

Содержание

К читателям журнала "Информационный вестник ВОГиС"	30
ПРОБЛЕМЫ ГЕНЕТИКИ РАСТЕНИЙ	
<i>В.К. Шумный</i>	32
ДИНАМИКА ГЕНОФОНДОВ ПРИ АНТРОПОГЕННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ	
<i>Ю.П. Алтухов</i>	40
БЕЛКОВАЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ: КОНФОРМАЦИОННЫЕ МАТРИЦЫ И ЭПИГЕНЕТИКА	
<i>С.Г. Инге-Вечтомов, А.С. Борхсениус, С.П. Задорский</i>	60
ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕНОМИКА ЦИАНОБАКТЕРИЙ	
<i>С.В. Шестаков</i>	67
СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КАК ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРОБЛЕМА	
<i>Л.И. Корочкин</i>	73
ИНТЕРКАЛЯРНЫЙ ГЕТЕРОХРОМАТИН И ПРОБЛЕМА САЙЛЕНСИНГА	
<i>И.Ф. Жимулёв, Е.С. Беляева, Т.Д. Колесникова, Е.И. Волкова</i>	81
МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭВОЛЮЦИИ: РЕГУЛЯТОРНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ И КОДИРОВАНИЕ СЛОЖНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ	
<i>Н.А. Колчанов, В.В. Суслов, К.В. Гунбин</i>	86

К читателям журнала "Информационный вестник ВОГиС"

Уважаемые читатели, дорогие коллеги!

Перед вами специальный выпуск журнала "Информационный вестник ВОГиС", посвященный 70-летию академика Владимира Константиновича Шумного – главного редактора издания.

"Информационный вестник ВОГиС" основан в декабре 1997 года. К настоящему времени вышло 28 номеров журнала. Периодичность издания составляет в среднем 4 номера в год, тираж 300 экземпляров. Учредителями журнала являются Институт цитологии и генетики СО РАН и Вавиловское общество генетиков и селекционеров (свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № 77-1277 от 20 декабря 1999 г.). Журнал "Информационный вестник ВОГиС" входит в число рецензируемых журналов, публикуется на русском языке. В качестве эксперимента была издана и англоязычная версия одного из номеров (№ 12).

Отныне журнал будет выходить в новом полиграфическом формате. Однако, изменив оформление, журнал сохранит тематическую направленность. На его страницах вы по-прежнему найдете оперативную информацию ВОГиС, информацию о съездах, конференциях, симпозиумах и совещаниях генетиков и селекционеров. В основе журнала останутся научные статьи общетеоретического и обзорного характера по актуальным проблемам генетики и селекции. Продолжится публикация работ по истории биологии, генетики и селекции, а также персоналий, аннотаций и рецензий книг и учебников. Найдут свое отражение и вопросы, связанные с преподаванием генетики и подготовкой высококвалифицированных кадров специалистов-генетиков.

"Информационный вестник ВОГиС" готовится к печати и издается на базе Института цитологии и генетики СО РАН. Журнал распространяется на безвозмездной основе среди коллективных и индивидуальных членов ВОГиС России и стран СНГ. Одно из несомненных преимуществ издания – оперативность публикации материалов: срок от поступления статьи в редакцию до ее выхода не превышает трех месяцев. Наши авторы – ведущие специалисты из Новосибирска, Санкт-Петербурга, Москвы и других научных центров России и стран СНГ. За период своего существования журнал доказал свою состоятельность и занял собственную нишу в научном информационном пространстве страны. Журнал не имеет аналога в России.

Накануне дня рождения академика В.К. Шумного, 11 февраля 2004 года, в новосибирском Академгородке в Малом зале Дома ученых СО РАН открылся Симпозиум "Актуальные проблемы современной генетики". Симпозиум проводился под эгидой Института цитологии и генетики СО РАН, Вавиловского общества генетиков и селекционеров, Проблемного совета РАН по генетике и селекции.

По решению редколлегии представленные на нем доклады в полном объеме публикуются в предлагаемом вашему вниманию выпуске "Информационного вестника ВОГиС", что позволит значительно расширить аудиторию Симпозиума. Программу Симпозиума составили только заказные доклады генетиков трех ведущих генетических центров страны: Санкт-Петербурга, Москвы и Новосибирска.

Открыл симпозиум президент Вавиловского общества генетиков и селекционеров академик С.Г. Инге-Вечтомов (С.-Пб.ГУ) докладом "Белковая наследственность: конформационные матрицы и эпигенетика", посвященным рассмотрению механизмов прионизации белков.

Москву представляли академики (ИОГен РАН) С.В. Шестаков (МГУ), К.Г. Скрябин (Центр биоинженерии РАН) и чл.-кор. Л.И. Корочкин (ИБР РАН).

Академик Ю.П. Алтухов, к сожалению, не выступал на Симпозиуме, но письменный вариант его доклада "Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях" публикуется в этом номере журнала. Академик С.В. Шестаков (МГУ) сделал доклад по проблемам геномики "Функциональная геномика цианобактерий".

Чл.-кор. Л.И. Корочкин прочел доклад "Стволовые клетки как генетическая проблема", осветив проблемы клонирования клеток млекопитающих и отметив необходимость взвешенного и осторожного подхода к оценке возможностей и перспектив применения этого метода для решения практических задач биомедицинской науки.

Академик К.Г. Скрябин сделал доклад по современному состоянию генно-инженерных разработок в мире и у нас в стране (письменного варианта доклада в редакцию не поступило). В докладе прозвучала серьезная озабоченность, вызванная некоторым отставанием в области использования ген-модифицирующих технологий отечественной биоинженерией и селекцией.

Докладчики из новосибирского ИЦиГ СО РАН чл.-кор. И.Ф. Жимулев и чл.-кор. Н.А. Колчанов посвятили свои доклады контролирующим элементам экспрессии генов ("Интеркалярный гетерохроматин и проблемы сайленсинга" – И.Ф. Жимулев) и эволюции регуляторных генетических систем ("Моделирование биологической эволюции: регуляторные генетические системы и кодирование сложности биологической организации" – Н.А. Колчанов).

12 февраля Симпозиум продолжился уже в конференц-зале ИЦиГ СО РАН. В.К. Шумный сделал доклад по развитию генетико-селекционных исследований в Институте цитологии и генетики со времени его организации до наших дней – "Проблемы современной генетики растений", в котором остановился на истории возникновения и становления новосибирской селекционно-генетической школы, подчеркнув преемственность ее традиций по отношению к довоенным московской и ленинградской генетическим школам.

Редколлегия

ПРОБЛЕМЫ ГЕНЕТИКИ РАСТЕНИЙ

В.К. Шумный

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

e-mail: shumny@bionet.nsc.ru

Наиболее впечатляющим и видимым в практической жизни человека объектом генетического преобразования и селекционного улучшения является растение как основа самовоспроизводящегося продовольственного потенциала.

Основными факторами мощнейшей генетической модификации генома растений в течение последних 10–12 тысяч лет поэтапно были и есть:

- 1) популяционное генетическое разнообразие;
- 2) индуцированное экспериментальным путем генетическое разнообразие (мутация, полиплоидия, гибридизация, в том числе отдаленная);
- 3) развитие генетики признаков и целенаправленное их улучшение;
- 4) развитие генно-инженерных и клеточных технологий для внесения в геном растений новых генов, а тем самым и формирование новых признаков.

Успех современного этапа генетико-селекционного улучшения растений и модификации их геномов зависит от эффективного и в меру необходимого знания и использования всех перечисленных факторов, особенно генетики признаков и сложных функциональных систем.

Именно эту идеологию я и заложил в основу своей научной биографии. Но, естественно, все зависит от школы, где начинаешь свою работу, и первого Учителя. Мне повезло. Первым моим учителем, вышедшим из вавилонской школы, прошедшим аспирантуру у Н.И. Вавилова, был Юрий Петрович Мирюта, человек сложный, одаренный и неординарный. Главным его научным кредо было – подвергать сомнениям установившиеся в науке догмы и оригинальными находками существенно их модифицировать; поменьше забивать себе голову чтением малополезных работ и побольше думать, для чего достаточно детального знания основных законов и тенденций в генетике.

Первым научным заданием в 1958 г. для меня было: получить у кукурузы на гибридном материале тетраплоидные формы и на них проверить схему закрепления гетерозиса, предложенную Ю.П. Мирютой и позднее получившую название "эффект Мирюты".

В основу этой схемы заложена идея предпочтительной–избирательной конъюгации сестринских хромосом после их удвоения у исходных диплоидных гибридов (рис. 1).

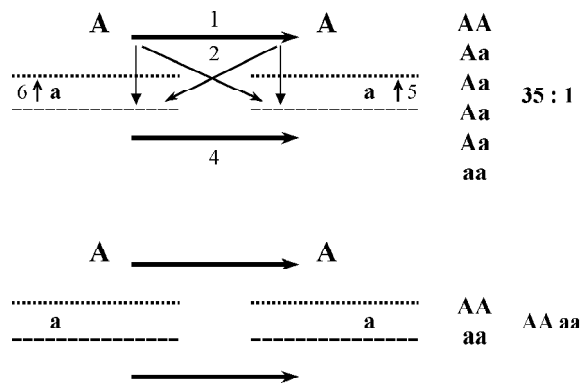


Рис. 1. «Эффект Мирюты».

Нами были получены тетраплоидные формы кукурузы на гибридном материале от скрещивания зубовидных, кремнистых форм с рисовыми формами зерна, т.е. наиболее дивергировавших внутри вида по форме и консистенции зерна.

В результате этого цикла работ были получены тетраплоидные формы простых гибридов кукурузы, выделены нерасщепляющиеся формы с соотношением бивалентов-тетравалентов при конъюгации хромом порядка 8 : 6 и сохранением гетерозиса по высоте растений и зеленой массе в ряду поколений (до 4–5). Однако мы не смогли полностью восстановить семенную фертильность, что и стало существенным ограничением этой модели закрепления гетерозиса. Поэтому с учетом дан-

ных по предыдущей модели по инициативе Д.К. Беляева мы развернули работы по моногибридному гетерозису, которые начались с обзорной статьи Д.К. Беляева, В.И. Евсикова и В.К. Шумного в журнале "Генетика". К этому времени было накоплено много фактов о благоприятном действии отдельных генов в гетерозиготном состоянии. Мы проанализировали порядка 100 работ. Стало ясно, что моногенный, или более точно, моногибридный гетерозис является своеобразным маркером сложного взаимодействия генов, определяющего комбинационную способность или связанного с ней и в конечном итоге приводящего к гетерозисному эффекту.

Уже было ясно, что источников в селекции на высокую комбинационную способность не так много. И если моногибридный гетерозис является действительно маркером на комбинационную способность в гетерозиготном состоянии, то его наличие заслуживает самого пристального внимания исследователей. Мы подобрали довольно обширные коллекции мутаций у гороха, кукурузы, ячменя, томатов и провели большой цикл исследований по анализу многих параметров у исходных и полученных из них мутантных линий и гетерозигот по мутантному гену.

Было показано, что действительно по отдельным генам (а мы проверили порядка 300 комбинаций) наблюдается устойчивое и существенное преимущество гетерозигот перед гомозиготами, и что механизм или гипотеза сверхдоминирования имеет существенное значение в формировании эффекта гетерозиса. Но вот по каким генам гетерозиготность обеспечивает гетерозис, остается неясным и по настоящее время, хотя сегодня возможности выяснить это значительно расширены в связи с развитием такого направления, как геномика.

В процессе этой работы нами совместно с моим дипломником и аспирантом Б.И. Токаревым была получена у ячменя мутация по активности фермента нитратредуктазы, важного звена в восстановлении растениями нитритов в аммонийную форму. Эта мутация у ячменя с блоком нитратредуктазной активности стала важным звеном в изучении механизмов азотного метаболизма растений и была широко использована отечественными и зару-

бежными исследователями. В такой же мере были использованы и модели моногибридного гетерозиса для изучения механизмов сверхдоминирования в ряде лабораторий института.

Эти два цикла работ были опубликованы в 76 статьях, из них 19 в журнале "Генетика".

Как исследователь, начавший свою работу с изучения проблемы гетерозиса и посвятивший ей почти 15 лет, я убежден, что и сегодня мы не до конца понимаем, что это сложнейшее и весьма значимое для эволюции и селекции явление, обеспечивающее преимущества как для естественного, так и для искусственного отбора, и виной этому исходная стратегическая ошибка - найти универсальный стратегический механизм, определяющий в ряде случаев существенное преимущество гибридов перед исходными формами. Поэтому и гипотезы гетерозиса сводились к двум основным - доминированию и сверхдоминированию. На самом деле гетерозис является сложным генетическим признаком, на проявление которого влияют многие гены и их сочетания. Центральным звеном в этом признаке являются гены, определяющие высокую комбинационную способность. Доказательством этому являются все эмпирически выстроенные схемы селекции на комбинационную способность, в основе которых лежит периодический отбор и целью которых является увеличение концентрации "генов гетерозиса" в исходных линиях. По аналогии это напоминает технологию обогащения руды концентратом извлекаемых компонент. Результаты крупномасштабной селекции на комбинационную способность, затронувшую, например, у кукурузы тысячи линий и длящуюся более 50 лет, позволяют предположить, что источников "генов высокой комбинационной способности" немного, в пределах десятков, если не менее. Анализ родословных линий, определяющих высокую комбинационную способность, показывает, что в их основе лежит не более десяти первоисточников. Это заставляет несколько переосмыслить природу гетерозиса, т.е. эффект превышения параметров над исходными формами. Ближе всего к этому подошел В.А. Струнников со своей гипотезой компенсационного комплекса генов, т.е. наличия в геноме комплекса генов или отдельных генов, способных частично нивелировать неблагопри-

ятное действие мутантных аллелей и сохранять свой эффект в гетерозиготах.

Короче говоря, как по проблеме гетерозиса, так и по другим нужно возвращаться к детальному анализу генетики признаков. Несмотря на огромные возможности генно-инженерных, хромосомных, клеточных технологий в изучении геномов, расшифровка механизмов гетерозиса затормозилась где-то на уровне 1980-х гг. Нужны новые идеи и использование мощи классических методов генетики на новом уровне.

С начала 1980-х гг. мы выстроили новую стратегию исследований лаборатории, включающую три основных направления:

- 1) реконструкция генома растений методами отдаленной гибридизации, хромосомной инженерии и клеточных технологий;
- 2) трансгенез у растений;
- 3) системы размножения у растений.

Первое направление по отдаленной гибридизации мы основали совместно с Л.А. Першиной, которое значительно расширило возможности переноса генетического материала между далекими в систематическом отношении видами и родами растений для получения уникального в генетическом и селекционном смысле исходного материала – дополненных и замещенных линий, аллоплазматических форм, новых комбинированных геномов. Необходимо отметить, что отдаленная гибридизация, особенно межродовая, является первым этапом трансгенеза, так как главной ее целью является перенос генетического материала крупными блоками, а то и целыми геномами, как в случае амфидиплоидии. Мы выбрали довольно далекие в систематическом отношении виды злаковых: ячмень, пшеницу, рожь, и с использованием методов культивирования *in vitro* получили гибриды между ними. Материалы по этому большому циклу работ широко опубликованы и хорошо известны исследователям в этой области. Без преувеличения можно сказать, что эти работы реанимировали интерес к отдаленной гибридизации уже на новом технологическом уровне, особенно с использованием культуры клеток и тканей растений (рис. 2–4).

Главными результатами данного цикла работ является получение новых комбинаций межродовых ячменно-пшеничных и ячменно-

рожных гибридов растений, новых аллоплазматических и замещенных линий. Наиболее существенным и новым результатом является восстановление фертильности у части межродовых гибридов путем целенаправленного подбора исходных форм для гибридизации.

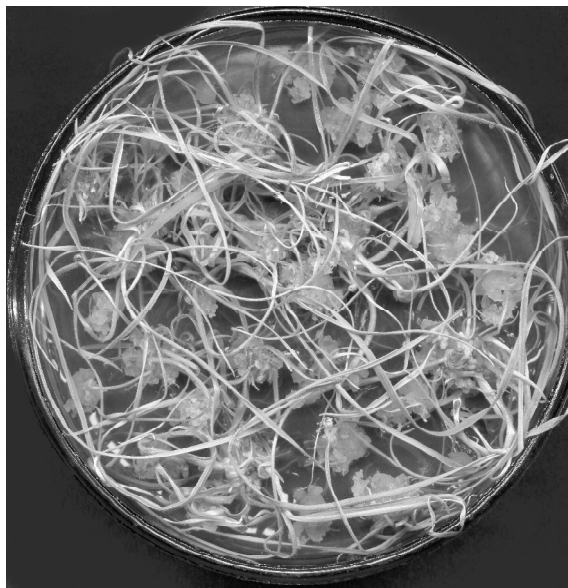


Рис. 2. Вегетативное размножение ячменно-пшеничных гибридов по циклу молодые соцветия–каллус-регенеранты.

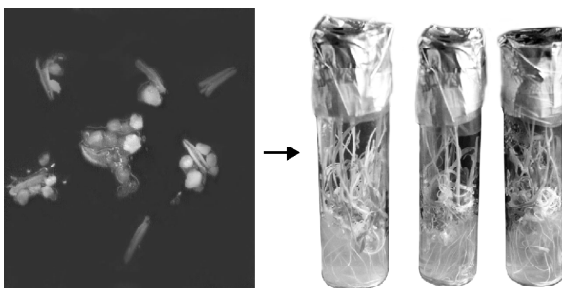


Рис. 3. Регенерация проростков при культивировании пыльников, использованном для ускоренного получения рекомбинантных гомозиготных линий ячменно-пшеничных гибридов.

Наличие такого гибридного материала открыло новые возможности для сравнительного изучения генома растений, интрогрессии чужеродного материала, взаимодействия генома и цитоплазмы с использованием аллоплазматических линий. Методы флуоресцентной



Рис. 4. Колосья дикорастущего ячменя. 1 – *H. geniculatum* All.; 2–3 – аллоплазматические дополненные линии мягкой пшеницы, полученные на основе ячменно-пшеничных гибридов *H. geniculatum* x *T. Aestivum*; 4 – мягкая пшеница сорта Пиротрикс 28.

микроскопии, которые в ИЦиГ поставлены на хорошем уровне, позволяют проследить всю динамику интрогрессии при взаимодействии разных геномов, уровень их гомологии.

Несомненно, что проблема реконструкции генома растений методами отдаленной гибридизации с использованием культуры клеток и тканей на злаковых в ИЦиГ проработана основательно.

Однако отдаленная гибридизация в сочетании с клеточными технологиями открывает новые перспективы и для хромосомной инженерии как важнейшего раздела биотехнологии растений. Значимый для эволюции формообразовательный процесс состоял из комбинативной, мутационной изменчивости и интрогрессии на межвидовом, межродовом уровнях генетического материала как дополнительного источника изменчивости. Полученные в результате этого цикла работ уникальные формы представляют новые возможности более полного моделирования формообразовательных процессов в эволюции и в последующем в селекции.

Этот цикл работ логически взаимосвязан с исследованиями по трансгенезу, где

речь идет о переносе уже не больших фрагментов генома, а целевых избранных генов.

Следующий цикл работ был обоснован совместно с Е.В. Дейнеко, начат сравнительно недавно и посвящен трансгенезу у растений, что хорошо вписывалось в общую концепцию лаборатории о реорганизации генома растений методами хромосомной и геномной инженерии, клеточных и тканевых культуральных технологий.

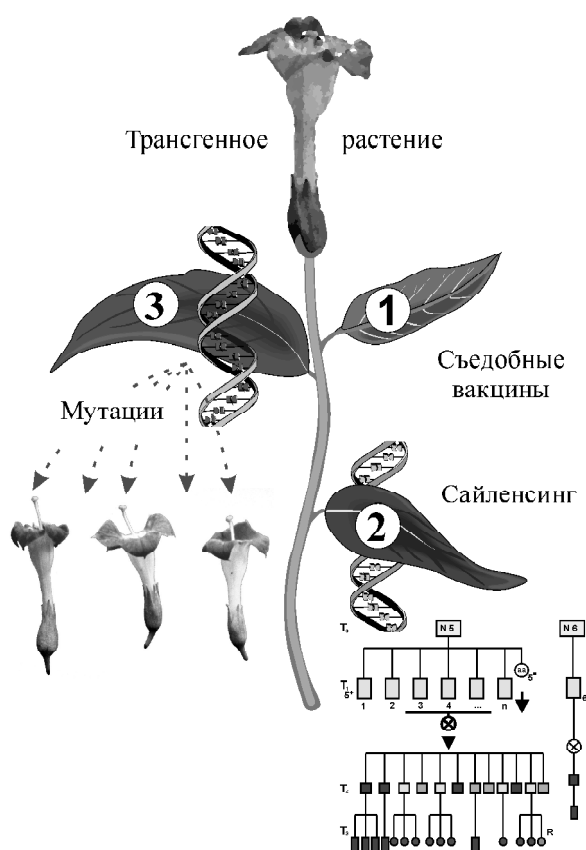


Рис. 5. Основные направления исследований по трансгенным растениям в ИЦиГ СО РАН.

1 – синтез специфических белков (съедобные вакцины); 2 – молекулярно-генетические механизмы инактивирования чужеродных генов; 3 – индукция мутаций.

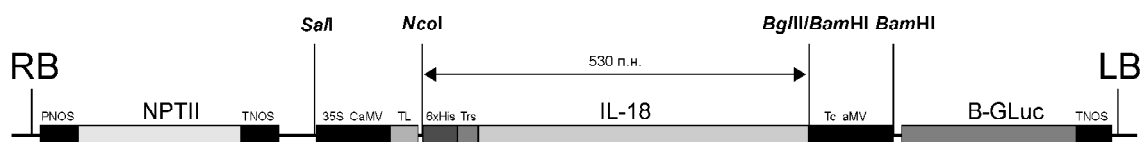
Для нас трансгенез у растений является прежде всего научной проблемой для решения следующих вопросов: 1) оптимизация безопасных векторных и репортерных систем; 2) клонирование "полезных" генов и создание генно-инженерных конструкций; 3) анализ экспрессии генов, проблема сайленсинга; 4) исследо-

вание изменчивости, индуцируемой inserциями чужеродных генов, в том числе встройки векторных (бактериальных) ДНК (рис. 5).

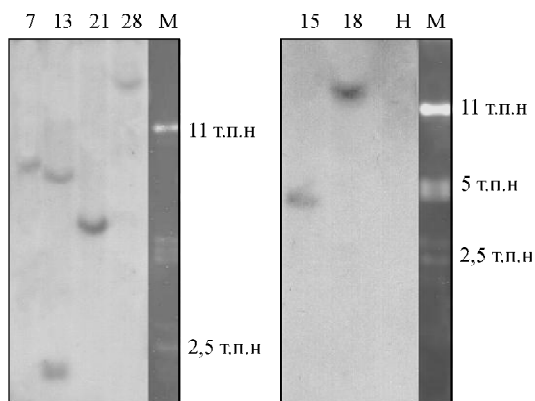
Именно эти вопросы являются основными в наших планах по изучению трансгенеза у растений. Естественным является и наш интерес к практическим аспектам проблемы трансгенеза у растений. Основные результаты по трансгенным растениям следующие. Получены: 1) трансгенные растения табака и люцерны с геном интерферона человека; 2) растения табака и моркови с генами интерлейкинов 10 и 18 (рис. 6); 3) растения табака и картофеля с геном неспецифической бактериальной нуклеазы; 4) растения таба-

ка с геном "оболочки" туберкулезной бактерии и с генами возбудителя гепатита; 5) растения табака с повышенным содержанием пролина, несущие антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы.

Перечень полученных нами трансгенных растений свидетельствует о нашем интересе к проблеме устойчивости растений к инфекциям и стрессам, созданию продуцентов белков медицинского назначения. Но это практический аспект нашей работы с трансгенными растениями. Главный результат этого цикла работ заключается в изучении экспрессии чужеродных генов, феномена сайленсинга и генетической из-



Саузерн



Вестерн

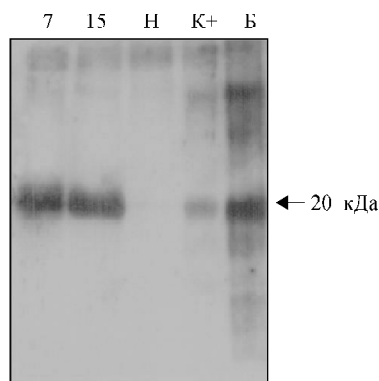


Рис. 6. Трансгенные растения – продуценты белков медицинского назначения (интерлейкины 10 и 18).

менчивости, вызванной инсерциями при трансгенезе. Выявлены частотные характеристики "замолкания" генов, прослежена динамика их экспрессии в ряду поколений в зависимости от числа копий и независимых встроок. Получена коллекция мутаций, вызванных инсерциями чужеродной ДНК, затрагивающих системы размножения и структуру цветка (появление стерильности, лонгостилии и др.). Показано, что многие из этих мутаций связаны с нарушением разных стадий мейоза.

Говоря о трансгенных организмах в целом и растениях в частности, следует отметить, что это супермощная технология для изучения геномов и их преобразования. Однако в этой проблеме имеются еще многие нерешенные фундаментальные вопросы. Некоторые из них были перечислены выше.

Теперь о дискуссиях вокруг генетически модифицированных организмов. Они связаны в основном с использованием трансгенных организмов. Сегодня только у растений трансгенные формы получены более чем у 100 видов, под ними занято более 60 млн га посевных площадей. Продовольственный рынок ежегодно получает миллионы тонн зерна трансгенных сои, кукурузы, рапса и других культур. Сегодня они являются компонентами многих продуктов, которые идут на экспорт, в том числе и в Россию. Естественно, такие продукты не всегда имеют маркировку о наличии в их составе ГМО (генетически модифицированных организмов). Самое печальное в этом то, что в России нет ни одного собственного трансгенного растения, разрешенного к использованию. Лучшим способом обезопасить себя от проникновения на рынок неизвестных и часто немаркированных продуктов является использование трансгенных растений, полученных на отечественных сортах, хорошо проверенных по всем критериям и безопасных для применения. Для этого нужна организация специальной программы по получению таких сортов, всестороннему изучению и проверке их на биобезопасность при использовании. Процесс создания и использования генетически модифицированных организмов уже не остановить, без него у человечества

нет шансов справиться с продовольственной проблемой при современной демографической ситуации.

Следующий цикл работ связан с генетикой систем размножения у растений. Основоположником этого направления в ИЦиГ был Ю.П. Мирюта. Под его руководством был создан первый районированный гибрид кукурузы Сибирский 4 на стерильной основе. Но главным достижением Ю.П. Мирюты было провозглашение закона "О периодической смене инбридинга и кроссбридинга в популяциях растений". Суть этого закона состоит в том, что в популяциях как самоопылителей, так и перекрестников имеется генетическая система, которая регулирует уровни инбридинга и кроссбридинга, а следовательно, и уровни гомозиготности и гетерозиготности.

Экспериментальная методика исследования этого явления на кукурузе была довольно проста. На белозерную форму наносится в равных или кратных долях смесь пыльцы желтозерной и белозерной форм и по ксености зерен определяется доля своей или чужой пыльцы, участвовавшей в оплодотворении. У других культур степень участия своей и чужой пыльцы определялась по доле гибридных растений, фиксированных по иным признакам.

Анализируя данные по избирательности своей и чужой пыльцы, Ю.П. Мирюта пришел к заключению, что и у самоопыляющихся, и перекрестноопыляющихся растений инбридинг и кроссбридинг чередуются по определенным временным циклам. Отсюда были сделаны далеко идущие практические выводы об использовании в схемах гетерозиса для получения гибридных семян не только ЦМС, но и эффекта избирательности чужой пыльцы, достигающего у отдельных линий, особенно самоопылителей, 80–90%. Но эти идеи и схемы Ю.П. Мирютой реализованы не были.

Нами с Э.В. Квасовой был задуман и проведен эксперимент с люцерной – самонесовместимым перекрестноопыляющимся видом со сложной структурой цветка, гарантирующей перекрестное опыление. Используя самофертильность и псевдосовместимость, характерные для небольшой части растений, мы прове-

ли глубокий инбридинг, к настоящему времени его глубина составляет 50 поколений. Целью этой работы были получение высокосамофертильных форм и полная реорганизация цветка – получение форм с самораскрывающимися цветками (автотриппинг) и с самоопылением в закрытом цветке (автогамия).

Такие формы были получены в 5–10 инбредных поколениях. Инбредная депрессия наиболее сильно была выражена в первых 5 поколениях, затем стабилизировалась до 15-го поколения инбридинга. А вот дальше, до 30-го поколения инбридинга мы отметили резкий всплеск изменчивости по многим морфологическим и репродуктивным признакам, среди них значительную долю составляют разные типы хлорофилльных мутаций. После 30-го поколения уровень изменчивости понизился, но повысился уровень самофертильности, что и являлось нашей целью – получение для генетических и селекционных исследований самофертильных форм с высоким уровнем автотриппинга и ксеногамии.

О том, что инбридинг связан с процессами изменчивости, говорит и цикл работ, выполненных нами совместно с Г.А. Похмельных на кукурузе при изучении гетерохроматических узелковых районов (ГУР) хромосом. Первоначально ставилась задача – получить контрастные многоузелковые и малоузелковые линии условно в гомо- и гетерозиготном по узелкам состоянии и выявить некоторые взаимосвязи между количеством и состоянием ГУР и морфофизиологическими признаками. Однако в процессе инбридинга при создании линий, условно гомозиготных по узелкам, мы столкнулись с необычным эффектом. Гомозиготизация по ГУР у многоузелковых форм привела к ярко выраженной протерандрии, т.е. одновременному цветению метелки и початка в пределах растения, что фактически исключает дальнейшее самоопыление, а следовательно, и инбридинг. Таким образом неожиданно выявлена необъяснимая пока взаимосвязь между состоянием гетерохроматина (по ГУР) и системами размножения.

Значительные исследования были выполнены по системам размножения у ржи

И.С. Поповой, а у гречихи и люцерны – В.И. Коваленко. Они также были связаны с самофертильностью и структурой цветка.

Мной совместно с сотрудниками и в большинстве случаев в соавторстве с коллегами СО РАСХН создано и районировано 7 сортов: 2 – ячменя, 2 – люцерны, 1 – пшеницы, 1 – ржи, 1 – амаранта.

Наиболее целенаправленной в практическом плане работой была программа Президиума СО АН СССР "Лизин". По этой программе я работал в Швеции (Лунд и Свалеф) и привез весь исходный материал с высоким содержанием лизина и белка. Была создана специальная группа, в которую, кроме меня, вошли М.И. Голышева, Л.П. Солоненко, А.В. Аксенович. Был осуществлен перенос необходимых генов в местные сорта ячменя. Две формы были доведены до сортов Ранний 1 и Ифтихор и районированы в Сибири и Таджикистане.

Дальше мне хотелось бы остановиться на некоторых общих проблемах развития генетики растений. За последние 45 лет в генетике в целом, в том числе и в генетике растений многое изменилось. Полностью расшифрован геном человека, ряда видов животных, микроорганизмов; у растений – полный геном *Arabidopsis thaliana*, частично риса и кукурузы. Появилась новая наука геномика. Резко возросли методические и технологические возможности. Но несмотря на все это, я бы выстроил для ИЦиГ приоритеты генетики растений в следующем порядке (прежде всего с учетом возможностей самого института):

1. Молекулярно-генетическое картирование генома растений, прежде всего злаковых. Чем полнее будет картирован геном, тем быстрее мы поймем его структурно-функциональную организацию в определении как простых, так и особенно сложных количественных признаков. Положительным моментом для этого является и созданная в институте теория генных сетей, позволяющая понять взаимодействие как генов, так и их продуктов при формировании признаков. В ряде лабораторий института эта работа идет на хорошем уровне и с эффективной интеграцией, в том числе и на международном уровне.

2. Детальная генетика признаков и функций как следствие картирования генома растений. В институте подробно изучаются такие признаки, как системы размножения, устойчивости к заболеваниям, адаптационного потенциала, симбиотической азотфиксации и другие. Для этого используются методы мутагенеза, моносомного анализа, изогенных линий и другие. Только хорошее знание генетической структуры признаков позволяет понять целостные характеристики растения и возможности их реорганизации. Это в полной мере относится и к такому сложному признаку, как гетерозис, с которым связаны многие генетические системы.
3. Хромосомная инженерия растений, основанная на отдаленной гибридизации и технологиях культивирования клеток, тканей и органов. В данном случае речь идет о переносе крупных блоков генетического материала на межвидовом и межродовом уровнях и создании на этой основе уникального генетического материала – дополненных, замещенных и аллоплазматических линий. Можно уверенно утверждать, что это направление в ИЦиГ имеет хороший задел и является приоритетным.
4. Генная инженерия на растениях представлена в ИЦиГ получением и исследованием трансгенных форм. Если при отдаленной гибридизации мы переносим крупные блоки генетического материала, то трансгенез позволяет целенаправленно интегрировать избранные целевые гены, и в фундаментальном плане эти исследования необходимо расширять.
5. Генетическое разнообразие и теория селекции. Для нас очень важно наличие уникального генетического материала, доноров устойчивости к экстремальным факторам сибирской экологической ниши. Создание такого исходного материала может осуществляться двумя путями – поиском естествен-

ных источников среди культурных растений и их диких сородичей и экспериментальным созданием разными методами, в том числе и вышеперечисленными.

Для нас также очень важно совершенствование старых и создание новых, более эффективных методов селекции. Генно- и хромосомно-инженерные, клеточные и тканевые технологии позволяют это сделать.

В последние годы идет серьезный пересмотр роли регуляторных механизмов в экспрессии генетических систем, эпигенетических процессов, что может иметь серьезные последствия, в том числе и в селекции. В этой связи в ИЦиГ поддерживаются исследования по созданию препаратов из природного растительного сырья или бактериальных, стимулирующих рост, развитие и защитные функции растений.

Пять направлений развития современной генетики растений, по которым в ИЦиГ ведутся исследования, естественно, не исчерпывают весь диапазон развития этой важнейшей области генетики.

Основной негатив в развитии генетики, в том числе и генетики растений, сегодня заключается в наметившемся разрыве между общей генетикой на организменном, популяционном и эволюционном уровнях и молекулярной генетикой на уровне структурно-функциональной организации генетических систем. Отрицательные последствия изоляции общей и молекулярной генетики – в непонимании необходимости оценивать весь имеющийся как в общей, так и в молекулярной генетике фактический материал с популяционно-эволюционных позиций, потому что эволюционирующей единицей является именно популяция. Поэтому, если мы понимаем процессы, в том числе и генетические, происходящие на уровне популяций, и их значение для эволюции, то мы способны сделать правильные обобщения. В противном случае нам грозит анализ не связанных между собой частных.

ДИНАМИКА ГЕНОФОНДОВ ПРИ АНТРОПОГЕННЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

Ю.П. Алтухов

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва
e-mail: yualt@vigg.ru

Для того чтобы понять динамику популяционных генофондов, необходимо провести мониторинг внутривидового генетического разнообразия. Хотя английское слово "мониторинг" уже давно бытует в мировой генетической литературе, принципы такого рода исследований нельзя признать достаточно разработанными. Это особенно относится к обоснованию "точки отсчета", необходимой для оценки происходящих изменений и понимания их смысла. Цель настоящей публикации – восполнить существующий пробел.

Задача мониторинга генофондов и теоретические подходы к ее решению

Задача генетического мониторинга – *долговременное слежение за состоянием популяционных генофондов, оценка и прогнозирование их динамики во времени и в пространстве, определение пределов допустимых изменений.* Однако любое прогнозирование осуществимо лишь на основе концепции *нормы – нормального состояния или нормального процесса.* Только такой подход дает необходимую точку отсчета и позволяет понять механизмы негативного влияния человеческой деятельности на популяции, виды и целые экосистемы.

Из теоретической популяционной генетики известны основных четыре процесса, порознь или во взаимодействии друг с другом определяющие эволюцию популяций, вызывая различные их состояния: 1) случайный генетический дрейф; 2) миграция генов; 3) мутации генов; 4) естественный отбор.

Случайный генетический дрейф – стохастические изменения частот генов в последовательных поколениях в силу ограниченной численности любой реальной популяции. Особенно важно то, что *генетически эффективная численность* (N_e) практически всегда и существенно ниже ее общей (N) и репродуктивной (N_r) численности (Алтухов, 2003).

Последствия дрейфа – убыль гетерозиготности и, как результат, – инбридинг (F), нарастающий в поколениях в пропорции $(1/2N_e)^t$, где t – число поколений, прошедшее с момента времени t_0 , когда гетерозиготность оценивалась величиной H_0 : $F_t = 1 - (1 - 1/2N_e)^t$. Соответственно $H_t = H_0(1 - 1/2N_e)^t$.

Из этих простейших формул очевидно, что интенсивность дрейфа, приводящего к убыли генного разнообразия и чаще всего к деградации популяций, обратно пропорциональна величине N_e : чем меньше N_e , тем интенсивнее дрейф и наоборот. В селекции животных и растений это обстоятельство крайне важно, и специалисты знают, как надо организовать процесс воспроизводства, чтобы предотвратить отрицательные последствия кровнородственных скрещиваний. Что же касается нативных природных популяций, то в них эффекты случайного дрейфа генов компенсируются процессами *миграции* некоторой интенсивности m , т.е. природные популяции, как правило, не являются однородными по своей внутренней структуре, а представляют исторически сложившиеся *системы субпопуляций*, одновременно испытывающих воздействие и случайного дрейфа, и миграции генов, взаимно уравновешивающих друг друга (Алтухов, Рычков, 1970). Тем самым в норме снимаются отрицательные последствия инбридинга, а важный параметр структуры $N_e m$ становится мерой абсолютной интенсивности генных миграций за поколение.

Согласно Райту (Wright, 1969), такое равновесие для островной модели подразделенной популяции оценивается величиной структурного инбридинга субпопуляции S относительно всей подразделенной популяции T , так что $F_{ST} = 1/(4 N_e m + 1)$ или, более строго, $F_{ST} = (1 - m)^2 / \{2N_e - [(2N_e - 1)(1 - m)^2]\}$.

Этот коэффициент локальной генетической дифференциации, ожидаемой в условиях стационарного селективно-нейтрального про-

цесса, можно обозначить как F_e и сравнить с фактически наблюдаемой стандартизованной генетической вариансой (F_0), оцениваемой из частот аллелей как отдельных полиморфных локусов, так и их совокупностей:

$$\bar{F}_0 = 1/k \sum F_i = 1/k \sum \sigma_p^2 / \bar{p}_i (1 - \bar{p}_i),$$

где k – число локусов, \bar{p}_i и $(1 - \bar{p}_i)$ – соответствующие средние аллельные частоты в тотальной подразделенной популяции, состоящей из n субпопуляций, а $\sigma_p^2 = 1/n \sum (p_i - \bar{p})^2$ – варианса Валунда.

Если локус селективно-нейтрален, то $F_0 \approx F_e$. Если имеет место балансирующий отбор, то $F_0 < F_e$, а при дизруптивном или разнонаправленном локальном отборе $F_0 > F_e$. Как показано для популяций человека, протекающий в них генетический процесс, оцениваемый в среднем по совокупности независимых полиморфных локусов, действительно соответствует селективно-нейтральному, так что $\bar{F}_0 \approx F_e$ (детали см. Алтухов, 2003). Прделанный нами анализ позволяет распространить этот вывод на биологические виды вообще, что имеет принципиальное значение для организации популяционного мониторинга и оценки состояния региональных генофондов (Altukhov *et al.*, 2000) (рис. 1). Действительно, как мы увидим дальше, любые ощутимые антропогенные воздействия, нарушающие популяционную структуру вида, быстро изменяют соотношение разных групп генов в генофонде, и эмпирическая F_{ST} -статистика начинает отличаться от ожидаемой для нейтрального процесса.

Помимо F_{ST} -статистики, Райт обосновал еще два параметра: F_{IS} – коэффициент инбридинга особи относительно субпопуляции S и F_{IT} – коэффициент инбридинга особи относительно тотальной подразделенной популяции T . Все эти индексы отражают отклонения от панмиксии вследствие корреляции объединяющихся гамет и в конечном счете определяются соотношением гомозиготных и гетерозиготных генотипов. Эквивалентом F_{ST} -статистики является G_{ST} -статистика Нея (Nei, 1975), связывающая общее (H_T) и внутривидовое (H_S) генное разнообразие следующим образом:

$$G_{ST} = (H_T - \bar{H}_S) / H_T.$$

Здесь

$$H_T = 1 - \sum \bar{p}_i^2; \bar{H}_S = 1/n \sum H_S;$$

$$H_S = 1 - \sum p_{is}^2,$$

где p_{is} – частота i -го аллеля в субпопуляции S , \bar{p}_i – средняя частота аллеля во всей подразделенной популяции, состоящей из n субпопуляций. Таким образом, \bar{H}_S есть средняя гетерозиготность субпопуляции, а H_T – гетерозиготность всей подразделенной популяции как если бы она представляла единое панмиктическое сообщество.

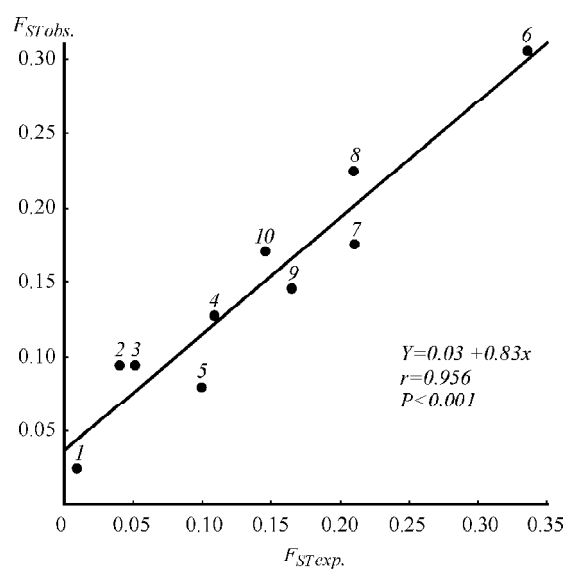


Рис. 1. Соотношение наблюдаемого (F_{STobs}) и ожидаемого (F_{STexp}) уровней пространственной генетической дифференциации у различных видов.

1 – горбуша, *Oncorhynchus gorbuscha*; 2 – нерка, *O. nerka*; 3 – чавыча *O. tshawytscha*; 4 – семга, *Salmo salar*; 5 – *Homo sapiens*, сибирский изолят; 6 – суслик, *Thomomys bottae*; 7 – мышь *Mus musculus*; 8 – обезьяна, *Aloutta seniculus*; 10 – морская черепаха, *Chelonia mydas* (По: Алтухов, 2003).

F_{ST} -статистика Райта (и, по сути, тождественная ей G_{ST} -статистика Нея), будучи мерой генетической подразделенности популяции и одновременно эквивалентом инбридинга особей в субпопуляции, несет важный биологический смысл: она отражает некий баланс процессов дифференциации и интеграции генофондов и, что также принципиально важно, оказывается величиной, авторегулируемой

по достижении популяционной системой стационарного режима. В этих условиях устанавливается отрицательная обратная связь между величинами N_e и m : когда эффективная численность субпопуляций, слагающих структуру популяционной системы, уменьшается, интенсивность иммиграции генов возрастает и наоборот.

Впервые такую неслучайную структуру миграций удалось обнаружить при исследовании генетических процессов в экспериментальной подразделенной популяции *Drosophila melanogaster*, соответствующей островной модели С. Райта. Оказалось, что чем меньше численность "островных" субпопуляций, тем больше приток генов в них с "континента" и наоборот. Затем та же зависимость была прослежена на природных популяциях других видов. Обнаруженная авторегуляция означает *поддержание устойчивого (оптимального) соотношения внутри- и межпопуляционной компонент генного разнообразия, соотношения гомо- и гетерозиготных генотипов, т.е. баланс между инбридингом и аутбридингом* (Алтухов, 2003). Это эволюционно сложившееся отношение, характерное для нативных самовоспроизводящихся популяционных систем, может нарушаться при антропогенных воздействиях, если интенсивность и/или направление генных миграций, или величина N_e существенно меняются. Например, резкое падение эффективной численности и обмена генами имеет место практически всегда, когда наносят вред местам размножения, что приводит к сокращению и фрагментации репродуктивных ареалов. В этих и подобных им случаях следует ожидать увеличения межпопуляционного (G_{ST}) генного разнообразия и сокращения внутрипопуляционного (H_S). Напротив, чрезмерное перемешивание и взаимодействие ранее изолированных генофондов может привести к проявлениям аутбридинга, т.е. к снижению жизнеспособности гибридных комбинаций. Такие эффекты бывают особенно выражены в отношении комплексов генов, составляющих основу адаптивной генетической структуры вида и сопряженных с приспособительными морфофизиологическими признаками и свойствами. Здесь на передний план выступает естественный отбор, обычно рас-

сматриваемый как наиболее систематический ключевой фактор в эволюции популяций. Их жизнеспособность оказывается напрямую связанной с приспособленностью генотипов. В случае повышенной приспособленности гетерозигот (сверхдоминирование) каждая популяция "платит" за адаптацию к конкретной среде выщеплением менее жизнеспособных гомозигот (так называемый "сегрегационный" генетический груз), однако в норме плата за адаптацию оказывается "приемлемой", поскольку соотношение гомо- и гетерозигот авторегулируется через $N_e m$ параметр структуры и поддерживается на устойчивом уровне. Этот уровень является *оптимальным: как убыль гетерозиготности, так и ее чрезмерное нарастание одинаково неблагоприятны для нормального функционирования популяции* (Алтухов и др., 1997; Алтухов, 2003).

Концепция оптимального генного разнообразия как условия благополучного существования популяций в нормально колеблющейся природной среде особенно важна в связи с их системной организацией. Зная *соотношение внутри- и межгрупповой компонент наследственной изменчивости* в условиях протекания процессов нормального воспроизводства или непосредственно перед тем или иным антропогенным воздействием, мы действительно получаем уникальную возможность осуществить генетический мониторинг популяционной системы с учетом структуры ее генофонда. Вместе с тем, чтобы получить надежную информацию, необходимо выполнить следующие требования: во-первых, популяция должна быть хорошо определена в историко-географическом плане; во-вторых, следует детально описать особенности распределения субпопуляционной структуры системы *во времени и в пространстве*; в-третьих, сбор материала надо организовать таким образом, чтобы субпопуляционная структура была максимально полно охарактеризована по совокупности заранее отобранных признаков.

Выбирая их, следует опереться на открывшуюся сравнительно недавно возможность соединить методы и подходы *популяционной* генетики и генетики *количественной*, т.е. исследовать одновременно как моногенные, так и полигенные признаки. *В субоптимальной*

среде или при достаточно жестком искусственном отборе обнаруживаются неслучайные связи между мультилокусной индивидуальной гетерозиготностью и значениями адаптивных количественных признаков (Алтухов, 1989).

Таким образом, помимо выполнения условия сбора материала - равномерного распределения выборок в пространстве (времени), должны быть вовлечены в анализ: а) данные о демографической структуре каждой субпопуляции (пол, возраст, соотношение полов, численность, миграция и др.); б) данные о весе, размерах и пропорциях тела исследуемых особей; в) оценка генотипа особей по возможно большему числу полиморфных генных локусов, включая различные белковые системы и, если необходимо, системы полиморфизма ДНК (как ядерной, так и неядерной). Эта информация позволяет проанализировать распределения полигенных и моногенных признаков, исследовать их сопряженную изменчивость, оценить соотношение компонент генного разнообразия и понять состояние генетического процесса в той или иной популяции, вычленив вклад случайного генетического дрейфа, миграции генов и отбора – порознь или в их взаимодействии (детали см. Алтухов, 2003).

Из нашего рассмотрения выпал лишь один фактор – *давление мутаций*. Так как их вероятность для отдельных генов ничтожна мала (10^{-5} – 10^{-6} на ген за поколение), влиянием мутационного процесса в норме можно пренебречь. Вместе с тем в условиях загрязнения среды радионуклидами и мутагенами химической природы проблема *мониторинга мутационного груза* становится важнейшей, особенно для человеческих популяций. Однако обсуждение этого вопроса выходит за рамки настоящей публикации. Следуя ее главной цели, рассмотрим результаты приложения развитых выше принципов к мониторингу генофондов подразделенных популяций (популяционных систем) животных и растений, опираясь главным образом на многолетние работы, проводимые в Институте общей генетики.

Динамика генофондов популяционных систем, самовоспроизводящихся в условиях нормально колеблющейся природной среды

Обратимся к изолированной популяции промыслового брюхоногого моллюска *Littorina squalida*, обитающего в лагуне Буссе на Южном Сахалине и имеющего *рельефную субпопуляционную структуру* (Алтухов, Калабушкин, 1974; Калабушкин, 1976). У литторины хорошо выражен полиморфизм окраски раковины, трактуемый как проявление двухаллельной системы с неполным доминированием. Так же как и у исключительно полно изученной садовой улитки *Cepea nemoralis*, различия генотипов (фенотипов) сохраняются у ископаемых форм и, таким образом, имеется возможность исследовать их распределение в выборках из ныне живущих и древних популяций, разделенных временным интервалом порядка 4,5–5 тыс. лет; это соответствует примерно 2–2,5 тыс. последовательных поколений. Такая оценка, сделанная на основании характера отложений и сопутствующей им теплолюбивой фауны, а также с учетом возрастной структуры литторин, представляется высоко надежной. С 1969 по 1974 гг. Б.А. Калабушкиным были исследованы распределения морф в трех выборках современного и в пяти выборках голоценового материала. Оценки генных частот показывают, что если сравнивать отдельные современные выборки с отдельными же ископаемыми, то можно прийти к весьма противоречивым выводам, обнаружив проявления как генетического сходства, так и различия во времени и в пространстве. Но если опереться на представления о системной организации популяций и взять систему как целое, то видно, что несмотря на изменчивость в частях, современная система в целом ($n = 1252$ экз., $q = 0,280 \pm 0,010$) устойчиво сохраняет генетический состав, унаследованный от прапопуляции ($n = 479$ экз., $q = 0,293 \pm 0,015$).

При более детальном изучении моллюсков лагуны Буссе удалось выявить эффекты сильного отбора – деструктивного на ранних и стабилизирующего на поздних стадиях онтогенеза (Калабушкин, 1976). По мере эволюции лагуны среда обитания литторины существенно изменялась, однако средняя частота гена сохранилась на

протяжении тысяч поколений. Аналогичные результаты были получены для различных бисексуальных видов животных и растений (Алтухов, Рычков, 1970), а также для человека (Рычков, 1973). То же самое обнаружено при исследовании экспериментальных подразделенных популяций *Drosophila melano-gaster* и при компьютерном моделировании генетических процессов в популяционных системах, соответствующих простейшей кольцевой ступенчатой модели (Алтухов, 2003): при одинаковой численности панмиктической и подразделенной популяций последняя оказывается более устойчивой в смысле сохранения генетического разнообразия (рис. 2).

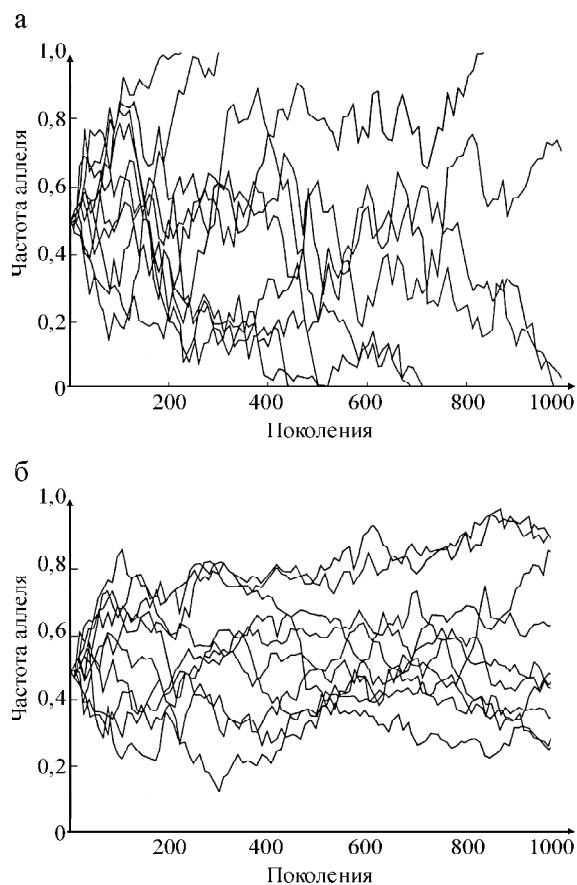


Рис. 2. Динамика частоты гена в поколениях 10 панмиктических (а) и 10 подразделенных (б) модельных популяций численностью 500 гаплоидных особей каждая. Подразделенная популяция соответствует известной кольцевой циркулярной модели со ступенчатой структурой генных миграций (М. Кимура). Структура циркулярной модели: число субпопуляций $k = 25$, эффективная численность субпопуляции $N = 20$, коэффициент миграции генов $m = 0,03$ (По: Алтухов, 2003).

Сравнение рис. 2а и 2б показывает, что к 1000-му поколению эксперимента из 10 модельных панмиктических популяций численностью 500 особей каждая "выродились" (т.е. стали полностью гомозиготными) 8, тогда как ни одна из подразделенных популяций той же численности ($N_e = 20; k = 25; m = 0,03$) не утратила генетического разнообразия. Если рассчитать "время жизни" панмиктических и равных им по величине подразделенных популяций, приняв за него число поколений, соответствующее потере 99 % от исходного уровня гетерозиготности, то для первого случая эта оценка составит 2301 поколение, а для второго ($N_e = 20; k = 25; m = 0,05$) – 5341. Иными словами, всего лишь наличие субпопуляционной структуры кольцевого типа с ограниченной интенсивностью генных миграций (порядка 0,5–1 %) замедляет темп убыли генетической изменчивости так, как если бы эффективная численность панмиктической популяции удвоилась. Различные сравнения такого рода, приведенные в табл. 1, демонстрируют очевидные преимущества популяционной системы в сохранении генетического полиморфизма на длительных временных интервалах. Такой вывод важен для природоохранной биологии, ибо совершенно очевидна несоизмеримость ресурсов (величина ареала, количество пищи и т.п.), требуемых для достижения одинакового практического результата: в одном случае численность так называемой "минимальной жизнеспособной популяции" может быть, благодаря внутренней фрагментации, равна всего сотням, тогда как в другом – тысячам и более особей.

В теоретическом плане интересен тот факт, что процесс убыли генетической изменчивости за счет дрейфа генов в структурированной популяции, как и следовало ожидать, обратно пропорционален интенсивности генной миграции и в первых десятках поколений оказывается выше, чем при панмиксии (Алтухов, 2003). Однако в дальнейшем картина меняется принципиально, и подразделенная популяция численностью всего 100 особей ($N_e = 10; k = 10; m = 0,01$) продолжает сохранять определенный уровень гетерозиготности на временном интервале, измеряемом сотнями поколений после момента "вырождения" бесструктурного сообщества (табл. 1).

Таблица 1

"Время жизни" (в поколениях) панмиктических и подразделенных популяций, тождественных в отношении численности, до момента утраты 95–99 % исходной гетерозиготности

Индивидуальная численность (N_i)	Количество субпопуляций (k)	Подразделенность с коэффициентом генных миграций						Панмиксия
		0,0005	0,001	0,005	0,010	0,030	0,000	
10	10	33/1119	40/1997	440/957	440/957	364/628	20/44	299/459
20	25	81/4977	314/8251	1731/5341	1772/3801	1437/2464	59/90	1497/2301

Устойчивость подразделенной популяции есть следствие формирования в ней неслучайной субпопуляционной структуры, реорганизации которой в "биологическом" времени, по крайней мере внешне, напоминают стационарный (точнее, квазистационарный) процесс – в линейно упорядоченных структурах появляются "волны". Введение в модель фактора так называемой "дальней миграции" (его роль могут играть миграция генов с "материка" системы в периферические субпопуляции, давление мутаций или отбора) способно быстро стабилизировать процесс; он становится истинно стационарным (Алтухов, 2003).

Приведенные факты с новых позиций подкрепляют сделанный ранее вывод о большей стабильности популяционной системы по сравнению с панмиктической, бесструктурной популяцией (Алтухов, Рычков, 1970). Можно считать доказанным, что и в природе, и в эксперименте популяционная система, благодаря реципрокному балансу факторов эволюции, сохраняет в ряду поколений генетическую характеристику предковой популяции, хотя в отсутствие "ядра" системы эти частоты генов могут вовсе и не быть свойственны ныне живущим популяциям и реконструируются лишь в процессе усреднения по всем компонентам структуры. Но не только стохастическая регуляция ответственна за генетическую устойчивость подразделенных популяций. Как отмечалось выше, основной механизм поддержания такой устойчивости – отрицательная корреляция между эффективной численностью популяции и интенсивностью миграции генов в нее из общего

генного пула системы. В этом случае и при условии достижения системой стационарной фазы стандартизованная генетическая вариация \bar{F}_0 (или ее эквивалент G_{ST}) должна оставаться величиной постоянной, на каком бы уровне популяционной иерархии она ни оценивалась. Такая модель генетической дифференциации вида в теории популяционной генетики никогда не обсуждалась. Между тем для популяций человека инвариантность пространственной генетической дифференциации на разных уровнях иерархии давно обнаружена и получила название "генетическая эквидистантность этапов этногенеза" (Рычков, Ящук, 1985). При разработке данных о частотах многих генов в системах коренного населения Европы, Северной Азии и Америки одна и та же величина коэффициента генной дифференциации, выраженная в единицах G_{ST} , оказалась свойственной каждому уровню популяционной иерархии безотносительно к его исторической древности. Такого рода закономерность удается продемонстрировать лишь в том случае, если вычленение региональных долей (G_{ST_i}) из общей генетической изменчивости системы ($G_{ST_{i-1}}$) проводится в соответствии с этническими классификациями, независимыми от генетики, но, вместе с тем, выделяющими *реальные уровни общности*, складывавшиеся в ходе исторического развития подразделенной популяции (например, лингвистическая классификация, этноконфессиональная и др.).

Для других видов подобная организация первичного материала весьма затруднительна

из-за отсутствия столь же надежных филогенетических систем, однако там, где удастся учесть естественноисторические особенности формирования ареала и выделить соответствующие им уровни древности (этапы сложения популяционной структуры), результат оказывается сопоставим с полученным для популяций человека. Это можно проиллюстрировать на примере нерки, *Oncorhynchus nerka* – одного из видов тихоокеанских лососей, имеющих сложную субпопуляционную структуру (табл. 2). Оценки G_{ST} основаны на собственных и литературных данных о частотах аллелей нескольких аллозимных локусов в 45 выборках из нативных популяций, размножающихся в бассейнах 20 рек Северной Азии и Северной Америки (детали см. Алтухов, 2003). Данные, приведенные в табл. 2, ясно показывают одинаковую степень локальной генетической дифференциации для трех выделенных нами уровней общности.

$F_{ST} = 0,0554$; во второй – $F_{ST} = 0,0541$. Тождественны F_{ST} -статистики, оцененные из частот гаплотипов ПДРФ-генов ядерной ДНК для атланти-средиземноморской ($F_{ST} = 0,13$) и индотихоокеанской ($F_{ST} = 0,13$) совокупностей популяций зеленой черепахи *Chelonia mydas* (ссылки см. Алтухов, 2003).

Анализ мировой литературы под соответствующим углом зрения убеждает, что число подобных примеров можно увеличить, но, к сожалению, ни в одной из известных публикаций не удается пока найти такие данные, которые позволили бы построить независимую от генетики исчерпывающую иерархическую классификацию популяций и выделить реальные, исторически сложившиеся уровни общности. Возможно, эта проблема привлечет к себе внимание специалистов, и недостающая информация станет появляться в печати. Однако уже и приведенных результатов вместе с опубликованными ранее (Алтухов и др., 1997)

Таблица 2

Пространственная генетическая дифференциация на разных уровнях иерархии популяционной системы нерки *Oncorhynchus nerka*

Уровень общности	Показатель	Степень локальной генетической дифференциации	
		в единицах G_{ST}	в долях $G_{ST_{i-t}}$, %
Регионы (Азия и Америка)	G_{3-4}	0,0254	34
Субрегионы в рамках регионов	G_{2-3}	0,0237	32
Реки в субрегионах	G_{1-2}	0,0249	34

Примечание. $G_{ST_{i-t}} = 0,074$.

Обращение к литературным источникам позволяет обнаружить ту же закономерность и для других видов, чья пространственная дифференциация была изучена одновременно по многим аллозимным генам. Так, например, у тихоокеанского лосося – чавычи, *Oncorhynchus tshawytscha*, значения G_{ST} на субрегиональном и региональном уровнях иерархии составили соответственно 0,047 и 0,053. То же обнаруживается для грызуна – луговой собачки *Synotus ludovicianus*, если оценивать дифференциацию субпопуляций ("wards") в пределах двух наиболее изученных популяций: в первой

достаточно для того, чтобы трактовать генетическую дивергенцию вида как ветвящийся процесс реорганизации генофонда предковой популяции по мере ее дифференциации на подчиненные подразделения в поколениях и по ареалу. В условиях нормально колеблющейся среды средняя частота гена, а по достижении фазы устойчивого равновесия и дисперсия в системе остаются инвариантными в отношении микроэволюционных преобразований, взаимно компенсирующих друг друга. Иными словами, изолированная популяция, если она не исчезает в ходе истории, развер-

тывается "в самое себя", поддерживая динамическое равновесие с окружающей средой.

Таким образом, внутривидовая генетическая дифференциация в условиях нормальной природной среды протекает в среднем по селективно-нейтральному типу и оказывается не цепью Маркова, в которой эволюция популяций не может быть прогнозируема далее чем на одно поколение, а процессом с памятью. Память о генетических свойствах прапопуляции, оптимальном соотношении в ней гомо- и гетерозиготных генотипов сохраняется благодаря упорядочивающему воздействию иммиграции генов. Это имеет место и в фазе формирования субпопуляционной структуры с выделением уровней системной иерархии (Рычков, Ящук, 1985) и в стационарной фазе через авторегуляцию параметра $N_e t$ (Алтухов, 2003). Предлагаемая трактовка, принципиально отличаясь от традиционных взглядов теоретической популяционной генетики, нуждается в дополнительном рассмотрении. Необходимо еще раз подчеркнуть: состояние генетического оптимума, унаследованное нативной системой популяций от предкового генофонда, только и может рассматриваться как показатель нормы. Следовательно, *нормальный генетический процесс можно определить как такой тип воспроизводства видовых генофондов, при котором соотношение внутри- и межпопуляционной компонент генного разнообразия сохраняется на эволюционно сложившемся оптимальном уровне, специфичном для каждого вида*. Понятно, что именно это соотношение и должно быть фундаментальной точкой отсчета при генетическом мониторинге популяционных систем, испытывающих антропогенные воздействия.

Обратимся теперь к рассмотрению соответствующих данных, полученных для ряда природных популяций.

Динамика генофондов природных популяционных систем, испытывающих антропогенные воздействия

В мировой литературе имеются примеры долгосрочного слежения за генетическими характеристиками отдельных популяций в природных условиях (примеры см. в Мауг, 1963). Генетическая динамика, как правило,

была сложной, однако в большинстве случаев отмечались *временные тренды*, трактуемые обычно как результат непрерывно текущего микроэволюционного (нередко – адаптивного) процесса. Более внимательный анализ тех же ситуаций (за исключением очевидных сдвигов в случае с индустриальным меланизмом у березовой пяденицы и при адаптации некоторых вредителей сельскохозяйственных культур к инсектицидам) показывает, однако, что наблюдавшаяся динамика могла носить чисто случайный характер, отражая факт игнорирования исследователями существующей субпопуляционной структуры, неравномерного охвата ее выборками. Поэтому следует признать, что только цикл многолетних работ, выполненных на популяциях промысловых рыб, включая тихоокеанских лососей, в наибольшей мере отвечает главной задаче генетического мониторинга и рассмотренным выше принципам его реализации (детали см. Алтухов, 2003). В последние годы близкий подход стал осуществляться также зарубежными авторами на различных видах лососей и некоторых других рыб (обзоры: Carvalho, 1995; Allendorf, Waples, 1996). Одно из главных наблюдений в этих программах мониторинга – выявляемое по биохимическим маркерам снижение генного разнообразия искусственно поддерживаемых популяций по сравнению с нативными. Но не менее важно открытие отрицательных эффектов увеличения внутривидовой популяционной генетической изменчивости, сопряженного с селективным промыслом и трансплантациями генофондов из одних участков видовой ареала в другие. Рассмотрим эти данные по порядку.

Промысел. При изучении природных рыбных популяций (стад) обнаруживается ярко выраженная гетерогенность, их дифференцированность на более мелкие, генетически отличающиеся субпопуляции. Это, например, было показано около 40 лет назад для американского морского окуня *Sebastes mentella*, чьи стада обитают на больших глубинах в районах п-ва Лабрадор и о-ва Ньюфаундленд (Алтухов, 2003).

Обнаружение такой системной организации популяций имеет принципиальное практическое значение. Очевидно, что если мы хотим осуществлять рациональный промысел, имея дело с системой, то должны подходить к ней

как к целому с учетом ее внутренней структуры. Вместе с тем рыбаки обычно игнорируют эту организацию стада, вследствие чего происходит разрушение популяционных систем.

Для иллюстрации сказанного обратимся к типичной картине морского рыбного промысла, стратегия которого, как известно, включает две главные акции – разведку достаточно плотных скоплений рыб поисковым судном и, после их обнаружения, вылов флотилией промысловых судов. Чтобы показать эту картину в динамике, можно изобразить ее в виде серии следующих друг за другом "кадров" (рис. 3), которые демонстрируют вскрытую нами цепь генетически отличающихся суб-

Столь на первый взгляд абстрактная схема получила прямые доказательства при изучении последствий промыслового воздействия на подразделенные популяции тихоокеанского лосося – нерки, размножающейся в озерах Камчатки. Важная биологическая особенность нерестовых популяций нерки – уникальная картина изменчивости производителей по длине тела: самки характеризуются одновершинным распределением, тогда как для самцов прослеживается четко выраженная двувершинность (Алтухов, 1983). В это время в водоемах обнаруживаются три легко распознаваемые группы рыб: мелкие самцы, крупные самцы и самки, занимающие между двумя

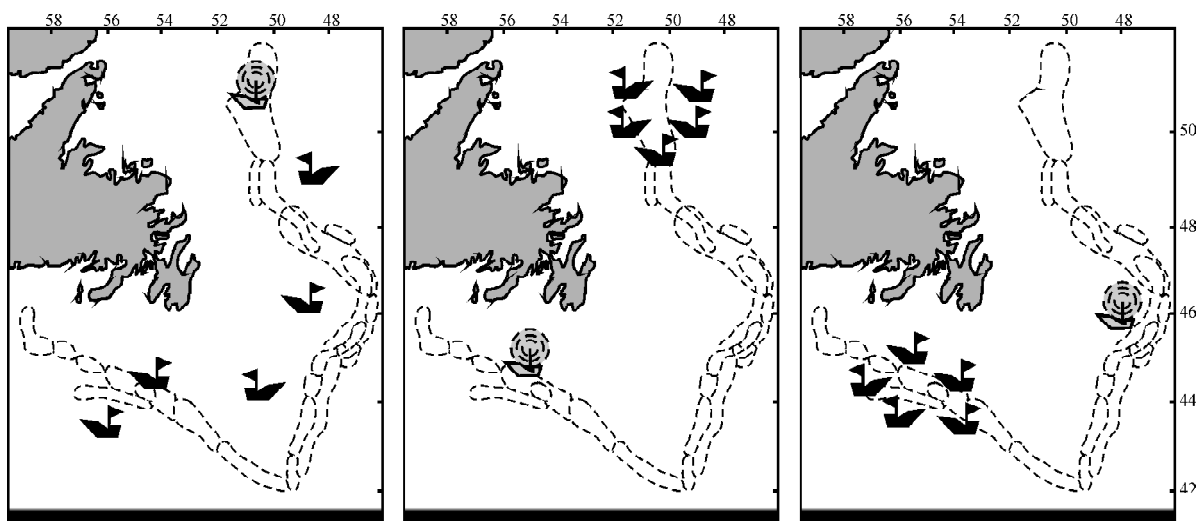


Рис. 3. Примерная схема промысла морского окуня на Ньюфаундлендских банках. Флотилия траулеров перемещается по ареалу в районы максимальных концентраций рыб, обнаруживаемых поисковым судном. Это приводит к неравномерному облову стада, субпопуляционная структура которого оконтурена прерывистой линией (По: Алтухов, 1989).

популяций морского окуня. Понятно, что при подобном типе промысла, когда суда всякий раз устремляются в тот участок ареала, где скопление рыб характеризуется максимальной плотностью, одни субпопуляции перелавливаются, другие недолавливаются. В конечном счете происходит нарушение естественно сложившихся каналов миграционной связи между элементами системы, разрушается генетическая структура популяции. Этого можно было бы избежать, равномерно облавливая стадо как целое, с постоянным учетом пространственной субпопуляционной организации.

группами самцов промежуточное положение по признаку "длина тела". Мало того, в процессе промысла можно видеть, как со временем в исследуемой популяции существенно возрастает доля мелких половозрелых самцов. Такие, как правило, трехлетние самцы (их местное название на Камчатке – "каюрки", канадцы называют их "джек", американцы – "грилз") лишь с небольшой частотой встречаются в нативных, мало облавливаемых стадах. Напротив, в популяциях, испытывающих систематическое промысловое воздействие, количество мелких, рано созревающих самцов резко возрастает. Этот процесс в настоящее

время в большей или меньшей мере характерен практически для всех популяций тихоокеанских лососей, размножающихся в разнообразных речных системах по обе стороны Северной Пацифики и интенсивно облавливаемых промыслом с начала нашего столетия.

Ярким примером, иллюстрирующим это правило, может служить стадо нерки оз. Дальнего (п-ов Камчатка), биология которого детально изучена начиная с 1930-х гг. благодаря работам Ф.В. Крогиус (цит. по Алтухов, 1989). Если в 1930-х гг. численность нерестовой части дальнеозерского стада составляла около 100 тыс. производителей, а доля каюрок среди половозрелых самцов не превышала 0,2 %, то в 1960–1970-е гг. численность производителей сократилась до 2–5 тыс. и доля каюрок увеличилась до 38 %.

В чем же причина столь драматических изменений? Исследования показали, что главный фактор – селективный морской промысел, из поколения в поколение нарушающий генетическую структуру стад нерки из-за непропорционального изъятия жабберными сетями крупных, более гомозиготных старых самцов. Другие рыбы, идущие на нерест и отличающиеся генетически от крупных самцов, облавливаются промыслом или равномерно (самки), или недолавливаются (мелкие самцы), что и приводит к резкому изменению исторически сложившейся популяционно-генетической структуры стада (Алтухов, 1989).

Дело в том, что в нерестовых стадах нерки существует весьма консервативная система так называемых селективных скрещиваний. При формировании брачных пар на нерестилищах самки отдают предпочтение старым, медленно растущим, более гомозиготным крупным самцам и лишь в маловодные годы и на мелководных нерестилищах, куда крупные самцы не могут проникнуть, репродуктивный успех сопутствует быстрорастущим молодым, более гетерозиготным самцам. Промысел нарушает естественную систему воспроизводства, и более гетерозиготные (гетерозисные) мелкие самцы во все большей мере передают свои гены последующим поколениям (хотя обычно гетерозисные животные характеризуются увеличенными разме-

рами, у нерки это не так, поскольку рыба размножается только раз в жизни и после нереста производители погибают). Доля крупных рыб в стаде уменьшается, нарушается равновесное соотношение полов, увеличивается скорость полового созревания, сокращается средняя продолжительность жизни и, как следствие, возрастает темп смены поколений. Одновременно падает численность стада, так как мелкие самки имеют более низкую плодовитость. Таким образом, в условиях снижения воспроизводительной способности стада даже постоянный по интенсивности промысел, вполне совместимый с изначальными продукционными возможностями популяции, приводит к сокращению ее численности в поколениях только из-за непропорционального изъятия рыб определенных генотипов (Алтухов и др., 1997; Altukhov *et al.*, 2000).

Обнаруженные процессы свойственны не только стадам тихоокеанских лососей, но и другим видам рыб – объектам промысла. Во всех до сих пор детально исследованных случаях картина была однотипной – мониторинг промысловых стад вскрывает их измельчение, омоложение, возрастание доли рано созревающих мелких самцов. Поскольку направление отбора оказывается неизменным (в пользу гетерозигот), внутривидовая компонента генного разнообразия возрастает, тогда как межвидовая – падает, приводя к снижению локальной генетической дифференциации. В таких условиях эмпирические значения F_{ST} (G_{ST}) оказываются достоверно ниже ожидаемой величины. Например, локальная генетическая дифференциация группы субпопуляций нерки оз. Азабачьего на Камчатке, наиболее подверженных селективному промыслу, составляет (в единицах F_{ST}) лишь 0,008 против 0,059, ожидаемых для селективно-нейтрального процесса (Altukhov *et al.*, 2000). В условиях столь мощного искусственного отбора устанавливаются неслучайные связи между полигенными (длина тела, скорость роста и полового созревания) и моногенными (аллозимы) признаками. Более сложная картина наблюдается при искусственном воспроизводстве рыбных популяций.

Искусственное воспроизводство. Генетические последствия искусственного воспроизводства лучше всего рассмотреть на примере лососей. Как уже подчеркивалось, их стада – сложноструктурированные популяционные системы, состоящие из множества дискретных субпопуляций. Если мы воспроизводим такие системы искусственно на рыбоводных заводах, то должны осуществлять сбор половых продуктов на всем протяжении нерестового хода, а не ограничиваться использованием лишь части дифференцированного генофонда. Чем более рельефна субпопуляционная структура популяции, тем меньше шансов воссоздать целое по его отдельной части. К сожалению, это обстоятельство на рыбоводных заводах нередко игнорируется и, как следствие, генетическое разнообразие популяций сокращается, что показано, например, для *Salmo clarki* и *S. salar*.

Нами выполнен мониторинг трех соседствующих нерестовых популяций горбуши Южного Сахалина – двух нативных (реки Фирсовка и Бахура) и одной искусственно воспроизводимой (р. Найба) (расстояние между реками – несколько десятков километров) (Алтухов и др., 1997). Популяция Найбы поддерживается рыбоводным заводом, благодаря деятельности которого численность местного стада увеличилась, судя по уловам, в несколько раз. Вместе с тем за последние годы в биологической структуре рыбоводного стада произошли изменения: рыба стала заметно крупнее, увеличилась частота самцов, стала сокращаться численность.

Для выяснения механизма процесса, приведшего к такого рода сдвигам, мы проделали следующее: 1) по совокупности аллозимных локусов, идентифицируемых методами электрофореза, сравнили генетические характеристики самцов-производителей, используемых и отбраковываемых в рыбоводном процессе; 2) проследили динамику соотношения полов и длины тела рыб в ряду поколений искусственно воспроизводимой найбинской популяции; 3) сопоставили ее генетические и биологические параметры с аналогичными параметрами двух нативных стад, размножающихся в соседних реках.

Кроме того, для выяснения связей индивидуальной гетерозиготности с биологически важными признаками у самцов, помимо длины тела, исследовали частоту аномалий (искривлений, расщеплений, срастаний) жаберных тычинок как показатель стабильности онтогенеза. По степени выраженности эти нарушения можно подразделить на две группы: слабые (затронута только одна жаберная дуга) и сильные (затронуты две и более дуг); в сравнительном анализе нами принимались во внимание только сильные аномалии.

Динамика длины тела и соотношения полов у найбинской горбуши оценивалась по рыбоводным материалам начиная с 1973 г. за весь период ее регулярного разведения. Аналогичные данные для самовоспроизводящейся популяции горбуши соседней р. Фирсовки собраны в процессе наших собственных работ. Идентификация генотипов осуществлялась по шести аллозимным локусам.

На рыбоводном заводе при искусственном оплодотворении отдельных порций икры, каждую из которых получают от 50 самок, используются молоки 20–30 самцов. Кроме того, сбор половых продуктов, как правило, осуществляется в начале нерестового хода, когда преобладают самцы, и в середине его, когда соотношение полов близко к равновесному. Сравнение самцов, использованных в рыбоводном процессе ($n = 300$, длина тела $52,6 \pm 0,2$ см), с отбракованными ("контрольная" группа, $n = 293$, длина тела $47,8 \pm 0,1$ см) свидетельствует о предпочтении рыбоводами крупных рыб. Для отбираемых самок такой селективности не выявлено. Особенно важен тот факт, что между контрольной группой самцов и самцами, использованными в скрещиваниях, различия наблюдаются также и по уровням аллозимной гетерозиготности, и по частоте рыб с аномалиями жаберных тычинок: крупные самцы, взятые для рыбоводных целей, оказались более гомозиготными по сравнению с контрольной группой (доля гомозиготных рыб $0,443 \pm 0,029$ и $0,369 \pm 0,028$ соответственно; различие достоверно при $P < 0,05$); у них же выше частота рыб с аномалиями жаберных тычинок ($P < 0,05$). Если предположить, что такой отбор был в той или иной мере систематическим на протяжении более 16 лет искусственного воспроизводства горбуши р. Найбы и, как

правило, в воспроизводство не вовлекалась "арьергардная" часть стада, характеризующаяся избытком самок, следовало ожидать вполне определенных сдвигов в биологической структуре популяции: снижения гетерозиготности по аллозимным локусам, увеличения длины тела, нарушения оптимального соотношения полов за счет нарастания доли самцов (так как сбор икры осуществляется главным образом на раннемигрирующих группах рыб, среди которых высока частота самцов).

Это предположение подтвердилось, во-первых, данными биологического мониторинга нескольких поколений найбинской популяции и, во-вторых, сравнением биологических и генетических характеристик этого стада с характеристиками нативных стад, нерестящихся в соседних реках Фирсовке и Бахуре. В последовательных поколениях найбинской популяции в более "урожайные" нечетные годы, когда искусственный отбор среди самцов выражен сильнее, доля самок падает, а длина тела рыб достоверно ($P < 0,05$) возрастает.

Зная разницу между средней длиной тела рыбы в начале и конце цикла отбора, т.е. так называемый селекционный дифференциал S , а также коэффициент наследуемости признака h^2 ($\approx 0,27$ для лососевых), можно оценить ожидаемый сдвиг (R) величины признака и сопоставить его с реально наблюдаемым на исследованном интервале поколений, используя известную формулу Фолконера $R = Sh^2$. Полученные оценки – 5,8 и 5,3 см соответственно настолько близки друг другу, что не нуждаются в дополнительных комментариях: селективный характер рыбоводного процесса очевиден. И так же, как под давлением промысла (см. выше), обнаруживается неслучайная связь

между изменчивостью полигенного признака (длина тела) и интегральной структурой генотипа по совокупности аллозимных локусов.

Принципиально важны и материалы табл. 3, в которой приведены оценки соотношения полов и средней длины тела для пяти "нечетных" поколений горбуши из воспроизводящейся только естественным путем популяции р. Фирсовки. В сравнении с резко меняющейся во времени найбинской популяцией стационарное состояние стада р. Фирсовки вполне очевидно. Средняя длина тела как самцов ($50,2 \pm 0,17$), так и самок ($49,3 \pm 0,11$) в р. Найбе достоверно выше ($P < 0,01$), чем в соседних реках Фирсовке ($47,3 \pm 0,38$ и $45,7 \pm 0,21$) и Бахуре ($46,4 \pm 0,30$ и $45,3 \pm 0,21$). В полном соответствии с этим у рыб из р. Найбы снижена величина мультилокусной аллозимной гетерозиготности ($0,730 \pm 0,016$ против $0,892 \pm 0,020$ в р. Фирсовке и $0,821 \pm 0,019$ в Бахуре).

При сравнении природных и искусственно поддерживаемых популяций атлантических лососей – семги *Salmo salar* и кумжи *S. trutta* – обнаруживаются 2 противоположно направленных процесса, связанных с перераспределением внутри- и межгрупповой компонент генного разнообразия (табл. 4). Так, у семги, воспроизводимой на рыбоводных заводах, межпопуляционная генетическая дифференциация существенно выше, а внутривидовый полиморфизм ниже, чем в природных условиях. Прямо противоположная, но еще более рельефная картина характерна для испанских и французских стад кумжи. Очевидно, что в случае с семгой рыбоводная деятельность приводит к нарастанию инбридинга, чему способствует малая численность

Таблица 3

Соотношение полов и средняя длина тела производителей горбуши в поколениях нечетных лет нативной популяции р. Фирсовки (По: Алтухов и др., 1989)

Год	Число изученных особей	Доля самок, %	Средняя длина тела и дисперсия			
			самки		самцы	
			\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
1979	416	51,2	46,6	2,88	47,3	3,88
1981	349	48,3	48,0	2,20	47,9	2,47
1985	250	50,0	45,7	2,51	47,3	4,10
1987	100	61,0	47,1	2,18	47,4	4,54
1989	216	51,8	46,3	4,27	45,9	5,91

Таблица 4

Генетическое разнообразие природных и искусственно поддерживаемых популяций лососей
(по: Алтухов, 1995)

Вид, регион	Природные			Искусственно поддерживаемые			Источник
	H_T	H_S	G_{ST}	H_T	H_S	G_{ST}	
<i>Salmo salar</i> Западная и Восточная Атлантика	0,041	0,038	0,064 (29 популяций)	0,037	0,030	0,196 (24 популяции)	Stahl, 1987
<i>Salmo trutta</i> Испания	0,069	0,027	0,610 (4 популяции)	0,092	0,083	0,028 (4 популяции)	Garcia-Marin <i>et al.</i> , 1991
Франция	0,111	0,050	0,550 (8 популяций)	0,077	0,072	0,063 (7 популяций)	Kreig, Guyomard, 1985

производителей, используемых для воспроизводства, тогда как в случае с кумжей нарастание внутривидовой гетерозиготности и стирание межвидовой генетической дифференциации есть следствие перемешивания генофондов различных по происхождению маточных линий либо отбора в пользу гетерозигот. В первом случае стада лососей страдают от инбридинга, во втором – от аутбридинга. Отрицательные последствия массовых трансплантаций – перебросок популяционных генофондов из одних частей видовой ареала в другие детально обсуждались ранее (Алтухов и др., 1997; Altukhov *et al.*, 2000). Помимо пониженной приспособленности гибридов между местными и вселенными рыбами, был обнаружен еще один важный факт: *в новых условиях переселенная популяция возвращается для размножения в те же сроки, что и в родную реку, и при этом генетическая структура переселенцев остается практически неизменной, несмотря на крайне низкий коэффициент возврата.* Это говорит лишь об одном: отбор в новых условиях носит неизбирательный характер, т.е. является катастрофическим. Когда мы нарушаем складывавшиеся веками связи между элементами экосистем, вырываем популяцию из исторически сложившейся, "собственной" среды и переносим в новую среду, запаса генетической пластичности обычно не хватает.

Уитлер (Withler, 1982), проанализировав обширные литературные данные о трансплантациях тихоокеанских лососей, пришел

к выводу, что такая деятельность по созданию в пределах естественного ареала новых анадромных стад оказалась крайне безуспешной. Эти и другие факты свидетельствуют об уникальности и консервативности локальных адаптаций, формируемых отбором на протяжении сотен и тысяч поколений в той конкретной среде, с которой связана естественная история популяции.

Необходимо, однако, учитывать, что и успешная акклиматизация оказывается, как правило, нежелательной по ее экологическим последствиям, так как при этом происходит вытеснение популяций местных видов либо на основе конкуренции – пищевой или за места нереста, либо, что бывает, по-видимому, чаще – за счет распространения возбудителей болезней, к которым не выработан иммунитет у местных форм.

Итак, мониторинг природных популяций хозяйственно ценных рыб вскрывает довольно однотипную картину изменений при антропогенных воздействиях. Практически во всех изученных случаях имеют место *неблагоприятные генетические процессы, т.е. такой тип воспроизводства видовой генофондов, при котором нарушается оптимальное соотношение внутри- и межвидовой компонент генного разнообразия, утрачивается память о прошлом состоянии.* Эти процессы порождаются игнорированием в хозяйственной деятельности исторически сложившейся субпопуляционной структуры. Даже рыболовная практика, преследующая, казалось бы, благородную цель – искусст-

венное воспроизводство биологических ресурсов, – может приводить к нежелательным последствиям. Как и прогнозировалось в первом разделе статьи, они связаны с перераспределением генетического разнообразия таким образом, что его внутрипопуляционная компонента (H_S) уменьшается, тогда как межпопуляционная (G_{ST}) – нарастает. Ситуация, типичная для лососевых рыболовных заводов, использующих либо недостаточное число производителей и тем самым провоцирующих инбридинг, либо ведущих бессознательный отбор в пользу гомозигот, что, по сути, одно и то же. Этот процесс *инадаптивен* и может привести к необратимой деградации популяций даже после прекращения соответствующего воздействия.

Перераспределение компонент генного разнообразия за счет увеличения внутрипопуляционной гетерозиготности обнаруживается при мониторинге самовоспроизводящихся популяций – объектов промышленного рыболовства, а также при искусственном воспроизводстве атлантических лососей на рыболовных заводах и при садковом выращивании (Altukhov *et al.*, 2000). Этот процесс *адаптивен*, однако конечный его результат – также деградация популяций, ибо плата за адаптацию оказывается непомерно большой, например, – замена проходных (мигрирующих) высокопродуктивных популяций малопродуктивными жилыми формами или увеличивающаяся смертность на ранних онтогенетических стадиях. Между тем своевременное прекращение неблагоприятного внешнего воздействия оставляет шанс для восстановления нарушенной субпопуляционной структуры и нормализации генетических процессов в популяционной системе.

Эти выводы получены благодаря многолетним наблюдениям на основе принципов мониторинга, рассмотренных выше. Можно полагать, что эти принципы приложимы и к другим популяциям, не только природным, но и сельскохозяйственным.

Мониторинг генофондов сельскохозяйственных популяций

На сегодняшний день наиболее надежная информация получена для сортов ячме-

ня, *Hordeum vulgare*, возделываемых в Восточной Сибири (Поморцев и др., 1994), и для различных пород кур, *Gallus gallus* (Моисеева и др., 1993).

За последние десятилетия было выведено, районировано и внедрено в производство около 60 новых сортов ячменя. Учитывая, что практически все они представляют собой популяции, а их районирование проводится в различных агроэкологических зонах, существенное значение приобретает вопрос о направлении отбора и его влиянии на генетическое разнообразие таких популяций.

Ниже приведены данные об изменениях аллельного состава 3 локусов гордеинов, полученные при сравнении местных сортов ярового ячменя Восточной Сибири (Хабаровский и Приморский края, Иркутская и Читинская области) с селекционными сортами, районированными в этих регионах за последние 60 лет (табл. 5). Анализ этих данных показывает, как существенно изменилась гетерогенность популяций: если раньше они были представлены смесью различных генотипов, то в настоящее время преобладают линейные сорта. Уровень генетической изменчивости существенно выше у местных сортов по сравнению с современными: у первых доля разновидностей с 3–4 аллелями по локусу *Hrd B* достигает 30 %, тогда как в преобладающей части вторых обнаружены лишь один, в лучшем случае два аллеля исследованных гордеиновых локусов (табл. 5). Ясно, что за последние 60 лет в генотипическом составе сортов ячменя, возделываемых в Восточной Сибири, произошли значительные изменения, связанные с сокращением наследственного разнообразия. Эти изменения вызваны сложившейся селекционной практикой – новые сорта являются потомством одного или нескольких растений.

Та же тенденция утраты генетического разнообразия во времени отчетливо прослеживается и при мониторинге популяций кур. Среди факторов, вызвавших снижение генетической изменчивости в промышленном птицеводстве, следует отметить резкое сокращение числа используемых в коммерческих целях пород. В состав теперешних промышленных кроссов входят лишь 4–7 пород из 603, перечисленных в каталоге Сомса. Что касается России, то из 80

Таблица 5

Гетерогенность местных и селекционных сортов ячменя по локусам *Hrd A*, *Hrd B* и *Hrd F*
(По: Поморцев и др., 1994)

<i>Hrd A</i>					
местные сорта			новые сорта		
число		доля сортов, %	число		доля сортов, %
аллелей	сортов		аллелей	сортов	
1	9	34,62	1	16	61,54
2	12	46,15	2	9	34,62
3	5	19,23	3	1	3,85
$\chi^2 = 5,05$; $d.f. = 2$; $P < 0,10$					
<i>Hrd B</i>					
местные сорта			новые сорта		
число		доля сортов, %	число		доля сортов, %
аллелей	сортов		аллелей	сортов	
1	9	34,62	1	20	76,92
2	9	34,62	2	6	23,08
3	6	23,08	3	0	0
4	2	7,69	4	0	0
$\chi^2 = 9,22$; $d.f. = 2$; $P < 0,01$					
<i>Hrd F</i>					
местные сорта			новые сорта		
число		доля сортов, %	число		доля сортов, %
аллелей	сортов		аллелей	сортов	
1	9	34,62	1	22	84,62
2	12	46,15	2	4	15,38
3	5	19,23	3	0	0
$\chi^2 = 13,49$; $d.f. = 2$; $P < 0,001$					
$\sum \chi^2 = 27,77$; $d.f. = 5$; $P < 0,001$					

старых пород к настоящему времени не сохранилось (или не найдено) около 30, что соответствует сокращению генетических ресурсов в плане породного состава на 37,5 % за последние 50 лет. Многие другие породы находятся на грани исчезновения (Моисеева и др., 1993).

Исследование динамики генетической изменчивости в птицеводстве и более точная количественная ее оценка согласуются с изложенными выше фактами. Были использованы экспериментальные данные (собственные и литературные) по биохимическому полиморфизму 48 популяций кур иностранного (средиземноморского и азиатского) и отечественного (российского) происхождения, включая диких предков домашних кур – подвид *Gallus gallus* (Red Jungle Fowl). Анализ основывался на 16 локусах, кодирующих белки крови и яиц. Шесть локусов полиморфны (*Ov*,

G-3, *G-2*, *Tf*, *Alb*, *Es-1*), тогда как остальные десять – мономорфны (*AMY-3*, *Es-2*, *PGM*, *PHI*, *TO*, *MDH*, *LDH*, *Es-D*, *Hb1*, *Hb2*). Каждая популяция охарактеризована по частоте встречаемости аллелей шести локусов. На основе усреднения частот аллелей, характерных для 47 пород, реконструирована генетическая структура гипотетической "прапопуляции".

Число аллелей на локус, как правило, оказывается ниже в группах коммерческих и средиземноморских пород. Относительно высокие оценки получены для диких кур, гипотетической "прапопуляции" и для группы азиатских кур. Примерно те же ранги занимают группы пород и по показателю средней гетерозиготности. Генетические "профили" гипотетической "прапопуляции" и некоторых отечественных пород кур представлены на рис. 4. Видно, что одни породы имеют уникальную структуру,

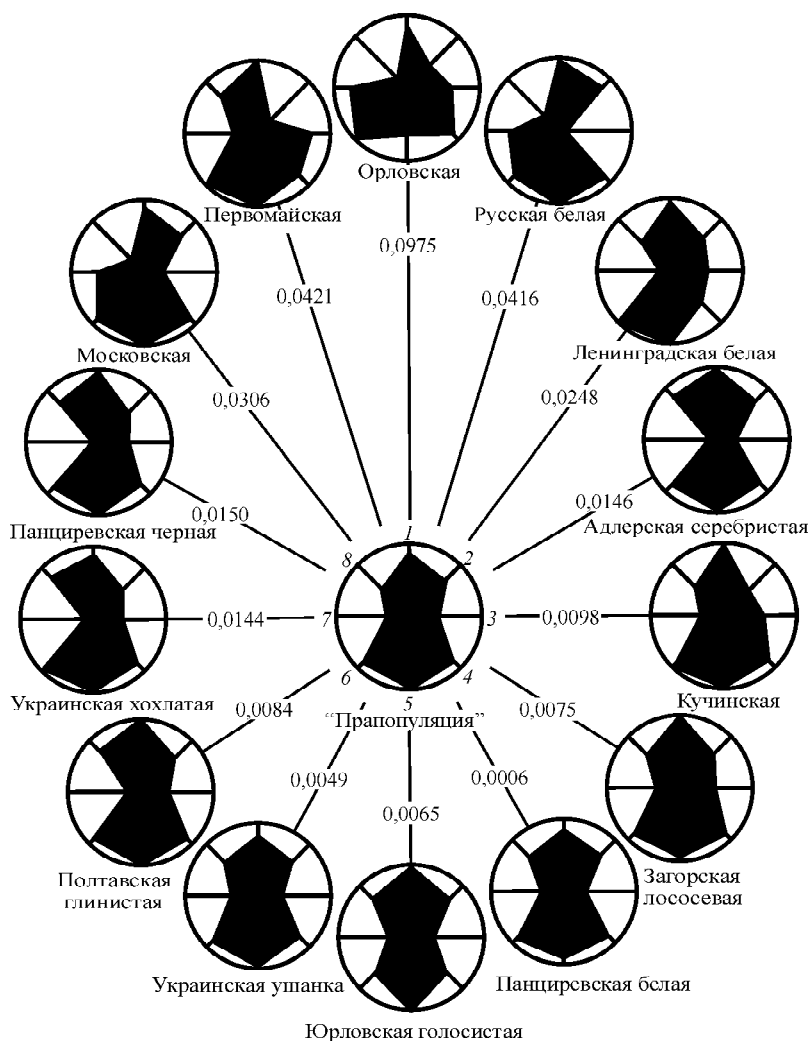


Рис. 4. «Генетический облик» некоторых отечественных пород кур и реконструированной «прапопуляции».

На радиусах отложены частоты следующих аллелей: 1 – *Ov A*; 2 – *G3-A*; 3 – *G3-B*; 4 – *G2-B*; 5 – *Tf B*; 6 – *Alb B*; 7 – *Es-1A*; 8 – *Es-1B*. Интервал частот генов: 0 – в центре круга, 1 – на периметре. На линиях, соединяющих отдельные породы с прапопуляцией, – оценки генетических расстояний по Нею.

другие вследствие их синтетического происхождения похожи на "прапопуляцию". К первой группе пород принадлежат пять популяций: орловская, первомайская, русская белая, ленинградская белая, московская; ко второй – остальные девять популяций, чьи генетические профили изображены на рис. 4.

Кроме того, обращает на себя внимание следующий факт: близкие к "прапопуляции" отечественные породы характеризуются более высоким уровнем внутривидовой гетерозиготности ($H_S = 0,213$) и низкой межпопу-

ляционной изменчивостью ($G_{ST} = 0,0975$) в сравнении с породами, наиболее удаленными от "прапопуляции" ($H_S = 0,183$; $G_{ST} = 0,2311$).

Со статистической точки зрения, так и должно быть. Но существенно то, что генетическая близость к прапопуляции оказывается связанной с меньшей породной специализацией: почти все 9 соответствующих пород имеют мясо-яичное направление продуктивности, тогда как 5 удаленных более специализированы либо в сторону яичного (например, русская белая, московская), либо мясного (например, ленинградская белая) направлений, а в основании наиболее удаленной от прапопуляции орловской породы находятся бойцовые куры.

Значительная межпопуляционная генетическая дифференциация и вместе с тем пониженный уровень гетерозиготности, характерные для группы специализированных пород, ясно указывают на то, что селекция сопровождалась потерей внутривидовой генетической разнообразия. Для группы неспециализированных пород характерна противопо-

ложная тенденция – рост гетерозиготности и утрата породного своеобразия. Очевидно, это все те же неблагоприятные генетические процессы, отмеченные выше для природных популяций и порождаемые человеческой деятельностью. Но природа и общество представляют единую динамическую систему, в связи с чем было бы важно понять: в чем сходство и различие генетических процессов, протекающих в популяциях человека и в природных популяциях? Этот вопрос интересен не только с чисто теоретической точки зрения на коэво-

люцию природы и общества или, иными словами, на коэволюцию генов и культуры. Он самым непосредственным образом смыкается с глобальной проблемой современности "Человек и биосфера", и правильный ответ на него, возможно, явился бы той путеводной нитью, которая указала бы нам выход из лабиринта усугубляющихся экологических проблем. Не претендуя на исчерпывающий анализ темы, обсудим ее в заключительной части статьи.

**Заключение: черты сходства
и различия в динамике генофондов
природных популяций
и популяций человека**

Рассматривая результаты генетического мониторинга нативных популяций, мы обращали внимание на важный факт равновеликости значений $F_{ST}(G_{ST})$ -статистики на разных уровнях иерархии популяционных систем различных биологических видов, с одной стороны, и человеческих популяций – с другой. Не является ли это сходство чисто внешним? Или за ним стоит некий универсальный регулирующий механизм?

По крайней мере, при исследовании эволюции популяционной системы коренных жителей Сибири показано, что такой механизм действительно существует и его роль выполняет миграция генов, уменьшающаяся во времени дискретно, по мере формирования каждого нового иерархического уровня структуры (Рычков, Ящук, 1985). При этом аргументируется, что рост численности системы сопряжен лишь с умножением числа субпопуляций, тогда как их средняя эффективная численность остается неизменной на протяжении всей истории дифференциации гигантского сибирского изолята. Сопоставление соответствующих F_{ST} -статистик – эмпирической, рассчитанной по совокупности локусов ($\bar{F}_0 = 0,0810$), и ожидаемой для селективно-нейтрального микроэволюционного процесса ($F_e = 0,0974$) – позволило оценить время достижения системой современного уровня генетического разнообразия, используя модель его экспоненциального роста:

$$\bar{F}_0 = F_e(1 - e^{-t/2N_e}).$$

Это время оказалось равным 19,5 тыс. лет (≈ 780 поколений) (Рычков, Ящук, 1985), что хорошо согласуется с археологическими радиоуглеродными датировками и оценкой, основанной на полиморфизме митохондриальной ДНК (Torgoni *et al.*, 1993).

Следовательно, в подразделенных популяциях человека постоянство долей тотальной $F_{ST}(G_{ST})$ на разных уровнях иерархии отражает продолжающийся и сегодня процесс генетической микродифференциации, следующей за пределом, отодвигающимся в ходе исторического развития системы народонаселения (Рычков, Ящук, 1985). Что же касается природных зоологических видов, то они, как предполагается (Алтухов, 1983), достигли эколого-генетического равновесия многие тысячелетия назад и с тех пор благодаря авторегуляции параметра $N_e m$ поддерживают структуру внутри- и межпопуляционной наследственной изменчивости на оптимальном уровне, отражающем их максимальную приспособленность к исторически сложившимся условиям естественного воспроизводства. Любопытно, что такая регуляция, по-видимому, имеет место даже у растительных видов, опыляемых насекомыми или птицами. Во всяком случае термин "optimal outcrossing distance", отражающий повышенную приспособленность потомков соответствующих родительских комбинаций у травянистого растения *Ipomopsis aggregata*, уже довольно давно и небезуспешно используется в ботанической литературе. Можно найти и более прямое доказательство, что у растений, так же как у животных, пространственная генетическая дифференциация оказывается практически одинаковой на сопоставимых уровнях естественной иерархии. Так, например, у того же многолетника *Ipomopsis aggregata* на уровне географических рас (подвидов) значения $N_e m$, оцененные по G_{ST} -статистикам 18 аллозимных локусов, оказываются весьма близкими, если не тождественными: *I.a. aggregata* – 2,62; *I.a. formosissima* – 2,46; *I.a. attenuata* – 2,44 и т. д. (при среднем для 8 подвидов – 2,49) (детали см. Алтухов, 2003).

Наше допущение о том, что в отличие от *Homo sapiens* генетические процессы в нативных природных популяциях протекают по ста-

ционарному типу, находит подкрепление еще в одном факте: генохронологические датировки через параметры субпопуляционной структуры у природных видов не удаются. Оцениваемое из приведенной выше формулы время существования популяции оказывается заведомо короче фактического. Так, для подразделенной популяции тихоокеанского лосося – нерки – в одном из камчатских озер оно составило ≈ 200 поколений, или около 900–1000 лет. Между тем это озеро как водоем, практически не отличающийся от современного, сформировалось по меньшей мере 5–7 тыс. лет тому назад и тогда же, по-видимому, было заселено. Определяемое в данном случае время, скорее всего, отражает лишь длительность достижения популяционной системой генетического равновесия и одновременно свидетельствует о непродолжительности этапа освоения природными популяциями ныне обитаемого ими пространства. Таким образом, в нашей модели предполагается не только уменьшение интенсивности генных миграций во времени, но и одновременный рост как числа субпопуляций, так и их эффективной численности вплоть до выхода системы на стационарный режим воспроизводства. Я, однако, не исключаю и такой возможности, что в процессе экспоненциального роста численности природной популяционной системы среднее значение N_e ее субпопуляции, как и у человека, остается величиной постоянной. *В любом случае завершение формирования иерархических структурных уровней означает дальнейшее существование подразделенной популяции как бы вне исторического времени.* Его оценка, разумеется, весьма приближенная, становится возможной лишь в рамках концепции "молекулярных часов" и теории генетических расстояний через анализ частот аминокислотных или нуклеотидных замен.

Хотя предлагаемая модель нуждается в дополнительной аргументации, она, тем не менее, подчеркивает два важных обстоятельства. Во-первых, поскольку коэффициент $F_{ST}(G_{ST})$ для каждого иерархического уровня популяционной структуры есть величина постоянная, можно оценить степень и характер отклонения региональных генофондов от средневидового оптимума и на этой основе про-

гнозировать и предотвращать неблагоприятные последствия таких отклонений. Иными словами, при осуществлении программ популяционного мониторинга открывается уникальная возможность "преодолеть" время через пространство, заменив длительные наблюдения за генетической структурой одной и той же группы популяций равномерным охватом видового ареала выборками с учетом его естественной истории.

Во-вторых, становится очевидным, что человек как творец и одновременно как субъект истории своей хозяйственной деятельностью порождает в природных видах те же самые генетические процессы, что регистрируются ныне и в его собственных популяциях: эволюцию к двум предельным состояниям структуры – к панмиксии или же крайней подразделенности, когда стираются либо чрезмерно гипертрофируются межпопуляционные различия. Процесс первого типа характерен для народонаселения зарубежной Европы, где происходит "свертывание" межпопуляционных различий и нарастает внутривидовый полиморфизм ($\bar{F}_0 = 0,0279$). Процесс второго типа характерен для коренных монголоидных популяций Северной Азии и Америки ($\bar{F}_0 = 0,081$ и $0,082$ соответственно), которые уже находятся вблизи предела пространственной дифференциации (Рычков и др., 1982). Ясно, что эти процессы суть плата за "цивилизацию" в одном случае и за "примитивный образ жизни" – в другом.

Какое из двух состояний предпочтительнее для человеческого общества – предмет особого обсуждения. Но в части, касающейся природных видов, ответ на заданный вопрос напрашивается сам собой: *оба процесса ведут к снижению приспособленности или даже деградации, приближая системы популяций к крайним пределам поддержания ими своей целостности.*

Действительно, рассмотренные выше результаты генетического мониторинга хозяйственно ценных видов удручающе: эволюционно сложившиеся уровни генного разнообразия нарушаются не только в процессе промысла (например, рыбного), но и при вполне благих намерениях, связанных с селекцией и улучшением сельскохозяйственных растений

(ячмень) и животных (куры) или же при искусственном воспроизводстве стад лососей на рыбобродных заводах. Во всех случаях непропорциональное изъятие одних генотипов и недоиспользование других либо их неравномерное воспроизводство порождают неблагоприятные процессы, приводящие к снижению приспособленности популяций. Механизм, лежащий в основе открытых явлений, сопряжен не только с уменьшением генетического разнообразия, но и с его увеличением по отношению к исторически сложившемуся оптимуму (Алтухов, 2003).

Есть основания утверждать, что во многих случаях или, по крайней мере, в тех из них, когда внутривидовой полиморфизм сокращается, а интрапопуляционная дифференциация нарастает, пределы допустимых генетических изменений уже превышены. В этом выводе – главный элемент делаемого нами долгосрочного прогноза генетических последствий антропогенного давления на природные и сельскохозяйственные популяции. Очевидно, что прогноз неблагоприятен. Поэтому в противовес существующим представлениям о продолжающейся эволюции биосферы я склонен сделать иной вывод – о происходящей на наших глазах деградации биосферы. Чтобы этого не допустить, нужно и в самом деле пересмотреть стратегию взаимодействия Человека с Природой, о чем речь уже шла в начале статьи. Заканчивая ее, мы возвращаемся к той же проблеме, правда, с одним уточнением: если вывод о плачевном состоянии биосферы Земли, сделанный во "Введении", мог выглядеть в определенной мере декларативным, то теперь его следует принимать во внимание уже с учетом рассмотренных выше фактов и результатов наблюдений. Они подсказывают, что взаимодействие человека с природой должно строиться таким образом, чтобы не разрушалась системная организация популяций, а внутри- и межпопуляционное генное разнообразие удерживалось на оптимальном уровне. Такой подход предполагает: 1) сохранение генетического разнообразия еще уцелевших популяционных систем в процессе их промысла и искусственного воспроизводства (неистощительное природопользование); 2) восстановление тех си-

стем, чья структура уже нарушена; 3) создание новых систем популяций в тех регионах, где существуют необходимые естественно-исторические и экономические условия. Эти принципы сохранения эволюционно сложившегося оптимального разнообразия должны быть справедливы для любых уровней биологической интеграции, включая экосистемный. Антропогенное давление испытывает биосфера в целом, но только популяции – исторически сложившиеся, самовоспроизводящиеся внутривидовые группировки особей – являются объектом непосредственных внешних воздействий. Я полагаю, что важнейшее условие стабильности любой экосистемы то же самое, что и популяционной системы отдельного вида, – саморегуляция через взаимодействие относительно независимых структурных компонентов, обменивающихся друг с другом информацией о своем собственном состоянии и о состоянии окружающей среды. Только на основе сохранения, восстановления и имитации исторически обусловленных направлений и интенсивности этих информационных потоков возможны как длительное существование охраняемого или вновь создаваемого сообщества, так и его способность целесообразно реагировать на те или иные внешние воздействия, не выходящие за пределы исторического оптимума. Для сохранения генетического разнообразия сельскохозяйственных популяций нами разработан специальный метод селекции и семеноводства, сочетающий умеренный направленный отбор по признакам продуктивности с одновременным стабилизирующим отбором по адаптивно значимым признакам. Реализация всех этих подходов будет способствовать не экстенсивному росту и сопряженному с ним разрушению биосферных генофондов, а устойчивому существованию системы "Человек – Биосфера" в неограниченно долгом ряду поколений.

Такой вывод был сделан более 30 лет тому назад (Алтухов, Рычков, 1970), но остался почти неостребованным. Позднее эта линия на оптимизацию взаимоотношений между человеком и природой неоднократно отстаивалась при различных обстоятельствах. Но, кажется, лишь на известной конференции ООН в Рио-де-Жанейро (1992) аналогичный подход возоб-

ладал, воплотившись в "Конвенции о биологическом разнообразии" и в призыве к разработке стратегии "устойчивого развития". Ее терминологический эквивалент – "модель социально-экологического оптимума" (Алтухов, 1983). Может быть, именно сейчас впервые открывается возможность в полной мере осознать значение генетики популяций для сохранения биологического разнообразия и управления им в процессе рационального хозяйственного использования. Естественным образом соответствующий раздел популяционной генетики трансформируется в природоохранную генетику.

Пользуюсь случаем, чтобы поблагодарить Е.А. Салменкову, Ю.С. Белоконю, Д.В. Политова, Б.А. Калабушкина, А.А. Поморцева и И.Г. Моисееву за помощь в подготовке этой статьи.

Литература

- Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Наука, 1983. 280 с.
- Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Наука, 1989. 328 с.
- Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: ИКЦ "Академкнига", 2003. 431 с.
- Алтухов Ю.П., Рычков Ю.Г. Популяционные системы и их структурные компоненты. Генетическая стабильность и изменчивость // Журн. общ. биологии. 1970. Т. 31. С. 507–526.
- Алтухов Ю.П., Калабушкин Б.А. Стабильный полиморфизм в современной и ископаемой популяции моллюска *Littorina squalida* // Докл. АН СССР. 1974. Т. 215. С. 1447–1480.
- Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т. Популяционная генетика лососевых рыб. М.: Наука, 1997. 288 с.
- Калабушкин Б.А. Генетическая изменчивость в современной и среднеголоценовой популяции *Littorina squalida* // Журн. общ. биологии. 1976. Т. 37, № 3. С. 369–377.
- Крогиус Ф.В. О взаимосвязи пресноводного и морского периодов жизни нерки озера Дальнего // Биология моря. 1979. № 3. С. 24–29.
- Моисеева И., Банникова Л., Алтухов Ю. Состояние птицеводства в России: генетический мониторинг // Междунар. с.-х. журнал. 1993. № 5/6. С. 66–69.
- Поморцев А.Л., Калабушкин Б.Л., Ладогина М.П., Бланк М.Л. Геноеография и закономерности распространения аллельных вариантов трех гордеин-кодирующих локусов ярового ячменя на территории бывшего СССР // Генетика. 1994. Т. 30, № 6. С. 806–815.
- Рычков Ю.Г. Система древних изолятов человека в Северной Азии в свете проблем стабильности и эволюции популяций // Вопр. антропологии. 1973. № 44. С. 3–22.
- Рычков Ю.Г., Ящук Е.В., Веселовская Е.В. Генетика и этногенез // Вопр. антропологии. 1982. № 69. С. 3–18.
- Рычков Ю.Т., Ящук Е.В. Генетика и этногенез. Историческая упорядоченность генетической дифференциации популяций человека (модель и реальность) // Вопр. антропологии. 1985. № 75. С. 97–116.
- Altukhov Yu.P., Salmenkova E.A., Omelchenko V.T. Salmonid Fishes: Population Biology, Genetics and Management. Oxford: Blackwell Science. 2000. 354 p.
- Allendorf F.W., Waples R.S. Conservation and genetics of salmonid fishes // Conservation Genetics: Case Histories from Nature / Ed. J.C. Avise, J.L. Hamrick. N.Y.: Chapman and Hall, 1996. P. 238–280.
- Carvalho G.R. Molecular genetics and the stock concept in fisheries // Molecular Genetics in Fisheries / Ed. G. Carvalho, T.J. Pitcher. L.: Chapman and Hall, 1995. P. 326–350.
- Garcia-Marin J.L., Jorde P.E., Ryman N., Utter F., Pla C. Management implications of genetic differentiation between native and hatchery population of brown trout (*Salmo trutta*) in Spain // Aquaculture. 1991. V. 95. P. 235–249.
- Krieg F., Guyomard R. Population genetics of french brown trout (*Salmo trutta* L.): large geographical differentiation of wild populations and high similarity of domesticated stocks // Genet. Selec. Evol. 1985. V. 17, № 2. P. 225–242.
- Mayr E. Animals Species and Evolution. Harvard: Harvard Univ. Press, 1963. 659 p.
- Nei M. Molecular Population Genetics and Evolution. Amsterdam: North-Holland Publ. Co., 1975. 288 p.
- Stahl G. Genetic population structure of Atlantic salmon // Population genetics and fishery management / Eds N. Ryman, F. Utter. Seattle; London: Univ. Wash. Press, 1987. P. 121–140.
- Torrioni A., Sukernik R.I., Schurr T.G. *et al.* MtDNA variation of aboriginal Siberians reveals distinct genetic affinities with Native Americans // Am. J. Hum. Genet. 1993. V. 53. P. 591–608.
- Withler F.G. Transplanting Pacific salmon // Can. Techn. Rep. Fish. Aquat. Sci. 1982. № 1079. 27 p.
- Wright S. Evolution and Genetics of Populations. Chicago: Univ. Chicago Press, 1969. V. 2. 511 p.

БЕЛКОВАЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ: КОНФОРМАЦИОННЫЕ МАТРИЦЫ И ЭПИГЕНЕТИКА

С.Г. Инге-Вечтомов, А.С. Борхсениус, С.П. Задорский

Кафедра генетики и селекции Санкт-Петербургского государственного университета
e-mail: inge@SI2444.spb.edu; inge@sgi.usr.pu.ru

Введение

Ряд нейродегенеративных заболеваний (губчатых энцефалопатий) человека и других млекопитающих связаны с белковой инфекцией. К числу таких болезней относятся: куру, семейная бессонница, болезнь Гершмана-Штресслера-Шайнкера, болезнь Кройцфельда-Якоба у людей, а также бычья губчатая энцефалопатия ("коровье бешенство"), скрэпи у овец, коз, оленей, мышей, хомяков и других животных (1).

Концепция прионов – инфекционных белков, переносящих эти заболевания, поначалу казалась достаточно безумной для того, чтобы в конце-концов за ее обоснование С. Прусинеру вручили в 1997 г. Нобелевскую премию (2). Такая концепция косвенно подразумевала некоторый механизм воспроизведения белков. Это противоречило Центральной догме молекулярной биологии (3), в основу которой положены матричные процессы: репликация, транскрипция, трансляция, ответственные за воспроизведение и реализацию генетической информации.

Конформационные матрицы

В действительности концепция прионов лишь дополнила Центральную догму (см. рис. 1) (4), поскольку вскоре выяснилось, что нет приона без структурного гена. В то же время на уровне белка действительно работает механизм воспроизведения, но не аминокислотной последовательности, а конформации. Единоразово попав в клетку (тем или иным способом), белок-прион перестраивает вновь синтезированные гомологичные полипептидные цепи своего клеточного предшественника "по своему образу и подобию". Таким образом, это тоже матричный процесс.

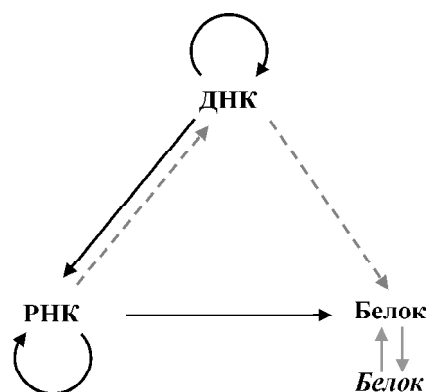


Рис. 1. Центральная догма молекулярной биологии Ф. Крика (По: (3) с дополнением (4)).

В отличие от Центральной догмы, в которой рассматриваются линейные матрицы последовательности, или матрицы первого рода, здесь мы имеем дело с матрицами пространственными, или конформационными, – матрицами второго рода.

Матрицы первого рода лежат в основе воспроизведения, а также реализации генетической информации. Матрицы второго рода преимущественно работают на уровне реализации генетической информации в традиционном понимании этого термина, точнее – после трансляции. Подробнее о матричном принципе в биологии изложено в работе (см. (5)). Тем не менее матричные процессы второго рода дают примеры механизмов наследования в митозе и мейозе, примеры изменчивости, напоминающей мутационный процесс. Эти события и механизмы следует классифицировать как эпигенетические.

Под эпигенетикой мы будем понимать различные механизмы наследственности и изменчивости, лишь косвенно связанные с кодированием наследственной информации в виде нуклеотидных последовательностей ДНК (РНК). Вслед за Р.Н. Чураевым их можно назвать неканоническими механизмами наследственности

ти и изменчивости (см. (6)). Разнообразие этих механизмов, видимо, велико: от модификации (метиляции) оснований в ДНК до пост-трансляционных перестроек белков. На последнем механизме мы остановимся более подробно, отталкиваясь от явления прионизации и последующего "размножения" прионов.

Прионы дрожжей как модельная эпигенетическая система

Механизмы, лежащие в основе прионизации белковой молекулы, по-видимому, широко распространены в природе. Феномен прионов – лишь крайнее их проявление, которое удобно исследовать. Это фенотип, без которого генетический анализ невозможен. Тем не менее даже этот, по-видимому, частный феномен характерен не только для млекопитающих, у которых он обнаружен впервые, но и для низших эукариот – грибов (табл.). Наиболее подробно он исследован у дрожжей (7, 8). В последнем случае прионы представляют собой цитоплазматические наследственные детерминанты, что создает определенные преимущества для их исследования. Другим удобным свойством дрожжевых прионов является возможность их элиминации из клетки при выращивании дрожжей на 5 мМ хлориде гуанидина (ГГХ) (9).

Таблица

Прионы грибов

Прион (прионоподобный детерминант)	Ген	Виды
[<i>PSI</i> ⁺]	<i>SUP35</i>	<i>S. cerevisiae</i>
[<i>URE3</i>]	<i>URE2</i>	<i>S. cerevisiae</i>
[<i>PIN</i> ⁺]	<i>RNQ1</i>	<i>S. cerevisiae</i>
[<i>Het-s</i>]	<i>Het-s</i>	<i>P. anserina</i>
[<i>ISP</i> ⁺]	?	<i>S. cerevisiae</i>
[<i>ASP</i> ⁺]	??	<i>S. cerevisiae</i>

Подобно прионам млекопитающих прионы грибов представляют собой конформационные варианты обычных клеточных белков. Последние могут спонтанно претерпевать конформационные перестройки (обогащение β-слоями), после чего они приобретают ряд но-

вых свойств, прежде всего способность к агрегации за счет взаимодействия β-слоев и образование так называемых амилоидов (своего рода процесс биологической кристаллизации с переходом в нерастворимую форму), становятся кислото- и протеазоустойчивыми (10, 11). При этом частично или полностью теряется собственная функциональная активность прионизирующихся белков. Клетка или организм становятся дефектными по функции белка-предшественника приона. Такие преобразования повторяют фенотип мутантов, которые могут возникать по соответствующим структурным генам. Делеция такого структурного гена или его части приводит к невозможности "воспроизведения" приона. Все это можно проиллюстрировать на примере наиболее разработанной модели прионизации: структурный ген *SUP35* / прион [*PSI*] у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Цитоплазматический наследственный фактор [*PSI*⁺], проявляющийся как omnipotentный нонсенс-супрессор (см. (8)) (а также супрессор некоторых сдвигов считывания (12)), является прионной изоформой белка-фактора терминации трансляции eRF3 – продукта гена *SUP35* (рис. 2). Известны структурные особенности eRF3, ответственные за процесс прионизации, по крайней мере, некоторые цис- и трансдействующие факторы, необходимые для этого процесса.

За прионизацию отвечают M- и N-домены этого белка (рис. 3), обогащенные аспарагином, глутамином и другими аминокислотами, способными образовывать β-слои, взаимодействующие в дальнейшем при формировании агрегатов (далее оба эти домена будут обозначены просто как объединенный N-домен). C-домены при этом не взаимодействуют и направлены в сторону от амилоидного тяжа, который представляет собой переплетенные нанотрубки (13). C-домен отвечает за функцию терминации трансляции (14). Его делеция летальна. Домены N и M можно удалять. Это не приводит к летальному эффекту, но препятствует прионизации (15). Генетические конструкции, объединяющие NM-домены с другими белками, делают их способными к прионизации. Отсюда и название "прионизирующий" пептид.

Прионизацию следует рассматривать как многостадийный процесс (рис. 4): включаю-

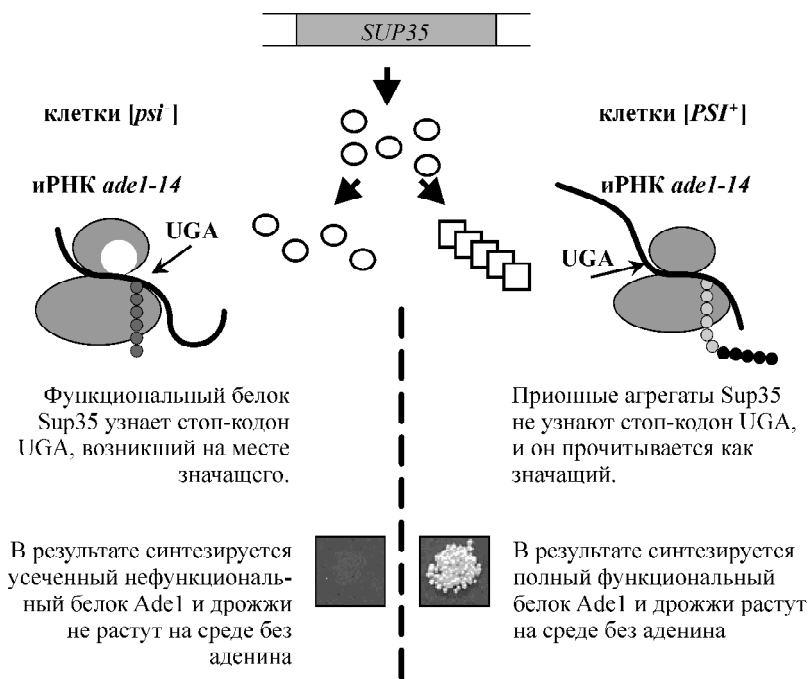


Рис. 2. Нонсенс-супрессия – фенотипическое проявление прионизации фактора терминации трансляции eRF3, кодируемого геном *SUP35* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

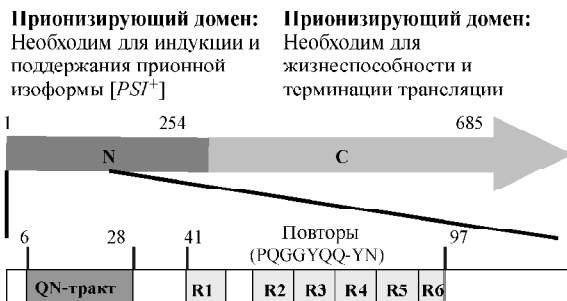


Рис. 3. Структура гена *SUP35* и белка eRF3 у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

ший стадию инициации, о которой мы имеем смутное представление, и стадии роста и размножения прионных агрегатов. Последний этап обусловлен отщеплением от крупных агрегатов олигомеров меньшего размера – так называемых семян. Последние попадают в дочерние клетки и служат затравкой для роста новых агрегатов. Так происходит размножение приона. В этом процессе ведущая роль принадлежит шаперонам, прежде всего Hsp104, "отгрызающему" семена, а также одному из белков Ssa – Hsp 70 (16). При желании можно

увидеть агрегаты дрожжевого приона [PSI], если слить прионизирующий пептид с зеленым флюоресцирующим белком GFP (рис. 5).

Проанализировав аминокислотную структуру известных прионизирующих пептидов, Дж. Вейсман и М. Мичелич составили список белков дрожжей, обогащенных повторами аспарагина и глутамина. Такие белки являются потенциальными прионами. У дрожжей в этот список попало 107 белков, что составляет около 2 % всех их белков, а у дрозофилы 472 белка, что составляет около 3,5 % всех ее белков (17). Для некоторых белков из "списка Вейсмана" уже

показано, что их прионизирующий пептид, присоединенный к eRF3 вместо собственного N-домена, обеспечивает его прионизацию. Число потенциальных прионов, видимо, не исчерпывается "списком Вейсмана". К прионизации могут быть способны и белки иного аминокислотного состава.

Прионные сети

Прионизация отдельного белка – это не изолированное событие, а, скорее всего, отражение существования некоторых прионных сетей, пронизывающих клетку. На это указывает зависимость появления одних прионов от наличия других.

Так, прион [PSI] не может появиться в клетке, если в ней нет другого приона – [PIN] – Prion inducibility (см. табл.). [PIN] – продукт структурного гена *RNQ1* (18, 19), функция которого пока не известна. Его идентифицировали при тотальном секвенировании генома дрожжей. Функции [PIN] в образовании [PSI] могут выполнять и некоторые другие прионы дрожжей (18). Таким образом, прионные сети,

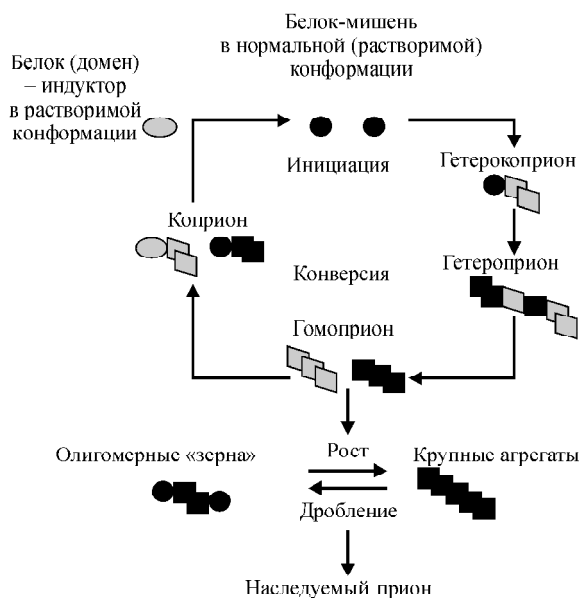


Рис. 4. Последовательные стадии прионизации клеточного белка-предшественника приона.

или каскад прионизации, – это отражение реальности системы протеома в клетке, когда изменения одного белка сказываются на структуре и функциях других белков. Следовательно, прионизация – это взаимодействие не только гомологичных, но и гетерологичных полипептидов. Точно так же можно показать, что существует не только взаимосвязь прионизация-прионизация, как в случае прионных сетей, но и мутация-прионизация. Так, на фоне некоторых мутаций *sup35* возникают (или селектируются) прионоподобные факторы ([ISP], [ASP]) – антисупрессоры. Это нехромосомные детерминанты, изгоняемые ГГХ и по ряду свойств очень похожие на прионы (20, 21). Правда, их структурные гены еще не идентифицированы.

Обсуждая проблему прионизации белков, следует помнить, что в настоящее время мы "ищем под фонарем, а не там, где потеряли". В нашем распоряжении есть супрессорный фенотип, сопровождающий превращение белка Sup35p в прион [PSI]. За этим превращением легко следить. В то же время известен ряд клеточных процессов и структур, связанных с перестройкой белков или их комплексов. Среди них динамика цитоскелета – сборка и разборка микротрубочек, сборка и разборка ядерной оболочки в каждом митозе высших эукариот (дрожжам в этом отношении меньше повезло, у них митоз и мейоз происходят по закрытому типу и ядерная оболочка никогда не исчезает). Последнее время цитологи все чаще обращаются к рассмотрению клеточного ядра как своеобразного ансамбля самособирающихся и разбирающихся микрокомпарментов, создающих своего рода хромосомные территории и эпигенетически регулирующих и репликацию, и транскрипцию (см., например, (22)). К числу таких процессов относится образование спайдерина – нитей паутины паукообразных (23). Это все процессы своеобразной биологической кристаллизации, очень напоминающие прионизацию.

То есть, говоря "прионизация", следует помнить, что это, по-видимому, лишь частное проявление механизмов более широкого биологического значения. К сожалению, чаще всего эти превращения не сопровождаются четкими фенотипическими изменениями, за которыми можно было бы следить в эксперименте.

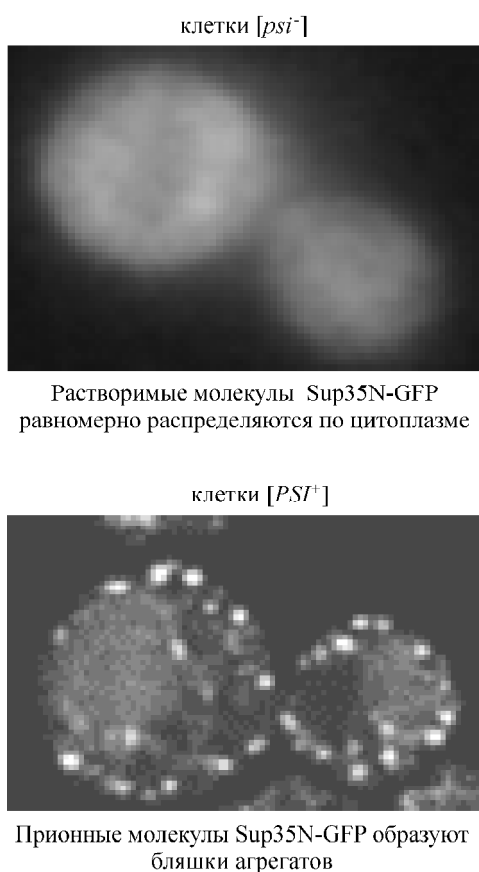


Рис. 5. Визуализация прионных агрегатов в клетках дрожжей.

К протеомному конструированию

Ситуация, правда, не безнадежна. На первых порах можно использовать прионы дрожжей как модельную эпигенетическую систему, в которой можно конструировать искусственные белковые структуры, отталкиваясь от того, что мы уже знаем о прионизации и ее механизмах. Поначалу следует опираться на тот же супрессорный фенотип и далее конструировать структуры с предсказуемыми фенотипами. Мы начали конструировать искусственные белковые структуры, используя сборку приона *[PSI]* как поточную линию, пытаясь предсказать результаты нашего вмешательства в этот процесс.

Напомним, что при образовании амилоидных фибрилл в ходе прионизации фактора eRF3 взаимодействуют только со своими N-доменами, в то время как C-домены в этом взаимодействии не участвуют (см. рис. 3). Мы решили заменить C-домен на белок, имеющий четвертичную структуру (Ade2p), то есть состоящий из идентичных субъединиц, и тем самым заставить взаимодействовать и C-домены. Сконструировали гибридную структуру *SUP35NM-ADE2*. Если ввести такую конструкцию на плазмиде в нормальную клетку с обычными *SUP35* и *ADE2* в геноме, то можно ожидать образования тройственного комплекса. Здесь будут взаимодействовать и N- и C-домены (рис. 6).

Должно ли это облегчить образование приона? Согласно нашим предсказаниям, должно и, судя по данным эксперимента, так и происходит. Это выражается в более эффективной прионизации фактора терминации даже при умеренной экспрессии гибридной конструкции – при введении ее в клетку на центромерной плазмиде. При этом наблюдается высокоэффективная нонсенс-супрессия, чего не бывает при введении *SUP35* на центромерной плазмиде. Правда, согласно рис. 6, следует ожидать образования не стандартного приона, а "урода". Этим, по-видимому, объясняется то, что наследование такого необычного гетероприона нарушается (24).

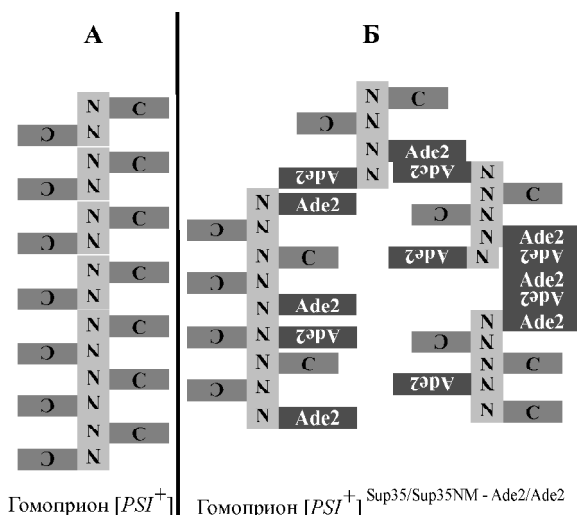


Рис. 6. Схематическое изображение взаимодействия доменов при образовании амилоидных фибрилл обычного дрожжевого гомоприона *[PSI]*-продукта гена *SUP35* (А) и тройного комплекса – гетероприона, содержащего белки *Sup35p*, *Sup35N-Ade2p* и *Ade2p*, в котором могут взаимодействовать как N-, так и C-домены белков.

Заключение

Почему это все может быть интересно в общебиологическом плане? Во-первых, потому что упомянутые матрицы первого и второго рода наверняка взаимодействуют между собой. Например, прионизация фактора терминации трансляции eRF3, кодируемого геном *SUP35*, – это модель такого (хотя и косвенного) взаимодействия. И последствия этого взаимодействия известны – нонсенс-супрессия и супрессия некоторых мутаций типа "сдвиг рамки считывания". То есть увеличивается частота ошибок трансляции или, правильнее, – уровень неоднозначности этого матричного процесса. А если прионизации подвергнется белок, участвующий в репликации или репарации, или белок хроматина? Так, например, в "списке Вейсмана" находим фактор SWI/SNF-белок, участвующий в преобразованиях хроматина. Его прионизирующий пептид заменяет прионизирующий пептид eRF3, т.е., похоже, этот фактор действительно способен прионизоваться (правда, последствия пока не известны). Поскольку взаимодействия матричных процессов первого и второго

рода – это реальность, а не фантазия, то следовательно, модификационная и наследственная изменчивость могут быть связаны неслучайно, однако не в ламаркистском понятии целесообразности, а в плане взаимообусловленной частоты событий. Во-вторых, это направление исследований в действительности относится к проблеме белок-белковых взаимодействий. Известно, что такие взаимодействия обеспечиваются некоторыми консервативными аминокислотными последовательностями. Но если они консервативны, то почему белок-белковые взаимодействия специфичны? Известно, что в нефизиологических условиях многие белки образуют амилоиды, например, тот же гемоглобин. Эволюция выработала механизмы, контролируемые, ограничивающие и канализирующие подобные события. Так, например, существует специальный шаперон для глобина (25). Кроме того, естественный отбор был направлен на канализацию в сторону специфического взаимодействия даже универсальных, предназначенных для белок-белковых взаимодействий аминокислотных последовательностей. Так, универсальный мотив SH3 для взаимодействия белков сигнальной трансдукции строго канализирован соседними аминокислотами для специфических взаимодействий в белках одного вида организмов. А если ввести ортологичный белок другого вида, эта специфичность утрачивается (26). Это путь к пониманию эволюции протеома, балансирующего на грани универсальности и специфичности. В-третьих, многие события, нарушающие баланс в протеоме, будь то мутации или прионизации в широком смысле этого слова или создание трансгенных организмов, требуют какого-то периода балансировки системы, ее стабилизации. Мы не случайно приводили примеры взаимодействий: прионизация–прионизация и мутация–прионизация. Если первичное событие – перестройка (модификационная) ядерной оболочки в каком-то ее компартменте, то следствием этого события может быть нарушение взаимодействия оболочки с хромосомами, что потребует компенсаторных генетических событий, например, хромосомных перестроек. Тем самым мы ло-

гически подходим к ситуации, о которой говорит В.Н. Стегний(27, 28), и можем по-новому взглянуть на роль модификаций в эволюционном процессе.

Авторы благодарят Юлию Викторовну Сопову за критические замечания при прочтении рукописи.

Работа выполнена при поддержке грантов CRDF/Минобразования РФ (ST-012; ST-012-02/Y1-B-12-06; ST-012-02/Y1-B-12-02) и гранта РФФИ (03-04-49335).

Литература

1. Prusiner S.B. Inherited prion diseases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 4611–4614.
2. Prusiner S.B. Prions // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 13363–13383.
3. Crick H.F.C. On protein synthesis // Symp. Soc. Exptl Biol. 1958. V. 12. P. 138–163.
4. Инге-Вечтомов С.Г. Прионы дрожжей и Центральная догма молекулярной биологии // Вестник РАН. 2000. Т. 70, № 3. С. 195–202.
5. Инге-Вечтомов С.Г. Матричный принцип в биологии // Экологическая генетика. 2003. Т. VI. С. 4–13.
6. Чураев Р.Н. Об одной неканонической теории наследственности // Современные концепции эволюционной генетики / Ред. В.К. Шумный, А.Л. Маркель. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2000. С. 22–32.
7. Wickner R.B., Masison D.C., Edskes H.K. [PSI] and [URE3] as yeast prions // Yeast. 1995. V. 11. P. 1671–1685.
8. Инге-Вечтомов С.Г., Миронова Л.Н., Аленин В.В., Борхсениус А.С. Прионы, синтез белка и клеточный цикл // Вестник СПб университета. Сер. 3. Биология. 1999. № 24. Вып. 4. С. 53–71.
9. Tuite M.F., Mundy C.R., Cox B.S. Agents that cause a high frequency of genetic change from [psi+] to [psi-] in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 1981. V. 98. P. 691–711.
10. King C.-Y., Tittman P., Gross H. *et al.* Prion-inducing domain 2-114 of yeast Sup35 protein transforms *in vitro* into amyloid-like filaments // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 6618–6622.
11. Paushkin S.V., Kushnirov V.V., Smirnov V.N., Ter-Avanesyan M.D. *In vitro* propagation of the prion-like state of yeast Sup35 protein // Science. 1997. V. 277. P. 381–383.
12. Куликов В.Н., Тиходеев О.Н., Форафонов Ф.С. и др. Супрессия мутации "сдвиг

- рамки считывания" в результате частичной инактивации факторов терминации трансляции у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. 2001. Т. 37, № 5. С. 602–609.
13. Perutz M.F., Finch J.T., Berriman J., Lesk A. Amyloid fibers are water-filled nanotubes // Proc. Natl Acad. Sci USA. 2002. V. 99. P. 5591–5595.
 14. Zhouravleva G., Frolova L., Le Goff X. *et al.* Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors eRF1 and eRF3 // EMBO J. 1995. V. 14. P. 4065–4072.
 15. Ter-Avanesyan M.D., Kushnirov V.V., Dagkesamanskaya A.R. *et al.* Deletion analysis of the SUP35 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two nonoverlapping functional regions in the encoded protein // Mol. Microbiol. 1993. V. 7. P. 683–692.
 16. Zhouravleva G.A., Alenin V.V., Inge-Vechtomo S.G., Chernoff Y.O. To stick or not to stick: prion domains from yeast to mammals // Recent Res. Devel. Mol. Cell. Biol. 2002. V. 3. P. 185–218.
 17. Michelitsch M.D., Weissman J.S. A census of glutamine/asparagines-rich regions: Implications for their conserved function and the prediction of novel prions // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 11910–11915.
 18. Derkatch I.L., Braadley M.E., Hong J.Y., Liebman S.W. Prions affect the appearance of other prions: the story of [PIN+] // Cell. 2001. V. 106. P. 171–182.
 19. Osherovich L.Z., Weissman J.S. Multiple Gln/Asn-rich prion domains confer susceptibility to induction of the yeast [PSI+] prion // Cell. 2001. V. 106. P. 183–194.
 20. Volkov K.V., Aksenova A.Yu., Soom M.J. *et al.* Non-Mendelian determinant involved in the control of translation accuracy in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 2002. V. 160, N 1. P. 25–36.
 21. Sopova J.V., Zadorsky S.P., Inge-Vechtomo S.G. Novel antisuppressor determinant [ASP⁺] of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // XXI Intern. Conf. on Yeast Genetics and Molecular Biology. Gotheburg, Sweeden. Abstracts. Yeast. V. 20, N S1. P. S291.
 22. Chromosome research. Organization inside the cell nucleus / Ed. H.J. Lipps, C. Cremer. 2003. V. 11. № 5. Special issue.
 23. Kenney J.M., Knight D., Wise M.J., Vollrath F. Amyloidogenic nature of spider silk // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. P. 4156–4163.
 24. Борхсениус А.С., Саснаускас К., Гедвилайте А., Инге-Вечтомо С.Г. Химерные прионы дрожжей с нестабильным наследованием // Генетика. 2002. Т. 38, № 3. С. 300–305.
 25. Luzatto L., Notaro R. Haemoglobin's chaperone // Nature. 2002. V. 417. P. 704–705.
 26. Zarrinpar All., Sang-Hyun Park, Lim W.A. Optimization of specificity in cellular protein interaction network by negative selection // Nature. 2003. V. 426. P. 676–680.
 27. Стегний В.Н. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция. Новосибирск: Изд-во Новосибирского ун-та. 1993. 110 с.
 28. Стегний В.Н. Сальтационное видообразование: средовые механизмы // Эволюционная биология. Томск, 2002. С. 109–117.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕНОМИКА ЦИАНОБАКТЕРИЙ

С.В. Шестаков

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
e-mail: shestakov@1.gen.bio.msu.ru

В задачи функциональной геномики входят идентификация функции генов и генетических элементов, регулирующих экспрессию генов, расшифровка механизмов координации работы генов в клетке. Основными методами функциональной геномики являются: 1) предсказание функции гена на основе изучения гомологии нуклеотидных и аминокислотных последовательностей по базам данных об идентифицированных генах других организмов; 2) ген-направленный мутагенез: введение в синтезированный и клонированный ген (или его фрагмент) инсерции/делеции или сайт-специфической мутации с последующим замещением гена дикого типа мутантным аллелем (метод так называемой "обратной генетики"); 3) изучение экспрессии гена с помощью ДНК-РНК гибридизации, репортерных систем (например, *lac*- или *luxAB* генов), антисмысловых РНК-конструкций, иммунохимического анализа, методов определения белок-белковых взаимодействий; 4) анализ промоторных, энхансерных и других регуляторных элементов, определяющих особенности транскрипции анализируемых генов, их взаимодействие с другими генами; 5) исследование координированной регуляции экспрессии генов в полногеномном масштабе с применением *microarray*-технологии (микрочипов с адресным расположением генных зондов). Эта технология позволяет установить, какие гены в целом геноме экспрессируются, включаются или выключаются в различных условиях (в частности, при стрессовых воздействиях) при мутационном блокировании функции других генов. С помощью этого метода можно выявить участие новых генов в том или ином биологическом процессе, т.е. идентифицировать ген, о клеточной функции которого не было сведений.

На основе использования методов функциональной геномики в последние годы достигнут существенный прогресс в понимании структурно-функциональной организации ге-

номов многих организмов, в том числе цианобактерий, которые являются модельными объектами изучения окислительного фотосинтеза и азотфиксации, биогенеза мембран и клеточной дифференцировки, сигнальных систем и механизмов адаптации, различных процессов, присущих фотосинтезирующим клеткам.

В таблице 1 приведены сведения о сиквенированных к 2004 г. геномах цианобактерий. На кафедре генетики МГУ были разработаны системы генетической трансформации у *Synechococcus* 7942 (Shestakov, Nguen Than Khyen, 1970) и *Synechocystis* 6803 (Grigorieva, Shestakov, 1982), которые сейчас широко используются во многих лабораториях мира. В 1966 г. японские авторы (Kaneko *et al.*, 1996) определили полную нуклеотидную последовательность генома *Synechocystis* 6803 – это был первый сиквенированный геном фотосинтезирующего организма.

Исследования в области молекулярной генетики *Synechocystis* 6803 внесли решающий вклад в расшифровку систем окислительного фотосинтеза (Shestakov, 2002). Дефектные по фотосинтезу мутанты этой фотогетеротрофной цианобактерии способны расти в темноте на среде с глюкозой. К ней применимы все основные методы бактериальной генетики и геномики, что позволяет изучать функции любых генов. В геноме *Synechocystis* 6803 85 % приходится на последовательности, кодирующие белки; 30 % из них гомологичны генам с известными функциями, 15 % имеют сходство с функционально идентифицированными генами и 10 % с гипотетическими генами других организмов, для 45 % генов нет аннотированных гомологов в геномах других объектов (Kotani, Tabata, 1998). Таким образом, главной задачей геномики этой цианобактерии является определение клеточных функций каждого гена с учетом того, что многие из них входят в большие семейства (например, около 50 генов кодируют разные пептидазы, более 100 – белки регуляторы транскрипции и т. д.)

Таблица 1

Геномы цианобактерий

Цианобактерия, вид, штамм	Биологические особенности	ГЦ % состав	Размер генома, Мб	Число ORF ¹
<i>Synechococcus</i> sp. PCC ² 6301 ³	одноклеточная, облигатно фотоавтотрофная	55,1	2,69	2842
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	короткие филаменты, фотогетеротрофная	49,1	3,12	2910
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	одноклеточная, фотогетеротрофная	47,7	3,57	3168
<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	отсутствуют тилакоиды	62,1	4,65	4430
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	азотфиксирующая, филаментозная	42,5	6,42	5368
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP1	одноклеточная, термофильная		2,59	2475
<i>Prochlorococcus marinus</i> S120	морская пикоцианобактерия	36	1,75	1884

Примечание. 1 – ORF – открытые рамки считывания; 2 – PCC – номер в коллекции Пастеровского института, Париж; 3 – штамм, эквивалентный PCC 7942 (*Anacystis nidulans* R2).

В 1998–2003 гг. опубликовано более 700 работ, посвященных изучению функции генов *Synechocystis* 6803 с помощью методологии "обратной генетики" (рис.). Следует отметить, что при замещении в результате рекомбинации "нормального" гена в штамме дикого типа геном, инактивированным инсерцией (нокаут-мутация), далеко не во всех случаях можно получить полностью сегрегированный мутант с видимым фенотипическим проявлением.

Клетки *Synechocystis* 6803 содержат 8–12 идентичных хромосомных копий; если полной сегрегации мутации (т.е. замещения во всех копиях) достичь не удастся, то это означает, что ген отвечает за жизненно необходимую функцию, без которой клетки не выживают. Для изучения таких генов можно использовать генно-инженерные конструкции, обеспечивающие регулируемую экспрессию дополнительной копии анализируемого гена или регуляцию экспрессии с помощью антисмысловой РНК. Если же получен полностью сегрегированный мутант (что проверяется Саузерн-гибридизацией или ПЦР-методом) без видимых фенотипических изменений, то это может означать, что: 1) открытая рамка считывания (ORF) не экспрессируется ни при каких условиях (псевдоген, "реликтовая" последовательность и т. п.); 2) ген экспрессируется только при определенных условиях, например, при адаптивном ответе на стрессовые воздействия; 3) функция инактивированного гена компенсируется другим геном (например, кросс-взаимодействие протеинкиназ и регуляторных белков в двух-компонентных системах сигнальной трансдукции); 4) блокирование функции гена не проявляется на уровне видимых морфо-физиологических характеристик; 5) возможно сохранение фенотипа в результате супрессорной мутации, локализованной в ином гене. Таким

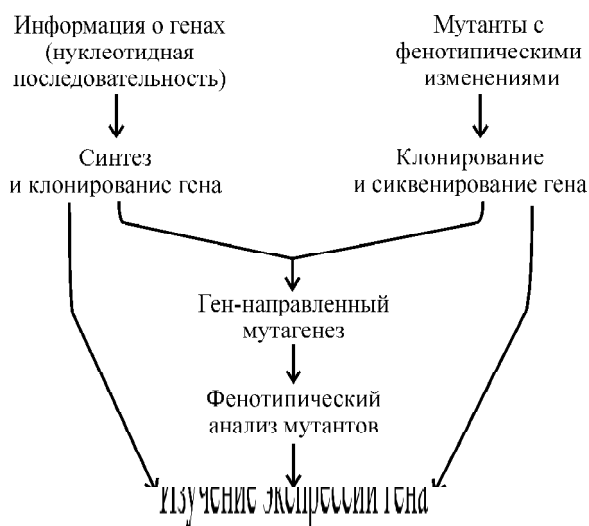


Рис. Функциональная геномика.

Левая часть схемы – методология «обратной генетики».

Таблица 2

Функциональный анализ некоторых генов *Synechocystis* 6803

Семейства генов, кодирующих	Количество генов, клеточные функции		Гены, функции которых исследуются в МГУ		
	идентифицированы	не установлены	инсерционный мутагенез	сегрегированные мутанты	определен фенотип
пептидазы	8	36	27	17	6
серин/треониновые протеинкиназы	2	14	12	11	2
response-белки 2-компонентных систем регуляции	6	33	24	22	2
Ycf- белки, гомологи белков хлоропластов	6	26	3	2	2

образом, для идентификации функции инактивируемого гена в большинстве случаев требуется детальный молекулярно-генетический и физиолого-биохимический анализ.

В таблице 2 представлена информация о некоторых направлениях исследований в МГУ по функциональной геномике *Synechocystis* 6803. Для 10 из 27 инактивированных генов, кодирующих пептидазы различного типа (Sokolenko *et al.*, 2002), не удалось получить полностью сегрегированных мутантов, что указывает на жизненно важные функции этих генов, к числу которых относятся 3 гена *clpP* семейства, а также гены *clpC*, *clpX*, *clpB1*, *htrA*, *ctpC*, *lepB2*, *ftsH1*. Изучение "гомозиготных" мутантов с фенотипическими изменениями позволило впервые установить конкретные физиологические функции ряда пептидаз. Мутанты по генам *ctpA*, *clpP2*, *lepB1* не способны к фотоавтотрофному росту. Ген *ctpA* кодирует С-терминальную пептидазу, осуществляющую процессинг белка D1 фотосистемы II (Shestakov *et al.*, 1994), пептидаза ClpP2 участвует в защите клеток от фотоинактивации (Паничкин и др., 2001), лидерная пептидаза LepB1 необходима для транслокации белков в тилакоидной мем-бране, белок ClpB2 с функцией шаперона вовлечен в регуляцию терморезистентности, пептидазы HhoA и HhoB являются белками теплового шока (Sokolenko *et al.*, 2002), пептидаза SppA1 отвечает за протеолиз линкерных белков фикобилисом, обес-

печивая адаптивную редукцию фотосинтетической антенны при высокой интенсивности света.

Инсерционная инактивация большинства генов серин/треониновых протеинкиназ эукариотического типа не привела к видимым фенотипическим изменениям (Галкин и др., 2003). Нокаут-мутация гена *spkA* блокирует подвижность клеток, у мутанта по гену *pknE* повышается резистентность к метиламину. Изучение экспрессии протеинкиназных генов с помощью мiсroаgау-анализа в различных стрессовых условиях может дать важную информацию о клеточных функциях этих генов. На основе такого подхода изучаются функции белков двухкомпонентных систем регуляции. В лаборатории Н. Мураты (Япония) осуществлен интерпозиновый мутагенез всех 40 *hik*-генов, кодирующих гистидиновые протеинкиназы, а в лабораториях В. Зинченко (МГУ) и Д. Лося (Институт физиологии растений РАН) получены инсерционные мутанты практически по всем *rre*-генам, кодирующим response-белки регуляторы двухкомпонентных систем. Наличие мутантов дает возможность идентифицировать взаимодействующие пары сенсорной гистидинкиназы и белка-регулятора и выяснить физиологические функции двухкомпонентных систем регуляции в адаптивных ответах клеток. Таким способом была расшифрована роль системы сигнальной трансдукции с участием гистидиновых протеинкиназ Hik33 и Hik19 в адаптации к холодному воздействию. Инактивация гена *hik33* влияет на регуляцию транскрипции более 60 ге-

нов (Suzuki *et al.*, 2001). При этом выявлено более 30 генов, контролируемых протеинкиназой Hik33, о клеточных функциях которых вообще не было информации.

Выявлены двухкомпонентные системы, ответственные за адаптивные ответы клеток *Synechocystis* 6803 при действии факторов осмотического солевого, светового, теплового или окислительного стресса. Наглядным примером исследования двухкомпонентных систем с использованием мутантов и микроаггау-анализа является работа по расшифровке механизма регуляции транспорта ионов марганца (Yamaguchi *et al.*, 2002). При высокой концентрации ионы марганца токсичны, при дефиците Mn^{2+} в клетках не собирается комплекс фотосистемы II. Поэтому внутриклеточная концентрация Mn^{2+} поддерживается на оптимальном уровне за счет регуляции экспрессии генов *mntABC*-оперона, кодирующих белки транспортной системы. По данным микроаггау-анализа в клетках штамма дикого типа при нехватке ионов марганца усиливается транскрипция *mnt*-генов, при избытке Mn^{2+} работа этих генов репрессируется. Регуляция экспрессии *mntABC*-генов осуществляется двухкомпонентной системой, включающей сенсорную гистидинпротеинкиназу MntS и регуляторный белок MntR. В клетках инсерционных мутантов по этим генам регуляция транскрипции *mntABC* оперона нарушается. При достаточной концентрации ионов марганца происходит их связывание с белком MntS, который активируется и переводит белок MntR в форму активного репрессора, блокирующего экспрессию *mntABC*-оперона. При дефиците ионов марганца происходит дерепрессия этого оперона, так как MntS находится в неактивной форме и не может инициировать образование репрессора.

В таблицу 2 включены также три гена, имеющие высокую степень гомологии с генами хлоропластной ДНК высших растений. Ранее был разработан метод функционального анализа таких *ycf*-генов растений на основе инсерционного мутагенеза гомологичных генов *Synechocystis* 6803 (Wilde *et al.*, 1995). При использовании этого подхода нам в сотрудничестве с Х. Пакраси (США) удалось установить, что белок Ycf4 участвует в защите фото-

системы I от фотоинактивации, а белок Ycf3 необходим для сборки и стабилизации реакционного центра этой фотосистемы. Анализ "нокаут-мутанта" по гену *psbJ* позволил доказать участие продукта этого гена в регуляции потока электронов в комплексе фотосистемы II (Regel *et al.*, 2001). На основе изучения мутантов с инактивированными *gap*-генами (кодирующими глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу) было установлено, что ген *gap1* отвечает за гликолитическое расщепление глюкозы, а фермент Gap2, подобный белку хлоропластов, участвует в фотосинтетическом цикле (Koksharova *et al.*, 1998). Эта работа демонстрирует высокую эффективность метода "обратной генетики" в изучении физиологических функций дивергентных генов, относящихся к одному семейству.

Детально исследован открытый на кафедре генетики МГУ новый ген, *prqR*, кодирующий белок регулятор транскрипции генов антиоксидантных ферментов и антипортерных систем, участвующих в защите клеток от действия параквата (Бабыкин и др., 2003). Идентифицированы домены белка PrqR, ответственные за репрессорные функции, и расшифрован механизм авторегуляции этого гена, играющего важную роль в адаптивном ответе клеток цианобактерий при окислительном стрессе. В геноме *Synechocystis* 6803 обнаружено много генов, предположительно кодирующих белки регуляторы транскрипции. Нами совместно с другими лабораториями ведется работа по инактивации каждого из этих генов для последующего анализа генных сетей с помощью микроаггау-технологии.

Особое внимание, естественно, уделяется полногеномному изучению глобальной координации работы генов при изменениях светового режима (в зависимости от спектра и интенсивности освещения). Исследование дифференциальной экспрессии генов показало, что в процессе световой адаптации в клетках цианобактерии происходят глубокие перестройки метаболизма, связанные с регуляцией активности большого числа генов (Hihara *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002). В фоторецепции участвуют различные фитохромы и светособирающие комплексы, которые передают сигналы через каскады регуляторных систем

Таблица 3

Регуляция экспрессии генов *Synechocystis* 6803 при адаптации клеток к свету высокой интенсивности (по данным microarray-анализа (Hihara *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002)

Гены	Количество генов (экспрессия)			
	активация		подавление	
	15 ¹	120 ²	15 ¹	120 ²
с известной функцией,	> 30	> 30	> 40	> 20
включая ³	rbc, ccm ndh, sodB, glp clpB, hsp	rpl, rps hem, chl aps, psb	psb, psa hem, chl apc, cpc	ndh clpB, hsp
с неизвестной функцией	18	8	28	12

Примечание. 1 – в первые 15 мин; 2 – после 60–180 мин инкубации; 3 – гены, контролируемые: rbc, ccm – CO₂ метаболизм; ndh – дыхание; sodB, glp – антиоксидантные ферменты; hsp, clpB – шапероны; rpl, rps – белки рибосом; psa, psb – белки фотосистем I и II; hem, chl – ферменты биосинтеза хлорофилла; apc, cpc – ферменты биосинтеза фикобилинов.

до уровня транскрипции генов, контролирующего циркадный ритм, фототаксис, синтез белков аппарата фотосинтеза, антиоксидантных ферментов и других светозащитных и репарационных систем (Mullineaux, 2001). В таблице 3 суммированы обобщенные сведения о динамике изменений в профилях экспрессии генов при адаптации клеток *Synechocystis* 6803 к высокой интенсивности света (200–300 мЕ/м²сек⁻¹). По результатам microarray-анализа можно выделить две основные фазы адаптационных сдвигов. В первой кратковременной фазе (15 мин) наблюдается репрессия генов, ответственных за синтез компонентов фотосистем II и I (гены *psb* и *psa*); происходит редукция светособирающих антенн, что приводит к снижению поглощения энергии и, соответственно, образования токсичных радикалов, повреждающих клеточные структуры. Одновременно индуцируется синтез большой группы белков, ответственных за углеродный метаболизм и дыхание, увеличивается экспрессия генов, кодирующих антиоксидантные ферменты, синтез каротиноидов, белков теплового шока, некоторых шаперонов и других защитных систем. В начале второй фазы (> 60 мин) уровень синтеза ряда защитных белков (ClpB, Hsp) снижается, но повышается экспрессия генов рибосомного аппарата (гены *rps*, *rpl* и ряд других). Затем постепенно начинается активизация генов фотосинтеза, увеличивается соотношение комплексов фотосисте-

мы II/фотосистемы I. Среди генов, индуцируемых в первой фазе адаптации, выявлено более 20 генов, клеточные функции которых еще не известны. Не идентифицированы функции 30 других генов, экспрессия которых подавляется в условиях высокой освещенности. Таким образом, предстоит решить два важных вопроса: 1) какую физиологическую роль играют эти неидентифицированные гены в жизнедеятельности цианобактерий; 2) как осуществляется согласованная регуляция экспрессии генов в интегральной геномной сети при световой адаптации. Ответы на эти вопросы позволят понять сущность механизмов глобальной координации клеточных процессов, специфичных для фотосинтезирующих организмов. Высокие темпы исследований в области функциональной геномики *Synechocystis* 6803 позволяют надеяться, что клеточные функции практически всех генов этой цианобактерии будут установлены в ближайшие годы.

Прогресс в разработке проблем геномики цианобактерий открывает новые возможности и для обсуждения актуальных вопросов эволюционной биологии. В субгеномах хлоропластов растений выявлено около 80 генов, обладающих высокой степенью гомологии с генами *Synechocystis* 6803, что является еще одним убедительным свидетельством в пользу эндосимбиотического происхождения хлоропластов. Однако многие гены цианобактерии имеют большую гомологию

и с ядерными генами растений. Анализ 386 филогенетических деревьев показал, что почти 9 % ядерных генов *Arabidopsis thaliana* могут иметь цианобактериальное происхождение (Rujan, Martin, 2001). Идентификация клеточных функций генов цианобактерий позволит внести вклад в геномику растений, понимание закономерностей ядерно-цитоплазматических взаимодействий. Изучение этих проблем может пролить свет на сущность процессов редуccionной эволюции субгеномов органелл и природу генетических механизмов перемещения генов из хлоропластов в ядро на ранних этапах биологической эволюции.

Литература

- Бабыкин М.М., Сидорук К.В., Зинченко В.В. и др. Об участии регуляторного гена *prqR* в развитии устойчивости к метилвиологену у цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Генетика. 2003. Т. 39. С. 25–32.
- Галкин А.Н., Михеева Л.Е., Шестаков С.В. Инсерционная инактивация генов, кодирующих серин/треониновые протеинкиназы эукариотического типа у цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 64–69.
- Паничкин В.Б., Глазер В.М., Зинченко В.В. и др. Ген *clp2*, кодирующий пептидазу у цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, контролирует чувствительность клеток к фотингибированию // Изв. АН. Сер. биол. 2001. № 3. С. 312–317.
- Grigorieva G.A., Shestakov S.V. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803 // FEMS Microbiol. Lett. 1982. V. 13. P. 367–370.
- Hihara Y., Kamei A., Kanehisa M. *et al.* DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light // Plant Cell. 2001. V. 13. P. 393–806.
- Huang L., McCluskey M.P., Ni H., LaRossa R.A. Global gene expression profiles to the cyanobacterium *Synechocystis* strain sp. PCC 6803 in response to irradiation with UV-B and white light // J. Bacteriol. 2002. V. 184. P. 6845–6858.
- Kaneko T., Sato S., Kotani H. *et al.* Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 // DNA Res. 1996. V. 3. P. 109–136.
- Koksharova O.A., Shubert M., Shestakov S.V., Cerff R. Genetic and biochemical evidence for distinct key functions of two highly divergent GAPDH genes in catabolic and anabolic carbon flow of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Plant Molec. Biol. 1998. V. 36. P. 183–184.
- Kotani T., Tabata S. Lessons from sequencing of the genome of a unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 1998. V. 49. P. 151–171.
- Mullineaux C.W. How do cyanobacteria sense and respond to light? // Mol. Microbiol. 2001. V. 41 (5). P. 965–971.
- Regel R.E., Ivleva N.B., Zer H. *et al.* Dereglуlation of electron flow within photosystem II in the absence of the PsbJ protein // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 41473–41478.
- Rujan T., Martin W. How many genes in *Arabidopsis* come from cyanobacteria? An estimate from 386 protein phylogeny // Trends Genet. 2001. V. 17, N 3. P. 113–120.
- Shestakov S.V. Gene-targeted and site-directed mutagenesis of photosynthesis genes in cyanobacteria // Photosynth. Res. 2002. V. 73. P. 279–284.
- Shestakov S.V., Anbudurai P.R., Stanbekova G.E. *et al.* Molecular cloning and characterization of the *ctpA* gene encoding a carboxyl-terminal processing protease // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 19354–19359.
- Shestakov S.V., Nguen Than Khyen. Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans* // Mol. Gen. Genetics. 1970. V. 107. P. 372–375.
- Sokolenko A., Pojidaeva E., Zinchenko V. *et al.* The gene complement for proteolysis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis thaliana* chloroplasts // Current Genet. 2002. V. 41. P. 291–310.
- Suzuki I., Kanesaki Y., Mikami K. *et al.* Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis* // Mol. Microbiol. 2001. V. 40 (1). P. 235–244.
- Wilde A., Hartel H., Hubschmann T. *et al.* Inactivation of a *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 gene with homology to conserved chloroplast open reading frame 184 increases the photosystem II to photosystem I ratio // Plant Cell. 1995. V. 7. P. 649–658.
- Yamaguchi K., Suzuki I., Yamamoto H. *et al.* A two-component Mn²⁺-sensing system negatively regulates expression of the *mmtCAB* operon in *Synechocystis* // Plant Cell. 2002. V. 14. P. 2901–2913.

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КАК ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРОБЛЕМА

Л.И. Корочкин

Институт биологии гена РАН, Институт биологии развития РАН им. Н.К. Кольцова
119334, Москва, Вавилова 34/5, e-mail: lkorochkin@mail.ru

Понятие о стволовых клетках

Стволовые клетки – это клетки, сохраняющие потенциал к развитию в разных направлениях. Из стволовой клетки могут возникнуть и кожная, и нервная клетки, и клетки крови (1–3). Считалось, что во взрослом организме стволовые клетки отсутствуют, их существование ограничивается самым ранним периодом эмбрионального развития. Однако в 1970-е гг. А.Я. Фриденштейн с соавторами обнаружили эти клетки в мезенхиме (строме) "взрослого" костного мозга (4). По принадлежности к строме их в дальнейшем стали называть стромальными стволовыми клетками. В 1970-е гг. были опубликованы работы, демонстрировавшие наличие стволовых клеток практически во всех органах взрослых животных и человека (5). В связи с этим принято разделять стволовые клетки на *эмбриональные стволовые клетки – ЭСК* (их выделяют из эмбрионов на стадии бластоцисты) и *региональные стволовые клетки – РСК* (их выделяют из органов взрослых особей или эмбрионов более поздних стадий). Будучи плюрипотентными, стволовые клетки составляют существенный восстановительный резерв в организме и способствуют замещению дефектов, возникающих в силу тех или иных обстоятельств в разных органах, включая и нервную систему (6, 7).

Особое удивление биологов вызвало наличие стволовых клеток в центральной нервной системе. Нейральные стволовые клетки относятся к региональным стволовым клеткам. Они отвечают на различные поражения нервной ткани размножением (сами нервные клетки, как известно, утрачивают способность к размножению уже на стадии нейробласта) и дифференцировкой в нервные и глиальные клетки (8, 9). Делящиеся клетки в центральной нервной системе отмечали и раньше, однако такие клетки ошибочно принимали за

нервные, и соответствующие работы вызывали законное сомнение, поскольку утрата нейронами способности к делению была твердо установлена. Изолированные нейральные РСК способны превращаться и в другие производные (8), хотя многочисленные данные, свидетельствующие об этом, рекомендуется тщательно перепроверять.

Особенности региональных нейральных стволовых клеток

Открытие стволовых клеток в нервной системе стало важным событием в современной неврологии (8). Оно вызвало переоценку целого ряда устоявшихся представлений, в особенности касающихся восстановительных процессов в центральной нервной системе. Стволовая клетка в нервной системе характеризуется теми же основными свойствами, что и стволовая клетка вообще, а именно – сохранением способности к делению (которая утрачивается уже на стадии нейробласта) и плюрипотентностью, т.е. возможностью дифференцироваться в различных направлениях, возможно, не только в нейральном. Известны молекулярные маркеры, позволяющие идентифицировать как стволовые нервные клетки, так и последовательные фазы их развития (8), – это нестин для стволовой клетки, виментин для клетки-предшественника, бета-тубулин для нейробласта, GFAP (кислый глиальный фибриллярный белок) для клетки, "движущейся" в направлении глиального развития и т. д.

Следует отметить еще одну особенность популяции, содержащей стволовые клетки, – ее гетерогенность. Например, типичное распределение специфических иммуногистохимических маркеров в популяции фетальных стволовых нервных клеток человека таково: нестин – 43,1 %, виментин – 63,2 %, бета-тубулин – 70,1 %, GFAP – 3,2 %, NCAM – 12,0 %, CD34 (маркер гематогенных стволо-

вых клеток) – 1,3 %, CD45 (антиген лейкоцитов) – 0,5 %. Эта гетерогенность в какой-то степени определяет специфику реакции стволовых клеток на различного рода внешние воздействия: в частности изменение процентного соотношения клеток с разными потенциалами, отражается на характере их дифференцировки при попадании в различную среду. Естественно, что больший процент нестин-содержащих клеток будет способствовать более эффективному воздействию микроокружения на дальнейшую судьбу дифференцирующихся клеток. Интересным примером такой специфической реакции является дифференцировка ксенотрансплантатов стволовых нервных клеток эмбрионов дрозофилы (10–12).

Установлено, что нервные стволовые клетки характеризуются выраженным консерватизмом, так что человеческие стволовые клетки способны мигрировать и развиваться в случае их трансплантации в мозг крысы (10, 11). Более того, в экспериментах было показано, что даже нервные стволовые клетки дрозофилы способны дифференцироваться в случае их ксенотрансплантации в мозг такого отдаленного таксона, как крыса (10–12). Для этой цели были получены трансгенные линии дрозофилы, содержащие человеческие гены, кодирующие нейротрофические факторы NGF, GDNF, BDNF. Человеческие гены были встроены в вектор CaSpeg под дрозофилиным хит-шоковым промотором, так что температура тела млекопитающих служила автоматическим активатором соответствующих генов. Для идентификации клеток дрозофилы в геном трансгенных линий был введен ген бактериальной галактозидазы *lacZ*, продукт которого легко выявляется с помощью гистохимической X-гал окраски. Тем самым нервные клетки ксенотрансплантата легко обнаруживаются среди клеток реципиента или котрансплантата.

Оказалось, что нервные стволовые клетки дрозофилы не только выживают, но и мигрируют и дифференцируются в мозге крысы (11). Они специфически реагируют на нейротрофические факторы, синтезируемые генами человека. Так, при ксенотрансплантации клеток трансгенной линии дрозофилы, содержащей ген *gdnf*, в дифференцирующихся стволовых нервных клетках дрозофилы отмечал-

ся выраженный синтез тирозингидроксилазы, а клетки с геном *ngf* активно продуцировали ацетилхолинэстеразу. Сходные синтезы ксенотрансплантат индуцировал в пересаживаемом в комбинации с ним аллотрансплантате эмбриональной нервной ткани (10–12). Следовательно, важную роль в специфичности дифференцировки стволовых нервных клеток играют нейротрофические факторы, которые, возможно, в числе прочего дают сигнал, определяющий направление развития стволовых клеток. При этом ксенотрансплантат, продуцирующий нейротрофические факторы, оказывает специфический эффект на судьбу аллотрансплантатов, которые развивались в этом случае значительно более интенсивно и в 2–3 раза превосходили по размерам аллотрансплантаты, введенные в мозг без добавления ксенотрансплантатов. Следовательно, клетки ксенотрансплантата, содержащие гены нейротрофинов, в частности ген, кодирующий человеческий глия-производный нейротрофический фактор, оказывают на развитие аллотрансплантата эффект, подобный соответствующему нейротрофину. Например, показано, что GDNF специфически повышает выживаемость дофаминэргических нейронов эмбрионального среднего мозга крыс, а также усиливает метаболизм дофамина этими клетками (13). GDNF также значительно повышает уровень дифференцировки тирозингидроксилаза-положительных клеток, усиливая рост аксонов и увеличивая размер тела клеток. Сходные эффекты наблюдаются и в культуре дофаминэргических нейронов среднего мозга крысы (13).

Таким образом, клетки ксенотрансплантата дрозофилы, будучи источниками синтеза GDNF, обеспечивают соответствующий эффект и влияние на аллотрансплантат, имея еще и то преимущество, что этот эффект – постоянно действующий.

При ксенотрансплантации эмбриональных стволовых нервных клеток человека в мозг взрослых крыс наблюдалась их активная миграция, что могло бы способствовать замещению дефектов в нервной системе при тех или иных заболеваниях, в частности нейродегенеративных. Немаловажно при этом учитывать генетическую конституцию трансплантируемого материала, поскольку известно, что

процесс миграции стволовых нервных клеток контролируется набором специальных генов (11, 14). В частности, сигнал клетке-предшественнице начинать "движение в сторону дифференцировки" дает белковый продукт протоонкогена *c-ret* совместно с GDNF. Следующий сигнал поступает от гена *Mash-1*, который является гомологом комплексу *achaete-scute* дрозофилы, управляющему выбором пути развития клетки. Специфическая реакция дифференцирующихся клеток зависит также от альфа-рецептора цилиарного нейротрофического фактора (14).

Во многих случаях развития нервной системы клетки, вступившие на путь нейрального развития, мигрируют в различные области центральной и периферической нервной системы и, становясь "оседлыми", претерпевают последовательные фазы дифференцировки вплоть до терминальной.

По-видимому, среди мигрирующих нейробластов могут крайне редко оказаться и клетки на более ранней стадии становления (предшественники?), сохраняющие способность к митотическому делению. Мне, по крайней мере, при просмотре десятков и сотен тысяч дифференцирующихся нейробластов в автономной нервной системе ранних эмбрионов человека удалось обнаружить 3 митотически делящихся нейробласта (15–17): 2 в ауэрбаховском сплетении кишечника 9-недельного эмбриона человека и 1 – в развивающемся симпатическом нервном стволе. По-видимому, это были стволовые клетки, случайно "заблудившиеся" в потоке мигрантов.

Открытие нервных стволовых клеток не отменило, однако, как думают некоторые, основные положения существующей в нейробиологии парадигмы. Действительно, о том, что нервная система в определенной степени (хотя и ограниченной) обнаруживает способность к регенеративным процессам, было известно и раньше, результаты исследования стволовых клеток не опровергают постулат о неспособности зрелых нервных клеток к делению. Кроме того, нервная система отнюдь не "нафарширована" стволовыми клетками, имеется очень ограниченное количество центров, которые их содержат.

Иными словами, новые данные о стволовых

нервных клетках просто существенно расширяют общепринятые представления о репарации в центральной и периферической нервной системе, ничего не отменяя и не заменяя.

Кроме того, нельзя забывать и еще два других, по-видимому, генетически детерминированных пути восстановительных процессов в нервной системе (18). Первый заключается в гиперпродукции нервных отростков, в какой-то степени компенсирующей гибель нейронов в ходе дегенеративных процессов, вызванных различными обстоятельствами, в частности, старением или теми или иными патологическими событиями. Выраженное разрастание новых отростков порою приобретает весьма причудливый характер, приводя к формированию так называемых окончатых клеток и прочих компенсаторно-реактивных образований.

Обнаружение *второго* способа восстановительных процессов в нервной системе (также генетически обусловленного) связано с интересным наблюдением С.И. Матвеевой на лягушках (19). Она обнаружила, что в нервных сплетениях пищеварительного тракта этих животных зимой погибает часть нервных клеток. Однако весной восстанавливается нормальная картина организации интрамурального нервного аппарата. Спрашивается, откуда же берутся дифференцированные нервные клетки? Оказывается, у взрослых лягушек сохраняется значительный резерв нейробластов, из которых и рекрутируются новые дифференцированные нейроны. Отсюда было сделано заключение, что в автономной нервной системе лягушки содержится достаточно мощный нейробластический резерв, представленный незрелыми нервными клетками, которые последовательно дифференцируются, так сказать, по мере надобности, обеспечивая в случае необходимости восстановление нарушенных нервных связей. В последующем в моей лаборатории в Томском медицинском институте были подтверждены эти данные, а Н.Е. Лисова обнаружила соответствующий нейробластический резерв и в интрамуральной нервной системе пищеварительной трубки рыб (20).

Значительный вклад в эту проблему был внесен школой Н.Г. Колосова (21). А.И. Буб-

нова (22) выявила нейронный полиморфизм в пищеварительном тракте птиц и нашла значительное количество малодифференцированных нервных клеток в интрамуральных ганглиях по всей длине пищеварительной трубки. Особенно богато такими нейробластическими элементами ауэрбаховское сплетение зоба, где можно обнаружить целые ганглии, состоящие из нейробластов. Еще интереснее находка З.Н. Хорос (23), изучавшей нервный аппарат червеобразного отростка человека. Оказалось, что межмышечное (ауэрбаховское) сплетение в этом случае образует дополнительную структуру, как бы еще одно сплетение внутри мышечных слоев. Ганглии этого дополнительно сплетения состоят в основном из незрелых нервных клеток, дифференцирующихся по мере взросления организма и необходимости восстановления нарушенных нервных связей в ходе патологических процессов, которыми аппендикс, увы, весьма богат. М.Ф. Кирик (24) описал наряду с гибелью зрелых нервных клеток явления раздражения недифференцированных нервных клеток, так называемый кюгельфеномен и т. д.

В лаборатории Н.Г. Колосова (опыты Н.Г. Захаровой) было показано, что клетки нейробластического ряда являются более резистентными к различного рода патологическим воздействиям по сравнению с дифференцированными нейронами (21).

В 1960–1970-е гг. мы с сотрудниками (16, 17, 25, 26) так же детально изучали поведение нейробластов интрамуральной нервной системы пищеварительной трубки человека в условиях различной патологии (язвенная болезнь и рак желудка, различные формы аппендицита); проведен также анализ реакции нейробластов толстого кишечника кошек при экспериментальной дизентерии (25, 26). Во всех исследованных случаях были найдены дегенеративные изменения и гибель дифференцированных нервных клеток в очаге поражения и на удалении от него. В то же время подтвердились данные лаборатории Н.Г. Колосова о резистентности нейробластов к различного рода патологическим воздействиям (21). Более того, наблюдались отчетливые признаки дифференцировки нейробластов, обеспечивавшие компенсаторные процессы и, возможно,

способствовавшие процессам репарации в очаге поражения и восстановлению разрушенных болезнью нервных ансамблей. Дифференцировка нейробластов внутриорганных ганглиев легкого при его аутотрансплантации была описана в моей лаборатории (27, 28). *Результаты дифференцировки своеобразного камбиального резерва, хотя и лишенного способности к размножению, в ряде случаев сопоставимы с таковыми при репаративных процессах, вызванных пролиферацией и последующей дифференцировкой стволовых клеток* (12, 17).

Полагаю, что как развитие, так и репарация в нервной ткани включают все перечисленные механизмы в качестве составляющих компонентов с преобладанием то одного, то другого *в зависимости от генотипа организма и конкретных внешних обстоятельств*. Весьма привлекательны исследования возможностей и путей экспериментальной стимуляции каждого из них в отдельности и всех вместе для повышения компенсаторного потенциала различных отделов нервной системы, включая головной мозг.

Стволовые клетки как удобная модель для анализа роли генов в процессе дифференцировки

Способность стволовых клеток (как РСК, так и ЭСК) трансформироваться в разных направлениях делает их весьма удобной модельной системой для изучения молекулярно-генетических событий, обуславливающих дифференцировку клеток в разных направлениях. Действительно, стволовые клетки можно изолировать в чистом виде и затем анализировать функции генных сетей на последовательных этапах их дифференциального развития (29).

Оказалось, в частности, что время последовательного включения генов, контролирующих развитие, совпадает в постимплантационных зародышах и в культуре эмбрионидных тел (30, 31). Следовательно, стволовые клетки могут служить удобной экспериментальной моделью для уточнения молекулярно-генетических процессов, сопровождающих клеточную специализацию.

Анализ культур стволовых клеток с помощью молекулярно-генетического мисо-агау-метода продемонстрировал, что в одном клоне мезенхимных стволовых клеток синтезируется по крайней мере 1200 матричных РНК (32). В разных стволовых клетках присутствует сходный набор предсинтезированных матричных РНК-копий многих генов (33). При этом удалось выяснить, что как и в случае дифференцировки в составе целостного эмбриона (34), в мезенхимных стволовых клетках взрослой гематогенной ткани содержится практически весь набор матричных РНК, которые функционируют в зародышевых листках и на стадии органогенеза. Идентифицированы также матричные РНК ключевых генов, регулирующих созревание клеток мезенхимального и мезодермального происхождения, а также энто- и эктодермы. Большинство матричных РНК – Нох-генов присутствует уже в яйцеклетке и презумптивных зародышевых клетках (31).

Следовательно, в стволовых клетках проявляется общий принцип онтогенеза – функция генов с "опережением", т.е. синтез тех матричных РНК, которые будут нужны (будут "работать") на стадиях развития, порою значительно более поздних.

Анализ поведения стволовых клеток в культуре тканей позволил выявить ключевые гены и генные сети, участвующие в спецификации этих клеток, в их развитии в том или ином направлении. Так, ключевым элементом созревания дофаминэргических нейронов была экспрессия гена тирозингидроксилазы (ТГ). В культуре максимальное количество ТГ⁺ клеток удалось получить с помощью 3 индукторов: FGF1, регулятора внутриклеточного уровня цАМФ (форсколина) и активатора протеинкиназы С. Эта триада вызывала проявление 10–20 % ТГ⁺ нейробластов. Двухнедельная инкубация в специальной среде для дифференцировки клеток повышала долю ТГ⁺ клеток до 75 %. Полученные результаты демонстрируют возможность получения из стволовых клеток в лабораторных условиях достаточного количества нервных клеток "нужной" специфичности (подробнее (31)). Исследования такого рода перспективны как для ре-

шения фундаментальных задач нейрогенетики, так и для разработки методов использования нейральных стволовых клеток в клеточной и генной терапии.

Стволовые клетки и проблемы генной и клеточной терапии

Плюри- и мультипотентность стволовых клеток делают их идеальным материалом для использования в трансплантационных методах клеточной и генной терапии (2, 5, 35). При этом следует учитывать то, что наряду со стволовыми клетками, которые при повреждении тканей соответствующего органа мигрируют к зоне повреждения, делятся и дифференцируются, образуя в этом месте новую ткань, существует и как бы "центральный склад запчастей" – *стромальные клетки костного мозга*. Эти клетки универсальны, они, по-видимому (полученные многочисленные данные такого рода все же требуют дополнительной проверки), способны поступать с кровотоком в поврежденный орган или ткань и на месте под влиянием различных сигнальных веществ давать начало нужным специализированным клеткам, в том числе и нервным, которые замещают погибшие.

Большое значение придают стволовым клеткам (и в частности стромальным) при лечении различных нейродегенеративных и неврологических заболеваний: паркинсонизма, болезни Альцгеймера (старческое слабоумие), хореи Гентингтона, мозжечковых атаксий, рассеянного склероза и др. Группа неврологов из Американского национального института неврологических заболеваний и Стэнфордского университета обнаружили, что стромальные клетки костного мозга могут дифференцироваться в нейральном направлении и, следовательно, костный мозг человека может быть использован в качестве источника стволовых клеток для восстановления поврежденных тканей в головном мозгу. *Следовательно, пациент может стать собственным донором, что предотвратит реакцию иммунологической несовместимости тканей.*

Группа ученых под руководством Евы

Мизей показала, что стволовые клетки, куда бы они ни имплантировались, могут достигать поврежденного места, в частности мозга, и обеспечивать там восстановительные процессы. Так, после внутривенного введения взрослым мышам стромальных стволовых клеток различные нейральные производные были обнаружены ими во многих областях мозга, включая неокортекс, гиппокамп, таламус, ствол мозга и мозжечок (31).

Важной является также проблема сохранения жизнеспособности стволовых клеток при их трансплантации. Она может быть повышена путем введения в геном трансплантируемых нейронов генов ростовых нейротрофических факторов, что является защитой от апоптоза. Такого рода попытки предпринимаются в различных лабораториях США и Европы.

Российскими учеными выделены региональные нейральные стволовые клетки, дана их подробная иммуногистохимическая характеристика, в том числе на проточном флюориметре, что было сделано в таких масштабах впервые. В опытах с трансплантацией стволовых нейральных клеток человека в мозг крыс была показана их приживляемость, миграция на достаточно большие расстояния (несколько миллиметров) и способность к дифференцировке. Последняя в значительной степени определяется микроокружением, в которое попадает трансплантат. Так, при трансплантации нейральных стволовых клеток человека в ту область мозжечка крысы, где расположены так называемые клетки Пуркинье, они дифференцируются в направлении именно этого типа клеток, о чем свидетельствует синтез в них белка калбиндина, специфического продукта клеток Пуркинье (35). Очевидно, "местные" индукторы действуют направляющим образом на специфические генные ансамбли, включая регуляторные гены, от которых зависит функционирование этих ансамблей.

Важным достижением российских ученых является также доказательство того, что белки теплового шока блокируют образование глиального рубца при нейротрансплантации, в связи с чем представляется возможным трансформировать подлежащие транс-

плантации клетки, введя в них ген, кодирующий белок теплового шока под промотором, реагирующим на температуру тела млекопитающих. *Таким промотором может быть промотор дрозофилы, контролирующей работу этого гена.* Сотрудниками Института биологии гена и Института биологии развития обнаружено, что поставленные под этот промотор гены, кодирующие нейротрофические факторы человека, активно функционируют в эмбрионах трансгенных дрозофил и в ксенотрансплантатах эмбриональных стволовых нейральных клеток дрозофилы в мозгу крысы. В связи с этим решается задача создания генно-инженерной системы и соответствующих конструкций, основанных на использовании регуляторных элементов генома дрозофилы, способных обеспечить активацию трансгенов в условиях температуры тела млекопитающих (3, 36, 37).

На основе этих исследований станет возможным создание генно-инженерных конструкций для трансформации нейральных стволовых клеток, подлежащих трансплантации. *Такого рода трансформации будут способствовать лучшему приживлению трансплантата, повышению его жизнеспособности и спецификации составляющих его клеток* (9, 34). Необходимо сравнить и внимательно проанализировать результаты трансплантации стволовых клеток в виде цельных или диссоциированных на клетки нейросфер и разработать соответствующий протокол для клинического использования.

Работа поддержана грантами РФФИ, ПНГ, Ведущими школами, Минпромнауки по физико-химической биологии.

Литература

1. Lovell-Badge R. The future for stem cell research // Nature. 2001. V. 414. P. 88–91.
2. Сухих Г.Т., Малайцев В.В. Нейральная стволовая клетка: биология и перспективы нейротрансплантации // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2001. Т. 131, № 2. С. 244–255.
3. Корочкин Л.И. Стволовые клетки // Онтогенез. 2003. Т.34, № 3. С. 164–166.
4. Friedenstain A., Owen M. Stromal stem cells: marrow derived osteogenic progenitors // CIBA Found. Symp. 1988. V. 136. P. 42–60.

5. Викторов И.В. Стволовые клетки мозга млекопитающих: биология стволовых клеток *in vitro* и *in vivo* // Изв. АН. Сер. биол. 2001. № 6. С. 645-655.
6. Лосева Е.В. Нейротрансплантация фетальных тканей и компенсаторно-восстановительные процессы в центральной нервной системе реципиентов // Усп. физиол. наук. 2001. Т. 12, № 1. С. 19-37.
7. Hofstetter C., Schwarz E., Hess D. *et al.* Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99, N 4. P. 2199-2204.
8. Gage F., Ray J., Fisher J. Isolation, characterization and use of stem cells from the CNS // Ann. Rev. Neurosci. 1995. V. 18. P. 159-192.
9. Корочкин Л.И. Стволовые клетки – один из путей регенерации нервной ткани // Изв. АН. Сер. биол. 2001. № 6. С. 666-671.
10. Александрова М.А., Павлова Г.В., Ревещин А.В. и др. Влияние чужеродного гена *GDNF* на развитие трансплантатов и ксенотрансплантатов в мозге крыс // Генетика. 2000. Т. 36, № 11. С. 1553-1560.
11. Корочкин Л.И. Некоторые аспекты генетического контроля развития автономной нервной системы // Онтогенез. 2000а. Т. 31, № 2. С. 94-101.
12. Корочкин Л.И. Новые подходы в генетике развития и генотерапии: ксенотрансплантация эмбриональных стволовых нервных клеток в мозг позвоночных животных // Генетика. 2000б. Т. 36, № 11. С. 1436-1442.
13. Lin L., Doherty D., Lin J. *et al.* GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons // Science. 1993. V. 260, N 6. P. 1130-1132.
14. Gershon M. Genes and lineages in the formation of the enteric nervous system // Curr. Opin. Neurobiol. 1997. V. 7. P. 101-109.
15. Корочкин Л.И. К вопросу о делении нервных клеток // Матер. теорет. и клинич. медицины. Томск: ТГУ, 1963. Вып. 2. С. 14-16.
16. Корочкин Л.И. Цитохимическое исследование симпатических нейронов в онтогенезе у человека // Цитология. 1965а. Т. VII, № 1. С. 47-55.
17. Корочкин Л.И. Дифференцировка и старение вегетативного нейрона. М.; Л.: Наука, 1965б. 180 с.
18. Корочкин Л.И., Михайлов А.Т. Введение в нейрогенетику. М.: Наука, 2000. 312 с.
19. Матвеева С.И. Об элементах эмбрионального характера в автономной нервной системе лягушки // Арх. анатом. гистол. и эмбриол. 1935. Т. 14, № 1. С. 135-146.
20. Корочкин Л.И. К цитохимии и цитофизиологии вегетативных нейронов // Арх. анатом. гистол. и эмбриол. 1966. Т. L, № 5. С. 101-111.
21. Колосов Н.Г. Иннервация внутренних органов и сердечно-сосудистой системы. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1954. 265 с.
22. Бубнова А.И. К вопросу об иннервации пищевода у птиц // Сб. трудов, посвященный памяти А.В. Леонтовича. Киев: КГУ, 1948. С. 148-165.
23. Хорос З.Н. 1948. Цит. По Н.Г. Колосову. 1954.
24. Кирик М.Ф. Нормальная и патологическая гистология нервных элементов червеобразного отростка // Морфология автономной нервной системы. М.: Медгиз, 1946. С. 224-244.
25. Фрумкис Э.М. К морфологии и цитохимии интрамуральных ганглиев червеобразного отростка при аппендицитах и при экспериментальной дизентерии толстой кишки: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Томск: ТГУ, 1968. 21 с.
26. Фрумкис Э.М., Сошникова М.Я., Корочкина Л.С. Некоторые данные о реактивных свойствах вегетативных нейронов в возрастном аспекте // Матер. теорет. и клинич. медицины. Томск: ТГУ, 1965. Вып. 5. С. 12-15.
27. Диденко В.И. Состояние внутриорганной нервной системы аутотрансплантированного легкого: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ростов-на-Дону, 1966. 22 с.
28. Диденко В.И. Функциональная морфология легкого после его ортотопической аутотрансплантации. Экспериментально-клиническое исследование. М.: Академкнига, 1997. 150 с.
29. Davidson E., Rast J., Oliveri *et al.* A genomic regulatory network foqe development // Science. 2001. T. 295, N 8. P. 1669-1679.
30. Leahy A., Xiong J., Kuhnert F. *et al.* Use of developmental marker genes to define temporale and spatial patterns of differentiation during embryonic body formation // J. Exptl Zool. 1999. V. 284, N 1. P. 67-81.
31. Репин В.С., Ржанинова А.А., Шаменков Д.А. Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина. М.: РеМетекс, 2002. 160 с.
32. Tremain N., Korkko J., Iberson D. *et al.* MicroSAGE analysis of 2353 expressed genes in a single cell derived colony of human mesenchymal stem cells reveals mRNA of multiple cell lineaged // Stem Cells. 2001. V. 19, N 3. P. 408-418.

33. Kelli D., Rizzino A. DNA microarray analysis of genes regulated during the differentiation of embryonic stem cells // *Mol. Reprod. Develop.* 2000. V. 56, N 1. P. 113–123.
34. Корочкин Л.И. Биология индивидуального развития. М.: Наука, 2002. 263 с.
35. Александрова М.А., Павлова Г.В., Ревещин А.В. и др. Эффект чужеродного гена GDNF на развитие гомо- и ксенотрансплантатов в мозгу крысы // *Генетика.* 2000. Т. 36, № 11. С. 1553–1560.
36. Щегельская Е.А., Микулинский Ю.Е., Ревещин А.В. и др. Индуцированная дифференцировка клеток стромы костного мозга мыши в нервные клетки // *Цитология.* 2002. Т. 44, № 7. С. 637–641.
37. Pavlova G., Enblom A., Revishchin A. *et al.* The influence of donor age, nerve growth factor and cografting with *Drosophila* cells on survival of peripherally grafted embryonic or fetal rat dorsal root ganglia // *Cell Transplantation.* 2003. V. 12. P. 705–715.

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

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

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

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

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

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

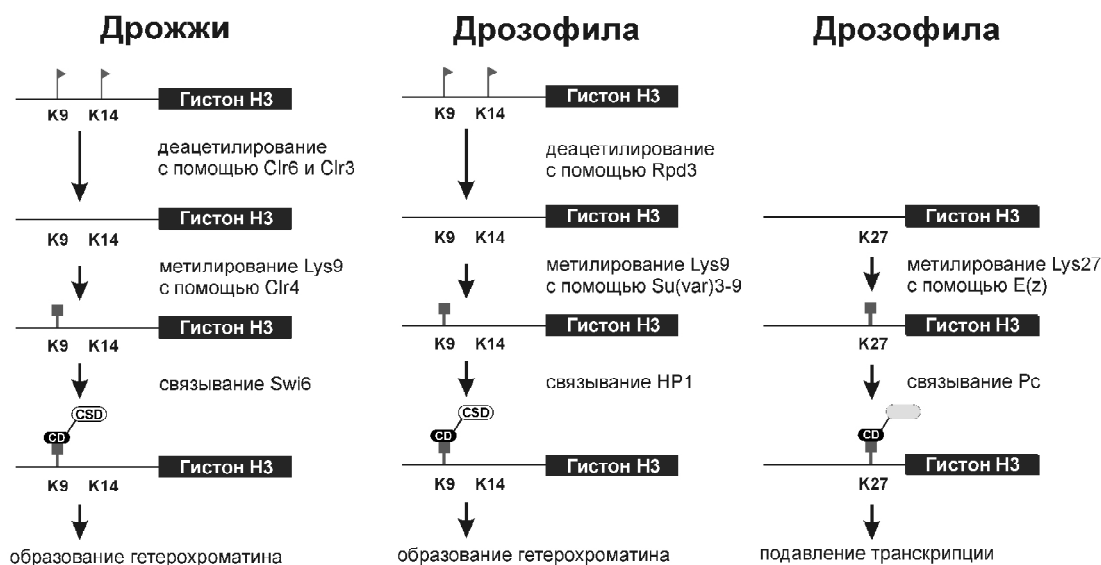


Рис. 1. Схема формирования сайленсинга в инактивированных районах с участием белков HP1 и Pc. Изображены молекулы гистона H3, в N-концевых участках которых аминокислоты лизин (K) в положениях 9 и 14 на первом этапе деацетируются с помощью деацетилаз. У дрожжей в этих процессах участвуют продукты генов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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

репликации связана с механизмами генетического сайленсинга?

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

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

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

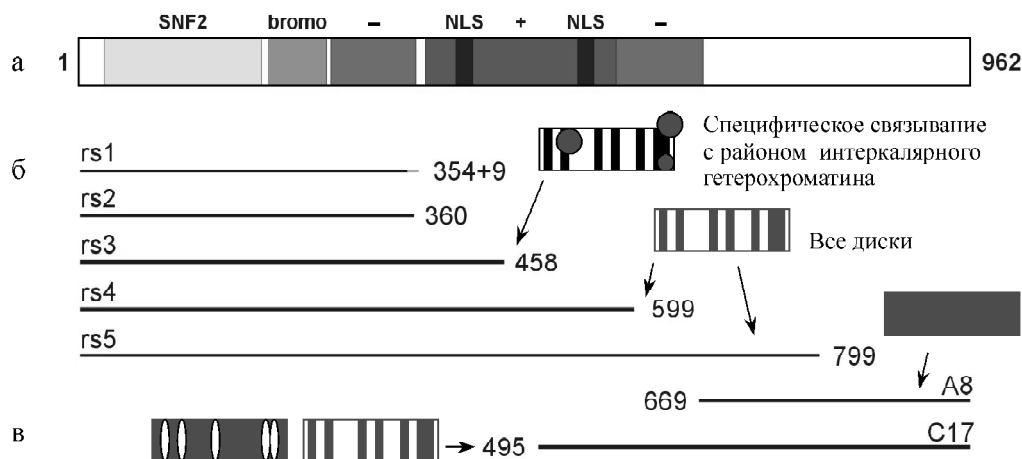


Рис. 3. Функциональная организация молекулы белка SuUR.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Литература

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

МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭВОЛЮЦИИ: РЕГУЛЯТОРНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ И КОДИРОВАНИЕ СЛОЖНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Н.А. Колчанов, В.В. Суслов, К.В. Гунбин

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск
e-mail: kol@bionet.nsc.ru

Введение

Рост сложности организмов всегда считался глобальной тенденцией эволюции жизни на Земле и признаком эволюционного прогресса (1). Данные палеонтологии указывают на рост сложности организмов и биосферы с момента появления жизни на Земле. Этот рост идет неравномерно, замедляясь и ускоряясь, но его не остановили ни массовые вымирания, ни глобальные катастрофы (2, 3). В общем виде эволюцию жизни на Земле можно описать следующим образом: жизнь появляется ~ 3,5 млрд лет назад в форме прогенот – простейших одноклеточных бактериеподобных структур (4, 5). Первый всплеск биоразнообразия, вероятно, произошел около 3,1 млрд лет назад (6). Но уже около 2 млрд лет назад существовали все три мегацарства жизни: безъядерные эубактерии и архебактерии, а также эукариоты, клетки которых имеют ядро (7). В ходе дальнейшей эволюции архебактерии и эубактерии, оставаясь на прокариотическом уровне, совершенствовались свой метаболизм, не приобретая качественно новых свойств биологической организации. Напротив, эукариоты, не отличаясь разнообразием базового метаболизма, эволюционировали в высокоорганизованные формы жизни. Их глобальный вектор эволюции состоял в возникновении огромного многообразия форм жизни, при этом происходило качественное увеличение сложности биологической организации – от одноклеточных до многоклеточных, насчитывающих в своих организмах десятки триллионов клеток (8).

Так как фенотипические признаки организмов кодируются их геномами, ожидалось, что в разных таксонах геномы значительно различаются по числу генов. Расшифровка

геномов выявила, что: а) сложность прокариот в целом коррелирует с размерами геномов и числом генов; б) наблюдается рост размера геномов и числа генов при переходе от прокариот к эукариотам и от одноклеточных к многоклеточным; в) у эукариот отсутствует связь между биологической сложностью, размерами геномов и числом генов (табл.). Последний результат был совершенно неожиданным. Например, *Drosophila melanogaster* содержит всего 13600 генов, а более простой круглый червь *Caenorhabditis elegans* – 19000 генов. Удивительно, что человек и рыба фугу имеют примерно равное количество генов ~ 30000–40000 (9, 10). Где же заключен потенциал усложнения генетической программы, реализуемой геномом?

Комбинаторное кодирование сложности

Комбинаторика на уровне генов. В отличие от генов прокариот, регуляторные районы генов эукариот очень велики (рис. 1). Так, регуляторный район гена тирозин-аминотрансферазы имеет размер 10000 пар нуклеотидов и содержит более 40 сайтов (11, 12).

Представим, что регуляторный район гена содержит N сайтов связывания регуляторных белков. Каждый сайт может быть свободным или связанным с регуляторным белком. Поэтому количество состояний регуляторного района равно 2^N . При $N = 20$ – около миллиона состояний! Для чего необходима такая емкость регуляторного кода? Очевидно, для того, чтобы в многоклеточном организме один и тот же ген в зависимости от стадии клеточного цикла, типа клетки, ткани, органа, стадии развития организма мог иметь различные паттерны экспрессии (13). Такой комбинаторный принцип

Таблица

Сравнительная характеристика геномов про- и эукариот (По: (9, 10) с изменениями)

Таксон	Вид	Гаплоидный геном млн п.н.	Число генов в геноме
Прокариоты			
Микоплазмы	<i>Mycoplasma genitalium</i>	0,58	470
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0,82	~670
Риккетсии	<i>Rickettsia prowazekii</i>	1,1	834
Археобактерии	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	2,18	2436
	<i>Methanopyrus kandleri</i>	1,69	1738
Цианобактерии	<i>Synechocystis sp.</i>	3,57	3168
Эубактерии	<i>Escherichia coli</i>	4,6–5,5	4288
	<i>Campylobacter jejuni</i>	1,64	1654
	<i>Aquifex aeolicus</i>	1,55	1512
	<i>Neisseria meningitidis</i>	2,27	2121
	<i>Bacillus subtilis</i>	4,2	4100
Низшие эукариоты			
Грибы	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11,4	6241
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	13,8	4824
	<i>Aspergillus nidulans</i>	31	
Протисты	<i>Amoeba dubia</i>	670000	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	20	
	<i>Dictyostelium discoideum*</i>	32	11000
Высшие эукариоты			
Высшие растения	<i>Lilium longiflorum</i>	90000	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	115,7	27540
	<i>Oryza sativa</i>	466	46022–55615
Первичноротые	<i>Caenorhabditis elegans</i>	97	19049
	<i>Drosophila melanogaster</i>	120	13600
Вторичноротые	<i>Protopterus aethiopicus</i>	139000	
	<i>Fugu rubriceps</i>	365–400	30000–40000
	<i>Homo sapiens</i>	3000	30000
	<i>Mus musculus</i>	2500	37000

* Протист, имеющий многоклеточную стадию жизненного цикла – плодовое тело (14).

кодирования генетической информации у эукариот – эволюционное приобретение широкого профиля, он позволяет фактически безгранично наращивать сложность генетических программ без существенного увеличения размеров геномов.

Другим примером комбинаторного кодирования является альтернативный сплайсинг пре-мРНК у эукариот. Комбинаторика экзонов и интронов обеспечивает огромную емкость кодирования генетической информации. Блестящий пример – ген *DSCAM* дрозофилы, белок которого участвует в формировании нервной системы. На основе альтернативного сплайсинга один этот ген кодирует десятки тысяч вариантов белка (15) (рис. 2).

Комбинаторика на уровне генных сетей.

Любой фенотипический признак – результат работы определенной генной сети – группы координированно функционирующих генов. Генные сети можно разбить на 4 класса: сети гомеостаза, циклических процессов, стрессового ответа и морфогенеза. В сетях гомеостаза преобладают отрицательные обратные связи, в циклических сетях имеется баланс между положительными и отрицательными обратными связями, в остальных сетях важную роль играют положительные обратные связи, уводящие систему от исходного состояния. В любой генной сети есть центральный регулятор – транскрипционный фактор, одновременно активирующий множество генов – генную

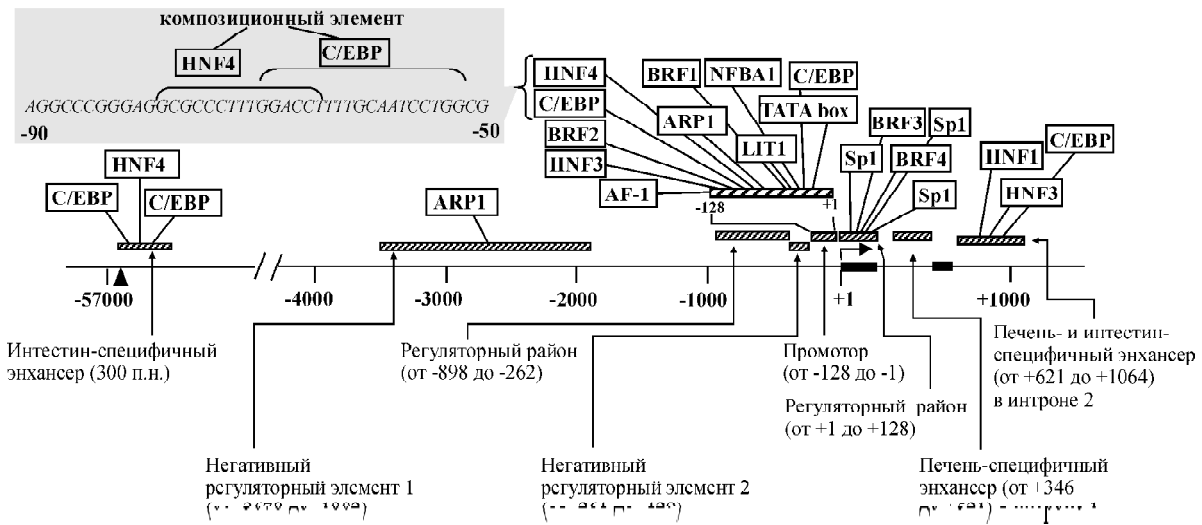


Рис. 1. Регуляторные районы, контролирующие транскрипцию эукариот, имеют большую длину и содержат большое количество регуляторных элементов: фрагмент иерархически организованного регуляторного района гена аполипопротеина В человека (12).

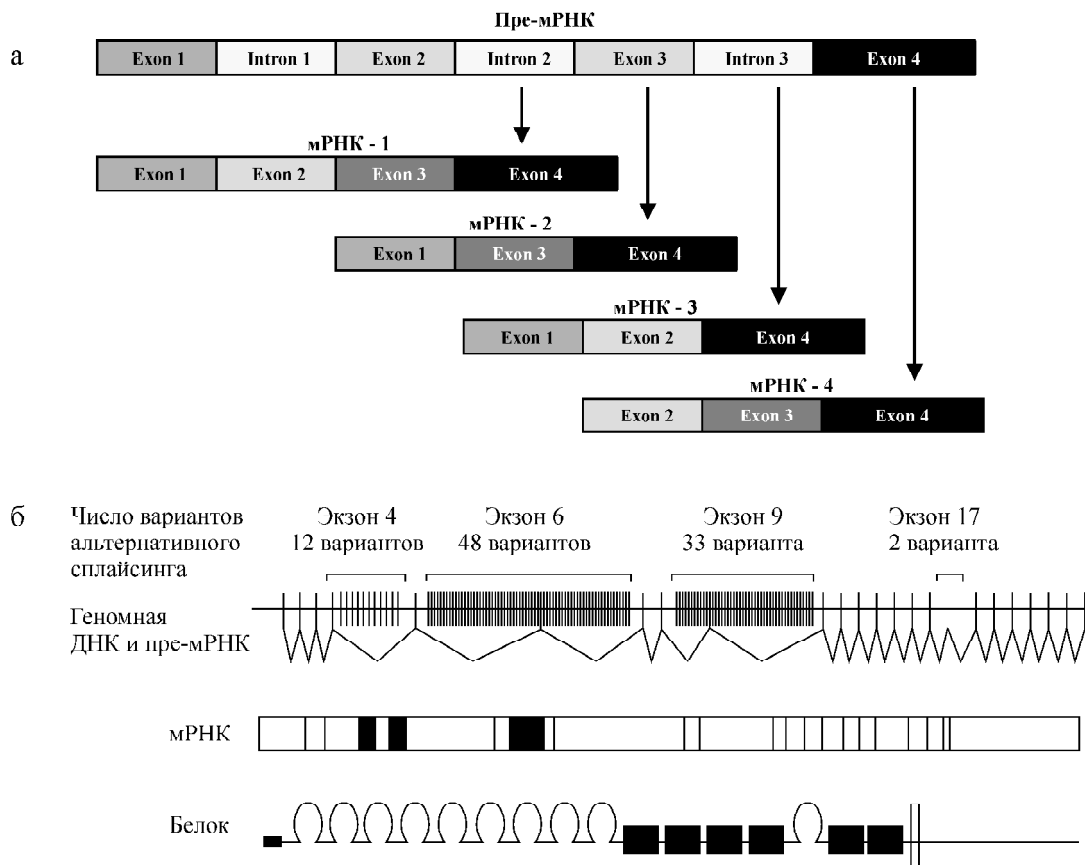


Рис. 2. Альтернативный сплайсинг эукариот: а – принцип альтернативного сплайсинга; б – комбинаторика альтернативного сплайсинга гена *DSCAM* (По: (15) упрощенно).

кассету. Мутации центральных регуляторов могут менять функции больших групп генов, приводя к выраженным фенотипическим изменениям (16–18). Можно представить два типа мутаций центрального регулятора, существенно меняющих работу генных сетей: мутации в регуляторных районах гена центрального регулятора и мутации, меняющие структуру белков-транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию центрального регулятора путем нарушения тонкой стереохимии соответствия атомных группировок белка и функционального сайта ДНК. Пример быстрой эволюции вследствие мутаций первого типа – селекция кукурузы из дикого предка – теосинта, происходившая 7 тыс. лет назад в Центральной Америке и связанная с положительным отбором и фиксацией в промоторе гена *tb1* (*teosinte-branched1*) уникального комплекса мутаций, обусловивших возникновение характерных особенностей строения початка кукурузы (19) (рис. 3а). Эволюционное значение мутаций второго типа иллюстрирует тот факт, что у *Arabidopsis thaliana* гены, управляющие транскрипцией, наименее консервативны по сравнению с генами, обеспечивающими другие функции организма (20) (рис. 3б).

Эволюционные механизмы перестройки генных сетей

Мутации центральных регуляторов.

Быстрая кардинальная перестройка морфологии может быть результатом сравнительно небольших мутационных изменений, повлиявших на экспрессию центральных регуляторов, что, в свою очередь, могло вызвать перестройку функционирования генных сетей. Экспериментальным подтверждением такого сценария могут служить перестройки морфогенеза *A. thaliana* вследствие трансгенеза *MADS*-генов – центральных регуляторов генной сети развития цветка (21). Генная сеть развития цветка – своеобразный молекулярно-генетический автомат. Он состоит из нескольких частично перекрывающихся подсетей. Комбинаторика регуляторных белков (в основном *MADS*-белки) по-разному совмещает работу этих подсетей. Например, активация подсети

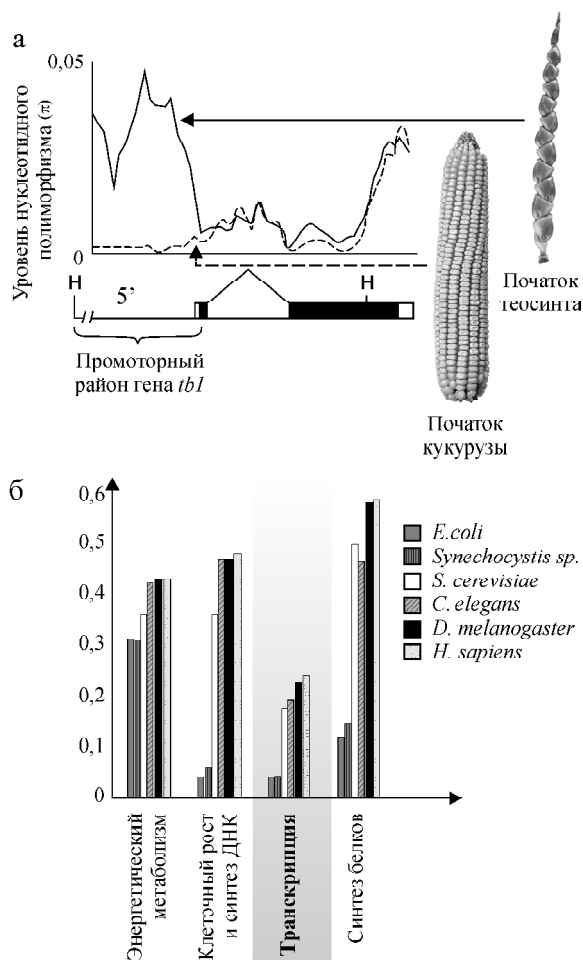


Рис. 3. Мутации центральных регуляторов и изменчивость организмов.

а – фиксация комплекса мутаций в гене *tb1* привела к возникновению початка кукурузы (По: (19), с изменениями); б – сравнение белков разных функциональных групп *Arabidopsis thaliana* с белками тех же групп у видов других таксонов. Белки, регулирующие транскрипцию, обладают наименьшим сходством, что позволяет предположить важную роль эволюции транскрипционных факторов в расхождении таксонов (По: (20), упрощенно).

генов А запускает формирование чашелистиков, А+В – лепестков, В+С – тычинок и С – пестиков. В эти подсети входят следующие гены *MADS*-белков: подсеть А – гены, кодирующие семейство AP1-подобных белков, подсеть В – гены, кодирующие семейство AP3/PI-подобных белков, подсеть С – гены, кодирующие семейство AG-подобных белков (22, 23). Экспериментальный трансгенез генов *MADS* может приводить к превращению стеблевых листочков в лепестки, появлению цветка из

двух рядов лепестков и тычинок и т. д. Примечательно, что эти морфологические изменения, сопоставимые с происходящими при видообразовании, достигаются за счет минимума изменений в геноме – переноса нескольких генов, перепрограммирующих весь автомат (24) (рис. 4а). В эволюции цветковых растений такое перепрограммирование также шло за счет появления новых *MADS*-генов из-за дубликации и дивергенции предкового гена, что обеспечило все известное разнообразие вариантов развития цветка ~ 285 млн лет назад (25) (рис. 4б).

Мутации в каскадах положительных обратных связей. Особый интерес представляют мутации в генных сетях с положительными обратными связями. В таких сетях незначительные мутационные изменения могут приводить к выраженным изменениям фенотипа организмов. Например, ген *tb1* не был идентифицирован в базе данных по кукурузе, содержащей ~ 100000 EST, что говорит о предельно малом количестве его продукта в клетках (26). Роль *tb1* в селекции кукурузы (см. выше), как и ярко выраженный фенотипический эффект его мутаций, можно объяснить лишь каскадным усилением по механизму положительной обратной связи в генных сетях онтогенеза. О степени данного усиления в таких генных сетях дает представление генная сеть программируемой клеточной смерти – апоптоза. Если сравнить молекулярную массу белка FasL, запускающего апоптоз, и массу погибшей клетки, то различие составит ~ 10^{10} (27, 28)! Высочайшая степень усиления в генных сетях с положительными обратными связями вызывает аналогию с сверхкритическими системами, известными в физике и механике. Пример подобной системы – снежная лавина, в которой массадвигающегося снега на много порядков больше массы исходного воздействия. Именно регуляторные контуры с каскадами положительных обратных связей, вовлеченные в регуляцию онтогенеза, – наиболее вероятные мишени процессов видообразования.

Мутации, изменяющие динамический режим функционирования генной сети. В результате теоретических исследований выявлен другой класс мутаций, качественно изменяющих свойства генных сетей. На рис. 5.1

представлена теоретическая генная сеть из 4 генов, имеющая единственное устойчивое состояние: независимо от начальных данных в клетке присутствует только белок P4, а остальные белки отсутствуют. Но появление в ходе мутации лишь одной новой регуляторной связи (выделена жирной стрелкой) качественно усложняет динамику сети – появляются два устойчивых состояния (стационарное и циклическое). В зависимости от начальных данных генная сеть попадает в одно из них (29). Таким образом, в ходе эволюции могли происходить скачкообразные изменения динамики генных сетей, приводящие к выраженным фенотипическим изменениям. Например, так могло идти изменение жилкования крыла двукрылых. Известны мутанты *D. melanogaster*, жилкование крыла которых сходно с жилкованием древних насекомых, т.е. генная сеть предкового жилкования сохраняется. Значит, жилкообразование у насекомых, имеющих в отличие от предков меньшее число жилок, должно ингибироваться в определенных местах крыла, что могло произойти вследствие мутации, изменившей режим функционирования генной сети жилкования (рис. 5.2) (30, 31). Другой яркий пример – крылатые и бескрылые расы у муравьев. Генетические исследования показали, что в разных филумах муравьев прерывание работы генной сети формирования крыла возникло независимо и происходит на разных этапах развития. Замечательно, что муравьи "научились" в ходе эволюции управлять этой генной сетью, регулируя соотношение крылатых и бескрылых форм в зависимости от ситуации в муравейнике (32).

Мутации в генных сетях-интеграторах. Еще один механизм возникновения системных мутаций связан с генными сетями-интеграторами, координирующими ансамбли подчиненных им генных сетей. Примером хорошо изученной генной сети-интегратора является генная сеть регуляции уровня свободных радикалов, при воспалительных процессах обеспечивающая активацию ансамбля генных сетей противовоспалительного ответа, остановки клеточного цикла, апоптоза и др. (18, 28, 33). Мутации, ведущие к изменению функционирования генной сети-интегратора, могут приводить к одновременному изменению работы множества

связанных с ней генных сетей и, как следствие, к фенотипическим изменениям больших масштабов. Например, у билатеральных животных *Hox*-гены являются центральными регуляторами многих генных сетей-интеграторов морфогенеза (работа которых контролируется также компонентами сигнальных каскадов и тканеспецифичными транскрипционными факторами) (34). Экспрессия *Hox*-генов *Ubx* и *abdominal-A* в задних брюшных сегментах гусениц локально репрессирована, что позволяет им формировать ложные ноги. Напротив, у личинок дрозофилы брюшные ложные ноги не формируются вследствие экспрессии этих генов в брюшных сегментах (35).

руются вследствие экспрессии этих генов в брюшных сегментах (35).

Механизмы эволюционной консервативности генных сетей

Комплексность центральных регуляторов. Резкие изменения фенотипа, подобные описанным выше, делают мутации в центральных регуляторах сетей онтогенеза чрезвычайно опасными и ставят вопрос о механизмах защиты. Одним из таких механизмов может быть комплексность центральных регуляторов, хо-

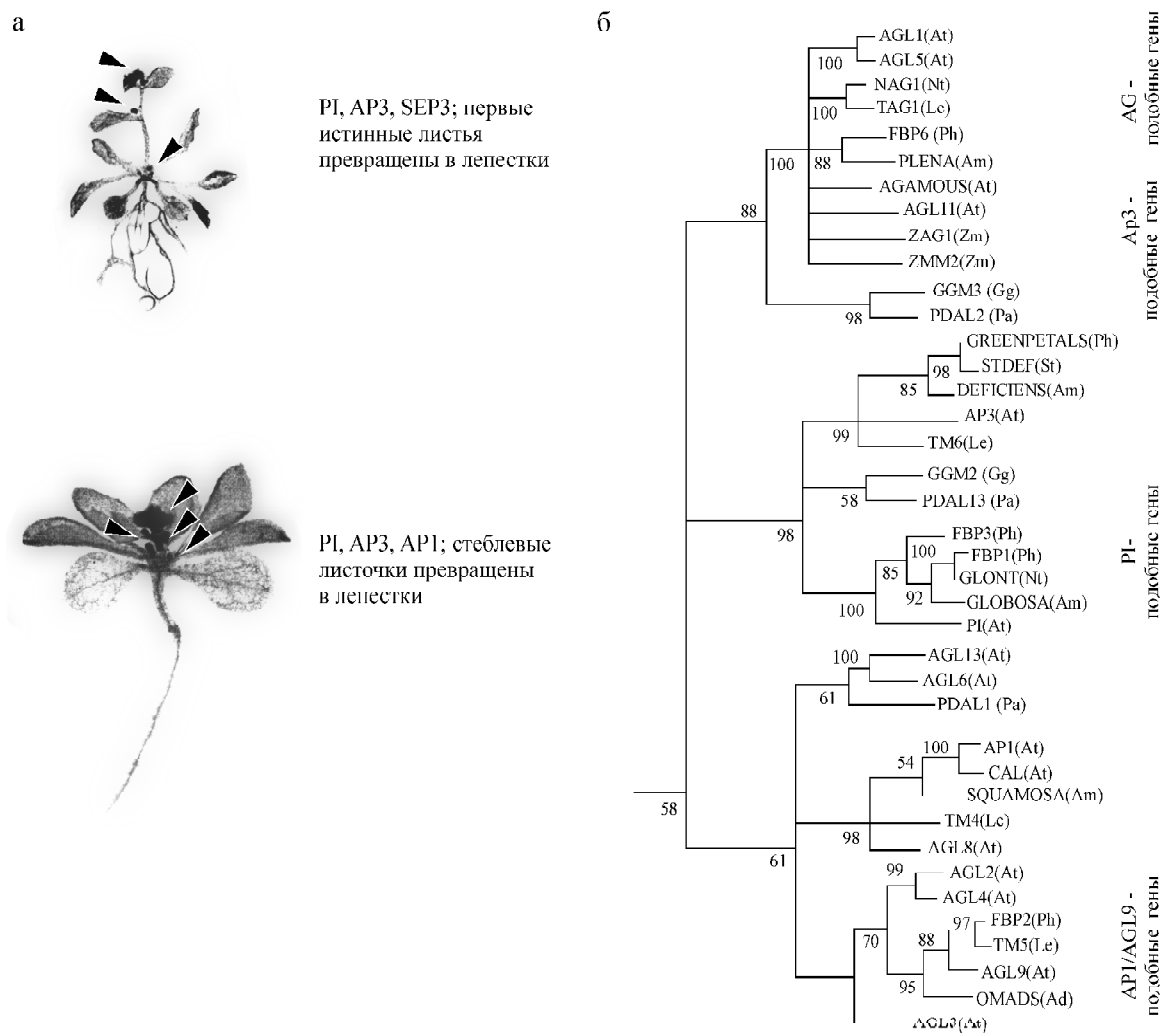


Рис. 4. Гены MADS-белков и изменчивость морфологии цветковых растений.

а – экспериментальный трансгенез нескольких генов MADS-белков приводит к кардинальным изменениям в морфологии *Arabidopsis thaliana* (По: (24), упрощенно); б – эволюционное древо генов MADS-белков цветковых растений. Все современное разнообразие MADS-белков произошло от одного предкового гена в ходе множества дупликаций (По: (25), упрощенно).

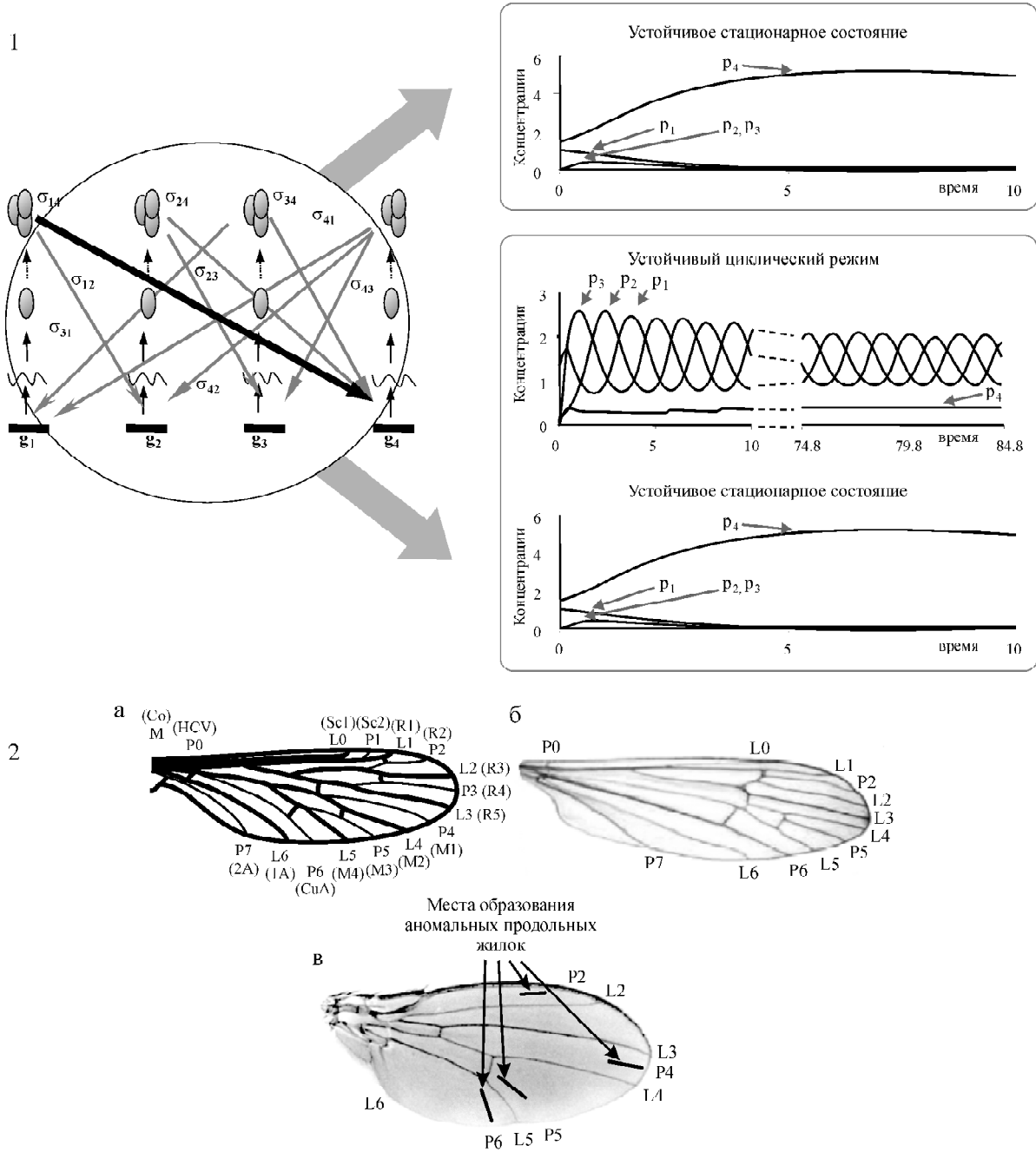


Рис. 5. Динамические системные мутации в теоретических (1) и реальных (2) генных сетях. 1 – изменение динамического режима функционирования теоретической генной сети вследствие появления новой связи. Объяснения см. в тексте (29). 2 – сравнение предкового жилкования крыла насекомых и расположения аномальных продольных жилок (псевдожилок) у мутантов *D. melanogaster* (По: (30, 31)). а – реконструкция предкового жилкования (в скобках даны сокращенные названия жилок, принятые в энтомологии); б – крыло взрослой долгоножки, сохранившей рисунок жилкования, близкий к предковому (P – псевдожилки, L – продольные жилки); в – расположение "горячих точек" эктопического жилкообразования на крыле *D. melanogaster* (P2, P4, P5 и P6): P4 располагается между жилками L3 и L4 у *fu*-мутантов. У *net*-мутантов обнаруживаются псевдожилки P2 и P6: P2 располагается между краем крыла и L2, P6 – между L5 и L6. P5 располагается между L4 и L5 на постериорной границе экспрессии гена *sal* (По: (31)).

рошо изученная у растений. Отличительной чертой подсетей формирования меристемы цветка и органов цветка является то, что регуляторы генов-интеграторов этих подсетей – не отдельные белки, а совместно действующие группы белков и/или белковые комплексы. Действительно, в данном случае даже утрата одного из генов-регуляторов гена-интегратора приведет только к частичной элиминации функции генной сети. Например, в результате такой мутации в генной сети меристемы цветка в соцветии *A. thaliana* не развиваются базальные цветки, а развиваются только терминальные (36, 37). Интегратором подсети меристемы цветка является ген *LFY*. Генами-регуляторами этого интегратора являются гены *API*, *CAL* и *FUL* (36, 38). Мутации в гене *API* не изменяют экспрессию гена *LFY*, приводя только к частичным потерям функции меристемы цветка (37). В двойном мутанте *ap1 cal* потеря функции меристемы цветка значительно, при этом наблюдается изменение экспрессии гена *LFY* (36). Тройной мутант *ap1 cal ful* вообще не цветет (т.е. функция меристемы цветка элиминирована полностью), и экспрессия *LFY* в нем сильно изменена (36, 39). При этом одиночная мутация *ful* или *cal* никак не сказывается на переходе к цветению, одиночная мутация гена *CAL* вообще не сказывается на фенотипе (36, 39). Гены *API*, *CAL* и *FUL* имеют значительную гомологию друг с другом. Продукты генов *API*, *CAL* и *FUL* образуют мультимер, все субъединицы которого взаимозаменяются без существенной потери функции. Например, белковые продукты генов *API* и *CAL* имеют 76 % идентичных и 88 % подобных аминокислот. В мультимере при отсутствии *CAL* его роль может выполнять *API*. Столь значительная гомология *API*, *CAL* и *FUL* предполагает их происхождение в ходе дупликаций (40). Таким образом, роль дупликаций в эволюционном процессе намного сложнее, чем предполагал С. Оно (41). Они не только могут провоцировать прогрессивную эволюцию, но и, наоборот, могут тормозить ее темпы.

Ярким примером защитной роли комплексности центральных регуляторов является экспериментальная трансформация цитрусовых, цветущих в норме на 6–20-м году

жизни, геном *API A. thaliana* под конститутивным промотором. В итоге трансформанты стали цвести на первом году жизни, не претерпев при этом никаких морфологических аномалий и стабильно передавая признак раннего цветения потомству (42). Таким образом, несмотря на то, что мутация центрального регулятора привела к серьезным изменениям динамики онтогенеза, генные сети морфогенеза оказались защищенными от ее последствий.

Сами центральные регуляторы подсетей также могут быть белковыми комплексами. Так, превращение листьев в лепестки может быть вызвано только совместной конститутивной экспрессией генов *API*, *AP3*, *PI* и *SEP3*, а превращение листьев в тычинки – совместной конститутивной экспрессией генов *AG*, *AP3*, *PI*, *SEP3* (24). Показано, что белки, кодируемые этими генами, образуют тетрамерный комплекс, а мутация одного гена из комплекса вызывает только частичное нарушение формирования органа. В данном случае белки, формирующие комплекс, не столь гомологичны, как *API*, *CAL* и *FUL*, и не способны, по-видимому, образовывать гомомер (24).

Интеграция генных сетей. Другим механизмом защиты является сильная интеграция генных сетей, вследствие чего мутации центральных регуляторов будут иметь резко выраженный плейотропный эффект, а сами центральные регуляторы будут находиться под жестким давлением стабилизирующего отбора. В эмбриогенезе животных наиболее сильно интегрированы генные сети *Hox*-генов, ответственных как за морфофункциональную спецификацию сегментов тела, так и за дифференцировку отдельных органов сегмента (34, 43). Соответственно мутации *Hox*-генов (гомеозисные мутации), как правило, вредны, а стадии эмбриогенеза, на которых *Hox*-гены начинают специфицировать сегменты, наименее эволюционно лабильны (34, 44, 45). Напротив, более ранние и более поздние стадии эмбриогенеза в разных таксонах билатеральных животных намного разнообразнее по молекулярно-генетическим механизмам, даже если морфологически весьма сходны (46–49).

Генные сети: от консервативности к лабильности

Ослабление интеграции генных сетей или выделение относительно самостоятельных и слабо перекрывающихся подсетей формируют горячие точки эволюции. Например, у растений лепестки и тычинки являются самыми лабильными органами цветка, что коррелирует с тем, что участвующие в их формировании *MADS*-гены подсетей В и С задействованы только в сети формирования органов цветка. Наоборот, гены подсети А, кроме того, участвуют в формировании меристемы цветка. Соответственно гены подсетей В и С, по-видимому, были более ранней эволюционной мишенью. Гены семейства *API*, судя по наличию высокоомологичных паралогов, переживают эволюционные изменения в настоящий период, причем механизмом ослабления интеграции генных сетей в этом случае является дупликация гена (24, 25), что типично для растений (50). Другим механизмом ослабления интеграции генных сетей может служить усложнение регуляции гена, позволяющее по-разному регулировать один и тот же ген в разных группах клеток многоклеточного организма. Функционально это равносильно дупликации гена. Например, вышеупомянутые *Hox*-гены, *Ubx* и *abdominal-A*, по-разному экспрессируются в различных брюшных сегментах гусеницы. В первых двух брюшных сегментах, которые не несут ложные ноги, экспрессия *Ubx* и *abdominal-A* аналогична таковой у личинок дрозофилы. Возможно, это связано с наличием двух разных типов регуляторных районов: в первых двух брюшных сегментах экспрессию *Ubx* и *abdominal-A* в примордиях ложных ног регулирует один регуляторный район. В задних брюшных сегментах другой регуляторный район репрессирует *Ubx* и *abdominal-A*, позволяя примордиям развиваться в ложные ноги (35). Таким образом, усложнение регуляции гена и его различная экспрессия в разных типах клеток являются новым способом комбинаторного кодирования информации огромной емкости, который освоили только многоклеточные эукариоты.

Роль регуляторной компоненты генной сети в эволюции

В любой генной сети имеются исполняющая и регуляторная компоненты. Например, в генной сети цикла трикарбоновых кислот *Escherichia coli* в исполняющую компоненту входят гены, кодирующие ферменты, непосредственно участвующие в этом метаболическом цикле, а в регуляторную – гены, их регулирующие. Регуляторная компонента этого цикла существенно сложнее метаболической: в среднем на 1 метаболический процесс приходится 13 регуляторных (51). Подобное соотношение характерно и для других генных сетей. В чем причина этого? Очевидно, что процессы базового метаболизма бактерий сформировались еще на заре эволюции и с тех пор существенно не менялись. Эволюционное усложнение бактерий шло именно за счет усложнения регуляторных контуров, управляющих базовыми консервативными процессами. Полный граф метаболизма *E. coli* содержит по последним данным ~ 4000 процессов. С учетом вышесказанного можно понять, насколько сложна регуляторная компонента даже такого простого организма, как бактерия. Можно сделать вывод: сложность организмов зависит не столько от количества генов в их геномах, сколько от сложности регуляции этих генов. Сложность регуляции гена можно грубо оценить количеством регуляторных контуров, замыкающихся на этот ген. Таким образом, прогрессивная эволюция организмов будет тесно (хотя и неоднозначно) связана с возникновением новых регуляторных контуров или усложнением старых.

Как возникают и усложняются регуляторные системы в ходе эволюции? Рассмотрим простейший контур с отрицательной обратной связью (ООС), регулирующий концентрацию белка. Любое отклонение концентрации белка от нормы отслеживается регуляторным звеном ООС, компенсирующим его путем изменения скорости биосинтеза белка (эффеторное звено ООС). Причем контуру безразлична природа факторов, приводящих к отклонениям от нормы. Следовательно, ООС минимизирует фенотипическое проявление мутаций, "обнейтривает" их, выводя из-под действия

отбора. Теоретически показано - чем сильнее ООС, тем сильнее эффект обнейтраливания и тем меньше величина фенотипической изменчивости в популяции (52).

Также показано, что стабилизирующий отбор благоприятствует в популяции таксонам с ООС, преимущественно фиксируя ООС высокого уровня иерархии, что ведет к росту иерархии регуляторных систем (рис. 6а). При этом на нижних уровнях иерархии накапливаются мутации, эволюционирующие в нейтральном режиме (52).

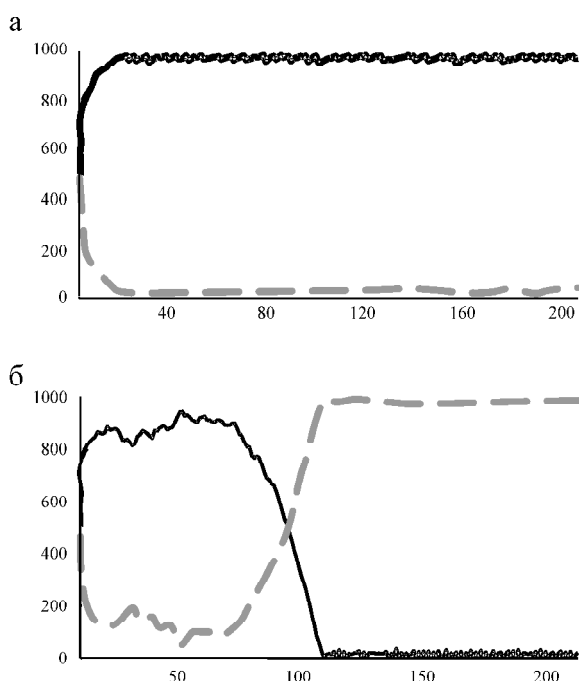


Рис. 6. Конкуренция особей с отрицательной обратной связью (N^-) и без нее (N^0) в ходе эволюции популяции под действием стабилизирующего отбора (а) и под действием движущего отбора (б). Численность популяции постоянна. В начальный момент 50 % особей имеют контур с отрицательной обратной связью (N^-) и 50 % особей не имеют такого контура (N^0) (52).

Важно, что эти мутации не являются нейтральными. Их фенотипический эффект скомпенсирован ООС. Другим классом мутаций со скомпенсированным эффектом являются условно нейтральные мутации – двойные мутации, компенсирующие фенотипический эффект друг друга (генотипическая супрессия у микроорганизмов, скоординированные заме-

ны в белках и рРНК, молекулярный драйв) (53). Одновременное появление таких мутаций – событие маловероятное, но появление одной вредящей мутации должно резко увеличить вероятность фиксации компенсирующей ее мутации (54, 55). Отмеченная выше комплексность центральных регуляторов должна способствовать накоплению в них условно нейтральных мутаций.

В отличие от условно нейтральных мутаций, обнейтраленные мутации не являются двойными, их фенотипическая нейтральность не зависит от конкретных молекулярных механизмов и они не влияют на вероятность фиксации мутаций, увеличивающих силу обнейтраливающего их контура ООС. Эта сила далеко не безгранична и лимитируется мощностью эффекторного и регуляторного звеньев. Превышение пределов их мощностей автоматически выводит часть обнейтраливаемых мутаций под действие отбора. Такое превышение может быть обусловлено либо изменением окружающей среды, либо накоплением груза мутаций в контуре, либо комбинацией этих причин. Представим, что два таксона, живущие в разных экологических нишах, имеют регуляторный контур равной мощности, унаследованный от общего предка. За равное время эволюции этот контур должен накопить в обоих таксонах примерно равный груз обнейтраленных мутаций. Пока запас силы контура велик, эти мутации никак себя не проявляют. Соответственно таксоны эволюционно стабильны, то есть находятся в стазисе. По мере приближения груза к "точке насыщения" эволюционная картина должна меняться. Оба таксона должны утратить эволюционную стабильность, выйти из стазиса. Обнейтраленные мутации должны начать проявляться при незначительных колебаниях окружающей среды. Причем, поскольку в разных нишах будет различна динамика таких колебаний, будет различна и эволюционная судьба таксонов. В худшем случае при неспецифическом изменении среды, затронувшем обе ниши, оба таксона вымрут – произойдет "катастрофа" в терминах катастрофизма. По своему влиянию на биосферу она может быть слабее подобных катастроф, успешно пережитых обоими таксонами ранее, когда не вся сила контура была задействована на обнейтраливание генетического груза.

Теперь представим экосистему, где большую часть ключевых ролей играют родственные таксоны (ситуация, не раз возникавшая на протяжении эволюции, например, динозавровые биоты или биота сумчатых Австралии (56, 57)). Предположим, что все эти таксоны унаследовали от общего предка контуры ООС равной силы и претерпели длительный стабилизирующий отбор, в ходе которого этот контур в каждом из таксонов накопил груз мутаций, близкий к "точке насыщения". В этом случае эволюционную стабильность примерно в одно и то же время могут утратить несколько ключевых таксонов, что приведет экосистему к кризису. Теоретически возможен и "цепной" сценарий: первым эволюционную стабильность теряет вид с регуляторным контуром, наиболее "насыщенным" мутационным грузом. Его гибель или выход из стазиса автоматически ухудшают условия для других видов, регуляторные контуры которых тоже не выдерживают, из-за чего эти виды тоже теряют эволюционную стабильность и т. д. Значит, длительный стабилизирующий отбор в экосистемах с низким таксономическим разнообразием может сам по себе привести к экосистемному кризису и вымиранию близкородственных таксонов-доминантов. На первый взгляд, наличие таксонов – "живых ископаемых" – противоречит этому выводу, так как их существование обычно объясняется стабильностью среды обитания и, следовательно, длительным стабилизирующим отбором. На деле это не совсем так. Часть "живых ископаемых" населяет биотопы, подверженные циклическим изменениям. В таких биотопах направление отбора должно меняться так быстро, что не позволяет таксону специализироваться, из-за чего он сохраняет примитивную морфологию. Это подтверждается, например, тем, что север Европы с его частыми сменами оледенений и межледниковий населяют виды с наиболее генерализованной морфологией (58). Напротив, темпы молекулярной и биохимической эволюции "живых ископаемых" сравнимы с таковыми у форм с эволюционно молодой морфологией (59), что согласуется с помехоустойчивостью генных сетей морфогенеза (42) и указывает на возможность эволюции под действием движущего отбора при сохранении генерализованной морфологии.

При дизруптивном или движущем отборе ситуация противоположна: преимущество получают таксоны без ООС или потерявшие ООС, в то время как таксоны с ООС элиминируются из популяции (рис. 6б) (52). При этом таксоны, потерявшие ООС, будут взрывообразно демонстрировать весь спектр накопленных и ранее обнейтрализуемых мутаций – произойдет гиперманifestация изменчивости и соответственно появится целая когорта молодых таксонов (60). Конечно, не все эти мутации будут адаптивны в новых условиях, поэтому за взрывом изменчивости должно наблюдаться вымирание вновь образованных таксонов, интенсивность которого со временем падает. Таксоны, пережившие вымирание, вступают в стазис. Именно такую картину и удалось наблюдать палеонтологам для когорт таксонов морских организмов фанерозоя. Важно, что описанная закономерность наблюдается на протяжении всего фанерозоя, т.е. является глобальным трендом эволюции, а посему должна иметь системный характер (61).

Таким образом, стабилизирующий и движущий/дизруптивный отборы противоположным образом влияют на регуляторные системы организмов, что приводит к так называемым эволюционным качелям. Поочередно при стабилизирующем отборе происходит возникновение и усиление ООС, а при движущем отборе – ослабление или разрушение некоторых ООС (60). Спектр мутаций, среди которых есть вредные, нейтральные, инадаптивные и адаптивные, должен фиксироваться в геномах таксонов в период стазиса в нейтральном режиме. В процессе захвата новой экологической ниши (или изменения старой) происходит разрушение контура ООС и гиперманifestация изменчивости, после чего таксоны с вредными мутациями быстро вымирают, следом за ними в ходе отбора постепенно вымирают или вытесняются в другие экологические ниши таксоны с инадаптивными мутациями. Если это действительно так, то фиксация практически всего спектра адаптивных для новой ниши мутаций должна проходить за короткое время и именно в периоды заселения (формирования) новых экологических ниш, что подтверждают эксперименты Елены и Ленски (62, 63).

Регуляторные контуры с ООС широко распространены в природе. Они выявляются на всех уровнях организации живого, от молекулярно-генетического, до экосистемного. Следовательно, феномен эволюционных качелей должен наблюдаться и на экосистемном уровне. Когерентная эволюция происходит под контролем сложившейся устойчивой структуры экологического сообщества в условиях острой конкуренции. Некогерентная эволюция, наоборот, идет в условиях распадающейся экологической системы и ослабленной конкуренции. Смена стадий когерентной и некогерентной эволюции (2), проходящая через вымирание доминирующих видов экосистемы (аналог разрушения регуляторного контура высшего иерархического уровня), вследствие чего свой эволюционный потенциал проявляют таксоны-субдоминанты (аналог обнейтраленных мутаций), по-видимому, является аналогом эволюционных качелей в экосистемах.

Основные выводы

1. Прогрессивная эволюция – это эволюция регуляторных генетических систем организмов.
2. В основе кодирования генетической сложности лежит блочно-комбинаторный принцип, позволяющий очень экономно записывать в геномах огромное количество информации о генетических программах, выполняемых генными сетями.
3. Блочно-комбинаторный принцип, буквально пронизывающий кодирование генетических программ функционирования высших эукариот, может обеспечивать как скачкообразное ускорение, так и замедление темпов эволюции.
4. Ускорение темпов эволюции связано с дезинтеграцией генных сетей и разрушением контуров с отрицательной обратной связью, что облегчает перекомбинирование уже существующих связей в генных сетях, либо фенотипическое проявление немногих новых связей.
5. Замедление темпов эволюции связано с усилением интеграции генных сетей и образованием контуров с отрицательной обратной связью.

Благодарности

Выражаю благодарность сотрудникам лабораторий теоретической генетики и молекулярной эволюции ИЦиГ СО РАН, а также особую признательность А.В. Харкевичу за помощь в подготовке статьи.

Работа поддержана грантами РФФИ: 03-04-48506-а, 03-01-00328, интеграционными проектами СО РАН № 119, № 142, № 145, № 148, проектом "Описание и анализ биоразнообразия динамики экосистем Сибири с использованием информационных технологий" программы РАН по биоразнообразию (12.4), проектом "Компьютерное моделирование и экспериментальное конструирование генных сетей" программы РАН по физико-химической биологии (10.4) и проектом "Происхождение и эволюция биосферы" программы президиума РАН.

Литература

1. McShea D.W. The minor transitions in hierarchical evolution and the question of a directional bias // *J. Evol. Biol.* 2001. V. 14, № 3. P. 502–518.
2. Красилов В.А. Нерешенные проблемы теории эволюции. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1986. 138 с.
3. Марков А.В. Новый подход к моделированию динамики разнообразия фанерозойской морской биоты // *Журн. общ. биологии.* 2001. Т. 62, № 6. С. 460–471.
4. Shopf J.W., Parker B.M. Early Archean (3,3 billion to 3,5 billion year old) microfossils from Warrawoona Group, Australia // *Science.* 1987. V. 237, № 4810. P. 70–73.
5. Schidlowski M. A 3,800-million-year isotopic record of life from carbon in sedimentary rocks // *Nature.* 1988. V. 333, № 6171. P. 313–318.
6. Joyce G.F. The antiquity of RNA-based evolution // *Nature.* 2002. V. 418, № 6894. P. 214–221.
7. Brocks J.J., Logan G.A., Buick R., Summons R.E. Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes // *Science.* 1999. V. 285, № 5430. P. 1025–1027.
8. Суслов В.В., Гунбин К.В., Колчанов Н.А. Генетические механизмы кодирования биологической сложности // *Экологическая генетика.* 2004 (в печати).

9. Carroll S.B. Chance and necessity: the evolution of morphological complexity and diversity // *Nature*. 2001. V. 409, № 6823. P. 1102–1109.
10. Taft R.J., Mattick J.S. Increasing biological complexity is positively correlated with the relative genome-wide expansion of non-protein-coding DNA sequences // *Genome Biol*. 2003. V. 5, № 1. P1. Epub 2003 Dec 01. <http://genomebiology.com/2003/5/1/P1>.
11. Колчанов Н.А., Ананько Е.А., Колпаков Ф.А. и др. Генные сети // *Мол. биология*. 2000. Т. 34, № 4. С. 533–544.
12. Ignatieva E.V., Ananko E.A., Podkolodnaya O.A. *et al.* Transcription Regulatory Regions Database (TRRD): Description of Transcription Regulation and the Main Capabilities of the Database // *Bioinformatics of genome regulation and structure* / Eds. N.A. Kolchanov, R. Hofstaedt. Boston a.o.: Kluwer Acad. Publ., 2004. P. 81–92.
13. Колчанов Н.А., Суслов В.В., Шумный В.К. Молекулярная эволюция генетических систем // *Палеонтологический журнал*. 2003. Т. 37, № 6. С. 617–629.
14. Хаусман К. Протозология. М.: Мир, 1988. 336 с.
15. Black D.L. Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology // *Cell*. 2000. V. 103, № 3. P. 367–370.
16. Kolchanov N.A., Nedosekina E.A., Ananko E.A. *et al.* GeneNet database: description and modeling of gene networks // *In Silico Biol*. 2002. V. 2, № 2. P. 97–110.
17. Kolchanov N.A., Ananko E.A., Likhoshvai V.A. *et al.* Gene networks description and modelling in the GeneNet system // *Gene Regulation and Metabolism: Post-genomic Computational Approaches* / Eds. J. Collado-Vides, R. Hofstadt. Cambridge, a.o.: MIT Press, 2002. P. 149–179.
18. Stepanenko I.L., Podkolodnaya O.A., Kolchanov N.A. Gene networks: principles of organization and mechanisms of operation and integration // *Proc. III Intern. Conf. on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (BGRS'2002)*. Novosibirsk: ICG, 2002. V. 2. P. 111–115.
19. Wang R.L., Stec A., Hey J. *et al.* The limits of selection during maize domestication // *Nature*. 1999. V. 398, № 6724. P. 236–239.
20. The Arabidopsis genome initiative analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* // *Nature*. 2000. V. 408, № 6814. P. 796–815.
21. Theissen G., Saedler H. Floral quartets // *Nature*. 2001. V. 409, № 6819. P. 469–471.
22. Theissen G., Saedler H. *MADS*-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's "biogenetic law" revisited // *Curr. Opin. Genet. Dev*. 1995. V. 5, № 5. P. 628–639.
23. Theissen G., Becker A., Di Rosa A. *et al.* A short history of *MADS*-box genes in plants // *Plant Mol. Biol*. 2000. V. 42, № 1. P. 115–149.
24. Honma T., Goto K. Complexes of *MADS*-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs // *Nature*. 2001. V. 409, № 6819. P. 525–529.
25. Lawton A.L., Alvarez-Buylla E.R., Purugganan M.D. Molecular evolution of flower development // *Trends Ecol. Evol*. 2000. V. 15, № 4. P. 144–149.
26. Baum D.A., Doebley J., Irish V.F., Kramer E.M. Response: missing links: the genetic architecture of flower and floral diversification // *Trends in Plant Sci*. 2002. V. 7, № 1. P. 31–34.
27. Stepanenko I.L., Grigor'ev S.A. Organization of the gene network of apoptosis // *Proc. III Intern. Conf. on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (BGRS'2002)*. Novosibirsk: ICG, 2002. V. 2. P. 89–91.
28. Stepanenko I.L., Kolchanov N.A. Apoptosis Gene Network: description in the GeneNet and TRRD databases // *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2003. V. 1010. P. 16–18.
29. Лихошвай В.А., Матушкин Ю.Г., Фадеев С.И. О связи графа генной сети с качественными режимами ее функционирования // *Мол. биология*. 2001. Т. 35, № 6. С. 1080–1087.
30. Garcia-Bellido A., de Celis J.F. Developmental genetics of the venation pattern of *Drosophila* // *Annu. Rev. Genet*. 1992. V. 26. P. 277–304.
31. Biehs B., Sturtevant M. A., Bier E. Boundaries in the *Drosophila* wing imaginal disc organize vein-specific genetic programs // *Development*. 1998. V. 125, № 21. P. 4245–4257.
32. Abouheif E., Wray G.A. Evolution of the gene network underlying wing polyphenism in ants // *Science*. 2002. V. 297, № 5579. P. 249–252.
33. Степаненко И.Л. Регуляция генных сетей стрессового ответа активными формами кислорода // *Экологическая генетика*. 2004 (в печати).
34. Hombria J.C.-G., Lovegrove B. Beyond homeosis – *Hox* function in morphogenesis and organogenesis // *Differentiation*. 2003. V. 71, № 8. P. 461–476.
35. Akam M. *Hox* genes, homeosis and the evolution of segment identity: no need for hopeless monsters // *Int. J. Dev. Biol*. 1998. V. 42, № 3. P. 445–451.

36. Bowman J., Alvarez J., Weigel D. *et al.* Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes // *Development*. 1993. V. 119, № 3. P. 721–743.
37. Weigel D., Alvarez J., Smyth D.R. *et al.* *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis* // *Cell*. 1992. V. 69, № 5. P. 843–859.
38. Irish V.F., Sussex I.M. Function of the *apetala-1* gene during *Arabidopsis* floral development // *Plant Cell*. 1990. V. 2, № 8. P. 741–753.
39. Ferrandiz C., Gu Q., Martienssen R., Yanofsky M. Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER* // *Development*. 2000. V. 127, № 4. P. 725–734.
40. Kempin S.A., Savidge B., Yanofsky M.F. Molecular basis of the cauliflower phenotype in *Arabidopsis* // *Science*. 1995. V. 267, № 5197. P. 522–555.
41. Оно С. Генетические механизмы прогрессивной эволюции. М.: Мир, 1973. 227 с.
42. Pena L., Martin-Trillo M., Juarez J. *et al.* Constitutive expression of *Arabidopsis LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time // *Nat. Biotechnol.* 2001. V. 19, № 3. P. 263–267.
43. McGinnis W. A century of homeosis, a decade of homeoboxes // *Genetics*. 1994. V. 137, № 3. P. 607–611.
44. Richardson M.K., Keuck G. Haeckel's ABC of evolution and development // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2002. V. 77, № 4. P. 495–528.
45. Richardson M.K. Heterochrony and the phylotypic period // *Dev. Biol.* 1995. V. 172, № 2. P. 412–421.
46. Raff R.A., Sly B.J. Modularity and dissociation in the evolution of gene expression territories in development // *Evol. Dev.* 2000. V. 2, № 2. P. 102–113.
47. Raff R.A. *The Shape of Life: Genes, Development, and the Evolution of Animal Form*. Chicago: Univ. of Chicago Press, 1996. 520 p.
48. Gilbert S.F., Opitz J.M., Raff R.A. Resynthesizing evolutionary and developmental biology // *Dev. Biol.* 1996. V. 173, № 2. P. 357–372.
49. Richardson M.K., Hanken J., Gooneratne M.L. *et al.* There is no highly conserved embryonic stage in the vertebrates: implications for current theories of evolution and development // *Anat. Embryol. (Berl)*. 1997. V. 196, № 2. P. 91–106.
50. Liu L., White M.J., MacRae T.H. Transcription factors and their genes in higher plants: functional domains, evolution and regulation // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 262, № 2. P. 247–257.
51. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
52. Колчанов Н.А., Шиндялов И.Н. Теоретическое исследование эволюции регуляторных контуров при различных типах отбора // *Проблемы генетики и теории эволюции* / Ред. В.К. Шумный, А.О. Рувинский. Новосибирск: Наука, 1991. С. 268–279.
53. Алешин В.В., Петров Н.Б. Условно нейтральные признаки // *Природа*. 2003. № 12. С. 25–34.
54. Афонников Д.А., Колчанов Н.А. Консервативные особенности ДНК-связывающих доменов класса "гомеодомен", обусловленные коадаптивными заменами аминокислотных остатков // *Докл. АН*. 2001. Т. 380, № 5. С. 691–695.
55. Afonnikov D.A., Oshchepkov D.Yu., Kolchanov N.A. Detection of conserved physicochemical characteristics of proteins by analyzing clusters of positions with co-ordinated substitutions // *Bioinformatics*. 2001. V. 17, № 11. P. 1035–1046.
56. Кэрролл Р. Палеонтология и эволюция позвоночных. Т. 2. М.: Мир, 1992. 280 с.
57. Кэрролл Р. Палеонтология и эволюция позвоночных. Т. 3. М.: Мир, 1993. 312 с.
58. Dynesius M., Jansson R. Evolutionary consequences of changes in species' geographical distributions driven by Milankovitch climate oscillations // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97, № 16. P. 9115–9120.
59. Антонов А.С. Растения и животные – "живые ископаемые" // *Природа*. 2000. № 10. С. 73–78.
60. Колчанов Н.А. Эволюция регуляторных генетических систем // Теоретический семинар геологов и биологов "Происхождение и эволюция живых систем". Горный Алтай, стационар "Денисова пещера", 2003, на сайте: Происхождение и эволюция живых систем, <http://www.bionet.nsc.ru/live>
61. Марков А.В. Возвращение Черной Королевы, или Закон роста средней продолжительности существования родов в процессе эволюции // *Журн. общ. биологии*. 2000. Т. 61, № 4. С. 357–369.
62. Elena S.F., Lenski R.E. Microbial genetics: evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation // *Nat. Rev. Genet.* 2003. V. 4, № 6. P. 457–469.
63. Elena S.F., Lenski R.E. Test of synergistic interactions among deleterious mutations in bacteria // *Nature*. 1997. V. 390, № 6658. P. 395–398.

Отредактировано и подготовлено к печати
в редакционно-издательском отделе ИЦиГ СО РАН

Редакторы: А.А. Ончукова, И.Ю. Ануфриева
Технический редактор Н.С. Глазкова
Дизайн и компьютерная верстка А.В. Харкевич

Подписано к печати 17.05.2004 г.
Формат бумаги 60x841/8. Усл.-печ.л. 8,37. Уч.-изд.л. 14,28
Тираж 400. Заказ 252

Издательство Сибирского отделения Российской академии наук
630090 Новосибирск, Морской проспект, 2