр. вирусологии. 1972. № 2. С. 222–226.

Никитин С.В., Юдин Н.С., Князев С.П. и др. Оценка частоты хромосом, содержащих свиные эндогенные ретровирусы, в популяциях домашней свиньи и дикого кабана // Генетика. 2008. Т. 44. № 6. С. 789–797.

Юдин Н.С., Айтназаров Р.Б., Князев С.П. и др. Дифференциация популяций диких и домашних свиней по частоте хромосом, содержащих эндогенные ретровирусы // Информ. вестник ВОГиС. 2009. Т. 13. № 4. С. 741–750.

Akiyoshi D.E., Denaro M., Zhu H. *et al*. Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine // J. Virol. 1998. V. 72. N 5. P. 4503–4507.

Blusch J.H., Patience C., Martin U. Pig endogenous retroviruses and xenotransplantation // Xenotransplantation. 2002. V. 9. N 4. P. 242–251.

Blusch J.H., Patience C., Takeuchi Y. *et al*. Infection of nonhuman primate cells by pig endogenous retrovirus // J. Virol. 2000. V. 74. N 16. P. 7687–7690.

Bosch S., Arnauld C., Jestin A. Study of full-length porcine endogenous retrovirus genomes with envelope gene polymorphism in a specific-pathogen-free Large White swine herd // J. Virol. 2000. V. 74. N 18. P. 8575–8581.

Breese S.S. Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines // Arch. Gesamte Virusforsch. 1970. V. 30. N 4. P. 401–404.

Czauderna F., Fischer N., Boller K. *et al*. Establishment and characterization of molecular clones of porcine endogenous retroviruses replicating on human cells // J. Virol. 2000. V. 74. N 9. P. 4028–4038.

Denner J. Recombinant porcine endogenous retroviruses (PERV-A/C): a new risk for xenotransplantation? // Arch. Virol. 2008. V. 153. N 8. P. 1421–1426.

Denner J., Specke V., Thiesen U. *et al*. Genetic alterations of the long terminal repeat of an ecotropic porcine endogenous retrovirus during passage in human cells // Virology. 2003. V. 314. N 1. P. 125–133.

Dinsmore J.H., Manhart C., Raineri R. *et al*. No evidence for infection of human cells with porcine endogenous retrovirus (PERV) after exposure to porcine fetal neuronal cells // Transplantation. 2000. V. 70. N 9. P. 1382–1389.

Di Nicuolo G., D'Alessandro A., Andria B. *et al*. Long-term absence of porcine endogenous retrovirus infection in chronically immunosuppressed patients after treatment with the porcine cell-based Academic Medical Center bioartificial liver // Xenotransplantation. 2010. V. 17. N 6. P. 431–439.

Dorrschuck E., Fischer N., Bravo I.G. *et al*. Restriction of porcine endogenous retrovirus by porcine APOBEC3 cytidine deaminases // J. Virol. 2011. V. 85. N 8. P. 3842–3857.

Edamura K., Nasu K., Iwami Y. *et al*. Prevalence of porcine endogenous retrovirus in domestic pigs in Japan and its potential infection in dogs xenotransplanted with porcine pancreatic islet cells // J. Vet. Med. Sci. 2004. V. 66. N 2. P. 129–135.

Ekser B., Rigotti P., Gridelli B., Cooper D.K. Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model // Transpl. Immunol. 2009. V. 21. N 2. P. 87–92.

Ericsson T., Oldmixon B., Blomberg J. *et al*. Identification of novel porcine endogenous betaretrovirus sequences in miniature swine // J. Virol. 2001. V. 75. N 6. P. 2765–2770.

Ericsson T.A., Takeuchi Y., Templin C. *et al*. Identification of receptors for pig endogenous retrovirus // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. N 11. P. 6759–6764.

Gock H., Salvaris E., Murray-Segal L. *et al*. Hyperacute rejection of vascularized heart transplants in BALB/c Gal knockout mice // Xenotransplantation. 2000. V. 7. N 4. P. 237–246.

Hanger J.J., Bromham L.D., McKee J.J. *et al*. The nucleotide sequence of koala (*Phascolarctos cinereus*) retrovirus: a novel type C endogenous virus related to Gibbon ape leukemia virus // J. Virol. 2000. V. 74. N 9. P. 4264–4272.

Heneine W., Tibell A., Switzer W.M. *et al*. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts // Lancet. 1998. V. 352. N 9129. P. 695–699.

Herring C., Quinn G., Bower R. *et al*. Mapping full-length porcine endogenous retroviruses in a large white pig // J. Virol. 2001a. V. 75. N 24. P. 12252–12265.

Herring C., Cunningham D.A., Whittam A.J. *et al*. Monitoring xenotransplant recipients for infection by PERV // Clin. Biochem. 2001b. V. 34. N 1. P. 23–27.

Himaki T., Watanabe S., Chi H. *et al*. Production of genetically modified porcine blastocysts by somatic cell nuclear transfer: preliminary results toward production of xenograft-competent miniature pigs // J. Reprod. Dev. 2010. V. 56. N 6. P. 630–638.

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). 2011. Available at http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1

Jin H., Inoshima Y., Wu D. *et al*. Expression of porcine endogenous retrovirus in peripheral blood leucocytes ten different breeds // Transplant. Infectious Disease. 2000. V. 2. P. 11–14.

Jung W.Y., Kim J.E., Jung K.C. *et al*. Comparison of PERV genomic locations between Asian and European pigs // Anim. Genet. 2010. V. 41. N 1. P. 89–92.

Karlas A., Irgang M., Votteler J. *et al*. Characterization of a human cell-adapted porcine endogenous retrovirus PERV-A/C // Ann. Transplant. 2010. V. 15. N 2. P. 45–54.

Kaulitz D., Fiebig U., Eschricht M. *et al*. Generation of neutralising antibodies against porcine endogenous retroviruses (PERVs) // Virology. 2011a. V. 411. N 1. P. 78–86.

Kaulitz D., Mihica D., Plesker R. *et al*. Absence of infection in pigs inoculated with high-titre recombinant PERV-A/C // Arch. Virol. 2011b. V. 156. N 4. P. 707–710.

Klymiuk N., Aigner B., Brem G., Wolf E. Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation // Mol. Reprod. Dev. 2010. V. 77. N 3. P. 209–221.

Krach U., Fischer N., Czauderna F., Tonjes R.R. Comparison of replication-competent molecular clones of porcine endogenous retrovirus class A and class B derived from pig and human cells // J. Virol. 2001. V. 75. N 12. P. 5465–5472.

Kurome M., Ishikawa T., Tomii R. *et al*. Production of transgenic and non-transgenic clones in miniature pigs by somatic cell nuclear transfer // J. Reprod. Dev. 2008. V. 54. N 3. P. 156–163.

Le Tissier P., Stoye J.P., Takeuchi Y. *et al*. Two sets of human-tropic pig retrovirus // Nature. 1997. V. 389. N 6652. P. 681–682.

Lee J.H., Webb G.C., Allen R.D., Moran C. Characterizing and mapping porcine endogenous retroviruses in Westran pigs // J. Virol. 2002. V. 76. N 11. P. 5548–5556.

Lee S.L., Kang E.J., Maeng G.H. *et al*. Developmental ability of miniature pig embryos cloned with mesenchymal stem cells // J. Reprod. Dev. 2010. V. 56. N 2. P. 256–262.

Levy M.F., Crippin J., Sutton S. *et al*. Liver allotransplantation after extracorporeal hepatic support with transgenic (hCD55/hCD59) porcine livers: clinical results and lack of pig-to-human transmission of the porcine endogenous retrovirus // Transplantation. 2000. V. 69. N 2. P. 272–280.

Li Z., Ping Y., Shengfu L. *et al*. Phylogenetic relationship of porcine endogenous retrovirus (PERV) in Chinese pigs with some type C retrovirus // Virus Res. 2004. V. 105. N 2. P. 167–173.

Li Y., Liu J., Dai J. *et al*. Production of cloned miniature pigs by enucleation using the spindle view system // Reprod. Domest. Anim. 2010. V. 45. N 4. P. 608–613.

Loss M., Arends H., Winkler M. *et al*. Analysis of potential porcine endogenous retrovirus (PERV) transmission in a whole-organ xenotransplantation model without interfering microchimerism // Transpl. Int. 2001. V. 14. N 1. P. 31–37.

Ma Y., Yang Y., Lv M. *et al*. Real-time quantitative polymerase chain reaction with SYBR green in detection for estimating copy numbers of porcine endogenous retrovirus from Chinese miniature pigs // Transplant. Proc. 2010. V. 42. N 5. P. 1949–1952.

Marcucci K.T., Argaw T., Wilson C.A., Salomon D.R. Identification of two distinct structural regions in a human porcine endogenous retrovirus receptor, HuPAR2, contributing to function for viral entry // Retrovirology. 2009. V. 6. N 3. P. 1–15.

Martin U., Kiessig V., Blusch J.H. *et al*. Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells // Lancet. 1998a. V. 352. N 9129. P. 692–694.

Martin U., Steinhoff G., Kiessig V. *et al*. Porcine endogenous retrovirus (PERV) was not transmitted from transplanted porcine endothelial cells to baboons *in vivo* // Transpl. Int. 1998b. V. 11. N 4. P. 247–251.

Martin U., Steinhoff G., Kiessig V. *et al*. Porcine endogenous retrovirus is transmitted neither *in vivo* nor *in vitro* from porcine endothelial cells to baboons // Transplant. Proc. 1999. V. 31. N 1/2. P. 913–914.

Martin U., Winkler M.E., Id M. *et al*. Productive infection of primary human endothelial cells by pig endogenous retrovirus (PERV) // Xenotransplantation. 2000. V. 7. N 2. P. 138–142.

Mattiuzzo G., Ivol S., Takeuchi Y. Regulation of porcine endogenous retrovirus release by porcine and human tetherins // J. Virol. 2010. V. 84. N 5. P. 2618–2622.

Mattiuzzo G., Takeuchi Y. Suboptimal porcine endogenous retrovirus infection in non-human primate cells: implication for preclinical xenotransplantation // PLoS One. 2010. V. 5. N 10. P. e13203.

Meije Y., Tonjes R.R., Fishman J.A. Retroviral restriction factors and infectious risk in xenotransplantation // Am. J. Transplant. 2010. V. 10. N 7. P. 1511–1516.

Miller A.D., Bonham L., Alfano J. *et al*. A novel murine retrovirus identified during testing for helper virus in human gene transfer trials // J. Virol. 1996. V. 70. N 3. P. 1804–1809.

Nakaya Y., Shojima T., Yasuda J. *et al*. Epigenetic regulation on the 5′-proximal CpG island of human porcine endogenous retrovirus subgroup A receptor 2/GPR172B // Microbes Infect. 2011a. V. 13. N 1. P. 49–57.

Nakaya Y., Hoshino S., Yasuda J., Miyazawa T. Mapping of a neutralizing epitope in the surface envelope protein of porcine endogenous retrovirus subgroup B // J. Gen. Virol. 2011b. V. 92. N 4. P. 940–944.

Niebert M., Tonjes R.R. Analyses of prevalence and polymorphisms of six replication-competent and chromosomally assigned porcine endogenous retroviruses in individual pigs and pig subspecies // Virology. 2003. V. 313. N 2. P. 427–434.

Niebert M., Tonjes R.R. Evolutionary spread and recombination of porcine endogenous retroviruses in suiformes // J. Virology. 2005. V. 79. N 1. P. 649–654.

Nikitin S.V., Yudin N.S., Knyazev S.P. *et al*. Differentiation of wild boar and domestic pig populations based on the frequency of chromosomes carrying endogenous retroviruses // Nat. Sci. 2010. V. 2. N 6. P. 527–534.

Paradis K., Langford G., Long Z. *et al*. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue // Science. 1999. V. 285. N 5431. P. 1236–1241.

Park S.J., Huh J.W., Kim D.S. *et al*. Analysis of the molecular and regulatory properties of active porcine endogenous retrovirus gamma-1 long terminal repeats in kidney tissues of the NIH-Miniature pig // Mol. Cells. 2010. V. 30. N 4. P. 319–325.

Patience C., Patton G.S., Takeuchi Y. *et al*. No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys // Lancet. 1998. V. 352. N 9129. P. 699–701.

Patience C., Switzer W.M., Takeuchi Y. *et al*. Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species // J. Virol. 2001. V. 75. N 6. P. 2771–2775.

Patience C., Takeuchi Y., Weiss R.A. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs // Nat. Med. 1997. V. 3. N 3. P. 282–286.

PGSP (Porcine Genome Sequencing Project). 2011. Available at http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_scrofa/

Qari S.H., Magre S., Garcia-Lerma J.G. *et al*. Susceptibility of the porcine endogenous retrovirus to reverse transcriptase and protease inhibitors // J. Virol. 2001. V. 75. N 2. P. 1048–1053.

Reed D.J., Lin X., Thomas T.D. *et al*. Alteration of glycosylation renders HIV sensitive to inactivation by normal human serum // J. Immunol. 1997. V. 159. N 9. P. 4356–4361.

Rogel-Gaillard C., Bourgeaux N., Billault A. *et al*. Construction of a swine BAC library: application to the characterization and mapping of porcine type C endoviral elements // Cytogenet. Cell Genet. 1999. V. 85. N 3/4. P. 205–211.

Rother R.P., Squinto S.P. The alpha-galactosyl epitope:

a sugar coating that makes viruses and cells unpalatable // Cell. 1996. V. 86. N 2. P. 185–188.

Schumacher J.M., Ellias S.A., Palmer E.P. *et al*. Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD // Neurology. 2000. V. 54. N 5. P. 1042–1050.

Scobie L., Takeuchi Y. Porcine endogenous retrovirus and other viruses in xenotransplantation // Curr. Opin. Organ Transplant. 2009. V. 14. N 2. P. 175–179.

Specke V., Tacke S.J., Boller K. *et al*. Porcine endogenous retroviruses: *in vitro* host range and attempts to establish small animal models // J. Gen. Virol. 2001. V. 82. N 4. P. 837–844.

Sugimura S., Yamanaka K., Kawahara M. *et al*. Early metaphase II oocytes treated with dibutyryl cyclic adenosine monophosphate provide suitable recipient cytoplasm for the production of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos // Anim. Sci. J. 2010. V. 81. N 1. P. 48–57.

Suzuka I., Shimizu N., Sekiguchi K. *et al*. Molecular cloning of unintegrated closed circular DNA of porcine retrovirus // FEBS Lett. 1986. V. 198. N 2. P. 339–343.

Tacke S.J., Bodusch K., Berg A., Denner J. Sensitive and specific immunological detection methods for porcine endogenous retroviruses applicable to experimental and clinical xenotransplantation // Xenotransplantation. 2001. V. 8. N 2. P. 125–135.

Tacke S.J., Kurth R., Denner J. Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation? // Virology. 2000. V. 268. N 1. P. 87–93.

Takefman D.M., Wong S., Maudru T. *et al*. Detection and characterization of porcine endogenous retrovirus in porcine plasma and porcine factor VIII // J. Virol. 2001. V. 75. N 10. P. 4551–4557.

Takeuchi Y., Porter C.D., Strahan K.M. *et al*. Sensitization of cells and retroviruses to human serum by (alpha 1-3) galactosyltransferase // Nature. 1996. V. 379. N 6560. P. 85–88.

Takeuchi Y., Patience C., Magre S. *et al*. Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus // J. Virol. 1998. V. 72. N 12. P. 9986–9991.

Tonjes R.R., Czauderna F., Fischer N. *et al*. Molecularly cloned porcine endogenous retroviruses replicate on human cells // Transplant. Proc. 2000. V. 32. N 5. P. 1158–1161.

Uchida M., Shimatsu Y., Onoe K. *et al*. Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection // Transgenic Res. 2001. V. 10. N 6. P. 577–582.

Valdes-Gonzalez R., Dorantes L.M., Bracho-Blanchet E. *et al*. No evidence of porcine endogenous retrovirus in patients with type 1 diabetes after long-term porcine islet xenotransplantation // J. Med. Virol. 2010. V. 82. N 2. P. 331–334.

van der Laan L.J., Lockey C., Griffeth B.C. *et al*. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice // Nature. 2000. V. 407. N 6800. P. 90–94.

Wilson C.A. Porcine endogenous retroviruses and xenotransplantation // Cell. Mol. Life Sci. 2008. V. 65. N 21. P. 3399–3412.

Wilson C.A., Wong S., Muller J. *et al*. Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells // J. Virol. 1998. V. 72. N 4. P. 3082–3087.

Wilson C.A., Wong S., VanBrocklin M., Federspiel M.J. Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus // J. Virol. 2000. V. 74. N 1. P. 49–56.

Wolgamot G., Bonham L., Miller A.D. Sequence analysis of *Mus dunni* endogenous virus reveals a hybrid VL30/gibbon ape leukemia virus-like structure and a distinct envelope // J. Virol. 1998. V. 72. N 9. P. 7459–7466.

Yamanaka K., Sugimura S., Wakai T. *et al*. Acetylation level of histone H3 in early embryonic stages affects subsequent development of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos // J. Reprod. Dev. 2009. V. 55. N 6. P. 638–644.

Yang Q., Liu F., Pan X.P. *et al*. Fluidized-bed bioartificial liver assist devices (BLADs) based on microencapsulated primary porcine hepatocytes have risk of porcine endogenous retroviruses transmission // Hepatol. Int. 2010. V. 4. N 4. P. 757–761.

Yang Y.G., Wood J.C., Lan P. *et al*. Mouse retrovirus mediates porcine endogenous retrovirus transmission into human cells in long-term human-porcine chimeric mice // J. Clin. Invest. 2004. V. 114. N 5. P. 695–700.

Zhang P., Yu P., Wang W. *et al*. Molecular characterization of long terminal repeat of porcine endogenous retroviruses in Chinese pigs // Acta Virol. 2010a. V. 54. N 3. P. 165–172.

Zhang P., Yu P., Wang W. *et al*. An effective method for the quantitative detection of porcine endogenous retrovirus in pig tissues // In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 2010b. V. 46. N 5. P. 408–410.

PORCINE ENDOGENOUS RETROVIRUSES: IS THE RISK OF TRANSMISSION IN XENOGRAFTING GREAT?

N.S. Yudin, R.B. Aitnazarov, V.I. Ermolaev

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: yudin@bionet.nsc.ru

Summary

Recent studies on porcine endogenous retroviruses are reviewed. Nucleotide sequences of the viruses, their expression and isolation of mature virions are considered. The tropism of the viruses for human cells and retrospective studies of human patients are discussed in detail. A critical overview of works on transmission of porcine endogenous retroviruses between species *in vitro* and *vivo* is presented. Approaches to the prevention and treatment of the conjectured infection in humans are discussed. It is concluded from the data reported hitherto that the risk of infection transmission from xenograft recipients to the rest of the population is very low. This low risk can be further reduced by careful observation and, probably, vaccination of contacting persons, as well as by preventive administration of antiviral drugs. The insignificant risk of infection can also be reduced by application of biotechnological methods to the raise of pigs lacking endogenous retroviruses tropic for humans.

Key words: porcine endogenous retroviruses, PERV, xenografting.

LTR-РЕТРОТРАНСПОЗОНЫ РАСТЕНИЙ

И.Д. Сормачева, А.Г. Блинов

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: sormacheva@bionet.nsc.ru

Ty1/copia и *Ty3/gypsy* LTR-ретротранспозоны занимают значительную часть геномов растений и играют важную роль в их организации, функционировании и эволюции. Большая часть информации о LTR-ретротранспозонах растений ограничивается видами, имеющими сельскохозяйственную значимость, и модельными объектами, такими, как *Arabidopsis thaliana*. Наиболее изученными являются LTR-ретротранспозоны покрытосеменных растений. В настоящее время в геномах покрытосеменных растений обнаружены и описаны следующие LTR-ретротранспозоны: *Sire*, *Oryco*, *Retrofit*, *Tork* (суперсемейство *Ty1/copia*); *CRM*, *Galadriel*, *Reina*, *Del*, *REM*, *Athila* и *Tat* (суперсемейство *Ty3/gypsy*). В геномах голосеменных растений описаны LTR-ретротранспозоны, близкие к ретротранспозонам других групп растений (*CRM*, *Galadriel*, *Reina*, *Del*), а также специфичные для голосеменных элементы (*Ty3/gypsy*: *PpRT1*, *IFG7*, *PtGypsyX1*, *PGGYPSYX1*; *Ty1/copia*: *TPE1*, *Tpa*, *PtCopiaX1*, *PGCOPIAX1*, *Tgb*). Информация о распространении и разнообразии LTR-ретротранспозонов несеменных растений (мхов, папоротников и др.) гораздо более ограничена. В геномах папоротников описаны *Ty3/gypsy* элементы, близкие к семейству *CRM*, а также элементы семейств *Galahad* и *Modred*, специфичные для несеменных растений. В геномах плаунов обнаружены *Ty3/gypsy*-элементы *Tcn1* (обнаруженные ранее только в геномах грибов), *Galahad* и *Modred*, а в геномах мхов-элементы семейств *Galahad* и *Tcn1*. *Ty1/copia*-элементы обнаружены в геномах некоторых несеменных растений, но не описаны детально, и на данный момент не установлено их отношение к той или иной филогенетической группе LTR-ретротранспозонов. Данные о разнообразии LTR-ретротранспозонов в геномах зеленых и харовых водорослей практически отсутствуют. Исключение составляет *REM* (*Ty3/gypsy*) элемент, описанный в геноме зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, и *Osser* (*Ty1/copia*), описанный в геноме колониальной зеленой водоросли *Volvox carteri*.

Ключевые слова: растения, LTR-ретротранспозоны, горизонтальный перенос, эволюция.

Введение

Ретротранспозоны – мобильные элементы (МЭ), составляющие значительную фракцию повторенных последовательностей ДНК эукариотических организмов. Эти МЭ перемещаются по механизму «copy-and-paste» («копирование» и «встройка») транспозиции, используя РНК-посредник, который переводится в экстрахромосомную ДНК с помощью обратной транскриптазы, кодируемой самими элементами, и затем встраиваются в геном (Boeke, Corces, 1989). Ретротранспозоны относятся к классу 1 МЭ, они обнаружены практически у всех эукариотических организмов, принадлежащих к различным таксономическим группам, таким, как простейшие, грибы, животные и растения (Kumar, Bennetzen, 1999). Ретротранспозоны широко распространены у растений (Flavell *et al*., 1992a; Voytas *et al*., 1992; Hirochika H., Hirochika R., 1993; Matsuoka, Tsunewaki, 1996, 1999) и могут составлять до 50 % всей геномной ДНК (Pearce *et al*., 1996; SanMiguel *et al*., 1996). Репликативный способ перемещения позволяет быстро накапливать большое количество копий элемента, таким образом, увеличивая размер генома растения (Pearce *et al*., 1996; SanMiguel *et al*., 1996; Kumar, Bennetzen, 1999). Увеличение генома кукурузы на 75 % за последние 5 млн лет является результатом перемещения и распространения элементов II семейства ретротранспозонов (SanMiguel *et al*., 1998). Мутации, создаваемые инсерцией ретротранспозона, оказываются стабильными в отличие от мутаций,

вызываемых ДНК-транспозонами, поскольку последние при перемещении вырезают свою исходную копию из генома и уже затем встраиваются в другой сайт, в то время как копия ретротранспозона, встроившись, уже никуда не исчезнет (Georgiev, 1984; Geyer *et al*., 1986; Peifer, Bender, 1988).

Ретротранспозоны разделяются на 5 групп, отличающихся механизмом перемещения и структурной организацией: 1) LTR-ретротранспозоны, имеющие на концах длинные прямые повторы (long terminal repeat – LTR) (рис. 1); 2) non-LTR-ретротранспозоны, не несущие длинных концевых повторов. Вторую группу также называют *LINE*-элементами (Long Interspersed Nuclear Elements – длинные диспергированные ядерные элементы); 3) *DIRS*-like элементы, содержащие ген тирозин рекомбиназы вместо гена интегразы (INT) и прямые разделенные повторы (split direct repeats – SDR) или инвертированные повторы (inverted repeats). Согласно классификации ICTV, DIRS-подобные элементы являются группой LTR-ретротранспозонов (рис. 2) (Havecker *et al*., 2004); 4) *Penelope*-like элементы (PLEs), кодирующие обратную транскриптазу (RT), более близкую к теломеразе, чем к обратной транскриптазе LTR-ретротранспозонов, и эндонуклеазу, более близкую к эндонуклеазе интронов группы II и бактериальному белку UvrC; 5) *SINE*-элементы (Short Interspersed Nuclear Elements) – короткие диспергированные ядерные элементы (Wicker *et al*., 2007).

Структурная организация LTR-ретротранспозонов

Полноразмерный автономный LTR-ретротранспозон имеет размер от 4 до 10 тыс. пар нуклеотидов и содержит в своей структуре длинные концевые повторы в прямой ориентации, длина которых варьирует от 100 п.о. до 5 тыс. п.о. (рис. 1). Длинные концевые повторы не кодируют белки, но содержат промоторы и терминаторы, регулирующие транскрипцию генов LTR-ретротранспозонов. Тело элемента включает в себя последовательности двух генов – *gag* и *pol* (Wicker *et al*., 2007). Ген *gag* кодирует белок, сходный с белком нуклеокапсида ретровирусов; ген *pol* кодирует белок, который имеет протеазную (protease – PR), обратнотранскриптазную (reverse transcriptase – RT) и рибонуклеазную (Ribonuclease H – RH) активности, которые необходимы для репликации/перемещения ретротранспозона, и интегразную активность (integrase – INT), позволяющую ретротранспозону встраиваться в новый сайт-мишень (Kumar, Bennetzen, 1999; Wicker *et al*., 2007). Другая особенность LTR-ретротранспозонов – это наличие коротких последовательностей, известных как праймер-связывающий сайт (Primer Binding Site – PBS) и полипуриновый тракт (Polypurine Tract – PPT). PBS располагается сразу за 5′LTR и необходим для синтеза первой цепи кДНК. Помимо последовательностей, кодирующих два основных полипротеина, LTR-ретротранспозоны также могут содержать дополнительные кодирующие последовательности. Например, некоторые ретротранспозоны растений содержат открытые рамки считывания, кодирующие белки, подобные белку оболочки Env (Env-like ORF) ретровирусов. Роль таких белков остается пока невыясненной (Laten, 1999; Wright, Voytas, 2002; Laten *et al*., 2003; Havecker *et al*., 2005). Поскольку LTR-ретротранспозоны отличаются от ретровирусов только отсутствием кодирующих последовательностей белка оболочки вирусной частицы – гена *env* (envelope – оболочка) ретровирусов, долгое время считалось, что LTR-ретротранспозоны возникли в результате «доместикации» ретровирусов и являются не чем иным, как ретровирусами, потерявшими ген белка оболочки (Xiong, Eickbush, 1990). Однако филогенетический анализ LTR-ретротранспозонов и ретровирусов выявил обратное. Вероятнее всего, ретровирусы возникли из LTR-ретротранспозонов в результате приобретения дополнительного гена *env*, продукт трансляции которого позволил проторетровирусу сформировать вирусную частицу, которая стала обладать инфекционной способностью (Xiong, Eickbush, 1990).

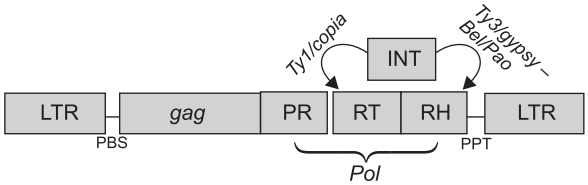


Рис. 1. Структурная организация LTR-ретротранспозонов (Llorens *et al*., 2011).

Классификация LTR-ретротранспозонов

Среди LTR-ретротранспозонов, как правило, выделяют два суперсемейства: *Ty1/copia* (или Pseudoviridae) и *Ty3/gypsy* (или Metaviridae) (Havecker *et al*., 2004). Некоторые авторы выделяют третье суперсемейство LTR-ретротранспозонов – *BEL-Pao* (Xiong *et al*., 1993; Wicker *et al*., 2007). Элементы данного суперсемейства обладают структурой, сходной со структурой *Ty3/gypsy* или *Ty1/copia*-элементов, однако они формируют отдельный кластер при филогенетическом анализе на основе доменов обратной транскриптазы (Cook *et al*., 2000). Основное различие в структуре элементов групп *Ty3/gypsy* и *Ty1/copia* заключается в порядке расположения доменов обратной транскриптазы и интегразы в составе гена *pol* (рис. 1). В классификации, предложенной T. Wicker с соавт., в состав класса LTR-ретротранспозонов включены также группы Retrovirus и ERV, представляющие собой ретровирусы и эндогенные ретровирусы соответственно (Wicker *et al*., 2007).

Суперсемейство *Ty1/copia*

Ty1/copia представляет собой суперсемейство ретровирусов и LTR-ретротранспозонов, широко представленных в геномах растений, грибов, животных, водорослей и некоторых простейших. Распространение элементов суперсемейства *Ty1/copia* позволяет предположить, что их предковые элементы были представлены в геномах эукариотических организмов еще до разделения растений и уникотов (Llorens *et al*., 2009). Среди представителей суперсемейства *Ty1/copia* описаны *Sire*-элементы из геномов растений, содержащие дополнительную ORF, кодирующую ген *env*, благодаря чему им был присвоен статус потенциальных ретровирусов (Havecker *et al*., 2005). *Ty1/copia* LTR-ретротранспозоны имеют LTRs длиной 100–1300 п.о., ограничивающие центральный район с одной открытой рамкой считывания, в которой закодированы гены *gag* и *pol* (в случае ретровирусов еще и ген *env*). Домен INT расположен между протеазным доменом и доменом обратной транскриптазы (Eickbush, Jamburuthugoda, 2008) (рис. 1).

Классификация суперсемейства *Ty1/copia* на данный момент не завершена. Согласно классификации Международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV)), суперсемейство *Ty1/copia* получило название Pseudoviridae и подразделяется на три группы: Pseudovirus, Hemivirus и Sirevirus (Havecker *et al*., 2004) (рис. 2). Однако данная классификация не является широко используемой и не удовлетворяет современным данным о разнообразии элементов суперсемейства *Ty1/copia*.

Лоренс с соавт. (Llorens *et al*., 2009) предложили свою классификацию ретроэлементов *Ty1/copia* (рис. 3). По результатам филогенетических исследований последовательностей гена *pol*, суперсемейство *Ty1/copia* подразделяется на две основные группы: 1) в группу 1 входят ретровирусы рода Pseudovirus (обнаруженные в геномах грибов), ретротранспозоны груп-

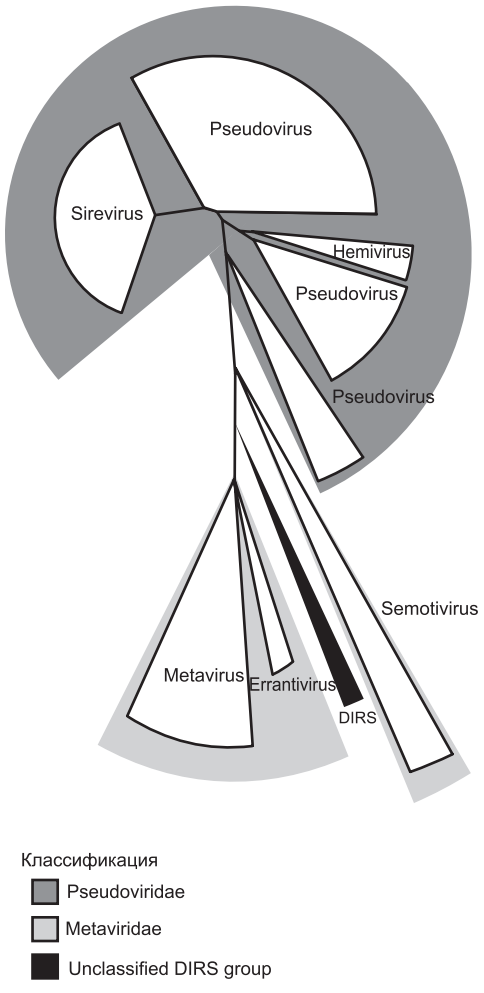


Рис. 2. Классификация LTR-ретротранспозонов согласно ICTV (Havecker *et al*., 2004).

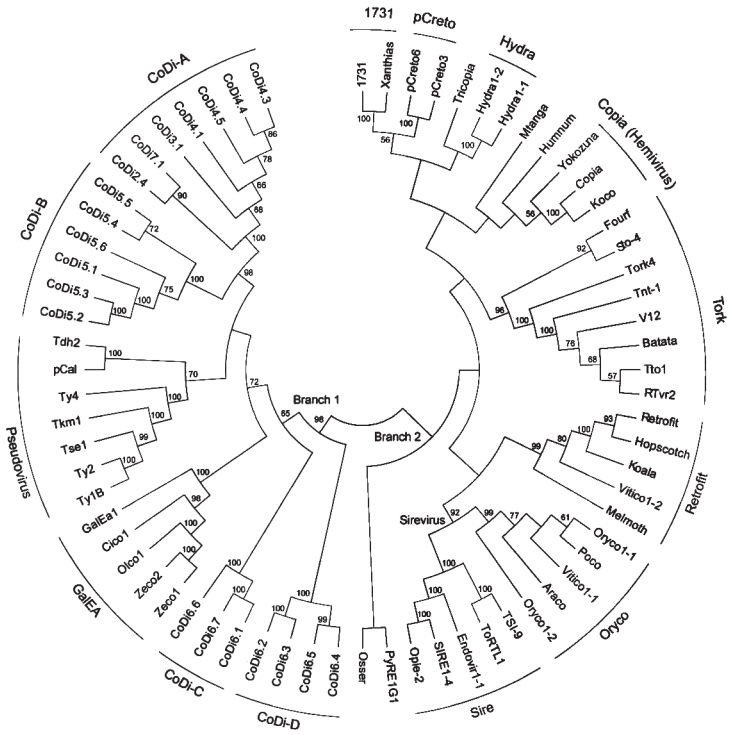


Рис. 3. Филогенетическое дерево *Ty1/copia* LTR-ретротранспозонов, построенное на основе последовательностей гена *pol* (Llorens *et al*., 2009).

пы *GalEA*, обнаруженные в геномах морских билатеральных животных, и четырех групп *CoDi*-like элементов, обнаруженных в геномах диатомовых водорослей; 2) в группу 2 входят оставшиеся линии LTR-ретротранспозонов и потенциальные ретровирусы включая *Copia*-like hemiviruses и *Copia*-like sireviruses, из геномов растений, грибов и животных.

Представители группы 1 не обнаружены в геномах растений вообще, а из группы 2 в геномах растений присутствуют элементы только 4 семейств *Ty1/copia*-элементов.

1. *Sireviruses.* *Sireviruses* представляют собой группу LTR-ретротранспозонов и ретровирусов из геномов растений, содержащую две филогенетически родственные линии «*Sire*» и «*Oryco*» (Llorens *et al*., 2009). Основное отличие данных линий в том, что элементы линии *Sire* содержат дополнительную открытую рамку считывания гена *env* и считаются потенциальными ретровирусами, а элементы линии *Oryco* являются классическими LTR-ретротранспозонами (Llorens *et al.*, 2011).

1.1. *Sire.* *Sire*-элементы представляют собой достаточно большие ретротранспозоны длиной 9,3–9,8 тыс. п.о. с концевыми инвертированными повторами размером 500–1200 п.о. Тело элемента содержит три открытые рамки считывания генов: *gag*, *pol* и *env*-like (*env*-like ORF расположена с С-конца домена RNase H) (Llorens *et al*., 2011) (рис. 4). Наиболее характерным представителем этой линии является элемент *SIRE-1*, первоначально описанный в геноме сои *Glycine max* (Laten *et al*., 1998; Laten, 1999). *SIRE1*-like элементы широко представлены в геномах растений как однодольных (рис, кукуруза, сорго), так и двудольных (арабидопсис, лотос, бобовые, цитрусовые) (Havecker *et al*., 2005).

1.2. *Oryco.* LTR-ретротранспозоны линии *Oryco* были обнаружены в геномах некоторых видов растений: *Vitis vinifera*, *Arabidopsis thaliana*, *Popolus tricocarpa* и *Oryza sativa*

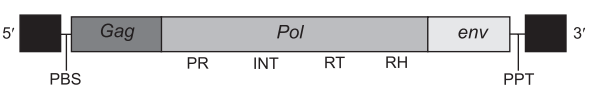


Рис. 4. Структурная организация *Ty1/copia* LTR-ретротранспозонов *Sire* (Llorens *et al*., 2011).

(Llorens *et al*., 2011). Это относительно короткие элементы длиной 4,2–4,9 тыс. п.о. с концевыми повторами размером 160–440 п.о. Кодирующая область содержит гены *gag* и *pol* в классическом для *Ty1/copia*-ретротранспозонов порядке (ген *env* отсутствует) (рис. 5).

2. *Retrofit*. Элементы *Retrofit* имеют размер 4,7–4,9 тыс. п.о., концевые повторы длиной 0,12–0,3 тыс. п.о. и доменную организацию генов *gag* и *pol*, типичную для *Ty1/copia*-ретротранспозонов (Piegu *et al*., 2006; *Llorens et al*., 2011) (рис. 5).

3. *Tork*. К семейству *Tork* принадлежат LTR-ретротранспозоны из геномов различных видов растений: *Zea mays*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinifera*, *Nicotiana tabacum* и *Vigna radiata* (Grandbastien *et al*., 1989; SanMiguel *et al*., 1996; Marillonnet, Wessler, 1998; Llorens *et al*., 2009). Размеры и длинных концевых повторов, и кодирующего района весьма вариабельны среди представителей различных элементов этого семейства: 0,12–1,2 тыс. п.о. и 4,1–6,7 тыс. п.о. соответственно (рис. 5).

4. *Osser*. *Osser* – первый полный *Ty1/copia*-like ретротранспозон, описанный в геноме колониальной зеленой водоросли *Volvox carteri* (Lindauer *et al*., 1993). Размер элемента составляет 4,875 п.о., длина LTRs – 197 п.о., элемент имеет доменную организацию генов *gag* и *pol*, типичную для *Ty1/copia*-ретротранспозонов. Данное семейство группы 2 *Ty1/copia*-ретротранспозонов содержит единственный элемент, для которого не описаны филогенетически близкие элементы (рис. 5).

Рис. 5. Структурная организация *Ty1/copia* LTR ретротранспозонов семейств *Oryco*, *Retrofit*, *Tork* и *Osser* (Llorens *et al*., 2011).

Суперсемейство *Ty3/gypsy*

Элементы группы *Ty3/gypsy* имеют сходство с вирусами семейства Retroviridae (Kumar, Bennetzen, 1999; Bennetzen, 2000). Главным отличием ретровирусов от LTR-ретротранспозонов группы *Ty3/gypsy* является то, что ретровирусы имеют дополнительную открытую рамку считывания (ORF) для кодирования белков оболочки (ENV), необходимых для передачи ретровируса от клетки к клетке. *Ty3/gypsy* LTR-ретротранспозоны имеют длину от 4 до ~ 15 тыс. п.о., длинные концевые повторы LTR, открытую рамку считывания, в которой закодированы гены *gag* и *pol* (в случае ретровирусов еще и ген *env*), и некоторые дополнительные гены (в случае *Tat* элементов и различных хромовирусов). Домен INT расположен с С-конца гена *pol* (после домена RNase H) (рис. 1).

Согласно классификации Международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV)), суперсемейство *Ty3/gypsy* названо Metaviridae и подразделяется на три группы: Metaviruses, Errantiviruses и Semotiviruses (рис. 2) (Havecker *et al.*, 2004). Филогенетический анализ метавирусов позволил выделить в составе Metaviridae 11 семейств: *Chromovirus*, *CsRn1*, *Mdg3*, *Cigr2*, *Cmr1*, *Osvaldo*, *Athila*, *Mag*, *Gypsy*, *Mdg1* и *Cer* (Gorinsek *et al*., 2004) (рис. 6).

Однако, согласно результатам последнего филогенетического анализа, проведенного на основе последовательностей доменов PR, RT, RH и INT, *Ty3/gypsy* LTR-ретроэлементы разделяются на две группы (Llorens *et al.*, 2009) (рис. 7): 1) в первую группу попадают все хро-

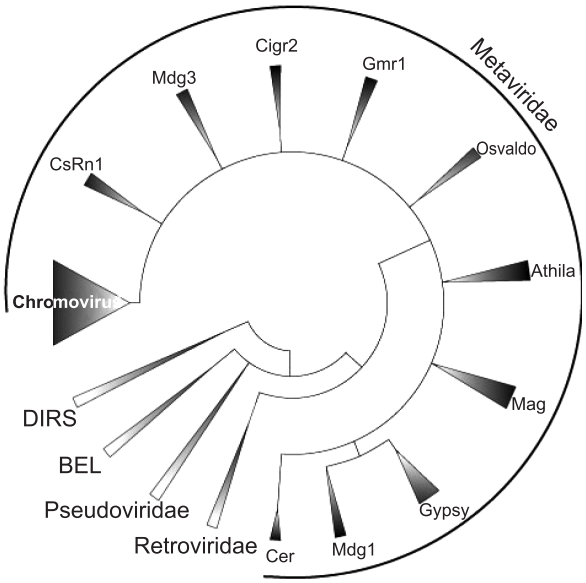


Рис. 6. Классификация элементов группы Metaviridae (Gorinsek *et al*., 2004).

модомен-INT-содержащие LTR-ретротранспозоны (альтернативное название хромовирусы). Эта группа включает в себя два достоверных кластера, названные «Plants» (семейства: *CRM*, *Galadriel*, *Reina*, *Del*, *REM* и *G-Rhodo*) и «Fungi/Vertebrates» (семейства: *TF1-2*, *Pyggy*, *MGLR3*, *Maggy*, *MarY1*, *Pyret*, *V-clade*) и 3 семейства (*Ty3*, *Skipper*, *Tse3*), не входящие в состав кластеров «Plants» и «Fungi/Vertebrates». Позднее в геномах высших несеменных растений были обнаружены хромодомен-INT-содержащие LTR-ретротранспозоны семейств *Modred* и *Galahad* (Novikova *et al*., 2010). Семейство хромодомен-INT-содержащие LTR-ретротранспозоны *Tcn1* было позднее описано в геномах мхов, плаунов и грибов (Novikova *et al*., 2010); 2) во вторую группу входят не содержащие хромодоменов LTR-ретротранспозоны растений и животных: *Athila/Tat* (*Athila*-like, *Tat*-like), *CsRN1*, *412/mdg1*, *Errantiviruses* (*17.6*, *Gypsy*), *Osvaldo*, *Gmr1*, *Cer2-3*, *Cer1*, *Mag*, *Tor1*, *Tor2*, *Tor4*, *Cigr-1*, *Micropia/Mdg3*.

Большинство семейств *Ty3/gypsy* LTR-ретротранспозонов специфичны для определенных таксономических групп живых организмов. Например, представители семейства *Athila* описаны исключительно для растений (Wright, Voytas, 2002). Единственная филогенетическая группа, распределение которой охватывает практически все эукариотические организмы, – это хромодомен-INT-содержащие LTR-ретротранспозоны (Chromovirus) (Gorinsek *et al*., 2004).

1. Хромодомен-INT-содержащие LTR-ретротранспозоны. Альтернативные названия: Класс B (Wright, Voytas, 1998) или *Ty3*-группа (Malik, Eickbush, 1999). Представители данной группы содержат хромодомен (CHR) на С-конце домена интегразы. *Ty3* группа является одной из древнейших и наиболее распространенных групп элементов суперсемейства *Ty3/gypsy*. Элементы этой группы, распространенные в геномах растений и зеленых водорослей, объединены в кластере «Plants» и подразделяются на 6 семейств (Llorens *et al*., 2009).

1.1. *CRM*. Элементы семейства *CRM* являются центромер-специфичными ретротранспозонами растений, последовательность хромодомена которых существенно отличается от общего консенсуса хромодоменов (Gorinsek *et al*., 2004). *CRM*-элементы имеют следу-

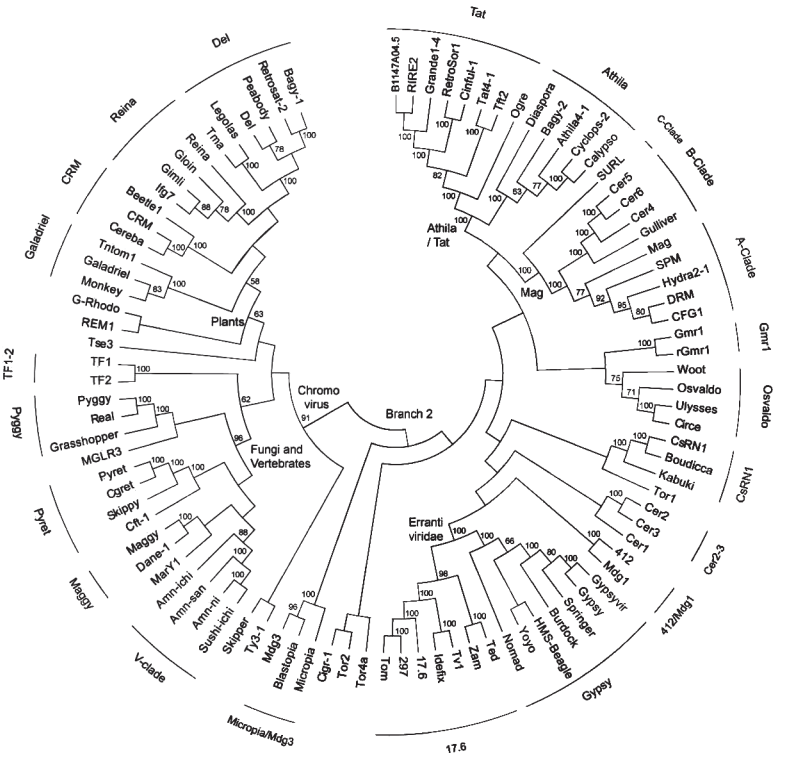


Рис. 7. Филогенетическое дерево *Ty3/gypsy* LTR-ретротранспозонов, построенное на основе последовательностей гена *pol* (Llorens *et al*., 2009).

ющую структуру: центральная часть длиной 6–7 тыс. п.о., фланкированная длинными концевыми повторами длиной 850–1100 п.о., содержит сайт связывания праймера (Primer Bindind Site (PBS)), две открытые рамки считывания канонических генов *gag* и *pol* и полипуриновый тракт (Polypurine Tract (PPT)) вблизи 3′LTR (рис. 8).

Рис. 8. Структурная организация *Ty3/gypsy* LTR-ретротранспозонов семейства *CRM* (Llorens *et al*., 2011).

1.2. *Galadriel.* Элементы семейства *Galadriel* имеют следующую структуру: центральная часть длиной 5,2–6 тыс. п.о., фланкированная концевыми повторами длиной 600–800 п.о., содержащая сайт PBS, две открытые рамки считывания генов *gag* и *pol* и полипуриновый тракт (PPT) вблизи 3′LTR (Gorinsek *et al*., 2004) (рис. 9).

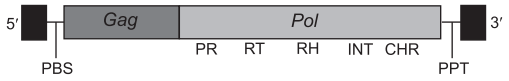


Рис. 9. Структурная организация *Ty3/gypsy* LTR-ретротранспозонов семейств *Galadriel, Del (Tekay)* и *Reina* (Llorens *et al*., 2011).

1.3. *Reina.* Элементы семейства *Reina* имеют длину 4,7–5 тыс. п.о., содержат LTR длиной 300–400 п.о., центральный район содержит две открытые рамки считывания генов *gag* и *pol*, сайт PBS и PPT вблизи 3′LTR (Llorens *et al*., 2011) (рис. 9).

1.4. *Del (Tekay).* Семейство Del (Tekay) представляет собой группу элементов размером 6,2–10,2 тыс. п.о. с концевыми повторами длиной 1,1–4,4 тыс. п.о., содержащих две открытые рамки считывания генов *gag* и *pol*, сайт PBS и PPT вблизи 3′LTR (Llorens *et al*., 2011) (рис. 9).

1.5. *REM.* Это семейство представлено одним элементом *REM1* из генома зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* (Perez-Alegre *et al*., 2005). Элемент *REM1* длиной 5,8 тыс. п.о. имеет следующую структуру: LTRs длиной 276–286 п.о., PBS, и PPT вблизи 3′LTR, центральная часть содержит три открытые рамки считывания – две, кодирующие типичные гены *gag* и *pol* в прямом направлении, и третья, кодирующая часть интегразы и хромодомена в обратном направлении (Llorens *et al*., 2009) (рис. 10).

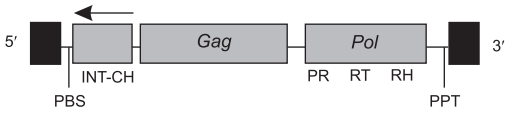


Рис. 10. Структурная организация *REM1 Ty3/gypsy* LTR-ретротранспозона (Llorens *et al*., 2011).

2. LTR-ретротранспозоны, не содержащие хромодомены. Только ретротранспозоны *Athila/Tat* из группы 2 обнаружены в геномах растений.

Athila/Tat. Данный кластер разделяется на два семейства *Athila* и *Tat* (Wright, Voytas, 1998, 2002). Элементы семейства *Athila* содержат в своей структуре ген оболочки *env* и рассматриваются в качестве потенциальных ретровирусов, в то время как элементы семейства *Tat* являются собственно LTR-ретротранспозонами.

Tat-like LTR-ретротранспозоны имеют гигантские размеры – 10–21 тыс. п.о. Центральная часть элемента фланкирована LTR длиной 0,5–1 тыс. п.о. и содержит сайт PBS, гены *gag* и *pol*, некодирующий участок вариабельного размера и тракт PPT вблизи 3′LTR (рис. 11). Некоторые элементы содержат антисмысловые

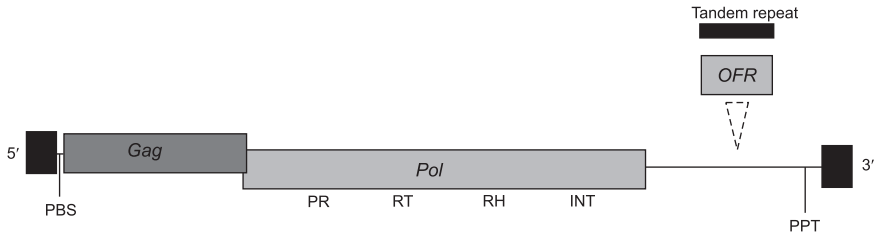


Рис. 11. Структурная организация *Ty3/gypsy* LTR-ретротранспозонов семейств *Athila* и *Tat*-like.

рамки считывания в нетранслируемом районе, которые на данный момент мало изучены (Havecker *et al*., 2004).

Суперсемейство *Bel/Pao*

Первыми описанными элементами суперсемейства *Bel/Pao* были такие элементы, как *Pao* (*Bombyx mori*), *Bel* (*Drosophila*), *Tas* (*Ascaris lumbricoides*) и различные *Cer*-like-элементы из генома *Caenorhabditis elegans* (Aeby *et al*., 1986; Xiong *et al*., 1993; Bowen, McDonald, 1999). Элементы суперсемейства *Bel/Pao* аналогично элементам *Ty3/gypsy* содержат кодирующую область с генами *gag-pol* (GAG-PR-RT-RH-INT) и геном *env* (в случае ретровирусов). Размеры элементов этого суперсемейства варьируют от 4 тыс. до 10 тыс. п.о.

Суперсемейство *Bel/Pao* подразделяется на семейства: *Bel*, *Tas*, *Pao*, *Sinbad* и *Suzu* (рис. 12) (Copeland *et al*., 2005). В геномах растений представители суперсемейства *Bel/Pao* не обнаружены.

Таким образом, в настоящее время в геномах растений обнаружены и описаны следующие LTR-ретротранспозоны: *Sire*, *Oryco*, *Retrofit*, *Tork* и *Osser* (суперсемейства *Ty1/copia*); *CRM*, *Galadriel*, *Reina*, *Del*, *REM*, *Galahard*, *Modred*, *Tcn1*, *Athila* и *Tat* (суперсемейства *Ty3/gypsy*).

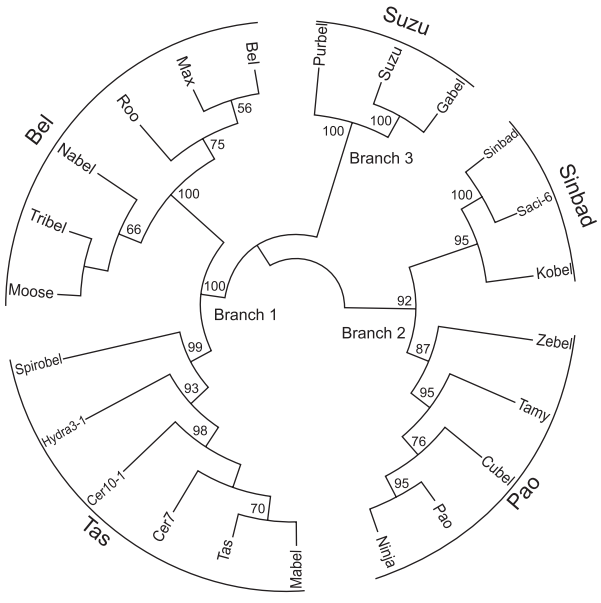


Рис. 12. Филогенетическое дерево *Bel/Pao* LTR-ретротранспозонов, построенное на основе последовательностей гена *pol* (Llorens *et al*., 2009).

Автономные и неавтономные ретротранспозоны

Для элементов класса 2 (ДНК транспозонов) автономность зависит от способности отдельных элементов экспрессировать фермент транспозазу и тем самым осуществлять собственное перемещение (Kumar, Bennetzen, 1999). Неавтономные элементы являются потомками автономных, накопивших ряд мутаций. Например, автономный элемент *Ac* кукурузы, потеряв ORF транспозазы, превращается в неавтономный элемент *Ds*. Однако, поскольку элементы класса 1 (ретротранспозоны) перемещаются по репликативному механизму, вопрос об автономности элемента носит более сложный характер. Если индивидуальные неавтономные элементы класса 1 способны реплицироваться несмотря на потерю автономности, то они формируют группы близких неавтономных элементов (Sabot, Schulman, 2006). Таким образом, понятие «автономный/неавтономный» в случае ретротранспозонов применяется на уровне групп и семейств. Семейства ретротранспозонов, содержащие индивидуальные ретроэлементы, способные к кодированию необходимых для транспозиции белков, считаются автономными (Sabot, Schulman, 2006). Индивидуальные копии могут быть в разной степени транскрипционно или трансляционно компетентными (трансляция приводит к формированию функциональных белков) или активными (Sabot, Schulman, 2006). Активные элементы могут участвовать в некоторых стадиях жизненного цикла неактивных или некомпетентных элементов того же семейства (*cis*) и других семейств или групп (*trans*), дополняя таким образом их жизненный цикл. В данном случае неактивные элементы выступают в роли паразитов активных элементов, снижая их способность к распространению. Аналогичное явление наблюдается в случае негативной интерференции вирусов и их паразитизма по отношению к другим вирулентным вирусам (Hu *et al*., 1997). Успешно распространяющийся трансляционно некомпетентный элемент может сформировать новое подсемейство и в конечном итоге семейство неавтономных элементов.

Недавние исследования позволили обнаружить большие структурно однородные группы ретротранспозонов, не содержащих доменов Gag, Pol или Env. Эти группы не являются автономными, но отдельные элементы могут быть транскрипционно активными (Sabot, Schulman, 2006). Примеры неавтономных групп ретротранспозонов: *LARD*, *TRIM* и *Morgane*. Элементы группы *LARD* содержат длинные концевые повторы и центральную консервативную область, не кодирующую белки (Kalendar *et al*., 2004). *TRIMs* являются относительно короткими элементами, содержат короткие LTRs и центральную часть, содержащую только сигналы обратной транскрипции (Witte *et al*., 2001). *Morgane*-элементы занимают промежуточное положение между автономными и полностью неавтономными и содержат нефункциональные участки ORF гена *pol* (Mhiri *et al*., 1997; Melayah *et al*., 2001; Sabot *et al*., 2006). Для групп *LARD*, *TRIM* и *Morgane* на данный момент не обнаружены *trans*-активируемые элементы.

Жизненный цикл LTR-ретротранспозонов растений

В жизненный цикл LTR-ретротранспозонов входят: транскрипция, трансляция, обратная транскрипция и интеграция новой копии в геном. Для осуществления перечисленных этапов требуются белки, закодированные в последовательностях ретротранспозонов (рис. 13).

Транскрипция. На первом этапе с помощью клеточной РНК полимеразы II происходит транскрипция, которая начинается с 5′LTR (5′R района (ниже TATA box)) и заканчивается в 3′R районе внутри 3′LTR (Kumar, Bennetzen, 1999). В результате транскрипции образуется бицистронная мРНК, кодирующая, по крайней мере, две ORF: Gag и Pol. мРНК ретротранспозонов, как правило, не содержит интронов, исключение составляет *Ogre* элемент (Neumann *et al*., 2003). Экспрессия ретротранспозонов так же, как и любых других генов с промоторами polII, зависит от факторов, влияющих на синтез мРНК клетки-хозяина. После транскрипции мРНК переносится в цитоплазму так же, как и другие мРНК хозяйской клетки.

В целом уровень экспрессии LTR-ретротранспозонов даже в случае индукции стрессом значительно ниже, чем транскрипция «классических» генов (Wessler *et al*., 1995; Jaaskelainen *et al*., 1999). Это, вероятнее всего, связано с тем, что LTR-ретротранспозоны обладают слабыми промоторами, и с действием клеточных механизмов инактивации. При встройке по типу

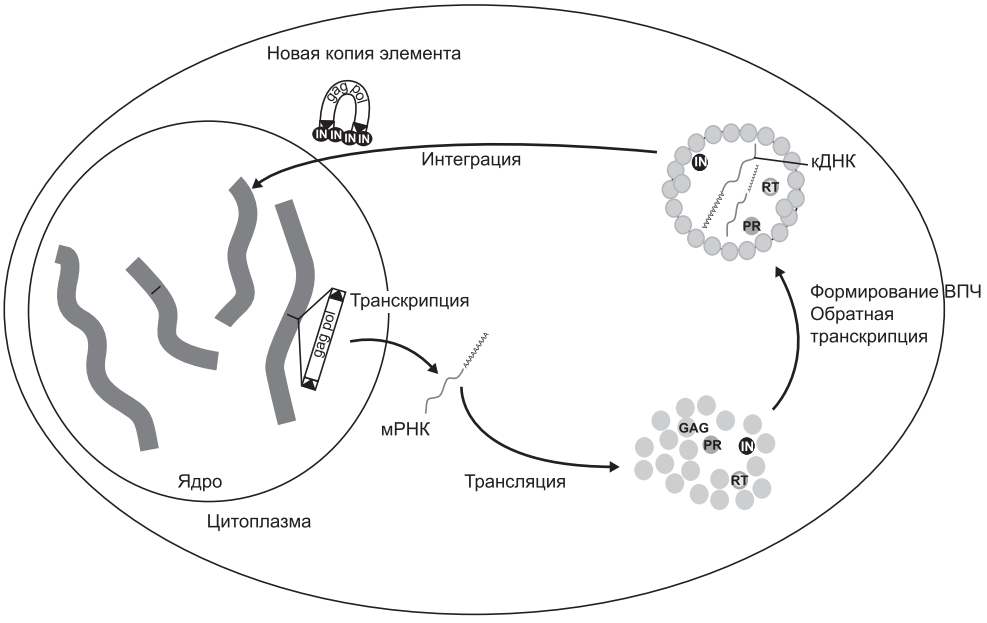


Рис. 13. Жизненный цикл LTR-ретротранспозонов (Grandbastien, 2008).

ВПЧ – вирусоподобная частица; GAG – белок, формирующий ВПЧ; RT – обратная транскриптаза; PR – протеаза; IN – интеграза.

промоторной ловушки («promoter-trap-like») ретротранспозоны могут экспрессироваться под «классическими» промоторами клетки. Некоторые конкретные элементы могут иметь альтернативные варианты экспрессии, например, опосредованной промотором polIII в случае элемента *Cassandra TRIM* (Sabot, Schulman, 2006).

Трансляция. В случае автономных элементов происходит трансляция РНК в цитоплазме с образованием белков Gag и Pol. Трансляционный сдвиг между двумя рамками считывания может происходить разными способами. Сайт рибосом в случае гена *gag* может быть универсальным, а сайт для гена *pol* – внутренним, менее эффективным (Meignin *et al*., 2003). Это приводит к преобладанию продуктов трансляции GAG над POL. В случае ретровирусов данный дисбаланс, являющийся следствием сдвига рамки считывания, соответствует стехиометрии, необходимой для сборки вирусных частиц (Briggs *et al*., 2004). Кроме того, наличие внутреннего сайта трансляции позволяет индивидуальным элементам со стоп-кодонами в районе гена *gag* осуществлять нормальную трансляцию гена *pol*. В другом варианте последовательность мРНК между *gag* и *pol* может содержать небольшой повторяющийся мотив (например, AAAAA), который вызывает «проскальзывание» рибосомы, и производит трансляцию по второй рамке считывания (Jin, Bennetzen, 1989; Gao *et al*., 2003; Kovalchuk *et al*., 2005). Этот механизм очень часто встречается у вирусов растений (Giedroc *et al.*, 2000). Для сдвига рибосомы по мРНК могут также использоваться редкие специфические транспортные РНК (Hull, Covey, 1995). В случае некоторых ретротранспозонов растений может транслироваться полипротеин, включающий Gag и Pol, без сдвига рамки считывания. Например, в случае элемента *BARE-1* трансляция происходит по одной рамке считывания и полипротеин в дальнейшем расщепляется на функциональные единицы. Посттрансляционный процессинг белка Pol (а также расщепление полипротеина на GAG и POL) в случае элемента *BARE-1* происходит эндопротеолитически за счет AP домена белка Pol (Jaaskelainen *et al*., 1999).

Формирование нуклеокапсида, упаковка и димеризация. Ретровирусный белок Gag имеет три функциональные области (во многих исследованных случаях полипротеин Gag расщепляется на отдельные полипептиды): капсидный домен (полимеризация), нуклеокапсидный домен (взаимодействие с нуклеиновыми кислотами) и матрикс домен (связывание с белками оболочки) (Adamson, Jones, 2004). Белок Gag LTR-ретротранспозонов содержит капсидный и нуклеокапсидный домены и область, сходную с матрикс-доменом ретровирусов (Jaaskelainen *et al*., 1999). Формирование вирусоподобных частиц (ВПЧ) необходимо для осуществления обратной транскрипции, специфической РНК. ВПЧ формируются в результате полимеризации белка Gag с помощью капсидного домена. Упаковка РНК (включение РНК в ВПЧ) происходит селективно для РНК, соответствующей Gag, который формирует ВПЧ (Sabot, Schulman, 2006). В случае ретровирусов селективность определяется специфической последовательностью PSI (packaging signal – сигнал упаковки), вторичная структура РНК узнается структурами нуклеокапсидного домена Gag (Evans *et al*., 2004). Последовательность PSI, как правило, расположена сразу же после PBS перед старт-кодоном (AUG) гена *gag*. В случае *HIV*- и *SIV*-like ретровирусов в PSI содержится последовательность, отвечающая за формирование петли, которая и обеспечивает высокий уровень специфичности. Для LTR-ретротранспозонов расположение последовательности PSI на данный момент не установлено. Однако высокая консервативность последовательно-сти LTR-ретротранспозонов вблизи PBS позволяет предположить сходный механизм упаковки для LTR-ретротранспозонов и ретровирусов. РНК неавтономных LTR-ретротранспозонов, содержащие PSI последовательности, одинаковые с PSI последовательностями активных элементов, может быть упакована в различные ВПЧ. Эффективное распространение неавтономных элементов в таких группах, как *TRIM* и *LARD*, показывает, что, возможно, таким образом неавтономные элементы могут избежать последствий отсутствия собственных функциональных белков (Sabot, Schulman, 2006).

РНК ретровирусов находится в димеризованном состоянии в составе ВПЧ (Brunel *et al*., 2002). Формирование димеров происходит за счет специфических последовательностей DIS

(DIS – dimerization initiation signal – сигнал инициации димеризации), которые участвуют в распознавании и взаимодействии двух молекул РНК даже в отсутствие белков (Darlix *et al*., 1990; Roy *et al*., 1990; Marquet *et al*., 1991). Формирование симметричной сигнальной петли вблизи PSI и приводит к нековалентному симметричному межмолекулярному взаимодействию, получившему у ретровирусов название «kissing-loop complex», которое в дальнейшем стабилизируется (Paillart *et al*., 2004). На данный момент в случае LTR-ретротранспозонов димеры были показаны только для *Ty1*-элемента дрожжей *Saccharomyces cereviseae* (Feng *et al*., 2000). Однако существуют косвенные подтверждения формирования димеров и в случае других LTR-ретротранспозонов (Sabot *et al*., 2005a; Vicient *et al*., 2005). Процесс димеризации, как и процесс упаковки, также является специфическим. Таким образом, неавтономные элементы должны нести одинаковые с автономными элементами DIS (для формирования специфических гетеродимеров) или иметь конкурентоспособную эффективность упаковки, позволяющую им преимущественно упаковываться в виде гомодимеров. Кроме того, они могут димеризоваться с РНК, содержащими другие DIS сигналы (неспецифические гетеродимеры) (Sabot, Schulman, 2006).

Обратная транскрипция. Большая часть данных о синтезе кДНК была получена из работ с *Ty1* и *Ty3* LTR-ретроэлементами дрожжей и ретровирусов, но предполагается, что этот механизм – общий для всех LTR-ретротранспозонов (Levin, 1995; Friant *et al*., 1998; Wilhelm *et al*., 1999; Cristofari *et al.*, 2002). Кроме того, некоторые данные могут быть так или иначе экстраполированы исходя из сходства организации LTR-ретротранспозонов и ретровирусов (Levin, 1995).

Обычно в одну ВПЧ упаковываются две РНК молекулы, а также тРНК, которая служит первичной затравкой для синтеза (–) цепи кДНК в процессе обратной транскрипции. Сайт связывания тРНК (чаще всего это метиониновая тРНК) находится на 5′-конце РНК-матрицы, поэтому в результате обратной транскрипции образуется относительно короткая кДНК, которая имеет участок гомологии как с 5′-, так и с 3′LTR, а также несет тРНК на 5′- конце (Sabot, Schulman, 2006). Сразу же после синтеза (–) цепи кДНК происходит удаление участка РНК-матрицы в комплексе РНК–кДНК с помощью рибонуклеазы H. Вновь синтезированная короткая кДНК переносится и отжигается на 3′LTR и продолжается построение первой цепи кДНК (или (–) цепь ДНК). На следующем этапе происходит удаление РНК-матрицы, за исключением участка так называемой полипуриновой последовательности (PPT), которая выполняет роль праймера в процессе синтеза второй цепи кДНК (или (+) цепи ДНК), т. е. является вторичной затравкой. После синтеза второй цепи кДНК вторичная затравка удаляется, а также происходит удаление первичной затравки (тРНК), которая до этого этапа находилась на 5′-конце первой цепи кДНК (Sabot, Schulman, 2006).

В процессе синтеза (+) цепи ДНК так же, как и в случае синтеза (–) цепи ДНК, необходим перенос вновь синтезированной цепи для продолжения синтеза. Вновь синтезированный короткий участок (+) цепи ДНК состоит из LTR и прилежащей последовательности PBS, т. е. на 3′-конце имеется участок, гомологичный 3′-концу (–) цепи ДНК. Присутствие гомологичных участков позволяет осуществить перенос (+) цепи кДНК и завершить синтез обеих цепей. Все описанные процессы происходят в вирусоподобных частицах в цитоплазме. Следующим этапом необходимо перенести вновь синтезированный LTR-ретротранспозон в ядро и внедрить в геном клетки хозяина (Sabot, Schulman, 2006).

Процесс обратной транскрипции не является специфическим к определеннной РНК-матрице (Sabot, Schulman, 2006). Таким образом, элементам неавтономных групп не требуется наличие каких-либо специфических характеристик для того, чтобы участвовать в обратной транскрипции, кроме PPT и PBS сайтов. Данный этап не является лимитирующим этапом жизненного цикла LTR-ретротранспозонов. Хотя существуют некоторые вариации в PBS мотиве и его анализ может показать, какие семейства LTR-ретротранспозонов способны участвовать в обратной транскрипции (Sabot, Schulman, 2006).

Реакция обратной транскрипции происходит с ошибкой ($2{,}5 \times 10^{-5}$ ошибок/нуклеотид/цикл) в 100 и 1000 раз выше, чем при работе клеточ-

ной ДНК полимеразы (Sabot, Schulman, 2006). Фермент обратная транскриптаза имеет более высокий уровень ошибок по нескольким причинам: 1) RT может продолжать наращивание последовательности даже без включения нуклеотида; 2) RT менее чувствительна к встройке неправильных нуклеотидов; 3) RT не обладает 3′ и 5′ экзонуклеазной активностями; 4) процесс обратной транскрипции сопровождается сдвигом затравок по отношению к матрице (Preston, 1996; Boutabout *et al*., 2001).

Один из самых сложных моментов в обратной транскрипции – это переключение между матрицами. Обычно переключение происходит между двумя РНК-транскриптами, упакованными вместе, но оно также может произойти между двумя несвязанными РНК, упакованными в один и тот же нуклеокапсид (Mikkelsen, Pedersen, 2000). Это приводит к образованию химерных продуктов, таких, как элементы *Veju_L* (Sabot *et al*., 2005b) и *BARE-2* (Vicient *et al*., 2005). Данная ошибка также может привести к образованию «комплексных» элементов, например: LTR – внутренняя последовательность – LTR – внутренняя последовательность – LTR, фланкированных TSD. Подобные «сложные» элементы часто встречаются в геномах представителей Triticeae (Sabot *et al*., 2005a; Vicient *et al*., 2005). Как правило, они включают два блока элементов, но могут состоять из трех или более блоков. Последовательности LTR «сложных» элементов очень похожи между собой, равно как и внутренние структуры, что свидетельствует об их общем происхождении.

Встраивание новой копии LTR-ретротранспозона в геном. Процесс включения новой копии LTR-ретротранспозона в геном осуществляется при помощи фермента интегразы, которая узнает и связывает концы элемента (LTRs). Интеграза делает асимметричный двухцепочечный разрыв в сайте-мишени геномной ДНК, который, как правило, имеет длину 2–16 пар оснований. Природа сайта-мишени (расположение сайта в гетерохроматиновой области, наличие встроившихся в него ранее других ретротранспозонов) влияет на вероятность интеграции ретроэлементов в данный сайт (Sabot *et al*., 2004). Образовавшиеся двухцепочечные разрывы восстанавливаются системой репарации клетки хозяина с формированием дупликаций в месте встройки нового элемента (TSD). Процесс встройки не требует дополнительной экзогенной АТФ или других энергетических интермедиатов.

Неавтономные ретротранспозоны имеют несколько возможностей для интегрирования в геном за счет автономных элементов. Они могут содержать специфические сайты в LTRs, совпадающие с сайтами автономных элементов и распознаваемые интегразой, или они могут содержать неспецифические мотивы, распознаваемые различными интегразами (Sabot, Schulman, 2006). Третий вариант предполагает особое давление со стороны клетки хозяина на автономные элементы в пользу неавтономных, благодаря которому неавтономным элементам требуется только опередить автономные на этапах упаковки и обратной транскрипции (Sabot, Schulman, 2006). Интеграция может быть неспецифической, и требуется только достаточная ее эффективность, чтобы противостоять разрушению существующих геномных копий элементов. Некоторые растительные ДНК, содержащие вирусы, особенно групп geminivirus, badnavirus и caulimovirus, могут интегрироваться в геном, не кодируя при этом интегразу (Hull *et al*., 2000). Интеграция неавтономных элементов группы *LARD*, вероятнее всего, объясняется третьей моделью. Их встройки как правило нетипичны, отсутствуют определенные TSDs или полная последовательность *LARD*-элемента, и они, по-видимому, являются результатом неспецифической интеграции. При интеграции *TRIM*- и *Morgane*-элементов, напротив, создаются TSDs, которые являются каноническими для LTR-ретротранспозонов (Witte *et al*., 2001; Sabot *et al*., 2005b, 2006).

Регуляция транскрипционной и транспозиционной активности LTR-ретротранспозонов

Наличие в геномах растений большого количества последовательностей, представляющих собой нарушенные LTR-ретротранспозоны, является результатом действия механизмов инактивации мобильных элементов на разных уровнях: 1) метилирование ДНК (Emberton *et al*., 2005); 2) преобразование районов встройки в гетерохроматин (Lippman *et al*., 2004);

3) образование так называемых *solo*-элементов за счет неравномерной рекомбинации внутри элементов (Devos *et al*., 2002; Ma *et al*., 2004); 4) накопление небольших делеций за счет неточной рекомбинации (Devos *et al*., 2002; Ma *et al*., 2004).

Известно, что за счет последних двух механизмов из генома риса (*Oryza sativa*) было удалено > 190 тыс. п.о. ДНК ретротранспозонов за последние 4 млн лет. Существует предположение о том, что содержание LTR-ретротранспозонов в геномах растений определяется действием механизма регуляции амплификации ретротранспозона и созданием небольших делеций в последовательности элемента (Bennetzen *et al*., 2005).

С другой стороны, наличие большого количества нарушенных копий и небольшого количества активных LTR-ретротранспозонов в геноме является индикатором того, что некоторым элементам удается избежать подавляющего воздействия со стороны клетки-хозяина. К таким «механизмам» можно отнести эффект специфической хромосомной локализации элементов, позволяющей им избежать сайленсинга. Другая возможность избежать инактивации – высокая вариабельность последовательностей мобильных элементов. В случае последовательностей *Tnt1*-ретротранспозона табака было показано, что промоторный район, являющийся основной мишенью для инактивации путем метилирования, наиболее вариабелен (Vernhettes *et al*., 1998). Однако перечисленных механизмов не достаточно для того, чтобы объяснить наличие огромного количества копий ретротранспозонов в геномах растений.

Несмотря на инактивацию LTR-ретротранспозонов в геномах растений, этот процесс намного медленнее, чем пролиферация ретротранспозонов (Vitte, Panaud, 2005). Транскрипционная и транспозиционная активности значительно варьируют среди различных групп LTR-ретротранспозонов.

Транскрипционно активные LTR-ретротранспозоны растений и их активация под влиянием стресса

Стресс, связанный с действием внешних условий, может активировать транспозицию мобильных генетических элементов (Васильева и др., 2007; Чересиз и др., 2008).

Транскрипционно активные ретротранспозоны наиболее часто встречаются в семействах с небольшим числом копий в геноме. Элемент *Tos17* представлен в геноме риса в числе от 1 до 5 копий и активируется в культуре клеток (Hirochika *et al*., 1996). Считается, что большинство LTR-ретротранспозонов растений транскрипционно инактивированы (Kumar, Bennetzen, 1999) или транскрипционно неактивны в соматических тканях, но активируются на определенных этапах развития растений (Pouteau *et al*., 1991) или в условиях стресса (Grandbastien, 1998; Takeda *et al*., 1998). Элементы *Tto1* и *Tnt1* представлены в геноме табака в числе 30 и 100 копий соответственно (Grandbastien *et al*., 1989; Hirochika H., Hirochika R., 1993). Экспрессия элементов *Tnt1* (*Tnt1C*) и *Tto1*(*Ty1/copia*) табака значительно усиливается под воздействием абиотического стресса, например салициловой кислоты, хлорной меди, пореза и т. д. (Mhiri *et al*., 1997; Beguiristain *et al*., 2001). Аналогичное увеличение экспрессии *Tnt1*- и *Tto1*-элементов наблюдается при воздействии биотических стрессорных факторов, например при введении вирусных, бактериальных или грибковых патогенов (Pouteau *et al*., 1994). Активировать ретротранспозицию также могут и условия окружающей среды (холод, тепло и т. д.). Так, резкое изменение микроклимата приводит к изменению числа копий элемента *BARE-1* в геноме дикого ячменя (Kalendar *et al*., 2000). Данные об активации транскрипции и транспозиции LTR-ретротранспозонов растений свидетельствуют о наличии в структуре ретротранспозонов определенных регуляторных элементов, контролирующих экспрессию элементов в клетке хозяина. Транскрипция LTR-ретротранспозонов контролируется регуляторными *cis*-элементами, расположенными в 5′LTR и в нетранслируемых районах. Регуляция транскрипции *Tnt1*- и *Tto1*-элементов хорошо изучена и, как показывают результаты исследований, строго контролируется. Промотор *Tnt1A* содержит две различные регуляторные последовательности (короткую палиндромную последовательность BI и последовательность, представляющую собой тандемный повтор 31 п.о., – BII) в 5′LTR, оказывающие активное

влияние на транскрипцию элемента и обладающие сходством с последовательностями промоторов растительных генов, участвующих в развитии ответа на стресс (Vernhettes *et al*., 1997). Одна из этих последовательностей (BI) специфически взаимодействует с белками, активируемыми при ответе организма хозяина на стресс (Vernhettes *et al*., 1997). В промоторе элемента *Tto1* определена регуляторная *cis*-последовательность длиной 13 п.о., влияющая на экспресиию *Tto1* во время ответа на стресс (Takeda *et al.*, 1999). Интересно, что данный мотив связывается с различными транскрипционными факторами MYB, в том числе с фактором LBM1, сходным с фактором MYB-1, индуцируемым вирусными инфекциями (Sugimoto *et al*., 2000). Экспрессия другого транскрипционного MYB фактора NtMYB2 активирует транскрипцию элементов *Tto1* и *PAL* у табака (Sugimoto *et al*., 2000). Кроме того, существует гомология между последовательностью промоторов *Tto1* и гена стрессорного ответа спаржи *AoPR1* (Takeda *et al.*, 1999). Все приведенные данные позволяют предположить, что оба элемента, *Tnt1* и *Tto1*, активируются в состоянии стресса, поскольку их промоторы имеют сходство с промоторами растительных генов, участвующих в развитии ответа на стресс, и связываются с теми же самыми транскрипционными факторами, активируемыми стрессом. Существует ли какое-либо селективное преимущество для ретротранспозонов или клеток растений, способных к стресс-индукции, не выяснено. Для ретротранспозонов способность к стресс-активации может быть преимуществом, тогда как растительной клетке придется подавить активность ретротранспозона и ответить на стресс.

Кроме того, некоторые транскрипты ретротранспозонов могут быть обнаружены также и в нормальных, нестрессовых условиях, особенно в активных тканях, таких, как эмбриональные, ткани кончиков корня и почек. Данное явление описано для широко распространенных элементов из генома ячменя *BARE-1* и *Sukkula* (Manninen, Schulman, 1993; Kalendar *et al*., 2004).

Экспрессия транскрипционно активных ретротранспозонов растений может усиливаться под влиянием различных стресс-факторов. Элементы семейства *CIRE1* (*Ty1/copia*) транскрипционно активны в клетках корня растения (*Citrus sinensis*) и неактивны в клетках листьев (Rico-Cabanas, Martinez-Izquierdo, 2007). Обработка растения бромистым жасмонатом (MeJA-Methyl jasmonate – гормон роста и развития растений) или нафталин ацетиловой кислотой (NAA – Naphthalene acetic acid) увеличивает уровень транскрипции *CIRE1* в листьях. Высокий уровень транскрипции элементов *CIRE1* в клетках тканей корня, вероятно, связан с высоким содержанием фитогормонов (ауксина) или постоянным повреждением клеток, связанным с ростом корня, что не характерно для тканей листа (Rico-Cabanas, Martinez-Izquierdo, 2007). Изменение экспрессии в ответ на обработку NAA, вероятнее всего, связано с тем, что NAA принимает участие в передаче сигналов в клетке во время ответа на стресс. Одинаковое изменение транскрипционной активности *CIRE1*-элементов на различные внешние воздействия свидетельствует о том, что *trans*-факторы в промоторном районе данных элементов одинаково реагируют на различные стимулы (Rico-Cabanas, Martinez-Izquierdo, 2007). Экспрессия *FaRE1 Ty1/copia*-ретротранспозона из генома *Fragaria spp.* в тканях листа также активируется под действием экзогенных фитогормонов (He *et al*., 2010). При изучении активации транспозиции другого активного *Ty1/copia*-ретротранспозона *OARE-1* в геноме овса под действием абиотических факторов паттерн изменения экспрессии был сходен с паттерном гена PAL (phenylalanin ammonia lyase). Кроме того, *OARE-1* активируется в результате инфицирования грибком *Puccinia coronata* (Kimura *et al*., 2001). Показано, что на экспрессию ретротранспозона *Reme1* (*Ty1/copia* из генома дыни *Cucumis melo*) оказывает влияние только ультрафиолетовое излучение. Изменения экспрессии генов домашнего хозяйства *Cucumis melo* под влиянием УФ излучения не наблюдалось (Ramallo *et al*., 2008).

Наравне с активными ретротранспозонами из суперсемейства *Ty1/copia* в геномах растений описаны и некоторые транскрипционно активные *Ty3/gypsy*-ретроэлементы. В геноме *Lotus japonicus* обнаружено семейство транскрипционно активных ретротранспозонов *LORE1* (*Ty3/gypsy*). Анализ экспрессии показал активность *LORE1* во всех изученных тканях растения (Madsen *et al*., 2005). Элемент *RIRE9* из

генома риса (*Oryza sativa* L.) транскрипционно активен в тканях листа и стебля (Li *et al*., 2000). Транскрипционно активные элементы *Beetle1* и *Beetle2* из генома дикой свеклы *Beta vulgaris* содержат интактную кодирующую область, но обладают высокой степенью метилирования. Детектируемая экспрессия *Beetle*-элементов, по-видимому, является следствием активности нескольких элементов с отличным паттерном метилирования, избежавших инактивации (Weber, Schmidt, 2009). В геноме некоторых линий зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* показан высокий уровень экспрессии уникального *Ty3/gypsy*-ретротранспозона *REM1* (Perez-Alegre *et al*., 2005). Транскрипционно активные LTR-ретротранспозоны играют важную роль в эволюции генов и геномов.

Классификация и систематика растений и водорослей

Предполагают, что в целом на Земле существует более 350 тыс. видов растений. По состоянию на начало 2010 г. по данным Международного союза охраны природы (IUCN) было описано около 320 тыс. видов растений, из них около 280 тыс. видов цветковых, 1000 видов голосеменных, около 16 тыс. мохообразных и около 12 тыс. видов высших споровых растений (плауновидные, папоротникообразные, хвощевидные) (Mougeot *et al*., 2009). Филогенетическое древо растений и водорослей представлено на рис. 14.

К царству растений относятся два отдела: Chlorophyta (Зеленые водоросли) и Streptophyta (Высшие растения). Харовые водоросли (Charophyta), ранее выделявшиеся в самостоятельный отдел, в настоящее время на основе результатов молекулярно-генетических, биохимических и ультраструктурных исследований введены в отдел Streptophyta. Зеленые водоросли (Chlorophyta) являются самой обширной группой водорослей. По приблизительным подсчетам сюда входит около 500 родов и от 13 тыс. до 20 тыс. видов.

Растения образуют группу наземных или высших растений (Streptophyta). Эта группа ключает в себя сосудистые растения: 1) высшие споровые растения – Псилотовидные (Psilotophyta), Папоротниковидные (Pteridophyta), Плауновидные (Lycopodiophyta), Ужовниковидные (Ophioglossophyta), Хвощевидные (Equisetophyta); 2) семенные растения. Кроме этого, к этой группе относятся и близкие родственники сосудистых растений – Моховидные растения (Bryophyta), Антоцеротовые мхи (Anthocerotophyta) и Печеночники (Marchantiophyta) (Raven *et al*., 2005). Группа семенных растений является самой молодой и распространенной среди всех растений и включает в себя Семенные папоротники (Pteridospermatophyta), Гинкговидные (Ginkgophyta), Гнетовидные (Gnetophyta), Хвойные (Pinophyta), Саговниковидные (Cycadophyta) и Покрытосеменные (Magnoliophyta).

Рис. 14. Филогенетическое древо растений и водорослей, и распределение основных групп LTR-ретротранспозонов по растительным таксонам.

В геномах растений присутствует огромное количество семейств LTR-ретротранспозонов. Так, в геноме маниоки (*Manihot esculenta*) обнаружено 59 семейств *Ty1/copia* и 26 семейств *Ty3/gypsy*-элементов (Gbadegesin *et al*., 2008), а в геноме сои – 353 семейства *Ty1/copia* и 157 семейств *Ty3/gypsy*-ретротранспозонов (Du *et al*., 2010), но лишь некоторые из них имеют значительное количество копий в геномах. Известно, что более 85 % LTR-ретротранспозонов из генома кукурузы составляют представители 5 основных семейств (SanMiguel *et al*., 1996). В геноме дикого риса *Oryza australiensis* за последние 3 млн лет накопилось более 90 тыс. копий LTR-ретротранспозонов, относящихся всего к трем семействам, что привело к удвоению размера генома (Piegu *et al*., 2006). *Ty1/copia*-элементы *BARE-1* из генома ячменя и *Opie-1* и *Huck2* из генома кукурузы представлены 20–200 тыс. копий (SanMiguel *et al*., 1996; Vicient *et al*., 1999). *Ty3/gypsy*-элемент *Cinful-1* представлен 20 тыс. копий в геноме кукурузы (Sanz-Alferez *et al*., 2003).

LTR-ретротранспозоны покрытосеменных растений

Ретротранспозоны группы *Ty1/copia* распространены в геномах представителей практически всех групп царства растений: одноклеточных водорослей, мохообразных, голосеменных и покрытосеменных (Voytas *et al*., 1990). Представители суперсемейства *Ty3/gypsy* широко представлены в геномах голосеменных и покрытосеменных растений и некоторых зеленых водорослей (Sentry, Smyth, 1989; Suoniemi *et al*., 1998; Thomson *et al*., 1998; Kossack, Kinlaw, 1999; Kumekawa *et al*., 1999). В случае видов с большими геномами, таких, как кукуруза (*Z. mays*), ячмень (*Hordeum vulgare*) и пшеница (*Triticum aestivum*), LTR-ретротранспозоны составляют более 70–80 % от их геномов (SanMiguel *et al*., 1996; Vicient *et al*., 1999; Wicker *et al*., 2001; Bruggmann *et al*., 2006). В геномах видов с относительно маленьким размером генома, например *Arabidopsis thaliana*, на ретротранспозоны приходится всего 4–8 % генома (Kumar, Bennetzen, 1999).

Первые LTR-ретротранспозоны растений были обнаружены при изучении полиморфизмов (Voytas, Ausubel, 1988). Последующие попытки изучения интересующих генов через создание малых геномных библиотек также привели к случайному описанию LTR-ретротранспозонов (Lee *et al*., 1990; Manninen, Schulman, 1993; Hu *et al*., 1995; Li *et al*., 2000; van Leeuwen *et al*., 2003). Некоторые семейства были открыты при изучении повторяющихся последовательностей в гетерохроматиновых или центромерных районах (Pelissier *et al*., 1995; Nakajima *et al*., 1996; Ananiev *et al*., 1998; Presting *et al*., 1998; Linares *et al*., 1999, 2001; Francki, 2001; Kentner *et al*., 2003). В дальнейшем активное развитие проектов по секвенированию геномов открыло доступ к большим геномным последовательностям растений и способствовало описанию новых LTR-ретротранспозонов. Так было в случае видов растений, представляющих сельскохозяйственный интерес, таких, как ячмень (Panstruga *et al*., 1998; Wei *et al*., 1999; Shirasu *et al*., 2000; Rostoks *et al*., 2002), кукуруза (SanMiguel *et al*., 1996; Fu, Dooner, 2002), рис (Llaca *et al*., 1998; Tarchini *et al*., 2000), пшеница (Wicker *et al*., 2001; SanMiguel *et al*., 2002) и томат (Mao *et al*., 2001). Большая часть информации о разнообразии, распространении и эволюции LTR-ретротранспозонов ограничивается видами, имеющими сельскохозяйственную значимость, и модельными объектами, такими, как *Arabidopsis thaliana*. На данный момент в геномах более 20 видов покрытосеменных растений описаны тысячи семейств LTR-ретротранспозонов, например, только в геноме сои (*G. max*) обнаружено 510 семейств (Du *et al*., 2010) (рис. 14).

LTR-ретротранспозоны голосеменных растений

Голосеменные представляют собой важный компонент растительного мира и являются доминирующим типом растительности во многих экосистемах. Существенный прогресс достигнут в понимании структуры и организации геномов голосеменных, однако наши знания о голосеменных гораздо менее полные, чем для покрытосеменных растений, грибов и многих групп животных. Большинство голосеменных имеют относительно большие размеры геномов, более 20 000 млн п.о. в случае семейства Pinaceae (Murray, 1998) по сравнению с геномом

Arabidopsis thaliana (130–140 млн. п.о.) или 5500 млн п.о. – с геномом ячменя (*H. vulgare*). Полиплоидия играет незначительную роль в эволюции голосеменных, и число хромосом, как правило, составляет 2*n* =18–24, но у некоторых видов – 14 хромосом (Khoshoo, 1959, 1961). Географическое распространение группы хвойных растений неравномерно: некоторые семейства, такие, как Кипарисовые (Cupressaceae), представлены в экосистемах обоих полушарий, другие, такие, как Pinaceae и Taxaceae, присутствуют только в Северном, а Araucariaceae и Podocarpaceae – только в Южном полушарии. В группе голосеменных выделяют следующие отделы: Саговниковидные (Cycadophyta), Гнетовидные (Gnetophyta), Гинкговидные (Ginkgophyta) и Хвойные, или Сосновые (Pinophyta) (Friesen *et al*., 2001).

Ty1/copia- и *Ty3/gypsy*-ретротранспозоны являются важными компонентами геномов голосеменных и представлены большим количеством семейств, многие из которых близки к ретротранспозонам других групп растений (Kamm *et al*., 1996). Представители отдела Хвойные доминируют во многих наземных экосистемах и представляют коммерческий интерес, поэтому большинство знаний накоплено о LTR-ретротротранспозонах именно этого отдела голосеменных. В геномах представителей рода *Pinus* (*Pinus elliottii*, *Pinus palustris*, *Pinus echinata*, *Pinus caribaea*, *Pinus oocarpa*, *Pinus banksiana*, *Pinus massoniana*, *Pinus resinosa*) широко распространено семейство *TPE1* (*Ty1/copia*). *TPE1*-элементы также широко представлены в геномах елей (*Picea strobus*, *Picea abies*, *Picea glauca*), но в геномах кипариса *Taxodium distichum* и гинкго *Ginkgo biloba* представлены небольшим количеством копий. Представители данного семейства содержат различные мутации: стоп-кодоны, сдвиги рамок считывания и являются неактивными (Kamm *et al*., 1996). До недавнего времени не много было известно о *Ty3/gypsy*-ретротранспозонах из геномов голосеменных. В геноме *Pinus radiata* обнаружен единственный полный *Ty3/gypsy*-элемент *IFG7*, а в геноме *Pinus pinaster* первый полный *Ty3/gypsy*-элемент *PpRT1* (Kossack, Kinlaw, 1999; Rocheta *et al*., 2007). Элемент *PpRT1* имеет длину 5,966 п.о. и структуру, типичную для *Ty3/gypsy*-ретротранспозонов.

Сравнение нуклеотидных последовательностей элементов *IFG7* и *PpRT1* показало высокое сходство (88 %), а последовательности интегразы и обратной транскриптазы полностью идентичны (Rocheta *et al*., 2007). Однако последовательности 5′LTR и 3′LTR элемента *PpRT1* отличаются, что является результатом накопленных мутаций. Число копий элементов *IFG7* и *PpRT1* различается. *IFG7* представлен большим числом копий в геноме *P. radiata*, а *PpRT1* присутствует в геноме *P. pinaster* в единственной копии (Kossack, Kinlaw, 1999; Rocheta *et al*., 2007). В геноме *Pinus taeda* распространены специфические для хвойных LTR-ретротранспозоны: *PtIFG7* (близкий к *IFG7*), *PtGypsyX1* (*Ty3/gypsy*-элемент, близкий к *PGGYPSYX1* (*Spcl*)-ретроэлементу из генома ели *P. glauca*) и *PtCopiaX1*, элемент, близкий к *PGCOPIAX1* (*Spdl*)-ретроэлементу из генома ели *P. glauca* (L'Homme *et al*., 2000; Rocheta *et al*., 2007). Семейство *IFG7*-элементов распространено только в геномах рода *Pinus*, тогда как *PtCopiaX1* представлено и в геномах рода *Picea*. Высокое сходство последовательностей *PGCOPIAX1* из геномов разных родов позволяет предположить наличие *PGCOPIAX1* у общего предка двух родов. Так как группы *Pinus* и *Picea* дивергировали около 140 млн лет назад, то данные *Ty1/copia*-like элементы достаточно древние (Millar, 1998). Предковая последовательность элементов *PtGypsyX1* и *PGGYPSYX1*, по-видимому, встраивалась множество раз в геномы хвойных в процессе их эволюции. Только два LTR-ретротранспозона, специфичных для хвойных (*PtGypsyX1* и *PtCopiaX1*), возможно, остались активными спустя 140 млн лет. Представители семейства *IFG7 Ty3/gypsy*-like элементов, по-видимому, остаются активными в геномах обоих подродов *Pinus*, дивергировавших примерно 110 млн лет назад (Kossack, Kinlaw, 1999; Eckert, Hall, 2006).

Распределение различных LTR-ретротранспозонов среди представителей голосеменных широко варьирует. Так, распространение *Tpa43* (*Ty1/copia*) ограничено только хвойными растениями рода *Picea*, где он представлен большим количеством копий. *Tpa17* и *Tpa35* присутствуют в геномах представителей рода *Picea*, но практически не обнаружены в геномах *Pinus* (Stuart-Rogers, Flavell, 2001). Другие ретротранспозоны

распространены в геномах многих эволюционно удаленных групп. Так, гомологи *Ty1/copia*-элемента *Tpa29* из *Picea* обнаружены в геномах родов *Abies* и *Ginkgo*, а элемент *Tpa27* в геномах *Picea*, *Abies*, *Ginkgo*, *Pinus*, *Cedrus* и *Larix* (Stuart-Rogers, Flavell, 2001). Уровень сходства последовательностей *Ty1/copia*-элементов из различных видов голосеменных – самый высокий из ранее детектированных для различных групп растений (Flavell *et al*., 1992a, b; Voytas *et al*., 1992; Vanderwiel *et al*., 1993; Matsuoka, Tsunewaki, 1997; Kumar, Bennetzen, 1999). В случае растений кросс-гибридизация различных ретроэлементов из близких родов при Саузерн-блот-анализе – не редкость, например, между ретроэлементами покрытосеменных растений Triticeae и Poaceae, которые разделились около 60 млн лет назад (Matsuoka, Tsunewaki, 1997). Но в случае ретротэлементов голосеменных речь идет о перекрестной гибридизации элементов из разных порядков, разделенных сотнями миллионов лет. Так, элементы *Tpa28* и *Tpa13* из геномов хвойных имеют высокую гомологию с последовательностями ретроэлементов из геномов *Ginkgo* (Stuart-Rogers, Flavell, 2001). Современных представителей данных групп разделяет как минимум 260 млн лет эволюции (Stewart, Rothwell, 1993).

Высокое сходство последовательностей *Ty1/copia*-элементов голосеменных, возможно, является результатом горизонтального переноса. По данной теории *Tpa28* и другие элементы с высокой гомологией были перенесены горизонтально в один или оба рода *Ginkgo* или *Picea* гораздо позднее, чем произошла их дивергенция, но, тем не менее, миллионы лет назад (Stuart-Rogers, Flavell, 2001). В дальнейшем количество их копий увеличилось, в последовательностях накопились мутации и к настоящему времени они представлены в геномах большим числом дефектных копий. Однако сигнал гибридизации *Ty1/copia*-элементов коррелирует с эволюционным расстоянием между исследуемыми группами (Stuart-Rogers, Flavell, 2001). Вследствие чего возможность влияния горизонтального переноса на эволюцию *Ty1/copia*-элементов голосеменных не исключается полностью, но высокое сходство последовательностей может быть объяснено и вертикальным наследованием (Stuart-Rogers, Flavell, 2001).

Важным является вопрос о том, почему именно элементы голосеменных, а не покрытосеменных растений имеют столь высокое сходство, хотя никакой значительной разницы между изменениями в ядерных генах этих групп не наблюдается (Qiu *et al*., 1999). Привлекательной моделью, объясняющей это различие, является модель, в которой более высокая частота встречаемости близких гомологов ретротранспозонов объясняется не как результат разницы в накоплении мутаций, а как результат исчезновения элементов из геномов (Stuart-Rogers, Flavell, 2001). Исчезновение/утрата мобильных элементов происходит гораздо более активно у покрытосеменных, чем голосеменных. Большое различие в размерах геномов характерно для покрытосеменных, кроме того, такие изменения могут произойти за несколько миллионов лет, в то время как геномы голосеменных являются более стабильными (SanMiguel *et al*., 1998). Например, внутри рода *Pinus*, возраст которого составляет около 200 млн лет, все виды диплоидны, имеют одинаковое количество хромосом и близкий размер генома (Wakaniya *et al*., 1993). В больших геномах с постоянным размером может сохраняться большое количество копий различных ретротранспозонов, но небольшой размер генома накладывает ограничение на количество копий ретротранспозонов, создает конкуренцию между различными их группами и может привести к элиминации ретротранспозонов с низким числом копий (Charlesworth *et al*., 1994). Таким образом, если предки покрытосеменных имели небольшой размер генома, то из них могли быть элиминированы многие виды предковых ретротранспозонов, которые при этом сохранились в более стабильных геномах голосеменных (Stuart-Rogers, Flavell, 2001).

В целом геномы голосеменных растений отличаются от геномов покрытосеменных более древним происхождением, а также распространением, разнообразием и степенью дивергенции LTR-ретротранспозонов по сравнению с более молодыми элементами покрытосеменых.

LTR-ретротранспозоны высших несеменных растений

В рамках данного раздела рассматриваются LTR-ретротранспозоны следующих

групп споровых растений: Плауновидные (Lycopodiophyta), Моховидные (Bryophyta), Хвощевидные (Equisetophyta) и Папоротниковидные (Polypodiyphyta).

На данный момент существует весьма ограниченная информация о разнообразии и распространении хромодомен-содержащих *Ty3/gypsy* LTR-ретротранспозонов несеменных растений, таких, как мохообразные, плауны и папоротники (Kumekawa *et al*., 1999;. Suoniemi *et al*., 1998).

Среди представителей Моховидных хромодомен-содержащие *Gypsy* LTR-ретротранспозоны исследованы в геноме модельного вида *Physcomitrella patens* и некоторых других видов мхов. В геномах *Bryophyta* выявлены 4 специфичные для мхов группы хромодомен-содержащих *Gypsy* LTR-ретротранспозонов: A, B, C, D (рис. 15) (Novikova *et al*., 2008). Большинство ретротранспозонов мхов, в том числе и *PpatensLTRs1*, *PpatensLTRs2*, *PpatensLTRs3*, *PpatensLTRs4* из генома *P. patens*, принадлежат к группе A. Группа B обнаружена только у мха *Plagiothecium laetum*, а группа C представлена ретротранспозонами из *Funaria hygrometrica*. Наконец, ретротранспозоны из *Tetraphis pellucida* и *Vesicularia dubyana* сформировали отдельную группу D (*Galahad*) (Novikova *et al*., 2010).

Ретроэлементы, выявленные в геномах мхов, эволюционно далеки от хромодомен-содержащих *Gypsy* LTR-ретротранспозонов других групп растений. *PpatensLTRs* и другие элементы группы A более близки к грибным *Tcn1*-ретротранспозонам, чем к группам *Galadriel*, *Reina*, *CRM* и *Tekay* (хромодомен содержащих *Gypsy* LTR-ретротранспозонов), описанных для растений (Novikova *et al*., 2010). Возможно, данный факт является следствием горизонтального переноса. Согласно другой гипотезе, вертикальная эволюция привела к такому распределению ретротранспозонов во мхах, поскольку эволюционная динамика мобильных элементов может значительно различаться даже у близкородственных таксонов. Как результат очень часто филогенетические связи, построенные на основе дивергенции мобильных элементов, не совпадают с филогенией видов, в которых эти мобильные элементы находятся (Novikova *et al*., 2010). Более того, в геноме *P. patens* были проведены исследования, которые показали возможность того, что многие так называемые «сохраненные гены» достались мхам от их общих с семенными растениями предков, в то время как в последних они успели потеряться (Reski, Frank, 2005; Rensing *et al.*, 2005; Stenoien, 2007). Высока вероятность того, что мхи просто сохранили эти ретротранспозоны.

Pteridium aquilinum (орляк) является самым распространенным папоротником, в его геноме обнаружено 183 *Ty1/copia*- и 195 *Ty3/gypsy*-элементов, что составляет 0,07 и 0,09 % генома соответственно, а это больше, чем количество мобильных элементов всех остальных групп (Der *et al*., 2011). Однако данные элементы мало описаны, часть из *Ty3/gypsy*-элементов, как известно, формируют группу, являющуюся сестринской к группе C мхов (Novikova *et al*., 2010). В геноме папоротника *Pteris cretica* были исследованы *Ty1/copia*-элементы и было показано, что их количество значительно ниже, чем в случае покрытосеменных растений, что, вероятнее всего, связано с полиплоидизацией последних (Brandes *et al*., 1997).

Распространение хромодомен-содержащих *Gypsy* LTR-ретротранспозонов группы Папоротниковидные было более подробно исследовано в геномах представителей трех классов: Psilotopsida, Polypodiopsida и Equisetopsida, а Плауновидные – в геномах представителей двух классов: Isoetopsida и Lycopodiopsida (Novikova *et al*., 2010). Ретротранспозоны данных групп обладают внутривидовой гомогенностью и межвидовой гетерогенностью. Для большинства семенных растений с большими геномами известна высокая внутривидовая гетерогенность LTR-ретротранспозонов. Папоротниковидные и Плауновидные имеют достаточно большие геномы и большое количество хромосом, например, у *Ophioglossum petiolatum* их число достигает 1 тыс. Редким исключением в этом смысле являются представители рода *Selaginella*, которые имеют самый маленький геном среди всех сосудистых растений. С другой стороны, есть мнение, что уникальные характеристики геномов папоротников, а именно размер и количество хромосом, появились в связи с диплоидизацией их предков. Поэтому разница в разнообразии мобильных элементов и их распределении в геномах папоротников и других групп растений ожидаема.

Несмотря на небольшое внутривидовое разнообразие, филогенетический анализ подтвер-

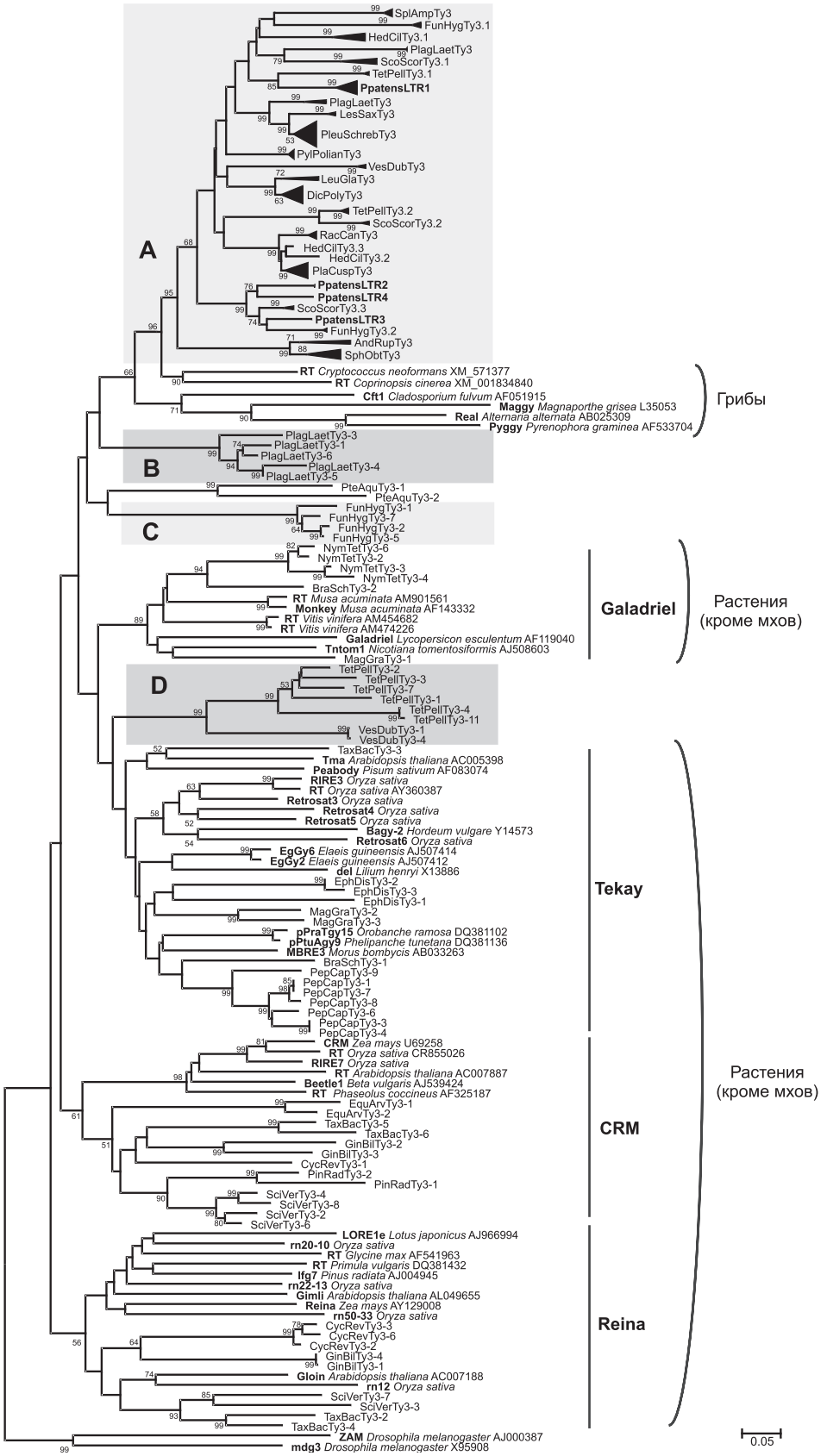


Рис. 15. Филогенетическое дерево *Ty3/gypsy*-ретротранспозонов из геномов растений (Novikova *et al*., 2008).

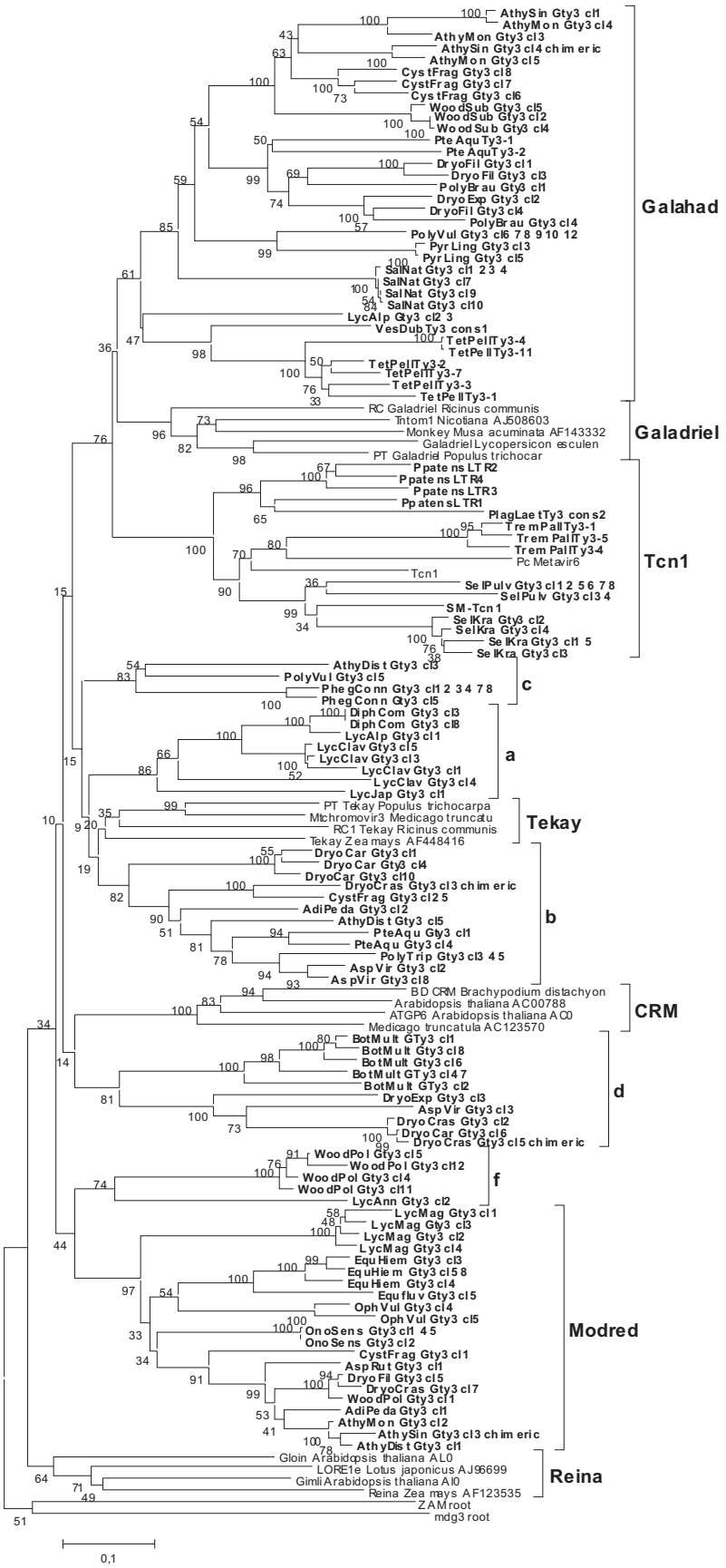


Рис. 16. Филогенетическое дерево *Ty3/gypsy*-ретротранспозонов из геномов растений (Novikova *et al*., 2010).

дил высокую межвидовую гетерогенность ретротранспозонов (рис. 16). В геномах Папоротниковидных и Плауновидных выделено 4 большие группы. В первую группу входят элементы из генома *Selaginella moellendorffii*, относящиеся к грибным элементам (группа *Tcn1*-подобных элементов), объединенные с хромовирусами из *P. patens* и некоторых других мхов. В эту группу также входят элементы, выделенные из геномов других представителей *Selaginella* (*Selaginella kraussiana* и *Selaginella pulvinata*) (Novikova *et al.*, 2010).

Вторая группа, *Galahad,* включает в себя различные хромовирусы Папоротниковидных, а также хромовирус из плауна *Lycopodium alpinum* и элементы мхов из группы D. Возможно, что эта группа является сестринской с группой *Galadriel* хромовирусов высших растений и является одной из старейших групп широко распространенных хромовирусов растений (Novikova *et al*., 2010). Поскольку элементы из *Galahad* были найдены во всех несеменных высших растениях включая мхи, то примерный возраст этой группы составляет 400–700 млн лет (время дивергенции мхов от сосудистых растений) (Hedges, 2002).

Третья группа сформирована элементами из Папоротниковидных и Плауновидных. Отношения между элементами внутри группы остаются, в основном, неясными, за исключением нескольких линий. Одна из этих линий – «a» присутствует в плаунах из семейства Lycopodiacea: *Lycopodium clavatum*, *Lycopodium japonicum* и *Diphasiastrum complanatum*. Другие линии, видимо, присутствуют в геномах папоротников долгое время, поскольку включают в себя представителей различных семейств (линия «b»): Dennstaedtiaceae (*P. aquilinum*), Pteridaceae (*Adiantum pedatum*), Aspleniaceae (*Asplenium viride*), Woodsiaceae (*Athyrium distentifolium* и *Cystopteris fragilis*), Dryopteridaceae (*Dryopteris crassirhizoma* и *Polystichum tripteron*) и плаунов *Isoetes histrix* (Isoetaceae) и *D. complanatum* (Lycopodiaceae). Элементы из трех видов: *Phegopteris connectilis*, *Polypodium vulgare* и *A. distentifolium*, вероятно, отдаленно родственны с другими специфичными для папоротников ретроэлементами (линия «c»). И, наконец, *HupSquGty3-1*-элемент из *Huperzia squarrosa* с высокой достоверностью не входит ни в одну из известных групп (Novikova *et al*., 2010).

Последняя наблюдаемая группа (*Modred*) разделена на три отдельные подгруппы. Первая из них сформирована ретротранспозонами из Ophioglossaceae (*Botrychium multifidum*), Aspleniaceae (*A. viride*) и Dryopteridaceae (*Dryopteris expansa*, *Dryopteris carthusiana* и *Dryopteris crassirhizoma*). Вторая была представлена ретроэлементами из *Lycopodium annotinum* (Lycopodiaceae) и *Woodsia polystichoides* (Woodsiaceae). Последняя монофилетичная подгруппа, *Mordred*, оказалась самой большой и содержала ретротранспозоны представителей папоротников из семейств Ophioglossaceae (*Ophioglossum vulgatum* и *B. multifidum*), Pteridaceae (*A. pedatum*), Woodsiaceae (*Athyrium sinense*, *A. distentifolium*, *A. monomachii*, *C. fragilis* и *W. polystichoides*), Onocleaceae (*Onoclea sensibilis*) и Dryopteridaceae (*Dryopteris filixmas* и *D. crassirhizoma*); хвощей *Equisetum hiemale* и *Equisetum fluviatile* (Equisetaceae); плауна *Lycopodium magellanicum* (Lycopodiaceae) (рис. 16).

В литературе присутствует информация о других *Ty3/gypsy*-ретротранспозонах, однако не выяснены их филогенетические отношения с другими группами (Nozue *et al*., 1997).

Информация о распространении *Ty1/copia* гораздо более ограниченна. Эти элементы обнаружены в геномах плауна *Selaginella apoda*, папоротников *Vittaria appalachiana*, *P. cretica*, но не были детально описаны, и на данный момент не установлено их отношение к той или иной филогенетической группе LTR-ретротранспозонов (Docking *et al*., 2006; Brandes *et al*., 1997).

Горизонтальный перенос

Горизонтальный перенос – это процесс, благодаря которому может осуществляться перемещение генов у репродуктивно изолированных видов. Большинство примеров горизонтального переноса генов эукариот так или иначе связано с мобильными генетическими элементами (Kidwell, 1992; Robertson, MacLeod, 1993; Hartl *et al*., 1997; Silva, Kidwell, 2004). Чаще всего горизонтальный перенос привлекают в качестве объяснения существования очень близких последовательностей у эволюционно далеких видов (Shields, Sharp, 1989; Kidwell, 1992; Powell, Gleason, 1996; Clark, Kidwell, 1997). Способность мобильных элементов

перемещаться и менять свою локализацию в геноме делает мобильные элементы одними из основных объектов для изучения явления горизонтального переноса. Примерами горизонтального переноса между различными видами животных являются мобильные элементы *P* (Silva, Kidwell, 2000), *mariner* (Robertson, Lamp, 1995), *copia* (Jordan *et al*., 1999) и другие (Silva *et al*., 2004).

Среди ретротранспозонов описано несколько примеров горизонтального переноса между близкородственными видами. Известны случаи горизонтального переноса LTR-ретротранспозонов *Ty1/copia* и *Ty3/gypsy* между видами рода *Drosophila* (Anxolabehere *et al*., 1988; Kidwell, 1992; Hartl *et al*., 1997; Jordan *et al.*, 1999; Silva, Kidwell, 2004). Некоторые LTR-ретротранспозоны способны формировать вирусоподобные частицы с инфекционной активностью (Lecher *et al*., 1997; Chalvet *et al*., 1999). Нет ничего удивительного в том, что в таком виде LTR-ретротранспозоны могут переноситься между близкородственными видами (Malik, Eickbush, 2001). Несмотря на то что случаи горизонтального переноса LTR-ретротранспозонов между видами растений были обнаружены, только несколько из них подробно описаны.

Один из наиболее подробно описанных случаев горизонтального переноса LTR-ретротранспозонов – перенос элементов семейства *RIRE1* между видами рода *Oryza* в течение короткого периода времени (Roulin *et al*., 2008). В исследованиях было выявлено как минимум 7 случаев горизонтального переноса элементов данного семейства на основании высокого сходства последовательностей из репродуктивно изолированных диких видов риса. Механизм горизонтального переноса *RIRE1* (*Ty3/gypsy*)-элементов не известен, но наиболее привлекательной является гипотеза переноса ретротранспозонов через общих патогенов (Roulin *et al*., 2008). *Rider* (*Ty1/copia*) – транскрипционно активный элемент, по-видимому, был перенесен горизонтально в геном томата из геномов представителей рода *Arabidopsis* (Cheng *et al*., 2009). Элемент *Rider* не был обнаружен в геномах других представителей *Lycopersicon*, таких, как картофель, табак и кофе, что может быть интерпретировано как результат утраты *Rider* в этих видах в рамках вертикального наследования. Данный элемент из генома томата показал высокое сходство с элементами *Rider*-like 1 и *Rider*-like 2 арабидопсиса (Cheng *et al*., 2009).

Возможные механизмы горизонтального переноса мобильных элементов. Существует несколько гипотез, объясняющих горизонтальный перенос мобильных элементов. Наиболее просто можно объяснять горизонтальный перенос элементов группы LTR-ретротранспозонов, так как некоторые из них (*Ty1/copia*- и *Ty3/gypsy*-элементы) способны формировать вирусоподобные частицы (Syomin *et al*., 1993; Lecher *et al*., 1997). Некоторые *Ty3/gypsy*-элементы могут переноситься как межклеточные вируспоподобные частицы без помощи дополнительного вектора и обладают определенной инфекционностью за счет экспрессии гена *env* (показано на примерах горизонтального переноса между видами животных) (Alberola, de Frutos, 1996; Terzian *et al*., 2000; Vazquez-Manrique *et al.*, 2000; Heredia *et al*., 2004).

Другая гипотеза заключается в прямой передаче ДНК между двумя растениями, находящимися в близком контакте. Некоторые случаи участия паразитических растений в горизонтальном переносе ДНК подтверждают, что горизонтальный перенос от растения к растению напрямую возможен: горизонтальный перенос митохондриального гена *atp1* между паразитическими растениями групп Orobanchaceae и Convolvulaceae и растениями рода *Plantago* (Mower *et al*., 2004); горизонтальный перенос ядерных генов между паразитическим видом растений *Striga hermonthica* и видами семейства Poaceae (Yoshida *et al*., 2010). Данная гипотеза объясняет большое количество фактов горизонтального переноса митохондриальных генов между наземными растениями и *Amborella trichopoda* (Bergthorsson *et al*., 2004). Таким образом, можно объяснить горизонтальный перенос любых последовательностей ДНК, в том числе и мобильных элементов.

Согласно третьей гипотезе, межвидовые гибриды могут служить посредником в передаче генетической информации между видами (Silva, Kidwell, 2000; de Almeida,Carareto, 2005).

Однако эти гипотезы не могут объяснить описанные ранее случаи горизонтального переноса LTR-ретротранспозонов семейства *RIRE1*

между видами рода *Oryza* (Roulin *et al*., 2008). Высокая частота горизонтальных переносов (в горизонтальный перенос вовлечено 7 видов) противоречит гипотезе о передаче напрямую от растения к растению, так как данные виды имеют разный ареал обитания. Также невозможно объяснить данное явление как результат семи независимых межвидовых гибридизаций. Еще одна гипотеза предполагает участие вектора в горизонтальном переносе между видами. У животных предполагаемыми векторами, вовлеченными в горизонтальный перенос, могут являться бактерии, грибы или любые внутриклеточные паразиты (Kondo *et al*., 2002; Shen *et al*., 2003). Вирусы могут выступать в качестве векторов горизонтального переноса у животных. Так, было показано, что *SINE*-элемент может переноситься из генома рептилии в геном вируса (poxvirus) и, возможно, далее – в геном млекопитающих (Piskurek, Okada, 2007). В случае горизонтального переноса мобильных элементов растений на данный момент не выявлено векторов, но предполагается, что горизонтальный перенос может происходить аналогично. Более того, некоторые паразитические насекомые могут быть потенциальными векторами, но данная гипотеза требует экспериментальных подтверждений (Fortune *et al*., 2008).

Работа была поддержана Государственным контрактом Министерства образования и науки Российской Федерации (№ П1044 от 31.05.2010).

Литература

Васильева Л.А., Выхристюк О.В., Антоненко О.В., Захаров И.К. Индукция транспозиций мобильных генетических элементов в геноме *Drosophila melanogaster* различными стрессовыми факторами // Информ. вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 3/4. С. 662–671.

Чересиз С.В., Юрченко Н.Н., Иванников А.В., Захаров И.К. Мобильные элементы и стресс // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 1/2. С. 217–242.

Adamson C.S., Jones I.M. The molecular basis of HIV capsid assembly – five years of progress // Rev. Med. Virol. 2004. V. 14. P. 107–121.

Aeby P., Spicher A., de Chastonay Y. *et al*. Structure and genomic organization of proretrovirus-like elements partially eliminated from the somatic genome of *Ascaris lumbricoides* // EMBO J. 1986. V. 5. P. 3353–3360.

Alberola T.M., de Frutos R. Molecular structure of a gypsy element of *Drosophila subobscura* (gypsyDs) constituting a degenerate form of insect retroviruses // Nucl. Acids Res. 1996. V. 24. P. 914–923.

Ananiev E.V., Phillips R.L., Rines H.W. Chromosome specific molecular organization of maize (*Zea mays* L.) centromeric regions // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 13073–13078.

Anxolabehere D., Kidwell M.G., Periquet G. Molecular characteristics of diverse populations are consistent with the hypothesis of a recent invasion of *Drosophila melanogaster* by mobile *P* elements // Mol. Biol. Evol. 1988. V. 5. P. 252–269.

Beguiristain T., Grandbastien M.A., Puigdomènech P., Casacuberta J.M. Three *Tnt1* subfamilies show different stress-associated patterns of expression in tobacco. Consequences for retrotransposon control and evolution in plants // Plant Physiol. 2001. V. 127. P. 212–221.

Bennetzen J.L. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution // Plant Mol. Biol. 2000. V. 42. P. 251–269.

Bennetzen J.L., Ma J., Devos K.M. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants // Ann. Bot. 2005. V. 95. P. 127–132.

Bergthorsson U., Richardson A.O., Young G.J. *et al*. Massive horizontal transfer of mitochondrial genes from diverse land plant donors to the basal angiosperm Amborella // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 17747–17752.

Boeke J.D., Corces V.G. Transcription and reverse-transcription of retrotransposons // Annu. Rev. Microbiol. 1989. V. 43. P. 403–434.

Boutabout M., Wilhelm M., Wilhelm F.X. DNA synthesis fidelity by the reverse transcriptase of the yeast retrotransposon Ty1 // Nucl. Acids Res. 2001. V. 29. P. 2217–2222.

Bowen N.J., McDonald J.F. Genomic analysis of *Caenorhabditis elegans* reveals ancient families of retroviral-like elements // Genome Res. 1999. V. 9. P. 924–935.

Brandes A., Heslop-Harrison J.S., Kamm A. *et al*. Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of *Ty1-copia*-like retrotransposons in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms // Plant Mol. Biol. 1997. V. 33. P. 11–21.

Briggs J.A., Simon M.N., Gross I. *et al*. The stoichiometry of GAG protein in HIV-1 // Nat. Struct. Mol. Biol. 2004. V. 11. P. 672–675.

Bruggmann R., Bharti A.K., Gundlach H. *et al*. Uneven chromosome contraction and expansion in the maize genome // Genome Res. 2006. V. 16. P. 1241–1251.

Brunel C., Marquet R., Romby P., Ehresmann C. RNA looploop interactions as dynamic functional motifs // Biochimie. 2002. V. 84. P. 925–944.

Chalvet F., Teysset L., Terzian C. *et al.* Proviral amplification of the gypsy endogenous retrovirus of *Drosophila melanogaster* involves env-independent invasion of the female germline // EMBO J. 1999. V. 18. P. 2659–2669.

Charlesworth B., Sniegowski P., Stephan W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes // Nature. 1994. V. 371. P. 215–220.

Cheng X., Zhang D., Cheng Z. *et al*. A new family of *Ty1-copia*-like retrotransposons originated in the tomato genome by a recent horizontal transfer event // Genetics. 2009. V. 181. P. 1183–1193.

Clark J.B., Kidwell M.G. A phylogenetic perspective on *P* transposable element evolution in Drosophila // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 11428–11433.

Cook J.M., Martin J., Lewin A. *et al*. Systematic screening of *Anopheles mosquito* genomes yields evidence for a major clade of *Pao*-like retrotransposons // Insect Mol. Biol. 2000. V. 9. P. 109–117.

Copeland C.S., Mann V.H., Morales M.E. *et al*. The *Sinbad* retrotransposon from the genome of the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*, and the distribution of related *Pao*-like elements // BMC Evol. Biol. 2005. V. 5. P. 20.

Cristofari G., Bampi C., Wilhelm M. *et al*. A 5′-3′ long-range interaction in *Ty1* RNA controls its reverse transcription and retrotransposition // EMBO J. 2002. V. 21. P. 4368–4379.

Darlix J.L., Gabus C., Nugeyre M.T. *et al*. *Cis* elements and *trans*-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1 // J. Mol. Biol. 1990. V. 216. P. 689–699.

de Almeida L.M., Carareto C.M. Multiple events of horizontal transfer of the *Minos* transposable element between Drosophila species // Mol. Phylogenet. Evol. 2005. V. 35. P. 583–594.

Der J.P., Barker M.S., Wickett N.J. *et al*. *De novo* characterization of the gametophyte transcriptome in bracken fern, *Pteridium aquilinum* // BMC Genomics. 2011. V. 12. P. 99.

Devos K.M., Brown J.K., Bennetzen J.L. Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in Arabidopsis // Genome Res. 2002. V. 12. P. 1075–1079.

Docking T.R., Saadé F.E., Elliott M.C., Schoen D.J. Retrotransposon sequence variation in four asexual plant species // J. Mol. Evol. 2006. V. 62. P. 375–387.

Du J., Tian Z., Bowen N.J. *et al*. Bifurcation and enhancement of autonomous-nonautonomous retrotransposon partnership through LTR Swapping in soybean // Plant Cell. 2010. V. 22. P. 48–61.

Eckert A.J., Hall B.D. Phylogeny, historical biogeography, and patterns of diversification for Pinus (Pinaceae): phylogenetic tests of fossil-based hypotheses // Mol. Phylogenet. Evol. 2006. V. 40. P. 166–182.

Eickbush T.H., Jamburuthugoda V.K. The diversity of retrotransposons and the properties of their reverse transcriptases // Virus Res. 2008. V. 134. P. 221–234.

Emberton J., Ma J., Yuan Y. *et al*. Gene enrichment in maize with hypomethylated partial restriction (HMPR) libraries // Genome Res. 2005. V. 15. P. 1441–1446.

Evans M.J., Bacharach E., Goff S.P. RNA sequences in the Moloney murine leukemia virus genome bound by the GAG precursor protein in the yeast three-hybrid system // J. Virol. 2004. V. 78. P. 7677–7684.

Feng Y.X., Moore S.P., Garfinkel D.J., Rein A. The genomic RNA in Ty1 virus-like particles is dimeric // J. Virol. 2000. V. 74. P. 10819–10821.

Flavell A.J., Dunbar E., Anderson R. *et al*. *Ty1-copia* group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants // Nucl. Acids Res. 1992a. V. 20. P. 3639–3644.

Flavell A.J., Smith D.B., Kumar A. Extreme heterogeneity of *Ty1-copia* group retrotransposons in plants // Mol. Gen. Genet. 1992b. V. 231. N 2. P. 233–242.

Fortune P.M., Roulin A., Panaud O. Horizontal transfer of transposable elements in plants // Commun. Integr. Biol. 2008. V. 1. P. 74–77.

Francki M.G. Identification of *Bilby*, a diverged centromeric *Ty1-copia* retrotransposon family from cereal rye (*Secale cereale* L.) // Genome. 2001. V. 44. P. 266–274.

Friant S., Heyman T., Bystroem A.S. *et al*. Interactions between *Ty1* retrotransposon RNA and the T and D regions of the tRNAiMet primer are required for initiation of reverse transcription *in vivo* // Mol. Cell. Biol. 1998. V. 18. P. 799–806.

Friesen N., Brandes A., Heslop-Harrison J.S. Diversity, origin, and distribution of retrotransposons (*gypsy* and *copia*) in conifers //Mol. Biol. Evol. 2001. V. 18. P. 1176–1188.

Fu H., Dooner H.K. Intraspecific violation of genetic colinearity and its implications in maize // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 9573–9578.

Gao X., Havecker E.R., Baranov P.V. *et al*. Translational recoding signals between gag and pol in diverse LTR retrotransposons // RNA. 2003. V. 9. P. 1422–1430.

Gbadegesin M.A., Wills M.A., Beeching J.R. Diversity of LTR-retrotransposons and Enhancer/Suppressor Mutator-like transposons in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) // Mol. Genet. Genomics. 2008. V. 280. P. 305–317.

Georgiev G.P. Mobile genetic elements in animal cells and their biological significance // Eur. J. Biochem. 1984. V. 145. P. 203–220.

Geyer P.K., Spana C., Corces V.G. On the molecular mechanism of *gypsy*-induced mutations at the yellow locus of *Drosophila melanogaster* // EMBO J. 1986. V. 5. P. 2657–2662.

Giedroc D.P., Theimer C.A., Nixon P.L. Structure, stability and function of RNA pseudoknots involved in stimulating ribosomal frameshifting // J. Mol. Biol. 2000. V. 298. P. 167–185.

Gorinsek B., Gubensek F., Kordis D. Evolutionary genomics of chromoviruses in eukaryotes // Mol. Biol. Evol. 2004. V. 21. P. 781–798.

Grandbastien M.A. Activation of plant retrotransposons under stress conditions // Trends in Plant Sci. 1998. V. 3. P. 181–187.

Grandbastien M.A. Retrotransposons of plants // Encyclopedia of Virology, 3rd ed. Elsevier, Oxford (UK). 2008. V. 5. P. 428–436.

Grandbastien M.A., Spielmann A., Caboche M. *Tnt1*, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics // Nature. 1989. V. 337. P. 376–380.

Hartl D.L., Lohe A.R., Lozovskaya E.R. Modern thoughts on an ancient marinere: function, evolution, regulation // Annu. Rev. Genet. 1997. V. 31. P. 337–358.

Havecker E.R., Gao X., Voytas D.F. The diversity of LTR retrotransposons // Genome Biol. 2004. V. 5. P. 225.

Havecker E.R., Gao X., Voytas D.F. The Sireviruses, a plant-specific lineage of the *Ty1/copia* retrotransposons, interact with a family of proteins related to dynein light chain 8 // Plant Physiol. 2005. V. 139. P. 857–868.

He P., Ma Y., Zhao G. *et al*. *FaRE1*: a transcriptionally active Ty1-copia retrotransposon in strawberry // J. Plant Res. 2010. V. 123. P. 707–714.

Hedges S.B. The origin and evolution of model organisms // Nat. Rev. Genet. 2002. V. 3. P. 838–849.

Heredia F., Loreto E.L., Valente V.L. Complex evolution of *gypsy* in Drosophilid species // Mol. Biol. Evol. 2004. V. 21. P. 1831–1842.

Hirochika H., Hirochika R. *Ty1-copia* group retrotransposons as ubiquitous components of plant genomes // Jpn. J. Genet. 1993. V. 68. P. 35–46.

Hirochika H., Sugimoto K., Otsuki Y. *et al*. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 7783–7788.

Hu W.S., Bowman E.H., Delviks K.A., Pathak V.K. Homologous recombination occurs in a distinct retroviral subpopulation and exhibits high negative interference // J. Virol. 1997. V. 71. P. 6028–6036.

Hu W., Das O.P., Messing J. *Zeon-1*, a member of a new maize retrotransposon family // Mol. Gen. Genet. 1995. V. 248. P. 471–480.

Hull R., Covey S.N. Retroelements: propagation and adaptation // Virus Genes. 1995. V. 11. P. 105–118.

Hull R., Harper G., Lockhart B. Viral sequences integrated into plant genomes // Trends Plant Sci. 2000. V. 5. P. 362–365.

Jaaskelainen M.J., Mykkanen A.H., Arna T. *et al*. Retrotransposon *BARE-1*: expression of encoded proteins and formation of virus-like particles in barley cells // Plant J. 1999. V. 20. P. 413–422.

Jin Y.K., Bennetzen J.L. Structure and coding properties of *Bs1*, a maize retrovirus-like transposon // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6235–6239.

Jordan I.K., Matyunina L.V., McDonald J.F. Evidence for the recent horizontal transfer of long terminal repeat retrotransposon // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 12621–12625.

Kalendar R., Tanskanen J., Immonen S. *et al*. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by *BARE-1* retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 6603–6607.

Kalendar R., Vicient C.M., Peleg O. *et al*. Large retrotransposon derivatives: abundant, conserved but non-autonomous retroelements of barley and related genomes // Genetics. 2004. V. 166. P. 1437–1450.

Kamm A., Doudrick R.L., Heslop-Harrison J.S., Schmidt T. The genomic and physical organization of *Ty1-copia*-like sequences as a component of large genomes in *Pinus elliottii* var. *elliottii* and other gymnosperms // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 2708–2713.

Kentner E.K., Arnold M.L., Wessler S.R. Characterization of high-copy-number retrotransposons from the large genomes of the Louisiana iris species and their use as molecular markers // Genetics. 2003. V. 164. P. 685–697.

Kidwell M.G. Horizontal transfer // Curr. Opin. Genet. Dev. 1992. V. 2. P. 868–873.

Kimura Y., Tosa Y., Shimada S. *et al*. *OARE-1*, a *Ty1-copia* retrotransposon in oat activated by abiotic and biotic stresses // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42. P. 1345–1354.

Khoshoo T.N. Polyploidy in gymnosperms // Evolution. 1959. V. 13. P. 24–39.

Khoshoo T.N. Chromosome numbers in gymnosperms // Silvae Genet. 1961. V. 1. P. 1–9.

Kondo N., Nikoh N., Ljichi N. *et al*. Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 4280–4285.

Kossack D.S., Kinlaw C.S. *IFG*, a *gypsy*-like retrotransposon in Pinus (Pinaceae), has an extensive history in pines // Plant Mol. Biol. 1999. V. 39. P. 417–426.

Kovalchuk A., Senam S., Mauersberger S., Barth G. *Tyl6*, a novel *Ty3/gypsy*-like retrotransposon in the genome of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica* // Yeast. 2005. V. 22. P. 979–991.

Kumar A., Bennetzen J.L. Plant retrotransposons // Annu. Rev. Genet. 1999. V. 33. P. 479–532.

Kumekawa N., Ohtsubo E., Ohtsubo H. Identification and phylogenetic analysis of *gypsy*-type retrotransposons in the plant kingdom // Genes. Genet. Syst. 1999. V. 74. P. 299–307.

Laten H.M. Phylogenetic evidence for *Ty1-copia*-like endogenous retroviruses in plant genomes // Genetica. 1999. V. 107. P. 87–93.

Laten H.M., Havecker E.R., Farmer L.M., Voytas D.F. *SIRE1*, an endogenous retrovirus family from *Glycine max*, is highly homogeneous and evolutionarily young // Mol. Biol. Evol. 2003. V. 20. P. 1222–1230.

Laten H.M., Majumdar A., Gaucher E.A. *SIRE-1*, a *copia/Ty1*-like retroelement from soybean, encodes a retroviral envelope-like protein // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 6897–6902.

Lecher P., Bucheton A., Pélisson A. Expression of the Drosophila retrovirus *gypsy* as ultrastructurally detectable particles in the ovaries of flies carrying a permissive flamenco allele // J. Gen. Virol. 1997. V. 78. P. 2379–2388.

Lee D., Ellis T.H.N., Turner L. *et al*. A *copia*-like element in *Pisum* demonstrates the uses of disperse sequences in genetic analysis // Plant Mol. Biol. 1990. V. 15. P. 707–722.

Levin H.L. A novel mechanism of self-primed reverse transcription defines a new family of retroelements // Mol. Cell. Biol. 1995. V. 15. P. 3310–3317.

Li Z.Y., Chen S.Y., Zheng X.W., Zhu L.H. Identification and chromosomal localization of a transcriptionally active retrotransposon of *Ty3-gypsy* type in rice // Genome. 2000. V. 43. P. 404–408.

Linares C., Loarce Y., Serna A., Fominaya A. Isolation and characterization of two novel retrotransposons of the *Ty1-copia* group in oat genomes // Chromosoma. 2001. V. 110. P. 115–123.

Linares C., Serna A., Fominaya A. Chromosomal organization of a sequence related to LTR-like elements of *Ty1-copia* retrotransposons in *Avena* species // Genome. 1999. V. 42. P. 706–713.

Lindauer A., Fraser D., Brüderlein M., Schmitt R. Reverse transcriptase families and a *copia*-like retrotransposon, *Osser*, in the green alga *Volvox carteri* // FEBS Lett. 1993. V. 319. P. 261–266.

Lippman Z., Gendrel A.V., Black M. *et al*. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control // Nature. 2004. V. 430. P. 471–476.

Llaca V., Messing J. Amplicons of maize *zein* genes are conserved within genic but expanded and constricted in intergenic regions // Plant J. 1998. V. 15. P. 211–220.

Llorens C., Futami R., Covelli L. *et al*. The Gypsy Database (GyDB) of Mobile Genetic Elements: Release 2.0 Nucl. Acids Res. (NARESE) (2011) 39 (suppl 1): D70-D74 doi: 10.1093/nar/gkq1061 (http://gydb.org/index.php/Ty3/Gypsy#CRM).

Llorens C., Mucoz-Pomer A., Bernad L. *et al*. Network dynamics of eukaryotic LTR retroelements beyond phylogenetic trees // Biol. Direct. 2009. V. 4. P. 41.

L'Homme Y., Séguin A., Tremblay F.M. Different classes of retrotransposons in coniferous spruce species // Genome. 2000. V. 43. P. 1084–1089.

Ma J., Devos K.M., Bennetzen J.L. Analyses of LTR-retrotransposon structures reveal recent and rapid genomic DNA loss in rice // Genome Res. 2004. V. 14. P. 860–869.

Madsen L.H., Fukai E., Radutoiu S. *et al*. *LORE1*, an active low-copy-number *Ty3-gypsy* retrotransposon family in the model legume *Lotus japonicus* // Plant J. 2005. V. 44. P. 372–381.

Malik H.S., Eickbush T.H. Modular evolution of the integrase domain in the *Ty3/gypsy* class of LTR retrotransposons // J. Virol. 1999. V. 73. P. 5186–5190.

Malik H.S., Eickbush T.H. Phylogenetic analysis of ribonuclease H domains suggests a late, chimeric origin of LTR retrotransposable elements and retroviruses // Genome Res. 2001. V. 11. P. 1187–1197.

Manninen I., Schulman A.H. *BARE-1*, a *copia*-like retroelement in barley (*Hordeum vulgare* L.) // Plant Mol. Biol. 1993. V. 22. P. 829–846.

Mao L., Begum D., Goff S.A., Wing R.A. Sequence and analysis of the tomato *JOINTLESS* locus // Plant Physiol. 2001. V. 126. P. 1331–1340.

Marillonnet S., Wessler S.R. Extreme structural heterogeneity among the members of a maize retrotransposon family // Genetics. 1998. V. 150. P. 1245–1256.

Marquet R., Baudin F., Gabus C. *et al*. Dimerization of human immunodeficiency virus (type 1) RNA: stimulation by cations and possible mechanism // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 2349–2357.

Matsuoka Y., Tsunewaki K. Wheat retrotransposon families identified by reverse transcriptase domain analysis // Mol. Biol. Evol. 1996. V. 13. P. 1384–1392.

Matsuoka Y., Tsunewaki K. Presence of wheat retrotransposons in *Gramineae* species and the origin of wheat retrotransposon families // Genes Genet. Syst. 1997. V. 72. P. 335–343.

Matsuoka Y., Tsunewaki K. Evolutionary dynamics of *Ty1-copia* group retrotransposons in grass shown by reverse transcriptase domain analysis // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. P. 208–217.

Meignin C., Bailly J.L., Arnaud F. *et al*. The 50 untranslated region and Gag product of *Idefix*, a long terminal repeat-retrotransposon from *Drosophila melanogaster*, act together to initiate a switch between translated and untranslated states of the genomic mRNA // Mol. Cell Biol. 2003. V. 23. P. 8246–8254.

Melayah D., Bonnivard E., Chalhoub B. *et al*. The mobility of the tobacco *Tnt1* retrotransposon correlates with its transcriptional activation by fungal factors // Plant J. 2001. V. 28. P. 159–168.

Mhiri C., Morel J.B., Casacuberta J.M. *et al*. The promoter of the tobacco *Tnt1* retrotransposon is induced by wounding and by abiotic stress // Plant Mol. Biol. 1997. V. 33. P. 257–266.

Mikkelsen J.G., Pedersen F.S. Genetic reassortment and patch repair by recombination in retroviruses // J. Biomed. Sci. 2000. V. 7. P. 77–99.

Millar C.I. Early evolution of pines // Ecology and Biogeography of Pinus / Ed. D.M. Richardson. Cambridge Univ. Press, 1998. P. 69–91.

Mougeot J.L., Richardson-Milazi S., Brooks B.R. Whole-genome association studies of sporadic amyotrophic lateral sclerosis: are retroelements involved? // Trends Mol. Med. 2009. V. 15. P. 148–158.

Mower J.P., Stefanović S., Young G.J., Palmer J.D. Plant genetics: gene transfer from parasitic to host plants // Nature. 2004. V. 432. P. 165–166.

Murray B.G. Nuclear DNA amount in gymnosperms // Ann. Bot. 1998. V. 82. P. 3–15.

Nakajima R., Noma K., Ohtsubo H., Ohtsubo E. Identification and characterization of two tandem repeat sequences (*TrsB* and *TrsC*) and a retrotransposon (*RIRE1*) as genome-general sequences in rice // Genes. Genet. Syst. 1996. V. 71. P. 373–382.

Neumann P., Pozarkova D., Macas J. Highly abundant pea LTR retrotransposon *Ogre* is constitutively transcribed and partially spliced // Plant Mol. Biol. 2003. V. 53. P. 399–410.

Novikova O., Mayorov V., Smyshlyaev G. *et al*. Novel clades of chromodomain-containing *Gypsy* LTR retrotransposons from mosses (Bryophyta) // Plant J. 2008. V. 56. P. 562–574.

Novikova O., Smyshlyaev G., Blinov A. Evolutionary genomics revealed interkingdom distribution of *Tcn1*-like chromodomain-containing *Gypsy* LTR retrotransposons among fungi and plants // BMC Genomics. 2010. V. 11. P. 231.

Nozue K., Kanegae T., Wada M. A full length *Ty3/gypsy*-type retrotransposon in the fern Adiantum // J. Plant Res. 1997. V. 110. P. 495–499.

Paillart J.C., Shehu-Xhilaga M., Marquet R., Mak J. Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair // Nat. Rev. Microbiol. 2004. V. 2. P. 461–472.

Panstruga R., Buschges R., Piffanelli P., Schulze-Lefert P. A contiguous 60 kb genomic stretch from barley reveals molecular evidence for gene islands in a monocot genome // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. P. 1056–1062.

Pearce S.R., Pich U., Harrison G. *et al*. The *Ty1-copia* group retrotransposons of *Allium cepa* are distributed throughout the chromosomes but are enriched in the terminal heterochromatin // Chromosome Res. 1996. V. 4. P. 357–364.

Peifer M., Bender W. Sequences of the *gypsy* transposon of *Drosophila* necessary for its effects on adjacent genes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 9650–9654.

Pelissier T., Tutois S., Deragon J.M. *et al*. *Athila*, a new retroelement from *Arabidopsis thaliana* // Plant Mol. Biol. 1995. V. 29. P. 441–452.

Perez-Alegre M., Dubus A., Fernández E. *REM1*, a new type of long terminal repeat retrotransposon in *Chlamydomonas reinhardtii* // Mol. Cell. Biol. 2005. V. 25. P. 10628–10638.

Piegu B., Guyot R., Picault N. *et al*. Doubling genome size without polyploidization: dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice // Genome Res. 2006. V. 16. P. 1262–1269.

Piskurek O., Okada N. Poxviruses as possible vectors for horizontal transfer of retroposons from reptile to mammals // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 12046–12051.

Presting G.G., Malysheva L., Fuchs J., Schubert I. A *Ty3/gypsy* retrotransposon-like sequence localizes to the centromeric regions of cereal chromosomes // Plant J. 1998. V. 16. P. 721–728.

Preston B.D. Error-prone retrotransposition: rime of the ancient mutators // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 7427–7431.

Pouteau S., Grandbastien M.A., Boccara M. Microbial elicitors of plant defence responses activate transcription of a retrotransposon // Plant J. 1994. V. 5. P. 535–542.

Pouteau S., Huttner E., Grandbastien M.A., Caboche M. Specific expression of the tobacco *Tnt1* retrotransposon in protoplasts // EMBO J. 1991. V. 10. P. 1911–1918.

Powell J.R., Gleason J.M. Codon usage and the origin of *P* elements // Mol. Biol. Evol. 1996. V. 13. P. 278–279.

Qiu Y.L., Lee J., Bernasconi-Quadroni F. *et al*. The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes // Nature. 1999. V. 402. P. 404–407.

Ramallo E., Kalendar R., Schulman A.H., Martínez-Izquierdo J.A. *Reme1*, a *Copia* retrotransposon in melon, is transcriptionally induced by UV light // Plant Mol. Biol. 2008. V. 66. P. 137–150.

Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E. Biology of Plants. 7th ed. N.Y.: W.H. Freeman and Co, 2005.

Rensing S.A., Fritzowsky D., Lang D., Reski R. Protein encoding genes in an ancient plant: analysis of codon usage, retained genes and splice sites in a moss, *Physcomitrella patens* // BMC Genomics. 2005. V. 6. P. 43.

Reski R., Frank W. Moss (*Physcomitrella patens*) functional genomics – Gene discovery and tool development, with implications for crop plants and human health. Brief Funct. // Genomic Proteomic. 2005. V. 4. P. 48–57.

Rico-Cabanas L., Martinez-Izquierdo J.A. *CIRE1*, a novel transcriptionally active *Ty1-copia* retrotransposon from *Citrus sinensis* // Mol. Genet. Genomics. 2007. V. 277. P. 365–377.

Robertson H.M., Lamp D.J. Recent horizontal transfer of a *mariner* transposable element among and between Diptera and Neuroptera // Mol. Biol. Evol. 1995. V. 12. P. 850–862.

Robertson H.M., MacLeod E.G. Five major subfamilies of *mariner* transposable elements in insects, including the Mediterranean fruit fly, and related arthropods // Insect Mol. Biol. 1993. V. 2. P. 125–139.

Rocheta M., Cordeiro J., Oliveira M., Miguel C. *PpRT1*: the first complete *gypsy*-like retrotransposon isolated in *Pinus pinaster* // Planta. 2007. V. 225. P. 551–562.

Rostoks N., Park Y.J., Ramakrishna W. *et al*. Genomic sequencing reveals gene content, genomic organization, and recombination relationships in barley // Funct. Integr. Genomics. 2002. V. 2. P. 51–59.

Roulin A., Piegu B., Wing R.A., Panaud O. Evidence of multiple horizontal transfers of the long terminal repeat retrotransposon *RIRE1* within the genus Oryza // Plant J. 2008. V. 53. P. 950–959.

Roy C., Tounekti N., Mougel M. *et al*. An analytical study of the dimerization of *in vitro* generated RNA of Moloney murine leukemia virus MoMuLV // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 7287–7292.

Sabot F., Guyot R., Wicker T. *et al*. Updating transposable element annotations from large wheat genomic sequences reveals diverse activities and gene association of elements // Mol. Genet. Genomics. 2005a. V. 274. P. 119–130.

Sabot F., Schulman A.H. Parasitism and the retrotransposon life cycle in plants: a hitchhiker‘s guide to the genome // Heredity. 2006. V. 97. P. 381–388.

Sabot F., Simon D., Bernard M. Plant transposable elements, with an emphasis on grass species // Euphytica. 2004. V. 139. P. 227–247.

Sabot F., Sourdille P., Bernard M. Advent of a new retrotransposon structure: the long form of the *Veju* elements // Genetica. 2005b. V. 125. P. 325–332.

Sabot F., Sourdille P., Chantret N., Bernard M. *Morgane*, a new LTR retrotransposon group, and its subfamilies in wheats // Genetica. 2006. DOI: 10.1007/S10709-006-0016-3.

SanMiguel P., Gaut B.S., Tikhonov A. *et al*. The paleontology of intergene retrotransposons of maize // Nat. Genet. 1998. V. 20. P. 43–45.

SanMiguel P., Ramakrishna W., Bennetzen J.L. *et al*. Transposable elements, genes and recombination in a 215-kb contig from wheat chromosome 5A(m) // Funct. Integr. Genomics. 2002. V. 2. P. 70–80.

SanMiguel P., Tikhonov A., Jin Y.K. *et al*. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome // Science. 1996. V. 274. P. 765–768.

Sanz-Alferez S., SanMiguel P., Jin Y.K. *et al*. Structure and evolution of the *Cinful* retrotransposon family of maize // Genome. 2003. V. 46. P. 745–752.

Sentry J.W., Smyth D.R. An element with long terminal repeats and its variant arrangements in the genome of *Lilium henryi* // Mol. Gen. Genet. 1989. V. 215. P. 349–354.

Shen Z., Denton M., Mutti N. *et al*. Polygalacturonase from Sitophilusoryzae: possible horizontal transfer of a pectinase gene from fungi to weevils // J. Insect Sci. 2003. V. 3. P. 24.

Shields D.C., Sharp P.M. Evidence that mutation patterns vary among Drosophila transposable elements // J. Mol. Biol. 1989. V. 207. P. 843–846.

Shirasu K., Schulman A.H., Lahaye T., Schulze-Lefert P. A contiguous 66-kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion // Genome Res. 2000. V. 10. P. 908–915.

Silva J.C., Kidwell M.G. Horizontal transfer and selection in the evolution of *P* elements // Mol. Biol. Evol. 2000. V. 17. P. 1542–1557.

Silva J.C., Kidwell M.G. Evolution of *P* elements in natural populations of *Drosophila willistoni* and *D. sturtevanti* // Genetics. 2004. V. 168. P. 1323–1335.

Silva J.C., Loreto E.L., Clark J.B. Factors that affect the horizontal transfer of transposable elements // Curr. Issues Mol. Biol. 2004. V. 6. P. 57–71.

Stenoien H.K. Compact genes are highly expressed in the moss *Physcomitrella patens* // J. Evol. Biol. 2007. V. 20. P. 1223–1229.

Stewart W.N., Rothwell G.W. Paleobotany and the Evolution of Plants. 2nd ed. Cambridge, England: Cambridge Univ. Press, 1993.

Stuart-Rogers C., Flavell A.J. The evolution of *Ty1-copia* group retrotransposons in gymnosperms // Mol. Biol. Evol. 2001. V. 18. P. 155–163.

Sugimoto K., Takeda S., Hirochika H. MYB-related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of the tobacco retrotransposon *Tto1* and defense-related genes // Plant Cell. 2000. V. 12. P. 2511–2528.

Suoniemi A., Tanskanen J., Schulman A.H. *Gypsy*-like retrotransposons are widespread in the plant kingdom // Plant J. 1998. V. 13. P. 699–705.

Syomin B.V., Kandror K.V., Semakin A.B. *et al*. Presence of the *gypsy (MDG4)* retrotransposon in extracellular virus-like particles // FEBS Lett. 1993. V. 323. P. 285–288.

Takeda S., Sugimoto K., Otsuki H., Hirochika H. Transcriptional activation of the tobacco retrotransposon *Tto1* by wounding and methyl jasmonate // Plant Mol. Biol. 1998. V. 36. P. 365–376.

Takeda S., Sugimoto K., Otsuki H., Hirochika H. A 13-bp *cis*-regulatory element in the LTR promoter of the tobacco retrotransposon *Tto1* is involved in responsiveness to tissue culture, wounding, methyl jasmonate and fungal elicitors // Plant J. 1999. V. 18. P. 383–393.

Tarchini R., Biddle P., Wineland R. *et al*. The complete sequence of 340 kb of DNA around the rice *ADH1*-

ADH2 regions reveals interrupted colinearity with maize chromosome 4 // Plant Cell. 2000. V. 12. P. 381–391.

Terzian C., Ferraz C., Demaille J., Bucheton A. Evolution of the *Gypsy* endogenous retrovirus in the *Drosophila melanogaster* subgroup // Mol. Biol. Evol. 2000. V. 17. P. 908–914.

Thomson K.G., Thomas J.E., Dietzgen R.G. Retrotransposon-like sequences integrated into the genome of pineapple, *Ananas comosus* // Plant Mol. Biol. 1998. V. 38. P. 461–465.

Vanderwiel P.L., Voyatas D., Wendel J.F. *Copia*-like retrotransposable element evolution in diploid and polyploid cotton (*Gossypium* L.) // J. Mol. Evol. 1993. V. 36. P. 429–447.

van Leeuwen H., Monfort A., Zhang H.B., Puigdomenech P. Identification and characterisation of a melon genomic region containing a resistance gene cluster from a constructed BAC library. Microcolinearity between *Cucumis melo* and *Arabidopsis thaliana* // Plant Mol. Biol. 2003. V. 51. P. 703–718.

Vazquez-Manrique R.P., Hernández M., Martínez-Sebastián M.J., de Frutos R. Evolution of *gypsy* endogenous retrovirus in the *Drosophila obscura* species group // Mol. Biol. Evol. 2000. V. 17. P. 1185–1193.

Vernhettes S., Grandbastien M.A., Casacuberta J.M. *In vivo* characterization of transcriptional regulatory sequences involved in the defence-associated expression of the tobacco retrotransposon *Tnt1* // Plant Mol. Biol. 1997. V. 35. P. 673–679.

Vernhettes S., Grandbastien M.A., Casacuberta J.M. The evolutionary analysis of the *Tnt1* retrotransposon in *Nicotiana* species reveals the high variability of its regulatory sequences // Mol. Biol. Evol. 1998. V. 15. P. 827–836.

Vicient C.M., Kalendar R., Anamthawat-Jynsson K., Schulman A.H. Structure, functionality, and evolution of the *BARE-1* retrotransposon of barley // Genetica. 1999. V. 107. P. 53–63.

Vicient C.M., Kalendar R., Schulman A.H. Variability, recombination and mosaic evolution of the barley *BARE-1* retrotransposon // J. Mol. Evol. 2005. V. 61. P. 275–291.

Vitte C., Panaud O. LTR retrotransposons and flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model // Cytogenet. Genome Res. 2005. V. 110. P. 91–107.

Voytas D.F., Ausubel F.M. A *copia*-like transposable element family in *Arabidopsis thaliana* // Nature. 1988. V. 336. P. 242–244.

Voytas D.F., Cummings M.P., Koniczny A. *et al*. *copia*-like retrotransposons are ubiquitous among plants // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 7124–7128.

Voytas D.F., Konieczny A., Cummings M.P., Ausubel F.M. The structure, distribution and evolution of the *Ta1* retrotransposable element family of *Arabidopsis thaliana* // Genetics. 1990. V. 126. P. 713–721.

Wakaniya I., Newton R.J., Johnston J.S., Price H.J. Genome size and environmental factors in the genus Pinus // Am. J. Bot. 1993. V. 80. P. 1235–1241.

Weber B., Schmidt T. Nested *Ty3-gypsy* retrotransposons of a single *Beta procumbens* centromere contain a putative chromodomain // Chromosome Res. 2009. V. 17. P. 379–396.

Wei F., Gobelman-Werner K., Morroll S.M. *et al*. The *Mla* (powdery mildew) resistance cluster is associated with three NBS-LRR gene families and suppressed recombination within a 240-kb DNA interval on chromosome 5S (1HS) of barley // Genetics. 1999. V. 153. P. 1929–1948.

Wessler S.R., Bureau T.E., White S.E. LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes // Curr. Opin. Genet. Dev. 1995. V. 5. P. 814–821.

Wicker T., Sabot F., Hua-Van A. *et al*. A unified classification system for eukaryotic transposable elements // Nat. Rev. Genet. 2007. V. 8. P. 973–982.

Wicker T., Stein N., Albar L. *et al*. Analysis of a contiguous 211 kb sequence in diploid wheat (*Triticum monococcum* L.) reveals multiple mechanisms of genome evolution // Plant J. 2001. V. 26. P. 307–316.

Wilhelm M., Boutabout M., Heyman T., Wilhelm F.X. Reverse transcription of the yeast *Ty1* retrotransposon: the mode of first strand transfer is either intermolecular or intramolecular // J. Mol. Biol. 1999. V. 288. P. 505–510.

Witte C.P., Le Q.H., Bureau T.E., Kumar A. Terminal-repeat retrotransposons in miniature (TRIM) are involved in restructuring plant genomes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 13778–13783.

Wright D.A., Voytas D.F. Potential retroviruses in plants: *Tat1* is related to a group of *Arabidopsis thaliana Ty3/gypsy* retrotransposons that encode envelope-like proteins // Genetics. 1998. V. 149. P. 703–715.

Wright D.A., Voytas D.F. *Athila4* of Arabidopsis and *Calypso* of soybean define a lineage of endogenous plant retroviruses // Genome Res. 2002. V. 12. P. 122–131.

Xiong Y., Burke W.D., Eickbush T.H. Pao, a highly divergent retrotransposable element from *Bombyx mori* containing long terminal repeats with tandem copies of the putative R region // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. V. 2117–2123.

Xiong Y., Eickbush T.H. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences // EMBO J. 1990. V. 9. P. 3353–3362.

Yoshida S., Maruyama S., Nozaki H., Shirasu K. Horizontal gene transfer by the parasitic plant *Striga hermonthica* // Science. 2010. V. 328. P. 1128.

LTR RETROTRANSPOSONS IN PLANTS

I.D. Sormacheva, A.G. Blinov

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: sormacheva@bionet.nsc.ru

Summary

Ty1/copia and *Ty3/gypsy* LTR retrotransposons are ubiquitous in plant genomes and may comprise over 50 % of their nuclear DNA content. LTR retrotransposons play a significant role in the structure, evolution, and function of plant genomes. Current knowledge of the distribution and evolution of this group of transposable elements has been obtained mostly from various model organisms, such as *Arabidopsis thaliana*, and species of agronomic interest. The most thoroughly investigated groups of LTR retrotransposons are those present in angiosperms. They include seven distinct families of *Ty3/gypsy* retroelements: *CRM*, *Galadriel*, *Reina*, *Del*, *REM*, *Athila* and *Tat*. The superfamily *Ty1/copia* in plants is represented by four distinct families: *Sire*, *Oryco*, *Retrofit*, and *Tork*. Four widely distributed *Ty3/gypsy* (*CRM*, *Galadriel*, *Reina*, *Del*) and some specific *Ty3/gypsy* (*PpRT1*, *IFG7*, *PtGypsyX1*, *PGGYPSYX1*) and *Ty1/copia* (*TPE1*, *Tpa*, *PtCopiaX1*, *PGCOPIAX1*, *Tgb*) LTR retrotransposon families have been described in gymnosperms. There is little information about the diversity and distribution of LTR retrotransposons in non-seed plants: mosses, lycophytes, and ferns.

Non-seed plants contain retrotransposons evolutionarily distinct from *Ty3/gypsy* retroelements of other plants. A specific group of chromodomain-containing *Ty3/gypsy* retroelements, *Galahad*, was described from ferns, mosses, and lycophytes. Another group of non-seed plant-specific *Ty3/gypsy* retroelements, *Mordred*, was found in ferns and lycophytes. Some chromodomain-containing *gypsy* retroelements from ferns are more closely related to the *CRM* family of the seed plants. *Ty3/gypsy* elements from *Tcn1* family, originally described for fungal genomes, are present in mosses and lycophytes. The diversity and evolution of *Ty1/copia* elements from *non-seed plants* is still poorly understood. Much less is known about the abundance, diversity, and biological significance of LTR retrotransposons in the genomes of green algae (Chlorophyta) and stonewort algae (Charophyta). Only two families of algal LTR retrotransposons are known. *REM* is a single-element family, including REM1, a *Ty3/gypsy* LTR retrotransposon from the genome of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Osser* is the first complete *Ty1/copia*-like retrotransposon described from the colonial green alga *Volvox carteri*.

Key words: plants, LTR retrotransposons, horizontal transfer, evolution.

МОБИЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ И ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА РАСТЕНИЙ

Е.М. Сергеева, Е.А. Салина

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: sergeeva@bionet.nsc.ru

Мобильные элементы являются основным компонентом, обеспечивающим пластичность растительного генома – их амплификация внесла значительный вклад в увеличение размеров геномов растений, может являться адаптивным ответом на условия стресса. За последнее десятилетие были либо полностью, либо частично секвенированы геномы ряда растений, что позволило проанализировать популяции мобильных элементов в их составе. В целом ряде работ было показано, что в течение эволюции в геномах происходила дифференциальная амплификация отдельных семейств мобильных элементов. Это внесло существенный вклад в межвидовую дивергенцию геномов и в дальнейшем могло способствовать успешному формированию генома аллополиплоидов.

Ключевые слова: мобильный элемент, LTR-ретротранспозон, ДНК-транспозон, *MITE*, дифференциальная амплификация, дивергенция геномов, аллополиплоид.

Мобильные элементы были впервые открыты у кукурузы более чем полвека назад Барбарой Мак-Клинток. С тех пор появилось достаточно много информации о существующих типах мобильных элементов, включающей информацию как о самих мобильных элементах, так и о взаимодействии с геномом организма-хозяина. В последнее десятилетие с развитием проектов по секвенированию геномов стали доступны обширные данные о большом количестве нуклеотидных последовательностей растений. Это дало возможность развернуть исследования семейств мобильных элементов и их популяций в составе геномов, что является чрезвычайно интересным для изучения эволюционной динамики как самих мобильных элементов, так и эволюции геномов растений.

Мобильные элементы (МЭ) генома подразделяют на два класса: элементы класса I (ретротранспозоны), которые перемещаются с помощью механизма «копирования-встраивания» с использованием РНК-интермедиатов, и элементы класса II (ДНК-транспозоны), которые используют механизм «вырезания-встраивания», с образованием либо одно-, либо двухцепочечных разрывов ДНК (Wicker *et al*., 2007).

Мобильные элементы класса I образуют несколько порядков: LTR-ретротранспозоны, которые имеют длинные концевые терминальные повторы (Long Terminal Repeats) на концах элемента, *DIRS*-элементы, *Penelope*, *LINE*- и *SINE*-элементы, а также неавтономные варианты LTR-ретротранспозонов *TRIM*- (Terminal-Repeat Retrotransposons In Miniature) и *LARD*-элементы (Large Retrotransposon Derivatives). LTR-ретротранспозоны растений разделяют на два основных надсемейства, *copia* и *gypsy*, у которых отличается порядок относительного расположения доменов, кодирующих интегразу и обратную транскриптазу в гене полипротеина (Wicker *et al*., 2007).

Мобильные элементы класса II в геноме растений представлены двумя подклассами: первый объединяет элементы, которые перемещаются с помощью классического механизма «вырезания–встраивания» с образованием двухцепочечного разрыва ДНК, а второй подкласс использует для перемещения механизм «катящегося кольца».

Подкласс 1 представлен порядком TIR (Terminal Inverted Repeats), характерной особенностью которого является наличие концевых инвертированных повторов – TIR – на обоих концах элемента. Транспозиция элементов первого подкласса происходит с помощью фермента транспозазы. У растений порядок

TIR представлен надсемействами *Tc-Mariner*, *hAT*, *Mutator* (*MULU*), *P*, *PIF-Harbinger* и *CACTA* (Wicker *et al*., 2007). Наиболее подробно изученные *hAT*-семейства – *Ac-Ds*-элементы кукурузы и *Tam3* львиного зева (Rubin *et al*., 2001). *CACTA*-элементы имеют характерную структурную черту: на внешних концах TIR присутствует консервативный мотив *CACTA*. Наиболее хорошо изученным является *CACTA*-транспозон семейства *Spm* (*Suppressor-Mutator*) кукурузы (Frey *et al*., 1990). Кроме того, к подклассу 1 принадлежит многочисленная и гетерогенная группа неавтономных элементов *MITE* (Miniature Inverted-Repeat Transposable Element). Эти элементы имеют размер от нескольких десятков до нескольких сотен п.н. Основываясь на нуклеотидной последовательности TIR, *MITE* разделяют на два больших надсемейства: *Stowaway*-подобные и *Tourist*-подобные элементы. В геномах растений эти элементы часто расположены рядом с генами (Bureau, Wessler, 1992, 1994).

Подкласс 2 в геномах растений представлен элементами порядка *Helitron*, которые хорошо описаны в геноме кукурузы (Kapitonov, Jurka, 2001).

Значительная часть МЭ представлена в виде неавтономных вариантов, у которых либо полностью, либо частично отсутствуют кодирующие последовательности. Неавтономные элементы не способны к самостоятельной транспозиции, однако их перемещение может происходить за счет трансактивации автономными элементами соответствующего семейства генома.

Некоторые группы ДНК-транспозонов остаются неклассифицированными, поскольку для них известны последовательности только неавтономных вариантов. Такую группу МЭ, малоизученную относительно других надсемейств ДНК-транспозонов, представляют *Foldback*-элементы, которые несут свое название от *Foldback* (*FB*)-элемента *Drosophila melanogaster*. Эти элементы представлены в широком ряду организмов, в том числе и растений – у риса *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, ржи *Secale cereale*, пасленовых *Solanaceae* (Feschotte, Pritham, 2007).

В геномах растений представлены все классы МЭ, присутствующие в геномах эукариот, однако преобладающими в численном и процентном соотношении являются LTR-ретротранспозоны (Flavell *et al*., 1992; Voytas *et al*., 1992; Bennetzen, 1996; Suoniemi *et al*., 1998; Vicient *et al*., 2001; Vitte, Bennetzen, 2006), и *MITE*-элементы (International Rice Genome …, 2005).

Вклад мобильных элементов в увеличение размера генома растений

Геномы растений значительно варьируют по своему размеру (Bennett, Leitch, 1995). Так, у злаковых размеры генома составляют от $2{,}7 \times 10^8$ п.н. у *Brachypodium distachyon* до $1{,}7 \times 10^{10}$ п.н. у гексаплоидного вида *Triticum aestivum* (мягкая пшеница). Столь большие различия размеров геномов нельзя объяснить различием содержания генов, так как оно в достаточной степени консервативно у разных видов (Bennetzen, 2000).

Одним из широко распространенных механизмов увеличения размеров генома у цветковых растений является полиплоидия (Wendel, 2000). Кроме полиплоидии различия размеров генома в значительной степени обусловлены варьирующим количеством повторяющихся последовательностей ДНК, что подтверждают данные либо по полному, либо частичному секвенированию геномов растений (табл. 1).

Так, у растений с маленьким размером генома, таких, как *Brachypodium distachyon*, *Arabidopsis thaliana* и *Oryza sativa*, МЭ составляют 14–34 % генома (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; International Rice Genome …, 2005; The International Brachypodium Initiative, 2010). Виды с большим размером генома имеют более высокое содержание МЭ, например, 84 % – у кукурузы (*Zea mays*) (Schnable *et al*., 2009) и 70–90 % – у видов из трибы Triticeae, таких, как ячмень *Hordeum*, *Aegilops* и пшеница *Triticum* (Paux *et al*., 2006; Charles *et al*., 2008; Wicker *et al*., 2009; Choulet *et al*., 2010).

Показано, что за последние 5 млн лет геномы кукурузы (*Zea mays*), хлопчатника *Gossypium* и вида риса *Oryza australiensis* претерпели двукратное увеличение размера генома за счет амплификации МЭ (SanMiguel *et al*., 1998; Hawkins *et al*., 2006; Piegu *et al*., 2006).

В увеличение размеров геномов растений наиболее весомый вклад внесли МЭ класса I, в частности LTR-ретротранспозоны (Bennetzen,

Таблица 1

Размеры геномов видов* растений и доля мобильных элементов в них

Вид	Размер генома, п.н. ($\times 10^6$)	Содержание МЭ, %	Литературный источник
Brachypodium distachyon	270	26	The International Brachypodium Initiative, 2010
Oryza sativa	389	34	International Rice Genome Sequencing Project, 2005
Sorghum bicolor	730	63	Paterson *et al*., 2009
Zea mays	2300	84	Schnable *et al*., 2009
Triticum aestivum	17000	88	Choulet *et al*., 2010, анализ $1{,}3 \times 10^7$ п.н. хромосомы 3B
Arabidopsis thaliana	125	14	The Arabidopsis Genome Initiative, 2000
Vitis vinifera	487	41	Jaillon *et al*., 2007
Populus trichocarpa	485	42	Tuskan *et al*., 2006
Carica papaya	372	52	Ming *et al*., 2008
Cucumis sativus	243	24	Huang *et al*., 2009
Glycine max	1100	59	Schmutz *et al*., 2010

* Представлены виды, геномы которых секвенированы (за исключением *Triticum aestivum*).

2000), на долю которых приходится 20 % геномных последовательностей у риса и не менее 60 % у пшеницы и кукурузы (Jiang *et al*., 2003; Messing *et al*., 2004; International Rice Genome ..., 2005; Choulet *et al*., 2010).

Преобладание ретротранспозонов объясняется их размножением с помощью механизма «копирование–встраивание», который дает возможность резкого увеличения числа копий. Такой огромный потенциал амплификации *LINE*-ретротранспозонов показан у видов рода *Lilium*. 14 проанализированных видов имеют огромные геномы порядка 30–45 млрд п.н., что является результатом амплификации ретротранспозонов (Joseph *et al*., 1990; Leeton, Smyth, 1993).

ДНК-транспозоны также вносят свой вклад в увеличение размера генома, несмотря на то что нерепликативный способ размножения «вырезание–встраивание» накладывает ограничение на их амплификацию. Существуют альтернативные механизмы увеличения числа копий ДНК-транспозонов: за счет транспозиции в ходе репликации геномной ДНК хозяина, когда инсерция происходит в еще нереплицированный участок из уже реплицированного; и за счет репарации двухцепочечного разрыва после вырезания элемента (генная конверсия) (Feschotte, Pritham, 2007). У пшеницы, ячменя и эгилопса среди ДНК-транспозонов наиболее представленным является надсемейство *CACTA* (> 87 % всех ДНК-транспозонов) – на него приходится 5–10 % генома (Devos *et al*., 2005; Paux *et al*., 2006; Charles *et al*., 2008; Wicker *et al*., 2009; Choulet *et al*., 2010). Геномы растений также несут большое число *MITE* в количестве, доходящем до сотен тысяч копий, как, например, в геноме риса – 120 тыс. копий, на которые приходится 5,5 % геномной последовательности (Feschotte, Wessler, 2002; International Rice Genome ..., 2005).

Кроме увеличения размера генома за счет амплификации МЭ, существуют также противодействующие механизмы удаления последовательностей ДНК из геномов. Один из этих механизмов связан с рекомбинацией между LTR-ретротранспозонами. В том случае, когда происходит незаконная рекомбинация между двумя LTR, фланкирующими один элемент, образуется solo-LTR, при этом второй терминальный повтор и внутренняя последовательность элемента теряются (Roeder, Fink, 1980). Неравный кроссинговер между двумя гомологичными LTR-ретротранспозонами, имеющими разную геномную локализацию, в зависимости от хромосомной локализации и ориентации элементов может вызвать делецию или дупликацию последовательности ДНК, или же такие геномные

перестройки, как инверсии и реципрокные транслокации (Garfinkel, 2005). Показано, что в геномах арабидопсиса и риса незаконная рекомбинация между LTR-ретротранспозонами ведет к потерям геномной ДНК путем накопления коротких делеций (Devos *et al*., 2002; Ma *et al*., 2004). Действие этих процессов привело к тому, что большинство LTR-ретротранспозонов, идентифицированных в геномах растений, являются относительно молодыми (время инсерции в геном < 4 млн лет назад) (Devos *et al*., 2002; Ma *et al*., 2004; Bennetzen *et al*., 2005). Анализ времени инсерции МЭ в геномах пяти видов покрытосеменных (*Lotus japonicus*, *Medicago truncatula*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Triticum monococcum*) показал, что скорость удаления LTR-ретротранспозонов из геномов варьирует между разными таксономическими группами, например, в геномах злаковых она ниже, чем в геномах бобовых. Однако более существенным фактором, влияющим на размер генома, все же является амплификация МЭ (Vitte, Bennetzen, 2006). Например, в течение последних 2–5 млн лет из генома риса было удалено > 190 млн п.н. последовательностей LTR-ретротранспозонов при высокой скорости амплификации ретроэлементов, что в итоге привело к увеличению размера генома (Ma, Bennetzen, 2004).

Дифференциальная амплификация МЭ и дивергенция геномов

МЭ являются быстро эволюционирующей фракцией геномов эукариот и вносят основной вклад в межвидовую дивергенцию геномов (Von Sternberg *et al*., 1992; Charlesworth *et al*., 1994). Изучение эволюции разных МЭ представляет собой большой интерес, особенно в геномах родственных видов, которые за счет гибридизации образовали аллополиплоиды, как, например, виды родов *Triticum* и *Aegilops*. Эти результаты важны как для изучения эволюции собственно МЭ, так и эволюции геномов.

В ряде работ по изучению популяций МЭ в геномах различных видов растений показано, что ретротранспозоны присутствуют в виде гетерогенных популяций во всех таксонах высших растений. При этом часто в геномах дивергировавших видов существуют гомологичные пары ретротранспозонов, как, например, показано для *copia*-элементов у видов рода *Poaceae* (Matsuoka, Tsunewaki, 1997) и семейства *copia*-ретротранспозонов *Tpa28* голосеменных (сходство между гомологичными элементами у дивергировавших видов 80–85 %) (Stuart-Rogers, Flavell, 2001). Также показано, что распределение многих ретротранспозонов между видами является дискретным – семейство МЭ может присут-ствовать в геноме одного из родственных видов и отсутствовать в геноме другого (Flavell *et al*., 1992; Voytas *et al*., 1992).

Преобладающая точка зрения на эволюцию МЭ заключается в том, что основные группы элементов присутствовали в предковом геноме растений до образования современных видов и затем в процессе эволюции дивергировали в гетерогенные подгруппы, при этом происходил вертикальный перенос МЭ при условиях отбора, действующего на консервативные домены. При этом присутствие гомологичных элементов у разных видов и дискретность распределения не противоречат версии горизонтального переноса. Однако у растений это явление наблюдается очень редко – описано всего несколько случаев переноса МЭ. Приведем два примера: перенос *Mu*-подобного ДНК-транспозона между просом *Setaria* и рисом (Diao *et al*., 2006) и перенос LTR-ретротранспозона *RIRE1* среди видов риса (род *Oryza*) (Roulin *et al*., 2008). Поэтому более вероятным объяснением дискретности распределения представляется то, что некоторые группы МЭ в геномах отдельных таксонов были утрачены в ходе эволюции.

Увеличение размеров геномов шло за счет амплификации отдельных семейств МЭ. Так, в геномах видов Triticeae широко представлены МЭ из группы родственных *copia*-семейств *BARE-1*, *WIS* и *Angela*. У ячменя элементы *BARE-1* составляют 3 % генома (Vicient *et al*., 1999, 2001). В геноме пшеницы эта группа представлена элементами семейств *WIS* и *Angela*, на которые приходится 70–80 % всех *copia*-элементов генома. Среди семейства *gypsy*-элементов у пшеницы преобладают семейства *Sabrina* и *Fatima*, на каждое из которых приходится около 20 % от общего числа *gypsy*-транспозонов (Charles *et al*., 2008). Для ДНК-транспозонов также показано преобладание отдельных семейств в геномных последовательностях, например, некоторые семейства *CACTA*-элементов

представлены в геномах растений большим числом копий: *BoC1* и *BoC2* у *Brassica oleraceae*, *Tpo1* райграса (*Lolium perenne*), и *Caspar* у Triticeae (Langdon *et al*., 2003; Wicker *et al*., 2003; Zhang, Wessler, 2004).

Отметим результат, который был выявлен при анализе геномных последовательностей пшеницы, полученных в ходе проекта по секвенированию хромосомы 3B, в том числе последовательностей, полученных с помощью новых высокопроизводительных методов секвенирования. В геноме пшеницы идентифицировано 944 различных семейств МЭ, при этом на 8 из них (*Fatima*, *Jorge*, *Angela*, *Laura*, *Sabrina*, *WIS*, *Wilma* и *Nusif*) приходится > 50 % всей фракции МЭ. Значительная же часть МЭ слабо повторена в геноме. Так, элементы, относящиеся к 818 семействам, составили всего лишь 13,9 % фракции МЭ (Choulet *et al*., 2010).

Явление, когда определенное семейство МЭ более успешно амплифицируется в геноме, чем другие, называется дифференциальной амплификацией. Дифференциальная амплификация была показана для геномов кукурузы (Meyers *et al*., 2001; Kronmiller, Wise, 2008), хлопка (Hawkins *et al*., 2006) и геномов диплоидных предков мягкой пшеницы (Charles *et al*., 2008). Эффект дифференциальной амплификации особенно интересен при изучении геномов аллополиплоидов, таких, как аллогексаплоид мягкая пшеница *Triticum aestivum*. С помощью филогенетического анализа и флуоресцентной гибридизации *in situ* нами показано, что амплификация B-геном-специфичных вариантов ретротранспозона *Fatima* имела место в геноме диплоидного предка B-генома *Ae. speltoides* до того момента, как он вошел в состав дикой аллотетраплоидной пшеницы *T. dicoccoides* (Salina *et al*., 2011) (рис. 1). Также мы показали существование геном-специфичных групп *CACTA*-транспозонов семейства *Caspar*. Элементы этого семейства локализуются преимущественно в субтеломерных областях хромосом пшеницы и ячменя, и филогенетический анализ

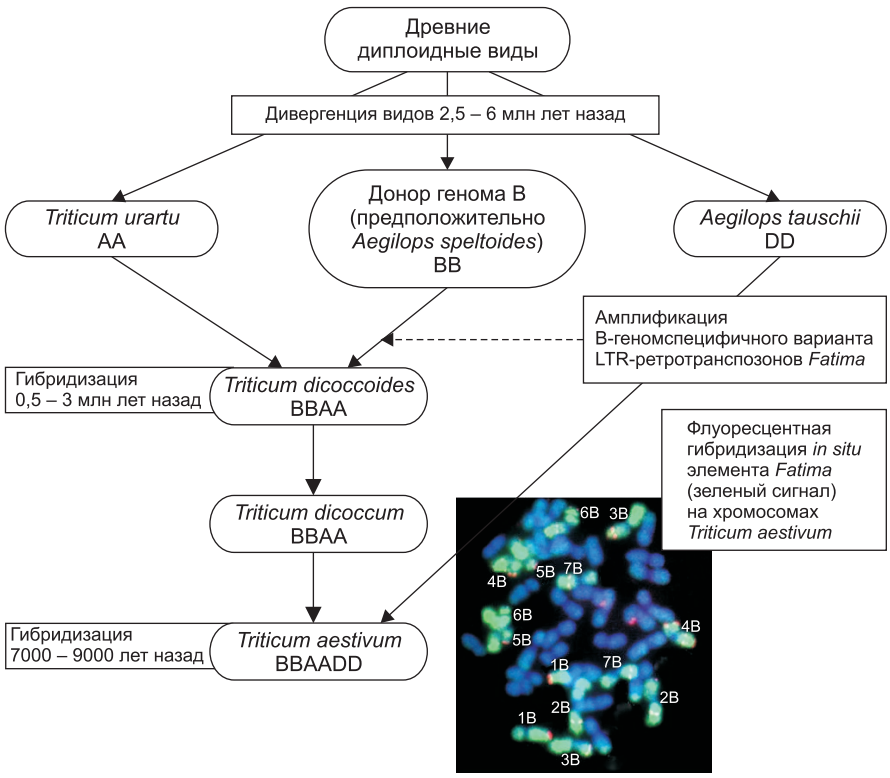


Рис. 1. Схема образования аллополиплоида *Triticum aestivum* и амплификация геном-специфичных вариантов ретротранспозона *Fatima* у донора генома B.

Примерные оценки времени дивергенции видов и аллополиплоидизации взяты из источников (Feldman *et al*., 1995; Huang *et al*., 2002).

показал, что амплификация отдельных геном-специфичных групп *Caspar* в геномах Triticeae происходила независимо. Таким образом, дифференциальная амплификация семейства *Caspar* внесла существенный вклад в формирование и дивергенцию субтеломерных районов хромосом видов Triticeae (Wicker *et al*., 2009; Sergeeva *et al*., 2010). Кроме того, дифференциальная амплификация МЭ также может обусловливать различия в содержании сателлитной ДНК у близкородственных видов. Так, ДНК-транспозоны часто несут в своем составе сателлитную ДНК, и в совокупности с дифференциальной амплификацией элементов в разных геномах это объясняет существенные различия, например, в содержании тандемного *Afa* повтора Triticeae, который является компонентом некоторых *CACTA*-семейств (Wicker *et al*., 2003).

Судя по всему, возникновение и амплификация геном-специфичных вариантов ретротранспозонов, которые происходили в основном у диплоидных видов, являются характерной чертой эволюции трех геномов гексаплоидной пшеницы. При анализе 13 млн п.н. геномных последовательностей пшеницы показано, что инсерции 90 % LTR-ретротранспозонов у пшеницы произошли в течение последних 3 млн лет, при этом всплеск амплификации пришелся на период 1,4 млн лет назад (до образования аллотетраплоида *Triticum dicoccoides*) (Huang *et al*., 2002; Dvorak *et al*., 2006; Choulet *et al*., 2010). Таким образом, дифференциальная амплификация внесла большой вклад в дивергенцию геномов A, B и D мягкой пшеницы и могла способствовать успешному формированию аллополиплоидного генома.

Каждое семейство LTR-ретротранспозонов имеет специфичный спектр активности. Амплификация большей части МЭ происходила в пределах относительно короткого временного интервала (< 1 млн лет), после чего следовал сайленсинг элементов, другие же семейства амплифицировались в течение длительного промежутка времени – более 2,5 млн лет. Так же специфичным для каждого семейства МЭ является и время, на которое пришлась основная масса событий транспозиции. Таким образом, геном пшеницы сформирован последовательными волнами амплификации МЭ, вовлекающими в себя разные семейства (Choulet *et al*., 2010).

Механизм дифференциальной амплификации разных семейств МЭ неизвестен, в качестве вероятных причин называют: различие репродуктивных потенциалов элементов; изменения регуляции эпигенетического сайленсинга или же ослабление давления отбора на определенную группу элементов, которое может возникнуть при стрессовых условиях различного рода. Ни одна из этих гипотез не является исключительной, и по существующим в настоящее время данным нельзя ни подтвердить, ни опровергнуть ни одну из них (Vitte, Bennetzen, 2006; Charles *et al*., 2008).

Необходимо отметить, что видоспецифичные МЭ служат как генетический инструмент для разработки ДНК-маркеров, распределенных по всему геному (Kumar *et al*., 1997). Молекулярные маркеры, основанные на МЭ, являются идеальным инструментом для изучения структуры и эволюции генома гексаплоидной пшеницы. Мобильные элементы представлены большим числом копий, а также равномерно распределены в геноме как в гетеро- так и в эухроматиновых районах и показывают полиморфизм сайтов инсерции на меж- и внутривидовом уровнях (Kumar *et al*., 1997; Paux *et al*., 2006). Эти свойства сделали возможными разработку некоторых типов молекулярных маркеров, основанных на МЭ, таких, как S-SAP, IRAP, REMAP и RBIP (Kumar, Hirochika, 2001; Schulman *et al*., 2004). Эти молекулярные маркеры успешно используются для изучения филогенетических взаимоотношений, биоразнообразия и для создания карт сцепления агрономически важных признаков у разных видов, таких, как ячмень, горох, рис и табак (Schulman *et al*., 2004). Очень ценными являются геном-специфичные молекулярные маркеры, основанные на МЭ – Insertion Site-Based Polymorphism (ISBP), которые используют информацию о последовательностях, фланкирующих МЭ, для амплификации ПЦР-фрагментов. Этот тип маркеров успешно используется для картирования хромосомы 3B пшеницы (Paux *et al*., 2010).

Роль МЭ в формировании отдельных локусов хромосом растений

На уровне нуклеотидной последовательности хромосому растений можно условно

разделить на две группы, которые показывают разную эволюционную динамику: небольшая консервативная часть, которая подвергается давлению отбора и соответствует генному пространству, и большая вариабельная часть, которая претерпевает динамичные изменения и охватывает МЭ, а также дуплицированные гены и фрагменты генов (Bennetzen, Freeling, 1997).

У растений с большим размером генома, таких, как кукуруза, пшеница, генное пространство организовано в виде генных островков, окруженных МЭ. Генные островки не обнаружены у растений с маленьким размером генома – *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) и *Brachypodium* (Huo *et al*., 2009). У пшеницы содержание МЭ весьма сильно различается между разными участками хромосом. Дистальные участки содержат относительно малое количество МЭ (59,2 %) по сравнению с проксимальными участками, которые практически полностью состоят из МЭ и не несут ни одного гена (Choulet *et al*., 2010).

Мобильные элементы (большей частью LTR-ретротранспозоны) внесли основной вклад в формирование межгенных участков, в частности в увеличение их размера и дивергенцию ортологичных локусов хромосом (SanMiguel *et al*., 1998; Vicient *et al*., 1999; Shirasu *et al*., 2000; Meyers *et al*., 2001; Wicker *et al*., 2001; Gu *et al*., 2004; Chantret *et al*., 2005; Isidore *et al*., 2005; Salse *et al*., 2008). Так, например, нами охарактеризованы ортологичные участки риса и пшеницы, содержащие четыре гена, порядок и последовательность которых являются консервативными. При этом ген-содержащий участок риса составил 9556 п.н., а соответствующий ему участок пшеницы – 29612 п.н. Увеличение длины данного участка генома у пшеницы произошло за счет межгенного пространства, где произошли встройки МЭ (Salina *et al*., 2009).

Характерной чертой ретротранспозонов растений является формирование множественных инсерций за счет предпочтительной интеграции в определенные последовательности или в одни и те же участки генома (SanMiguel *et al*., 1996; Suoniemi *et al*., 1997). Описаны случаи колонизации некоторых участков хромосом ретротранспозонами, так, *gypsy*-семейства *crwydryn* и *cereba-1* являются одними из основных компонентов центромер *Poaceae* (Presting *et al*., 1998; Hudakova *et al*., 2001), а некоторые *copia*- и *LINE*-ретротранспозоны кластеризуются в терминальном гетерохроматине хромосом ячменя и эгилопса (Belyayev *et al*., 2001).

Описана и колонизация разных участков хромосом ДНК-транспозонами, так, *CACTA*-транспозон *Caspar* локализован в субтеломерных хромосомных районах видов Triticeae (Wicker *et al*., 2009; Sergeeva *et al*., 2010). Увеличение содержания элементов *Caspar* положительно коррелирует со скоростью рекомбинации. Вероятно, что механизм, лежащий в основе увеличения числа копий ДНК-транспозонов *Caspar* в субтеломерных районах, заключается в активном использовании процесса рекомбинации для транспозиции МЭ. Например, районы с высокой скоростью рекомбинации являются более доступными для инсерций ДНК-транспозонов, так как для инициации мейотической рекомбинации необходимо формирование двухцепочечных разрывов, которые ДНК-транспозоны могут использовать для инсерции (Cao *et al*., 1990). Другим возможным механизмом является генная конверсия, которая активно используется ДНК-транспозонами для амплификации; ее скорость прямо пропорциональна скорости мейотической рекомбинации (Qi *et al*., 2009).

Неравномерное распределение мобильных элементов на хромосомах растений встречается достаточно часто, при этом спектры распределения ДНК-транспозонов и ретротранспозонов различаются. Ретротранспозоны имеют дисперсную локализацию вдоль плеч хромосом с наибольшей концентрацией в районах с низкой скоростью рекомбинации (районы прицентромерного гетерохроматина) (Heslop-Harrison *et al*., 1997; Copenhaver *et al*., 1999; Wright *et al*., 2003).

ДНК-транспозоны зачастую неравномерно распределены вдоль плеч хромосом, что неоднократно показано. Так, на хромосомах *Arabidopsis thaliana* наблюдается отрицательная корреляция между плотностью генов и МЭ, т. е. распределение МЭ в большей степени обусловлено отбором против нарушения экспрессии генов (Wright *et al*., 2003). У риса короткие ДНК-транспозоны, такие, как *IS5/Tourist* и *IS630/Tc1/mariner*, показали положительную корреляцию и со степенью рекомбинации, и с плотностью генов, видимо, благодаря эффекту

отбора против эктопической рекомбинации, при этом нарушение функции генов ослаблено из-за малой длины МЭ (International Rice Genome …, 2005). У кукурузы частота сайтов инсерции ДНК-транспозона *Mutator* коррелирует со степенью рекомбинации, фактором, определяющим плотность сайтов мейотической рекомбинации и сайтов инсерции, в этом случае является структура гетерохроматина (Liu *et al*., 2009).

Таким образом, спектр распределения МЭ вдоль хромосом является результатом совместного действия ряда генетических факторов: действие негативного отбора против «вредных» инсерций МЭ (Finnegan, 1992); действие отбора против транспозиционной активности МЭ (Brookfield, 1991) и эктопической рекомбинации (Montgomery *et al*., 1991). Кроме того, влияние оказывают специфичные характеристики определенных районов хромосом, как, например, структура хроматина или содержание последовательностей определенного типа, а также и специфичные свойства самих МЭ (Liu *et al*., 2009). Степень действия этих факторов зависит от специфики и характеристик вида, таких, как система размножения и эффективный размер популяции. Кроме того, факторы могут коррелировать друг с другом и со скоростью мейотической рекомбинации, в результате распределение МЭ определяется факторами, доминирующими в каждом конкретном случае (Barnes *et al*., 1995; Wilson, 1999; Marais *et al*., 2001; Akhunov *et al*., 2003; Borde *et al*., 2009; Liu *et al*., 2009).

Факторы, влияющие на амплификацию МЭ

Как было отмечено выше, геномы растений, таких, как кукуруза и пшеница, были существенно увеличены за счет амплификации ретротранспозонов. Однако при этом в геноме пшеницы не обнаружено ни одной копии LTR-ретротранспозонов, активной в недавнем времени (Choulet *et al*., 2010). А малое количество транскрибируемых последовательностей, гомологичных ретротранспозонам, например, 1,5 % от всех EST (Expressed Sequence Tags) у кукурузы, подразумевает, что некоторые механизмы, скорее всего, эпигенетические, должны очень эффективно репрессировать транскрипцию фракции МЭ в геномах растений (Vicient, 2010). Жизненный цикл LTR-ретротранспозонов включает в себя четыре шага: транскрипцию, трансляцию, обратную транскрипцию и интеграцию ДНК-элемента в геномную последовательность. Для осуществления транспозиции ДНК-транспозона также необходимы транскрипция и трансляция для образования белка транспозазы. Регуляция на каждой из этих стадий может лимитировать активность элемента.

Информация о факторах, определяющих активность МЭ, начала появляться с открытия первого мобильного элемента у кукурузы – сайта хромосомного разрыва, названного *Dissociation* (*Ds*). Ds может перемещаться только в присутствии элемента-активатора *Activator* (*Ac*), который также может обеспечивать свою собственную транспозицию. Вместе *Ac* и *Ds* составляют семейство МЭ, которое включает автономный (*Ac*) и неавтономный (*Ds*) элементы. Позднее было обнаружено, что разные семейства ДНК-транспозонов являются причиной нестабильных мутантных фенотипов у других растений, например, львиного зева, петунии, сои, сорго (Craig *et al*., 2002).

Изучение мутаций, которые отвечают за стабильные мутантные аллели у кукурузы, привели к выявлению LTR-ретротранспозонов. Пять разных семейств LTR-ретротранспозонов (*Bs1*, *Stonor*, *Magellan*, *Hopscotch* and *B5/G*) были выявлены из восьми мутантных аллелей (Johns *et al*., 1985; Varagona *et al*., 1992; Vignols *et al*., 1995).

Какие же факторы определяют активацию МЭ в геноме? В дополнение к прямой инактивации путем накопления мутаций в последовательности элементов клетки выработали механизм контроля активности МЭ, включающий сайленсинг путем метилирования ДНК (транскрипционный генетический сайленсинг), или сайленсинг за счет РНК-интерференции (посттранскрипционный генетический сайленсинг) (Casacuberta, Santiago, 2003). Исследования у *Arabidopsis* и риса показали, что значительное количество транспозонов являются неактивными, метилированными, и связанными с малыми интерферирующими РНК (Kasschau *et al*., 2007; Zilberman *et al*., 2007; Lister *et al*., 2008).

Метилирование ДНК является основным механизмом сайленсинга у растений. Так, еще

Б. Мак-Клинток при анализе нестабильных мутаций у кукурузы описала наследуемые и обратимые изменения активности элементов *Ac* и *Spm* (*Suppressor–Mutator*) (McClintock, 1965), при которых наблюдается изменение статуса метилирования (Banks *et al*., 1988). Описание активных и неактивных фаз элемента *Mutator* кукурузы показало, что его активность коррелирует с метилированием остатков цитозина (Chandler, Walbot, 1986). Во всех случаях неактивные элементы были гиперметилированы по отношению к их активным копиям.

У мутантов *Arabidopsis ddm1* (*decreased DNA methylation 1*), которые имеют пониженный уровень метилирования CpG, происходила активация транскрипции и транспозиции транспозонов *Mutator* и *CACTA* (Miura *et al*., 2001;Singer *et al*., 2001), при этом элементы могли оставаться активными в ряду поколений (Kato *et al*., 2004). Также наблюдалась активация транскрипции ретротранспозонов *Tar17*, *Athila4* и *Athila5* (Hirochika *et al*., 2000; Wright, Voytas, 2002).

МЭ осуществляют транскрипцию и даже транспозицию при различных биотических и абиотических стрессах или в клеточной культуре, а также при межвидовой гибридизации (Pouteau *et al*., 1991; Hirochika, 1993; Mhiri *et al*., 1997; Kashkush *et al*., 2002; Ramallo *et al*., 2008; Picault *et al*., 2009). Например, после стресс-индуцированной транскрипции число копий LTR-ретротранспозона *Tos17* в клетках риса некоторых линий увеличилось от 2 до 30 копий (Hirochika *et al*., 1996). Активация в клеточной культуре показана и для LTR-ретротранспозона *Tos17*, и для ДНК-транспозона *mPing* риса (Hirochika *et al*., 1996; Jiang *et al*., 2003). Одним из наиболее хорошо изученных примеров является активация транскрипции LTR-ретротранспозонов табака *Tnt1* и *Tto1* обработкой экстрактами грибов и бактерий, инфицированием патогенами, поранением и абиотическими факторами (Grandbastien *et al*., 1997, 2005; Takeda *et al*., 1999). Все эти стрессовые условия могут приводить к снижению уровня метилирования ДНК, что вызывает активацию МЭ, при этом активация может быть обратимой. На примере львиного зева *Antirrhinum majus* показано, что низкие температуры ведут к деметилированию ДНК и активации ДНК-транспозона *Tam3*, но этот процесс может быть остановлен повышением температуры (Hashida *et al*., 2003).

Транспозоны могут вносить существенный вклад в адаптацию геномов растений и животных за счет действия на гены при активации в стрессовых условиях (обзоры: Васильева и др., 2007; Чересиз и др., 2008). МЭ часто встраиваются в эухроматиновые районы рядом с генами или в последовательности генов, и, таким образом, могут оказывать влияние на их экспрессию (Bennetzen, 2000). Например, у кукурузы транспозон *Mutator* специфично встраивается в последовательности генов (Cresse *et al*., 1995), а *MITE*-элементы являются сцепленными с кодирующими районами в геномах ячменя, кукурузы, риса и сорго (Bureau, Wessler, 1992, 1994; Iwamoto, Higo, 2003; Sabot *et al*., 2005). Существует множество примеров полиморфных инсерций *MITE* в промоторы, интроны или 3′-фланкирующие последовательности между ортологичными и паралогичными генами (Bureau, Wessler, 1992, 1994; Bureau *et al*., 1996). Инсерции МЭ также могут обеспечивать альтернативные промоторы, экзоны, терминаторы и сайты сплайсинга (Bennetzen, 2000). Кроме того, обнаружено, что *CACTA*-транспозоны пшеницы, *MULES* риса и *Helitrons* кукурузы могут содержать фрагменты и копии генов хозяина, захватывать и перетасовывать экзоны (Wicker *et al*., 2003; Jiang *et al*., 2004; Morgante *et al*., 2005; Choulet *et al*., 2010). Транспозоны, по-видимому, участвовали в увеличении числа генов и нарушении их коллинеарности у пшеницы путем МЭ-опосредованных межхромосомных дупликаций и захвата генов (Akhunov *et al*., 2007).

Надо отметить, что общей чертой МЭ, вызывающих инсерционные мутации, является их относительно низкий уровень копий (< 100) в геноме хозяина. Например, LTR-ретротранспозон *Bs1*, который был впервые обнаружен как инсерция в гене алкогольдегидрогеназы (*adh1*), представлен в геноме кукурузы только в количестве 1–5 копий (Johns *et al*., 1985). Видимо, на активность элементов, представленных большим числом копий в геноме, кроме метилирования ДНК, действуют еще и дополнительные факторы. Так, было обнаружено, что уровень транскрипции некоторых МЭ у кукурузы в тканях апикальной меристемы побегов и ге-

нативных клетках оказался очень высоким, однако, несмотря на активную транскрипцию МЭ транспозиция у кукурузы является редким событием (Vicient, 2010). Также показано, что при межвидовой гибридизации пшеницы происходит активация экспрессии транспозонов, например, широко представленного в геноме ретротранспозона *WIS*, однако увеличения частоты инсерций при этом не происходит (Kashkush *et al*., 2002, 2003). По-видимому, клетки могут контролировать транспозицию на посттранскрипционном уровне.

Некоторые МЭ могут осуществлять транскрипцию и при нормальном развитии растения, как, например, показано для ретротранспозонов *BARE-1* ячменя, *Grande* кукурузы и *Rider* томата и разных МЭ сорго (Suoniemi *et al*., 1996; Muthukumar, Bennetzen, 2004; Gómez *et al*., 2006; Cheng *et al*., 2009). Два новых класса транскрипционно активных транспозон-подобных последовательностей, *Revolver* и *Superior*, были найдены у ржи (Tomita *et al*., 2008, 2009).

Показано, что ряд МЭ был активен в недавнем прошлом. Высокая степень сходства, наблюдаемая для многих семейств *MITE*, означает, что эти семейства могли распространиться в недавний период времени в геноме хозяина. Согласуется с этой точкой зрения факт, что сайты инсерции *MITE* в отдельных локусах часто являются полиморфными между особями одного вида (Bureau, Wessler, 1994; Bureau *et al*., 1996; Zhang *et al*., 2000).

Амплификация МЭ может быть связана с адаптивной эволюцией хозяина. Так, описана МЭ-опосредованная реструктуризация генома в популяции дикого ячменя *Hordeum spontaneum*. Реструктуризация генома выражается в наличии внутривидовой вариации размера генома за счет амплификации LTR-ретротранспозона *BARE-1*. Число копий этого элемента между популяциями, которые подверглись разным степеням засухи, варьирует между 8300 и 22100, что соответствует 1,8–4,7 % ядерной ДНК (Vicient *et al*., 1999; Kalendar *et al*., 2000). Аналогично показано, что амплификация *MITE*-элемента *mPing* происходила в основном в сортах риса, адаптированных к экстремальным условиям окружающей среды (Jiang *et al*., 2003).

Также можно было бы ожидать всплеска транспозиции при образовании межвидовых гибридов. Однако анализ геномных последовательностей пшеницы показал, что 90 % МЭ были амплифицированы до вхождения в геном аллополиплоида, в том числе и B-геном-специфичный ретротранспозон *Fatima* (Charles *et al*., 2008; Salina *et al*., 2011). Также описан C-геном-специфичный *CACTA*-транспозон *Bot1* у видов рода *Brassica*, который сыграл основную роль в дивергенции геномов на диплоидном уровне. После образования аллополиплоида *B. napus* (AA CC) не было обнаружено распространения этого элемента на хромосомы другого, A-генома (Alix *et al*., 2008). Таким образом, аллополиплоидизация никак не повлияла на частоту транспозиции.

При этом через некоторое время после образования аллополиплоида возможно перемещение МЭ по всему геному, однако это зависит от конкретных видов растений. Например, у аллополиплоидов хлопчатника (*Gossypium*) разные семейства МЭ распространились из одного генома в другой уже после аллополиплоидизации (Zhao *et al*., 1998), а у аллополиплоидов рода *Nicotiana*, образовавшихся около 1 млн лет назад, произошел существенный обмен мобильными элементами между геномами, вошедшими в его состав (Lim *et al*., 2007).

Амплификация МЭ вносит существенный вклад в эволюцию генома растений, за ее счет произошли существенное увеличение размера геномов растений, а также дивергенция последовательностей родственных видов, кроме того, видимо, амплификация МЭ является адаптивным ответом растений на стресс. Таким образом, МЭ являются ключевым компонентом, который обеспечивает пластичность растительного генома.

Работа частично финансировалась программой Президиума РАН «Биологическое разнообразие» (2009–2011) – проект № Б.26.28 и грантом РФФИ № 11-04-00178.

Литература

Васильева Л.А., Выхристюк О.В., Антоненко О.В., Захаров И.К. Индукция транспозиций мобильных генетических элементов в геноме *Drosophila melanogaster* различными стрессовыми факторами // Информ. вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 3/4. С. 662–671.

Чересиз С.В., Юрченко Н.Н., Иванников А.В., Захаров И.К. Мобильные элементы и стресс // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 1/2. С. 217–242.

Akhunov E.D., Goodyear A.W., Geng S. *et al*. The organization and rate of evolution of wheat genomes are correlated with recombination rates along chromosome arms // Genome Res. 2003. V. 13. P. 753–763.

Akhunov E.D., Akhunova A.R., Dvorak J. Mechanisms and rates of birth and death of dispersed duplicated genes during the evolution of a multigene family in diploid and tetraploid wheats // Mol. Biol. Evol. 2007. V. 24. N 2. P. 539–550.

Alix K., Joets J., Ryder C.D. *et al*. The CACTA transposon *Bot1* played a major role in *Brassica* genome divergence and gene proliferation // Plant J. 2008. V. 56. N 6. P. 1030–1044.

Banks J.A., Masson P., Fedoroff N. Molecular mechanisms in the developmental regulation of the maize *Suppressor–Mutator* transposable element // Genes Dev. 1988. V. 2. P. 1364–1380.

Barnes T.M., Kohara Y., Coulson A., Hekimi S. Meiotic recombination, noncoding DNA and genomic organization in *Caenorhabditis elegans* // Genetics. 1995. V. 141. P. 159–179.

Belyayev A., Raskina O., Nevo E. Chromosomal distribution of reverse transcriptase-containing retroelements in two Triticeae species // Chromosome Res. 2001. V. 9. P. 129–136.

Bennett M.D., Leitch I.J. Nuclear DNA amounts in Angiosperms // Ann. Bot. 1995. V. 76**.** P. 113–176.

Bennetzen J.L. The contribution of retroelements to plant genome organization, function and evolution // Trends Microbiol. 1996. V. 4. P. 347–353.

Bennetzen J.L. Transposable element contributions to plant genome evolution // Plant Mol. Biol. 2000. V. 42. P. 251–269.

Bennetzen J.L., Freeling M. The unified grass genome: synergy in synteny // Genome Res. 1997. V. 7. N 4. P. 301–306.

Bennetzen J.L., Ma J., Devos K.M. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants // Ann. Bot. 2005. V. 95. P. 127–132.

Borde V., Robine N., Lin W. *et al*. Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites // EMBO J. 2009. V. 28. P. 99–111.

Brookfield J.F. Models of repression of transposition in P–M hybrid dysgenesis by P cytotype and by zygotically encoded repressor proteins // Genetics. 1991. V. 128. P. 471–486.

Bureau T.E., Ronald P.C., Wessler S.R. A computer-based systematic survey reveals the predominance of small inverted-repeat elements in wild-type rice genes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 8524–8529.

Bureau T.E., Wessler S.R. *Tourist*: a large family of inverted-repeat elements frequently associated with maize genes // Plant Cell. 1992. V. 4. P. 1283–1294.

Bureau T.E., Wessler S.R. *Stowaway*: a new family of inverted-repeat elements associated with genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants // Plant Cell. 1994. V. 6. P. 907–916.

Cao L., Alani E., Kleckner N. A pathway for generation and processing of double-strand breaks during meiotic recombination in *S. cerevisiae* // Cell. 1990. V. 61. P. 1089–1101.

Casacuberta J.M., Santiago N. Plant LTR-retrotransposons and *MITE*s: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes // Gene. 2003. V. 311. P. 1–11.

Chandler V.L., Walbot V. DNA modification of a maize transposable element correlates with loss of activity // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 1767–1771.

Chantret N., Salse J., Sabot F. *et al*. Molecular basis of evolutionary events that shaped the *Hardness* locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*) // Plant Cell. 2005. V. 17. N 4. P. 1033–1045.

Charles M., Belcram H., Just J. *et al*. Dynamics and differential proliferation of transposable elements during the evolution of the B and A genomes of wheat // Genetics. 2008. V. 180. P. 1071–1086.

Charlesworth B., Sniegowski P.D., Stephan W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes // Nature. 1994. V. 371. P. 215–220.

Cheng X., Zhang D., Cheng Z. *et al*. A new family of *Ty1-copia*-like retrotransposons originated in the tomato genome by a recent horizontal transfer event // *Genetics*. 2009. V. 181. P. 1183–1193.

Choulet F., Wicker T., Rustenholz C. *et al.* Megabase level sequencing reveals contrasted organization and evolution patterns of the wheat gene and transposable element spaces // Plant Cell. 2010. P. 1686–1701.

Copenhaver G.P., Nickel K., Kuromori T. *et al*. Genetic definition and sequence analysis of *Arabidopsis* centromeres // Science. 1999. V. 286. P. 2468–2474.

Craig N.L., Craigie R., Gellert M., Lambowitz A.M. Mobile DNA II. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 2002.

Cresse A.D., Hulbert S.H., Brown W.E. *et al*. *Mu1*-related transposable elements of maize preferentially insert into low copy number DNA // Genetics. 1995. V. 140. N 1. P. 315–324.

Devos K.M., Brown J.K., Bennetzen J.L. Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in Arabidopsis // Genome Res. 2002. V. 12. P. 1075–1079.

Devos K.M., Ma J., Pontaroli A.C. *et al*. Analysis and mapping of randomly chosen bacterial artificial chromosome clones from hexaploid bread wheat // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 19243–19248.

Diao X., Freeling M., Lisch D. Horizontal transfer of a plant transposon // PLoS Biol. 2006. V. 4. P. 119–128.

Dvorak J., Akhunov E.D., Akhunov A.R. *et al*. Molecular characterization of a diagnostic DNA marker for domesticated tetraploid wheat provides evidence for gene flow from wild tetraploid wheat to hexaploid wheat // Mol. Biol. Evol. 2006. V. 23. N 7. P. 1386–1396.

Feldman M., Lupton F.G.H., Miller T.E. Wheats // Evolution of Crops. 2nd ed. / Eds J. Smartt, N.W. Simmonds. London: Longman Scientific, 1995. P. 184–192.

Feschotte C., Pritham E.J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes // Annu. Rev. Genet. 2007. V. 41. P. 331–368.

Feschotte C., Wessler S.R. *Mariner*-like transposases are widespread and diverse in flowering plants // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 280–285.

Finnegan D.J. Transposable elements // The Genome of *Drosophila melanogaster* / Eds D.L. Lindsley, G. Zimm. N.Y.: Academic Press, 1992. P. 1096–1107.

Flavell A.J., Dunbar E., Anderson R. *et al*. *Ty1-copia* group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 3639–3644.

Frey M., Reinecke J., Grant S. *et al*. Excision of the *En/Spm* transposable element of *Zea mays* requires two element-encoded proteins // EMBO J. 1990. V. 9. N 12. P. 4037–4044.

Garfinkel D.J. Genome evolution mediated by Ty elements in Saccharomyces // Cytogenet. Genome Res. 2005. V. 110. P. 63–69.

Gómez E., Schulman A.H., Martínez-Izquierdo J.A., Vicient C.M. Integrase diversity and transcription of the maize retrotransposon Grande // Genome. 2006. V. 49. *P.* 558–562.

Grandbastien M.A., Audeon C., Bonnivard E. *et al*. Stress activation and genomic impact of *Tnt1* retrotransposons in Solanaceae // Cytogenet. Genome Res. 2005. V. 110. P. 229–241.

Grandbastien M.A., Lucas H., Morel J.B. *et al*. The expression of the tobacco *Tnt1* retrotransposon is linked to plant defense responses // Genetica. 1997. V. 100. P. 241–252.

Gu Y.Q., Coleman-Derr D., Kong X., Anderson O.D. Rapid genome evolution revealed by comparative sequence analysis of orthologous regions from four Triticeae genomes // Plant Physiol. 2004. V. 135. P. 459–470.

Hashida S.N., Kitamura K., Mikami T., Kishima Y. Temperature shift coordinately changes the activity and the methylation state of transposon *Tam3* in *Antirrhinum majus*. // Plant Physiol. 2003. V. 132. P. 1207–1216.

Hawkins J.S., Kim H., Nason J.D. *et al*. Differential lineage-specific amplification of transposable elements is responsible for genome size variation in Gossypium // Genome Res. 2006. V. 16. P. 1252–1261.

Heslop-Harrison J.S., Brandes A., Taketa S. *et al*. The chromosomal distributions of *Ty1-copia* group retrotransposable elements in higher plants and their implications for genome evolution // Genetica. 1997. V. 100. P. 197–204.

Hirochika H. Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture // EMBO J. 1993. V. 12. P. 2521–2528.

Hirochika H., Okamoto H., Kakutani T. Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the *ddm1* mutation // Plant Cell. 2000. V. 12. P. 357–369.

Hirochika H., Sugimoto K., Otsuki Y. *et al*. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 7783–7788.

Huang S., Sirikhachornkit A., Su X. *et al*. Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the Triticum/Aegilops complex and the evolutionary history of polyploid wheat // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 8133–8138.

Huang S., Li R., Zhang Z. *et al.* The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. // Nature Genetics. 2009. V. 41. P. 1275–1281.

Hudakova S., Michalek W., Presting G.G. *et al*. Sequence organization of barley centromeres // Nucl. Acids Res. 2001. V. 29. P. 5029–5035.

Huo N., Vogel J.P., Lazo G.R. *et al*. Structural characterization of Brachypodium genome and its syntenic relationship with rice and wheat // Plant Mol. Biol. 2009. V. 70. N 1/2. P. 47–61.

International Rice Genome Sequencing Project. The map-based sequence of the rice genome // Nature. 2005. V. 436. P. 793–800.

Isidore E., Scherrer B., Chalhoub B. *et al*. Ancient haplotypes resulting from extensive molecular rearrangements in the wheat A genome have been maintained in species of three different ploidy levels // Genome Research. 2005. V. 15. P. 526–536.

Iwamoto M., Higo K. *Tourist C* transposable elements are closely associated with genes expressed in flowers of rice (*Oryza sativa*) // Mol. Genet. Genomics. 2003. V. 268. N 6. P. 771–778.

Jaillon O., Aury J.M., Noel B. *et al*. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla // Nature. 2007. V. 449. N 7161. P. 463–467.

Jiang N., Bao Z., Zhang X. *et al*. An active DNA transposon family in rice // Nature. 2003. V. 421. P. 163–167.

Jiang N., Bao Z., Zhang X. *et al*. *Pack-MULE* transposable elements mediate gene evolution in plants //

Nature. 2004. V. 431. N 7008. P. 569–573.

Johns M.A., Mottinger J., Freeling M. A low copy number, *copia*-like transposon in maize // EMBO J. 1985. V. 4. P. 1093–1102.

Joseph J.L., Sentry J.W., Smyth D.R. Interspecies distribution of abundant DNA sequences in *Lilium* // J. Mol. Evol. 1990. V. 30. P. 146–154.

Kalendar R., Tanskanen J., Immonen S. *et al*. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by *BARE-1* retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 6603–6607.

Kapitonov V., Jurka J. Rolling-circle transposons in eukaryotes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 8714–8719.

Kashkush K., Feldman M., Levy A.A. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid // Genetics. 2002. V. 160. P. 1651–1659.

Kashkush K., Feldman M., Levy A.A. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat // Nat. Genet. 2003. V. 33. P. 102–106.

Kasschau K.D., Fahlgren N., Chapman E.J. *et al*. Genome-wide profiling and analysis of *Arabidopsis* siRNAs // PLoS Biol. 2007. V. 5. P. e57.

Kato M., Takashima K., Kakutani T. Epigenetic control of *CACTA* transposon mobility in *Arabidopsis thaliana* // Genetics. 2004. V. 168. P. 961–969.

Kronmiller B.A., Wise R.P. TEnest: automated chronological annotation and visualization of nested plant transposable elements // Plant Physiol. 2008. V. 146. P. 45–59.

Kumar A., Hirochika H. Applications of retrotransposons as genetic tools in plant biology // Trends Plant Sci. 2001. V. 6. P. 127–134.

Kumar A., Pearce S.R., McLean K. *et al*. The *Ty1-copia* group of retrotransposons in plants: genomic organization, evolution, and use as molecular markers // Genetica. 1997. V. 100. P. 205–217.

Langdon T., Jenkins G., Hasterok R. *et al*. A high-copy-number *CACTA* family transposon in temperate grasses and cereals // Genetics. 2003. V. 163. P. 1097–1108.

Leeton P.R.J., Smyth D.R. An abundant *LINE*-like element amplified in the genome of *Lilium speciosum* // Mol. Gen. Genet. 1993. V. 237. P. 97–104.

Lim K.Y., Kovarik A., Matyasek R. *et al*. Sequence of events leading to near-complete genome turnover in allopolyploid Nicotiana within five million years // New Phytol. 2007. V. 175. N 4. P. 756–763.

Lister R., O'Malley R.C., Tonti-Filippini J. *et al*. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis* // Cell. 2008. V. 133. P. 523–536.

Liu S., Yeh C.-T., Ji T. *et al*. *Mu* transposon insertion sites and meiotic recombination events co-localize with epigenetic marks for open chromatin across the maize genome // PLoS Genetics. 2009. V. 5. N 11. P. e1000733.

Ma J., Bennetzen J.L. Rapid recent growth and divergence of rice nuclear genomes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 12404–12410.

Ma J., Devos K.M., Bennetzen J.L. Analyses of LTR-retrotransposon structures reveal recent and rapid genomic DNA loss in rice // Genome Res. 2004. V. 14. P. 860–869.

Marais G., Mouchiroud D., Duret L. Does recombination improve selection on codon usage? Lessons from nematode and fly complete genomes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 5688–5692.

Matsuoka Y., Tsunewaki K. Presence of wheat retrotransposons in Gramineae species and the origin of wheat retrotransposon families // Genes Genet. Syst. 1997. V. 72. P. 335–343.

McClintock B. Components of action of the regulators *Spm* and *Ac* // Carnegie Inst. Wash. Yearb. 1965. V. 64. P. 527–534.

Messing J., Bharti A.K., Karlowski W.M. *et al*. Sequence composition and genome organization of maize // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 14349–14354.

Meyers B.C., Tingey S.V., Morgante M. Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome // Genome Res. 2001. V. 11. P. 1660–1676.

Mhiri C., Morel J.B., Vernhettes S. *et al*. The promoter of the tobacco *Tnt1* retrotransposon is induced by wounding and by abiotic stress // Plant Mol. Biol. 1997. V. 33. P. 257–266.

Ming R., Hou S., Feng Y. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus) // Nature. 2006. V. 452. P. 991–996.

Miura A., Yonebayashi S., Watanabe K. *et al.* Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis* // Nature. 2001. V. 411. P. 212–214.

Montgomery E.A., Huang S.M., Langley C.H., Judd B.H. Chromosome rearrangement by ectopic recombination in *Drosophila melanogaster*: genome structure and evolution // Genetics. 1991. V. 129. P. 1085–1098.

Morgante M., Brunner S., Pea G. *et al*. Gene duplication and exon shuffling by helitron-like transposons generate intraspecies diversity in maize // Nat. Genet. 2005. V. 37. N 9. P. 997–1002.

Muthukumar B., Bennetzen J.L. Isolation and characterization of genomic and transcribed retrotransposon sequences from sorghum // *Mol. Genet. Genom.* 2004. V. 271. P. 308–316.

Paterson A.H., Bowers J.E., Bruggmann R. *et al*. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of

grasses // Nature. 2009. V. 457. N 7229. P. 551–556.

Paux E., Faure S., Choulet F. *et al*. Insertion site-based polymorphism markers open new perspectives for genome saturation and marker-assisted selection in wheat // Plant Biotechnol. J. 2010. V. 8. N 2. P. 196–210.

Paux E., Roger D., Badaeva E. *et al*. Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B // Plant J. 2006. V. 48. N 3. P. 463–474.

Picault N., Chaparro C., Piegu B. *et al*. Identification of an active LTR retrotransposon in rice // Plant J. 2009. V. 58. P. 754–765.

Piegu B., Guyot R., Picault N. *et al*. Doubling genome size without polyploidization: dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice // Genome Res. 2006. V. 16. P. 1262–1269.

Pouteau S., Huttner E., Grandbastien M.A., Caboche M. Specific expression of the tobacco *Tnt1* retrotransposon in protoplasts // EMBO J. 1991. V. 10. P. 1911–1918.

Presting G.G., Malysheva L., Fuchs J., Schubert I. A *Ty3/gypsy* retrotransposon-like sequence localizes to the centromeric regions of cereal chromosomes // Plant J. 1998. V. 16. P. 721–728.

Qi J., Wijeratne A.J., Tomsho L.P. *et al*. Characterization of meiotic crossovers and gene conversion by whole-genome sequencing in *Saccharomyces cerevisiae* // BMC Genomics. 2009. V. 10. P. 475.

Ramallo E., Kalendar R., Schulman A.H., Martínez-Izquierdo J.A. *Reme1*, a *Copia* retrotransposon in melon, is transcriptionally induced by UV light // Plant Mol. Biol. 2008. V. 66. P. 137–150.

Roeder G.S., Fink G.R. DNA rearrangements associated with a transposable element in yeast // Cell. 1980. V. 21. P. 239–249.

Roulin A., Piégu B., Panaud O. Evidence of multiple horizontal transfers of the long terminal repeat retrotransposon *RIRE1* within the genus *Oryza* // Plant J. 2008. V. 53. P. 950–959.

Rubin E., Lithwick G., Levy A.A. Structure and evolution of the *hAT* transposon superfamily // Genetics. 2001. V. 158. P. 949–957.

Sabot F., Guyot R., Wicker T. *et al*. Updating of transposable element annotations from large wheat genomic sequences reveals diverse activities and gene associations // Mol. Genet. Genomics. 2005. V. 274. P. 119–130.

Salina E.A., Sergeeva E.M., Adonina I.G. *et al.* Isolation and sequence analysis of the wheat B genome subtelomeric DNA // BMC Genomics. 2009. V. 10. P. 414.

Salina E.A., Sergeeva E.M., Adonina I.G. *et al*. The *Ty3-gypsy* group LTR retrotransposon *Fatima:* the impact on B-genome specificity of polyploid wheats // BMC Plant Biol. 2011. V. 11. P. 99.

Salse J., Chagué V., Bolot S. *et al***.** New insights into the origin of the B genome of hexaploid wheat: Evolutionary relationships at the *SPA* genomic region with the S genome of the diploid relative *Aegilops speltoides* // BMC Genomics. 2008. V. 9. P. 555.

SanMiguel P., Gaut B.S., Tikhonov A. *et al*. The paleontology of intergene retrotransposons of maize // Nat. Genet. 1998. V. 20. P. 43–45.

SanMiguel P., Tikhonov A., Jin Y.K. *et al*. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome // Science. 1996. V. 274. P. 765–768.

Schmutz J., Cannon S.B., Schlueter J. *et al*. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean // Nature. 2010. V. 463. N 7278. P. 178–183.

Schnable P.S. *et al*. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics // Science. 2009. V. 326. P. 1112–1115.

Schulman A.H., Flavell A.J., Ellis T.H. The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants // Methods Mol. Biol. 2004. V. 260. P. 145–173.

Sergeeva E.M., Salina E.A., Adonina I.G., Chalhoub B. Evolutionary analysis of the *CACTA* DNA-transposon *Caspar* across wheat species using sequence comparison and *in situ* hybridization // Mol. Genet. Genomics. 2010. V. 284. N 1. P. 11–23.

Shirasu K., Schulman A.H., Lahaye T., Schulze-Lefert P. A contiguous 66 kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion // Genome Res. 2000. V. 10. P. 908–915.

Singer T., Yordan C., Martienssen R.A. Robertson's *Mutator* transposons in *A. thaliana* are regulated by the chromatin-remodeling gene *Decrease in DNA Methylation* (*DDM1*) // Genes Dev. 2001. V. 15. P. 591–602.

Stuart-Rogers C., Flavell A.J. The evolution of *Ty1-copia* group retrotransposons in Gymnosperms // Mol. Biol. Evol. 2001. V. 18. N 2. P. 155–163.

Suoniemi A., Narvanto A., Schulman A.H. The *BARE-1* retrotransposon is transcribed in barley from an LTR promoter active in transient assays // Plant Mol. Biol. 1996. V. 31. P. 295–306.

Suoniemi A., Schmidt D., Schulman A.H. *BARE-1* insertion site preferences and evolutionary conservation of RNA and cDNA processing sites // Genetica. 1997. V. 100. P. 219–230.

Suoniemi A., Tanskanen J., Schulman A.H. *Gypsy*-like retrotransposons are widespread in the plant kingdom // Plant J. 1998. V. 13. P. 699–705.

Takeda S., Sugimoto K., Otsuki H., Hirochika H. A 13-bp *cis*-regulatory element in the LTR promoter of the tobacco retrotransposon *Tto1* is involved in responsiveness to tissue culture, wounding, methyl

jasmonate and fungal elicitors // Plant J. 1999. V. 18. P. 383–393.

The *Arabidopsis* Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* // Nature. 2000. V. 408. P. 796–815.

The International Brachypodium Initiative. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon* // Nature. 2010. V. 463. P. 763–768.

Tomita M., Kuramochi M., Iwata S. *Superior*: a novel repetitive DNA element dispersed in the rye genome // Cytogenet. Genome Res. 2009. V. 125. P. 306–320.

Tomita M., Shinohara K., Morimoto M. *Revolver* is a new class of transposon-like gene composing the Triticeae genome // DNA Res. 2008. V. 15. P. 49–62.

Tuskan G.A., DiFazio S., Jansson S. *et al*. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. and Gray) // Science. 2006. V. 313. N 5793. P. 1596–1604.

Varagona M.J., Purugganan M., Wessler S.R. Alternative splicing induced by insertion of retrotransposons into the maize *waxy* gene // Plant Cell. 1992. V. 4. P. 811–820.

Vicient C.M., Kalendar R., Schulman A.H. *Envelope*-class retrovirus-like elements are widespread, transcribed and spliced, and insertionally polymorphic in plants // Genome Res. 2001. V. 11. P. 2041–2049.

Vicient C.M., Suoniemi A., Anamthawat-Jonsson K. *et al.* Retrotransposon *BARE-1* and its role in genome evolution in the genus *Hordeum* // Plant Cell. 1999. V. 11. P. 1769–1784.

Vicient C.M. Transcriptional activity of transposable elements in maize // BMC Genomics. 2010. V. 11. P. 601.

Vignols F., Rigau J., Torres M.A. *et al*. The *brown midrib3* (*bm3*) mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid O-methyltransferase // Plant Cell. 1995. V. 7. P. 407–416.

Vitte C., Bennetzen J.L. Analysis of retrotransposon structural diversity uncovers properties and propensities in angiosperm genome evolution // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 17638–17643.

Von Sternberg R.M., Novick G.E., Gao G.P., Herrera R.J. Genome canalization: the coevolution of transposable and interspersed repetitive elements with single copy DNA // Genetica. 1992. V. 86. P. 215–246.

Voytas D.F., Cummings M.P., Konieczny A.K. *et al*. *Copia*-like retrotransposons are ubiquitous among plant // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 7124–7128.

Wendel J.F. Genome evolution in polyploids // Plant Mol. Biol. 2000. V. 42. P. 225–249.

Wicker T., Stein N., Albar L. *et al.* Analysis of a contiguous 211 kb sequence in diploid wheat (*Triticum monococcum* L.) reveals multiple mechanism of genome evolution // Plant J. 2001. V. 26. P. 307–316.

Wicker T., Guyot R., Yahiaoui N., Keller B. *CACTA* transposons in Triticeae. A diverse family of high-copy repetitive elements // Plant Physiol. 2003. V. 132. P. 52–63.

Wicker T., Sabot F., Hua-Van A. *et al*. A unified classification system for eukaryotic transposable elements // Nat. Rev. Genet. 2007. V. 8. N 12. P. 973–982.

Wicker T., Taudien S., Houben A. *et al*. A whole-genome snapshot of 454 sequences exposes the composition of the barley genome and provides evidence for parallel evolution of genome size in wheat and barley // Plant J. 2009. V. 59. N 5. P. 712–722.

Wilson R.K. How the worm was won. The *C. elegans* genome sequencing project // Trends Genet. 1999. V. 15. P. 51–58.

Wright S.I., Agrawal N., Bureau T.E. Effects of recombination rate and gene density on transposable element distributions in *Arabidopsis thaliana* // Genome Res. 2003. V. 13. P. 1897–1903.

Wright D.A., Voytas D.F. *Athila4* of *Arabidopsis* and *calypso* of soybean define a lineage of endogenous plant retroviruses // Genome Res. 2002. V. 12. P. 122–131.

Zhang Q., Arbuckle J., Wessler S.R. Recent, extensive and preferential insertion of members of the miniature inverted-repeat transposable element family *Heartbreaker* (*Hbr*) into genic regions of maize // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 1160–1165.

Zhang X., Wessler S.R. Genome-wide comparative analysis of the transposable elements in the related species *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 5589–5594.

Zhao X.P., Si Y., Hanson R.E. *et al.* Dispersed repetitive DNA has spread to new genomes since polyploid formation in cotton // Genome Res. 1998. V. 8. N 5. P. 479–492.

Zilberman D., Gehring M., Tran R.K. *et al.* Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription // Nat. Genet. 2007. V. 39. P. 61–69.

TRANSPOSABLE ELEMENTS AND PLANT GENOME EVOLUTION

E.M. Sergeeva, E.A. Salina

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: sergeeva@bionet.nsc.ru

Summary

Transposable elements are the major component that contributes to plant genome plasticity. The amplification of transposable elements made a dramatic impact on the increase of plant genome size, and it might be an adaptive response to stress factors. Some plant genomes were completely or partially sequenced in the last decade. The sequencing data gave the opportunity to investigate the populations of transposable elements in plant genomes. Consequently, it was shown that plant genome evolution was accompanied by differential amplification of particular transposable element families. The differential amplification contributed to interspecific genomic divergence. It is likely that this amplification facilitated the successful formation of allopolyploid genomes.

Key words: transposable element, LTR-retrotransposon, DNA-transposon, *MITE*, differential amplification, genome divergence, allopolyploid.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ *CACTA* ДЛЯ УТОЧНЕНИЯ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ ВНУТРИ ВИДА *BRASSICA RAPA* L.

А.М. Артемьева[1], Х. Будан[2], Э. Клоке[2], Ю.В. Чесноков[1]

[1] Всероссийский НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия, e-mail: akme11@yandex.ru; yu.chesnokov@vir.nw.ru;
[2] Институт селекционных исследований садовых и овощных культур, Quedlinburg, Germany, e-mail: holger.budahn@jki.bund.de; evelyn.klocke@jki.bund.de

В дополнение к проведенному ранее изучению генетического разнообразия и внутривидовых отношений *Brassica rapa* L. методом анализа микросателлитов (Артемьева и др., 2008; Zhao *et al*., 2010) для уточнения внутривидовых филогенетических связей в этом виде впервые были использованы мобильные генетические элементы (МГЭ) II класса. Материалом исследований послужила стержневая коллекция вида, хранящаяся в ВИР (96 образцов). Применение 12 пар S-SAP-праймеров дало возможность найти 123 полиморфных маркера. Выяснено, что использование в качестве маркеров МГЭ позволяет разделить культуры вида на два основных кластера – восточноазиатских овощных и индоевропейско-азиатских масличных и корнеплодных культур, а первый кластер – на подкластеры пекинской и китайской капуст, что соответствует ботаническому делению и результатам анализа микросателлитов. Ценным дополнением к предшествующему анализу явилось разделение пекинской капусты на группы, в том числе выделение ее кочанных форм, уточнение положения формы Хирошимана, японской капусты, а также разделение масличных культур во втором кластере по географическому происхождению. Однако использование 149 SSR-маркеров и 123 S-SAP-маркеров для построения SAHN-дендрограммы позволило получить более точное положение каждого изученного образца в системе вида. В этом случае лишь несколько хорошо морфологически отличимых образцов европейской корнеплодной репы оказались дисперсно распределены между образцами второго кластера; в то время как половина образцов репы сформировала отдельную группу в пределах непальско-индийского подкластера. Возможно, это наиболее древние формы, близкие первой доместицированной центральноазиатской форме вида.

Ключевые слова: *Brassica rapa* L., ДНК-маркеры, филогения, мобильные генетические элементы (МГЭ), *CACTA*, S-SAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphism), микросателлиты (SSR).

Введение

Вид *Brassica rapa* L. (*n* = 10, геном AA) включает экономически важные масличные, овощные и кормовые культуры, листовые и корнеплодные и широко распространен на земном шаре. В этой связи генетическое разнообразие и филогенетические взаимоотношения внутри вида всегда являлись предметом интенсивного изучения различными методами, в том числе и методами молекулярного анализа ДНК, и чаще всего проводились на материале коллекций генетических ресурсов различных стран (Song *et al*., 1988, 1990; Zhao *et al*., 2005, 2010; Ling *et al*., 2007; Takuno *et al*., 2007; Warwick *et al*., 2007; Артемьева и др., 2008). В проведенных исследованиях выявлена тенденция к группировке проанализированных образцов в соответствии с их географическим происхождением в европейскую, индийскую (чаще одну евразийскую) и восточноазиатскую группы.

Известно, что повторяющиеся ДНК-мотивы представляют значительную часть эукариотического генома; они составляют как минимум 50 % генома человека (IHGSC, 2001), а у некоторых растений они могут составлять 80 % генома (Meyers *et al*., 2001; Vicient *et al*., 2001). Повторяющиеся последовательности разделены

на две большие группы: тандемные повторы, которые образуют большие блоки в геноме, в том числе сателлиты различной длины, и дисперсно распределенные повторы, которые включают мобильные генетические элементы (МГЭ) (Heslop-Harrison, 2000). На основе наличия или отсутствия промежуточной РНК транспозиции МГЭ подразделяют на два класса. МГЭ I класса объединяют ретротранспозоны, которые используют обратную транскриптазу для перевода РНК-матрицы в ДНК. МГЭ II класса – транспозоны, осуществляют транспозицию без посредника – напрямую от ДНК к ДНК.

Сравнительный анализ, проведенный с привлечением методов биоинформатики, показал, что геномы модельного растения *Arabidopsis thaliana* L. и капусты огородной *Brassica oleracea* L. ($n = 9$, геном CC), от которого произошел вид *B. rapa*, несут одни и те же мобильные элементы, хотя и в разных соотношениях, вызванных в том числе различиями в размере генома (Zhang, Wessler, 2004). Этот результат находится в соответствии с высоким уровнем геномного консерватизма между двумя видами, дивергировавшими 15–20 млн лет назад (Yang *et al*., 1999).

Несмотря на то что полностью секвенированный геном *Arabidopsis* несет все известные типы мобильных элементов (AGI, 2000), до сих пор только очень малая часть мобильных элементов *Brassica* была изучена на молекулярном уровне, при этом главным объектом изучения были МГЭ I класса. Полученные нами и нашими молдавскими коллегами результаты свидетельствуют о наличии последовательностей МГЭ II класса *Ac*, *MuDR*, *CACTA* и *Far1* в геномах шести видов рода *Brassica* (Соловьева и др., 2009). Ранее было установлено, что в геноме *B. oleracea* среди МГЭ II класса наиболее широко распространены элементы *CACTA* (Zhang, Wessler, 2004). Термин CACTA относится к элементам с инвертированными концевыми повторами (TIR, Terminal Inverted Repeats) длиной обычно 10–28 п.н., которые заканчиваются консервативным мотивом 5′-*CACTA*-3′, при этом внутренние последовательности элементов *CACTA* высоковариабельны.

В настоящее время предполагается, что повторяющиеся элементы, особенно МГЭ, являются одной из главных движущих сил геномной и генной эволюции (Bennetzen, 2005; Hawkins *et al*., 2006). В роде *Brassica CACTA*-транспозон *Bot*1 прошел несколько раундов амплификации только в геноме *B. oleracea* в отличие от генома *B. rapa*, что сыграло главную роль в недавней дивергенции двух геномов (Alix *et al*., 2008). Этими же авторами был установлен C-геном-специфичный сегмент *Bot*1. В геномах *B. rapa* и *B. napus* (AACC) они обнаружили присутствие *Bot*1-подобных *CACTA*-элементов, идентифицировали их размер и TIR-последовательности.

Целью нашей работы было посредством S-SAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphism) анализа установить, насколько *Bot*1-подобные *CACTA*-элементы широко распространены в геноме *B. rapa*, могут ли созданные на основе их последовательностей специфичные маркеры быть использованы для уточнения внутривидовой классификации *B. rapa*, какова эффективность совместного использования двух типов молекулярных маркеров, созданных на основе различных групп повторяющихся последовательностей ДНК – тандемно организованных микросателлитов и дисперсно покрывающих геном мобильных элементов *CACTA* – для филогенетических построений у вида *B. rapa*.

Материалы и методы

Растительный материал

Стержневая коллекция, отражающая ботаническое разнообразие вида *Brassica rapa*, включала 96 местных и старых селекционных образцов различного происхождения. Образцы коллекции имеют различный статус: дикие, примитивные, местные, селекционные, и т. д. К старым относятся образцы, созданные приблизительно до 1960-х гг.). Коллекция включала листовые восточноазиатские капусты: пекинскую, китайскую, розеточную, пурпурную, японскую; листовую репу, а также гибриды между подвидами листовых форм, корнеплодную репу, масличные культуры включая дикую/сорную ssp. *sylvestris*, индийские масличные культуры торию, коричневый и желтый сарсон, озимую и яровую сурепицу (табл. 1). Таксономическое деление дано по C.E. Specht и A. Diederichsen (2001) за исключением выде-

Таблица 1

Список проанализированных образцов вида *Brassica rapa* L.

Подвид/ разновидность	Сортотип	№ кат. ВИР	№ на дендрограмме и электрофореграмме	Название образца	Происхождение
ssp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt	Дунганская	139	001	Дунганская	Казахстан
	Сяо	53	008	Местный	Казахстан
		74	009	Сяо-бай-коу	Китай
		89	010	Доу-образная раннеспелая	Китай
	Чиримен	100	011	Hikoshima spring	Япония
	Нагасаки	238	007	Nagoya Market	Япония
	Шантунг	58	012	Би-це	Киргизия
		210	013	Kiriba Santo	Япония
		108	014	Местный	Китай
	Касин	132	017	Kasin	Япония
		247	018	Хасинбечу	Корея
	Чосен	122	020	Лен-син-дзон	Китай
		207	021	Chosen	Япония
	Аити	63	022	Местный	Китай
		131	023	Aichi	Япония
	Нозаки	111	025	Nozaki early	Япония
		327	026	Nozaki Harumaki	Япония
	Кага	103	028	Kaga	Япония
		88	029	Цзюй-син-бао-тоу-бай-цай	Китай
	Хоторен	127	030	Hotoren	Япония
	Чи-фу	48	031	Wong-Bok	Нидерланды
		110	033	Matsushima	Япония
	Кенсин	222	034	Kensin	Япония
	Гранат	164	036	Michihli	Канада
		71	038	Хэ-тоу-вень	Китай
	Да-цин-коу	56	039	Да-цин-коу	Китай
		128	040	Цужита	Япония
		198	041	Местный	Китай
ssp. *chinensis* (L.) Hanelt	Пиорбай	75	042	Пиорбай	Китай
	Сыюсман	77	043	Сыюсман	Китай
		Вр.930	044	Майская 8	Китай
	Тайсай	46	045	Тай-на	Россия
		106	046	Янцай	Китай
		214	047	Nicanme Jukijiro Taisai	Япония
	Ю-тсай (var.utilis)	195	048	Местный	Китай
		203	049	Ching Pang Ju Tsai	Китай
var. *rosularis* (Tsen and Lee) Hanelt	Та-гу-цай	84	050	Хэе-ю-та-цай	Китай
		129	051	Та-гу-цай	Китай
var. *narinosa* (Bailey) Hanelt	Хризантемум	154	052	Chrysanthemum heart	Китай
		213	053	Bitamin na	Япония

Продолжение таблицы 1

Подвид/ разновидность	Сортотип	№ кат. ВИР	№ на дендрограмме и электрофореграмме	Название образца	Происхождение
var. *purpuraria* (Bailey) Bailey		391	054	Xing Yang	Китай
ssp. *nipposinica* (Bailey) Hanelt	Мибуна	115	055	Mibuna	Япония
	Мизуна	159	056	Mizuna	Япония
		241	057	Shiroguki Kyona	Япония
ssp. *rapa* L. f. *Komatsuna*	Комацуна	215	059	Uzuki Komatsuna	Япония
		242	060	Goseki Late	Япония
	Куроха	264	061	Kuroha	Япония
Японские листовые овощи	Мана	372	002	Bansei Mana	Япония
	Сирона	98	003	Osaka Market	Япония
		217	004	Okute Osaka Shirona	Япония
	Хирошимана	335	005	Hiroshimana	Япония
Стабильные гибриды между подвидами		96	063	Шантай	Китай
		302	064	Гурин Дэбюу	Япония
		331	065	White Long Petiole	Япония
		436	066	Benrina	Япония
ssp. *rapa* L.	Китайский	163	058	Местный	Китай
	Остерзундомский	307	097	Остерзундомский	Россия
	Бортфельдский	385	098	Бортфельдский	Украина
	Карельская	738	099	Карельская	Россия
	Гробовская	821	100	Гробовская	Россия
	Миланская белая	826	101	Миланская белая	Россия
	Петровская	830	102	Петровская	Россия
	Тельтовский	894	103	Тельтовская	Германия
	Норфолькский фиолетовоголовый	984	104	Норфолькский	Франция
	Волынский	1050	105	Волынский	Украина
	Золотой шар	1283	106	Золотой шар	Нидерланды
ssp. *oleifera* (DC.) Metzger f. *annua*		68	062	Местный	Китай
		1	067	Kun Min ai u-zai	Китай
		2	068	Hue Zin u-zai	Китай
		11	069	Gute	Финляндия
		13	070	Местный	Аргентина
		25	071	Zsjan Su U uan-uzai 5082	Китай
		63	073	Pahsi	Индия
		106	075	Lotni mustard	Индия
		108	076	Arlo	Швеция
		114	077	Local (tetraploid)	Пакистан
		163	081	LGL	Пакистан
		192	085	Mustard	Непал
		248	088	Local	Испания

Окончание таблицы 1

Подвид/ разновидность	Сортотип	№ кат. ВИР	№ на дендрограмме и электрофореграмме	Название образца	Происхождение
ssp. *oleifera* (DC.) Metzger f. *annua*		251	089	Vat-cawte	Танзания
		301	091	BHLS	Непал
		339	095	Jui-cai-tai	Китай
		374	096	Local 88/47	Бутан
ssp. *oleifera* (DC.) Metzger f. *biennis*		166	082	Root mustard	Тунис
		337	093	U-zai-zsi	Китай
ssp. *dichotoma* (Roxb.) Hanelt		53	072	Local toria	Индия
		100	074	Local	Непал
		135	079	Ds 17	Индия
		161	080	Toria selection	Пакистан
		205	086	Sarson	Пакистан
ssp. *trilocularis* (Roxb.) Hanelt		131	078	Type 1	Индия
		188	083	Palton sarson 66	Индия
		299	090	Sangam	Индия
		338	094	Chen-du-ai-u-zai	Китай
ssp. *sylvestris* (Lam.) Janchen		176	084		Италия
		218	087	Nabo silvestre	Перу

ления ssp. *sylvestris* (Lam.) Janchen в отдельный от ssp. *oleifera* подвид.

Выделение ДНК

ДНК выделяли из молодых листьев по методике Д.Б. Дорохова и Э. Клоке (1997). Для гетерогенного (bulk)-анализа ДНК использовали 5 растений каждого образца.

S-SAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphism) анализ ДНК

Для анализа ДНК использовали стандартный метод AFLP. S-SAP анализ проводили согласно методике R. Waugh с соавт. (1997). При этом в качестве CACTA-специфичных праймеров использовали праймеры, созданные на основе TIR длиной 17 и 19 п.н., описанных в статье K. Alix и др. (2008): BoB029L16 5′-(CACTACAAGAAAACAGC)-3′ и часть BoB048N13 5′-(CACTACAAGAAAACAGCGA)-3′. Для селективной амплификации использовали Mse-CAC, Mse-CAT+CAG, Mse-CCG, Mse-CCT, Mse-CGT, Eco-ACA, которые были выбраны в предварительных тестовых испытаниях.

Электрофорез проводили в 8 %-м ПААГ с помощью автоматизированного секвенатора Li-Cor 4200 (Biosciences, Линкольн, Небраска, США), гель-документацию полученных данных выполняли с помощью программы GeneIR, предназначенной для Li-Cor. Визуализация геля проводилась в IR700 и IR800, что позволяло использовать при электрофорезе один гель для двух комбинаций праймеров.

SSR (Simple Sequence Repeats) анализ ДНК

Для SSR-анализа ДНК использовали 21 олигонуклеотидную пару sss праймеров и один BrFLCI специфичный CAPS, созданные различными авторами (www.brassica.info) и отобранные для определения полиморфизма среди образцов *B. rapa* научно-исследовательской группой селекции растений Университета Вагенингена, Нидерланды (Артемьева и др., 2008; Zhao *et al*., 2010). Выбранные праймеры продуцировали маркеры, находящиеся во всех 10 хромосомах

вида, т. е. обеспечивали хорошее покрытие генома.

ПЦР проводили в смеси объемом 12,5 µl: 10 × инкубационный буфер (1,25 µl), 0,25 µl каждого dNTP (10 mM), по 0,25 µl каждого праймера (10 pmol/µl), 0,1 µl Taq ДНК-полимеразы (5 U/µl) (Qbiogene, Германия) и 20 ng геномной ДНК.

Амплификацию осуществляли в ДНК амплификаторе (BioRad, Германия), запрограммированном на 43 цикла: 1-й цикл – первичная денатурация при 94 ºС 3 мин, 2-й цикл – денатурация при 94 ºС 1 мин, отжиг праймеров при использовании touch-down (ступенчатое понижение температуры) с 65 ºС до 56 ºС по 1 мин. Температуру понижали на 1 ºС каждый цикл до достижения финальной температуры отжига 56 ºС. Элонгацию проводили при 72 ºС 1,5 мин (10 циклов). 3-й цикл – при 94 ºС 1 мин, отжиг при 55 ºС 1 мин (30 циклов), конечное расширение при 72 ºС 5 мин.

Обработка экспериментальных данных

При оценке полученных полиморфных ПЦР-фрагментов использовали бинарную матрицу: (1) в присутствии и (0) при отсутствии соответствующего ампликона.

Расчет генетической дистанции выполняли с помощью NTSYSpc, кластерный анализ – методами UPGMA с использованием программы TREECON для Windows (версия 1.36), NJ (Neighbor Joining) и SAHN (Sequential Agglomerative Hierarchical and Nested Clustering).

Результаты

Впервые коллекция *B. rapa* (табл. 1) была проанализирована методом S-SAP с использованием праймеров, специфичных к МГЭ *CACTA*. В связи с тем что для отработки методики и учета повторяемости и воспроизводимости результатов каждый образец коллекции был представлен двумя повторностями, для построения матрицы отбирались фрагменты, встречающиеся в обеих повторностях (25 % полос были различны в двух повторностях). Также были учтены только хорошо различимые фрагменты, свойственные более чем двум образцам, что, возможно, могло привести к потере некоторых очень редких аллелей.

Проведенное изучение показало достаточно высокий уровень полиморфизма между членами вида: с 12 парами праймеров наблюдали 123 полиморфных S-SAP-фрагмента. При этом все пары праймеров обеспечили проведение нормальной амплификации. В комбинациях с праймером BoB029L16 количество полиморфных фрагментов было соответственно 9, 14, 11, 17, 15, 6 (в среднем 12 аллелей на праймер), а в комбинациях с BoB048N13 – 12, 10, 3, 9, 9, 8 (в среднем 8,5 аллелей на праймер) (примеры см. на рис. 1).

На рис. 2 представлена SAHN-дендрограмма, построенная по результатам S-SAP анализа МГЭ *CACTA*. Образцы на дендрограмме сгруппированы в два больших кластера: восточноазиатских капустных культур и масличных культур и корнеплодной репы, коэффициент подобия между кластерами 0,59.

Кластер восточноазиатских овощей, в свою очередь, разделен на подкластеры пекинской и китайской капуст, при этом образцы розеточной и пурпурной капусты (*rosularis*, *narinosa* и *purpuraria*) (50, 51, 52, 53, 54 на дендрограмме) образуют отдельную группу внутри подкластера китайской капусты вместе с родственным образцом сортотипа Ю-тсай (49). Два образца япон-ской капусты из трех расположены рядом между подкластерами пекинской и китайской капуст так же, как и японские листовые овощи Мана (2) и Хирошимана (11). За пределами подкластеров находятся несколько образцов пекинской и китайской капуст, а также образцы японских овощей Сирона (4) и Хирошимана (5). В кластер розеточной капусты попал образец коричневого сарсона из Индии (79), а два образца пекинской капусты находятся среди образцов китайской (14 и 33).

Во втором большом кластере на дендрограмме расположены образцы масличных культур вида ssp. *oleifera*, *dichotoma*, *trilocularis*, дикой ssp. *sylvestris*, а также образцы корнеплодной репы, при этом образец европейской репы сортотипа Гробовская (100 на дендрограмме) занимает в этом кластере позицию внешней группы с коэффициентом подобия 0,60. Кластер разделен на два подкластера: в первом подкластере находятся масличные культуры, ведущие

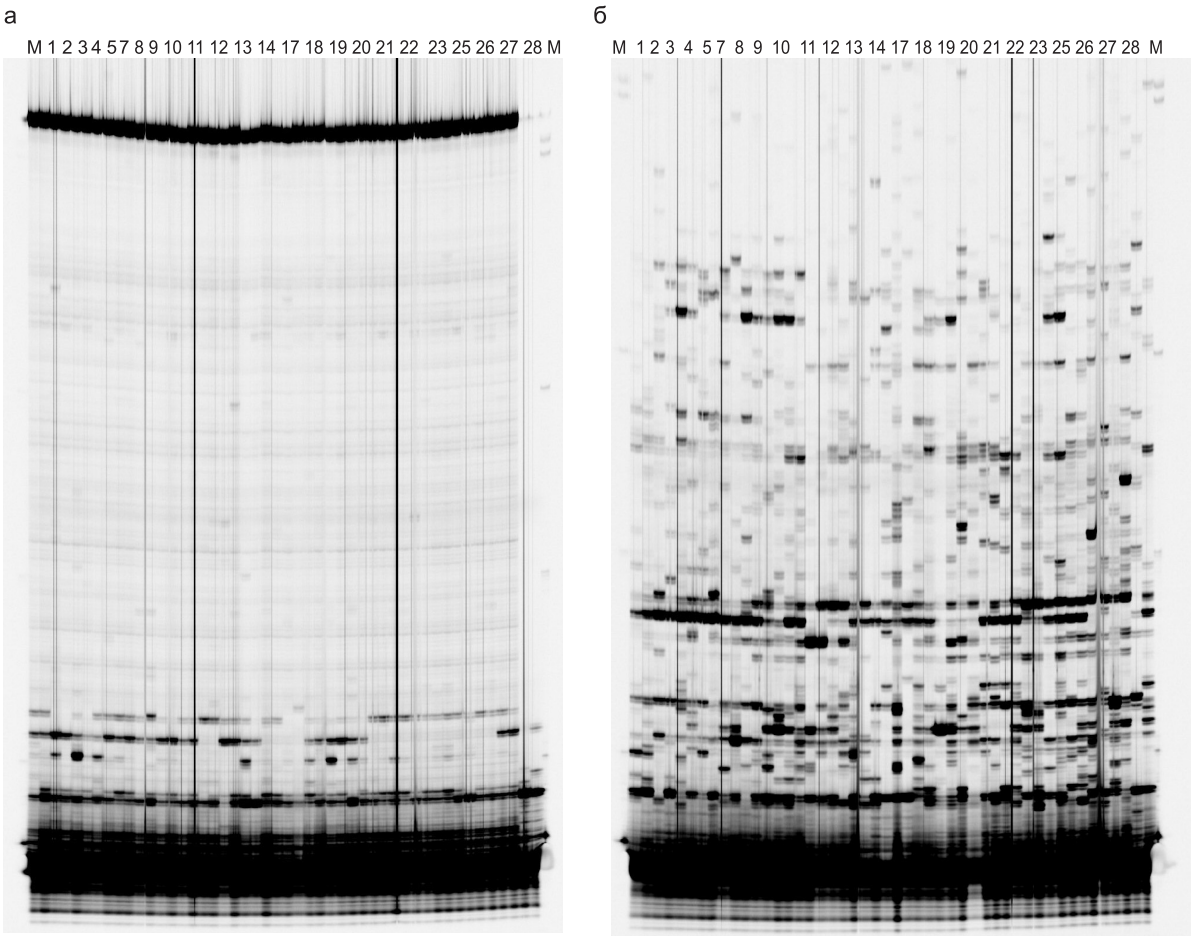


Рис. 1. Пример электрофореграмм, полученных с BoB048N13+Mse CCG (19 п.н. (а) и с BoB029L16+Mse CAC (17 пн) (б).

M – маркер молекулярной массы; 1–5, 7–14, 17–23 и 25–28 – образцы коллекции. Каждый образец представлен на двух дорожках. Нумерация, название и ботаническая принадлежность даны в табл. 1.

происхождение преимущественно из Непала и Пакистана, а во втором – из Индии и Китая. В первый подкластер вошли также масличные из Швеции, Италии, Перу, Танзании. Образцы корнеплодной репы не образовали отдельного кластера, но 5 образцов из 11 образуют группу, будучи расположенными в первом подкластере, остальные образцы корнеплодной репы оказались распределены между подкластерами. Также в этом кластере находятся образцы листовой репы Комацуна и Куроха (59, 60, 61) и стабильные гибриды между подвидами (63, 64, 65, 66). В кластер попали один образец китайской капусты, два образца пекинской капусты и образец Хирошимана (7).

На рис. 3 приведена дендрограмма, построенная с учетом SSR- и S-SAP-маркеров. На дендрограмме также отражены два больших кластера: восточноазиатских овощных культур и масличных культур и репы; за пределами кластеров находится оригинальный образец пекинской капусты Michihli (36) из Канады, а образец, ранее описанный как репа Карельская (99), находится в положении внешней группы с коэффициентом подобия 0,65.

Кластер восточноазиатских капуст разделен на подкластеры пекинской и китайской капуст, а два образца китайской капусты группируются отдельно (47 и 48), но примыкают к китайской капусте. Среди пекинской капусты отдельно сгруппированы, как и при S-SAP-анализе, сорта Дунганская (1) и сорта сортотипа Касин (17 и 18), к ним примыкают листовые японские овощи Мана (2) и Сирона (4). Типично кочанные сорта

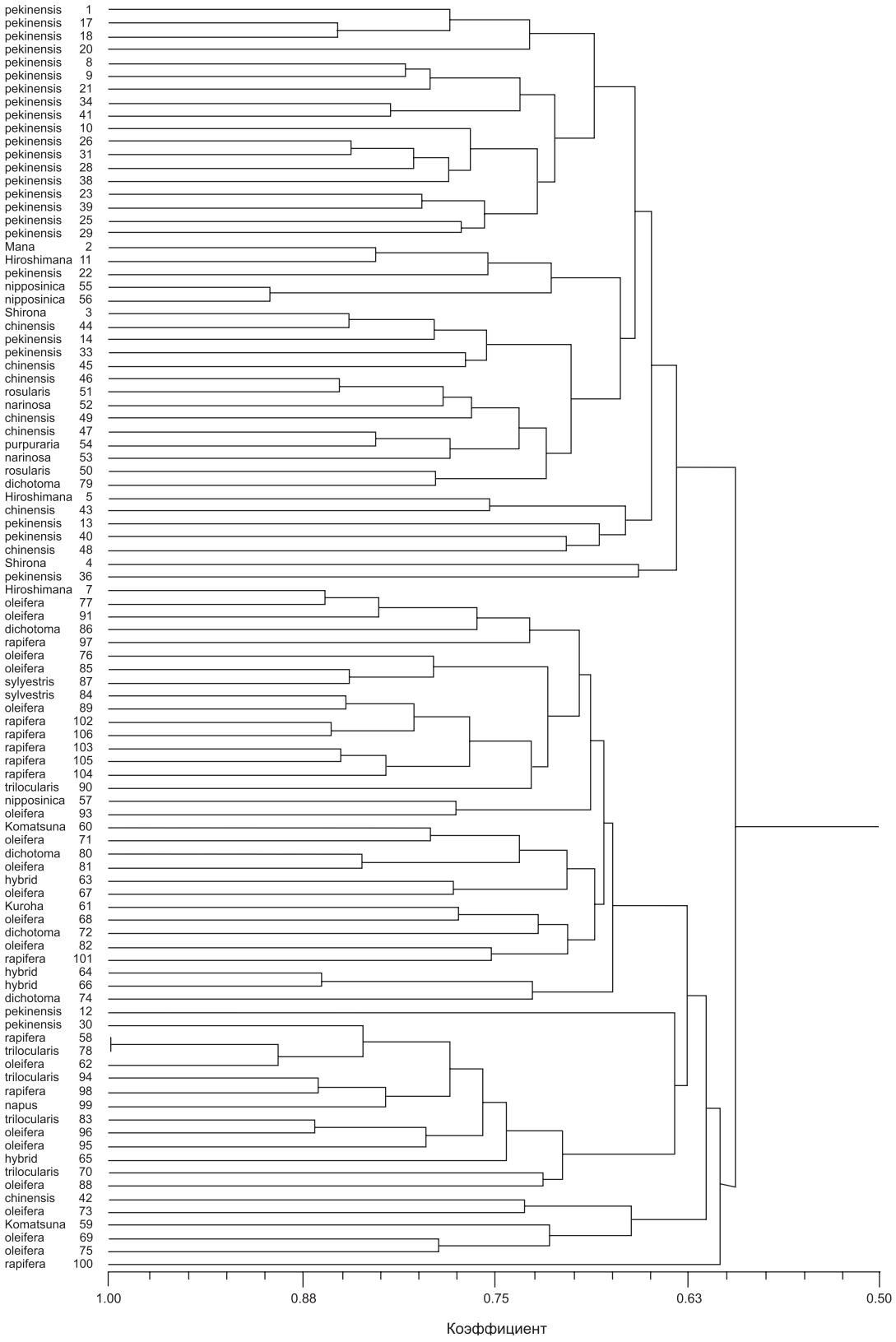


Рис. 2. SAHN-дендрограмма, построенная с использованием S-SAP-маркеров.

Расчет генетической дистанции с использованием бинарной матрицы был проведен с помощью NTSYSpc. Названия подвидов, соответствующие кластерам и подкластерам, приведены слева от дендрограммы.

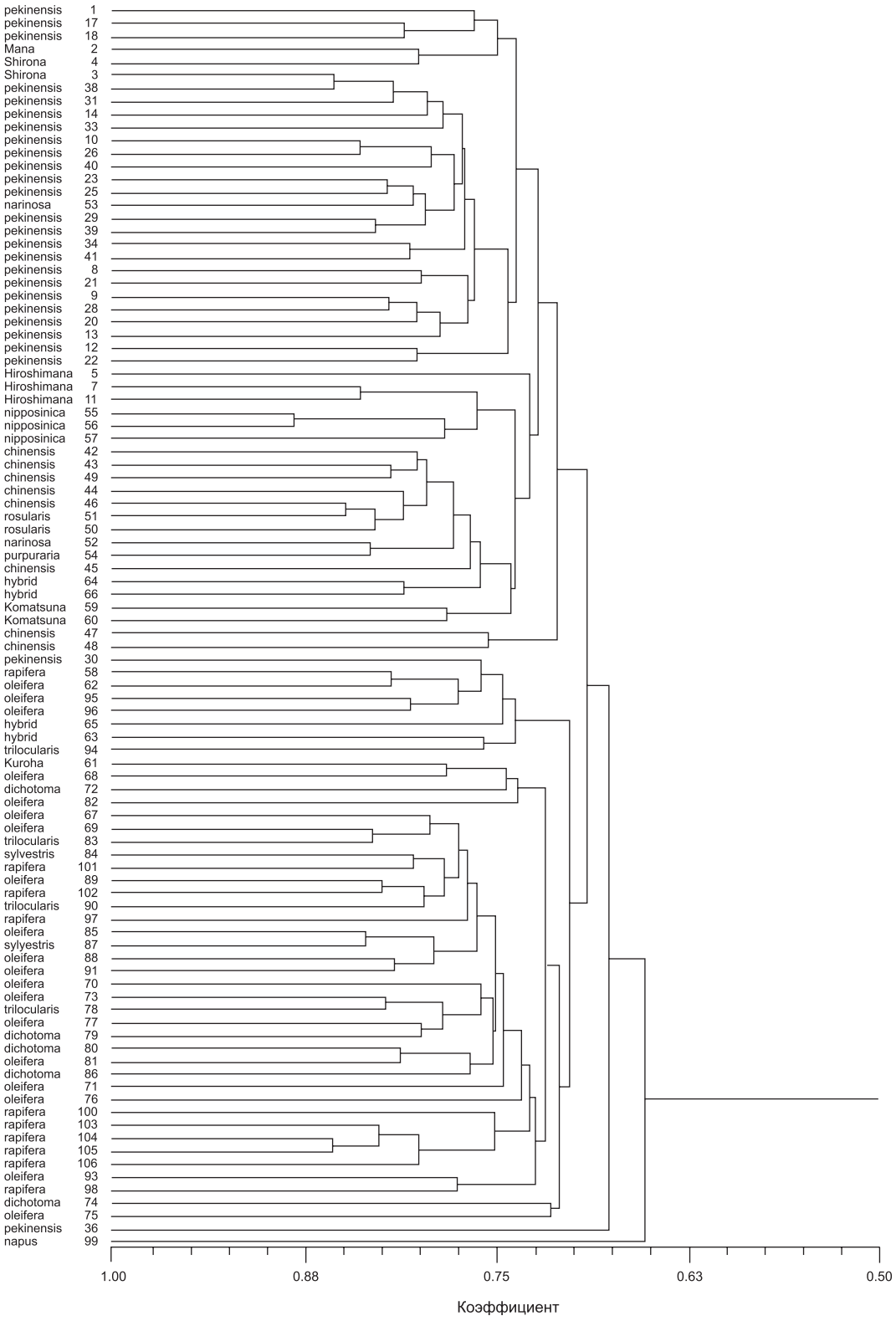


Рис. 3. SAHN-дендрограмма, построенная с использованием SSR- и S-SAP-маркеров.

Расчет генетической дистанции с использованием бинарной матрицы был проведен с помощью NTSYSpc. Названия подвидов, соответствующие кластерам и подкластерам, приведены слева от дендрограммы.

и полукочанные/кочанные с открытой вершиной образуют соответственно вторую и третью близкие группы, независимо от страны, из которой они поступили в коллекцию. Четвертая группа представлена двумя образцами различных сортотипов из Киргизии и Китая (12 и 22).

Подкластер китайской капусты включает следующие группы: Хирошимана (5, 7, 11), японскую капусту (55, 56, 57), большую группу, включающую рядом расположенные близкие образцы типично китайской капусты (42, 43, 44, 46, 49), розеточную и пурпурную капусты (50, 51, 52, 54), листовую репу Комацуна (59, 60), стабильные гибриды между подвидами китайской и розеточной капуст (64) и китайской капустой и листовой репой (66).

Индоевропейско-азиатские масличные культуры, независимо от ботанического подвида, и корнеплодная репа так же, как и в предыдущих наших исследованиях, сформировали один большой кластер. Масличные культуры китайского происхождения расположены за одним исключением в двух небольших отдельных подкластерах рядом со стабильными листовыми гибридами (63 и 65). В третьем большом подкластере находятся масличные Непала, Пакистана и Индии, а также все образцы европейской репы за исключением китайского местного образца (58) в первом подкластере. Пять образцов репы сформировали группу близких образцов (100, 103, 104, 105, 106); еще один образец репы находится рядом с ними и образцом озимой сурепицы (98). В кластер попал образец пекинской капусты Хоторен (30).

Обсуждение

Полиморфные SSR- и CAPS-локусы, выбранные для создания праймеров в настоящей работе, представляли генетические локусы всех 10 групп сцепления , т. е. обеспечивают хорошее покрытие генома *B. rapa*.

При использовании *CACTA BoB029L16* (17 п.н.) мы получили очень большое число S-SAP-фрагментов разной интенсивности, в том числе единичных, и не представлялось возможным учесть на фореграмме все полосы, продуцируемые изучаемым праймером. В то же время более специфичный *BoB048N13* (19 п.н.) продуцировал менее многочисленные хорошо организованные фрагменты (рис. 1). 20 % найденных S-SAP-фрагментов были свойственны всем изученным образцам, возможно, они являются видоспецифичными.

SAHN-метод кластеризации образцов показал результаты, наилучшим образом согласующиеся с ботаническим делением.

Филогенетическая картина, полученная при использовании в качестве маркеров концевых мотивов последовательностей МГЭ, хотя включает несколько несовпадающих с классической (традиционной) ботанической точки зрения положений, однако вносит ряд существенных поправок в результаты анализа микросателлитов. В первом большом кластере это касается, прежде всего, четкого положения всех образцов розеточной и пурпурной капуст внутри подкластера китайской капусты. Также отдельно оказались сгруппированы образцы пекинской капусты сортотипов Дунганская из Казахстана (001) и Касин и Чосен (017, 018, 020), кочанные с открытой вершиной, ведущие происхождение из Кореи, и это объединение представляется совершенно оправданным.

Во второй большой индоевропейский кластер масличных культур и корнеплодной репы попали образцы Хирошимана, листовой репы и листовые сложные гибриды восточноазиатского происхождения, что справедливо подтверждает происхождение листовых реп от корнеплодных, а также участие масличных форм в гибридизации при становлении конкретного образца и типа. Наметившееся в результате использования маркеров, разработанных на основе мотивов последовательностей МГЭ, хотя и не во всех случаях, разделение масличных культур по географическому происхождению – Непал и Пакистан, с одной стороны, и Индия и Китай – с другой, также является важным дополнением в обоснованную дифференциацию образцов вида.

При использовании двух типов молекулярных маркеров расположение ветвей дендрограммы явилось самым точным с традиционной ботанической точки зрения (рис. 3). Образец внешней группы был таковым и в случае использования SSR маркеров. Этот образец был привлечен в стержневую коллекцию как репа Карельская, но морфологический анализ подтвердил выводы анализа ДНК: видимо, при ре-

продуцировании была допущена ошибка, и этот образец – брюква *B. napus* L. ssp. *rapifera* Metzg. Образец пекинской капусты с цилиндрическим кочаном Michihli (36) из Канады при S-SAP-анализе был в кластере восточноазиатских овощных, хотя и не в группе пекинской капусты, а за пределами подкластеров. При использовании всех маркеров он остался за пределами обоих больших кластеров как второй образец внешней группы с коэффициентом подобия 0,67.

В нашей предшествующей работе при использовании анализа микросателлитов (Артемьева и др., 2008) так же, как и в работах Song с соавт. (1988) и Warwick с соавт. (2007), образцы пекинской капусты были разделены на две группы. В настоящем анализе внутри подкластера пекинской капусты выделены четыре группы. Объединение сортов Дунганская, Касин и двух морфологически близких Дунганской японских овощных, имеющих гибридное происхождение (первая группа), говорит, скорее, о родственности происхождения с участием «сильного» компонента репы. Выделение хорошо различимой группы преимущественно кочанных сортов, видимо, позволит найти маркеры, связанные с генными локусами, ответственными за формирование кочана. Выявленное разделение пекинской капусты на четыре группы представляется очень интересным и, по нашему мнению, говорит о множественном и гибридном происхождении пекинской капусты.

В предшествующих исследованиях (Zhao *et al*., 2005; Takuno *et al*., 2007; Warwick *et al*., 2007) образцы китайской капусты распадались на несколько кластеров. В наших работах при анализе микросателлитов образцы китайской капусты и гибриды с ней образовали один подкластер за исключением четырех образцов (Артемьева и др., 2008; Zhao *et al*., 2010). В настоящем исследовании все образцы китайской капусты вошли в один подкластер. Существование группы розеточной и пурпурной капусты внутри кластера китайской капусты свидетельствует о близости этих форм и правомерности включения их в ssp. *chinensis* на правах разновидностей var. *rosularis*, var. *narinosa*, var. *purpuraria*, как предложили C.E. Specht и A. Diederichsen (2001).

Японские образцы Hikoshima spring (11) и Nagoya market (7) ранее при морфологическом описании (Артемьева, 2004) были отнесены к отдельным сортотипам пекинской капусты. В дальнейших исследованиях была установлена их близость типу листовых овощей Хирошимана, возникших путем множественной гибридизации в районе Киото, который японские ботаники выделяют в ботаническую форму (Tsen, Lee, 1942). Их мнение подтверждают результаты настоящего анализа, когда упомянутые образцы вошли в подкластер китайской капусты, но образовали отдельную группу, а образец с названием собственно Хирошимана (5) на дендрограмме примыкает к ним, но отстоит от остальных типов кластера, являясь для китайской капусты внешней группой.

При анализе микросателлитов было выявлено отдельное положение части образцов японской капусты (Takuno *et al*., 2007; Warwick *et al*., 2007; Артемьева и др., 2008). По результатам настоящей работы, группа японской капусты примыкает к группе Хирошимана, образуя с ней свой кластер внутри китайской капусты, что, скорее, поддерживает мнение А.Н. Игнатова (2006) о японском происхождении этой культуры.

Группировка масличных культур и репы в один кластер при отсутствии разделения на подвиды в наших исследованиях подтверждает тесные взаимоотношения ssp. *rapa* и ssp. *oleifera*, а также общность происхождения и генетическую близость ботанических подвидов масличных культур, как об этом можно было судить по результатам морфологических исследований, RFLP, AFLP и изоэнзимного анализа (Синская, 1928; Prakash, Hinata, 1980; Song *et al*., 1988; McGrath, Quiros, 1992; Takuno *et al*., 2007; Warwick *et al*., 2007).

При *CACTA*-анализе масличные культуры объединились согласно географическому происхождению – из Непала и Пакистана, с одной стороны, и из Китая и Индии – с другой. При использовании же двух типов маркеров на дендрограмме образцы китайских масличных выделились в два кластера. Это положение подтверждает широко распространенное деление масличных *B. rapa* на яровые, озимые и китайский типы (Bonnema, 2010; Zhao, 2010).

В наших предыдущих исследованиях образцы европейской репы оказались бессистемно распределены между масличными культурами (Артемьева и др., 2008). В настоящей работе

5 образцов кластеризованы вместе и рядом с шестым, а также образцом озимой сурепицы, возможно, родственным. Этот результат свидетельствует об успешном поиске молекулярных маркеров, свойственных подвиду ssp. *rapa*, среди *CACTA* МГЭ. Остальные образцы корнеплодной репы распределены между кластерами, что, по-видимому, свидетельствует об их высокой вариабельности.

Были найдены два несоответствующих классической систематике положения образцов на дендрограмме, построенной с использованием обоих типов маркеров: положение образца розеточной капусты Bitamin na (53) и пекинской капусты Хоторен (30), но этот результат не удивителен для перекрестно опыляемых гетерогенных и гетерозиготных образцов коллекции.

Таким образом, амплифицированные последовательности МГЭ II класса *CACTA* могут быть полезны при разработке молекулярных маркеров, в частности S-SAP, благодаря разнообразию и распространенности этих последовательностей в геномах представителей *Brassica rapa*. S-SAP-маркеры могут быть напрямую использованы для анализа генетического разнообразия, филогенетических построений и геномного картирования.

Выяснено, что использование в качестве маркеров только МГЭ, как и других ранее использованных маркеров, позволяет разделить культуры вида *B. rapa* на два основных кластера: восточноазиатских овощных и индоевропейско-азиатских масличных и корнеплодных культур, а первый кластер – на подкластеры пекинской и китайской капуст, что соответствует традиционному ботаническому делению. Ценным дополнением к предшествующему анализу той же коллекции методом микросателлитов явилось разделение пекинской капусты на ботанически различные группы, в том числе выделение ее кочанных форм, уточнение положения формы Хирошимана, японской капусты, а также разделение масличных культур во втором кластере по географическому происхождению. Использование обоих типов маркеров – 149 SSR и 123 S-SAP для построения SAHN-дендрограммы позволило получить наиболее точное положение каждого изученного образца в системе вида. Только несколько морфологически хорошо отличимых образцов европейской корнеплодной репы оказались дисперсно распределены между образцами второго кластера; однако часть образцов репы сформировала отдельную группу в пределах непальско-индийского подкластера. Возможно, это наиболее древние формы, близкие первой доместицированной центрально-азиатской форме вида.

Благодарности

Работа выполнена в рамках российско-немецкого проекта 1/07 «Использование молекулярных маркеров для оценки генетических ресурсов растений».

Литература

Артемьева А.М. Доноры и источники для селекции листовых овощных культур вида *Brassica rapa* L. (Пекинская, китайская и японская капусты, листовая репа) // Каталог мировой коллекции ВИР. СПб, 2004. Вып. 740. 132 с.

Артемьева А.М., Чесноков Ю.В., Клоке Э. Генетическое разнообразие и внутривидовые филогенетические взаимоотношения культур вида *Brassica rapa* L. по результатам анализа микросателлитов // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 4. С. 608–619.

Дорохов Д.Б., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов // Генетика. 1997. Т. 33. № 4. С. 358–365.

Игнатов А.Н. Генетическое разнообразие фитопатогенных ксантомонад вида *Xanthomonas campestris* и устойчивость к ним растений семейства *Brassicaceae*: Дис. ... д-ра биол. наук. М., 2006. 350 с.

Синская Е.Н. Масличные и корнеплоды семейства *Cruciferae* // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1928. Т. 19. Вып. 3. 648 с.

Соловьева А.Е., Артемьева А.М., Чесноков Ю.В. Идентификация последовательностей элементов Ac, MuDR, Far 1 и CACTA в геномах видов рода *Brassica* // V съезд ВОГиС. М., 21–28 июня 2009 г. Ч. 1. С. 329.

Alix K., Joets J., Ryder C.D. *et al*. The CACTA transposon *Bot*1 played a major role in *Brassica* genome divergence and gene proliferation // Plant J. 2008. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03660.x

AGI, Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* // Nature. 2000. V. 408. P. 796–815.

Bennetzen J.L. Transposable elements, gene creation and genome rearrangement in flowering plants // Curr. Opin. Genet. Dev. 2005. V. 15. P. 621–627.

Bonnema G. Association mapping in *Brassica rapa*. A case study on metabolite variation comparing methods. Nov11-11 OECD. 2010.

Hawkins J.S., Kim H., Nason J.D. *et al*. Differential lineage-specific amplification of transposable elements is responsible for genome size variation in *Gossypium* // Genome Res. 2006. V. 16. P. 1252–1261.

Heslop-Harrison J.S. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes // Plant Cell. 2000. V. 12. P. 617–635.

IHGSC, Initial sequencing and analysis of the human genome // Nature. 2001. V. 409. P. 860–921.

Ling A.E., Kaur J., Burgess B. *et al*. Characterization of simple sequence repeat markers derived in silico from *Brassica rapa* bacterial artificial chromosome sequences and their application in *Brassica napus* // Mol. Ecol. Notes. 2007. V. 7. P. 273–277.

McGrath J.M., Quiros C.F. Genetic diversity at isozyme and RFLP loci in *Brassica campestris* as related to crop type and geographical origin // Theor. Appl. Genet. 1992. V. 83. P. 783–790.

Meyers B.C., Tingey S.V., Morgante M. Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome // Genome Res. 2001. V. 11. P. 1660–1676.

Prakash S., Hinata K. Taxonomy, cytogenetics and origin of crop *Brassica*, a review // Opera Bot. 1980. V. 55. P. 1–57.

Song K.M., Osborn T.C., Williams P.H. *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). 2. Preliminary analysis of subspecies within *B. rapa* (syn. *campestris*) and *B. oleracea* // Theor. Appl. Genet. 1988. V. 76. P. 593–600.

Song K.M., Osborn T.C., Williams P.H. *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). 3. Genome relationships in *Brassica* and related genera and the origin of *B. oleracea* and *B. rapa* syn. *campestris* // Theor. Appl. Genet. 1990. V. 79. N 4. P. 497–506.

Specht C.E., Diederichsen A. *Brassica* // Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops / Ed. P. Hanelt. Berlin: Springer-Verlag, 2001. V. 3. P. 1435–1465.

Takuno S., Kawahara T., Ohnishi O. Phylogenetic relationships among cultivated types of *Brassica rapa* L. em. Metzg. as revealed by AFLP analysis // Genet. Res. Crop Evol. 2007. V. 54. P. 279–285.

Tsen M., Lee S.H. A preliminary study of Chinese cultivated brassicas // Hort. Sin. Bull. 1942. V. 2. P. 1–32.

Vicient C.M., Jaaskelainen M.J., Kalendar R., Schulman A.H. Active retrotransposons are a common feature of grass genomes // Plant Physiol. 2001. V. 125. P. 1283–1292.

Warwick S.I., James T., Falk K.C. AFLP-based molecular characterization of *Brassica rapa* and diversity in Canadian spring turnip rape cultivars // Plant Genet. Res. Charact. Util. 2007. V. 6. N 1. P. 11–21.

Waugh R., McLeon K., Flavell A.J. *et al*. Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphism (S-SAP) // Mol. Gen. Genet. 1997. V. 253. P. 687–694.

Yang Y.W., Lai K.N., Tai P.Y., Li W.H. Rates of nucleotide substitution in angiosperm mitochondrial DNA sequences and dates of divergence between *Brassica* and other angiosperm lineages // J. Mol. Evol. 1999. V. 48. P. 597–604.

Zhang X., Wessler S.R. Genome-wide comparative analysis of the transposable elements in the related species *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 5589–5594.

Zhao J., Pino del Carpio D., Cumar Basnet R. *et al*. Design of a *Brassica rapa* core collection for association mapping studies // Genome. 2010. V. 53. N 11. P. 884–898.

Zhao J., Wang X., Deng B. *et al*. Genetic relationships within *Brassica rapa* inferred from AFLP fingerprints // Theor. Appl. Genet. 2005. V. 10. P. 1301–1314.

USE OF *CACTA* MOBILE GENETIC ELEMENTS FOR THE REFINEMENT OF PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AMONG *BRASSICA RAPA* L. SPECIES

A.M. Artemyeva[1], H. Budahn[2], E. Klocke[2], Yu.V. Chesnokov[1]

[1] Vavilov Institute of Plant Industry, St. Petersburg, Russia,
e-mail: akme11@yandex.ru; yu.chesnokov@vir.nw.ru;
[2] Institute for Breeding Research on Agricultural Crops, Quedlinburg, Germany,
e-mail: holger.budahn@jki.bund.de; evelyn.klocke@jki.bund.de

Summary

In addition to our previous studies of the genetic diversity and intraspecific relationships in *Brassica rapa* L. by SSR analysis, we were first to use Class II transposable elements to clarify phylogenetic relations. The core collection of 96 accessions stored at the Vavilov Institute was used in the study. Experiments with 12 S-SAP primer pairs gave rise to 123 polymorphic markers. With the use of TE markers, we divided *B. rapa* crops into two major clusters: East-Asian vegetables and Indo-European-Asian oilseed and turnip. The first cluster was divided into subclusters of Chinese cabbage and pak-choi, in agreement with the botanical division and the results of SSR analysis. The previous classification was improved by division of Chinese cabbage into groups, including a separate group of headed cabbages; refinement of the positions of the Hiroshimana and Mizuna forms; and division of oilseed according to geographical origin. However, more accurate positions of accessions in the system of the species were obtained by construction of a SAHN dendrogram with 149 SSR and 123 S-SAP markers. In this dendrogram, only few accessions of European turnip were dispersed among accessions of the other cluster, but some accessions formed a separate group in the Nepal-Indian subcluster. They are supposed to be the oldest forms closely related to the first domesticated Central-Asian *B. rapa* form.

Key words: *Brassica rapa* L., DNA markers, phylogeny, transposable elements (TEs), *CACTA*, Sequence-Specific Amplification Polymorphism (S-SAP), Simple Sequence Repeats (SSRs).

P-ЭЛЕМЕНТ КАК ИНСТРУМЕНТ АНАЛИЗА ГЕНОМА И ПРОТЕОМА *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Е.В. Мариловцева, Л.В. Омельянчук

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия, e-mail: ome@mcb.nsc.ru

В работе рассмотрены классы генетических конструкций, полученных на основе мобильных генетических элементов, используемых в генетическом анализе у *Drosophila melanogaster*.

Ключевые слова: мобильные генетические элементы, *Drosophila melanogaster*, анализ генома, ловушка энхансеров, Gal4-UAS, FLP-FRT.

Введение

Классический генетический анализ был основан на изучении изменений фенотипа особей под действием отдельных мутаций или их комбинаций. Создание генно-инженерных конструкций (назовем их условно аналитическими конструкциями), содержащих привнесенные в геном гены-репортеры и/или гены самого изучаемого организма, существенно расширила возможности генетического анализа. Так, использование истинных мутаций для генетической диссекции некоторого биологического процесса в настоящее время не является единственным способом решения задачи, поскольку имеется несколько методов инактивирования гена на уровне транскрипции или подчинения его действию чужеродного регуляторного элемента. Гиперморфные мутации в классическом генетическом анализе были крайне редки, обычно анализировались рецессивные аллели генов. Системы эктопической экспрессии значительно расширили возможности получения и исследования этого класса мутаций. Селективные схемы нахождения мутаций, затрагивающих определенную функцию, также претерпели изменения. Ловушки для генов и белков позволяют находить гены, работающие в определенной ткани. Использование Gal4-драйверов позволяет отбирать встройки ловушек по их фенотипическому эффекту на рассматриваемый орган. Таким способом может быть осуществлен более целенаправленный поиск генов, работающих в данном органе.

Настоящая работа представляет собой обзор методов исследования, использующих мобильные генетические элементы в качестве инструмента анализа генов и белков.

1. Ловушка энхансеров. Возможность введения экзогенной ДНК в геном дрозофилы с помощью микроинъекций вектора, сконструированного на основе *P*-элемента дрозофилы, была впервые продемонстрирована в 1982 г. (Rubin, Spradling, 1982). Интеграция чужеродной ДНК в геном обеспечивалась либо с помощью дисгенного скрещивания, либо с помощью примеси вектора, содержащего ген транспозазы *P*-элемента. Дальнейшее развитие этой технологии было связано с получением инсерций вектора P{Delta2-3}, содержащего ген транспозазы *P*-элемента, лишенный интрона между экзонами 2 и 3, что дало возможность получить стабильный геномный источник транспозазы. Дополнительно рассматриваемая инсерция имела делецию одного из повторов *P*-элемента, что делало ее немобильной при действии собственной транспозазы (Robertson *et al*., 1988). В работе O′Kane и Gehring (1987) была сконструирована ловушка энхансеров – вектор, содержащий репортерный ген бета-галактозидазы, находящийся под контролем слабого промотора транспозазы (рис. 1). В случае внедрения этого вектора в область хромосомного гена репортерная бета-галактозидаза начинает

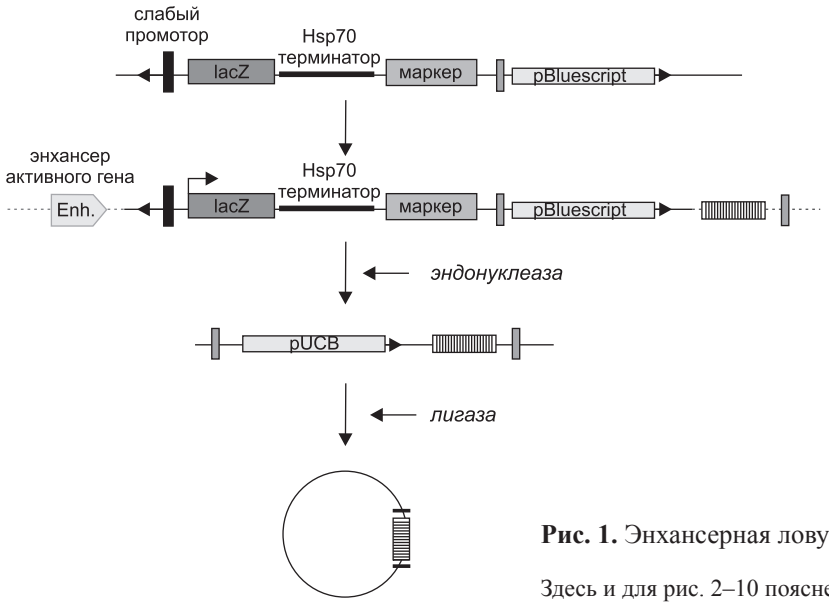


Рис. 1. Энхансерная ловушка.

Здесь и для рис. 2–10 пояснения в тексте.

синтезироваться в тех участках ткани, в которых этот хромосомный ген активен. Дополнительно в векторе была предусмотрена возможность клонирования прилежащей к инсерции геномной ДНК за счет использования внутреннего бактериального вектора, что позволило использовать процедуру «спасения» бактериальной плазмиды для этой цели. Самое существенное достижение рассматриваемой работы состояло в том, что для получения новых встроек *P*-элемента не было необходимости каждый раз трансформировать особей чужеродной ДНК. Новые трансгены могли быть получены с помощью скрещивания, в котором однажды полученная геномная встройка конструкта перемещалась в новые районы под действием стабильного источника транспозазы. Достаточно высокая частота таких перемещений (частота получения новых транспозиций в экспериментах на дрозофиле составляет величину порядка нескольких процентов) впоследствии создала возможность для полного насыщения генома дрозофилы инсерционными мутациями и последующего завершения геномного проекта на дрозофиле (Adams *et al*., 2000). Генетическая работа с конструктами типа энхансерной ловушки облегчается наличием у них репортеров встраивания (в качестве которых используются гены окраски глаз *Drosophila melanogaster*). Помимо идентификации инсерций это дает возможность получать делеции хромосомной ДНК, соседствующей со встройкой.

2. Gal4-UAS-система эктопической экспрессии. Энхансерная ловушка предназначена для обнаружения генов, обладающих интересными паттернами экспрессии. Предполагается, что дальнейшее изучение обнаруженного гена будет состоять в клонировании (с помощью встроенного бактериального вектора) и получении мутационных вариантов с помощью неточных эксцизий или незаконной рекомбинации в зародышевой линии самцов. Клонирование гена позволяет получать конструкции, в которых ген экспрессируется под чужеродным промотором. Как оказалось, последнее может быть легко осуществлено и без этапа клонирования. Достаточно внести изменения в структуру исходного вектора. В работе J. Fischer с соавт. (1988) было показано, что дрожжевой белок Gal4 и промотор UAS, с которым Gal4 связывается и начинает транскрипцию, могут функционировать в тканях дрозофилы. Систематическое использование системы началось с работы A.H. Brand и N. Perrimon (1993), в которой были сконструированы P{GawB}- и P{UAST}-транспозоны. Первый вектор представляет собой энхансерную ловушку, в которой геном-репортером является дрожжевой транскрипционный фактор Gal4. Второй вектор содержит промотор UAS (5 повторенных элементов), фланкированный TATA-боксом от hsp70 промотора, полилинкер для встраивания произвольного гена и SV40 полиА сигнал (рис. 2). Перемещая первый вектор по геному, можно

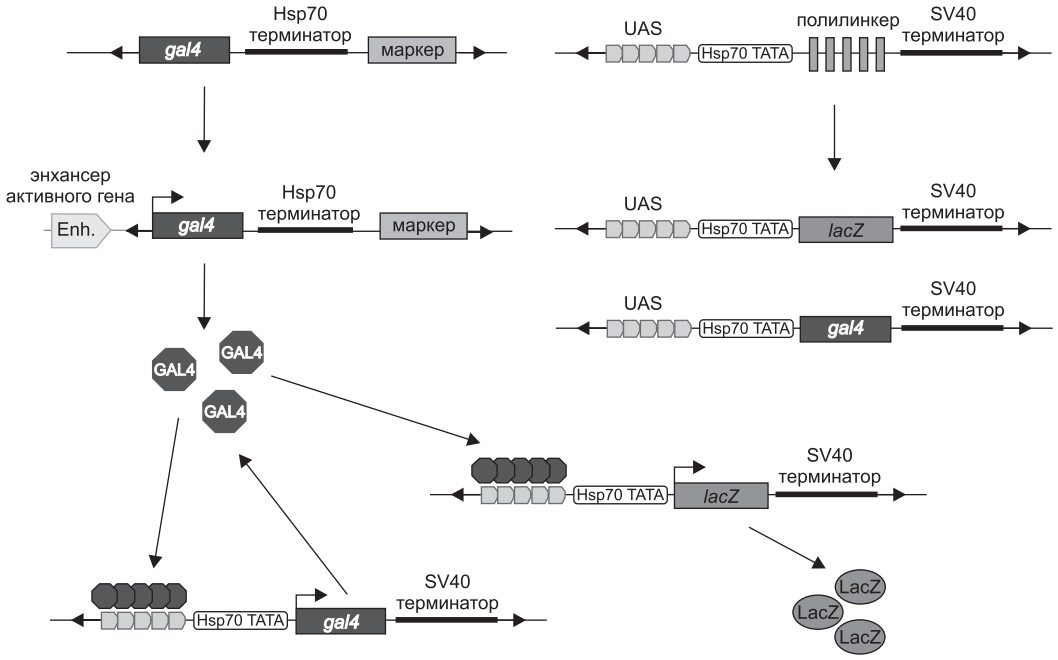


Рис. 2. Gal4-UAS-система для принудительной экспрессии генов.

получить спектр Gal4-драйверов, имеющих различные паттерны экспрессии. Изучаемый ген (или его часть) клонируется во второй вектор и экспрессируется под действием драйвера. Существующее разнообразие драйверов позволяет оверэкспрессировать исследуемый ген не только в той ткани, где он экспрессируется в норме, но также и в любой другой – мисэкпрессия (для экспрессии в зародышевой линии используют P{UASp}-вектор), что дает возможность более точно найти функцию гена. Поскольку в норме ген может иметь не одну фазу экспрессии в онтогенезе и экспрессироваться не в одной ткани, то Gal4-UAS-система позволяет дифференциально изучать каждую фазу и каждую ткань отдельно. Интересной возможностью, полученной в результате такой модификации энхансерной ловушки, является введение в геном в дополнение к Gal4-UAS-системе конструкта UAS-Gal4 (Hassan, 2000). Это дает возможность создать положительную петлю обратной связи, которая усилит экспрессию изучаемого гена, и полезно для изучения слабоэкспрессирующихся генов.

Описанный выше вариант использования Gal4-UAS-системы основан на получении серии Gal4-драйверов, под действием которых проводится оверэкспрессия изучаемого гена. Однако подвижным может быть не только элемент, содержащий Gal4, но и элемент, содержащий UAS. В работе Rorth (1996) был сконструирован *P{EP}*-элемент, содержащий GAGA-сайт (2 копии), UAS-сайт (14 копий) и hsp70-промотор, направляющий экспрессию гена, в который произойдет встройка в направлении от сайта внедрения конструкта (рис. 3). Случайные перемещения этого элемента по геному позволили создать коллекцию EP-встроек. Такая коллекция используется для нахождения генов, которые активны в заданной ткани, путем соединения в одном генотипе Gal4-драйвера, обладающего нужной ткане- или стадиеспецифичностью. Если некоторая EP-инсерция в комбинации с драйвером дает мутантный фенотип, получающийся в результате мисэкспрессии, то соответствующий ген подвергается дальнейшему изучению (Rorth, 1996).

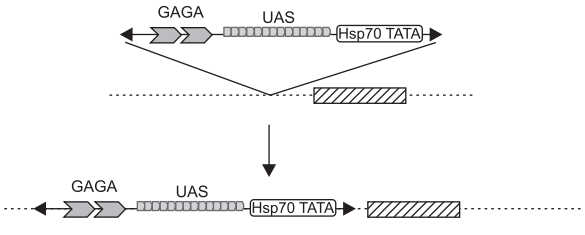


Рис. 3. *EP*-элемент.

3. Направленное создание делеций. Возможность конструирования синтетических делеций как комбинации двух транслокаций Y-хромосомы известна давно (Lindsley *et al*., 1972). Этот подход позволил покрыть весь геном этого модельного организма синтетическими делециями и найти все гаплочувствительные локусы. По существу, этот метод может считаться предшественником современных полногеномных технологий. Однако делеции, получаемые этим способом, являются слишком протяженными и не могут удовлетворить современные запросы. Предложен подход, основанный на генерации случайных транспозиций специальных конструкций (*RS3* и *RS5*) в различные районы генома с последующей генерацией обменов между внутренними FRT-сайтами полученных встроек (Golic K., Golic M., 1996). Элемент *RS3* представляет собой *P*-элемент, содержащий ген w^+, прерываемый интроном. Один FRT-сайт содержится в интроне, а другой (в той же ориентации) – в 3′-участке гена w^+. Элемент *RS5* устроен аналогично – один FRT-сайт расположен в интроне, а другой – в 5′-области гена w^+, кроме того, вся конструкция противоположно ориентирована относительно 5′- и 3′-повторов *P*-элемента. Находящиеся в интронах FRT-сайты не мешают сплайсингу гена w^+, поэтому он проявляется в исходной линии и в линиях с новыми транспозициями этих элементов (рис. 4). Следующим шагом в получении коллекции делеций является проведение выщепления (FLP-опосредованного) генетического материала, находящегося между FRT-сайтами перемещенного элемента. При этом маркер w^+ исчезает, поскольку один из его экзонов элиминируется. Эта процедура проводится как для инсерций *RS3*, так и для инсерций *RS5*. Далее выбранные инсерции *RS3* и *RS5* объединяются в геноме, и с помощью действия FLP-рекомбиназы проводится рекомбинация между гомологичными хромосомами, содержащими инсерции. Рекомбинационное событие, приводящее к возникновению дупликации, может быть обнаружено по восстановлению экспрессии маркера w^+. Практически этот подход для дрозофилы был реализован в полногеномном варианте в работе E. Ryder с соавт. (2004). Этот метод позволяет охарактеризовать точки разрывов делеции с точностью до одного нуклеотида с помощью инверс-PCR (рестрикция геномной ДНК, лигирование в кольца, PCR с праймеров на последовательность транспозона, направленных в сторону прилежащей геномной ДНК). Альтернативный метод насыщения генома дрозофилы делециями с точно картированными точками разрывов был предложен в работе (Huet *et al*., 2002). Транспозон *P{wHy}*, сконструированный в этой работе, представляет собой *P*-элемент, содержащий внутренний транспозон *hobo*, фланкированный генами y^+ и w^+ соответственно с 3′- с 5′-концов (рис. 5). Сначала проводится мобилизация этого транспозона с помощью транспозазы *P*-элемен-

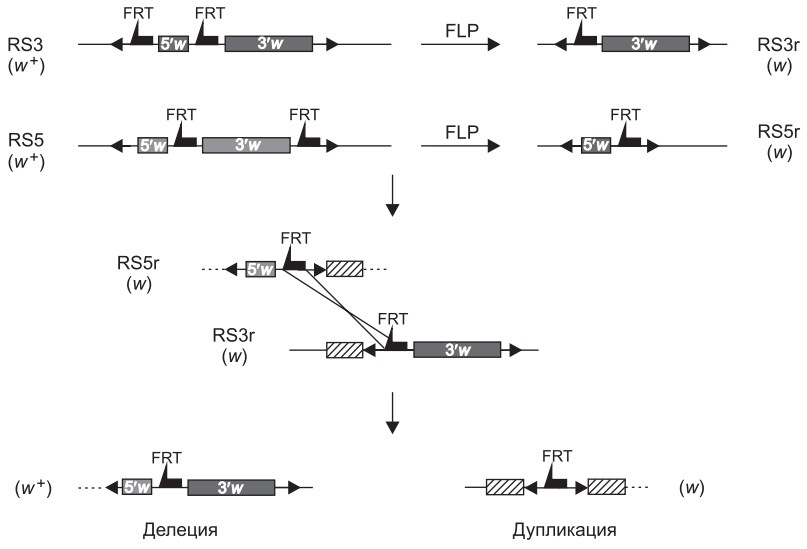


Рис. 4. Направленное получение делеций.

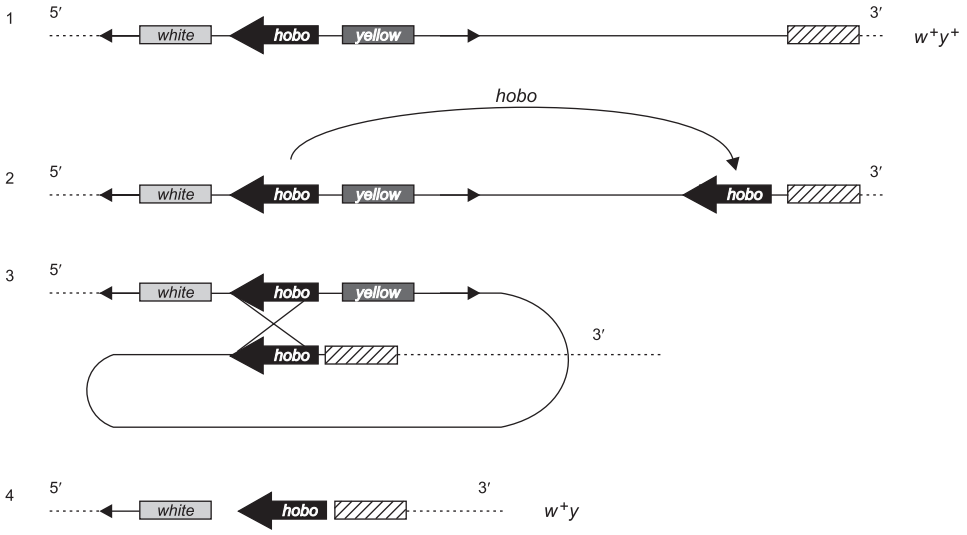


Рис. 5. Использование транспозона *hobo* для получения локализованных делеций.

та для получения инсерций в различные места генома. На втором шаге проводится мобилизация внутреннего транспозона *hobo* с помощью *hobo*-транспозазы, которая вводится в геном. Поскольку *hobo* имеет высокую частоту репликативных внутрихромосомных перемещений, то высока вероятность получения его встройки в окрестности исходной инсерции (без потери последовательности исходного внутреннего *hobo*). На третьем шаге (выделение третьего шага – условность; на самом деле эти события происходят у тех же особей, у которых вызваны перемещения *hobo*) под действием *hobo*-транспозазы происходит внутрихромосомная рекомбинация между двумя *hobo*-элементами, приводящая к появлению делеций. Направление делеций определяется по исчезновению w^+ или y^+.

4. Направленный мутагенез. Метод введения мутаций в заданный ген дрозофилы был разработан в работе У. Rong и K. Golic (2001). Для введения мутации в ген *X* получают донорный конструкт FRT-*X1*-(I-SceI)-*X2*-*MarkerGene*-FRT, фланкированный повторами *P*-элемента, и с их помощью вводят конструкт в геном дрозофилы. *X1* и *X2* – участки гена *X* в прямой ориентации, которые могут содержать вводимые мутации (I-SceI) – сайт разрезания homming-нуклеазы (CAAAACGTCGTGAGACAGTTTG) (рис. 6). С помощью скрещиваний конструируют генотип, в котором донорный конструкт сочетается с двумя другими: hsFLP и hsI-SceI. Таких особей на стадии личинки подвергают тепловому шоку, в результате которого FLP-рекомбиназа «выщепляет» участок донорного конструкта между FRT-сайтами, превращая его в экстрахромосомное кольцо ДНК. Наработанная в результате активации тепловым шоком I-SceI-нуклеаза вводит рекомбиногенный двуцепочечный разрыв в экстрахромосомное кольцо. Прямая ориентация *X1* и *X2* в донорном конструкте (и инвертированная после действия I-SceI) определяет способ рекомбинации участка с эндогенным геном *X*. В рассматриваемом случае это (ends in) рекомбинация, продуктом которой является дупликация эндогенного гена *X*, такая, что один член дупликации содержит замену, имевшуюся в *X1*-, а другой – в *X2*-участке. Члены дупликации разделены маркерным геном и прилежащим к нему FRT-сайтом. Рекомбинационные события внедрения находят в генетических скрещиваниях, наблюдая за перемещением маркера из исходного хромосомного сайта локализации донорного конструкта в район локализации эндогенного гена *X* (они должны находиться в разных хромосомах). Ends out донорный конструкт, предназначенный для введения мутации, имеет структуру *MarkerGene*-FRT-(I-SceI)-*X*-(I-SceI)-FRT. После FRT-зависимого выщепления экстрахромосомной копии ДНК и разрезания нуклеазой I-SceI получается цельный участок *X*, несущий мутацию. В результате рекомбинации, индуцированной разрывом, имеется вероят-

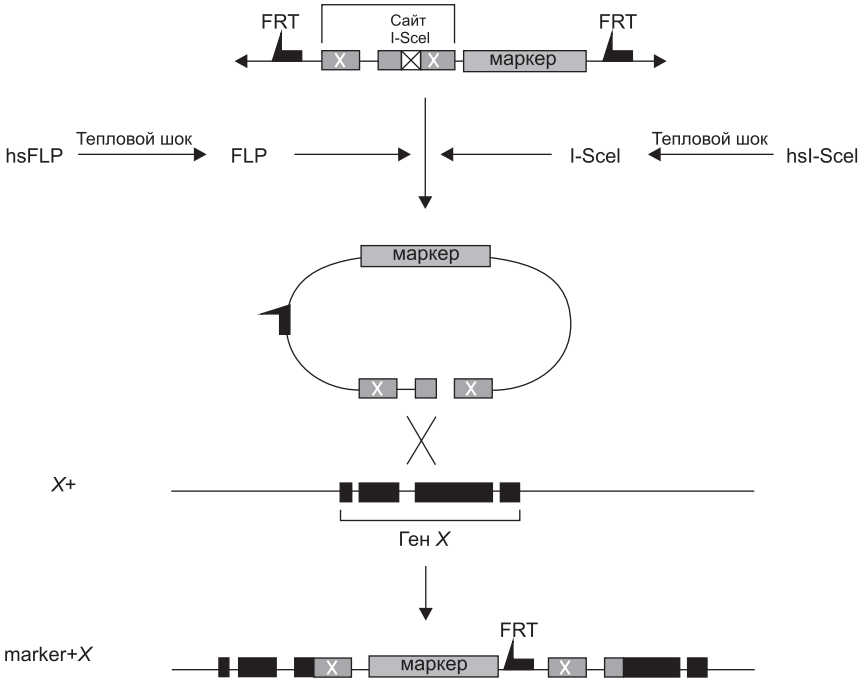


Рис. 6. Направленный мутагенез.

ность того, что два рекомбинационных обмена, расположенных по краям *X*, внесут требуемую замену в эндогенную копию этого гена (Gong, Golic, 2003). Эффективность обоих методов мало отличается.

Описанная выше стратегия основана на использовании синтетической (homming) нуклеазы цинкового пальца с повышенной специфичностью (homming – самонаводящейся) для генерации двуцепочечных разрывов в специфических сайтах генома. Последующая репарация двойных разрывов через спаривание негомологичных концов с высокой частотой будет индуцировать делеции и/или инсерции в месте соединения. Синтетическая нуклеаза цинкового пальца включает неспецифический ДНК-расщепляющий домен из эндонуклеазы Fok I и ДНК-связывающий домен, представленный тремя Cys2His2 цинковыми пальцами (Wah, 1998; Pabo *et al*., 2001). Конструирование доменов с цинковыми пальцами необходимо для того, чтобы связывать специфические ДНК последовательности, а нуклеазый домен – чтобы генерировать двуцепочечные разрывы в этом сайте (Gong, Golic, 2003).

5. Ловушки для генов и белков. У дрозофилы энхансерные ловушки встраиваются чаще в регуляторный район гена, чем в его кодирующую область, и поэтому часто не приводят к истинной генной мутации. Для поиска инсерций в кодирующую область гена была создана конструкция *P{GT1}*. Этот транспозон содержит донорный сайт сплайсинга, кодирующую область Gal4-белка и терминатор Hsp70. После внедрения конструкции в интрон гена кодирующая область Gal4 будет сшита с 5′-лежащим экзоном этого гена; в результате этого будет образован гибридный белок, способный управлять UAS-конструктами. Рассматриваемый конструкт также содержит ген w^+, обладающий промотором, лишен сигнала полиА и имеет 5′-акцепторный сайт сплайсинга. Функциональный транскрипт гена w^+ появляется только тогда, когда происходит соединение кодирующей области w^+ с 3′-лежащими экзонами гена. Оба события – образование гибридного Gal4 и функционального w^+ (по которому идентифицируется встройка) – происходят одновременно, поэтому эта система получила название двойного попадания в ген (dual tagging gene trap) (Lukacsovich, 2001) (рис. 7).

По сходной идее сконструирована и белковая ловушка GFP, представляющая собой транспозон, который, встраиваясь в интрон гена,

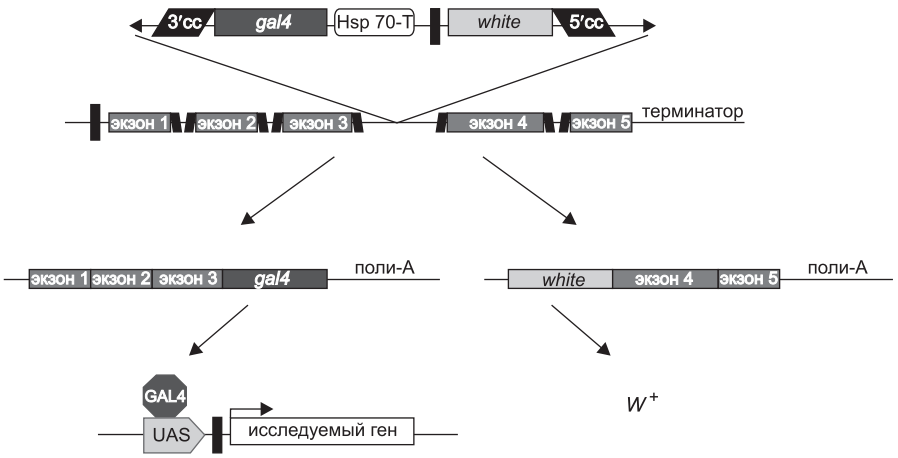


Рис. 7. Ловушка для двойного попадания в ген.

приводит к образованию в нем искусственного экзона, кодирующего GFP-белок (Morin *et al*., 2001). Кодирующая область гена *GFP* содержит донорный и акцепторный сайты сплайсинга на своих концах (рис. 8). В результате транскрипции и последующего сплайсинга может образовываться м-РНК, включающая *GFP*-экзон. При трансляции этой мРНК получается белок, содержащий полноразмерную *GFP*-часть, т. е. способный флуоресцировать. Поскольку имеются три варианта конструкции, содержащие кодирующую область *GFP* с различными сдвигами рамки считывания, то возможно осуществить попадание в любой ген с помощью одной из них. Гибридные GFP-белки крайне полезны для решения многих проблем молекулярной генетики дрозофилы. Если получена встройка в ген, то технически легко изучить паттерн экспрессии белка в развитии, определить локализацию белка в клетке, изучить динамические свойства белка в клетке.

В настоящее время в базе данных FlyTrap описаны 1522 встройки *GFP*-ловушки. Всего у дрозофилы имеется около 14 тыс. генов, среди них только для 271 гена имеются встройки *GFP*-ловушки, с которых правильно считывается гибридный GFP-белок. Таким образом, в настоящее время насыщение генома дрозофилы такими ловушками далеко не достигнуто. Вопрос был проанализирован в работе J. Aleksic (2009). Было сделано заключение о том, что для успешного насыщения генома нужно либо изготовить *GFP*-ловушку на основе менее специфичного к сайту инсерции транспозона, либо применить стратегию массового получения векторов, содержащих *GFP* кодирующую область, к которой

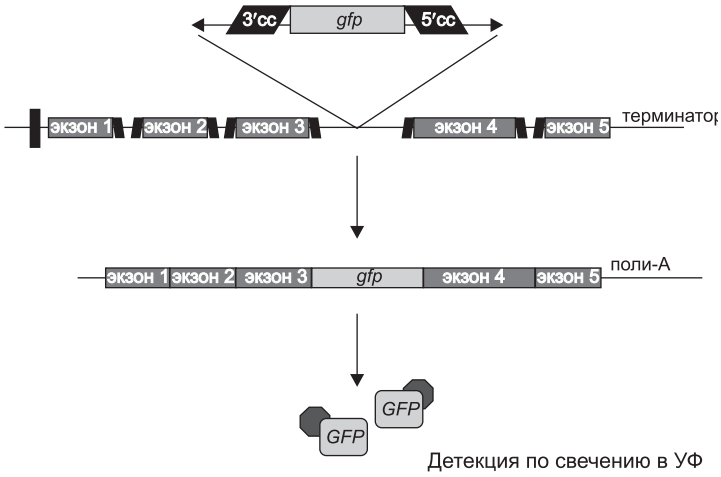


Рис. 8. *GFP*-ловушка.

«пришита» библиотека белков дрозофилы, с последующей трансформацией зародышевой линии дрозофилы клонами этой библиотеки.

6. FLP-FRT система для генерации соматического мозаицизма. У дрозофилы многие гены развития имеют один фокус действия в эмбриогенезе, а другой – на более поздних стадиях. Для того чтобы исследовать второй фокус действия прибегают к изучению фенотипа мутации в мозаичных пятнах. FLP-рекомбиназа, находящаяся под контролем промотора генов теплового шока, может быть индуцирована в любой точке развития. Это дает возможность индуцировать мозаичный клон, после того как особь пройдет первый фокус действия мутации. У дрозофилы созданы линии, содержащие FRT в основании каждого из хромосомных плеч. Это позволяет получить клоны, в которых любое из плеч находится в гомозиготном состоянии, таким образом, любая мутация может быть переведена в гомозиготное состояние (Xu, 1993). В частности, этим методом удается находить мутации по расхождению хромосом в мозаичных клонах зародышевой линии (Fedorova *et al*., 2001).

Другим подходом к изучению многофокусных мутаций является создание конструктов, содержащих конститутивный промотор (например, промотор гена актина), отделенный от кодирующей области изучаемого гена кассетой FRT-сайтов. Индукция FLP-рекомбиназы на желаемой стадии развития индуцирует выщепление FRT-кассеты, и изучаемый ген сближается с конститутивным промотором (рис. 9). Это позволяет получить сильную эктопическую экспрессию гена в ограниченном участке ткани (Struhl, Basler, 1993). Предложены также подходы для выключения гена с помощью FLP-FRT опосредованной эксцизии гена из конструкта. Экстрахромосомная копия гена легко теряется при интенсивных клеточных делениях, но может не успеть потеряться в поздних клонах. Для преодоления этой трудности предложено выщеплять из конструкта один из экзонов гена (Ahmad, Golic, 1996).

7. Ингибирование активности генов с помощью явления РНК-интерференции. Явление РНК-интерференции заключается в том, что при попадании двухцепочечной РНК в клетку она фрагментируется на 20–25 п.н. участки под действием РНКазы Dicer2 (у дрозофилы) (Liu *et al*., 2003). Эти короткие РНК включаются в состав RISC-комплексов и определяют специфичность этих комплексов при разрушении ими матричных РНК.

РНК-интерференция может быть применена для ингибирования транскрипции гена в условиях культуры тканей или при инъекциях, однако наиболее распространенным применением является транскрипция трансгенов. Конструкт для РНК-интерференционного ингибирования гена *X* представляет собой вектор, имеющий UAS-промотор, под который клонируется ген *X* (или его участок) и его инвертированная копия (рис. 10). В результате эктопической экспрессии возникает РНК шпилька, которая служит субстратом для РНК интерференции. Несмотря на положительные результаты, полученные на этом пути, оказалось, что конструкты, имеющие шпильку, нестабильны в соматических тканях (Giordano *et al*., 2002). Это заставило совершенствовать метод. Если разделить инвертированные повторы с помощью фрагмента ДНК, фланкированного сайтами сплайсинга, то проблема стабильности повторов решается. В то же время после вырезания такого искусственного интрона получается шпилька, обладающая

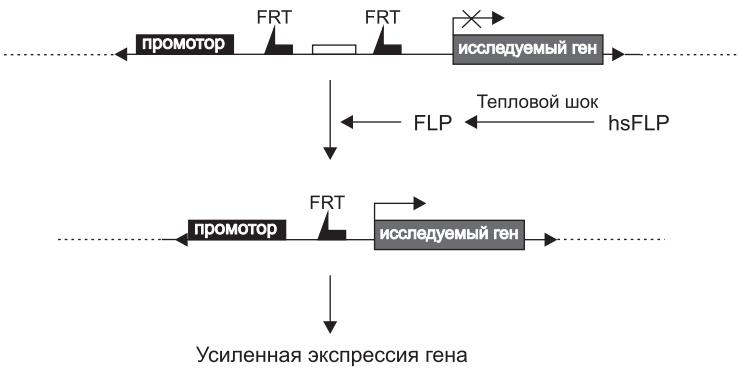


Рис. 9. Принудительная экспрессия гена в мозаичном клоне.

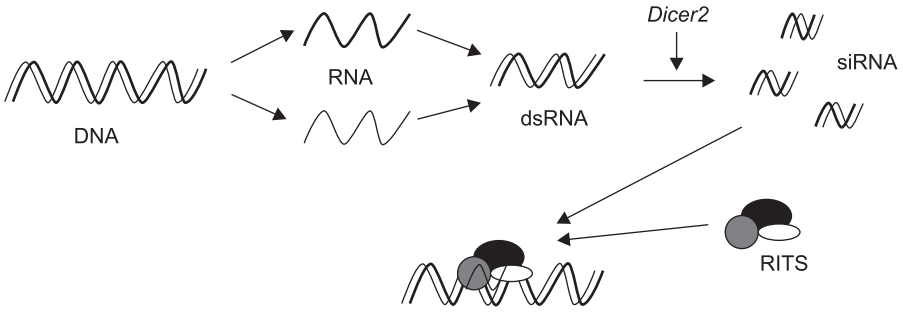


Рис. 10. Ингибирование действия гена с помощью РНК-интерференции.

РНК-интерференционными свойствами (Lee, Carthew, 2003). Другое решение проблемы стабильности состоит в том, чтобы фрагмент ДНК, используемый для транскрипции, имел два UAS-промотора, один в прямой ориентации, а другой – в инвертированной для транскрипции противоположной цепи ДНК (Giordano *et al*., 2002).

Заключение

Несмотря на то что в проекты секвенирования геномов вовлекается все больше различных видов, вряд ли следует ожидать появления новых аналитических конструкций для их анализа, поскольку уже существующие способны обеспечить решение задач определения функции данного гена. В то же время хорошая изученность генов модельных эукариот стимулирует постановку задач о построении карты взаимодействий всех пар генов модельного организма. Дрожжевая дигибридная система для поиска пар взаимодействующих белков является одним из подходов к решению этой задачи. Существующая общедоступная информация, полученная в рамках этого подхода, показывает его недостаточную разрешающую способность. Поэтому на дрожжах проводятся работы по изучению парных генетических взаимодействий между мутациями (в определенном смысле это возвращение к классическому генетическому анализу) (Tong *et al*., 2001, 2004). По всей вероятности, это направление генетических исследований со временем получит развитие и на рассматриваемых в данном обзоре модельных системах. Для того чтобы технология регистрации генных взаимодействий, детектируемых по морфологии, получила полногеномное развитие, необходимо, чтобы имелись большие коллекции мутаций. Мы полагаем, что такое развитие будет проходить через использование UAS-конструктов для эктопической экспрессии генов или, что более вероятно, за счет использования решающих ту же задачу коллекций *EP*-элементов. Возможна также другая, более близкая к клеточной биологии, ветвь исследования генных взаимодействий на уровне белков. Известно явление Fluorescence resonance energy transfer (FRET), заключающееся в том, что энергия возбужденной молекулы одного флюорохрома может переноситься на молекулу другого флуорохрома и излучаться ею в другом спектральном диапазоне, если расстояния между молекулами меньше радиуса Форстера (1–10 Å) (Selvin, 2000). Поскольку показано, что явление FRET происходит между синим флуоресцентным (BFP-донор FRET) и зеленым флуоресцентным (GFP-акцептор FRET) белками (Cubitt *et al*., 1995), то возникает возможность создания двух коллекций инсерций генных ловушек, одна из которых снабжена BFP, а другая GFP. С помощью генетических скрещиваний пары ловушек могут быть объединены в одном геноме и интенсивность FRET (пропорциональная близости белков) между ними в различных клетках может быть оценена с помощью соответствующей микроскопии.

Работа поддерживалась проектами РФФИ 10-04-00652-а и 11-04-00256-а.

Литература

Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A. *et al*. The genome sequence of *Drosophila melanogaster* // Science. 2000. V. 287. N 5461. P. 2185–2195.

Ahmad K., Golic K.G. Somatic reversion of chromosomal position effects in Drosophila melanogaster // Genetics. 1996. V. 144. N 2. P. 657–670.

Aleksic J., Lazic R., Müller I. *et al*. Biases in *Drosophila melanogaster* protein trap screens // BMC Genomics. 2009. V. 10. P. 249.

Brand A.H., Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes // Development. 1993. V. 118. N 2. P. 401–415.

Cubitt A.B., Heim R., Adams S.R. *et al*. Understanding, improving and using green fluorescent proteins // Trends Biochem. Sci. 1995. V. 20. N 11. P. 448–455.

Fedorova S., Nokkala S., Chubykin V., Omelyanchuk L. The isolation of a mutation causing abnormal cytokinesis in male and split chromocenter in female meiosis in Drosophila melanogaster // Hereditas. 2001. V. 134. N 2. P. 125–134.

Fischer J.A., Giniger E., Maniatis T., Ptashne M. GAL4 activates transcription in Drosophila // Nature. 1988. V. 332. P. 853–856.

Giordano E., Rendina R., Peluso I., Furia M. RNAi triggered by symmetrically transcribed transgenes in *Drosophila melanogaster* // Genetics. 2002. V. 160. N 2. P. 637–648.

Golic K.G., Golic M.M., Engineering the Drosophila genome: chromosome rearrangements by design // Genetics. 1996. V. 144. P. 1693–1711.

Gong W.J., Golic K.G. Ends-out, or replacement, gene targeting in Drosophila // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. N 5. P. 2556–2561.

Hassan B.A., Bermingham N.A., He Y. *et al*. *atonal* regulates neurite arborization but does not act as a proneural gene in the Drosophila brain // Neuron. 2000. V. 25. N 3. P. 549–561.

Huet F., Lu J.T., Myrick K.V. *et al*. A deletion-generator compound element allows deletion saturation analysis for genomewide phenotypic annotation // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. N 15. P. 9948–9953.

Lee Y.S., Carthew R.W. Making a better RNAi vector for Drosophila: use of intron spacers // Methods. 2003. V. 30. P. 4. P. 322–329.

Lindsley D.L., Sandler L., Baker B.S. *et al*. Segmental aneuploidy and the genetic gross structure of the Drosophila genome // Genetics. 1972. V. 71. P. 157–184.

Liu Q., Rand T.A., Kalidas S. *et al*. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway // Science. 2003. V. 301. N 5641. P. 1921–1925.

Lukacsovich T., Asztalos Z., Awano W. *et al*. Dual tagging gene trap of novel genes in Drosophila melanogaster // Genetics. 2001. V. 157. P. 727–742.

Morin X., Daneman R., Zavortink M., Chia W. A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in Drosophila // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. N 26. P. 15050–15055.

O′Kane C., Gehring W.J. Detection *in situ* of genomic regulatory elements in Drosophila // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 9123–9127.

Pabo C.O., Peisach E., Grant R.A. Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins // Annu. Rev. Biochem. 2001. V. 70. P. 313–340.

Robertson H.M., Preston C.R., Phillis R.W. *et al*. A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1988. V. 118. N 3. P. 461–470.

Rong Y.S., Golic K.G. A targeted gene knockout in Drosophila // Genetics. 2001. V. 157. N 3. P. 1307–1312.

Rorth P.A. A modular misexpression screen in Drosophila detecting tissue-specific phenotypes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. N 22. P. 12418–12422.

Rubin G.M., Spradling A.C. Genetic transformation of Drosophila with transposable element vectors // Science. 1982. V. 218. N 4570. P. 348–353.

Ryder E., Blows F., Ashburner M. *et al*. The DrosDel collection: A set of *P*-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster* // Genetics. 2004. V. 167. P. 797–813.

Selvin P.R. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer // Nat. Struct. Biol. 2000. V. 7. N 9. P. 730–734.

Struhl G., Basler K. Organizing activity of wingless protein in Drosophila // Cell. 1993. V. 72. N 4. P. 527–540.

Tong A.H., Evangelista M., Parsons A.B. *et al*. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants // Science. 2001 V. 294. N 5550. P. 2364–2368.

Tong A.H., Lesage G., Bader G.D. *et al*. Global mapping of the yeast genetic interaction network // Science. 2004. V. 303. N 5659. P. 808–813.

Xu T., Rubin G.M. Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues // Development. 1993. V. 117. N 4. P. 1223–1237.

Wah D.A., Bitinaite J., Schildkraut I., Aggarwal A.K. Structure of FokI has implications for DNA cleavage // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. N 18. P. 10564–10569.

P ELEMENT AS A TOOL FOR ANALYSIS OF THE *DROSOPHILA MELANOGASTER* GENOME AND PROTEOME

E.V. Marilovtseva, L.V. Omel'yanchuk

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: ome@mcb.nsc.ru

Types of genetic constructs derived from transposable elements and used in the genetic analysis of *Drosophila melanogaster* are considered.

Key words: transposable elements, *Drosophila melanogaster*, genome analysis, enhancer trap, Gal4-UAS, FLP-FRT.

THE UNITY OF THE WHOLE AND FREEDOM OF PARTS: FACULTATIVENESS PRINCIPLE IN THE HEREDITARY SYSTEM

M.D. Golubovsky

Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley, USA,
e-mail: mdgolub@gmail.com

Facultativeness in the genome structure and function reflects the general principle of life organization and evolution: *the unity of the whole and the freedom of parts*. The genome, or cell hereditary system code, maintains and transfers hereditary information both structurally and dynamically. The generalized genome concept presents a genome as an ensemble of both obligate and facultative elements. Template processes (Replication, Transcription and Translation) and Basic genetic processes (Repair, Recombination and Segregation) are capable of functional facultativeness and dynamic (epigenetic) modifications. It is reasonable to discriminate among three kinds of heritable changes: mutations, variations and epigenetic modifications. Structural genome facultativeness is expressed as a subdivision of cell DNA and RNA elements into two subsystems: Obligate genetic elements (OGEs) and Facultative genetic elements (FGEs). FGEs include various kinds of repeated sequences, mobile elements, amplicons, inserted viral and foreign DNA, B-chromosomes, plasmids and cytobionts. The abundance and intracellular topography of FGEs are different in different cells, tissues and individuals. Changes in the structure or order of OGEs correspond to classical mutations. For diverse changes in the number or cell/tissue topography of FGEs the term *variations* seems appropriate. Mutations and variations significantly differ in the pattern of their occurrence. Variations may occur simultaneously in many cells/individuals and are induced by nonmutagenic factors. Spontaneous hereditary changes in nature usually occur in the system ENVIRONMENT – FGEs – OGEs via a two-step pathway. FGEs are first to respond to both internal and external environmental challenges. Then their activation induces gene/chromosomal mutations. Both variations and epigenetic changes (epivariations and epimutations) may have non-Mendelian features, sometimes reminding the phenomenon of inheritance of acquired characteristics.

Key words: genome, facultative elements, mutation, variation, epigene, heritable changes.

Introduction

The genome, which in the broad sense is the cell's hereditary system, codes, stores and transfers information in both structural and dynamic ways. Thus we need to discriminate among different forms of structural heritable changes of genome and dynamic (or epigenetic) ones. The amusing absence of a strict correlation of DNA content in the haploid nuclear DNA content with the taxonomic status of species and 2–10 fold differences in genome size in closely related species was called in 1970s the «C-value paradox» (Gregory, 2001; King *et al*., 2002). It appears that in most eukaryotes protein-coding sequences constitute only small part of nuclear DNA. For example, in humans they constitute less than 5 % of the haploid nuclear DNA. Other parts comprise regulatory DNA regions (about 15 % of genomic DNA) and diverse kinds of repetitive sequences including mobile elements (International Human Genome ..., 2001). A recent study of 270 human individuals from four populations in Europe, Africa and Asia revealed a total of 1,447 copy number variable regions covering 360 megabases, or about 12 % of the genome. These variable regions contained hundreds of genes, functional elements, segmental duplications and repeats (Redon *et al*., 2006).

To describe such unusual eukaryote genome organization and its variability we suggested that two genome subsystems: OGEs, or Obligate Genetic Elements (genes and their families), and FGEs,

or Facultative Genetic Elements, be recognized. FGEs are the predominant fraction in the genome content of most eukaryotes. FGEs include various kinds of repeats, mobile elements, amplicons, viral and foreign DNA, B-chromosomes, plasmids, and nuclear/cytoplasmic cytobionts. The abundance and intracellular topography of FGEs are different in different cells, tissues and individuals. Mutations in their classical Morgan's sense (point and chromosomal) are mainly changes in the OFG subsystem. Various changes in the number or cell topography of facultative elements were named *variations* (Golubovsky, 1985, 2000; Golubovsky, Manton, 2005).

Mutations and variations differ dramatically in (i) the rate of their occurrence, (ii) the mode of genotype/environment dependence, and (iii) the stability of their positions in the genome topography. FGEs are first to respond to genetic background or environmental challenges. They constitute an operational genome memory. Activation of OFGs leads directly or indirectly to gene mutations and chromosome rearrangements. The process of heritable changes in the nature occurs in two steps, mediated mainly by mobile elements and other FGEs. Recurrent global and local mutation bursts in wild Drosophila populations were observed in long-term studies (Berg, 1982). They appeared to result from activation and insertion of diverse mobile elements (Golubovsky, 1980; Golubovsky, Belyaeva, 1985). In the case of P-M hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*, multipoint rearrangements occur mostly in the sites of insertions of *P* mobile elements (Berg *et al*., 1980; Lim, 1981). Similarly, in the *D. virilis* species, which normally has a very stable karyotype, activation and amplification of the *Penelope* mobile element lead to hybrid dysgenesis and are accompanied by multisite rearrangements. It is worth noting that about 50 % of these rearrangements discriminate various species of this Drosophila subgenus (Evgen'ev *et al*., 2000). These facts point to direct involvement of mobile elements in speciation.

The subdivision of the hereditary system into the Obligate and Facultative subsystems reflects the general principle in organization and evolution of life organisms: *the unity of the whole and the freedom of parts,* or similarity in design but differences in details. FG elements can be mobile regulators of gene expression in many chromosomal sites. Thus, the chromosome/cell topography of FGEs may predetermine the direction of genomic evolutionary changes. In this paper we discuss how diverse interactions in the OFG and FGE subsystems lead to noncanonical (non-Mendelian) heritable changes.

Facultativeness characterizes also the functioning of two triades of genetic processes universal for all living organisms: (1) Template processes – Replication, Transcription and Translation, and (2) Basic genetic processes – Recombination, Repair and Segregation. These two triades determine the coding, maintenance and transfer of genetic information during individual development and during intergeneration transmission.

The dynamic aspects of coding, storage and transfer of genetic information are called epigenetic. The spectrum of epigenetic changes is wide: from the transformation of serotypes in Paramecium to chromosomal and gene imprinting. The terminology in this field has not yet been established. We argue in favor of the heuristic value of the epigene concept, developed both in theoretical and experimental aspects (Tchuraev, 2000, 2009).

Facultativeness of genome structure and function

Genome and cell information systems. The term «genome» was coined by cytologist Winkler in 1920 to designate the haploid set of chromosome for a species. The term was used for an analysis of allopolyploid species or for such mutations as chromosome number amplification. Then its meaning widened to include the entire hereditary constitution of the cell: both structural and dynamic aspects of the coding, storage and transfer of species-specific hereditary information.

The necessity to include stochastic dynamics in the genome concept comes from the discovery of regulatory genes and specific chromosome sequences (such as enhancers). Since classical studies of Monod and Jacob in the earlier 1960s, it has been evident that the genome contains not only blueprints, but a coordinate program of protein synthesis and cell function. The holistic aspects of species-specific hereditary systems might be viewed metaphorically as the structural design of a temple that cannot be understood by studying separate breaks, genes, at one point. The discoverers of the

operon and principles of gene regulation entitled their classical paper «Teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation» (Monod, Jacob, 1961). To preserve intracellular homeostasis and the adaptive response of the genome to environmental challenges, they emphasized the biological purposefulness or the teleonomy of cell regulatory systems.

Recent molecular discoveries of signal transduction pathways and chromosome organization have shifted focus from genes as units of heredity and function to the genome as a complex dynamic system. The ability of a cell to analyze external and internal conditions (and to control growth, movement and differentiation) can be compared with an information computing network and check-points. By means of signal transduction pathways a cell receives external signals and transmits, amplifies and directs them internally. Seventeen discovered pathways are highly conserved in nematodes, flies and vertebrates (Nebert, 2002). Each pathway includes a signal-receiving receptor, membrane or cytosolic proteins including kinases and phosphatases to convey the signal, and key transcription factors capable of switching their states, activating or suppressing transcription of particular genes.

DNA repair systems remove damages. Multiple proofreading mechanisms recognize and remove errors that occur during DNA replication or due to mutagens. Repair systems allow the cells not to be passive victims of random physical and chemical forces. They control the level of mutability by modulating the repair system activity (Caporate, 2000).

Mobile elements (MEs) found now in all eukaryotic genomes, can move from one chromosomal position to another and induce chromosome rearrangements (review: Evgen'ev *et al*., 2000; Kazazian, 2004). Mobile elements contain genetic punctuation characters (promoters, enhancers, transcription termination signals, etc.), which regulate gene expression and promote the appearance of new constructs. The term «Natural Genetic Engineering», coined by Shapiro (1999, 2002), emphasizes that biotechnology uses the same enzymes (nucleases, ligases, reverse transcriptases and polymerases) that living cells use to reshuffle the genome and its function. Though MEs are repetitive and dispersed on different chromosomes, they can be activated simultaneously by a cell signal (e.g., HSP90, the genetic «capacitor») to cause outbreaks of nonrandom genetic variability.

Genome structure: obligate and facultative genetic elements. The eukaryotic genome can be naturally subdivided on two subsystems: Obligate and Faculative genetic elements. FGEs include the hierarchy of intra and extra chromosomal elements in nucleus and cytoplasm. Nuclear FGEs comprise a highly repeated and nucleated DNA sequences, pseudogenes and retrotranscripts, transposons, amplicons, and even an additional, or B-chromosome. In cytoplasm, FGEs include plasmids, amplified rod and circular segments, and endosymbionts/cytobionts (Fig. 1).

OGEs and FGEs exhibit different patterns of heritable changes. Mutations in their classical sense are changes in structure, position and number of genes. These events are connected with OGEs. Diverse changes concerning FGEs are referred to as *variations*. Let us consider the human genome (International Human Genome ..., 2001; Golubovsky, Manton, 2005). Coding sequences constitute less than 5 % of all DNA; 15–20 % is connected with gene/chromosome activity regulation. FGEs occupy about 50 % of the genome and include highly repetitive sequences, duplication of chromosome segments, and distinct MEs of four types: three kinds of retroelements (*LINE*, *SINE* and *Alu*) and one class of transposons. Segmental duplications of 1–200 kb blocks are a remarkable feature of the human genome and

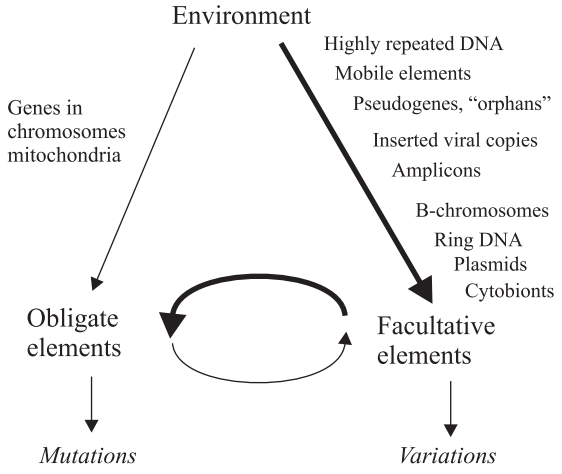


Fig. 1. Obligate and Facultative genetic elements in the genome and two types of hereditary changes: mutations and variations. Arrows indicate links, and their widths show the intensity of their forces.

comprise about 3,3 % of all DNA. Other repetitive elements are simple sequence repeats (SSRs): short repeated units, or mic-rosatellites (1–11 b.p), and longer SSRs, or minisatellites (14–500 b.p). SSRs, comprising ~ 3 % of the genome, are important in human genetic studies because they show a higher degree of length polymorphism in populations and are helpful for molecular localization. The human genome includes also several families of human endogenous retroviruses dispersed on chromosomes (Kazazian, 2004). The *LINE-1* retrotransposon, L1, is present in the human genome in 3000–5000 full-size and 500 000 truncated copies, ~ 15–17 % of the genome. About one million copies of *Alu* retrotransposons comprise 10–12 % of the genome. One of every 100–200 human births has a *de novo Alu* insertion. A similar rate is found for *L1*. More than thirty *L1*–mediated insertion mutations leading to diseases have been observed (hemophilia A and B, thalassemia, DMD).

Changes in the number and chromosome topography of the intracellular population of FGEs are drastically different from gene mutations. Wollman and Jacob (1961) were the first who studied similar hereditary changes in the phage–bacteria system and called them variations. It is clear now that variations in eukaryotes are frequent phenomena and they embrace diverse changes in intracellular populations of diverse FGEs. A typical example is the phenomenon of hybrid dysgenesis discovered in Drosophila. In an F_1 hybrid from crosses of paternal P-stock containing active *P*-transposons with females of M-stocks devoid of *P*-active copies of cytoplasmic repressor, numerous *P*-transpositions occur in the germ line, being accompanied by multiple insertion mutations and rearrangements. Their incidence in the F_1 progeny of dysgenic crosses may reach about 10 %.

Chromosomal breaks in cases of P-M hybrid dysgenesis are ordered and site specific: they occur near the *P*-site location. Multi-site inversions occur in dysgenic hybrids as often as single ones (Berg *et al*., 1980; Lim, 1981). Activation of diverse MEs in nature result in mutation bursts of definite genes in distant natural populations (Golubovsky, Belyaeva, 1985).

Variations or hereditary changes in the FGE subsystem can be induced by nonmutagenic environmental factors such as line crosses or food/temperature fluctuations.

There is a two-step pathway of the spontaneous mutation process in nature (Fig. 1). First, activation of mobile elements (significant part of FGE) in response to diverse environment challenges. Second, insertional mutations and chromosome rearrangements.

Typical examples of variation are changes in the ratio between OGEs and FGEs. These changes accompany the phenomenon of amplification of definite chromosomal segments during the development or in the course of adaptation of somatic cells to drugs that block cell division.

Amplified segments, or amplicons, can exist as tandem duplications or be transformed into plasmids or even minichromosomes, capable of autonomous replication in cytoplasm. Both the number and topography of amplicons vary over cell lines. Amplification of chromosomal segments containing *myc* oncogene occurs in 25 % of human neuroblastomas. The exact number of amplified segments cannot be determined even in daughter cloned cells (Khesin, 1984).

Records of FGE-mediated genetic variability in natural populations. Since the middle of 1960s regular monito-ring of phenotypic and genetic variability of wild Drosophila population has been conducted at the Laboratory of Population Genetics of the Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia. The data obtained in the process of this long-term population genetics study resulted in the discovery of many unknown traits of spontaneous genetic variability. We mention only the discovery of insertion mutagenesis, the finding of the first case of natural genetic engineering, observations concer-ning the role of viruses and endosymbionts in vital host animal traits, detailed analysis of a highly mutable system in the case of intralocus insertion of two ME copies, and genetic analysis of mutational changes mediated by ME insertions (Table 1).

Template and basic genetic processes and their facultativeness

The occurrence and fixation of new hereditary information are implemented via two triades of genetic events acting both in prokaryotes and eukaryotes: template and basic genetic processes. Template processes include Replication, Transcription and Translation. Basic genetic processes

Table 1

Genetic variability events mediated by Facultative genetic elements
that were observed in wild Drosophila populations and examined in genetic experiments

1	Global and local locus-specific mutability bursts are caused by ME insertions
2	Mutation fashion: synchronous activation of distinct MEs and waves of distinct ME insertions at the same target loci in geographically distant populations
3	First case of Natural genetic engineering: two genes from a wild population fall under the control of a *hobo* ME with resulting conjoint expression and mutations
4	Multiple unstable insertion alleles differing in transposition rate in the germ and somatic cells; direction and pattern of phenotypic expression
5	Picornavirus infection increases the general mutation rate; mutations in loci sensitive to viral DNA were found among those most frequent in wild populations
6	The cytobiont *Wolbachia* is ubiquitous in wild populations. It may have negative effect on host life span under optimal conditions but be adaptive under thermal stress depending on the host and *Wolbachia* genotypes
7	The transposition–homologous recombination association was discovered. ME-mediated mutations are accompanied by abnormal homological recombination events
8	ME-mediated mutations (transpositions) frequently occur during the first zygote divisions with resulting regular germline/somatic mosaicism
9	Discovery of a natural specific gene instability system induced by insertion of two identical MEs to different promoter sites and regular inversion–reinversion events between these two inserted MEs
10	Discovery of the fact that the rate of locus-specific ME-mediated mutability in germ and somatic cells depends on modifier genes and the constitution of the DNA repair system

The data presented summarize the results obtained during long-term studies at the Laboratory of Population Genetics of the Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk (Golubovsky 2000; Ilinsky, Zakharov, 2007; Zakharov *et al*., 2008; Weisman *et al*., 2009).

include Recombination, Repair and Segregation (Golubovsky, 2000; Golubovsky, Manton, 2005). To be inherited, all DNA changes need to go through template and basic genetic processes. The *E. coli* bacterium has 4,228 genes. Of them, 115 (2,7 %) are involved in replication, recombination and DNA repair; 55 (1,3 %), in transcription, synthesis and RNA modification; 182 (4,2 %), in translation and post-translation protein modification; 21, in ribosomal r-RNA synthesis; and 86, tRNA (Blattner *et al*., 1997).

There are a lot of examples of facultativeness in the cellular implementation of template and basic genetic processes. First, facultative overreplication or underreplication of chromosomal segments enriched in DNA repeats (heterochromatin areas). Amplification of definite segments is another example of facultative local DNA overreplication during development or in the cases of environmental challenges.

About 60 % of genes in humans are capable of alternative transcription and alternative splicing, depending on specific tissue or cell/tissue physiology. This ability is based on the existence of two or more promoters and the exon/intron structure of eukaryotic genes. In humans, due to alternative gene splicing, there are 2,6 transcripts per gene on the average.

Facultative translation is reliably proven in yeast. With the presence of protein Sup35, which controls a subunit of the translation termination complex and exhibits prion features, ribosomes begin to read through stop codons in an appreciable proportion of cases. This releases a hidden genetic variation and creates a variety of new phenotypes, particularly, under stress conditions (Tyedmers *et al*., 2008).

DNA repair is the main guardian against diverse errors and injuries of the DNA structure. In addition to normal mechanisms of the repair process, there are facultative ones: photoreactivation, excision and postreplicative repair. Facultative recombination includes such variants as site-specific recombination and replicative transposition of LTR-containing mobile elements. The segrega-

tion process as the necessary end of both mitotic and meiotic divisions might be also facultative as in the case of such genetic factors as Segregation Distortion or some chromosomal rearrangements (Khesin, 1984).

Dynamic epigenetic changes and the logics of an epigene

The dynamic aspects of the coding, storage and transfer of genetic formation are called epigenetic. Clear conceptual discrimination between genetic and epigenetic control systems was made more than 50 years ago by the protozoologist and geneticist David Nanney (1958). He underscored several diagnostic assumptions which point to the action of cellular epigenetic control systems: cells with same genetic material can manifest different phenotypes; the genetic potentialities of a cell are expressed in integrated patterns, when the expression of one specific trait prevents the expression of others; particular patterns of expression can be specifically induced; epigenetic alterations, although specifically induced, may be perpetuated in the absence of the inducing conditions (ciliate serotypes and mating type); some epigenetic devices are located in the nucleus. Nanney emphasized that epigenetic states and their repertoire were limited «by the information available in the genetic library».

The term *epigenotype* was introduced in 1960s. Holiday (1987, 1990) was the first who coined the term *epimutation* and associated DNA methylation with heritable variations in gene expression. The spectrum of epigenetic inheritance is very wide. It includes gene and chromosome imprinting, developmental genome reprogramming, and control of chromatin structure and dynamics (Epigenetics, 2004). There are at least four types of epigenetic inheritance systems (Jablonka, 2008): (i) self-sustaining metabolic loops (Monod, Jacob, 1961); (ii) chromatin marking mediated by histones and DNA-binding proteins; (iii) RNA-mediated variation in gene expression, and (iv) inheritance of some preexisting cellular structures (membrane) and some protein structures, prions.

Since the middle of 1970s, the concept of an *epigene* as a unit of epigenetic inheritance has been developed by R. Tchuraev. This fruitful idea was experimentally validated by an artificial epigene synthesis (Tchuraev, 2000, 2009). The epigene is an autoregulatory hereditary unit, a genetic system with cyclic links, or feedback, having two or more functional states and able to maintain each other over cell generations.

A one-component epigene scheme shown in Fig. 2 demonstrates the possibility of switching (*trans*-activation) from the inactive to active epigene state in cell epiheterozygotes. Such switching will correspond to an epimutation, displaying non-Mendelian inheritance («blending inheritance»). Noteworthy, if we imagine ten independent epigenes in the genome, the cell can have 1024

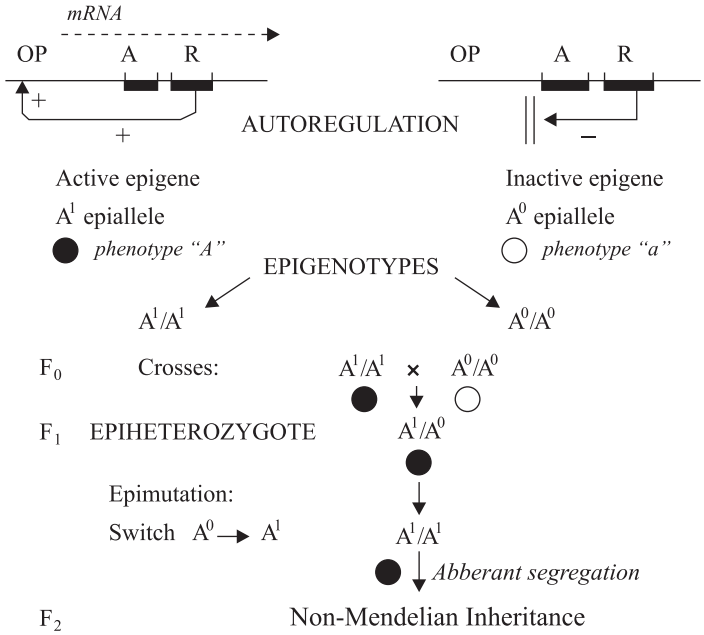


Fig. 2. Schematic presentation of an epigene.

Epigenes constitute autoregulatory feed back loops via DNA binding proteins. The figure shows the positive autoregulation at the transcription level. A^1 and A^0 designate active and inactive states of the epigene. Crosses may result in an epimutation in the progeny of F_1 epiheterozygotes.

potential states without any structural changes in DNA sequences. Their feedback can be positive, as in the bacterium–phage system with the autoregulatory *c1* gene function. The state of the *c1* gene determines the genetic switch between the lysogenic or lythic lambda phage cycles (Ptashne, 2004). Similarly, transposons *P* in Drosophila and *Ac* and *Spm* in corn are organized as epigenes with positive autoregulation.

Conclusions

The presented general approach to the genome organization and function posits the division of the genome into two subsystems, OGE and FGE, and assumes at least three types of heritable changes: mutations, variations, and epigenetic alterations. Heritable changes of diverse facultative genome elements or variations can occur simultaneously in many individuals. They can be site-specific and are induced by various weak nonmutagenic environmental factors as temperature, interstock crosses, or nutritional shifts («genotrophs» in plants). The same is true for epigenetic alterations.

Based on the comparative molecular anatomy of various MEs, Khesin (1984) postulated the general principles of their organization: terminal repeats, genetic punctuation marks (promoters and terminators), duplications flanking the site of insertion into target loci, and induction of gene instability. A hypothesis on two ways of their independent evolution, progressive and regressive, was put forward and well justified. In the former case, progressive complication may occur in the following order: insertion elements – transposons – plasmids – viruses. In the latter case, retroviruses may lose their genes or have them damaged, losing the capacity of independent replication and transposition. They exist as immobile elements of the host genome. A remarkable confirmation of such evolution is presented by the discovery of molecular polymorphism in a series of Drosophila *copia*- and *gypsy*-like MEs having long terminal repeats. Some of these MEs carry only two of three typical retrovirus genes. The *gypsy* ME has all the three retroviral genes and may be infectious, like retroviruses. As a result, they were recently recognized as first endogenic insect retroviruses and were designated as errantiviruses (Nefedova, Kim, 2007).

The *P*-transposon, omnipresent in Drosophila, and HIV in humans appear remarkably similar in evolutionary behavior and fate (Table 2). Evidently, the evolutionary fate of both *P*-element and HIV virus involves regular horizontal transfer. Due to mobile elements, the gene pool of all organisms potentially constitutes an integrated biosphere gene pool (Khesin, 1984). Transfer of genes among taxa has been well documented. In mammals and birds almost identical proviral DNA sequences appeared after the evolutionary diversification of these taxa. Mice, rats, cats, pigs, and humans became «relatives»: they carry many common rudiments of endogenous viruses. The *Mariner* transposon, first found in Drosophila, was found in different

Table 2

Similar evolution fates of two facultative elements

P element in Drosophila*	HIV retrovirus in humans**
Encodes transposase and is inserted in diverse chromosomes of the genome	Encodes integrase and is inserted in diverse sites of the human genome
~ 40-50 yr BP: global activation and rapid spread in most wild populations	~50 yr BP: global distribution in humans
Transpositions, mass germ line insertions, gonad sterility	Insertion in cells of immune systems and their damage
Horizontal transfer: both identical and divergent *P* variants in drosophilids	In diverse primates and nonhuman primate monkeys. Horizontal transfer
D. melanogaster transported from Africa to America on slavery ships	Slavery-associated transport from Africa

* *P*-like transposons, omnipresent in Drosophila, were found also in vertebrates; they are still mobile in zebra fish but immobilized in human ancestors (Hummer *et al*., 2005); ** HIV-1 virus: was transferred to humans from chimpanzees, which hosted and recombined two form of simian monkey SIV (Sharp, Hahn, 2010).

Diptera species, Crustacea, and humans. The human genome has about 14 000 copies of *Mariner*, comprising 2,6 Mb (Mandal *et al*., 2008).

Horizontal transfer of genes promoting adaptation constantly occurs in microorganisms. Gene migration by means of plasmids is necessary for bacteria to develop the resistance to antibiotics and capacity for environmental sanitation through elimination of anthropogenic pollutants. Were it not for insertion sequences and transposons/plasmids, not only numerous bacterial species but also we humans would have disappeared because of poisoning with the products of our powerful chemical industry, which is neutralized by bacteria (Khesin, 1984).

On the other side, due to this regular interspecies and intergenera horizontal transfer human beings are eternally attacked by pathogenic microorganisms arising *de novo*. To mention but one example, the genome of the cholera agent *Vibrio cholerae* bacterium was completely deciphered in 2000. It consists of two circular chromosomes, the larger, 2,96 Mb, and the smaller, 1,07 Mb. Most genes responsible for vital functions are located on the larger chromosome, whereas the smaller chromosome is thought to be a megaplasmid taken up by one of the ancestral species of the genus *Vibrio* (Heidelberg *et al*., 2000). Thus, *V. cholerae* resembles the Earth-Moon system. The «Moon», or megaplasmid, contains gene complexes that ensure interspecies transposition and genes for virulence and resistance to antibiotics. Prior to being taken up by the cholera agent, the plasmid had accumulated genes from different bacteria. Under natural conditions, nonpathogenic bacteria of the genus *Vibrio* live in river estuaties and brackish waters as component of zooplankton. The pathogenicity of *V. cholerae* resulted from its «domestication» and its entering the new ecological niche after it acquired the plasmid, which was at first a facultative component of the genome and then became semiobligate.

The broad spectrum of events discovered in modern «mobile genetics», including the principle of the unity of the whole and the freedom of parts, was outlined in experimental studies by B. McClintock about 60 years ago and about 50 years ago by French geneticists (A. Lvov, E. Wollman, and F. Jacob), who analyzed the phenomena of sexuality in bacteria *E. coli* and the behavior of the *E. coli*–lambda phage system. They came to the conclusion that there can be any forms intermediate between virus and normal cellular genetic determinants. Episomes (plasmids) may or may not be present in the cell; once in the cell, they may be located on chromosomes or in the cytoplasm and may be exogenous or pathogenic. These facultative elements erect bridges between heredity and infection, nuclear and cytoplasmic heredity, and cell pathology and physiology (Wollman, Jacob, 1961). These prophetic conclusions reflect the important principle of organization and function of all hereditary systems: the unity of the whole and the freedom of parts. The last principle was philosophically formulated as inherent in the whole organic nature by the philosopher Vladimir Solovyev in the end of the 19th century and was underlined by A.A. Lubischev (1890–1972) for the morphological evolution of living organisms.

References

Berg R.L. Mutability changes in *Drosophila melanogaster* population of Europe, Asia and North America and probable mutability changes in human populations in the USSR // Jpn. J. Genet.1982. V. 57. P. 171–183.

Berg R.L. Engels W.R., Kreber R.A. Site-specific X-chromosome rearrangements from hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster* // Science. 1980. V**.** 210. N 4468. P. 427–429.

Blattner F.R., Plunkett G., Bloch C.A. *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K12 // Science. 1997 V. 227. P. 1453–1462.

Caporate L.H. Mutation is modulated: implication for evolution // BioEssays. 2000. V. 22. P. 388–395.

Epigenetics // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 2004. V. LX1X. 532 p.

Evgen'ev M.B., Zelentsova H., Poluectova H. *et al*. Mobile elements and chromosome evolution in the virilis group of Drosophila // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 11337–11342.

Golubovsky M.D. A Century of Genetics: Evolution of Ideas and Concepts. 2000. Borey, St. Petersburg (Russia). 262 p. (Russ.)

Golubovsky M.D. Organization of genotype and types of hereditary variability of eukaryots // Biol. Bull. Rev. (Uspechi Sovrem. Biol.) (Moscow, Russia). 1985. V. 100. P. 323–339. (Russ.)

Golubovsky M.D. Mutation process and microevolution // Genetica. 1980. V. 52/53. P. 139–149.

Golubovsky M.D., Belyaeva E.S. Mutation outburst in nature and mobile genetic elements: study of a series of alleles in the singed bristle locus in *Drosophila*

melanogaster // Genetika (Moscow, Russia). 1985. V. 21. N 10. P. 1662–1670. (Russ.)

Golubovsky M.D., Manton K.G. Genome organization and three kinds of heritable changes: general description and stochastic factors (Review) // Frontiers Biosci. 2005. V. 10. P. 335–344.

Heidelberg J.F., Eisen J.A., Nelson W.C. *et al.* DNA sequencies of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae* // Nature. 2000. V. 406. P. 477–483.

Holiday R. The inheritance of epigenetic defect // Science. 1987. V. 238. P. 163–170.

Holliday R. Mechanisms for the control of gene activity during development // Biol. Rev. 1990. V. 65. P. 69–83.

Gregory T.R. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma // Biol. Rev. 2001. V. 76. N 1. P. 65–101.

Hummer S.F., Strehl S., Hageman S. Homologs of Drosophila *P* transposons were mobile in zebrafish but have been domesticated in a common ancestor of chicken and human // Mol. Biol. Evol. 2005. V. 22. N 4. P. 833–844.

International Human Genome Sequencing Consortium: Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome // Nature. 2001. V. 409. P. 860–921.

Ilinsky Yu.Yu., Zakharov I.K. The endosymbiont Wolbachia in Euroasian populations of *Drosophila melanogaster* // Russ. J. Genet. 2007. V. 43. N 7. P. 748–756.

Kazazian H. Mobile elements: drivers of genome evolution // Science. 2004. V. 303. P. 1626–1632.

Khesin R.B. Genome Inconstancy. M.: Nauka, 1984. 472 p. (Russ.).

King R.C., Stansfield W.D., Mulligan P.K. A Dictionary of Genetics. 2006. 7th ed., Oxford Univ. Press.

Lim J.K. Site-specific intrachromosomal rearrangements in *Drosophila melanogaster*: cytogenetic evidence for transposable elements // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1981. V. 45. P. 553–560.

Mandal P.K., Kazazian H.H. *SnapShot*: Vertebrate transposons // Cell. 2008. V. 135. P. 192.

Monod J., Jacob F. General conclusion: teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth and differentiation // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1961. V. 26. P. 389–401.

Nanney D.L. Epigenetic control systems // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1958. V. 44. P. 712–717.

Nebert D.W. Transcription factors and cancer: an overview // Toxicology. 2002. V. 181. P. 131–141.

Nefedova L.N., Kim A.I. Evolution of errantiviruses of *Drosophila melanogaster*. Strategy2: from retroviruses to retrotransposons // Russ. J. Genet. 2007. V. 43. N 10. P. 1161–1167.

Ptashne M. A Genetic Switch. Phage lambda revisited. 3rd ed. Cold Spring. Harbor, N.Y., 2004.

Redon R., Ishikawa S., Fitch K.R. *et al*. Global variation in copy number in the human genome // Nature. 2006. V. 444. P. 444–454.

Sharp P.M., Hahn B.M. The evolution of HIV-1 and origin of AIDS // Philos. Trans. Roy. Soc. Biol. Sci. 2010. V. 365. N 1552. P. 2487–2494.

Shapiro J.A. Genome system architecture and natural genetic engineering in evolution // Ann. NY Acad. Sci. 1999. V. 870. P. 21–35.

Shapiro J.A. Genome organization and reorganization in evoluton:formatting for computation and function // Ann. NY Acad. Sci. 2002. V. 981. P. 111–134.

Tchuraev R.N., Stupak I.V., Tropynina T.S., Stupak E.E. Epigenes: design and construction of new hereditary units // FEBS Lett. 2000. V. 486. N 3. P. 200–202.

Tchuraev R.N. Galimzyanov A.V. Gene and epigene network: two levels of organizing of hereditary system // J. Theor. Biol. 2009. V. 259. N 4. P. 659–669.

Tyedmers J., Madariaga M.L., Indquist S. Prion switching in response to environmental stress // PloS Biol. 2008. V. 6. N 11. P. 2605–2614.

Weisman N.Ya., Ilinsky Yu.Yu., Golubovsky M.D. Population genetic analysis of *D. melanogaster* longevity: similar effects of endosymbiont Wolbachia and tumor suppressor *lgl* under conditions of temperature stress // Zhurnal Obschei Biologii. (Moscow, Russia). 2009. V. 8. N 1. P. 425–434. (Russ.)

Wollman E.L., Jacob F. Sexuality and the Genetics of Bacteria. Academic Press, 1961.

Yablonka E. The epigenome in evolution: beyond the modern synthesis // The Herald of Vavilov Soc. for Geneticists and Breedinhg Scientists. 2008. V. 12. N 1/2. P. 242–254.

Zakharov I.K., Vaulin O.V., Ilinsky Yu.Yu. *et al*. Sources of genetic variability in natural populations of *Drosophila melanogaster* // The Herald of Vavilov Soc. for Geneticists and Breedihg Scientists. 2008. V. 12. N 1/2. P. 112–126. (Russ.)

10 марта 2011 г. на 66 году жизни после продолжительной болезни скончался заведующий лабораторией селекции и семеноводства яровой пшеницы ГНУ Поволжский НИИСС имени П.Н. Константинова, доктор сельскохозяйственных наук, профессор **ГОЛОВОЧЕНКО Анатолий Петрович**

Анатолий Петрович родился 7 декабря 1945 г. в г. Кинеле Куйбышевской области в семье рабочего. В 1964 г. окончил среднюю школу № 2 г. Кинеля с золотой медалью. С 1964 по 1970 гг. учился в Куйбышевском политехническом институте им. В.В. Куйбышева на инженерно-технологическом факультете. По окончании института получил квалификацию инженера-электромеханика и в 1970–1973 гг. работал инженером конструктором в НИИ г. Балашиха Московской области. Затем с 1973 по 1977 гг. работал старшим инженером-испытателем на Зональной Поволжской машиноиспытательной станции в вычислительном центре. С 1978 по 1986 гг. работал начальником вычислительного центра Куйбышевского СХИ и учился (с 1982 по 1986 гг.) в аспирантуре ВИР им. Н.И. Вавилова в Ленинграде. После окончания успешно защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности «Селекция и семеноводство». С 1987 по 1990 гг. работал старшим преподавателем кафедры «Управление и вычислительная техника» Куйбышевского СХИ.

А.П. Головоченко работал в Поволжском НИИСС им. П.Н. Константинова с августа 1990 г., сначала в должности заведующего лабораторией математического обеспечения научных исследований, а с 1992 г. – заведующим лабораторией и отделом селекции и семеноводства яровой пшеницы и по совместительству ученым секретарем института.

В 2000 г. А.П. Головоченко успешно защитил докторскую диссертацию на тему: «Особенности адаптивной селекции мягкой яровой пшеницы в лесостепной зоне Среднего Поволжья» по специальности «Селекция и семеноводство» (г. Саратов).

Постоянное стремление к познанию и совершенствованию селекционно-семеноводческого процесса, успешная разработка методологических и поисковых работ, достигнутые результаты по созданию новых высокоурожайных сортов яровой пшеницы обеспечили ему высокую оценку и признание коллег в агробиологической науке.

Научное наследие А.П. Головоченко составляет более 80 научных трудов в том числе: 3 монографии, 4 учебных пособия, 2 методических рекомендации, 7 изобретений. Под его руководством в лаборатории селекции и семеноводства яровой пшеницы выведены такие сорта, как Кинельская 59, Кинельская 60, Кинельская 61, Кинельская нива, Кинельская отрада, Кинельская краса, Золотица, Кинельская 2010. Пять первых включены в Государственный реестр селекционных достижений РФ. Им впервые предложена оригинальная методика оптимизации площадей озимой и яровой пшеницы в зависимости от сложившегося среднемноголетнего соотношения их урожайности в определенной местности. Им же предложены для практического использования количественные характеристики адаптации сортов пшеницы к условиям внешней среды – индекс адаптивности и адаптивный потенциал сорта. Профессором А.П. Головоченко разработаны прогнозные уравнения содержания белка и клейковины в зерне яровой пшеницы, изучены структуры запасного белка пшеницы, разработаны рекомендации по усовершенствованию селекционного процесса и технологии выращивания продовольственного зерна.

При активном участии А.П. Головоченко были организованны и проведены региональные конференции по актуальным проблемам селекции, семеноводства и производства зерновых культур в Поволжском НИИСС.

С 2001 г. А.П. Головоченко вел преподавательскую деятельность в Самарской государственной сельскохозяйственной академии в должности профессора.

Селекционные достижения А.П. Головоченко отмечены 3 золотыми медалями Всероссийского выставочного центра. За многолетний плодотворный труд А.П. Головоченко награждался Почетными грамотами Российской академии сельскохозяйственных наук и Министерства сельского хозяйства РФ.

Светлая память об Анатолии Петровиче Головоченко надолго останется в наших сердцах.

Средневолжское региональное отделение ВОГиС,
коллектив ГНУ Поволжский НИИСС им. П.Н. Константинова

О перерегистрации журнала «Информационный вестник ВОГиС» в связи с изменением названия и территории распространения

В свидетельство о регистрации издания внесены изменения в связи с переименованием учредителей, изменением юридического адреса учредителя, уточнением тематики 25 ноября 2010 г.

Научный рецензируемый журнал «Вавиловский журнал генетики и селекции» («Vavilov Journal of Genetics and Breeding») (Свидетельство Роскомнадзора о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС77-42741 от 25.11.2010 г.) до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС» («The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists») (журнал зарегистрирован Министерством РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций Свидетельство ПИ № 77-1277 от 20.12.1999 г.).

Учредителями журнала являются: Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики СО РАН и Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров.

Читатели, подписавшиеся на «Информационный вестник ВОГиС», в 2011 г. будут получать «Вавиловский журнал генетики и селекции». Журнал сохраняет формат и объем и продолжает выходить ежеквартально.

Отредактировано и подготовлено к печати
в редакционно-издательском отделе ИЦиГ СО РАН

Редакторы: А.А. Ончукова, И.Ю. Ануфриева
Дизайн: А.В. Харкевич
Компьютерная графика: А.В. Харкевич, Т.Б. Коняхина
Компьютерная верстка: Т.Б. Коняхина, Н.С. Глазкова

Подписано в печать 20.06.2011 г.
Формат бумаги 60×84 1/8. Усл.-печ. л. 26. Уч.-изд. л. 24,6
Тираж 400. Заказ 221

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН»
630090, Новосибирск, Морской проспект, 2