

В. А. КУНАХ

МОБІЛЬНІ ГЕНЕТИЧНІ ЕЛЕМЕНТИ І ПЛАСТИЧНІСТЬ ГЕНОМУ РОСЛИН

ndon)](plasmid

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

В. А. КУНАХ

**МОБІЛЬНІ
ГЕНЕТИЧНІ ЕЛЕМЕНТИ
І ПЛАСТИЧНІСТЬ
ГЕНОМУ РОСЛИН**

Київ — Логос — 2013

УДК 575+[575.111:573.4]
ББК 28.04+28.54
К91

В.А. Кунах

К91 Мобільні генетичні елементи і пластичність геному рослин / В.А. Кунах. — К.: Логос, 2013. — 288 с.: іл.
ISBN 978-966-171-721-2.

Розглянуто кількісно найбільший компонент рослинного геному — мобільні генетичні елементи (МГЕ) обох класів: класу I (ретротранспозони) і класу II (ДНК-транспозони), історію їх відкриття і вивчення. Проаналізовано механізми і чинники їх переміщення, особливості структури, еволюції, біологічне значення і практичне застосування. Наведено відомості про багатоліку роль МГЕ в регуляції клітинних генів і еволюції розміру, структури і пластичності геномів, у механізмах адаптивності вищих рослин як на рівні окремого організму, так і на популяційному рівні. Припускається, що інвазія і подальша ампліфікація МГЕ є основним формотворчим чинником, що забезпечує адаптацію до мінливих умов довкілля і в деяких випадках може приводити до «швидкого» видоутворення.

Для спеціалістів у галузі генетики, молекулярної біології, клітинної біології, біотехнології, екології, фізіології та біохімії рослин, селекції, викладачів та студентів вищих навчальних закладів.

УДК 575+[575.111:573.4]
ББК 28.04+28.54

V.A. Kunakh

Mobile genetic elements and plant genome plasticity / V.A. Kunakh. — Kyiv: Logos, 2013. — 288 p.

Mobile genetic elements (MGEs or MEs) of both classes, class I (retrotransposons) and class II (DNA transposons), making up bulk proportion of plant genome, history of their discovery and studies have been reviewed. Mechanisms and reasons underlying their transposition, details of structure, evolution, biological significance and practical application were analyzed. Evidence for multifaceted role of MGEs in cell regulation and evolution of genome size, structure and plasticity, in mechanisms of higher plant adaptability both at individual and populational level was provided. It is supposed that MGEs invasion and their further amplification present the major form-building factors to ensure adaptation to varying environment and in some cases may result in «rapid» speciation.

For specialists in the field of genetics, molecular biology, cell biology, biotechnology, ecology, physiology and biochemistry of plants, plant breeding, lecturers and students of higher education institutes.

*Затверджено до друку рішенням вченої ради Інституту молекулярної біології
і генетики НАН України
(протокол №6 від 28 травня 2013 р.).*

Рецензенти: **Блюм Я.Б.**, академік НАН України;
Сльська Г.В., академік НАН України;
Говорун Д.М., член-кореспондент НАН України

ISBN 978-966-171-721-2

© Кунах В. А., 2013

ЗМІСТ

ВСТУП, або дещо про пластичність геному як основу адаптивності рослин	9
INTRODUCTION, or something about genome plasticity as a basis for plant adaptability	13

Частина I

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МОБІЛЬНИХ (РУХОМИХ) ЕЛЕМЕНТІВ ГЕНОМУ

Розділ 1. КОРОТКА ІСТОРІЯ ВИВЧЕННЯ НЕСТАБІЛЬНОСТІ ГЕНІВ І ВІДКРИТТЯ МОБІЛЬНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ЕЛЕМЕНТІВ.	16
1.1. Відкриття мобільних генетичних елементів	16
1.2. Гіпотеза Б. МакКлінток	18
1.3. Концепція профага, епісоми і плазмідів	19
1.4. Відкриття інсерційних елементів у прокаріотів	21
1.5. Інсерційний мутагенез і вибухи мутацій у дрозофіли.	22
Розділ 2. БІОЛОГІЯ МОБІЛЬНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ЕЛЕМЕНТІВ.	25
Розділ 3. РЕТРОТРАНСПОЗОНИ	30
3.1. LTR-вмісні ретротранспозони	31
3.1.1. Надродина <i>Ty1/copia</i>	32
3.1.1.1. Особливості деяких представників надродини <i>Ty1/copia</i>	34
3.1.2. Надродина <i>Ty3/gypsy</i>	37
3.1.3. Надродина <i>Bel/Pao</i>	40
3.1.4. Філогенія і транспозиційна активність <i>Ty1/copia</i> та <i>gypsy</i> -подібних ретротранспозонів у геномах злаків.	41
3.2. Автономні та неавтономні ретротранспозони	42
3.3. Життєвий цикл LTR-вмісних ретротранспозонів	43
3.3.1. Транскрипція	44
3.3.2. Трансляція	44
3.3.3. Формування нуклеокапсиду, упаковка і димеризація	44
3.3.4. Зворотна транскрипція	45
3.3.5. Інтеграція нової копії LTR-вмісних ретротранспозонів у геном	46
3.4. Регуляція активності LTR-вмісних ретротранспозонів	47
3.5. Поширення LTR-вмісних ретротранспозонів серед рослин	48
3.5.1. LTR-ретротранспозони покритонасінних рослин	48
3.5.2. LTR-ретротранспозони голонасінних рослин	49
3.5.3. LTR-ретротранспозони вищих безнасінних рослин	50
3.6. Узагальнена характеристика LTR-вмісних ретротранспозонів. Підсумок	52
3.7. LTR-невмісні ретротранспозони	54
3.7.1. <i>L1</i> -ретротранспозони покритонасінних рослин	57
3.7.1.1. Структурна організація <i>L1</i> -non-LTR-ретротранспозонів рослин	57
3.7.2. Життєвий цикл LTR-невмісних ретротранспозонів і їх регуляція хазяїном	59
3.7.2.1. Механізми реплікації.	60
3.7.2.2. Хазяйські чинники сприяння LTR-невмісним ретротранспозонам	63
3.7.2.3. Регуляторні механізми хазяїна, що обмежують LTR-невмісні ретротранспозони	63
3.7.3. Короткі розсіяні елементи (SINEs) або ретрогени.	64
3.7.3.1. SINEs рослин. Походження і класифікація	65
3.7.3.2. SINEs-елементи Brassicaceae	66
3.7.3.3. Походження різних родів SINEs-елементів у <i>A. thaliana</i> і <i>B. oleracea</i>	67
3.8. Виділення ретротранспозонів	69
3.9. Ендогенні паретровіруси (EPRVs) як особливий клас ретроеlementів	69
3.9.1. Структура й інтеграція	69
3.9.2. Еволюція EPRVs	71
3.9.3. Активація і контроль EPRVs	72
3.10. Ретротранспозони — ключові ознаки, роль у формуванні розміру й еволюції геному рослин. Підсумок	74

Розділ 4. ДНК-ТРАНСПОЗОНИ	76
4.1. <i>Ac</i> -елемент і його похідні — <i>Ds</i> -елементи	82
4.2. <i>En/Spm</i> -елемент	85
4.3. <i>Mu</i> -елементи	85
4.4. Гелітрони	86
4.4.1. Механізм транспозиції і захоплення генів гелітронами	92
4.4.2. Походження й еволюційне значення генних послідовностей у гелітронах	92
4.4.3. Зв'язування гелітронними транскриптами екзонів різних генів	94
Розділ 5. ЕВОЛЮЦІЯ МОБІЛЬНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ЕЛЕМЕНТІВ РОСЛИН	96
5.1. Контроль транспозиції МГЕ	97
5.2. Видалення МГЕ шляхом рекомбінації	98
5.3. Вплив популяційних процесів на транспозиції і делеції МГЕ	99
5.4. Проблеми і перспективи. Підсумок	102
Розділ 6. ФАКТОРИ, ЦО ВПЛИВАЮТЬ НА АМПЛІФІКАЦІЮ МГЕ. УЗАГАЛЬНЕННЯ	103

Частина II

БІОЛОГІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ МОБІЛЬНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ЕЛЕМЕНТІВ

Розділ 7. ІНДУКЦІЯ ТРАНСПОЗИЦІЙ МГЕ І СТРЕС	107
7.1. Вибух транспозицій у геномах гібридів	108
7.2. Генотоксичний стрес і мобілізація транспозонів	110
7.3. Активація МГЕ у культурі клітин і тканин	111
7.4. Вплив температури	113
7.5. Вплив інфекцій вірусного, бактеріального і грибового походження	113
7.6. Яровизація рослин і транспозони	113
7.7. Молекулярні механізми індукції транспозицій	116
7.8. Епігенетичний контроль і місцеспрямовання інсерцій як відповідь на екологічні впливи	117
7.8.1. Динаміка ретротранспозонів ячменю <i>BARE-1</i> у різних умовах зростання	118
7.9. Активація МГЕ стресовими чинниками. Підсумок	120
Розділ 8. ЕВОЛЮЦІЙНА РОЛЬ «ОДОМАШНЕНИХ» МГЕ	123
Розділ 9. ГЕНОМНІ ПЕРЕБУДОВИ ЗА ДОПОМОГОЮ НЕЛІНІЙНОЇ (АЛЬТЕРНАТИВНОЇ) ТРАНСПОЗИЦІЇ (на прикладі кукурудзи)	126
9.1. Походження нової алелі <i>PI-w</i> з великою інвертованою дуплікацією	127
9.2. Підтвердження явища нелінійної транспозиції (NLT)	128
9.3. Молекулярний аналіз спарених алелей	129
9.4. Механізми і відносні частоти нормальної і нелінійної (альтернативної) транспозицій та цитогенетичні підтвердження хромосомних перебудов	131
9.5. Значення NLT-індукованих перебудов	136
Розділ 10. РОЛЬ МГЕ В ЕВОЛЮЦІЇ ГЕНОМУ РОСЛИН	138
10.1. Зміна кількості послідовностей ДНК	140
10.2. Створення генів	142
10.3. Втрата новостворених генів	144
10.4. Генні і геномні перебудови	145
10.5. Диференційна ампліфікація МГЕ і дивергенція геномів	146
10.6. Ендогенний мутагенез, МГЕ й «альтруїстична некодувальна ДНК»	148
10.7. Структурне різноманіття ретротранспозонів і особливості еволюції геномів рослин	152
10.7.1. Великі геноми квіткових рослин збільшуються завдяки активності кількох родин LTR-ретротранспозонів, які є різними у різних видів	154
10.7.2. Час вставки LTR-вмісних ретротранспозонів	154
10.7.3. Нерівна рекомбінація — основний чинник видалення ДНК	154
10.7.4. Заміщення й індели у дивергуючих довгих кінцевих повторах (LTRs)	155
10.7.5. Динаміка геномів. Підсумок	156
Розділ 11. МОБІЛЬНІ ЕЛЕМЕНТИ Й ЕПІГЕНЕТИКА РОСЛИН	157
11.1. Еволюція шляхом мутацій у генах, які керують епігенетичними системами	158
11.2. Епігенетичне перепрограмування і сайленсинг МГЕ малими РНК	159
11.2.1. Перепрограмування в онтогенезі	160
11.2.2. Механізми прояву і сайленсингу МГЕ у зародковій лінії клітин	161
Розділ 12. РОЛЬ ТРАНСПОЗОНІВ У РОСЛИННИХ ПОПУЛЯЦІЯХ	163
12.1. Динаміка транспозонів й інших фракцій високоповторюваної ДНК як індикатор процесів видоутворення	166

Розділ 13. МГЕ Й ЕВОЛЮЦІЯ СТАТІ	168
13.1. Еволюція статевих хромосом.	168
13.2. Роль МГЕ у формуванні статевих хромосом і генетичного різноманіття	170
13.3. МГЕ та системи розмноження рослин	171
13.4. Шляхи і напрями еволюції статі. Підсумок	174
Розділ 14. РОЛЬ МОБІЛЬНИХ ЕЛЕМЕНТІВ В ОРГАНІЗАЦІЇ ХРОМОСОМ	175
14.1. Особливості розподілу МГЕ на хромосомах	176
14.2. Мобільні елементи і В-хромосоми	177
14.3. Утворення кільцевих мікрохромосом у дріжджів як адаптивний механізм ампліфікації генів	179
Розділ 15. ГОРИЗОНТАЛЬНЕ ПЕРЕНЕСЕННЯ ГЕНІВ І МГЕ	181
15.1. Явище горизонтального перенесення	181
15.2. Можливі механізми горизонтального перенесення МГЕ	182
15.3. Критерії горизонтального перенесення МГЕ	183
15.4. Горизонтальне перенесення LTR-невмісних ретротранспозонів	184
Розділ 16. ФУНКЦІОНАЛЬНЕ ЗНАЧЕННЯ МГЕ. ПІДСУМОК	186
Частина III	
ПРИКЛАДНІ АСПЕКТИ	
Розділ 17. УМОВИ І ФАКТОРИ КЛОНУВАННЯ ГЕНІВ І КОНТРОЛЮ ТРАНСПОЗИЦІЇ	189
Розділ 18. ТРАНСПОЗООНОВИЙ МУТАГЕНЕЗ	192
Розділ 19. РЕТРОТРАНСПОЗОННІ ВЕКТОРНІ СИСТЕМИ ДЛЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ	194
19.1. Деякі аспекти біології LTR-вмісних ретротранспозонів	194
19.2. Розробка векторної системи на основі ретротранспозона <i>Tnt1</i>	195
19.3. Перспективи застосування двокомпонентної системи векторів міні- <i>Tnt1</i>	198
Розділ 20. ОСОБЛИВОСТІ ТА ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ТРАНСПОЗИЦІЙ МГЕ У МЕЖАХ ОДНОГО ГЕНОМУ ТА МІЖ ГЕНОМАМИ	200
Розділ 21. ТРАНСПОЗИЦІЇ ТА КЛОНУВАННЯ ГЕНІВ У ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ	202
Розділ 22. МГЕ ЯК ІНСТРУМЕНТ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	204
22.1. Транспозони у біотехнології рослин	204
22.2. Транспозонні технології для генної і клітинної інженерії	204
Розділ 23. МГЕ ЯК ГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ	207
23.1. Типи ДНК-маркерів і їх застосування у молекулярно-генетичному аналізі	208
23.1.1. ПДРФ-маркери	209
23.1.2. ПЛР-маркери	209
23.1.2.1. ПЛР із довільними праймерами	209
23.1.2.2. Метод AFLP (amplified fragment length polymorphism)	210
23.1.2.3. ПЛР із локус-специфічними праймерами	210
23.1.3. Ретротранспозони як молекулярні маркери	211
23.1.3.1. Методи S-SAP/TD	211
23.1.3.2. Методи IRAP/REMAP	213
23.1.3.3. Методи RBIP/TAM	215
23.1.3.4. Метод iPBS	215
23.1.3.5. Ретротранспозони й аналіз генетичного різноманіття	217
23.2. Особливості молекулярних маркерів на основі мобільних елементів	218
23.3. Застосування мобільних елементів у філогенії і популяційній генетиці	221
23.3.1. Використання представників <i>Ty1/copia</i> та <i>gypsy</i> -подібних груп ретротранспозонів у філогенії злаків	222
23.3.2. SINEs-елементи як джерело молекулярних маркерів	223
23.3.3. Застосування ДНК-транспозонів для філогенетичних досліджень на прикладі <i>Brassica rapa</i> L. . .	225
ПІДСУМОК. Роль МГЕ в еволюції геному	227
CONCLUSION. Role of MGEs in evolution of genome	231
Література	235
Словник	265

CONTENT

ВСТУП, або дещо про пластичність геному як основу адаптивності рослин	9
INTRODUCTION, or something about genome plasticity as a basis for plant adaptability	13

Part I

GENERAL CHARACTERISTICS OF MOBILE (TRANSPOSABLE) GENOME ELEMENTS

Section 1. A BRIEF HISTORY OF STUDIES ON GENE INSTABILITY AND DISCOVERY	
OF THE MOBILE GENETIC ELEMENTS	16
1.1. Discovery of mobile genetic elements	16
1.2. Hypothesis of B. MacClintock	18
1.3. Concept of prophage, episomes and plasmids	19
1.4. Discovery of insertion elements in procaryotes	21
1.5. Insertional mutagenesis and mutation bursts in <i>Drosophyla</i>	22
Section 2. BIOLOGY OF MOBILE GENETIC ELEMENTS	25
Section 3. RETROTRANSPOSONS.	30
3.1. LTR-retrotransposons	31
3.1.1. <i>Ty1/copia</i> superfamily	32
3.1.1.1. Features of some members of <i>Ty1/copia</i> superfamily	34
3.1.2. <i>Ty3/gypsy</i> superfamily	37
3.1.3. <i>Bel/Pao</i> superfamily	40
3.1.4. Phylogeny and transpositional activity of <i>Ty1/copia</i> and <i>gypsy</i> -like retrotransposons in cereal genomes	41
3.2. Autonomous and non-autonomous retrotransposons	42
3.3. Life history of LTR-retrotransposons	43
3.3.1. Transcription	44
3.3.2. Translation	44
3.3.3. Nucleocapside formation, packaging and dimerization	44
3.3.4. Reverse transcription	45
3.3.5. Integrating of new LTR-retrotransposon copy into genome	46
3.4. Regulation of activity in LTR-retrotransposons	47
3.5. Distribution of LTR-retrotransposons among plants	48
3.5.1. LTR-retrotransposons of angiosperms	48
3.5.2. LTR-retrotransposons of gymnosperms	49
3.5.3. LTR-retrotransposons of higher seedless plants	50
3.6. General characteristics of LTR-retrotransposons. Resume	52
3.7. Non-LTR-retrotransposons	54
3.7.1. <i>L1</i> -retrotransposons of angiosperms	57
3.7.1.1. Structural organization of plant <i>L1</i> -non-LTR-retrotransposons	57
3.7.2. Life history of non-LTR retrotransposons and their control by host	59
3.7.2.1. Mechanisms of replication	60
3.7.2.2. Host factors promoting non-LTR-retrotransposons	63
3.7.2.3. Host control mechanisms confining non-LTR retrotransposons	63
3.7.3. Short interspersed elements (SINEs) or retrogenes	64
3.7.3.1. Plant SINEs. Origin and classification	65
3.7.3.2. SINEs-elements of Brassicaceae	66
3.7.3.3. Origin of various families of SINEs-elements in <i>A. thaliana</i> and <i>B. oleracea</i>	67
3.8. Isolation of retrotransposons	69
3.9. Endogeneous pararetroviruses (EPRVs) as a special class of retroelements	69
3.9.1. Structure and integration	69
3.9.2. Evolution of EPRVs	71
3.9.3. Activation and control of EPRVs	72
3.10. Retrotransposons: key features, role in formation of size and in evolution of plant genome	74
Conclusions	74

Section 4. DNA-TRANSPOSONS	76
4.1. <i>Ac</i> -element and its derivatives, <i>Ds</i> -elements	82
4.2. <i>En/Spm</i> -element	85
4.3. <i>Mu</i> -elements	85
4.4. Helitrons	86
4.4.1. Mechanism of transposition and gene acquirement by Helitrons	92
4.4.2. Origin and evolutionary implication of gene sequences in Helitrons	92
4.4.3. Binding by Helitron transcripts of the exons in different genes	94
Section 5. EVOLUTION OF PLANT MOBILE GENETIC ELEMENTS	96
5.1. Control of MGE transposition	97
5.2. Removal of MGE via recombination	98
5.3. Effect of population events on transposition and deletion of MGE	99
5.4. Problems and prospects. Conclusions.	102
Section 6. FACTORS, AFFECTING MGE AMPLIFICATION. GENERALIZATION	103

Part II

BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF MOBILE GENETIC ELEMENTS

Section 7. INDUCTION OF MGE TRANSPOSITIONS AND STRESS	107
7.1. Burst of transpositions in genomes of hybrids	108
7.2. Genotoxic stress and transposon mobilization	110
7.3. Activation of MGEs in cell and tissue culture	111
7.4. Effect of temperature	113
7.5. Effect of viral, bacterial and fungal infections	113
7.6. Plant vernalization and transposons	113
7.7. Molecular mechanisms of transposition induction	116
7.8. Epigenetic control and target direction of insertions as a respond to environmental stimuli	117
7.8.1. Dynamics of barley <i>BARE-1</i> retrotransposons in various conditions of growing	118
7.9. Activation of MTEs with stress factors. Conclusions.	120
Section 8. EVOLUTIONARY ROLE OF THE «DOMESTICATED» MGEs	123
Section 9. GENOME REARRANGEMENTS BY NON-LINEAR (ALTERNATIVE) TRANSPOSITIONS (as exemplified by maize)	126
9.1. Origin of novel <i>P1-ww</i> allele with large inverted duplication	127
9.2. Confirmation of non-linear transposition (NLT) phenomenon	128
9.3. Molecular analysis of matched alleles	129
9.4. Mechanisms and relative frequencies of regular and non-linear (alternative) transpositions and cytogenetic confirmations of chromosome rearrangements.	131
9.5. Implication of NLT-induced rearrangements	136
Section 10. ROLE OF MGEs IN EVOLUTION OF PLANT GENOME	138
10.1. Change in number of DNA sequences	140
10.2. Gene generation	142
10.3. Loose of newly generated genes	144
10.4. Gene and genome rearrangements	145
10.5. Differential MGE amplification and genome divergention	146
10.6. Endogenous mutagenesis, MGE and «altruistic non-coding DNA»	148
10.7. Structural retrotransposon diversity and details of plant genome evolution.	152
10.7.1. Large genomes of angiosperms expand due to activity of some LTR-retrotransposon families, varying among species	154
10.7.2. Timing of LTR-retrotransposon insertion	154
10.7.3. Unequal recombination, major factor of DNA removal	154
10.7.4. Substitutions and indels in divergating long terminal repeats (LTRs)	155
10.7.5. Genome dynamics. Conclusions.	156
Section 11. MOBILE ELEMENTS AND PLANT EPIGENETICS	157
11.1. Evolution by mutations in genes that control epigenetic systems	158
11.2. Epigenetic reprogramming and MGE silencing by small RNAs	159
11.2.1. Reprogramming in ontogenesis	160
11.2.2. Mechanisms of MGE occurrence and silencing in germ-line cells	161

Section 12. ROLE OF TRANSPOSONS IN PLANT POPULATIONS	163
12.1. Dynamics of transposons and other fractions of highly repeated DNA as indicator of speciation events	166
Section 13. MGEs AND SEX EVOLUTION	168
13.1. Evolution of sex chromosomes	168
13.2. Role of MGEs in formation of sex chromosomes and genetic diversity	170
13.3. MGEs and systems of plant propagation	171
13.4. Ways and directions of sex evolution. Conclusions	174
Section 14. ROLE OF MOBILE ELEMENTS IN CHROMOSOME ORGANIZATION	175
14.1. Details of MGE distribution on chromosomes	176
14.2. Mobile elements and B-chromosomes	177
14.3. Generation of ring micro-chromosomes in yeasts as an adaptive mechanism for gene amplification	179
Section 15. HORIZONTAL GENE TRANSFER AND MGEs	181
15.1. Phenomenon of horizontal transfer	181
15.2. Putative mechanisms involving horizontal transfer of MGEs	182
15.3. Criteria of MGEs horizontal transfer	183
15.4. Horizontal transfer of non-LTR-retrotransposons	184
Section 16. FUNCTIONAL IMPLICATION OF MGEs. CONCLUSIONS	186
 Part III APPLIED ASPECTS 	
Section 17. CONDITIONS AND FACTORS INVOLVING GENE CLONING AND CONTROL OF TRANSPOSITION	189
Section 18. TRANSPOSON MUTAGENESIS	192
Section 19. RETROTRANSPOSON VECTOR SYSTEMS FOR GENOME ENGINEERING	194
19.1. Some aspects of LTR-retrotransposon biology	194
19.2. Development of vector system based on <i>Tnt1</i> retrotransposon	195
19.3. Prospects for using a <i>Tnt1</i> -based two-component vector system	198
Section 20. FEATURES AND PRACTICAL SIGNIFICANCE OF MGE TRANSPOSITION WITHIN INDIVIDUAL GENOME AND BETWEEN GENOMES	200
Section 21. TRANSPOSITIONS AND GENE CLONING IN TRANSGENIC PLANTS	202
Section 22. MGE AS A TOOL FOR BIOTECHNOLOGICAL STUDIES	204
22.1. Transposons in plant biotechnology	204
22.2. Transposon technologies for gene and cell engineering	204
Section 23. MGEs AS GENETIC MARKERS	207
23.1. Types of molecular genetic markers and their use in fingerprinting	208
23.1.1. RFLP-markers	209
23.1.2. PCR-markers	209
23.1.2.1. PCR with arbitrary primers	209
23.1.2.2. AFLP method	210
23.1.2.3. PCR with site-specific primers	210
23.1.3. Retrotransposons as molecular markers	211
23.1.3.1. S-SAP/TD methods	211
23.1.3.2. IRAP/REMAP methods	213
23.1.3.3. RBIP/TAM methods	215
23.1.3.4. iPBS method	215
23.1.3.5. Retrotransposons and evaluation of the genetic diversity	217
23.2. Characteristics of molecular markers based on mobile elements	218
23.3. Application of mobile elements in phylogeny and populational genetics	221
23.3.1. Use of members of <i>Ty1/copia</i> and <i>gypsy</i> -like groups of retrotransposons in phylogeny of cereals.	222
23.3.2. SINEs-elements as a source of molecular markers	223
23.3.3. Use of DNA-transposons for phylogenetic studies as exemplified by <i>Brassica rapa</i> L.	225
ПІДСУМОК. Роль МГЕ в еволюції геному	227
CONCLUSION. Role of MGEs in genome evolution	231
Literature	235
Dictionary	265

ВСТУП,

або децю про пластичність геному як основу адаптивності рослин

Вищі рослини, які є прикріпленими організмами, виробили потужні й ефективні, а подекуди — й специфічні механізми адаптації до мінливих умов довкілля, зокрема могутні механізми захисту від дії екстремальних (стресових) чинників. Механізми стресової адаптації діють як на рівні окремого організму, так і на популяційному рівні.

Дослідження молекулярних механізмів адаптації на рівні окремого організму показали, що за ці реакції відповідають переважно епігенетичні системи, які є частиною естафети від фіксації «відчуття» зміни в довкіллі до зміни генної експресії. Здатність епігенетичних систем змінюватися швидко й ефективно, зберігаючи при цьому потенціал стабільної «пам'яті» впродовж багатьох клітинних поколінь, пояснює гнучкість реакції рослин на умови довкілля. Залежно від умов існування продукт реалізації генотипу — фенотип — може бути різним. Наприклад, один із видів роду *Ficus* у лісі — це ліани, а на відкритому просторі — дерева. Або класичний приклад з рослиною стрілиця *Sagittaria* L., що утворює різні відмінні форми листків: підводні (нитчасті), плаваючі (суцільні серцеподібні) і надводні (стрілоподібні). Ці й багато інших даних свідчать про те, що епігенетичні системи рослин є складними і містять цілу низку унікальних складових, які відсутні в інших евкаріотів.

В основі відомих на сьогодні клітинних і молекулярних механізмів захисту рослин від стресових чинників, адаптивності і гомеостатичності на рівні окремого організму лежить, на нашу думку, таке основоположне явище, як висока пластичність геному соматичних клітин, його т. зв. «динамічність», яка чітко виявляється в онтогенезі. Пластичність геному рослин зумовлює тотипотентність (переключення морфогенетичних програм, наприклад, з метою відновлення пошкоджених органів чи організму в цілому) і регульовану (адаптивну) мінливість геному в онтогенезі (у тому числі появу генотрофів), а також високу частоту, на перший погляд, ненаправлених геномних змін в умовах впливів, що виходять за межі норми реакції генотипу (стресових впливів).

Молекулярні механізми пластичності в організації геному, що змінюється залежно від потреб клітини й умов її функціонування і, особливо, за відхилень, викликаних непередбачуваними стресовими умовами, що дозволяє клітині ефективно уникати загибелі, детально розглянуто у низці книг і оглядів (Колотова і др., 2004; Патрушев, Минкевич, 2007; Яблонка, Лэмб, 2008; Юрченко і др., 2011; Arnold-Schmitt, 2004; Grant-Downton, Dickinson, 2005, 2006; Mittler et al., 2006, тощо). Проте у цих працях практично не проаналізовано геномні зміни, зокрема кількісні зміни ДНК і хромосомні зміни, які відіграють не менш важливу роль, ніж інші, добре відомі й багаторазово описані «класичні» складові епігенетичної системи рослин, а саме так звані «три стовпи» епігенетики:

- метилювання ДНК (цитозинових і аденинових залишків);
- модифікації хроматину (метилювання і ацетилювання гістонових білків і їх посттрансляційних модифікацій);
- світ РНК (перш за все обох типів малих РНК — малих інтерферуючих РНК (siRNA) і мікроРНК (miRNA)).

Ще у 70-х рр. минулого століття Барбара МакКлінток, спостерігаючи за швидкою, прямою індукцією нових спадкових станів за зовнішніх і внутрішніх (онтогенетичних) впливів, писала: «Я вважаю, що немає підстав ставити під сумнів наявність внутрішніх систем, здатних реструктурувати геном. Наразі необхідно вивчити ці системи і визначити, чому багато з них є неактивними, залишаються такими впродовж тривалого періоду часу і запускаються у дію лише формами стресу, наслідки якого варіюють залежно від природи виклику, з яким потрібно впоратися» (McClintock, 1978). Виступаючи з нобелівською лекцією, вона закликала біологів «визначити ступінь знань клітини про саму себе і як вона використовує це знання у «розумний» (thoughtful) спосіб у разі необхідності» (McClintock, 1984).

За часи, що минули, наше розуміння однієї з найзагадковіших проблем генетики — проблеми

пластичності геному, розуміння динамічної поведінки геному, епігеному, ядра і самої клітини значно поглибилося, і ми наближаємося до початку визначення механізмів, за допомогою яких клітина й організм використовують «своє знання у розумний спосіб у разі потреби».

Початок XXI століття відзначився тим, що молекулярна клітинна біологія встановила наявність компактної структури інформаційно-процесингових мереж, що використовують геном як систему інтерактивної пам'яті, а не просто як програму розвитку організму. Сиквенування геному показало важливість активності мобільної ДНК і основних процесів реструктурування геному протягом еволюції: перетасування екзонів, зміни у *cis*-регуляторних сайтах, горизонтальне перенесення, злиття клітин, подвоєння усього геному (WGDs — whole genome doublings) тощо. Функції природної генетичної інженерії, які обумовлюють реструктурування геному, активуються численними факторами, зокрема мікробною інфекцією та міжвидовою гібридизацією, які приводять до формування алотетраплоїдів — ключового шляху еволюції рослинного світу. Відкриття у царині молекулярної генетики, сучасні гіпотези та припущення на основі новітніх даних стосовно того, як перебудови мобільної ДНК збільшують ефективність виникнення функціональних геномних «інновацій», дозволяють певною мірою об'єднати сучасні знання молекулярної основи геномних змін, основних генетичних процесів еволюції та адаптації і чинників, що активують реструктурування ДНК, із класичним цитогенетичним розумінням ролі гібридизації у дивергенції видів, а також онтогенетичної поліплоїдії у процесах адаптації.

Нещодавно ми проаналізували особливості прояву пластичності геному соматичних клітин рослин, що виявляються, перш за все, у змінах числа хромосом, кількості ДНК, її окремих фракцій, повторів і послідовностей у нормі та за впливу різних біотичних і абіотичних факторів довкілля, адаптивності геномних перетворень, що відбуваються в онтогенезі, і можливість передачі адаптивних змін, що виникли у соматичних клітинах, у статевих поколіннях (Кунах, 2011, 2011а). Упевнилися, що принцип факультативності геному, розроблений М. Голубовським і нещодавно викладений у завершено-

му і цілісному вигляді (Golubovsky, 2011), дійсно віддзеркалює загальний принцип організації життя й еволюції живого — *єдність цілого і свободи частин*. Коротко ця гіпотеза і її наслідки є такими.

Геном зберігає і передає спадкову інформацію як структурно, так і динамічно. Він представляє собою ансамбль як облігатних, так і факультативних елементів. Матричні процеси (реплікація, транскрипція і трансляція) й основні генетичні процеси (репарація, рекомбінація і сегрегація) здатні до факультативної функціональності і динамічних (епігенетичних) модифікацій. Автор пропонує розрізняти три типи спадкових змін: *мутації, варіації та епігенетичні модифікації*. Факультативність структури геному виражається у поділі клітинних ДНК і РНК на дві підсистеми: облігатні генетичні елементи (OGEs) і факультативні генетичні елементи (FGEs). До FGEs автор відносить різні типи повторюваних послідовностей, мобільні генетичні елементи (МГЕ), амплікони, вставлені вірусні і чужинні ДНК, В-хромосоми, плазміди і цитобіонти (рис. 1).

Кількість і внутрішня топографія FGEs різні у різних клітинах, тканинах та індивідах. Зміни структури і порядку OGEs відповідають класичним мутаціям. Для різних змін кількості чи клітинної/тканинної топографії FGEs автор вважає слушним застосовувати термін «варіації». Мутації і варіації значно відрізняються за характером свого розповсюдження. Варіації можуть траплятися одночасно у багатьох клітинах/індивідах й індукуються немутагенними чинниками. Спонтанні спадкові зміни в природі зазвичай виникають у системі *ДОВКІЛЛЯ* — *FGEs* — *OGEs* двохетапним шляхом. Першими на дію внутрішніх і зовнішніх умов реагують FGEs. Потім їх активація індукує генні/хромосомні мутації. Як варіації, так і епігенетичні зміни (епіваріації та епімутації) можуть мати менделівські властивості, іноді нагадуючи успадкування набутих ознак (Golubovsky, 2011).

Останнім часом накопичується все більше даних про те, що поряд з іншими механізмами перебудов, що забезпечують адаптивність і еволюцію рослин, важливу роль відіграють транспозиції мобільних генетичних елементів (МГЕ).

МГЕ (транспозони) були відкриті у кінці 40-х рр. XX ст., проте знадобилося півстоліття,

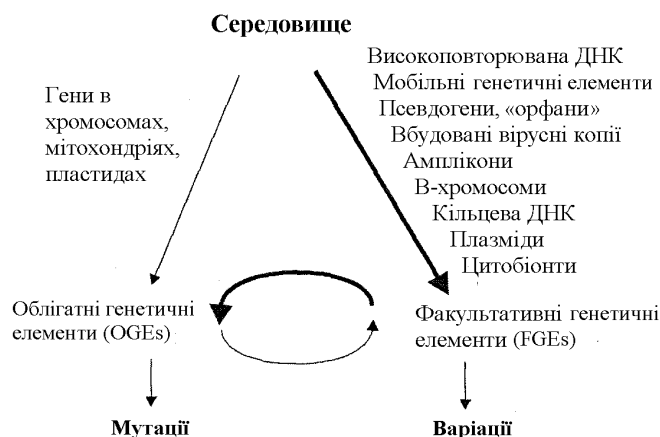


Рис. 1. Облігатні (OGEs) і факультативні (FGEs) генетичні елементи та два типи спадкових змін — мутації і варіації. Стрілки вказують на зв'язки, а товщина стрілок — на інтенсивність їх сили (intensity of their forces) (за: Golubovsky, 2011, з доповненнями)

щоб зрозуміти механізми їх дії і біологічне значення. Спочатку вони вважалися непотрібними, «смітчевою» ДНК (junk DNA), а нині виявилися головними «діючими гравцями» адаптації і еволюції. Наразі практично щодня у світовій науковій літературі з'являються все нові й нові докази цього (див., наприклад: Fedoroff, 2011, 2012; Plant Transposons., 2013; Ewing et al., 2013).

Зокрема, у більшості вищих рослин МГЕ складають понад половину (до 90% у деяких злаків) ядерного геному. Очевидно, у багатьох випадках у рослин саме МГЕ є основою тієї частини геному, яку М. Голубовський назвав факультативними генетичними елементами (FGEs). Вони є внутрішньогеномними біохімічними системами перебудов ДНК, що лежать в основі значної кількості генетичних змін, виконують ключову роль у природній генетичній інженерії. МГЕ поєднують у собі здатність до переміщення, захоплення та експорту послідовностей, до ектопічної рекомбінації між гомологічними послідовностями і ще до великого переліку різних явищ, розглянутих, наприклад, у монографії (Колотова и др., 2004) і огляді (Юрченко, 2011).

Проте, за винятком цитованої монографії, у якій МГЕ — не головна тема, та п'яти-шести оглядових статей, ні монографічна, ні навчальна література, в якій на сучасному рівні було б спеціально розглянуто структуру мобільних елементів, роль транспозицій в еволюції геномів, а також в адаптації організмів до змінних

умов довкілля, практичні аспекти застосування транспозицій, в Україні не друкувалася. Це не сприяє як підготовці кваліфікованих кадрів, так і подальшому розвитку досліджень у багатьох галузях сучасної біології і екології, а також біотехнології рослин.

Коли я практично завершив рукопис цієї монографії, вийшла в світ чудова книга, збірник праць, яку написав колектив авторів за редакцією відомого фахівця у галузі молекулярної генетики і геноміки рослин Ніни Федорофф (Plant Transposons and Genome Dynamics in Evolution. Ed. Nina V. Fedoroff, 2013, Wiley-Blackwell, 232 p.). У книзі наведено дані ретельного аналізу поточного стану знань про чисельність, поширення і природу транспозонів і ретротранспозонів і про їх роль у формуванні й еволюції геномів рослин. Як видно із порівняння тексту згаданої книги і подальшого тексту моєї монографії, мої погляди і припущення про біологічну роль мобільних елементів переважно збігаються з поглядами і припущеннями авторів згаданої книги. Проте є й певні відміни, що стосуються головним чином оцінки внеску мобільних генетичних елементів у пластичність геному як основу адаптивності рослин (див. заключний розділ 24 цієї монографії).

Моя монографія також спрямована на узагальнення та аналітичний огляд результатів досліджень у галузі біології мобільних генетичних елементів, даних про механізми і чинники їх переміщення, особливості структури, еволюції,

біологічне значення і практичне застосування. Наведено відомості про багатолику роль МГЕ у регуляції клітинних генів і еволюції розміру, структури і пластичності геномів, у механізмах адаптивності вищих рослин як на рівні окремого організму, так і на популяційному рівні. Аналізуються дані щодо МГЕ як основного формотворного чинника, що забезпечує адаптацію до мінливих умов довкілля і в деяких випадках може приводити до «швидкого» видоутворення.

Автор розуміє, що він не міг охопити все розмаїття експериментальних даних, накопичених у цій галузі досліджень. Слід враховувати, що майже щоденно з'являються все нові й нові результати, що поглиблюють і уточнюють наші знання щодо рухливих (мобільних) елементів геному. У цій книзі автор, у міру своїх можли-

востей, намагався узагальнити наявні і доступні йому відомості і на деяких прикладах продемонструвати найхарактерніші особливості МГЕ, їх біологічну роль і практичне значення. Наскільки це вдалося — судити читачеві.

Висловлюю глибоку вдячність моїм учням і колегам, перш за все співробітникам відділу генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, особливо молодшому науковому співробітнику В. І. Адоніну, науковому співробітнику Л. П. Можилевській та старшому науковому співробітнику кандидатів біол. наук Н. Ю. Мирюті, які допомогли в оформленні і підготовці тексту та ілюстративного матеріалу, сприяли тому, щоб ця книга вийшла у світ саме такою.

INTRODUCTION, *or something about genome plasticity as a basis for plant adaptability*

Higher plants being settled organisms evolved powerful, effective and sometimes specific mechanisms of adaptation to varying environments, in particular, potent protective mechanisms from the effect of extreme (stress) factors. Mechanisms of stress adaptation operate both at individual and populational level.

Studies on molecular mechanisms of adaptation at individual level suggested that these responses were preferentially mediated by the epigenetic systems to be a part of relay race from fixation of «sensation» in environmental changes to alteration of gene expression. Ability of the epigenetic systems to change promptly and efficiently while keeping the potential of stable «memory» for many cell generations may explain the flexibility of plant responses to environmental conditions. Dependently on living conditions product of genotype realization, phenotype, may vary. For example, one of the *Ficus* species inhabiting forests is represented by lianas while those found in open space vegetate as trees. Or take it a classic example of a plant arrowhead, *Sagittaria* L., forming a variety of different shapes of leaves: underwater (filamentous), continuous (cordate) and above-water (sagittal). These and many other data suggest that plant epigenetic systems are complex and contain a number of unique elements, lacking in other eukaryotes.

The basis for the presently known cellular and molecular mechanisms of plant protection against stress factors, adaptability and homeostatic nature at the level of the individual organism is, in our opinion, a fundamental phenomenon of high plasticity of the genome of somatic cells, its so-called «dynamicity», which is clearly manifested in ontogenesis. Plant genome plasticity results in totipotency (switching of morphogenetic programs, for example, with view to restore the damaged organs or body as a whole) and regulated (adaptive) genome variation during ontogenesis (including genotrophs occurrence) as well as high incidence, at first sight, of undirected genome changes that go beyond the norm of reaction genotype (stress influences).

Molecular mechanisms of plasticity in the organization of the genome that varies depending on the

needs of the cell and the conditions of its functioning and, especially, the deviations caused by unpredictable stress conditions that allow to avoid effectively cell death are detailed in several books and reviews (Kolotova et al., 2004; Patrushev, Mynkevych, 2007; Yablonka, Lamb, 2008; Yurchenko et al., 2011; Arnold-Schmitt, 2004; Grant-Downton, Dickinson, 2005, 2006; Mittler et al., 2006, etc.). However, in these works virtually there is no analysis of genomic changes, including quantitative changes of DNA and chromosomal alterations that play no less important role than the others, well-known and frequently described «classic» components of plant epigenetic system, namely, the so-called «three pillars» of epigenetics:

- DNA methylation (of cytosine and adenine residues);
- chromatin modifications (methylation and acetylation of histone proteins and their post-translation modifications);
- RNA world (first of all both types of small RNAs, small interfering RNAs (siRNA) and microRNAs (miRNAs)).

Back in the 70s of last century, Barbara McClintock, observing the fast, direct induction of new hereditary states upon internal and external (ontogenetic) effects wrote: «I believe there is little reason to question the presence of innate systems that are able to restructure a genome. It is now necessary to learn of these systems and to determine why many of them are quiescent and remain so over very long periods of time only to be triggered into action by forms of stress, the consequences of which vary according to the nature of the challenge to be met» (McClintock, 1978). Speaking from his Nobel Prize lecture, she urged biologists «to determine the extent of knowledge the cell has of itself, and how it utilizes this knowledge in a «thoughtful» manner when challenged» (McClintock, 1984).

For the times that have passed, our understanding of one of the most enigmatic problems of genetics — genome plasticity problem, understanding of the dynamic behavior of the genome, epigenome, the nucleus and the cell itself is much deeper and we are approaching the beginning of the insight into

the mechanisms by which cells and organisms use their knowledge «in a thoughtful manner when challenged».

Beginning of the XXI century was marked by the fact that molecular cell biology established the presence of compact structure of information-processing networks using the genome as a system of interactive memory but not just as a program of organism development. Genome sequencing demonstrated the importance of mobile DNA activity and major events of the genome restructuring throughout evolution: exon reshuffling, changes in *cis*-regulatory sites, horizontal transfer, cell fusion, whole genome doublings (WGDs) etc. Functions of natural genetic engineering that lead to the genome restructuring are activated by numerous factors, including microbial infection and interspecies hybridization, which result in allotetraploid formation, a key pathway of plant world evolution. Discoveries in molecular genetics area, current hypotheses and suggestions based on the newest findings concerning the way the mobile DNA rearrangements increase the efficiency of functioning genome «innovations» appearance, allow to some extent combine modern knowledge of the molecular basis for genome changes, main genetic events of evolution and adaptation and factors that activate DNA restructuring with classical cytogenetic understanding of the role of hybridization in species divergence as well as developmental polyploidy in the process of adaptation.

Recently we have analyzed the details of plasticity manifestations in the genome of somatic plant cells that are revealed first of all in changes of chromosome number, DNA amount, its individual fractions, repeats and sequences in norm and under the influence of various biotic and abiotic environmental factors, adaptability of genome reformations to occur in development and possibilities for transmission of adaptive changes arising in somatic cells to germ line generations (Kunakh, 2011, 2011a). We ascertained that genome facultativeness principle in the hereditary system developed by M. Golubovsky and recently stated in completed and integral form (Golubovsky, 2011) really reflects the general principle of life organization and evolution of living — *the unity of the whole and freedom of the parts*. In brief, this hypothesis and its consequences are as follows.

The genome maintains and transfers hereditary information both structurally and dynamically. It

represents an ensemble of both obligate and facultative elements. Template processes (replication, transcription and translation) and basic genetic processes (reparation, recombination and segregation) are capable of functional facultativeness and dynamic (epigenetic) modifications. Author proposes to discriminate among three kinds of heritable changes: *mutations, variations and epigenetic modifications*. Structural genome facultativeness is expressed as a subdivision of cell DNA and RNA elements into two subsystems: obligate genetic elements (OGEs) and facultative genetic elements (FGEs). To FGEs author includes various kinds of repeated sequences, mobile elements (MEs), amplicons, inserted viral and foreign DNA, B-chromosomes, plasmids and cytotobionts (Fig. 1).

The abundance and intracellular topography of FGEs are different in different cells, tissues and individuals. Changes in structure and order of OGEs correspond to classical mutations. For different changes in number or cell/tissue topography of FGEs author believes reasonable to use the term variations. Mutations and variations significantly differ in the pattern of their occurrence. Variations may occur simultaneously in many cells/individuals and are induced by non-mutagenic factors. Spontaneous hereditary changes in nature usually occur in the system ENVIRONMENT — FGEs — OGEs via a two-stage pathway. FGEs are first to respond to both internal and external environmental challenges. Then their activation induces gene/chromosomal mutations. Both variations and epigenetic changes (epivariations and epimutations) may have non-Mendelian features, sometimes reminding the phenomenon of inheritance of acquired characteristics (Golubovsky, 2011).

Lately, ever more accumulate findings that alongside with other mechanisms of rearrangements that ensure adaptability and evolution of plants, important role play transpositions of mobile genetic elements (MGEs or MEs).

MEs (transposons) were discovered in the late 40th of XX century, but it took half a century to understand the mechanisms of their effect and biological implication. At first they were treated as unnecessary, «junk» DNA, while nowadays these proved to be the major «acting players» of adaptation and evolution. Currently, practically every day the world scientific literature demonstrates ever new

evidence of this (see: Fedoroff, 2011, 2012; Plant Transposons., 2013; Ewing et al., 2013).

Specifically, in most of higher plants MEs make up over half (up to 90% in some cereals) of nuclear genome. Obviously, in many cases in plants namely MGEs are the basis of that part of the genome, which were termed Golubovsky by facultative genetic elements (FGEs). They present intragenomic biochemical systems of DNA rearrangements, underlying considerable number of genetic changes, play a key role in natural genetic engineering. MEs combine in themselves the ability to transposition, capture and export of sequences, to ectopic recombination between homologous sequences and also to a great range of different phenomena, considered, for example, in monograph (Kolotova et al., 2004) and review (Yurchenko, 2011).

However, except for cited monograph, in which MEs is not main topic, and five-six reviews, no monograph, no educational literature, in which at modern level would specially considered the structure of mobile elements, role of transpositions in genome evolution as well as in organism adaptation to varying environment, practical aspects of transposition application in Ukraine were not published. This doesn't promote both the training of skilled personnel, and the further development of studies in many areas of modern biology and ecology as well as plant biotechnology.

When I almost finished manuscript of this monograph, it was published a remarkable book, a collection of papers written by staff writers, edited by renowned specialist in the field of molecular genetics and genomics of plants Nina Fedoroff. (See original: Plant Transposons and Genome Dynamics in Evolution. Ed. Nina V. Fedoroff, 2013, Wiley-Blackwell, 232 p.). The book provides a thorough data analysis of the current state of knowledge about the number, distribution and nature of the transposons and retrotransposons and their role in shaping the evolution of plant genomes. As can be seen from the comparison of the text of that book and the

subsequent text of my monograph, my views and assumptions about the biological role of mobile elements mainly reflect the views and assumptions of the authors of that book. However, there are some differences, mainly concerning estimation of the contribution of mobile genetic elements in the genome plasticity as a basis adaptability of plants (see final section 24 of this monograph).

This monograph is aimed at summarizing and analytical reviewing the results of research in the area of mobile genetic element biology, data on mechanisms and factors underlying their transposition, details of structure, evolution, biological implication and practical application. Evidence for multifaceted role of MGEs in regulation of the cellular genes and in evolution of the size, structure and plasticity of genomes, in mechanisms of higher plant adaptability both at individual organism and population levels have been presented. Data relative to MGE as a major form-building agent which ensures adaptation to changing environments that occasionally may result in «rapid» speciation were analyzed.

Author is conscious that he cannot comprehend all the diversity of the experimental data accumulated in this research area. One should take into account that almost every day appear ever new results deepening and refining our knowledge concerning mobile genome elements. In this book author as far as he could tried to generalize available and accessible to him information and some examples has demonstrated most characteristic features of MGEs, their biological role and practical value. How much it was succeeded will judge the reader.

I express my deep gratitude to my students and colleagues, first of all to the staff of Cell Population Genetics Department of the Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, especially junior researcher V.I. Adonin, researcher L.P. Mozhylevska and Senior Fellow PhD N.Yu. Myryuta which helped in the design and preparation of text and illustrations, contributed to this book was published just like that.

Частина I

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МОБІЛЬНИХ (РУХОМИХ) ЕЛЕМЕНТІВ ГЕНОМУ

Розділ 1. КОРОТКА ІСТОРІЯ ВИВЧЕННЯ НЕСТАБІЛЬНОСТІ ГЕНІВ І ВІДКРИТТЯ МОБІЛЬНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ЕЛЕМЕНТІВ

І сказав Бог: нехай вирощує земля зелень, траву, що сіє насіння за [родом і за подобою своєю, і] дерево плідне, що приносить за родом своїм плід, у якому насіння його на землі. І стало так.

Буття 1:11

І взяв Яків свіже пруття із тополі, мигдалю та явора, і повирізував на ньому [Яків] білі смуги, знявши до білизни кору, що на прутті, і поклав пруття з нарізкою перед худобою у водопійних коритах, куди худоба приходила пити і де, приходячи пити, зачинала перед пруттям. І зачинала худоба перед пруттям, і народжувалася худоба строката, і з цятками, і з плямами.

Буття 30:37–39

Відкриття мобільних генетичних елементів (МГЕ) радикально змінило лик сучасної генетики. Спочатку головні факти, що привели до відкриття МГЕ, здавалися не пов'язаними один з одним, оскільки їх було отримано у різних галузях генетики. Лише наприкінці 1970-х — на початку 1980-х рр. накопичені дані привели до перегляду добре підтверджених і тому, здавалося б, непорушних положень класичної генетики. Найфундаментальнішою роботою, в якій було узагальнено новий погляд на геном, на явища стабільності/мінливості геному, є добре відома монографія «Непостоянство генома» (Хесин, 1984). Наслідки цього перегляду були значними за масштабами для всієї біології, особливо для еволюційної теорії (Pollard, 1987; Shapiro, 1992, 2011; Transposable elements, 1996; Голубовський, 2000, 2011; див. також журнал «Mobile DNA», 2010–2012).

М. Д. Голубовський (2011) виділяє п'ять відносно незалежних напрямів, що привели до народження «мобільної» генетики або уявлення про динамічний геном:

- цитогенетичні дослідження нестабільності генів і хромосом у кукурудзи, розпочаті

Барбарою МакКлінток наприкінці 1940-х і узагальнені у 1950-х рр. у вигляді стрункої концепції мобільних елементів, здатних регулювати стан генів і викликати хромосомні мутації (McClintock, 1950, 1951, 1956, 1961, 1965, 1984);

- дослідження плазмід та епісом у бактерій і відкриття А. Львовим здатності бактеріофага лямбда вбудовуватися у геном бактерії кишкової палички *E. coli* у стані профага (Lwoff, 1953);
- відкриття у 1968–1976 рр. у бактерій особливого класу мутацій, що викликаються вставками певних інсерційних елементів, які населяють геном бактерій і причетні до горизонтального міжвидового перенесення генів у бактерій;
- дослідження нестабільних генів і відкриття інсерційного мутагенезу у природних популяціях дрозофіли;
- виділення і молекулярно-цитогенетичний аналіз мобільних диспергованих фракцій ДНК (МГЕ) у хромосомах дрозофіли (Rubin et al., 1981; Tchurikov et al., 1981).

1.1. Відкриття мобільних генетичних елементів

Гуго де Фріз, найвірогідніше, був першим ученим-біологом, який на зламі ХІХ–ХХ ст. чітко показав наявність у природі особливого

нестабільного стану спадкових факторів. Він дійшов такого висновку, вивчаючи явище нестабільності у різних рослин, зокрема у ротиків

Antirrhinum majus, у яких часто спостерігається мозаїчність у забарвленні квітки. Результати цих досліджень узагальнено у циклі лекцій, прочитаних у 1904 р. в Каліфорнійському університеті (Берклі, США), які було видано окремою книгою (De Vries Hugo, 1906). В одній з лекцій (розділів книги) під назвою «Ever-spotting varieties» («Варіанти, що постійно виникають») привернуто особливу увагу до різкої особливості вияву факторів нестабільності у вищих організмів: «Here the variability is a thing absolute constancy, while the constancy consist of a eternal change!» («Мозаїцизм є сталим, і в той же час ця сталість включає вічне варіювання прояву!») (De Vries, 1906, р. 311). А через майже 90 років у ротиків було знайдено мобільний генетичний елемент *Tam*, який відповідає за подібний мозаїцизм забарвлення квітки (Saedler, Starlinger, 1992). Встановлено, що цей мобільний (інсерційний) елемент контролює роботу локусу-хазяїна на рівні транскрипції і ця регуляція є дуже чутливою до коливань зовнішніх умов і генетичного середовища, включаючи тканинну й органоспецифічність.

У 1920-х рр. головним модельним об'єктом у генетиці рослин стала кукурудза, в якій мозаїцизм забарвлення зерна — досить поширене явище. Генетичний аналіз мозаїчності забарв-

лення рослин і зерен, що містять ген пурпурового забарвлення перикарпа *P*, розпочав відомий американський дослідник Ролін Адамс Емерсон (Emerson, 1873–1947). Серед невеликої групи його учнів двоє стали нобелівськими лауреатами: Дж. Бідл, автор концепції «один ген — один фермент», і Б. МакКлінток, яка відкрила мобільні генетичні елементи. Згадуючи свого вчителя, Дж. Бідл писав: «Внесок Емерсона у генетику був багатостороннім. Він розпочав працювати ще в той час, коли ця наука була слабкою і викликала багато сумнівів... Його статті з генетики забарвлення алейрона у кукурудзи — видатний зразок експериментального дослідження, глибоко обґрунтовані і ясні за написанням... Його роботи з мозаїцизму у забарвленні перикарпа привели до концепції нестабільних генів і представляють собою розділ в історії генетики» (цит. за: Голубовський, 2011).

Р.А. Емерсон у 1914 р. першим провів генетичний аналіз мозаїчного нестабільного проявлення гена *P*, який контролює забарвлення оболонки зерна (перикарпа) у кукурудзи. На світлому тлі з'являлися червоні плями на зернівках, викликані, як тепер уже відомо, вирізанням мобільного елемента, що інгібує проявлення локусу (рис. 1.1). Емерсон зробив висновок, що існує певний фактор мозаїцизму, «різновид-

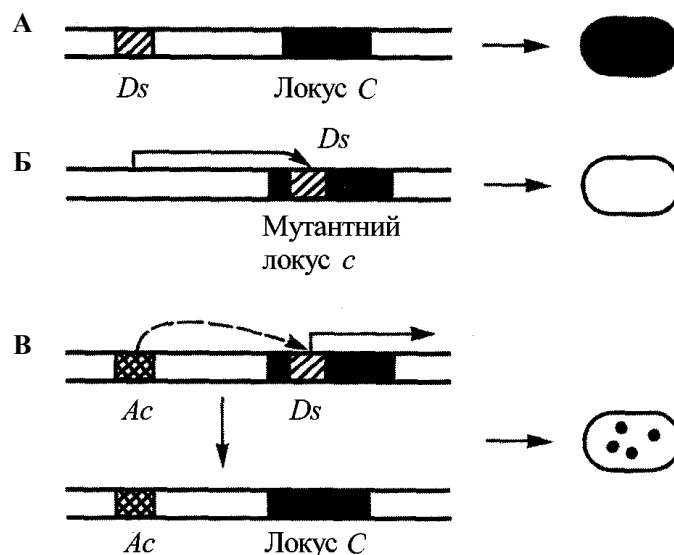


Рис. 1.1. Схема взаємодії активатора (*Ac*) і дисоціатора (*Ds*), що інактивував локус *C* у кукурудзи, який пояснює результати, отримані Р. Емерсоном, а пізніше — і Б. МакКлінток:

А — *Ds* віддалений від локусу *C*; **Б** — *Ds* перемістився у локус *C* й інактивував його (виявляється як рецесивна алель *c*); **В** — *Ac* стимулює переміщення *Ds*, внаслідок чого він залишає локус *C*, що виражається в реверсіях *c* → *C* у процесі мітичних поділів (поява зафарбованих плям на зернівках кукурудзи) (за: Инге-Вечтомов, 2010)

ність тимчасового рецесивного інгібітора, який на ранньому чи пізньому етапі онтогенезу втрачає свою здатність інгібувати... Причини такої зміни фактора лежать нині поза рамками розумного обговорення» (Emerson, 1917; цит. за: Голубовський, 2011).

Подібного висновку дійшов і інший видатний американський дослідник — Милислав Демерец (1895–1966), югослав за походженням. Йому належать класичні роботи у галузі генної нестабільності, ефекту положення у дрозофілі і

генетики мікроорганізмів. Він розпочинав свої дослідження з аналізу генетичної нестабільності у ротиків *Antirrhinum majus*. Вивчивши властивості двох нестабільних мутацій, які впливали на забарвлення квітки, Демерец припустив, що розмір мозаїчної плями на рослині залежить від стадії онтогенезу, на якій мутує нестабільний ген. Один з вивчених ним генів мутував рівномірно на всіх стадіях розвитку, а інший — лише на пізній ембріональній стадії.

1.2. Гіпотеза Б. МакКлінток

Найважливіший крок у дослідженні нестабільності геному було зроблено ученицею Р. А. Емерсона Барбарою МакКлінток (1902–1992). Вона висловила гіпотезу про існування особливого класу генетичних елементів, здатних переміщуватися по геному, вбудовуватися в різні локуси, вирізатися звідти і таким чином регулювати темп мутування гена і його мутаційний стан. По суті, всі основні генетичні властивості мобільних генетичних елементів, що були знайдені пізніше, через 25–30 років, у різних видів і досліджені на рівні ДНК, вже були встановлені Б. МакКлінток. Особливість її роботи полягала у тісному об'єднанні генетичного і цитогенетичного підходів, що дозволило безпосередньо бачити у мікроскопі те, що передбачалося на основі даних генетичного аналізу.

В однієї з ліній кукурудзи у мейозі МакКлінток спостерігала регулярні розриви і возз'єднання хромосом у ділянці короткого плеча хромосоми 9. На дистальному кінці цієї хромосоми розташовувався вузлик гетерохроматину, неподалік від нього у напрямку центромери локалізувалися рецесивні мутації генів. Зазвичай розрив хромосоми відбувався у певному місці, позначеному як *Ds* (від dissociation — розрив), між геном *Ds* і центромерою.

У деяких ліній Б. МакКлінток виявила переміщення точки розриву, і в цьому місці виникали нестабільні мутації. Коли ж із нестабільного гена фактор *Ds* переміщувався в іншу ділянку, ген знову ставав відносно стабільним. Частота розривів, викликаних фактором *Ds*, різко зростала під впливом домінантного фактора *Ac* (activator). Таким чином, у системі *Ac — Ds* фак-

тор *Ds* є контролюючим, а *Ac* — регуляторним елементом. Контролюючий елемент *Ds* мав такі властивості:

- контроль активності гена-хазяїна, так що за вбудовування *Ds* ген може або частково, або ж повністю інактивуватися;
- здатність до транспозицій;
- здатність викликати розриви у сайтах вбудовування;
- здатність змінювати свій стан.

Проте всі ці властивості виявлялися лише у присутності *Ac*.

На прочатку 1980-х рр., коли розпочалася ера молекулярних досліджень на рослинах, висновок МакКлінток було повністю підтверджено. Дійсно, нестабільні мутації, викликані факторами *Ac — Ds*, містили вставку. Повнорозмірний мобільний *Ac*-елемент мав довжину близько 4,5 т.п.н., а *Ds* виявився дефектним варіантом *Ac*, який, будучи вбудованим у даний локус, сам по собі не здатен переміщуватися, але активується за присутності у геномі повної копії *Ac*, яка містить транспозазу — фермент транспозиції. Активація приводить до вирізання *Ds* і появи забарвлених плям (див. рис. 1.1, а також наступний розділ).

Таким чином, роботи Б. МакКлінток привели до появи у генетиці трьох нових ідей:

- мутантна подія, приурочена до певного локусу чи гена, може бути пов'язана не зі зміною самого гена, а з певним контролюючим елементом;
- цей контролюючий елемент є мобільним, він здатен вбудовуватися в різні локуси, причому цей мобільний контролюючий елемент не один, є група незалежних елементів;

- мобільний елемент може регулювати характер прояву гена залежно від онтогенезу і тканинної (органної) специфічності.

Саме тому МакКлінток назвала ці елементи не лише мобільними, а й контролюючими.

Цей висновок було зроблено у 1950-ті рр., коли нічого не знали ні про транскрипцію і трансляцію, ні про гени-регулятори, які були пізніше відкриті Жакобом і Моно.

Повідомлення про першу серію дослідів було надруковано в працях Американської академії наук (1950), а потім у детальнішому вигляді представлено на авторитетному форумі

генетиків у Колд Спрінг Харборі (McClintock, 1951). Проте зроблені висновки здавалися надто парадоксальними, чимось неправдоподібним. МакКлінток згадує, що доповідь 1951 р. не зрозуміли, а гіпотезу — зустріли вороже. Згідно з канонічною теорією Т. Моргана гени повинні мати строгу локалізацію, а існування цілого класу мобільних елементів порушувало всі канони. За словами одного з членів Нобелівського комітету, у 1951 р. «оцінити цю гіпотезу могли не більше п'яти генетиків у всьому світі, а сама Б. МакКлінток призналася, що «мене вважали божевільною» (цит. за: Голубовский, 2011).

1.3. Концепція профага, епісоми і плазмід

За дивним збігом, практично одночасно у 1953 р. було зроблено ще два відкриття, що визначили обличчя сучасної молекулярної і загальної генетики: відкриття подвійної спіралі ДНК Дж. Уотсоном і Ф. Кріком та дослідження А. Львовим лізогенії у бактерій і запропонована ним концепція профага.

Андре Львов установив, що у процесі взаємодії бактеріофаг лямбда — бактерія фаг здатен вбудовуватися у хромосому бактерії і передаватися у ряді поколінь як її генетичний елемент. Бактерію, що включила геном фага у свій геном, Львов назвав лізогенною, а вбудований бактеріофаг — профагом. Фаги, що здатні переходити у латентний інтегрований у геном бактерії стан, називають помірними. Вбудовавши фаг у свій геном, бактерія набуває імунітет до зараження. У деяких випадках стан лізогенії спричинює набуття клітинних ознак, побічних щодо інфекції, наприклад зміна вигляду колоній чи зміна поверхневих антигенів бактеріальної клітини (т. зв. конверсія штамів). Велич відкриття Андре Львова стає більш чіткою, якщо його розглядати на тлі подій, що йому передували.

Уже на початку 1920-х рр. були відомі штами бактерій, здатні нести фаги у прихованому стані і викликати лізис у чутливих штамів. Проте автор відкриття бактеріофагів Фелікс Д'Еррель (1873–1949) розглядав фаг чи вірус як облигатно летальний для клітини агент. Він уважав, що культури лізогенних бактерій просто забруднені фагом і від нього можливо позбутися шляхом очистки.

Подібної думки дотримувалася і група дослідників, учнів та послідовників класика генетики Макса Дельбрюка (група генетики фагів Каліфорнійського технологічного інституту). Тут працювали з т. зв. Т-фагами, які не здатні вбудовуватися в бактерію і викликати стан лізогенії. Авторитет школи М. Дельбрюка був настільки високим, що явищем лізогенії довго ніхто детально не займався.

А. Львов після Другої світової війни відновив у Пастерівському інституті дослідження лізогенних штамів бактерії. Він стежив під мікроскопом за долею окремих клітин, тоді як у групі Дельбрюка основним був статистичний підхід, на рівні колоній бактерій. У 1953 р. А. Львов опублікував струнку теорію лізогенії, яка повністю зберегла своє значення донині (цит. за: Голубовский, 2011).

Трансформацію, трансдукцію і лізогенію можливо розглядати як три різних способи «параспадкового» набуття нових ознак. Термін «параспадкові» запропоновано у 1925 р. Ежені Вольманом (Egenie Wollman) під час роботи у Пастерівському інституті під керівництвом І. Мечнікова. Ще у 1920-ті рр. Е. Вольман установив, що злиття летального фага і бактерії хазяїна як наслідок може давати клони бактерій, що містять фаг, але не гинуть, переходячи у лізогенний стан. У 1928 р. він дійшов висновку, що «обидва поняття — спадковість і інфекція, здавалося б, настільки різні й у певному сенсі навіть не сумісні... за певних умов майже збігаються» (цит. за: Голубовский, 2011, переклад

власний — В.К.). Досліди Е. Вольмана продовжив його син Ілля Вольман (Elie Wollman, 1917–2008), який виявив, що позахромосомний фактор F відповідає за кон'югацію (стать) бактерій.

І. Вольман і Ф. Жакоб установили, що чоловічий статевий тип бактерії визначається позахромосомним фактором F, який може вбудовуватися у хромосому бактерії і на три порядки (у 1000 разів!) посилювати здатність до хромосомної рекомбінації цієї бактерії з іншими бактеріями. Поведінка бактеріофага лямбда багато в чому нагадувала поведінку статевого фактора бактерій. У 1958 р. Ф. Жакоб та І. Вольман увели термін «епісома» для позначення генетичних елементів, які можуть існувати у клітинах у двох взаємовиключних станах — автономному та інтегрованому. До епісом вони зарахували помірні бактеріофаги, статевий фактор бактерій і фактори коліциногенності, за допомогою яких одні штами бактерій убивають інші.

У 1952 р. Джошуа Ледерберг увів поняття «плазмід» і запропонував позначати всі поза ядерні генетичні елементи, здатні до автономної реплікації, цим терміном. Погляд на плазмиди як на симбіонти та альтернативний погляд на них як на складову частину генотипу, згідно з Ледербергом, залежить від того, наскільки широко дослідник трактує межі генотипу і спадкової системи організму.

Спектр можливих перетворень і взаємопереходів генетичних елементів було передбачено у книзі Ф. Жакоба та І. Вольмана (1962, с. 418): «Ми доходимо висновку, що внаслідок певних генетичних подій можуть виникати всі проміжні категорії між вірусами (структури екзогенні, інфекційні та позаядерні, тобто ті, що належать до класу плазмід) і нормальними генетичними детермінантами клітини (структури ендогенні, неінфекційні та інтегровані). Отже, епісоми перекидають своєрідний міст між спадковістю й інфекцією, між клітинною патологією і фізіологією клітини, між ядерною і цитоплазматичною спадковістю... Епісомні елементи можуть бути або присутні в клітині, або відсутні, перебувати у хромосомі або в цитоплазмі, бути ендогенними або екзогенними, патогенними або нешкідливими. Таким чином, за своїми властивостями епісоми складають категорію генетичних еле-

ментів, що наближаються одночасно до нормальних структур клітини і до внутрішньоклітинних паразитів, до хромосомних компонентів і до цитоплазматичних елементів» (переклад власний — В.К.).

Автори передбачали відкриття епісомоподібних елементів у евкаріотів, указуючи як на їх аналог на «контролюючі елементи», відкриті Б. МакКлінток. Обговорюючи взаємодію епісом з геномом клітин хазяїна, Ф. Жакоб та І. Вольман дійшли висновку, що спадковість та інфекція перестають бути несумісними.

Цей висновок підтверджується встановленими даними у подальших дослідженнях поведінки бактеріофага лямбда у системі фаг — бактерія (Фаг-лямбда, 1975):

- стан вірулентності, інфекційності — бактеріофаг проникає у клітину і веде до її загибелі, лізису, так що з однієї бактерії утворюється 100–200 фагових часточок;
- стан профага — фаг інтегрований у хромосому, частина його генів є активною і блокує власне розмноження;
- облігатно-вірулентний стан або втрата лізогенного стану при ушкодженні або делеції у локусі *cI* у фага;
- облігатно-інтегрований у хромосому хазяїна стан за делеції локусу, що контролює вирізання фага із ДНК хазяїна;
- стан плазмиди — за деяких делецій фаг втрачає здатність утворювати білки оболонки, але зберігає властивість реплікації.

В епоху початку генно-інженерних робіт за використання геному бактеріофага лямбда створено значну кількість й інших унікальних конструкцій:

- косміди — кінцеві фрагменти фага (*cos*-сайти), що забезпечують упаковку в головку фага всієї молекули із вбудованим посередині фрагментом чужинної ДНК і ділянкою реплікації, взятої із бактеріальної плазмиди. Така косміда за наявності цілого фага-помічника здатна проникати у клітину і реплікуватися в ній. У косміди нині упаковано весь розрізаний на фрагменти геном деяких евкаріотів, зокрема дрозофіли, а також значна частина геному людини;
- химерний інфекційний агент, активний стосовно про- і евкаріотів: ДНК вірусу поліоми

введено в ДНК фага лямбда — виник вірус-химера, здатний викликати лізис бактерій і рак у мишей.

Іще в середині 1940-х рр. К. Дарлінгтон висловив думку про складність точного вибору між плазмагеном і вірусом, подальші ж дослідження підтвердили це припущення. Зокрема, як уже згадувалося, властивість чоловічих штамів бактерій передавати частину своєї ДНК і своїх генів жіночим реципієнтним штамам залежить від факультативної F-плазмиди. Вона здатна до самовідтворення або в автономному стані, або ж будучи інтегрованою у хромосому бактерії. Топографія плазмиди у клітині-хазяїні різко змінює її плодючість і склад генів, що переносяться за кон'югації.

Коли F-плазміда вбудована у геном бактерії, то здатність клітини-хазяїна передавати свою ДНК жіночим донорам зростає у десятки разів, а сама рекомбінація відбувається зовсім іншим способом. F-плазміда здатна включатися у хромосому клітини-хазяїна у різних її ділянках і в різній орієнтації. У результаті виникає велике розмаїття штамів з різними початковою точкою і напрямками перенесення. Виключення фактора F із бактеріальної хромосоми приводить до утворення різних автономних похідних плазмід, які несуть різні за довжиною фрагменти клітини-

хазяїна, що були сусідами місця інтеграції цієї плазмиди. Деякі похідні варіанти F-плазмиди можуть містити у своєму складі до четвертої частини всього геному бактерії (Стент, Кэлинджер, 1981).

Бактеріофаг лямбда виявився подібним до плазмиди за здатністю існувати й автономно, й у вбудованому у геном стані. Разом з тим, відомі й інші варіанти симбіозу. Фаг P1 не інтегрується у хромосому бактерії, проте стабільно співіснує у клітинах у вигляді низькокопійної плазмиди. Стабільність передачі у ряді поколінь фага P1 залежить від упорядкованої сегрегації по дочірніх клітинах за поділу бактерії. Фаг P1 нагадує широкий клас автономних R-плазмід або плазмід резистентності, які відтворюються автономно і несуть у складі своєї ДНК гени стійкості до різних антибіотиків.

З еволюційної точки зору бактеріофаги розглядають як особливий клас плазмід, що накопичили спадкову інформацію, необхідну для синтезу білкової соми — головки фага, в яку включається генетичний матеріал. Вважається, що еволюція фагової ДНК привела до утворення інфекційних плазмід, які у шатах фагових часточок здатні переходити поза цитоплазмою від одного хазяїна до іншого (Стент, Кэлинджер, 1981).

1.4. Відкриття інсерційних елементів у прокариотів

Мутації, викликані появою мобільних генетичних елементів, у мікроорганізмів відкрито випадково. Для більшості спонтанних мутацій, як правило, вдається знайти мутацію в іншому гені (супресор), яка пригнічує першу, і таким чином відновлюється нормальний фенотип. Проте було виявлено такі спонтанні мутації у галактозному опероні, які інактивують усі гени, що входять до складу оперона, і в той же час не здатні супресуватися, хоча самі по собі дають реверсії до дикого типу. Вивчення мутантних і нормальних оперонів методами молекулярної гібридизації та електронної мікроскопії виявило у мутантів наявність інсерційного сегмента IS (англ. IS — insertion sequences) (Shapiro, 1969; Starlinger, Seadler, 1972, 1976).

Незабаром було встановлено, що існує велика низка інсерційних елементів. Усі IS-елементи

мають спільні риси організації і спільні властивості:

- кінці IS-елементів облямовані повторюваними послідовностями;
- у місцях їх убудовування в хромосому утворюються короткі дуплікації;
- вони здатні включатися у різні локуси у будь-якій орієнтації, частково або повністю інактивуючи роботу гена-хазяїна;
- самі IS не кодують у своїй ДНК ніяких генів, окрім одного або декількох, необхідних для власного переміщення, проте вони містять знаки генетичної пунктуації, промотори і термінатори;
- деякі з IS, подібно до фактора *Ds* у кукурудзи, регулярно індують розриви хромосом поблизу локусу вбудовування;

- послідовності ІС-елементів, виділені з різних локусів, майже ідентичні;
- одні й ті самі ІС-елементи виявлено у різних видів бактерій;
- кількість таких елементів у геномі може варіювати від кількох штук до кількох сотень.

Виявлено і певні відмінності. Наприклад, розмір елементів ІС2 та ІС3 був у межах 1300–1400 п. н., а міні-елементи ІС8 та ІС7 були довшою 108 і 54 п. н. відповідно.

Результати інтенсивних досліджень показали, що ІС-елементи є звичайними елементами геному і що існує ціла ієрархія мобільних елементів. Самі ІС-елементи досить часто входять до складу мобільних елементів наступного класу — транспозонів. Транспозони на кінцях облямовані повторами або ІС-сегментами, а у середині несуть різні гени, не пов'язані безпосередньо з транспозиціями, наприклад гени стійкості до антибіотиків. Наступний крок в ієрархії мобільних елементів — це плазмиди. Вони є, по суті, транспозонами, які набувають фактор власної реплікації і тому здатні розмножуватися у клітині відносно незалежно від хромосоми хазяїна. Остання ланка у цій ієрархії — це бактеріофаги, які вже включають до свого

складу гени, необхідні для формування білкової оболонки.

М. Д. Голубовський у своєму історико-біологічному дослідженні відзначає, що на початку 1970-х рр. мало хто з молекулярних генетиків розумів, що відкриття ІС-елементів і транспозонів — це молекулярне підтвердження ідей Б. МакКлінток. Пітер Штарлінгер, один із відкривачів мобільних елементів бактерій, згадує, що ще у 1972 р. його перший огляд про інсерційні мутації привернув мало уваги. Але вже у 1976 р. на другий опублікований огляд прийшла велика кількість запитів. А за рік по тому на симпозіумі у Колд Спрінг Харборі, скликаному за ініціативи Дж. Шапіро у травні 1977 р., на доповіді щодо рухливих елементів було важко потрапити до зали! (цит. за: Голубовский, 2011).

Сам П. Штарлінгер і його колега Г. Седлер (H. Saedler) швидко зрозуміли, що вони, по суті, відкрили те, що було чверть століття тому назад передбачено Б. МакКлінток. І вони практично полишили роботу з мікроорганізмами і переключилися на молекулярно-генетичний аналіз нестабільних мутацій у кукурудзи й інших рослин. Їхні пошуки відразу стали успішними (Saedler, Starlinger, 1992).

1.5. Інсерційний мутагенез і вибухи мутацій у дрозофіли

У 1919 р. М. Демерец розпочав роботи з вивчення високомутабельних генів у кукурудзи і дрозофіли у Корнельському університеті (США) під керівництвом Р. А. Емерсона. Незабаром він виявив нестабільні мутації гена *yellow* (алель *reddish-alpha*) «маленькі крила» (*miniature*) у дрозофіли виду *D. virilis*. Частота реверсій до норми від високомутабельних алелей сягала в однієї з алелей 25 %. Ревертанти були стабільними. Демерецу вдалося виділити від вихідної нестабільної алелі *miniature* мутантні похідні, які ревертували до норми і в статевих, і у соматичних клітинах, або тільки у соматичних, або ставали стабільними. Дослідивши все можливе за допомогою генетичних методів, Демерец перейшов до вивчення інших проблем, не висловивши жодного здатного до перевірки припущення щодо механізмів відкритих ним явищ. Очоливши у 1941 р. відділ генетики Інституту Карнегі (Вашингтон) в Колд Спрінг Харборі,

Демерец відразу запросив у цей відділ Б. МакКлінток, яка пропрацювала там з 1942 р. до кінця свого життя.

Дослідження нестабільних генів у дрозофіли було відновлено лише наприкінці 1960-х рр. у роботах американського генетика Мелвіна Гріна (Green, 1967). Він виявив високомутабельну алель гена *white*, яка з частотою 1×10^{-3} давала реверсії до норми, а також мутувала до проміжних за фенотипом (колір очей) алелей. Крім того, ця алель володіла здатністю до транспозицій в інші хромосоми. М. Грін локалізував місця транспозицій і отримані результати опублікував в авторитетному американському журналі «Genetics» (Green, 1969).

Проте ця стаття помітної уваги не привернула. М. Грін пізніше згадує: «Це засмутило і здивувало мене, оскільки я думав, що явище спонтанної транспозиції гена зацікавить генетиків. Адже феномен транспозиції має очевидні

генетичні й еволюційні наслідки. Транспозиції *in vivo* доповнювали явище транспозиції контролюючих елементів МакКлінток. Транспозиції допомагали зрозуміти, як ген, локалізований в одній хромосомі одного виду дрозофіл, локалізується у негомологічних хромосомах в інших видів. Через кілька місяців після публікації праці я відвідав Б. МакКлінток в її лабораторії в Колд Спрінг Харборі. Коли я поскаржився їй на неувагу до статті про транспозиції, вона м'яко заспокоїла мене таким зауваженням: «Не хвилюйтесь, немає нічого незвичайного з Вашою статтею про транспозиції; люди просто до цього не готові. Я перестала публікувати мої результати у генетичних журналах у 1964 р., оскільки ніхто не чи-

тав, що я писала!» (Green, 1992; цит. за: Голубовский, 2011, переклад власний — В. К.).

Відомості про те, що генетична нестабільність у дрозофіли — не курйоз, було отримано у дослідженнях з генетики популяцій, а саме в роботах з гібридного дисгенезу. Цим терміном позначили дестабілізацію потомства від схрещувань самок лабораторних ліній з дикими самцями з природних популяцій. Самки першого покоління виявлялися стерильними або напівстерильними, а у потомстві гібридних самців спостерігали мутації у багатьох локусах і хромосомні перебудови. Тобто цитоплазма лабораторних ліній виявилася несумісною з хромосомами самців диких ліній. Шляхом серій насичуваль-

Таблиця 1.1

Основні віхи у вивченні та відкритті нестабільності генів, інсерційного мутагенезу і мобільних генетичних елементів (за: Голубовский, 2011)

Роки	Дослідники	Факти і гіпотези
1901	Hugo de Vries	Теорія мутацій. Гіпотеза про коливання темпу мутацій та про нестабільний стан спадкових факторів.
1914–1917	P. Emerson	Аналіз соматичної і генеративної нестабільності гена забарвлення перикарпа у кукурудзи; феноменологія без гіпотези.
1926–1941	M. Demerec	Відкриття й аналіз нестабільних генів у дрозофіли. Автономний характер і алелеспецифічність мутування в статевих і соматичних клітинах. Ідея про подібність нестабільності й ефекту положення.
1937–1961	P. Л. Берг, С. М. Гершензон	Коливання загального темпу мутування та різкі флюктуації мутабельності окремих генів у природних популяціях дрозофіл. Підтвердження ідеї де Фріза.
1950–1965	B. McClintock	Цитогенетика нестабільних мутацій у кукурудзи. Відкриття МГЕ, здатних контролювати характер експресії гена-хазяїна і викликати хромосомні мутації.
1953–1961	A. Lwoff, E. Wollman, F. Jacob	Концепція профага і відкриття ролі епісом у регуляції статі бактерій та генетичної рекомбінації.
1967–1969	M. M. Green	Поновлення генетики нестабільності у дрозофіли. Виявлення транспозиції високомутабельного гена.
1969–1976	P. Starlinger, H. Saedler, J. Shapiro	Відкриття у бактерій інсерційних елементів та їх молекулярної структури. Підтвердження гіпотези МакКлінток на рівні ДНК.
1977–1979	М. Д. Голубовский	Генаналіз серії нестабільних алелей із природних популяцій дрозофіл. Гіпотеза про інсерційну природу цих алелей та про зв'язок спалахів мутацій з інсерціями.
1977–1978	G. Rubin, Е. Ананьев, В. А. Гвоздев, Г. П. Георгиев	Відкриття родин МГЕ у дрозофіли і вивчення їх структури та транспозицій.
1981	M. Kidweli, G. Rubin, P. Bingham, W. Engels	Відкриття мобільного Р-елемента, відповідального за Р-М-систему гібридного дисгенезу.
1982	G. Rubin, A. Spradling, W. Engels	Створення контрольованої системи горизонтального перенесення генів у дрозофіли на основі плазмід з Р-елементом. Регуляція мутабельності за трансгенезу.

них схрещувань удавалося змінити генетичну конституцію цитоплазми. Виявилося, що цей феномен є досить поширеним у природі за звичайних схрещувань всередині виду, а фактори, що викликають дисгенез, розкидані по різних хромосомах. Було висловлено припущення, що цей феномен має певну подібність з транспозиціями контролюючих елементів, описаними на кукурудзі МакКлінток (Picard, 1976).

У результаті ретельно проведеного генетичного аналізу було зроблено висновок, що властивість гібридного дисгенезу залежить від елементів, що містяться в хромосомах батьківських Р-ліній і взаємодіють з материнським цитотипом (властивостями цитоплазми) М-ліній. За аналізу поведінки нестабільної мутації у локусі *singed* (*sn* — обпалені щетинки) за гібридного дисгенезу (потомство від схрещування: самки М-цитотипу × самці з Р-факторами) було встановлено, що у гібридів першого покоління у випадку передачі від самців хромосом з Р-факторами нестабільна *sn*-алель мутувала у десятки разів частіше, ніж у потомстві реципрокного схрещування (Engels, 1979).

Незабаром було отримано прямі молекулярно-генетичні докази того, що хромосоми з мутаторними Р-факторами містять Р-транспозони, яких немає у лінії з М-цитотипом (Rubin et al., 1982). Стало зрозумілим, що цитоплазма М-ліній не передавала гібридам супресор транспози-

ції мобільних елементів у хромосомах Р-ліній. Саме тому у потомстві від схрещувань «самки М × самці Р» у першому поколінні відбувалися активація Р-елементів і множинні інсерційні мутації. Вони супроводжувалися летальними і видимими нестабільними мутаціями, порушуючи зародкові клітини самок. Р-елемент, як зазначив Р. Хесін, виявився «чемпіоном із стрибків», володіючи у випадку активації надвисокою здатністю до транспозиції. З інсерціями Р-елементів виявилися пов'язаними понад 50% спонтанно виникаючих у природних популяціях нестабільних алелей гена *singed*.

Детально історію подальшого вивчення цього явища і підсумок найцікавіших результатів генетичного аналізу нестабільних природних алелей у дрозофіли викладено в аналітичній статті (Голубовский, 2011). Автор справедливо підсумовує, що у період 1977–1982 рр. гіпотезу Б. МакКлінток про зв'язок нестабільності з вбудовуванням мобільного генетичного елемента було повністю підтверджено у дослідженнях на дрозофілі, як на генетичному, так і на молекулярному рівнях. Основні етапи історії розкриття загадки нестабільності наведено в табл. 1.1.

Таким чином, на сьогодні мобільні генетичні елементи знайдено в усіх випадках, де вели їх пошук, — вони описані для представників усіх царств живих організмів, включаючи людину.

Розділ 2. БІОЛОГІЯ МОБІЛЬНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ЕЛЕМЕНТІВ

Мобільним (рухомим) генетичним елементом (МГЕ) називається ділянка ДНК (нуклеотидна послідовність), що здатна змінювати положення в геномі; такі нуклеотидні послідовності ще називають транспозонами (Хесин, 1984). Транспозони зумовлюють транспозиції — переміщення невеликих ділянок генетичного матеріалу в межах однієї хромосоми або між різними хромосомами.

Вперше мобільні генетичні елементи описала американська дослідниця Барбара МакКлінток, яка, вивчаючи особливості успадкування забарвлення насінин кукурудзи, на початку 40-х рр. минулого століття виявила існування гена, або локусу, що викликав підвищення частоти хромосомних перебудов, появу чітких фенотипних змін у окремих клітинних клонів насінин. Серед нащадків, у яких обидва батьки несли такі перебудови, з неочікувано високою частотою з'являлися нестабільні мутації. Виявлений мобільний локус отримав назву *Ds* (дисоціатор), в якому переважно і відбуваються розриви хромосом. Сам по собі *Ds* не викликає розривів. Вони з'являються у цьому локусі за умови наявності у геномі іншого мобільного елемента — *Ac* (активатор). Обидва ці елементи можуть втрачатися з частотою у кілька відсотків у мейотичному потомстві або змінювати свою локалізацію за мітотичних поділів. При цьому *Ds* переміщується лише за наявності *Ac*.

На рис. 1.1 уже було схематично продемонстровано взаємодію активатора і дисоціатора.

Вбудовування *Ds* поблизу або всередині гена *C*, що контролює забарвлення алейрону насіння, приводило до активації гена *C*. Внаслідок цього гетерозиготні насінини *C/c/c/* (ендосперм формується триплоїдною клітиною) виявилися незабарвленими. За присутності *Ac* дисоціатор *Ds* починав переміщуватися, інколи покидав локус *C*. У результаті цього з'являлися забарвлені плями алейрону на незабарвлених насінинах.

У 1948 р. Б. МакКлінток опублікувала результати досліджень локусу, що викликав розриви хромосом, зробивши висновок, що він є дуже незвичайним, оскільки може переміщуватися з однієї ділянки хромосоми в іншу (McClintock, 1948). Лише у 80-х рр. XX ст. завдяки успіхам генної інженерії вдалося виділити і дослідити *Ac*, *Ds* і деякі інші мобільні генетичні елементи кукурудзи (рис. 2.1). Виявилось, що *Ds* — дефектний делетований варіант *Ac*. Структура елемента *Ac* виявилася типовою для вивчених на той час мобільних елементів.

Б. МакКлінток назвала феномен переміщення транспозицією, а самі локуси — контролюючими елементами. Ці елементи створюють безмежний матеріал для дії природного добору, оскільки характеризуються такими властивостями:

- можуть переміщуватися з одного локусу (сайта) в інший (як у межах однієї хромосоми, так і між різними хромосомами);
- їх вбудовування в дану ділянку впливає на активність генів, що розташовані поряд;

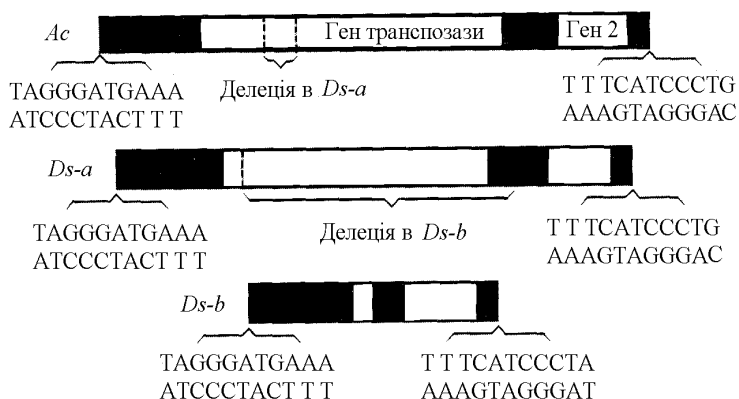


Рис. 2.1. Будова мобільних генетичних елементів *Ac* і *Ds* кукурудзи:

показано два гени (світлі), відповідальні за транспозицію, і послідовності інвертованих недосконалих повторів на кінцях (за: Инге-Вечтомов, 2010)

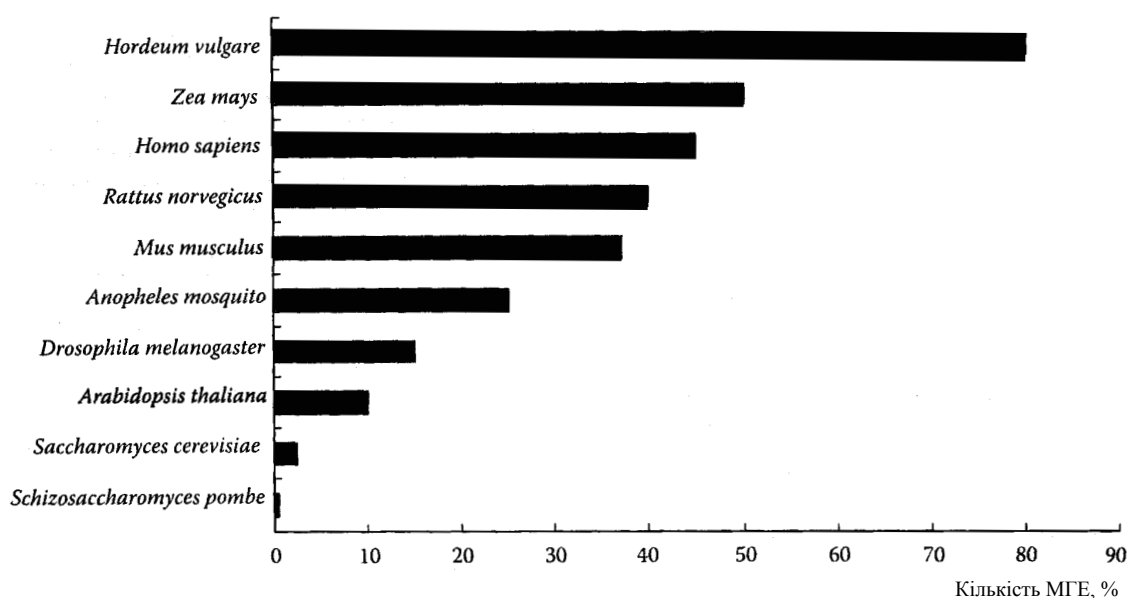


Рис. 2.2. Частка МГЕ у геномах деяких евкаріотів (за: Підпала та ін., 2008)

- втрата «контролюючих елементів» у даному локусі перетворює раніше мутабельний локус у стабільний;
- у сайтах, в яких присутні «контролюючі елементи», можуть виникати делеції, транслокації, транспозиції, інверсії, а також розриви хромосом (McClintock, 1948, 1984).

Відтоді «контролюючі елементи» (мобільні елементи, мобільні генетичні елементи, МГЕ — згідно зі сучасною термінологією) знайдено в геномах різних організмів, вони становлять значну частину ДНК евкаріотів (McClintock, 1956; Nevers et al., 1986; Kidwell, Lisch, 1997; Arabidopsis, 2000; Bennetzen, 2005; Bennetzen, Ma, Devos, 2005; Biemont, Vieira, 2006; Vitte, Bennetzen, 2006; Овчаренко та ін., 2006; Підпала та ін., 2008; Чересиз и др., 2008; Новикова, Блинов, 2009; Козерецкая, 2010; Шпильчин, Терновська, 2010), наприклад, понад 45% геному людини, понад 70% геному кукурудзи, близько 80% геному ячменю, 90% геному пшениці і лілейних (рис. 2.2). За різними підрахунками, це мільйони окремих копій транспозонів. Тобто у середньому частка МГЕ у геномі є пропорційною його розміру і великі геноми, як правило, містять більшу частку мобільних елементів.

Нещодавно на прикладі різних видів і форм арабідопсиса у результаті вивчення майже 2000 родин МГЕ, що представляють усі відомі їх класи для даних об'єктів дослідження, було

показано, що одним із важливих чинників еволюційної динаміки МГЕ є особливості розмноження рослини-хазяїна. Зокрема, у перехресників кількість копій представників різних родин мобільних елементів була у 3–10 разів більше, ніж у самоzapильних. Це, на думку авторів дослідження (De la Chaux et al., 2012), свідчить про те, що кількість копій МГЕ залежить також і від особливостей системи розмноження хазяїна. Зокрема, самоzapильні види, очевидно, містять у своєму геномі менше мобільних елементів.

Біологічна необхідність реплікації робить майже неминучим заселення геномів егоїстичними генетичними елементами. Дійсно, секвенування геномів виявило, що одиничні копії генів часто дуже «розбавлені» повторюваними транспозонами (Goff et al., 2002; Schnable et al., 2009). Чисельність і розподіл будь-якого конкретного транспозона залежить від того, наскільки він є «агресивним» (як швидко може помножувати число копій), де він вставляє нові копії і як реагує на вставку хазяїн. Оскільки ці чинники можуть сильно варіювати, вміст транспозонів у кожного виду є унікальним і його фактично неможливо передбачити *a priori*. Саме здатність до збільшення (інколи дуже значного — на порядки) кількості власних копій внаслідок процесу транспозиції надала можливість говорити про егоїстичність і навіть про паразитичність транспозонів, про «сміттєвість» транспозонної ДНК

(Feschotte, Pritham, 2007). Насправді ж МГЕ можуть різними шляхами дуже істотно впливати на геном хазяїна. Зокрема, на сьогодні доведено таке:

- мобільні генетичні елементи можуть інсерційно мутувати гени, в які вони вбудовуються;
- послідовності транспозона в геномі можуть модулювати генну експресію, працюючи як промотори, енхансери, сайленсери, місця епігенетичної модифікації і місця альтернативного сплайсингу;
- гени, що кодують транспозони, можуть бути пристосовані хазяїном для виконання клітинних функцій, діяти як нові чи регуляторні елементи генів, тобто бути джерелом «інновацій» для організму; цей процес дістав назву «молекулярне одомашнювання»;
- оскільки в геномі існує багато копій інтегрованих елементів, вони можуть слугувати місцями рекомбінації, які призводять до делецій, дуплікацій, інверсій чи транслокацій.

Таким чином, МГЕ можуть істотно впливати на геном соматичних клітин, на його експресію, на формування конкретних ознак (фенотипів), часто у взаємодії з конкретними умовами довкілля. Наявність транспозонів часто виявляється у вигляді химер і мозаїків. Приклади цих явищ у рослин наведено, наприклад, у монографії (Кунах, 2005, розділ 4.2) й оглядах (Шпильчин, Терновська, 2010; Сормачева, Блинов, 2011), а у людини — в огляді (Collier, Largaespada, 2007).

У 1983 р. Б. МакКлінток у нобелівській лекції висунула гіпотезу про активізацію мобільних генетичних елементів у відповідь на вплив зовнішніх і внутрішньоклітинних стресових чинників (McClintock, 1984). Автор припустила, що така мобілізація є системною геномною відповіддю на стресові для організму події і саме цей механізм видоутворення привів до виникнення низки відомих нині видів. Подібна геномна стресова відповідь утворює широкий спектр генетичного різноманіття шляхом інсерційного мутагенезу, що надає можливість видам/популяціям, резервуарам МГЕ, успішніше адаптуватися до змін. Більше того, як свідчать результати останніх досліджень, результат такої геномної відповіді можливо розглядати як «спрямовані»/адаптивні мутації.

Отже, завдяки великій кількості копій і здатності переміщуватися у геномі МГЕ відіграють суттєву роль як в організації і функціонуванні, так і в еволюції евкаріотних геномів, яка переважно проявляється у таких явищах:

- багато відомих мутацій є наслідком переміщення мобільних елементів;
- переміщення МГЕ і процес рекомбінації ДНК, який відбувається у геномі завдяки високій копійності, суттєво впливають на еволюцію регуляції функціонування генів;
- можуть зумовлювати хромосомні перебудови, які є одним із основних механізмів еволюції рослинного геному;
- наявність і активність МГЕ забезпечує геному пластичність;
- МГЕ беруть участь у виникненні псевдогенів,
- а також у переміщенні екзонів (exon shuffling) тощо.

Факти, що підтверджують реальність названих (й інших подібних явищ), можна знайти у роботах (Moran et al., 1999; Bennetzen, 2000, 2005; Esnault et al., 2000; Kidwell, Lisch, 1997, 2001; Kazazian, 2004; Bennetzen et al., 2005; Biemont, Vieira, 2006; Vitte, Bennetzen, 2006; Овчаренко та ін., 2006; Venturi et al., 2006; Підпала та ін., 2008; Чересиз і др., 2008; Новикова, Блинов, 2009; Козерецька, 2010; Шпильчин, Терновська, 2010; Belyayev et al., 2010). Результати викладених досліджень свідчать про суттєвий вплив МГЕ на геном хазяїна, зокрема про те, що ці елементи відігравали значну роль в еволюції геномів, особливо шляхом регулювання генної активності. З іншого боку, ці самі дані цілком узгоджуються з уявленням про мобільні елементи як про паразитичну ДНК, що використовується клітинами хазяїна в першу чергу для збільшення варіабельності і пластичності геному. Як свідчать дані, наведені в огляді (Новикова, Блинов, 2009), наразі для тварин існує один приклад прямої участі МГЕ у функціонуванні геному — деякі LTR-невмісні транспозони беруть участь в утворенні теломер у дрозофіли. У вищих рослин явище створення транспозонами нових генів не таке рідкісне (див. розділ 10.2).

Існує й третя точка зору на біологічну роль МГЕ. Згідно з нею гени стосовно дії МГЕ можна поділити на дві групи. Мутації у першій групі генів «заборонені» (летальні або ведуть до сте-

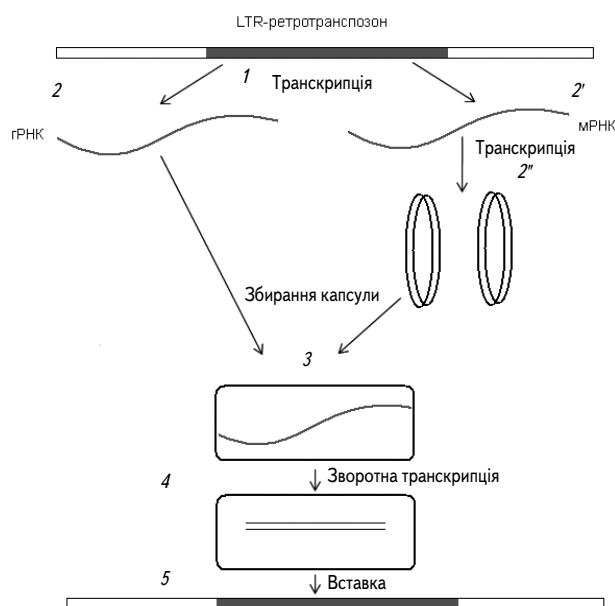


Рис. 2.3. Схема транспозиції LTR-вмісних ретротранспозонів:

1 — на першому етапі відбувається транскрипція послідовності транспозона в мРНК; 2 — у подальшому транскрипт може діяти як геномна РНК; 2' — альтернативно транскрипт може діяти як мРНК; 2'' — транскрипт може транлюватися в декілька функціональних білків, що відповідають за утворення капсули, зворотну транскрипцію та інтеграцію; 3 — навколо геномної РНК утворюється капсула; 4 — відбувається зворотна транскрипція; 5 — інтеграція до геному хазяїна (за: Шпильчин, Терновська, 2010)

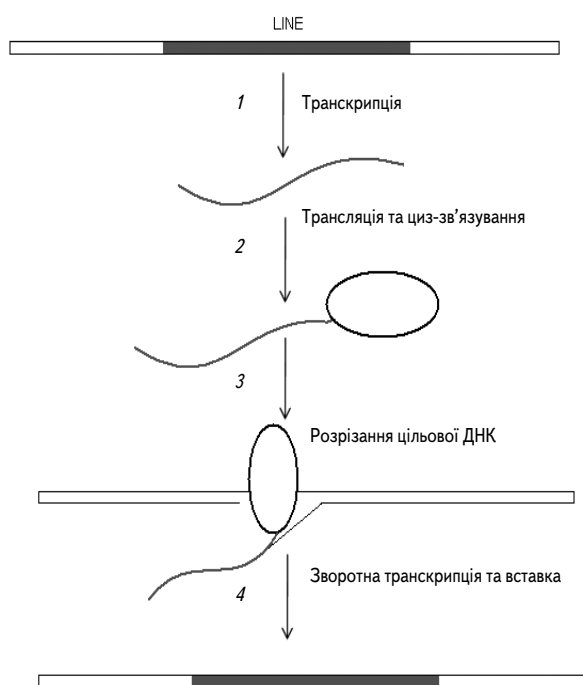


Рис. 2.4. Схема транспозиції LTR-невмісних ретротранспозонів (LINE-транспозонів):

1 — транскрипція послідовності транспозона в РНК; 2 — трансляція та цис-зв'язування транскрипта з новосинтезованим багатофункціональним білком; 3 — розпізнавання та розрізання цільової послідовності ДНК хазяїна; 4 — зворотна транскрипція та вставка (за: Шпильчин, Терновська, 2010)

рильності), мутації у другій (варіабельній) ведуть до створення значного різноманіття. Таким чином, вплив транспозонів на першу групу генів буде негативним і мобільні елементи вестимуть себе, як «егоїстична» ДНК, тоді як потрапляючи до другої групи, вноситимуть вклад в еволюційні процеси. Детально це питання розглянуто в оглядах (Lonnig, Saedler, 1997; Bennetzen, 2000, 2005; Fedoroff, 2000).

Відповідно до механізму переміщення МГЕ поділяють на два великих класи:

- мобільні елементи I класу, міграція яких здійснюється шляхом виникнення геномних копій за умови збереження старої; цей процес називається реплікативною транспозицією і відбувається завдяки активності зворотної транскриптази з використанням як матриць молекул РНК; за аналогією з ретровірусами, що мають подібний механізм відтворення, мобільні елементи цього класу називають

ретротранспозонами або *ретроелементами* (рис. 2.3, 2.4);

- мобільні елементи II класу, в основі переміщення яких лежить так звана нереплікативна транспозиція, що полягає у вирізання та реінтеграції самої вихідної копії (механізм «виріз і встав», англ. «cut and paste»); оскільки цей механізм не потребує наявності проміжної РНК-матриці, відповідні мобільні елементи називаються *ДНК-транспозонами* (рис. 2.5).

Кожен з класів включає різні за будовою і деякими біологічними особливостями типи МГЕ (рис. 2.6).

Окрім згаданих двох основних класів, пізніше було відкрито нову групу транспозонів, названу MITE (miniature inverted-repeat transposable elements — транспозони з мініатюрними інвертованими повторами). Ця група транспозонів має риси, характерні як для першого, так і для

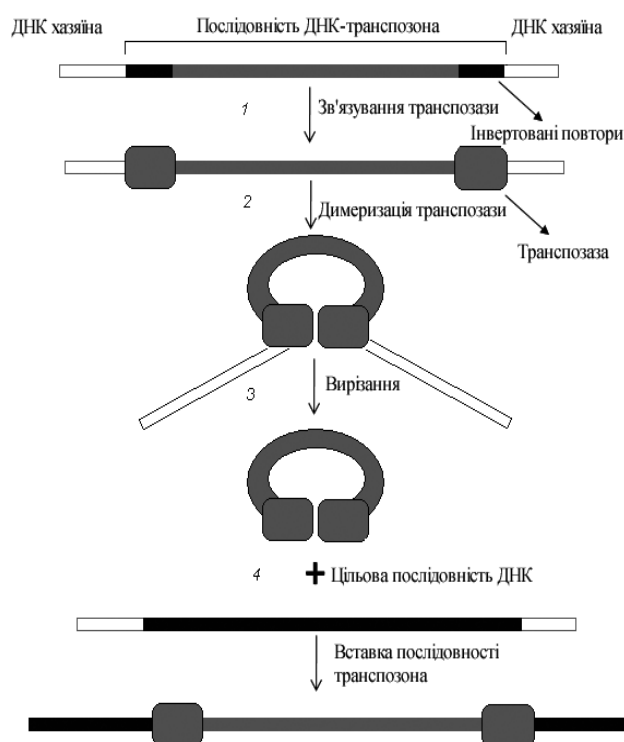


Рис. 2.5. Схема транспозиції ДНК-транспозонів:

1 — зв'язування транспозази з розпізнавальними послідовностями в ділянках інвертованих повторів на кінцях транспозона; 2 — димеризація ферменту; 3 — вирізання послідовності транспозона з геному хазяїна; 4 — вставка послідовності транспозона в новий сайт (за: Шпильчин, Терновська, 2010)

другого класів. Вони переміщуються за механізмом «виріж і встав», тому належать до ДНК-транспозонів. МІТЕ-елементи не кодують власну транспозазу і здатні переміщуватися за допомогою транспозази якогось іншого, «автономного» елемента, що належить до тієї ж родини. Точний механізм транспозиції МІТЕ-елементів ще не відомий. До МІТЕ відносять такі мобільні елементи, як *Tourist* та *Stowaway*, які було знайдено в інтронах, а також вище 5'- та нижче 3'-ділянок багатьох генів у значної кількості вищих рослин (Kanazawa et al., 2000).

До класу ДНК-транспозонів належить і дуже цікавий елемент, названий «Гелітрон» (*Helitron*), який ампліфікується за типом «обруча, що котиться» і не містить звичайних для даного класу інвертованих повторів на своїх кінцях (Kapitonov, Jurka, 2001). Детально особли-

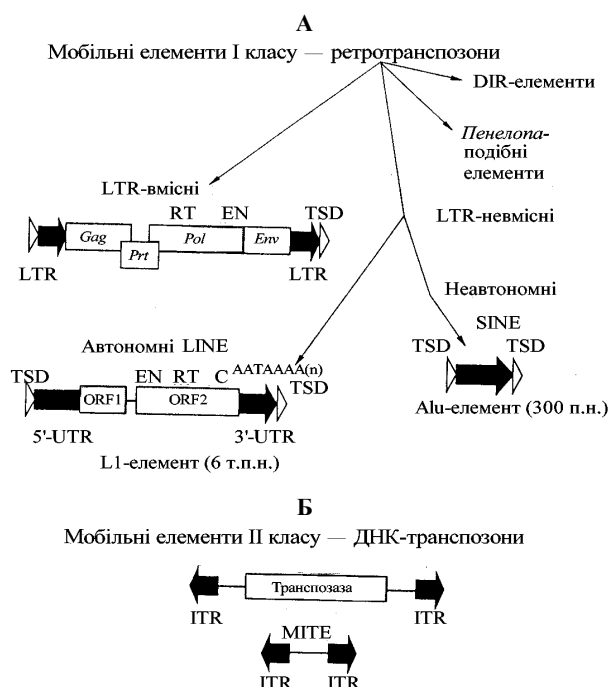


Рис. 2.6. Будова основних класів МГЕ:

А — мобільні елементи I класу — ретротранспозони; Б — мобільні елементи II класу — ДНК-транспозони: ITR (inverse terminal repeat) — обернений кінцевий повтор; TSD (target site duplication) — дуплікація сайту-мішені; UTR (untranslated region) — нетрансльована (незчитувана) ділянка; EN (endonuclease) — ендонуклеаза; RT (reverse transcriptase) — зворотна транскриптаза; PRT (protease) — протеаза; LTR (long terminal repeat) — довгий кінцевий повтор (за: Евгенєв, 2007, зі змінами)

вості цього елемента, його роль у пластичності геному розглянуто у розділі 4.4.

Порівняно нещодавно описано ще одну родину еукаріотних ДНК-транспозонів, тісно пов'язаних з так званими LTR-вмісними ретротранспозонами, — це надродина *Ginger* (*Gypsy* *InteGrasE* Related) (Bao et al., 2010). *Ginger*-елементи дають нове уявлення про еволюцію мобільних генетичних елементів і певних генів, що виникли від рухомих елементів (детальніше див. розділ 4).

У міру сиквенування все нових геномів відкриваються все нові і навіть досить великі групи МГЕ як обох класів, так і групи, яку можливо віднести як до ретротранспозонів, так і до ДНК-транспозонів. Їх особливості наведено і проаналізовано нижче у відповідних розділах.

Розділ 3. РЕТРОТРАНСПОЗОНИ

Мобільні генетичні елементи І класу — це МГЕ, які складають значну частину повторюваних послідовностей ДНК еукаріотів. Вони переміщуються за механізмом «скопій і встав» («copy and paste»), оскільки кодують зворотну транскриптазу і переміщуються за допомогою РНК-інтермедіата, тобто використовують кодовану ними РНК як матрицю для синтезу кДНК, на основі якої будується друга нитка ДНК. У подальшому ця ДНК і включається у хромосому за допомогою інтегрази, що зазвичай кодується тим самим елементом. Саме тому ретротранспозони належать до класу І МГЕ, тобто до зворотно транскрибованих елементів, які мультиплікуються (помножуються) шляхом передачі генетичної інформації від РНК до ДНК подібно ретровірусам і параретровірусам.

Ретротранспозони виявлено практично в усіх еукаріотів, що належать до різних таксономічних груп, таких як найпростіші, гриби, тварини і рослини. У рослин вони можуть складати до 50% і більше всієї геномної ДНК. Реплікативний спосіб переміщення дозволяє швидко накопичувати велику кількість копій елемента, збільшуючи розмір геному рослин. Мутації, створені інсерцією ретротранспозона, є стабільними, на відміну від мутацій, викликаних ДНК-транспозонами, оскільки останні за переміщення вирізають свою вихідну копію, а вже потім вбудовують її в інший сайт, у той час як копія ретротранспозона, вбудовавшись, уже нікуди не зникне.

Ретротранспозони поділяють, згідно з останніми даними (Сормачева, Блинов, 2011), на 5 груп, що відрізняються за механізмом переміщення та структурною організацією:

- LTR-вмісні ретротранспозони (або просто LTR-транспозони), які мають на кінцях довгі кінцеві повтори (ДКП, або LTR — long

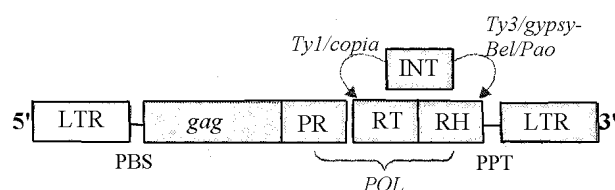


Рис. 3.1. Структурна організація LTR-вмісних ретротранспозонів (за: Сормачева, Блинов, 2011)
(пояснення в тексті)

terminal repeats) (рис. 3.1), сюди ж відносять і ендегенні ретровіруси;

- LTR-невмісні ретротранспозони (або non-LTR-транспозони), які не несуть довгих кінцевих повторів; цю групу також називають LINE-елементами (long interspersed nuclear elements — довгі дисперговані ядерні елементи);
- *DIRS*-подібні (*DIRS*-like) елементи, які містять ген тирозин рекомбінази замість гена інтегрази (INT) і прямі відокремлені повтори (SDR — split direct repeats), або інвертовані повтори (inverted repeats); згідно з класифікацією ICTV (International Committee on the Taxonomy of Viruses) *DIRS*-подібні елементи є групою LTR-вмісних ретротранспозонів (рис. 3.2);

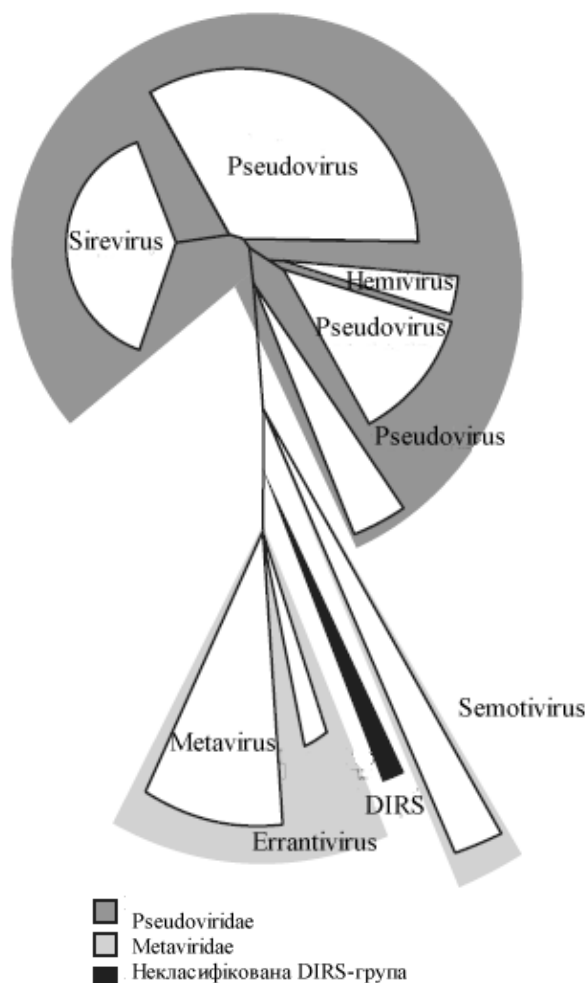


Рис. 3.2. Класифікація LTR-вмісних ретротранспозонів згідно з ICTV (за: Сормачева, Блинов, 2011)

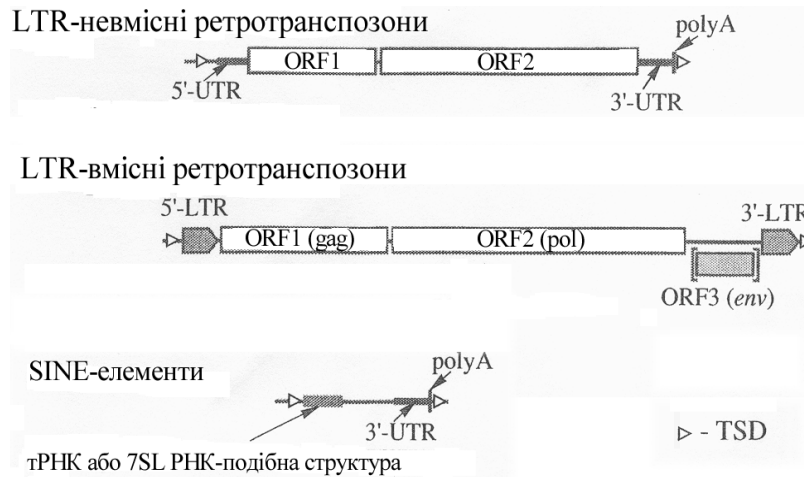


Рис. 3.3. Структурна організація трьох груп ретротранспозонів:

ORF (open reading frame) — відкрита рамка читання; 5'- і 3'-UTR (untranslated region) — 5'- і 3'-нетрансльовані (незчитувані) ділянки; polyA — аденінзбагачена послідовність; 5'- і 3'-LTR (long terminal repeats) — 5'- і 3'-довгі кінцеві повтори (ДКП); *gag* — ген основного білка вірусоподібних часточок; *pol* — ген поліпротеїну; *env* — ген білка оболонки; TSD (target site duplication) — дуплікації сайту-мішені, короткі прямі фланкуючі послідовності (за: Новикова, Блинов, 2009)

- *Penelope*-подібні елементи (PLEs), які кодують зворотну транскриптазу (RT), ближчу за структурою до теломерази, ніж до зворотної транскриптази LTR-вмісних ретротранспозонів, та ендонуклеази, ближчу до ендонуклеази інтронів групи II і до бактеріального білка UvrC;
- SINE-елементи (short interspersed nuclear elements — короткі дисперговані ядерні елементи).

Порівняльну схематичну структуру названих типів ретротранспозонів наведено на рис. 3.3.

Слід відзначити, що було запропоновано перекласифікувати ретротранспозони згідно з вірусною номенклатурою: LTR-вмісні ретротранспозони віднесено до порядку *Retrovirales*, а LTR-невмісні ретротранспозони — до порядку

Retrales (Grandbastien, 2008); проте не всі дослідники погоджуються з такою номенклатурою. Дійсно, LTR-транспозони є структурно тісно спорідненими з ретровірусами і цикл їх ампліфікації повторює внутрішньоклітинні стадії ретровірусного циклу з великою подібністю процесів реверсної транскрипції та інтеграції. Крім того, популяції LTR-вмісних ретротранспозонів за своєю структурою нагадують вірусні квазівиди із можливо адаптивним оптимальним характером ампліфікації, який добирається для кожного конкретного геному хазяїна. У рослин виявлено різні структурні варіанти цього класу транспозонів, при цьому дефектні варіанти ампліфікуються у надзвичайно великих кількостях. (Детальніше цей матеріал викладено в розділі 3.5.)

3.1. LTR-вмісні ретротранспозони

LTR-вмісні ретротранспозони мають довгі кінцеві повтори (ДКП або LTR) і за своєю організацією є найскладнішими серед транспозонів. Повнорозмірний автономний LTR-транспозон має розмір від 4 до 10 т.п.н. і містить у своїй структурі ДКП у прямій орієнтації, довжина яких варіює у різних видів від 100 п.н. до 5 т.п.н. (наприклад, 115 п.н. у рису і 2,4 т.п.н. у деяких лілій). Обидва повтори у складі одного й того

самого LTR-ретротранспозона звичайно мають високий ступінь гомології (див. рис. 3.1).

ДКП не кодують білки, але містять промотори і термінатори, які регулюють транскрипцію генів LTR-ретротранспозонів. Тіло елемента містить у собі послідовності двох генів — *gag* і *pol* (Wicker et al., 2007). Ген *gag* кодує білок, схожий з білком нуклеокапсида ретровірусів. Ген *pol* кодує довгу поліпептидну молекулу (polyprotein),

окремі домени якої згодом відщеплюються одна від одної і стають самостійними функціонально різними білками. У результаті продуктами гена *pol* є декілька активних білків, зокрема:

- протеїназа PR, яка розщеплює єдиний продукт гена *pol* на самостійні функціонально активні домени;
- ендонуклеаза Endo, яка здатна вбудовувати в геном нові копії ретротранспозона і тому називається інтегразою (INT);
- висококонсервативний поліпептид, що має функції зворотної транскриптази RT (reverse transcriptase) та РНКазу H (RNaseH або RH), які необхідні для реплікації/переміщення ретротранспозона (див. рис. 3.1, 3.3).

Інша особливість LTR-ретротранспозонів — це наявність коротких послідовностей, відомих як праймер-зв'язуючий сайт (primer binding site — PBS), що комплементарний до аспарагіну (Asp) тРНК, і поліпуриновий тракт (polypurine tract — PPT). PBS розташовується відразу за 5'-LTR і потрібен для синтезу першого ланцюга кДНК.

Окрім послідовностей, що кодують два основних поліпротеїни, LTR-ретротранспозони також можуть містити додаткові кодувальні послідовності. Наприклад, деякі ретротранспозони рослин містять додаткові відкриті рамки зчитування (ORF — open reading frame), кодувальні трансмембранні домени і N-термінальні сигнальні послідовності, які є характерними для генів оболонки білка Env (Env-like ORF) ретровірусів. Роль таких білків залишається поки що не ясною. Проте їх рекурентна присутність у транспозонах рослин і консервативність специфічних механізмів експресії можуть свідчити про їх важливу роль у життєвому циклі МГЕ (Grandbastien, 2008).

Оскільки LTR-ретротранспозони відрізняються від ретровірусів тільки відсутністю кодуючих послідовностей білка оболонки вірусної частки — гена *env* (envelope — оболонка) ретровірусів, довгий час вважалося, що LTR-ретротранспозони виникли у результаті «до-

местикації» ретровірусів і є насправді ретровірусами, які загубили ген білка оболонки. Однак філогенетичний аналіз LTR-ретротранспозонів і ретровірусів виявив інше. Вірогідніше за все, ретровіруси виникли із LTR-ретротранспозонів у результаті придбання додаткового гена *env*, продукт трансляції якого дозволив протретровірусу сформувати вірусну частинку, яка володіє інфекційною здатністю (Xiong, Eickbush, 1990).

Взаємне розташування доменів зворотної транскриптази та інтегрази у складі гена *pol* може дещо відрізнятися. Відповідно, LTR-вмісні ретротранспозони поділяють на дві надродини, які отримали своє позначення від найбільше вивчених представників у геномах дріжджів і дрозофіли:

- надродина Pseudoviridae — група *Ty1/copia*-подібних елементів (послідовність доменів: Gag-PR-INT-RT/RH); транспозони цієї групи досить поширені в еукаріотів і на сьогодні виявлені у понад 100 видів рослин, починаючи від одноклітинних водоростей і закінчуючи обома класами квіткових рослин;
- надродина Metaviridae — група *Ty3/gypsy*-подібних елементів (послідовність доменів: Gag-PR-RT/RH-INT) досліджена у рослин значно менше; окремі представники цієї групи виявлені у квіткових і голонасінних (Kumar, Bennetzen, 1999; Grandbastien, 2008) (див. рис. 3.1).

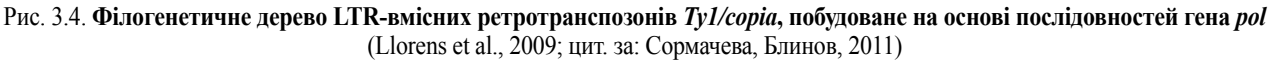
Деякі автори виділяють третю надродину LTR-вмісних ретротранспозонів — *Bel-Pao*. Елементи цієї надродини мають структуру, подібну до структури *Ty3/gypsy* чи *Ty1/copia* елементів, проте вони формують окремий кластер за філогенетичного аналізу на основі доменів зворотної транскриптази (Cook et al., 2000; Wicker et al., 2007; Сормачева, Блинов, 2011).

Згідно з однією з останніх класифікацій до класу LTR-ретротранспозонів включено також групи: ретровіруси (Retrovirus) і ендегенні ретровіруси (ERV) (Wicker et al., 2007; див. також Bao et al., 2010).

3.1.1. Надродина *Ty1/copia*

Ty1/copia являє собою надродину ретровірусів і LTR-вмісних ретротранспозонів, які широко представлені у геномах рослин, грибів, тварин, водоростей і деяких найпростіших. Роз-

повсюдження мобільних елементів надродини *Ty1/copia* дозволяє припустити, що їхні предкові елементи були представлені у геномах еукаріотних організмів ще до поділу рослин і уніко-



Класифікацію надродина *Ty1/coria* ще не завершено. Згідно з класифікацією Міжнародного комітету по таксономії вірусів (ICTV) надродина *Ty1/coria* отримала назву Pseudoviridae і поділяється на три групи: Pseudovirus, Hemivirus і Sirevirus (Havecker et al., 2004) (див. рис. 3.2).

Нещодавно було запропоновано іншу класифікацію ретроелементів *Ty1/copia* (рис. 3.4). За результатами філогенетичних досліджень послідовностей гена *pol*, надродина *Ty1/copia* поділяється на дві основні групи:

- 33

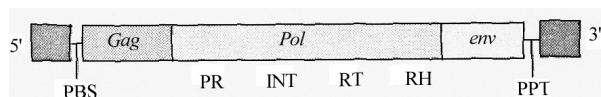


Рис. 3.5. Структурна організація *Ty1/copia* LTR-вмісних ретротранспозонів *Sire* (Llorens et al., 2009; цит. за: Сормачева, Блинов, 2011)

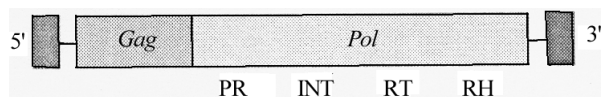


Рис. 3.6. Структурна організація *Ty1/copia* LTR-вмісних ретротранспозонів родин *Oryco*, *Retrofit*, *Tork* і *Osseer* (Llorens et al., 2009; цит. за: Сормачева, Блинов, 2011)

Представників групи 1 не виявлено у геномах рослин взагалі, а з групи 2 у геномах рослин присутні елементи тільки таких чотирьох родин *Ty1/copia* елементів:

1. *Sirevirus*. Вони представляють собою групу LTR-ретротранспозонів і ретровірусів із геномів рослин, яка містить дві філогенетичні споріднені лінії *Sire* і *Oryco* (Llorens et al., 2009). Основна відмінність даних ліній в тому, що елементи лінії *Sire* містять додаткову приховану рамку зчитування гена *env* і зчитуються потенційними ретровірусами, а елементи лінії *Oryco* є класичними LTR-ретротранспозонами (Llorens et al., 2011).

1.1. *Sire*. *Sire*-елементи представляють собою достатньо великі ретротранспозони довжиною 9,3–9,8 т. п. н. з кінцевими інвертованими повторами розміром 500–1200 п. н. Тіло елемента містить три відкриті рамки зчитування генів: *gag*, *pol* і *env-like* (*env-like* ORF розташована з С-кінця домену RNase H) (Llorens et al., 2011) (рис. 3.5). Найхарактернішим представником цієї лінії є елемент *SIRE-1*, описаний раніше в геномі сої *Glycine max* (Laten et al., 1998). *SIRE-1-like* елементи широко представлені в геномах рослин як однодольних (рис, кукурудза, сорго), так і дводольних (арабідопсис, лотос, бобові, цитрусові) (Havecker et al., 2005; Rajput, Upadhyaya, 2010).

1.2. *Oryco*. LTR-ретротранспозони лінії *Oryco* знайдено в геномах таких видів рослин, як:

3.1.1.1. Особливості деяких представників надродини *Ty1/copia*

Останнім часом у різних видів рослин і особливо у *Triticeae* добре вивчено низку ретротранспозонів — представників надродини *Ty1/copia*.

Ретротранспозони родини *BARE-1* є транскрибованими *Ty1/copia*-подібними ретроелементами розміром 8,9 т. п. н. із LTRs довжиною 1,829 т. п. н., довгою, нетрансльованою лідерною послідовністю розміром 2 т. п. н. і консервативними кодувальними доменами для GAG, PR, INT, RT та RH і активним промотором. Представни-

Vitis vinifera, *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa* і *Oryza sativa* (Llorens et al., 2011). Це відносно короткі елементи довжиною 4,2–4,9 т. п. н. з кінцевими повторами розміром 160–440 п. н. Кодувальна ділянка містить гени *gag* і *pol* у класичному для *Ty1/copia*-ретротранспозонів порядку (ген *env* відсутній) (рис. 3.6).

2. *Retrofit*. Елементи *Retrofit* мають розмір 4,7–4,9 т. п. н., кінцеві повтори довжиною 120–300 п. н., доменну організацію генів *gag* і *pol*, типову для *Ty1/copia*-ретротранспозонів (Piegu et al., 2006; Llorens et al., 2011) (рис. 3.6).

3. *Tork*. До родини *Tork* належать LTR-ретротранспозони з геномів різних видів рослин: *Zea mays*, *Solanum lycopersicon*, *Vitis vinifera*, *Nicotiana tabacum*, *Vigna radiata*. Розміри і довгих кінцевих повторів, і кодувальної ділянки дуже варіабельні серед представників різних елементів цієї родини: 0,12–1,2 т. п. н. і 4,1–6,7 т. п. н. відповідно (рис. 3.6).

4. *Osseer*. Це перший повний *Ty1/copia*-ретротранспозон, описаний у геномі колоніальної зеленої водорості *Volvox carter*. Розмір елемента складає 4875 п. н., довжина LTRs — 197 п. н., елемент має доменну організацію генів *gag* і *pol*, типову для *Ty1/copia*-ретротранспозонів. Ця родина групи 2 *Ty1/copia*-ретротранспозонів містить єдиний елемент, для якого не описані філогенетично близькі елементи (рис. 3.6).

ки родини *BARE-1* присутні у геномі ячменю у середньому в кількості близько 14 000 повномірних копій, розсіяних по всіх хромосомах, що складає майже 3% сумарного розміру геному. Соло LTRs *BARE-1* складають щонайменше 64 000 додаткових елементів у геномі, і геноми видів *Hordeum* містять у 7–42 рази більше LTRs *BARE-1* порівняно з повномірними копіями цього ретротранспозона. Як повномірні, так і соло LTRs *BARE-1* складають 5–10% геному ячме-

ню і впливають не тільки на мінливість розміру всього геному, а й на локальну диверсифікацію геному і диференціацію розміру геному у локальному масштабі.

BARE-елементи транскрибуються у тканинах ячменю з промоторів самого LTR-елемента. *BARE*-1 містить два промотори, які є активними *in vivo*. У протопластах ячменю для даунстрим ТАТА-боксу виявлено як позитивні, так і негативні регуляторні ділянки тимчасової експресії. Апстрим-сегментом, що значно більше впливає на експресію, є *GARE*-елемент, який транскрипційно реагує на гіберелову кислоту, взаємодіючи з ядерними факторами. Зворотна транскрипція іде за транскрипцією і залежить від сайту ініціації (–)-ланцюга (PBS), який зазвичай у LTR-вмісних ретротранспозонах комплементарний тРНК, і сайту ініціації (+)-ланцюга (PPT), багатого на пурин. Вони дуже консервативні в елементах *BARE*-1 та *LARD* ячменю.

Трансляція LTR-вмісних ретротранспозонів генерує один окремий поліпротеїн, або два окремих продукти генів *gag* та *pol*. Вони підлягають процесингу до утворення зрілих форм ретротранспозон-кодованою протеїназою.

Одними із сайтів інтеграції елементів *BARE*-1, яким надається найбільша перевага, є інші елементи *BARE*-1. Це свідчить про те, що основною особливістю рослинних ретротранспозонів є «гніздова інсерція». Більша у 40 разів кількість соло *BARE*-1, ніж повномірних копій цього ретротранспозона у ячменю, говорить про те, що LTR-LTR-рекомбінація може відігравати значну роль у протидії геномній експансії ретротранспозонів. Така внутрішньохромосомна рекомбінація приводить до втрати одного LTR і внутрішнього домену, залишаючи після себе рекомбінантний соло-LTR.

Гібридаційний аналіз *in situ* метафазних пластинок ячменю показав, що ретротранспозони *Ty1/copia* розподілені по всьому геному на всіх хромосомах, але є менш численними або й відсутніми у певних гетерохроматинових ділянках.

Елемент *BARE*-1 незвичний тим, що він транскрипційно активний у тканинах листків ячменю за нормальних умов росту, а також у культурі тканин *in vitro*. За допомогою молекулярних маркерів, створених частково на осно-

ві мотивів консервативних послідовностей *BARE*-1, виявили значний поліморфізм у різних видів *Hordeum* і сортів *H. vulgare*, який засвідчив, що у геномі ячменю йде активна транспозиція *BARE*-1-подібних елементів (Kalendar et al., 1999). Отже, транспозиційна активність *BARE*-1-подібних ретротранспозонів у принципі дозволяє введення інсерційних мутацій у геном ячменю. Підгрупа *BARE*-1, виділена з геномної ДНК жита, за нормальних умов росту транскрипційно активна також в інших однодольних, таких як ячмінь і пшениця.

Порівняно із ретротранспозоном *BARE*-1 усі інші ретротранспозони *Ty1/copia* рослин транскрипційно активуються у тканинах хазяїна лише за абіотичних чи біотичних стресових умов (див. розділ 7).

BARE-1 є дуже поліморфним не лише у сортів *H. vulgare*, засвідчуючи про його недавню транспозицію, він також досить розповсюджений у трибі *Triticeae*, особливо у пшениці, жита і вівса. Значний рівень інсерційного поліморфізму *BARE*-1 у *T. aestivum*, *S. cereale* та *A. sativa* є показником високої транскрипційної активності групи ретротранспозонів *Ty1/copia* у видів *Triticeae*. Рівень поліморфізму вищий у жита (*S. cereale*) порівняно із сортами вівса (*A. sativa*) та пшениці (*T. aestivum*). Ретротранспозони *BARE*-1 можна успішно використовувати як молекулярні маркери не лише для ідентифікації видів і сортів, а і для спостережень за еволюцією рослинного геному.

Для пшениці і її родичів описано родину ретротранспозонів групи *Ty1/copia*, названу *Wis-2*. На основі результатів вивчення нуклеотидної подібності домену зворотної транскриптази (RT) у геномі пшениці було виявлено сім родин ретроелементів. Ці родини виявилися спільними для геномів вихідних диплоїдних видів пшениці, що є свідченням того, що вони формувалися на етапі диплоїдного видоутворення.

Сумарне число копій ретротранспозонів групи *Ty1/copia* у геномі рису становить близько 1000, засвідчуючи, що вони є основним класом транспозонів у рису. Обмежене розповсюдження, а також порівняно невелика кількість копій свідчать про те, що *copia*-подібні ретротранспозони рису були і є відносно неактивними у процесах еволюції порівняно з такими в інших рослин.

Особливості розповсюдження *copia*-подібних ретротранспозонів свідчать про існування можливого розмаїття хромосомних генеалогічних ліній (рас) рису. Це вказує на те, що дуплікація і диверсифікація хромосом можуть бути механізмами походження й еволюції хромосом рису. Ретротранспозони групи *Ty1/copia* в умовах нормального росту є неактивними, проте була показана активація кількох представників цієї групи ретротранспозонів, що позначаються як родина *Tos*-елементів (*Tos10*, *Tos17* та *Tos19*), в умовах культури тканин.

Tos17 є першим ретротранспозоном однокольних рослин (рису), для якого показані транскрипційна і транспозиційна активності. Активність *Tos17*, як й інших вивчених *Ty1/copia* ретротранспозонів, також регулюється на транскрипційному рівні. Виявлена у LTR *Tos17* повторювана послідовність довжиною 16 п.н. може бути регуляторним елементом, але ніякої гомології між транскрипційними регуляторними елементами тютюну — *Tnt1A*, *Tto1* і *Tos17* — не виявлено. Ці відмінності є важливим матеріалом для вивчення механізмів транскрипційної регуляції ретротранспозонів, вони передбачають участь негомологічних *cis*-регуляторних елементів у транскрипції ретротранспозонів у різних видів рослин чи залежність від типу індуктора (різні стреси, такі як виділення протопласта, індукване еліситором(ами), що є у ферменті, отриманому із патогенного гриба, а не формуванням самого протопласта чи культури тканин). Спостерігали збільшення числа копій *Tos17* (від 5 до 30 транспозованих копій *Tos17* у всіх рослин, регенерованих із культур тканин, включаючи трансгенні рослини) із збільшенням часу культивування (від 3 до 24 місяців).

У шести досліджених близькоспоріднених сортів рису число копій *Tos17* варіює від одного до чотирьох, і вони мають слабку активність за природних умов. Висока транспозиційна активність *Tos17* може бути пов'язана із пораненням, оскільки культивовані клітини досить подібні до ранозагоювальних тканин, тобто калюсів. Ретротранспозони можуть також слугувати чинниками, що викликають індуквані культурою тканин мутації. Щонайменше п'ять із дев'яти цільових сайтів транспозиції *Tos17*, індуквані в культурі тканин, є кодувальними ділянками

генів. Було отримано регенеранти зі вставками *Tos17* у ген *phytochrome A*, ген кіназо-подібного S-рецептора та ген, що кодує білок ring-finger. Ці результати вказують на те, що активація *Tos17* є важливою причиною індукованих культурою тканин мутацій і вона може бути корисним засобом інсерційного мутагенезу і функціонального аналізу генів.

Мобільність ретротранспозонів рису може бути також застосована для оцінки процесів транспозиції під час еволюції цього рослинного виду. Присутність чи відсутність рухомих елементів у певних сайтах геному дає неоднозначну інформацію про час транспозиції. На основі порівняння характеру гібридизації підвидів рису *indica* та *japonica* припустили, що час транспозиції між родинами ретротранспозонів *Tos* відрізняється. Більшість представників сімейства *Tos2* до дивергенції підвидів рису *indica* та *japonica* транспозували і потім не змінювалися, у той час як більшість представників *Tos1* і *Tos3* могли транспозувати після їх дивергенції. Оскільки у більшості ретротранспозонів різних сортів рису змін числа копій не спостерігали, ці ретротранспозони, можливо, є наразі неактивними і поганими кандидатами у маркери розпізнавання сортів порівняно з ретротранспозонами *BARE-1*, які мають великий інсерційний поліморфізм у сортів ячменю.

Велику кількість ретротранспозонів групи *Ty1/copia* ідентифіковано у кукурудзи: *B5*, *G*, *Hopscotch*, *Ji*, *Opie*, *Stonor*, *Prem-1*, *Fourf*, *Victum* тощо. Кожна високоповторювана родина ретротранспозонів складає значну частину геному кукурудзи (Meyers et al., 2001). Встановлено, що приблизно 50% геному кукурудзи складається із послідовностей ретротранспозонів, п'ять великих родин яких складають до 25% геномної ДНК. Так, 30 000 копій елемента *Opie* складає близько 10–15% 2400-мегабазного геному кукурудзи. Усього ретротранспозони групи *Ty1/copia* — *Opie* та *Ji*, а також LTR-вмісні ретротранспозони групи *Ty3/gypsy* — *Cinful*, *Grande* та *Huck* — складають понад 25% геному кукурудзи. Однак не всі родини ретротранспозонів присутні у великій кількості копій. Деякі представники ретротранспозонів групи *Ty1/copia* у кукурудзи — *Fourf*, *Victum* — представлені малою кількістю копій. У геномі кукурудзи при-

сутні сотні чи може й тисячі родин, що містять менше 100 елементів. Найкращими цільовими сайтами для вставки цих елементів часто є інші ретротранспозонні елементи («гніздові» ретротранспозони), які найчастіше локалізовані у міжгенних ділянках і надзвичайно рідко в самих генах. Очевидно, що «гніздова» структура ретроелемента є стандартною організацією міжгенних ділянок у кукурудзи. Ділянки поблизу теломер, центромер, вузликів (knobs), рибосомальних повторів ДНК чи інші подібні структури напевно є винятком з цього правила.

Цікаво, що елементи, які викликають мутації у кукурудзи, присутні у геномі у відносно малій кількості копій. Вони включають *Magellan* (від чотирьох до восьми копій на гаплоїдний геном), *Hopscotch* (від двох до шести копій) та *Bs1* (від однієї до п'яти копій). Представники родини *B5* у кількості лише від двох до чотирьох копій відповідальні за три незалежні мутації (*wxB5*, *wxG* та *bm-3*), у той час як елементи *Magellan* виявлено у двох мутантних алелях (*wxM* та *pl-987*), а *Stonor* виявлено як мутантну алель *wxStonor*. Мутація *wx-K* є результатом вставки *copia*-подібного ретротранспозона *Hopscotch*, який має одну довгу відкриту рамку зчитування, що кодує всі домени, необхідні для транспозиції

3.1.2. Надродина *Ty3/gypsy*

Мобільні генетичні елементи групи *Ty3/gypsy* мають подібність з вірусами родини *Retroviridae* (Kumar, Bennetzen, 1999; Bennetzen, 2000). Головною відмінністю ретровірусів від LTR-ретротранспозонів групи *Ty3/gypsy* є додаткова відкрита рамка зчитування (ORF) для кодування білків оболонки (ENV), необхідних для передачі ретровірусу від клітини до клітини. LTR-вмісні *Ty3/gypsy* ретротранспозони мають довжину від 4 до 15 т.п.н., довгі кінцеві повтори (LTR), відкриту рамку зчитування, в якій закодовані гени *gag* і *pol* (у випадку ретровірусів ще й ген *env*), і деякі додаткові гени (у випадку *Tat*-елементів і різних хромовірусів). Домен NTV розташовано із C-кінця гена *pol* після домену RH (RNase H) (див. рис. 3.1).

Згідно з даними, наведеними в огляді (Todorovska, 2007), виділяють дві основні підгрупи *gypsy*-подібних LTR-вмісних ретротранспозонів:

в екзон 12 гена *waxy* кукурудзи. Комп'ютерні пошуки у базі даних із застосуванням *Hopscotch* та інших рослинних *copia*-подібних ретроелементів виявили, що древні, вироджені ретротранспозонні вставки дуже близькі до 21 раніше сиквенованого рослинного гена. Ці елементи можуть бути задіяними у дуплікації генів і регуляції генної експресії.

Для малокопійних ретротранспозонів *Tos17* та *Tnt1A* описано їхні вставки у послідовності генів, засвідчуючи, що ретротранспозиція може значно впливати на соматоклональну мінливість (Grandbastien et al., 1989).

Жоден представник будь-якої великої родини транспозонів кукурудзи, таких як *Opie* (30 000 копій) або *Grande*, *Ji* чи *Huck* (усі представлені більш ніж 10 000 копій), не викликав якихось охарактеризованих мутацій кукурудзи, незважаючи на те, що деякі з транспозонів є здебільшого інтактними і здатними до подальшої транспозиції. Тому припускається, що може бути причинно-наслідковий зв'язок між розміром родини МГЕ і схильністю вставлятися у гени. Тобто елементи з дуже великих родин можуть процвітати, оскільки вони мають цільовий сайт переваги й уникають мутуючих генів кукурудзи. (Деталі і посилання див.: Todorovska, 2007.)

- *gypsy*-подібні (*Bagy-1*, *Cereba*, *Fatima*, *Kulkuri*, *Latidu*, *Laura*, *Lolaog*, *Romani-Hv1*, *-Hv-2*, *-Hv-3*) та
- *gypsy*-подібні *env*-вмісні (*Bagy-2*, *Sabrina*, *R173*, *Wham*, *Wobi*, *Egug*).

Ці ретротранспозони широко розповсюджені у рослинному царстві, особливо у *Triticeae*. *Env*-вмісні *gypsy*-подібні LTR-вмісні ретротранспозони є не надто рідкісними, вони формують частину окремого і широко розповсюдженого кладу, який виявлено у всіх квіткових рослин. Серед *gypsy*-подібних *env*-вмісних ретротранспозонів добре відомі елементи *Bagy-2* у ячменю і його гомолог *Rigy-2* у рису. Послідовності із двох клонів *Bagy-2* (AF254799 та AJ279072) вказують, що розмір даного елемента близько 10 т.п.н. і містить LTRs довжиною 1520–1537 п.н. та внутрішню білок-кодувальну ділянку, організовану подібно до інших *gypsy*-подібних елементів. Ці LTRs є відносно довгими як для рослин-

них ретротранспозонів, так і для LTRs інших ретротранспозонів ячменю — *BARE-1*. Безпосередньо поблизу 5'-кінця LTR міститься гаданий праймерзв'язувальний сайт (PBS), 17 із 18 нуклеотидів якого ідентичні на тРНК-Glu *Schizosaccharomyces pombe*, що міститься на 3'-кінці. Використання тРНК-Glu є доволі незвичним для рослинних ретротранспозонів, воно виявлено також для *gypsy*-подібного *env*-вмісного елемента *Cyclops-2* бобових. На один нуклеотид вище 3'-кінця LTR-послідовності *Bagy-2* міститься поліпуриновий тракт (PPT), який ідентичний такому інших *gypsy*-подібних елементів, таких як *Athila*, і дуже подібний до *Cyclops-2* (спільними є 12 із 14 нуклеотидів). Вивчена амінокислотна послідовність внутрішнього домену *Bagy-2*, що охоплює GAG, PR, RT, RH та INT, також значною мірою подібна до такої *Athila* (*Arabidopsis thaliana*) та *Cyclops-2* (гороху) і *gypsy*-подібна за порядком доменів. Поширеність ретротранспозона *Bagy-2* є порівняною із такою *BARE-1*, що налічує приблизно 104 копії у геномі ячменю.

Відомий також рисовий гомолог (*Rigy-2*) ячмінного *Bagy-2*. Описані чотири копії *Rigy-2* містять інші ретротранспозони, вбудовані в них. Консенсусний елемент містить LTRs розміром 1171 п. н., а загальний його розмір складає 9753 п. н.

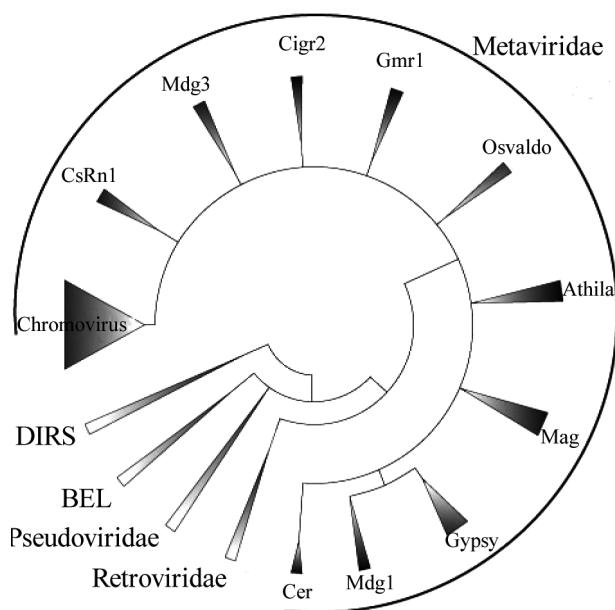


Рис. 3.7. Класифікація мобільних генетичних елементів групи Metaviridae (за: Сормачева, Блинов, 2011)

Як *Bagy-2*, так і *Rigy-2* містять ділянку, положення і структура якої відповідають *env* на 3'-кінці внутрішнього домену. Присутність *env* підтверджено методом ампліфікації геномної ДНК ячменю та отриманням ВАС-клонів ячменю із застосуванням праймерів, фланкуючих *env*-домен. У ячменю *env*-вмісний *gypsy*-подібний елемент *Bagy-2* транскрибується в усіх досліджених тканинах, а транскрипти *Bagy-2* зазнають сплайсингу, генеруючи субгеномний *env*-продукт у спосіб, подібний до такого у ретровірусів. Гадані поліпептиди оболонки *Bagy-2* та *Rigy-2* містять передбачувані сайти N-глікозилювання, лейцинову застібку і трансмембранні домени, характерні для ретровірусних ENVs. Для елемента *Bagy-2* є властивим інсерційний поліморфізм навіть серед споріднених сортів ячменю, засвідчуючи недавню транспозиційну активність. (Деталі і посилання див.: Todorovska, 2007.)

Згідно з класифікацією Міжнародного комітету по таксономії вірусів (ICTV) надродину *Ty3/gypsy* було названо Metaviridae і поділяють її на три групи: Metaviruses, Errantiviruses і Semotiviruses (див. рис. 3.2) (Havecker et al., 2004). Філогенетичний аналіз метавірусів дозволив виділити у складі Metaviridae 11 родин: *Chromovirus*, *CsRn1*, *Mdg3*, *Cigr2*, *Gmr1*, *Osvaldo*, *Athila*, *Mag*, *Gypsy*, *Mdg1* і *Cer* (рис. 3.7).

Однак згідно з результатами останнього філогенетичного аналізу, проведеного на основі послідовностей доменів PR, RT, RH і INT, *Ty3/gypsy* LTR-ретроелементи поділяють на дві групи (Llorens et al., 2009) (рис. 3.8):

- до першої групи відносять всі хромодомен-INT-вмісні LTR-ретротранспозони (альтернативна назва хромовіруси). Ця група включає два кластери, названі «Plants» (родина *CRM*, *Galadriel*, *Reina*, *Del*, *REM G-Rhodo*) і «Fungi/Vertebrates» (родина *TF-2*, *Pyggy*, *MGLR3*, *Maggy*, *Mar1*, *Pyret*, *V-clade*), а також три родини (*Ty3*, *Skipper*, *Tse3*), які не входять до складу кластерів «Plants» і «Fungi/Vertebrates». Пізніше у геномах рослин було знайдено хромодомен-INT-вмісні LTR-ретротранспозони родин *Modred* і *Galahad*. Родина хромодомен-INT-вмісні LTR-ретротранспозони *Tsn1* була виявлена у геномах мохів, плаунів і грибів (Novikova et al., 2010);



Рис. 3.8. Філогенетичне дерево *Ty3/gypsy* LTR-вмісних ретротранспозонів, побудоване на основі послідовностей гена *pol* (Llorens et al., 2009; цит. за: Сормачева, Блинов, 2011)

- до другої групи входять LTR-ретротранспозони рослин і тварин, які не містять хромодомів: *Athila/Tat* (*Athila*-like, *Tat*-like), *CsRN1*, *412/mg1*, *Errantiviruses* (17,6, *Gypsy*), *Oswaldo*, *Gmr1*, *Cer2-3*, *Mag*, *Tor1*, *Tor2*, *Tor4*, *Cigr-1*, *Micropia/Mdg3*.

Більшість родин *Ty3/gypsy* LTR-вмісних ретротранспозонів є специфічними для певних таксономічних груп живих організмів. Наприклад, представники родини *Athila* описані виключно для рослин (Writh, Voytas, 2002). Єдина філогенетична група, розподіл якої охоплює практично всі еукаріотичні організми, — це хромомен-INT-вмісні LTR-ретротранспозони (*Chromovirus*) (Gorinsek et al., 2004). Розглянемо детальніше деяких представників цих двох груп *Ty3/gypsy* LTR-вмісних ретроелементів.

Група 1. Хромомен-INT-вмісні LTR-ретротранспозони. Альтернативні назви: клас В або *Ty3*-група. Представники цієї групи містять хромомен (CHR) на С-кінці домену інтегрази. *Ty3*-група є однією з найдавніших і найпоширеніших груп елементів надродини *Ty3/gypsy*. Елементи цієї групи, розповсюджені у геномах рослин і зелених водоростей, об'єднані у кластері «Plants» і поділяються на такі родини:

- родина *CRM*. Її елементи є центромер-специфічними ретротранспозонами рослин, послідовність хромомену яких суттєво відрізняється від загального консенсуса хромоменів. *CRM*-елементи мають таку структуру: центральна частина довжиною 6–7 т.п.н., облямована (фланкована) довгими кінцевими повторами довжиною 850–

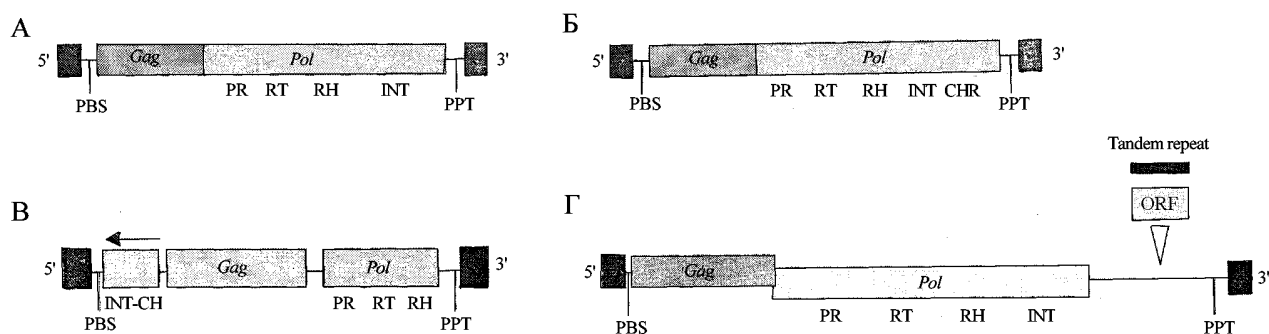


Рис. 3.9. Структурна організація *Ty3/gypsy* LTR-вмісних ретротранспозонів різних родин:
 А — родина *CRM*; Б — родини *Galadriel*, *Del* (*Tekay*) і *Reina*; В — LTR-вмісний ретротранспозон *REM1*;
 Г — родини *Athila* і *Tat-like* (*Tat*-подібна) (за: Сормачева, Блинов, 2011)

1100 п. н., містить сайт зв'язування праймера (PBS), дві відкриті рамки зчитування канонічних генів *gag* і *pol* та поліпуриновий тракт (PPT) поблизу 3'-LTR (рис. 3.9, А);

- родина *Galadriel*. Її елементи мають таку структуру: центральна частина довжиною 5,2–6,0 т. п. н., фланкована кінцевими повторами довжиною 600–800 п. н., яка містить сайт PBS, дві відкриті рамки зчитування генів *gag* і *pol* та поліпуриновий тракт (PPT) поблизу 3'-LTR (рис. 3.9, Б);
- родина *Reina*. Її елементи мають довжину 4,7–5,0 т. п. н., містять LTR довжиною 300–400 п. н., центральна ділянка містить дві відкриті рамки зчитування генів *gag* і *pol*, сайт PBS і PPT поблизу 3'-LTR (рис. 3.9, Б);
- родина *Del* (*Tekay*). Вона представляє собою групу елементів розміром 6,2–10,2 т. п. н. з кінцевими повторами довжиною 1,1–4,4 т. п. н., які містять дві відкриті рамки зчитування генів *gag* і *pol*, сайт PBS і PPT поблизу 3'-LTR (рис. 3.9, Б);
- родина *REM*. Ця родина представлена одним елементом *REM1* із геному зеленої водорості *Chlamydomonas reinhardtii*. Елемент *REM1* довжиною 5,8 т. п. н. має таку структуру: LTRs

довжиною 276–286 п. н., PBS і PPT поблизу 3'-LTR, центральна частина містить три відкриті рамки зчитування — дві, які кодують типові гени *gag* і *pol* у прямому напрямку, і третя кодувальна частина інтегрази і хромодомена — у зворотному напрямку (рис. 3.9, В).

Група 2. LTR-ретротранспозони, які не містять хромодомена. У цій групі транспозонів, виявлених у геномах рослин, існує один кластер — *Athila/Tat*. Він розділяється на дві родини — *Athila* і *Tat*:

- родина *Athila*. Елементи цієї родини містять у своїй структурі ген оболонки *env* і розглядаються як потенційні ретровіруси, тоді як елементи родини *Tat* і є власне LTR-ретротранспозонами;
- *Tat-like* родина. LTR-ретротранспозони цієї родини мають величезні розміри — 10–21 т. п. н. Центральна частина елемента фланкована LTR довжиною 0,5–1,0 т. п. н. і містить сайт PBS, гени *gag* і *pol*, некодуючу ділянку варіабельного розміру і тракт PPT поблизу 3'-LTR (рис. 3.9, Г). Деякі елементи містять антиспрямовані рамки зчитування у нетрансльованій ділянці, які ще мало вивчені.

3.1.3. Надродина *Bel/Pao*

Першими описаними елементами надродини *Bel/Pao* були такі елементи, як *Pao* (*Bombyx mori*), *Bel* (*Drosophila*), *Tas* (*Ascaris lumbricoides*) і різні *Cer-like*-елементи із геному *Caenorhabditis elegans*. Елементи надродини *Bel/Pao* аналогічно елементам *Ty3/gypsy* містять кодувальну ділянку з генами *gag-pol* (GAG-PR-RT-RH-

INT) і ген *env* (у випадку ретровірусів). Розміри елементів цієї надродини варіюють у межах 4–10 т. п. н.

Надродину *Bel/Pao* поділяють на такі родини: *Bel*, *Tas*, *Pao*, *Sinbad* та *Suzu* (рис. 3.10) (Copeland et al., 2005). У геномах рослин представників надродини *Bel/Pao* не знайдено.

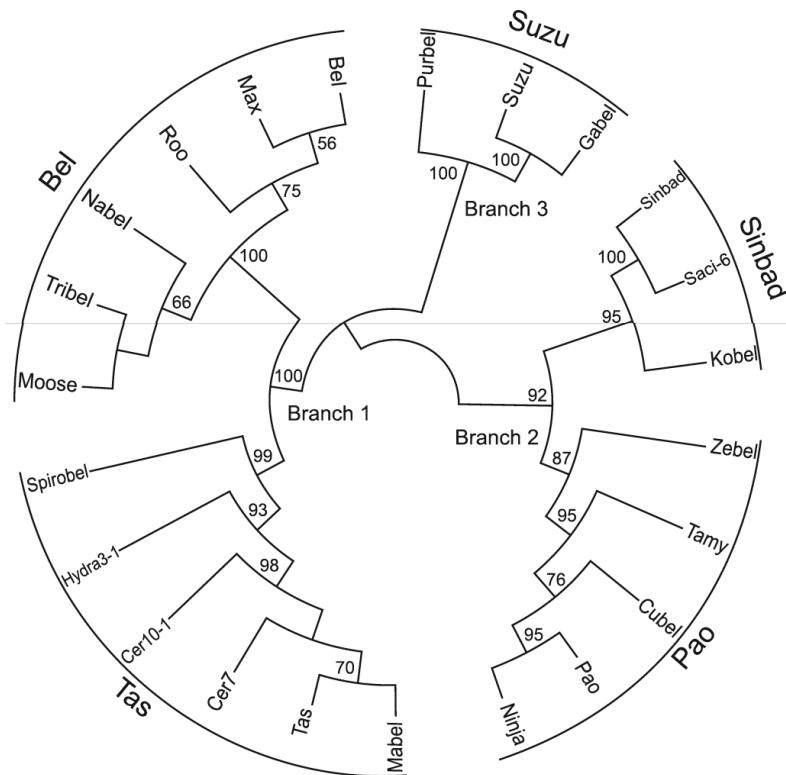


Рис. 3.10. Філогенетичне дерево надродини *Bel/Pao* LTR-вмісних ретротранспозонів, побудоване на основі послідовностей гена *pol* (Llorens et al., 2009; цит. за: Сормачева, Блинов, 2011)

Таким чином, наразі у геномах рослин знайдено й описано такі LTR-вмісні ретротранспозони:

- *Sire*, *Oryco*, *Retrofit*, *Tork* і *Osser* (надродина *Ty1/copia*);

- *CRM*, *Galadriel*, *Reina*, *Del*, *REM*, *Galahard*, *Modred*, *Ten1*, *Athila* та *Tat* (надродина *Ty3/gypsy*).

3.1.4. Філогенія і транспозиційна активність *Ty1/copia* та *gypsy*-подібних ретротранспозонів у геномах злаків

Застосування ретротранспозонів для маркерних систем надає можливість простежити за інсерційним процесом і наступним вертикальним розповсюдженням МГЕ за допомогою генеалогічного чи філогенетичного аналізу.

Побудовано філогенетичні дерева для ячменю і пшениці, а також проведено порівняння з іншими попередньо визначеними ретротранспозонами *Ty1/copia* у цих та інших видів з Gramineae. Виявлено, що популяція ретротранспозонів ячменю надродини *Ty1/copia* складається з дуже гетерогенної низки ретротранспозонів, а також із набору послідовностей, що близькоспоріднені з елементом *BARE-1*. Це і не дивно, оскільки більшість окремих копій рослинних ретротранспозонів групи *Ty1/copia*, очевидно, виникли на

початку еволюції цього виду і є неактивними, а за відсутності селективного тиску можуть накопичувати мутації у великій кількості (нуклеотидні заміни, делеції чи інсерції).

Переважаючою мішенню деяких з них є інші ретротранспозони, що веде до порушення кодувального потенціалу і створення дуже гетерогенної групи ретротранспозонів *Ty1/copia*, що показано для багатьох родин ретротранспозонів *Ty1/copia* у кукурудзи. Пшениця також містить дуже різноманітні популяції ретротранспозонів *Ty1/copia* (*W* родина), більшість з яких формують нові підгрупи, більш споріднені з підгрупою *Tta12 BARE-1* та іншою підгрупою *Tta15*, а також з ретротранспозонними послідовностями, що не мають близької гомології з ними

і які складають іншу, ще мало вивчену групу транспозонів пшениці. Порівняння всіх відомих ретротранспозонів групи *Ty1/copia* у видів, що належать до Gramineae, виявляє кілька цікавих моментів. Близькоспоріднені з *BARE-1* гомологічні послідовності виявлено також у жита і вівса. Це є свідченням того, що близька гомологія з *BARE-1* широко розповсюджена серед ретротранспозонів триби Triticeae. У рисі ретротранспозонні послідовності групи *Ty-1/copia* є менш численними. Деякі представники цієї групи ретротранспозонів є членами надродини *Tta15* пшениці, але ніякої гомології не виявлено із ретротранспозонами групи *Ty1/copia* інших видів, що належать до Gramineae.

Група *gypsy*-подібних ретротранспозонів є також гетерогенною у Gramineae, що скоріше за все пов'язано із присутністю/відсутністю *env*-домену. Зі свого боку, *env*-послідовності *gypsy*-подібних ретротранспозонів також складають дуже гетерогенну групу. Значний розмір і різноманіття послідовностей у білків ретровірусної оболонки не дозволяє використовувати для ампліфікації праймери *env*-послідовностей у неспоріднених видів рослин. Щоб показати повсюдність *env*-містких *gypsy*-подібних елементів у рослин, таке

різноманіття послідовностей змушує застосовувати різні підходи на основі використання праймерів не для ENV, а для домену зворотної транскриптази, тобто RT-домену. На основі цього підходу і подальшої класифікації 328 *gypsy*-подібних RT-послідовностей відомих ретротранспозонів і бази даних усіх організмів, побудованих на основі попередніх класифікацій, продемонстровано наявність цього класу ретроелементів у всіх досліджених донині геномах квіткових. Побудоване на основі цих послідовностей філогенетичне дерево показало, що рослинні *gypsy*-подібні елементи діляться на дві генеалогічні лінії: в одній зовсім немає *env*-доменів, а інша містить послідовності, ампліфіковані разом із іншими елементами, що містять *env*-подібні чи довгі 3'-ділянки. Згідно з цим деревом генетичну характеристику кладу *Athila gypsy*-подібних *env*-вмісних ретротранспозонів (*Bagy-2*, *Rigy-2*, *Athila*, *Calipso*, *Cyclops*) можна пояснити розповсюдженням між видами шляхом горизонтального перенесення. Це підтверджує припущення про те, що рослинні ENVs можуть відігравати внутрішньоклітинну чи внутрішньорослинну, а не інфекційну роль у реплікації елемента або у переміщенні від клітини до клітини в межах рослини.

3.2. Автономні та неавтономні ретротранспозони

Для мобільних генетичних елементів класу 2 (ДНК-транспозонів) автономність залежить від здатності окремих елементів експресувати фермент транспозазу і тим самим здійснювати власне переміщення. Неавтономні елементи є нащадками автономних, які накопичили низку мутацій. Наприклад, автономний елемент *Ac* кукурудзи, загубивши ORF транспозази, перетворюється у неавтономний елемент *Ds* (див. рис. 2.1).

Однак, оскільки елементи класу 1 (ретротранспозони) переміщуються за реплікативним механізмом, питання про автономність такого елемента носить складніший характер. Якщо індивідуальні неавтономні елементи класу 1 спроможні реплікуватися, незважаючи на втрату автономності, то вони формують групи близьких неавтономних елементів (Sabot, Schulman, 2006). Таким чином, поняття «автономний/неавтономний» у випадку ретротранспозонів застосовується на рівні групу та родин.

Родини ретротранспозонів, які містять індивідуальні ретроелементи, здатні до кодування необхідних для транспозиції білків, вважаються автономними. Індивідуальні копії можуть бути в різному ступені транскрипційно або трансляційно компетентними (трансляція приводить до формування функціональних білків) або активними (Sabot, Schulman, 2006).

Активні елементи можуть брати участь у деяких стадіях життєвого циклу неактивних або некомплементарних елементів тієї ж родини (*cis*) й інших родин чи груп (*trans*), доповнюючи таким чином їхній життєвий цикл. У цьому випадку неактивні елементи тієї самої родини виступають як паразити активних елементів, знижуючи їх здатність до розповсюдження. Аналогічне явище відоме у випадку негативної інтерференції вірусів і їх паразитизму відносно інших вірулентних вірусів (Hu et al., 1997). Некомпетентний елемент, який успішно розпо-

всюджується трансляційно, може сформувати нову підродину і, в кінцевому підсумку, родину неавтономних елементів.

Виявлено великі структурно подібні групи ретротранспозонів, які не містять домени *Gag*, *Pol* або *Env*. Ці групи не є автономними, але окремі елементи можуть бути транскрипційно активними (Sabot, Schulman, 2006). Приклади неавтономних груп ретротранспозонів *LARD*, *TRIM* і *Morgane*:

- елементи групи *LARD* містять довгі кінцеві повтори і центральну консервативну частину, яка не кодує білки (Kalendar et al., 2004);

- *TRIMs* є досить короткими елементами, які містять тільки сигнали зворотної транскрипції (Witte et al., 2001);
- *Morgane*-елементи займають проміжне положення між автономними і повністю неавтономними і містять нефункціональні ділянки ORF гена *pol* (Sabot et al., 2006a).

Для груп *LARD*, *TRIM* і *Morgane* наразі не знайдено *trans*-активних елементів.

3.3. Життєвий цикл LTR-вмісних ретротранспозонів

Реплікативний механізм транспозиції ретротранспозонів у геномах хазяїв зумовлює високу інвазивність цього класу МГЕ. Забезпечення необхідної життєздатності організму хазяїна і, тим самим, власного виживання забезпечується жорстким контролем процесу ретротранспозиції, життєвого циклу транспозонів.

Етапами життєвого циклу LTR-вмісних ретротранспозонів є:

- транскрипція;
- трансляція;
- зворотна транскрипція;

- інтеграція нової копії у геном хазяїна (див. рис. 2.3).

Здійснення названих етапів забезпечують білки, закодовані послідовностями ретротранспозонів (рис. 3.11), а одним із найважливіших контрольних етапів є транскрипція, яка визначає утворення РНК-матриці та синтез мРНК, необхідної для синтезу білків.

Розглянемо особливості кожного з етапів детальніше, спираючись, переважно, на дані, наведені в огляді (Сормачева, Блинов, 2011).

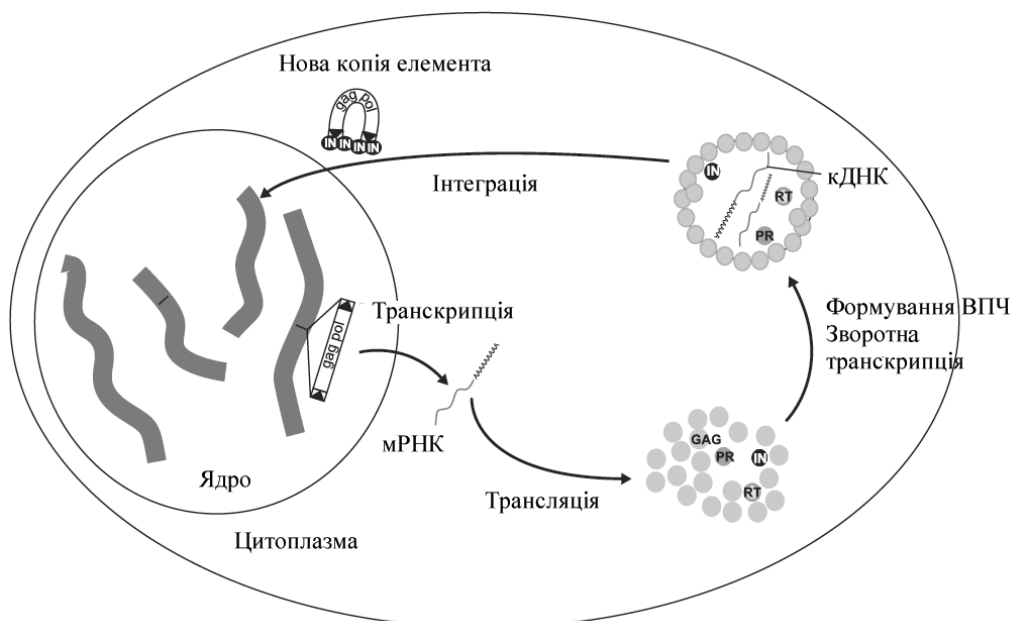


Рис. 3.11. Життєвий цикл LTR-вмісних ретротранспозонів:

ВПЧ — вірусоподібна часточка; GAG — білок, що формує ВПЧ; RT — зворотна транскриптаза; PR — протеаза; IN — інтеграза (Grandbastien, 2008; цит. за: Сормачева, Блинов, 2011)

3.3.1. Транскрипція

На першому етапі за допомогою клітинної РНК полімерази II відбувається транскрипція, яка починається з 5'-LTR 5'-R ділянки (нижче TATA box) і закінчується у 3'-R ділянці всередині 3'-LTR (Kumar, Bennetzen, 1999). У результаті транскрипції утворюється біцистронна мРНК, яка кодує, у всякому разі, дві ORF: Gag і Pol. мРНК ретротранспозонів, як правило, не містить інтронів, виняток становить *Orge*-елемент. Експресія ретротранспозонів, так само як і будь-яких інших генів з промоторами polII, залежить від факторів, які впливають на синтез мРНК клітини-хазяїна. Після транскрипції мРНК переноситься у цитоплазму так само, як і інші мРНК хазяйської клітини.

3.3.2. Трансляція

У випадку автономних елементів відбувається трансляція РНК у цитоплазмі з утворенням білків Gag і Pol. Трансляційний зсув між двома рамками зчитування може відбуватися різними способами. Сайт рибосом у випадку гена *gag* може бути універсальним, а сайт для гена *pol* — внутрішнім, менш ефективним. Це призводить до переважання продуктів трансляції Gag над Pol. У випадку ретровірусів даний дисбаланс, що є наслідком зсуву рамки зчитування, відповідає стехіометрії, яка необхідна для збирання вірусних часточок. Крім того, наявність внутрішнього сайту трансляції дозволяє індивідуальним елементам зі стоп-кодонами у ділянці гена *gag* здійснювати нормальну трансляцію гена *pol*. У другому варіанті послідовність мРНК між *gag* і *pol* може містити невеликий повторюваний мо-

У цілому рівень експресії LTR-вмісних ретротранспозонів навіть у випадку індукції стресом значно нижчий, ніж транскрипція «класичних» генів. Це, вірогідніше за все, пов'язано з тим, що LTR-ретротранспозони мають слабкі промотори, а також з дією клітинних механізмів інактивації. За вбудови за типом промоторної пастки («promoter-trap-like») ретротранспозони можуть експресуватися під «класичними» промоторами клітини. Деякі конкретні мобільні елементи мають альтернативні варіанти експресії, наприклад опосередкованої промотором polIII у випадку елемента *Cassandra TRIM* (Sabot, Schulman, 2006).

тив (наприклад, AAAAA), який викликає «протривання» рибосоми і проводить трансляцію по іншій рамці зчитування (Kovalchuk et al., 2005). Цей механізм зустрічається досить часто у вірусів рослин. Для зсуву рибосоми по мРНК можливе використання також рідкісних специфічних транспортних РНК. У випадку деяких ретротранспозонів рослин поліпротеїн, який містить Gag і Pol, може транслюватися без рамки зчитування. Наприклад, у випадку елемента *BARE-1* трансляція проходить по одній рамці зчитування і поліпротеїн у подальшому розщеплюється на функціональні одиниці. Посттрансляційний процесинг білка Pol (а також розщеплення поліпротеїну на Gag і Pol) у випадку елемента *BARE-1* проходить ендопроотеолітично за рахунок AP-домену білка Pol.

3.3.3. Формування нуклеокапсиду, упаковка і димеризація

Ретровірусний білок Gag має три функціональні ділянки (у багатьох досліджених випадках поліпротеїн Gag розщеплюється на окремі поліпептиди):

- капсидний домен (полімеризація);
- нуклеокапсидний домен (взаємодія з нуклеїновими кислотами);
- матрикс-домен (зв'язування з білками оболонки) (Adamson, Jones, 2004).

Білок Gag LTR-вмісних ретротранспозонів містить капсидний і нуклеокапсидний домени і ділянку, подібну з матрикс-доменом ретровіру-

сів. Формування вірусоподібних часточок (ВПЧ) необхідне для здійснення зворотної транскрипції специфічної РНК. ВПЧ формуються за полімеризації білка Gag за допомогою капсидного домену. Упаковка РНК (включення РНК до складу ВПЧ) проходить селективно для РНК, відповідної Gag, який формує ВПЧ (Sabot, Schulman, 2006). У випадку ретровірусів селективність визначається специфічною послідовністю PSI (packaging signal — сигнал упаковки), вторинна структура РНК пізнається структурами нуклеокапсидного домену Gag. Послідовність PSI, як правило,

розташована відразу ж після PBS перед старто-кодоном (AUG) гена *gag*. У випадку *HIV*- і *SIV*-like ретровірусів у PSI міститься послідовність, що відповідає за формування петлі, яка і забезпечує високий рівень специфічності. Для LTR-вмісних ретротранспозонів розташування послідовності PSI наразі не встановлено. Проте висока консервативність послідовності LTR-ретротранспозонів поблизу PBS дозволяє припустити схожий механізм упаковки для LTR-вмісних ретротранспозонів і ретровірусів. РНК неавтономних LTR-ретротранспозонів, які містять PSI послідовності, однакові з PSI послідовностями активних елементів, може бути упакована у різні ВПЧ. Ефективне розповсюдження неавтономних елементів у таких групах, як *TRIM* і *LARD*, показує, що, можливо, таким чином неавтономні елементи можуть уникнути наслідків відсутності власних функціональних білків (Sabot, Schulman, 2006).

РНК ретровірусів перебуває у димеризованому стані у складі ВПЧ. Формування димерів відбувається за рахунок специфічних послідовностей сигналу ініціації димеризації DIS

3.3.4. Зворотна транскрипція

Згідно з даними, наведеними у роботі (Sabot, Schulman, 2006), процес зворотної транскрипції (синтезу кДНК) у LTR-вмісних ретроелементів відбувається таким чином.

Зазвичай в одну ВПЧ упаковуються дві молекули РНК, а також тРНК, яка слугує первинною затравкою для синтезу мінус-ланцюга кДНК у процесі зворотної транскрипції. Сайт зв'язування тРНК (найчастіше за все це метіонінова тРНК) міститься на 5'-кінці РНК-матриці, тому в результаті зворотної транскрипції утворюється відносно коротка кДНК, яка має ділянку гомології як з 5'-, так і з 3'-LTR, а також несе тРНК на 5'-кінці. Одразу після синтезу мінус-ланцюга кДНК відбувається видалення ділянки РНК-матриці у комплексі РНК-кДНК за допомогою рибонуклеази H. Заново синтезована коротка кДНК переноситься і ренатурується на 3'-LTR, і продовжується побудова першого ланцюга кДНК (або мінус-ланцюга ДНК). На наступному етапі відбувається видалення РНК-матриці, за винятком ділянки так званої поліпуринової послідовності (PPT), яка виконує роль праймера у процесі синтезу другого ланцюга

(dimerization initiation signal), які беруть участь у розпізнаванні й взаємодії двох молекул РНК навіть за відсутності білків. Формування симетричної сигнальної петлі поблизу PSI приводить до нековалентної симетричної міжмолекулярної взаємодії (вона отримала у ретровірусів назву «kissing-loop complex»), яка у подальшому стабілізується (Paillart et al., 2004). Для LTR-вмісних ретротранспозонів виявлено димери лише для *Ty1*-елемента дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Однак існують непрямі підтвердження формування димерів і у випадку інших LTR-ретротранспозонів (Vicent et al., 2005).

Процес димеризації, як і процес упаковки, також є специфічним. Таким чином, неавтономні елементи повинні нести однакові з автономними елементами DIS (для формування специфічних гетеродимерів) або мати конкурентноздатну ефективність упаковки, яка дозволяє їм упаковуватися переважно у вигляді гомодимерів. Крім того, вони можуть димеризуватися з РНК, які містять інші DIS-сигнали (неспецифічні гетеродимери) (Sabot, Schulman, 2006).

кДНК (або мінус-ланцюга ДНК), тобто є вторинною затравкою. Після синтезу другого ланцюга кДНК вторинна затравка видаляється, а також відбувається видалення первинної затравки (тРНК), яка до цього етапу містилася на 5'-кінці першого ланцюга кДНК.

У процесі синтезу плюс-ланцюга ДНК, як і у випадку синтезу мінус-ланцюга, потрібно перенесення заново синтезованого ланцюга для продовження синтезу. Заново синтезована коротка ділянка плюс-ланцюга ДНК складається із LTR і розташованої поряд послідовності PBS, тобто на 3'-кінці є ділянка, гомологічна 3'-кінцю мінус-ланцюга ДНК. Присутність гомологічних ділянок дозволяє здійснити перенесення плюс-ланцюга кДНК і завершити синтез обох ланцюгів. Усі описані процеси відбуваються у вірусоподібних часточках у цитоплазмі. Наступним етапом є перенесення заново синтезованого LTR-вмісного ретротранспозона в ядро і вбудовування його у геном клітини хазяїна.

Процес зворотної транскрипції не є специфічним до певної РНК-матриці. Таким чином, мобільним елементам неавтономних груп не по-

трібна наявність будь-яких специфічних характеристик для того, щоб брати участь у зворотній транскрипції, окрім PPT та PBS сайтів. Цей етап не є лімітуючим етапом життєвого циклу LTR-ретротранспозонів. Хоча існують деякі варіації в PBS мотиві і його аналіз може показати, які саме родини LTR-ретротранспозонів здатні брати участь у зворотній транскрипції.

Реакція зворотної транскрипції проходить з похибкою, на 2–3 порядки вищою, ніж при роботі клітинної ДНК-полімерази ($2,5 \times 10^{-5}$ похибок/нуклеотид/цикл). Фермент-зворотна транскриптаза RT має вищий рівень похибок з таких причин:

- RT може продовжувати нарощування послідовності навіть без включення нуклеотида;
- RT менш чутлива до вбудовування неправильних нуклеотидів;
- RT не володіє 3'- та 5'-ендонуклеазною активністю;
- процес зворотної транскрипції супроводжується зсувом затравки відносно матриці (Voultabou et al., 2001).

3.3.5. Інтеграція нової копії LTR-вмісних ретротранспозонів у геном

Процес включення нової копії LTR-ретротранспозона у геном здійснюється за допомогою фермента інтегрази, яка впізнає і зв'язує кінці елемента (LTRs). Інтеграза робить асиметричний дволанцюговий розрив у сайті-мішені геномної ДНК, який, як правило, має довжину 2–16 пар основ. Природа сайту-мішені (розташування сайту в гетерохроматиновій ділянці, наявність вбудованих у нього раніше інших ретротранспозонів) впливає на вірогідність інтеграції ретро-елементів у даний сайт. Утворені дволанцюгові розриви з'єднуються системою репарації клітини хазяїна з формуванням дуплікацій на місці вбудови нового елемента (TSD). Процес вбудовування не потребує додаткової екзогенної АТФ або інших енергетичних інтермедіаторів.

Неавтономні ретротранспозони мають такі можливості для інтегрування у геном за рахунок автономних елементів:

- можуть містити специфічні сайти в LTRs, які збігаються з сайтами автономних елементів і розпізнаються інтегразою;
- можуть містити неспецифічні мотиви, які розпізнаються різними інтегразами;

Один із найскладніших моментів у зворотній транскрипції — це переключення між матрицями. Зазвичай переключення проходить між двома РНК-транскриптами, які упаковані разом, але воно може відбутися між двома незв'язаними РНК, упакованими в один і той самий нуклеокапсид. Це приводить до утворення химерних продуктів, таких як елементи *Veju_L* і *BARE-2*. Така похибка також може привести до утворення «комплексних» елементів, наприклад: LTR — внутрішня послідовність — LTR — внутрішня послідовність — LTR, фланкованих TSD. Подібні «складні» елементи часто трапляються у геномах представників Triticeae (Sabot et al., 2005a; Vicient et al., 2005). Як правило, вони містять два блоки елементів, але можуть складатися із трьох або й більше блоків. Послідовності LTR «складних» елементів дуже подібні між собою, так само як і внутрішні структури, що свідчить про їх загальне походження.

- припускається особливий тиск з боку клітини хазяїна на автономні елементи на користь неавтономних, завдяки якому неавтономним елементам потрібно тільки випередити автономні на етапах упаковки та зворотної транскрипції.

Інтеграція може бути неспецифічною, і потрібна тільки її достатня ефективність, щоби протистояти руйнуванню існуючих геномних копій мобільних елементів. Деякі рослинні ДНК, які містять віруси, особливо груп Geminivirus, Badnavirus і Caulimovirus, можуть інтегруватися у геном, не кодуючи при цьому інтегразу (Hull et al., 2000). Інтеграція неавтономних елементів групи *LARD*, вірогідніше за все, пояснюється третьою моделлю. Їхні вбудови, як правило, не типові, відсутні певні TSDs або повна послідовність *LARD*-елемента, і вони, очевидно, є результатом неспецифічної інтеграції. За інтеграції *TRIM*- та *Morgane*-елементів, навпаки, створюються TSDs, які є канонічними для LTR-вмісних ретротранспозонів (Sabot et al., 2005b, 2006a).

3.4. Регуляція активності LTR-вмісних ретротранспозонів

Транскрипційну активність описано лише для кількох МГЕ, переважно для LTR-вмісних ретротранспозонів. Більшість таких процесів було виявлено після транспозиції в ген хазяїна чи поблизу гена. Значну частину МГЕ виділено також після транспозиції в ген хазяїна чи поблизу нього. Більшість мобільних елементів було охарактеризовано за допомогою ПЛР-аналізу геномної ДНК чи кДНК. Докази ретротранспозиційної активності отримували при аналізі послідовностей LTR, які є ідентичними у копій, які щойно транспозували. Специфічні транскрипти, починаючи з LTR-елементів, було продемонстровано для ретротранспозонів тютюну (*Tnt1A* і *Tto1*), ячменю (*Bare-1*), рису (*Tos17*) і кукурудзи (*Huck*). Остаточну транскрипційну здатність LTR було підтверджено для *Tnt1A*, *BARE-1* та *Tto1* шляхом застосування конструктів, в яких репортерні гени поміщали під контроль LTR-елемента.

Згідно з даними, наведеними в огляді (Todorovska, 2007), онтогенетична регуляція експресії була показана для *Tnt1*, який експресується лише у коренях, та й то на дуже низькому рівні; для *Tto1*, *Tos10* та *Tos17*, які не експресуються в тканинах листка, і для мобільних елементів *B5*, *Hopscotch*, *Stonor* та *Magelan*, які не експресуються в рослинних тканинах. Експресію мобільного елемента кукурудзи *Prem-2* було виявлено лише в молодих мікроспорах. Експресію ретроелементів кукурудзи *Opie*, *Huck*, *Cinful* та елемента *BARE-1* ячменю спостерігали в тканинах листка.

Встановлено, що експресія ретротранспозонів у тварин і дріжджів перебуває під контролем гормональних і онтогенетичних чинників. Загальна картина регуляції експресії ретротранспозонів у рослин ще повністю не встановлена, оскільки відсутні порівняльні дослідження на різних тканинах рослин. За нормального розвитку транскрипція більшості активних рослинних МГЕ, охарактеризованих донині, здебільшого перебуває у латентному стані, але може бути індукована біотичними і/чи абіотичними стресами, включаючи культуру клітин, поранення й атаку патогенів (детальніше див. розділ 7).

Наявність у геномах рослин великої кількості послідовностей, які є неактивними LTR-ретротранспозонами, є результатом дії таких механізмів інактивації мобільних елементів на різних рівнях:

- метилювання ДНК;
- перетворення ділянок вбудовування в гетерохроматин;
- утворення так званих *solo*-елементів за рахунок нерівної рекомбінації всередині елементів;
- накопичення невеликих делецій за рахунок неточної рекомбінації (за: Сормачева, Блинов, 2011).

Відомо, що за рахунок останніх двох механізмів із геному рису (*Oryza sativa*) було видалено понад 190 т.п.н. ДНК ретротранспозонів за останні 4 млн років. Існує припущення, що вміст LTR-ретротранспозонів у геномах рослин визначається дією механізму регуляції ампліфікації ретротранспозона і створенням невеликих делецій у послідовності елемента (Bennetzen et al., 2005) (див. розділ 5).

З іншого боку, наявність великої кількості порушених копій і невеликої кількості активних LTR-ретротранспозонів у геномі є індикатором можливості деяких елементів уникнути пригнічення з боку клітини-хазяїна. До таких механізмів можливо віднести ефект специфічної хромосомної локалізації елементів, яка дозволяє їм уникнути сайленсингу. Інша можливість уникнути інактивації — висока варіабельність послідовностей мобільних елементів. У випадку послідовностей ретротранспозона тютюну *Tnt1* було показано, що промоторна ділянка, яка є основною мішенню для інактивації шляхом метилювання, найбільш варіабельна (Vernhettes et al., 1998). Однак перерахованих механізмів недостатньо для пояснення наявності великої кількості копій ретротранспозонів у геномах рослин.

Незважаючи на інактивацію LTR-ретротранспозонів у геномах рослин, цей процес набагато повільніший, ніж проліферація ретротранспозонів (Vitte, Panaud, 2005). Транскрипційна та транспозиційна активності значно варіюють серед різних груп LTR-ретротранспозонів (див. огляд: Сормачева, Блинов, 2011).

3.5. Поширення LTR-вмісних ретротранспозонів серед рослин

Вважається, що на Землі зростає понад 350 000 видів рослин. Описано з них близько 320 000 видів, серед яких — 280 000 квіткових, 1000 голонасінних, близько 16 000 мохоподібних і близько 12 000 видів вищих спорових рослин (плауноподібні, папоротеподібні, хвощеподібні) (Mougeott et al., 2009).

У геномах рослин виявлено велику кількість родин LTR-вмісних ретротранспозонів (рис. 3.12). Так, у геномі маніоки (*Manihot esculenta*) виявлено 59 родин *Ty1/copia* і 26 родин *Ty3/gypsy*-елементів, а у геномі сої — 353 родини *Ty1/copia* і 157 родин *Ty3/gypsy*-ретротранспозонів (Du et al., 2010), та лише деякі з них мають

значну кількість копій у геномах. Понад 85% LTR-ретротранспозонів із геному кукурудзи складають представники 5-ти основних родин. У геномі дикого рису *Oryza australiensis* за останні 3 млн років накопичилося понад 90 тис. копій LTR-ретротранспозонів, які належать усього до трьох родин, що привело до подвоєння розміру геному (Piegu et al., 2006). *Ty1/copia*-елементи *Bare-1* із геному ячменю та *Opie-1* і *Huck2* із геному кукурудзи представлені у кількості 20–200 тис. копій. *Ty3/gypsy*-елемент *Cinful-1* представлений у кількості близько 20 тис. копій у геномі кукурудзи (цит. за: Сормачева, Блинов, 2011).

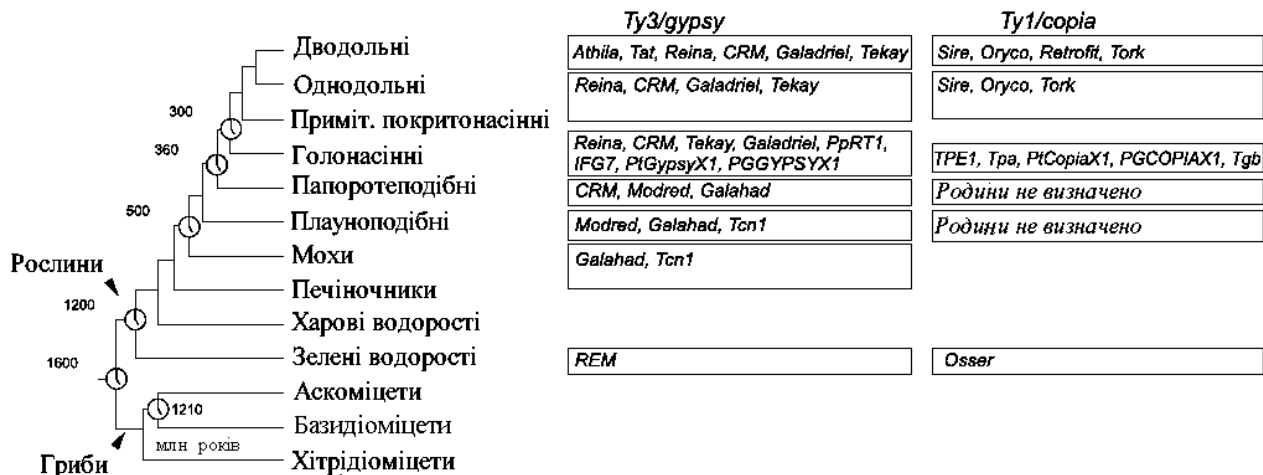


Рис. 3.12. Філогенетичне дерево рослин та водоростей і розподіл основних груп LTR-вмісних ретротранспозонів за рослинними таксонами

Цифри зліва позначають час, млн років (за: Сормачева, Блинов, 2011)

3.5.1. LTR-ретротранспозони покритонасінних рослин

Ретротранспозони групи *Ty1/copia* розповсюджені у геномах представників практично всіх груп царства рослин: одноклітинних водоростей, мохоподібних, голонасінних і покритонасінних. Представники надродини *Ty3/gypsy* широко представлені у геномах голонасінних і покритонасінних рослин і деяких зелених водоростей. У випадку видів з великими геномами, таких як кукурудза (*Z. mays*), ячмінь (*H. vulgare*) та пшениця (*T. aestivum*), LTR-ретротранспозони можуть складати понад 70–80% від їхніх геномів (Vicent et al., 1999; Wicker et al., 2001; Bruggmann et al., 2006). У геномах з відносно

маленьким розміром геному, наприклад у арабідопсиса, на ретротранспозони припадає всього 4–8% геному (Kumar, Bennetzen, 1999) (див. рис. 2.2).

Перші LTR-ретротранспозони рослин були виявлені під час вивчення поліморфізмів геномів. Наступні спроби вивчення цільових генів за створення малих геномних бібліотек також привели до випадкового описування LTR-ретротранспозонів. Деякі родини були відкриті під час вивчення повторюваних послідовностей у гетерохроматинових або центромерних ділянках. У подальшому активний розвиток проектів

із секвенування геномів відкрив доступ до великих геномних послідовностей рослин і сприяв опису нових LTR-ретротранспозонів. Так було у випадку видів рослин, які мають велике сільськогосподарське значення, таких як ячмінь, кукурудза, рис, пшениця, томати тощо. Велика частина інформації про різноманіття, розповсюдження й еволюцію LTR-вмісних ретротранспозонів обмежується видами, які мають сільськогосподарське значення, і модельними об'єктами, такими як *A. thaliana*. Наразі у геномах більше ніж 20 видів покритонасінних рослин описано тисячі родин LTR-вмісних ретротранспозонів, наприклад, тільки у геномі сої (*G. max*) їх виявлено 510 родин (Du et al., 2010).

3.5.2. LTR-ретротранспозони голонасінних рослин

Більшість голонасінних мають відносно великі розміри геномів, більше 20 000 млн п. н. у випадку родини Pinaceae порівняно з геномом *A. thaliana* (130–140 млн п. н.) або 5500 млн п. н. — з геномом ячменю (*H. vulgare*). Проте поліплоїдія відіграє незначну роль в еволюції голонасінних.

Важливими компонентами геномів голонасінних є *Ty1/copia*- і *Ty3/gypsy*-ретротранспозони, вони представлені великою кількістю родин.

У геномах представників роду *Pinus* (*P. eliotii*, *P. palustris*, *P. echinata*, *P. caribaea*, *P. oocarpa*, *P. banksiana*, *P. massoniana*, *P. resinosa*) широко розповсюджена родина *TPE1* (*Ty1/copia*). *TRE1*-елементи також широко представлені у геномах ялин (*Picea strobus*, *P. abies*, *P. glauca*), але в геномах кипарису *Taxodium distichum* та гінкго *Ginkgo biloba* вони представлені невеликою кількістю копій. Представники цієї родини мобільних елементів містять різні мутації: стоп-кодони, зсуви рамок зчитування і є неактивними (Kamm et al., 1996).

Менше відомо про *Ty3/gypsy*-ретротранспозони із геномів голонасінних. У геномі *Pinus radiata* виявлено єдиний повний *Ty3/gypsy*-елемент *IFG7*, а у геномі *Pinus pinaster* — перший повний *Ty3/gypsy*-елемент *PpRT1* (Rocheta et al., 2007). Елемент *PpRT1* має довжину 5966 п. н. і типову для *Ty3/gypsy*-ретротранспозонів структуру.

Порівняння нуклеотидних послідовностей елементів *IFG7* і *PpRT1* показало високу подібність (88%), а послідовності інтегрази і зворотної транскриптази повністю ідентичні. Однак послідовності 5'-LTR і 3'-LTR елемента *PpRT1* відрізняються, що є результатом накопичених мутацій. Кількість копій елементів *IFG7* і *PpRT1* різняться. Наприклад, *IFG7* представлений великою кількістю копій у геномі *Pinus*

radiata, а *PpRT1* присутній у геномі *Pinus pinaster* в однині. (Дані щодо поширення цих та інших специфічних для хвойних ретроелементів з відповідними посиленнями на першоджерела наведено в огляді: Сормачева, Блинов, 2011.)

Розподіл різних LTR-ретротранспозонів серед представників голонасінних широко варіює. Так, розповсюдження *Tpa43* (*Ty1/copia*) обмежено лише хвойними рослинами роду *Picea*, де цей елемент представлений великою кількістю копій. У геномах представників роду *Picea* присутні елементи *Tpa17* і *Tpa35*, але вони практично не виявлені у геномах *Pinus*. Інші ретротранспозони розповсюджені у геномах багатьох еволюційно віддалених груп. Так, гомологи *Ty1/copia*-елемента *Tpa29* із *Picea* знайдені в геномах родів *Abies* і *Ginkgo*, а елемент *Tpa27* — у геномах *Picea*, *Abies*, *Ginkgo*, *Pinus*, *Cedrus* і *Larix* (Stuart-Rogers, Flavell, 2001).

Рівень подібності послідовностей *Ty1/copia*-елементів із різних видів голонасінних — найвищий серед детектованих для різних груп рослин.

Висока подібність, можливо, є результатом горизонтального перенесення. Зокрема, вважають, що *Tpa28* й інші елементи з високою гомологією були перенесені горизонтально в один або й обидва роди *Ginkgo* чи *Picea* набагато пізніше, ніж відбулася їх дивергенція. У подальшому кількість їхніх копій збільшилась, у послідовностях накопичилися мутації, і наразі вони представлені у геномах великою кількістю дефектних копій. Однак сигнал гібридизації *Ty1/copia*-елементів корелює з еволюційною відстанню між досліджуваними групами, внаслідок чого можливість впливу горизонтального перенесення на еволюцію *Ty1/copia*-елементів голонасінних не виключається повністю, але висока подібність послідовностей може бути пояснена

і вертикальним успадкуванням (Stuart-Rogers, Flavell, 2001).

Важливим є питання — чому саме елементи голонасінних, а не покритонасінних рослин мають таку високу подібність, хоча ніякої значної різниці між змінами в ядерних генах цих груп не спостерігається? Цікавою моделлю, що пояснює цю відмінність, є модель, в якій вища частота трапляння близьких гомологів ретротранспозонів пояснюється не як результат різниці у накопиченні мутацій, а як результат зникнення елементів із геномів. Зникнення (втрата) мобільних елементів проходить набагато активніше у покритонасінних, ніж у голонасінних. Велика відмінність у розмірах геномів характерна для покритонасінних, крім того, такі зміни можуть пройти за кілька мільйонів років, у той час як геноми голонасінних стабільніші. Наприклад, усередині роду *Pinus*, вік якого складає близько 200 млн років, усі види диплоїдні, мають однакову кількість

хромосом і близький розмір геному. У великих геномах з постійним розміром може зберігатися велика кількість копій різних ретротранспозонів, але невеликий розмір геному накладає обмеження на кількість копій ретротранспозонів, створює конкуренцію між різними групами і може привести до елімінації ретротранспозонів з низькою кількістю копій. Таким чином, якщо прашури покритонасінних мали невеликий розмір геному, то з них могли бути еліміновані багато видів прашурних ретротранспозонів, які при цьому збереглися у стабільніших геномах голонасінних (Stuart-Rogers, Flavell, 2001).

У цілому геноми голонасінних рослин відрізняються від геномів покритонасінних більш давнім походженням, а також розповсюдженням, різноманіттям і ступенем дивергенції LTR-вмісних ретротранспозонів порівняно з молодшими мобільними генетичними елементами покритонасінних.

3.5.3. LTR-ретротранспозони вищих безнасінних рослин

Тепер розглянемо LTR-вмісні ретротранспозони деяких спорових рослин, а саме: плауноподібні (Lycopodiophyta), мохоподібні (Bryophyta), хвощеподібні (Equisetophyta) та папоротеподібні (Polypodiophyta).

Серед представників мохоподібних хромомен-вмісні *Gypsy* LTR-ретротранспозони вивчені у геномі модельного виду *Physcomitrella patens* і деяких інших видів мохів. У геномах Bryophyta виявлено 4 специфічні для мохів групи хромомен-вмісних *Gypsy* LTR-ретротранспозонів: А, В, С, D (рис. 3.13). Більшість ретротранспозонів мохів, зокрема *PpatensLTR1*, *PpatensLTR2*, *PpatensLTR3*, *PpatensLTR4* із геному *P. patens*, належить до групи А. Група В виявлена тільки у мохів *Plagiothecium laetum*. Група С представлена ретротранспозонами із *Fungaria hygrometrica*. Ретротранспозони із *Tetraphis pellucida* і *Vesicularia dubyana* сформували окрему групу D (*Galahad*) (Novikova et al., 2010).

Ретроелементи, виявлені у геномах мохів, еволюційно далекі від хромомен-вмісних *Gypsy* LTR-ретротранспозонів інших груп рослин. *PpatensLTR* й інші елементи групи А ближчі до грибних *Tcn1*-ретротранспозонів, ніж до груп *Galadriel*, *Reina*, *CRM* та *Tekay* (хромомен-вмісних *Gypsy* LTR-ретротранспозонів), описа-

них для рослин. Можливо, цей факт є наслідком горизонтального перенесення. Відповідно до іншої гіпотези до такого розподілу ретротранспозонів у мохів привела вертикальна еволюція, оскільки еволюційна динаміка мобільних елементів може значно різнитися навіть у близькоспоріднених таксонів. Як результат, дуже часто філогенетичні зв'язки, побудовані на основі дивергенції мобільних елементів, не збігаються з філогенією видів, у яких ці мобільні елементи містяться (Novikova et al., 2010). Понад те, у геномі *P. patens* проведено дослідження, які показали, що так звані «збережені гени», можливо, дісталися мохам від їхніх загальних з насінневими рослинами прашурів, у той час як в останніх вони встигли загубитися (Reski, Frank, 2005; Rensing et al., 2005; Stenoien, 2007). Висока вірогідність того, що мохи просто зберегли ці ретротранспозони.

Pteridium aquilinum (орляк) є найрозповсюдженішою папороттю, в її геномі знайдено 183 *Ty1/copia*- та 195 *Ty3/gypsy*-елементів, що складає 0,07 і 0,09 % геному, відповідно, а це більше, ніж кількість мобільних елементів усіх останніх груп (Der et al., 2011). Однак дані елементи мало описані, частина із *Ty3/gypsy*-елементів формують групу, яка є сестринською до групи С мохів

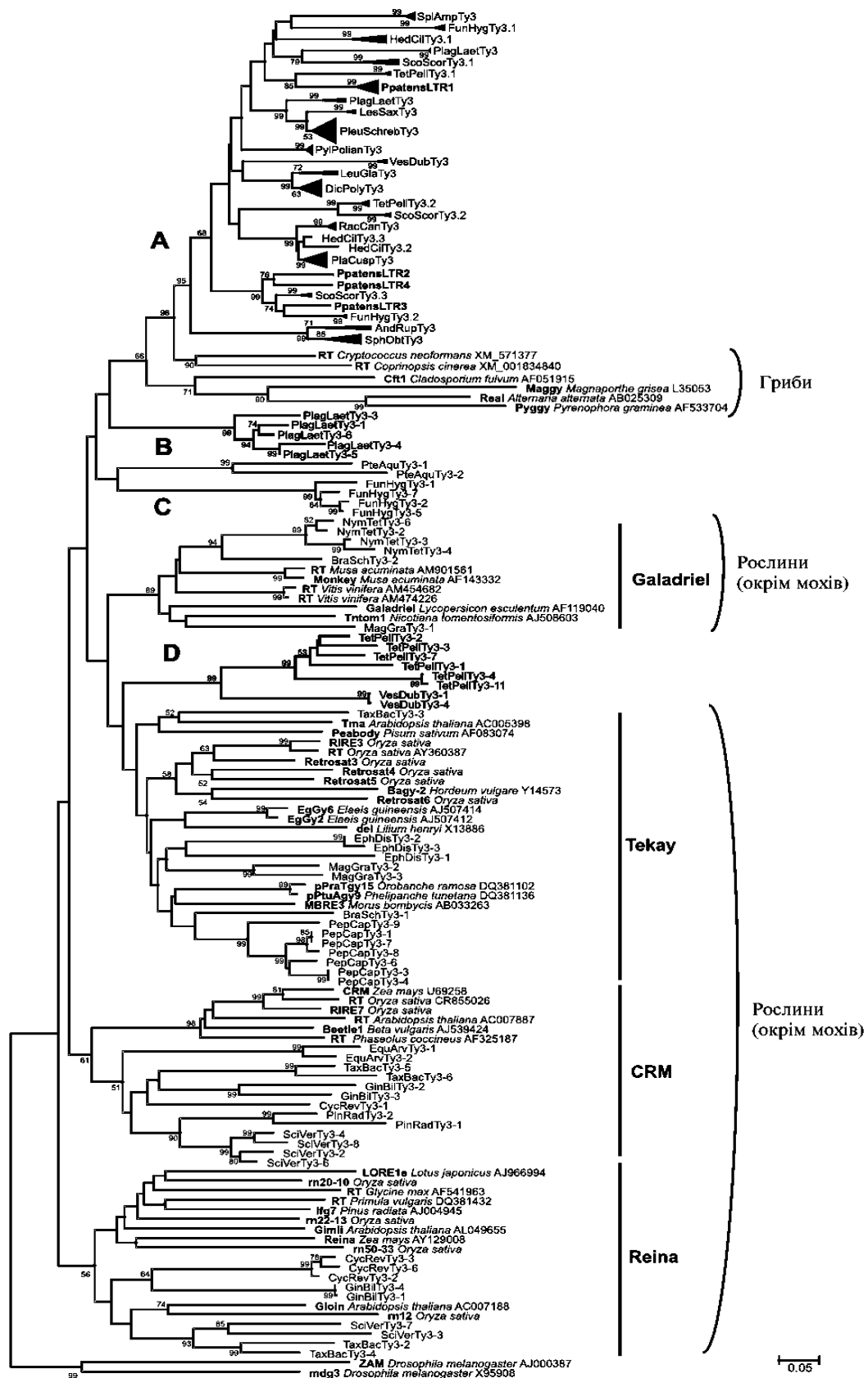


Рис. 3.13. Філогенетичне дерево *Ty3/gypsy*-ретротранспозонів із геномів рослин (Novikova et al., 2008; цит. за: Сормачева, Блинов, 2011)

(Novikova et al., 2010). У геномі папороті *Pteris cretica* були досліджені *Ty1/copia*-елементи і було показано, що їх кількість значно нижча, ніж у випадку покритонасінних рослин, що, вірогідніше за все, пов'язано з поліплоїдизацією останніх (Brandes et al., 1997).

Розповсюдження хромодомен-вмісних *Gypsy* LTR-ретротранспозонів групи папоротевих детальніше досліджено в геномах представників трьох класів: Psilotopsida, Polypodiopsida і Equisetopsida, а плауноподібних — у геномах представників двох класів: Isoetopsida і Lycopodiopsida (Novikova et al., 2010). Ретротранспозони цих груп мають внутрішньовидову гомогенність і міжвидову гетерогенність. Для більшості насінневих рослин з великими геномами відома висока внутрішньовидова гетерогенність LTR-вмісних ретротранспозонів. Папоротепоподібні та плауноподібні мають достатньо великі геноми і велику кількість хромосом, наприклад, у *Ophioglossum petiolatum* їх число сягає 1000. Винятком є представники роду *Selaginella*, які мають найменший геном серед усіх судинних

рослин. З іншого боку, існує думка, що унікальні характеристики геномів папоротей, а саме розмір і кількість хромосом, з'явилися у зв'язку з диплоїдизацією їхніх пращурів. Тому можна очікувати відмінності у різноманітті мобільних елементів і їх розподілі у геномах папоротей та інших груп рослин.

Незважаючи на невелике внутрішньовидове різноманіття, філогенетичний аналіз підтвердив високу міжвидову гетерогенність ретротранспозонів. Філогенетичне дерево *Ty3/gypsy*-ретротранспозонів спорових рослин, а також особливості цих ретротранспозонів детально розглянуто в оглядах (Novikova et al., 2010; Сормачева, Блинов, 2011).

Інформація про поширення *Ty1/copia* більш обмежена. Ці мобільні елементи виявлено у геномах плауна *Selaginella apoda*, папоротей *Vittoria appalachiana*, *P. cretica*, проте до цих пір не встановлено їх стосунки з тією чи іншою філогенетичною групою LTR-вмісних ретротранспозонів (Brandes et al., 1997; Docking et al., 2006).

3.6. Узагальнена характеристика LTR-вмісних ретротранспозонів. Підсумок

За своєю структурою і організацією LTR-вмісні ретротранспозони є близькими до інтегрованого генетичного матеріалу ретровірусів і відрізняються від нього лише відсутністю гена *env*, який кодує структурний білок вірусної капсиди. Відповідно, типові ретротранспозони, ймовірно, є дефектними ретровірусами, які втратили стадію інфекційних позаклітинних часточок і перетворились у досить своєрідні елементи хазяйського геному. На користь цього припущення свідчить і реплікативний механізм переміщення ретротранспозонів, що ґрунтується на процесі зворотної транскрипції. Нещодавно висловлено припущення, що еволюційний процес може йти двома напрямками: як шляхом перетворення ретротранспозонів у ретровіруси, так і шляхом формування ретротранспозонів на базі ретровірусів (Staginnus et al., 2006; Нефедова, Ким, 2009) (див. також розділ 3.9).

Міграція ретротранспозона починається з утворення його транскрипта. На відстані кількох нуклеотидів від лівого LTR до транскрипта приєднується комплементарна праймерна молекула

(найчастіше метионінова тРНК), 3'-кінець якої слугує затравкою для зворотної транскриптази (рис. 3.14). Відповідна ферментативна активність забезпечується білком RT/RNaseH, який попередньо транлювався з інших транскриптів того самого мобільного елемента. Синтезований при цьому мінус-ланцюг нової ДНК-копії ретротранспозона поряд із правим LTR містить пуринзбагачену послідовність, у ділянці якої відбувається ініціація синтезу плюс-ланцюга. Далі нова дволанцюгова копія мобільного елемента інтегрує в геном завдяки активності ендонуклеази Endo, що також кодується ретротранспозоном. Процес інтеграції супроводжується асиметричним розкриттям сайту мішені з утворенням 5'-нуклеотидних «липких» кінців, внаслідок чого на кінцях нової геномної копії ретротранспозона виникає пряма дуплікація цього сайту.

Детальніше картину життєвого циклу LTR-транспозонів розглянуто в роботі (Sabot, Schulman, 2006). Регуляція активності ретротранспозонів у рослин може відбуватися на будь-якому етапі їх життєвого циклу, а найвіро-

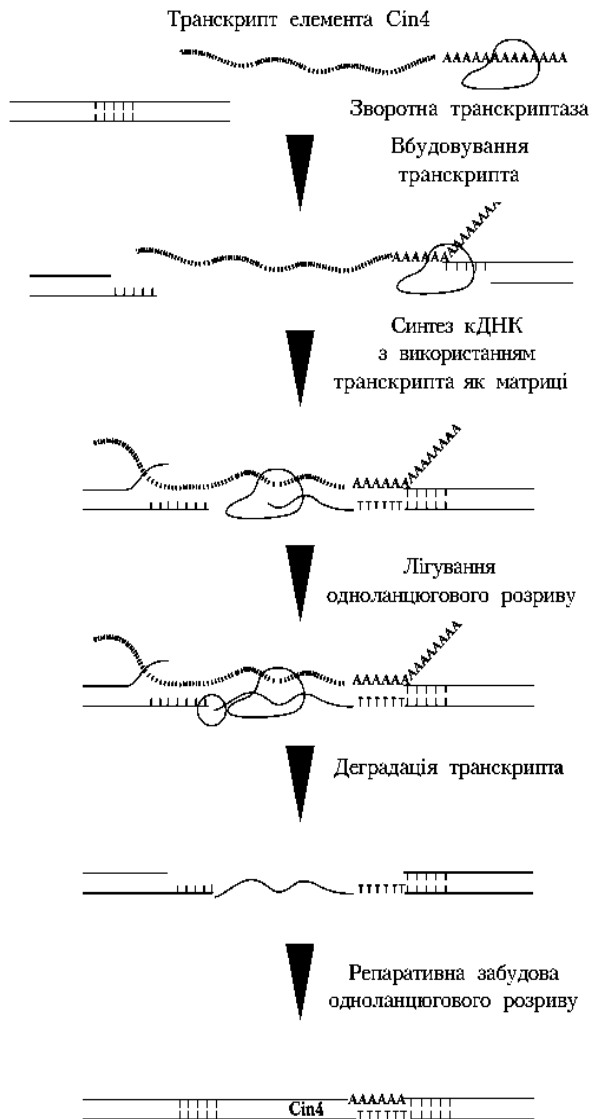


Рис. 3.14. Гіпотетична схема реплікативної транспозиції елемента *Cin4* у кукурудзи (за: Лутова и др., 2000)

гіднішим контрольним механізмом є транскрипційний сайленсінг шляхом метилювання промоторної ділянки ДНК (Liu et al., 2004; Cheng et al., 2006).

Для процесу зворотної транскрипції характерною є досить висока частота помилок, що призводять до інсерцій, делецій, зсуву рамки зчитування. Тому значна частина нових генетичних копій транспозонів містить у своїх функціонально значимих ділянках різні мутації і вже не є здатною до самостійного переміщення. Тобто за такого механізму відтворення переважна більшість повністю протрансформованих транспо-

зонів виявляється дефектною, неавтономною, наприклад, це такі елементи, як *LARD*, *TRIM*, *Morgane* та ін.

На сьогодні у рослин відомі приклади функціонально активних ретротранспозонів, до яких можливо віднести елементи *Tnt1* і *Tto1* тютюну. *Tnt1*, виявлений і описаний як спонтанна інсерція у ген нітратредуктази, представлений понад 100 копіями і зберігає здатність до переміщення навіть у гетерологічній системі, наприклад в арабідопсисі. Типова реплікативна транспозиція є характерною і для елемента *Tto1*, проте вона виявляється лише у культивованих клітинах, а в інтактних рослин усі копії цього елемента лишаються практично нерухомими. Цей ефект, вірогідно, пов'язаний з диференціальною транскрипцією елемента *Tto1*, надзвичайно слабкою за звичайних умов, але яка різко зростає за введення клітин у культуру. Активне переміщення цього елемента спостерігали і в трансгенних рослинах рису. Як вважає О. Н. Тиходєєв, транспозони *Tnt1* і *Tto1* виходячи з їх рухомості у гетерологічних системах володіють здатністю переміщуватися у достатньо автономному режимі і не вимагають будь-яких додаткових активностей (без урахування «хазяйських» ферментативних систем, що забезпечують експресію самого гена *POL*) (цит. за: Лутова и др., 2000).

На відміну від функціонально активних елементів *Tnt1* і *Tto1*, переважна більшість відомих ретротранспозонів не здатна до автономного переміщення внаслідок своєї дефектності. Незважаючи на те, що такі класи транспозонів деградували в ході еволюції і вже не несуть у своїй структурі інформації, необхідної для їх активного переміщення, вони продовжують бути присутніми в ядерній ДНК (Witte et al., 2001). Разом з тим, навіть для таких неактивних елементів описані окремі випадки мобільності. Зокрема, незважаючи на делецію всього домену, який кодує зворотну транскриптазу, транспозон *Bs1* кукурудзи виявлено як спонтанну інсерцію в гені *ADH1*. Це переміщення, очевидно, було забезпечене певною зворотною транскриптазою, яка кодується або певними послідовностями самого «хазяйського» геному, або поки що не виявленими повноцінними копіями транспозонів. Не виключено, що рухливість неавтономних елементів може забезпечуватися за рахунок комплементар-

ної взаємодії між окремими копіями, дефектними за різними доменами гена *POL*. Враховуючи достатньо високу копійність ретротранспозонів,

наприклад близько 35 000 для елемента *BAR-1* у ячменю, вірогідність такої взаємодії є достатньо високою (Тиходеев, 2009).

3.7. LTR-невмісні ретротранспозони

Підклас LTR-невмісних ретротранспозонів, або non-LTR-ретротранспозони (*LINEs*- або *SINEs*-елементи), відрізняється за структурою і циклом транспозиції від LTR-вмісних ретротранспозонів: вони також кодуються генами *gag*- та *pol*-подібних білків, проте не мають довгих кінцевих повторів (LTRs). LTR-невмісні ретротранспозони — найпоширеніші мобільні елементи у геномах ссавців (складають, наприклад, третину геному людини). У рослин вони менш численні, проте трапляються у багатьох рослинних геномах (Смышляев, Блинов, 2011).

Ці ретротранспозони є найдревнішою групою ретроелементів еукаріотів. Зворотна транскриптаза (RT), що кодується LTR-невмісними транспозонами, має високу гомологію з RT, виявленою у представників групи II, і з теломеразою (Xiong, Eickbush, 1990; Nakamura et al., 1997). Вважається, що виникнення LTR-невмісних ретротранспозонів за часом збігається з виникненням еукаріотних організмів (Malik et al., 1999; Arkhipova, Morrison, 2001).

У структурі повнорозмірних LTR-невмісних ретротранспозонів виділяють чотири основні частини:

- 5'-нетрансльована ділянка (5'-UTR — від untranslated regions);
- перша відкрита рамка зчитування (ORF1 — open reading frame), що кодує ДНК-зв'язувальний білок, подібний до Gag-білка ретровірусів;
- друга відкрита рамка зчитування (ORF2), що кодує поліпротеїн з різними ферментативними активностями, який потім розщеплюється на ендонуклеазу, зворотну транскриптазу й, інколи, РНКазу Н (RNH);
- 3'-нетрансльована ділянка (3'-UTR) (див. рис. 3.3).

Кожен із елементів містить на своєму правому кінці невеликий (6–11 нуклеотидів) оліго-А тракт, що нагадує поліаденильований 3'-кінець еукаріотної іРНК, який відіграє важливу роль в інтеграції у нові геномні локуси. Їх транскрипція здійснюється клітинною РНК-полімеразою II із внутрішнього промотора.

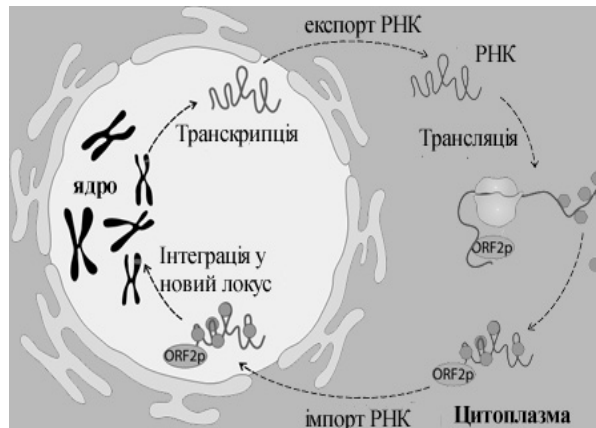
LTR-невмісні ретротранспозони можуть містити два різних типи ендонуклеаз: древні групи мобільних елементів містять сайт-специфічну ендонуклеазу, а молодші містять апуринову/апіримідинову ендонуклеазу (APE). Крім того, елемент із водорості хламідомонади, який філогенетично займає положення між древніми і молодими елементами, містить обидві нуклеази в одній рамці зчитування (Kojima, Fujiwara, 2005).

Питання про те, як мобільні елементи рухаються і розмножуються у геномі, найкраще вивчене на прикладі ретротранспозона *LINE-1*, найпоширенішого мобільного елемента в геномі людини. *LINE-1* кодує два білки, необхідні для свого поширення у геномі. Один з них, ORF1p, зв'язується з РНК *LINE-1*, транскрибованої з його копії на хромосомі. Надалі ORF1p, вірогідно, бере участь в імпорті РНК *LINE-1* в ядро, а також у наступній зворотній транскрипції її в ДНК, внаслідок чого відбувається інтеграція гена в нову ділянку геному.

ORF1 р складається з трьох частин. Одна частина відповідає за взаємодію поліпептидних ланцюгів один з одним таким чином, що утворюється тример-комплекс із трьох однакових молекул білка. Дві інші частини необхідні для зв'язування з РНК *LINE-1*. Середня частина ORF1p представляє собою RRM-домен (від RNA recognition motif) (Khazina, Weichenrieder, 2009). Наявність цього домену пояснює здатність ORF1p зв'язувати *LINE-1* РНК. («Життєвий цикл» ретротранспозона *LINE-1* наведено на рис. 3.15.)

Проте далеко не всі LTR-невмісні ретротранспозони мають дві відкриті рамки зчитування (ORF). Багато з них містять одну таку відкриту рамку. Окрім того, у деяких родин LTR-невмісних ретротранспозонів до 90% елементів мають 5'-кінцеві делеції різної довжини (Hutchison et al., 1989; Malik, Eickbush, 1998; Wicker et al., 2007).

Детальну класифікацію LTR-невмісних ретротранспозонів, особливості їх виникнення, еволюції і поширення наведено в огляді (Новикова, Блинов, 2009), з якого і взято рис. 3.16.

Рис. 3.15. Життєвий цикл ретротранспозона *LINE-1*

РНК *LINE-1* зчитується з однієї копії елемента у геномі. Тоді ця РНК експортується в цитоплазму. У цитоплазмі відбувається трансляція обох закоданих у РНК *LINE-1* білків, які одразу зв'язуються з цією ж молекулою РНК. Утворений РНК-білковий комплекс імпортується в ядро, де відбувається зворотна транскрипція й інтеграція синтезованої ДНК *LINE-1* з новим локусом хромосоми (за: <http://www.biomolekula.ru/print.php?id=476>)

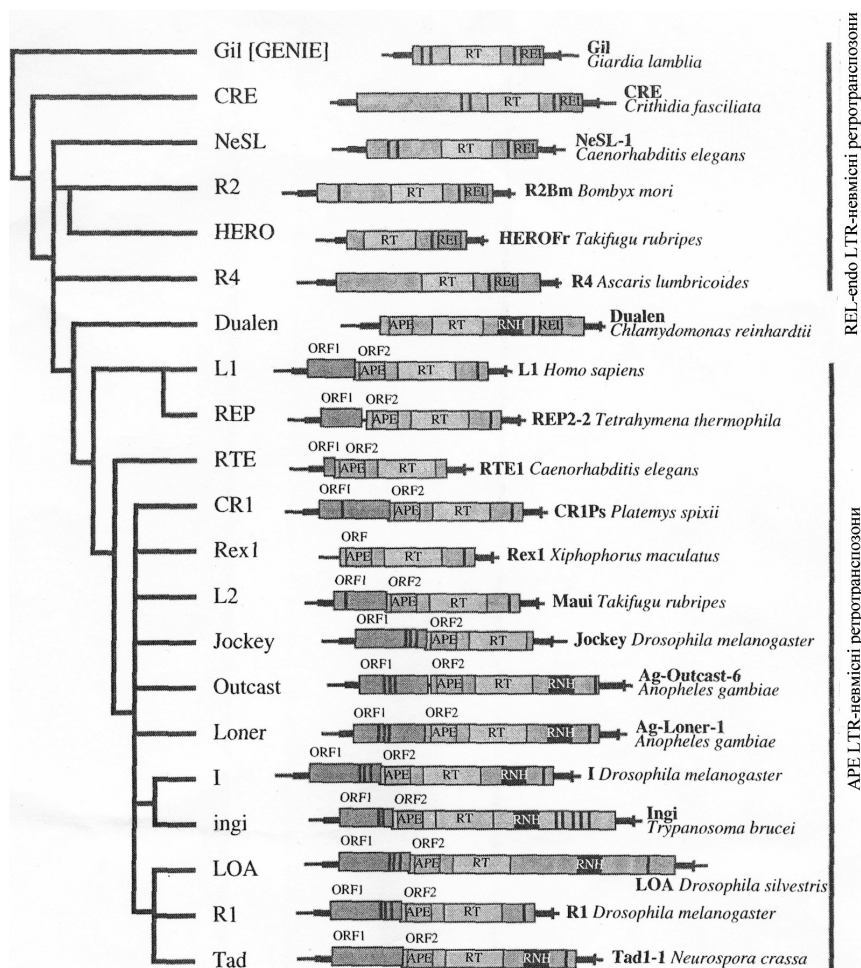
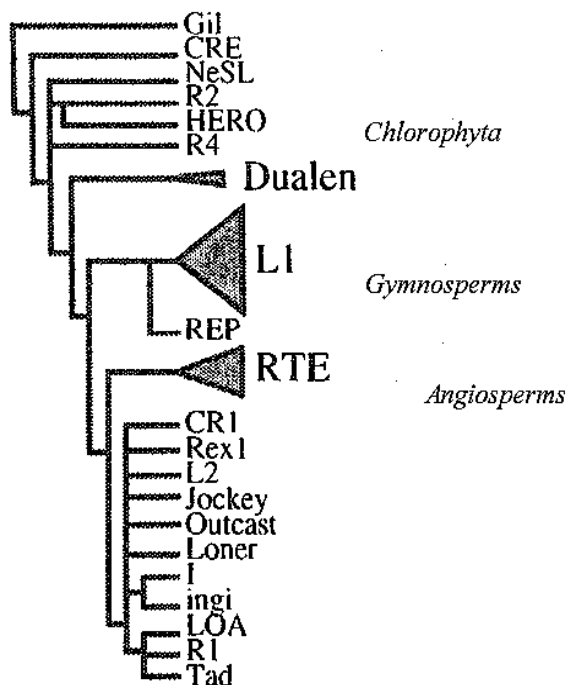


Рис. 3.16. Еволюція LTR-невмісних ретротранспозонів та структурна організація представників філогенетичних груп: ORF — відкрита рамка зчитування; RT — домен зворотної транскриптази; REL — домен REL-ендонуклеази; APE — домен апурин/апиримідинендонуклеази; RNH — домен рибонуклеази H; поперечні смуги — гістидин-цистеїнові мотиви (за: Новикова, Блинов, 2009)

Plantae (рослини)



Fungi (гриби)

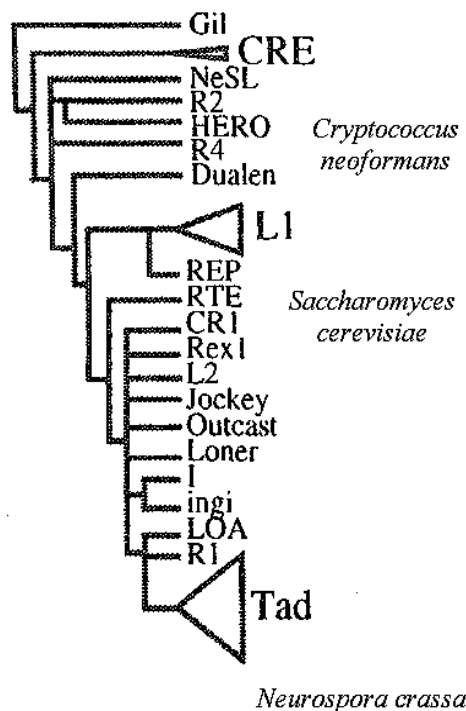


Рис. 3.17. Розповсюдження різних філогенетичних груп LTR-невмісних ретротранспозонів серед рослин і грибів (за: Новикова, Блинов, 2009, зі змінами)

Незважаючи на те, що геноми багатьох рослин більше ніж на 50% складаються із послідовностей ретротранспозонів, різноманітність LTR-невмісних ретротранспозонів рослин обмежується однією родиною *TaII* у складі філогенетичної групи *L1*, а також RTE-подібними елементами (рис. 3.17). Існує думка, що LINE-елементи є геномними копіями різних іРНК, зчитаних із внутрішніх ділянок ретротранспозонів (див.: Лутова и др., 2000).

Окремі копії споріднених LINE-елементів можуть істотно варіювати за довжиною (наприклад, від 1,1 до 6,6 т.п.н. у родини транспозонів *Cin4* у кукурудзи) за рахунок різної довжини своїх лівих кінців. Це може бути зумовлено гіпотетичним механізмом інтеграції, який припускає комплементарну взаємодію між внутрішньою ділянкою транскрипта або його ДНК-копії і випадковим олігонуклеотидним сайтом мішені. Проте конкретний механізм виникнення LINE-елементів ще недостатньо вивчений не тільки у рослин, а й у інших еукаріотів. Однак, врахо-

вуючи високу копійність LTR-невмісних ретротранспозонів (наприклад, до 250 тисяч у лілії *Lilium speciosum*), цей механізм повинен бути вельми ефективним. Це припущення підтверджується випадками реплікативної транспозиції окремих LINE-елементів, наприклад *Cin4-1* у кукурудзи.

Переважну більшість ретротранспозонів у геномах рослин складають LTR-вмісні ретроелементи (див. вище, а також Vitte, Panaud, 2005). І тим не менше, в останні роки найцікавішу знахідку відносно еволюції LTR-невмісних ретротранспозонів зроблено при вивченні представника царства рослин. Мобільні елементи групи Dualen було виявлено у геномі зеленої водорості хламідомонади (Kojima, Fujiwara, 2005). Dualen non-LTR-ретротранспозони представляють не тільки перехідну форму між REL-endo і APE ретроелементами, а й є доказом того, що домен RNase II було придбано значно раніше, ніж припускалося (див.: Malik et al., 1999).

3.7.1. *L1*-ретротранспозони покритонасінних рослин

Мобільні генетичні елементи групи *L1* належать до молодих LTR-невмісних ретротранспозонів і, відповідно, містять APE нуклеазу. *L1*-non-LTR-ретротранспозони розповсюджені у багатьох еукаріотних організмах: рослинах, грибах і тваринах (Смышляев, Блинов, 2011).

У *L1*-елементів рослин описано два різних типи ORF1. ORF1 першого типу містить РНК-зв'язувальний RRM (RNA recognition motif) домен і наступний за ним цистеїновий мотив (CCHC) (Khazina, Weichenrieder, 2009). ORF1 другого типу містить інший, консервативніший, RRM-домен без будь-яких слідів цистеїнового мотиву (Heitkam, Schmidt, 2009).

Першим описаним *L1*-non-LTR-елементом рослин був *Cin4*-елемент із геному кукурудзи. Потім *L1*-елементи були виявлені у геномах *Arabidopsis thaliana* (*Tall-1* і *ATLN*), *Lilium speciosum* (*del2*), *Cannabis sativa* (*LINE-CS*),

Hordeum vulgare (*BLIN*), *Beta vulgaris* (*Bvll* і *BNR*) і *Chlorella vulgaris* (*Zepp*) (див.: Смышляев, Блинов, 2011).

У результаті нещодавно проведеного дослідження було побудовано філогенетичне дерево, на якому чітко виявляються три основні філогенетичні групи *L1*-елементів покритонасінних рослин: *Tall*, *BNR* і *Cin4* (Смышляев, Блинов, 2011).

Група *Tall* є найрозповсюдженішою, елементи цієї групи знайдено майже в усіх досліджених геномах. Мобільні елементи із груп *BNR* і *Cin4* представлені у геномах дводольних і однодольних рослин відповідно. Ці дані, отримані на основі філогенетичного аналізу RT-последовностей *L1*-non-LTR-ретротранспозонів, відповідають даним про структурну організацію мобільних елементів: елементи з однієї філогенетичної групи мають подібну будову і загальні структурні особливості.

3.7.1.1. Структурна організація *L1*-non-LTR-ретротранспозонів рослин

Більшість геномів містять згодом активні копії *L1*-елементів однієї або кількох груп. Але в геномах низки видів (наприклад, *Carica papaya*, *Cucumis sativum* і *Manihot esculenta*) не виявлено жодного повнорозмірного елемента, що свідчить, можливо, про відсутність у них недавніх подій ретротранспозиції *L1*-non-LTR-елементів. Альтернативним поясненням відсутності повнорозмірних копій цих видів може бути і вищий рівень репресії мобільних елементів геномом хазяїна.

Для кожної із трьох груп *L1*-елементів встановлено загальну структуру її складових елементів (рис. 3.18). Головною відмінністю елементів із різних груп виявилася структурна організація їхніх ORF1: у *Tall*-елементів вона представлена рамкою зчитування першого типу, у *BNR* — другого типу, а у *Cin4*-елементів виявлено інший тип ORF1. Крім того, важливою особливістю *Tall*-елементів є наявність у них RNH-домену у складі ORF2.

***Tall*-елементи.** Елементи групи *Tall* найпоширеніші порівняно з іншими описаними групами мобільних елементів. Вони знайдені у багатьох досліджених геномах, проте не виявлені у геномах *Vitis vinifera* і *Triticum monococcum*.

У базі даних RepBase ці два геноми представлені тільки елементами із *BNR*- і *Cin4*-груп. Можливо, геноми *V. vinifera* і *T. monococcum* також містять *Tall*-елементи, але вони або присутні у цих геномах у дуже невеликій кількості копій, або ж дуже зруйновані. Через одну з цих причин вони могли бути не виявлені стандартними програмами передбачення повторів. Таким чином, *Tall*-група є єдиною із досліджених груп, яка представлена у геномах як однодольних, так і дводольних рослин.

Широке розповсюдження цієї групи свідчить про її давнє походження, появу ще до розділення однодольних і дводольних рослин, тобто близько 150 млн років тому. Для цієї групи *L1*-елементів характерною є наявність двох ORF. ORF1 представлена рамкою зчитування першого типу, тобто в ній присутній RRM-домен, за яким розташований цистеїновий CCHC-мотив (рис. 3.18). RRM-домен і цистеїновий мотив є єдиними консервативними ділянками ORF1, одночасно інші її частини значно варіюють між елементами. Це, скоріше за все, свідчить про відсутність, з одного боку, прямого функціонального значення цих последовностей, а з іншого — про те, що розмір ORF1 у цілому є консервативним і складає

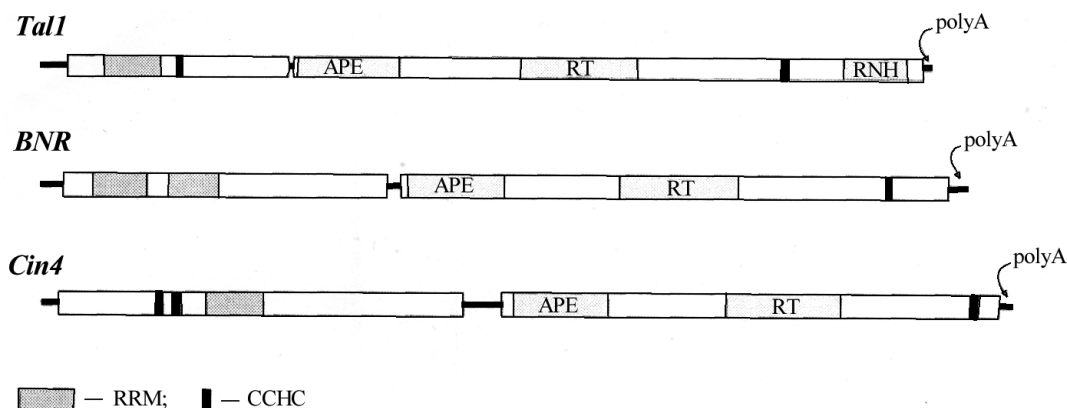


Рис. 3.18. Схема будови мобільних генетичних елементів із трьох різних груп *L1*-елементів рослин: APE — аспарагінова протеаза; RT — зворотна транскриптаза; RRM — РНК-зв'язувальний домен; CCHC — цистеїновий мотив типу CCHC; RNH — РНКаз H; polyA — polyA послідовність (за: Смышляев, Блинов, 2011)

близько 1500 п. н. Це дає можливість припускати, що неконсервативна частина ORF1 необхідна для підтримання просторової конфігурації білка. RRM-домен, як і CCHC-мотив, вірогідно, бере участь у зв'язуванні білка з РНК (Matsui et al., 2009), що підтверджує припущення про необхідність білка, який кодується ORF1, для формування рибонуклеопroteїнової часточки *L1*-елемента.

ORF2, крім стандартних для *L1*-елементів APE- і RT-доменів та CCHC-мотиву, містить у своєму складі ще й RNH-домен (рис. 3.18). Жодна із раніше описаних груп *L1*-елементів еукаріотів не містить цей домен. Більше того, поява RNH-послідовності у non-LTR-ретротранспозонах вважається пізнішим явищем. Припускається, що вперше цей домен з'являється у non-LTR-ретротранспозонів у філогенетично молодшій родині Jockey (Malik, 2005). Виявлення RNH-домену у групі *Tal1*-елементів рослин дозволяє зробити висновок про незалежне набуття цього домену у різних груп non-LTR-ретротранспозонів. На користь цього припущення свідчить і той факт, що в останніх non-LTR-елементів, які володіють RNH, CCHC-мотив розташовується після RNH, а у *Tal1*-елементів цей мотив розташований перед RNH (рис. 3.18).

Наявність RNH-домену характерна не для всіх елементів групи *Tal1*. В елементів *BD4a* із *Brachypodium distachyon*, *OS7* із *Oryza sativa* і *LINE1-62B* із *Sorghum bicolor* він відсутній. Усі три згаданих елементи формують окрему групу

на філогенетичному дереві, тому можна припустити, що RNH у цій групі було втрачено.

BNR-елементи. Елементи цієї групи не були виявлені в жодному з досліджених геномів злаків. Висловлено припущення, що *BNR*-група специфічна для дводольних рослин (Смышляев, Блинов, 2011). Однак за відсутності даних щодо геномів незлакових однодольних у вільному доступі очевидно, що для перевірки цієї гіпотези потрібна додаткова інформація.

Відомі основні характеристики представників *BNR*-групи (Heitkam, Schmidt, 2009). Головною особливістю цієї групи є висококонсервативний «подвійний» RRM-домен (рис. 3.18) і відсутність цистеїнового мотиву в ORF1. ORF2 має стандартну для *L1*-елементів структуру і містить домени APE та RT, а також цистеїновий мотив CCHC на її С-кінці. Нещодавно виявлено нові елементи цієї групи в геномах *Aquilegia coerulea*, *Carica papaya*, *Cucumis sativum*, *Malus domestica* і *Medicago truncatula* (Смышляев, Блинов, 2011). Присутність *BNR*-елементів в одному з найпростіших дводольних *Aquilegia coerulea* із порядку Ranunculales свідчить на користь походження цієї групи елементів до появи так званих основних евдикотів (англ. — core eudicots), тобто понад 110 млн років тому.

Cin4-елементи. Елементи цієї групи знайдено в геномах усіх досліджених злакових рослин. Окрім того, у цій групі опинився й елемент *del2* із *Lilium speciosum*, що свідчить про те, що *Cin4*-елементи виникли до появи злакових.

У результаті філогенетичного аналізу було виявлено кілька підгруп елементів *Cin4*. Незважаючи на філогенетичні відміни, елементи цих підгруп мають схожу структурну організацію. За детальнішого аналізу структури ORF1 елементів із групи *Cin4* було виявлено новий, третій тип ORF1 *L1*-елементів рослин. ORF1 елементів *Cin4* має RRM-мотив, схожий з таким у *Tall*-елементів, але на відміну від останніх елементи *Cin4* мають не один, а два цистеїнових CCHC-мотиви у першій рамці, які розташовуються не на С-кінці, як у *Tall*-елементів, а в N-кінці білка відносно RRM-мотиву (рис. 3.18).

Окрім того, ORF1 елементів *Cin4* має велику протяжність і її середня довжина складає понад 3000 п. н. Для порівняння, довжина ORF1 людини — близько 1 т. п. н. (GenBank: U93570). Остання частина ORF1, за винятком двох CCHC-мотивів і RRM-домену, значно варіює між елементами *Cin4*-групи, що дозволяє так само, як і для *Tall*-елементів, припустити її функціонування як стабілізатора просторової структури синтезованого з ORF1 білка.

3.7.2. Життєвий цикл *LTR*-невмісних ретротранспозонів і їх регуляція хазяїном

Вище ми відзначали, що *LTR*-невмісні ретротранспозони, або non-*LTR*-ретротранспозони (їх ще називають LINEs, поліА-ретротранспозонами або мішене-спрямованими (target-primed — TP)-ретротранспозонами), не містять довгих кінцевих повторів (ДКП або *LTR*s), натомість вони є подібними до інтегрованої іРНК. Це древні генетичні елементи, які існували в евкаріотних геномах упродовж сотень мільйонів років і краще за все відомі завдяки своєму успішному розмноженню і наявності у великій кількості у геномі людини. На *LTR*-невмісних ретротранспозонах можуть паразитувати неавтономні елементи (такі як дисперсні (вкраплені) транспозабельні елементи (SINEs)) (див. далі).

Повномірні, автономні *LTR*-невмісні ретротранспозони, як правило, містять одну чи дві відкриті рамки зчитування (ORFs). Загальну структуру трьох найкраще вивчених модельних прикладів — елемента *R2 Bombyx mori*, елемента *L1* людини та фактора *I Drosophila melanogaster* — наведено на рис. 3.19. Головним у мобілізації ретротранспозона є активність зворотної транскриптази (RT), а тому всі автономні *LTR*-невмісні

Таким чином, кожна з трьох груп *L1*-елементів покритонасінних рослин: *Tall*, *BNR* і *Cin4* характеризується особливою структурою ORF1, у той час як ORF2 у цілому схожа в усіх групах, за винятком елементів *Tall*, які містять RNH-домен. Елементи групи *Tall* і *BNR* мають ORF1 першого і другого типів відповідно. Для групи *Cin4* виявлено новий, третій, тип ORF1, для якого характерна наявність двох цистеїнових CCHC-мотивів і RRM-домену. Очевидно, основними еволюційними подіями в розвитку *L1*-ретротранспозонів, які привели до появи нових груп елементів, є зміни, пов'язані з функціонуванням ORF1. Білок, який синтезується з цієї рамки зчитування, бере участь у створенні рибонуклеопротейнової часточки і має шаперонні функції, перешкоджаючи таким чином руйнуванню мРНК елемента клітинними нуклеазами.

Крім того, важливою подією в еволюції *L1*-елементів було надбання деякими з них білка RNH, що привело до появи групи *Tall*-елементів (деталі і посилання див.: Смышляев, Блинов, 2011).

ретротранспозони містять RT-домен. Фактично в усіх non-*LTR*-ретротранспозонів присутній і ендонуклеазний (ендо) домен, хоча кодованим активність не є абсолютною вимогою для non-*LTR*-ретротранспозиції (див. далі). Інша рамка (ORF1) має РНК-зв'язувальну активність та нуклеїново-кислотну шаперонову активність і, очевидно, відіграє роль, подібну до такої у білків gag ретровірусів (див.: Han, 2010).

5'- та 3'-нетрансльовані ділянки (untranslated regions — UTRs) *LTR*-невмісних ретротранспозонів є досить варіабельними. Хоча для більшості вивчених 5'-UTRs функціональних *LTR*-невмісних ретротранспозонів характерна внутрішня промоторна активність, часто відзначали заміщення промотора, а тому промоторна послідовність не обов'язково є консервативною в елементів різних видів організмів. Ці промотори транскрибуються РНК-полімеразою II. Відомі також елементи без явного ендегенного промотора. Так, мобільні елементи *R2*, які виявлено у рибосомних локусах ДНК комах, очевидно, не кодують свого власного промотора, а котранскрибуються з повтором рРНК їхнього хазяїна.

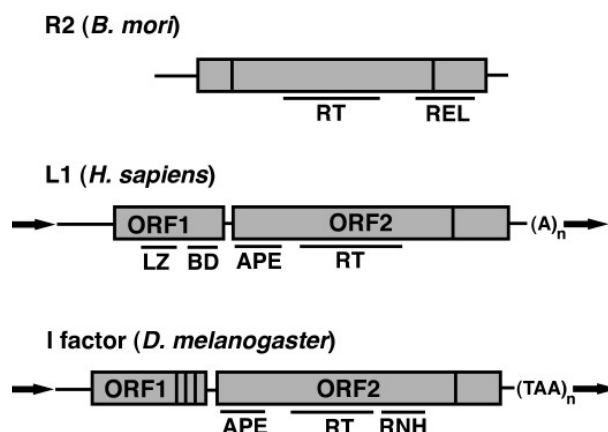


Рис. 3.19. Структура LTR-невмісних ретротранспозонів

Наведено загальну структуру трьох моделей LTR-невмісних елементів. *Верхня модель*: елемент R2 *Bombyx mori* складається з однієї відкритої рамки читування (ORF), яка містить зворотну транскриптазну (RT) активність та рестрикційно-подібний (REL) домен. Вертикальні лінії вказують цистеїн-гістидин збагачені ділянки, які, ймовірно, заковані нуклеїновою кислотою зв'язувального домену. Горизонтальні лінії представляють нетрансльовані ділянки. *Середня модель*: L1-елемент людини містить дві ORF. ORF1 містить лейциновий замок-блискавку (LZ) домену, який забезпечує протеїн-протеїнові взаємодії, та домен, який зв'язує С-кінець нуклеїнової кислоти (BD). ORF2 має N-кінцеву апурин/апиримідинову ендонуклеазу (APE), центральний RT домен та С-кінцевий цистеїн-гістидин збагачений домен. Елемент закінчується поліА хвостом. Типові інсерції (вставки) фланкуються дуплікованими сайтами-мішенями (товсті стрілки). *Нижня модель*: 1 фактор елемент дрозофіли ORF1 містить три С-кінцевих цистеїн-гістидин збагачених мотиви, подібні до ретровірусних gag. ORF2 містить APE ендонуклеазу, центральний RT/РНКазу Н (RNH) домен та С-кінцевий цистеїн-гістидиновий домен. У всіх структурах суміжні комірки сірого кольору являють собою одиничний ORF (за: Han, 2010)

3'-UTR LTR-невмісних елементів зазвичай містить специфічну послідовність/структуру, яка розпізнається зворотною транскриптазою ORF (Anzai et al., 2005). Винятком є мобільний елемент L1 ссавців, для якого 3'-UTR є обов'язковим для ретротранспозиції (Moran et al., 1996). 3'-межа LTR-невмісних ретротранспозонів може складатися з полідезоксиаденозин (поліА) послідовності, коротких повторюваних послідовностей. Через велику варіабельність UTRs LTR-невмісних ретротранспозонів немож-

ливо зробити узагальнення щодо специфічних особливостей ініціації та термінації non-LTR транскрипції. Хоча на рис. 3.19 показано повномірні елементи, non-LTR-ретротранспозони у геномах є часто усіченими з 5'-кінця завдяки неповній зворотній транскрипції. Лише частина елементів є повномірними й активними; наприклад, із 500 000 L1-елементів геному людини лише 7000 є повномірними, а з них лише від 80 до 100 є ретротранспозиційно активними (див. огляд: Han, 2010).

3.7.2.1. Механізми реплікації

Загальну схему реплікації LTR-невмісного ретротранспозона наведено на рис. 3.20. Після транскрипції і ядерного експорту ORF(s) трансльовуються і збираються, формуючи рибонуклеопротеїнову часточку (РНЧ). Для *polIII*-транскрибованих елементів перша ORF скоріше за все трансльовується за традиційним кеп-розпізнаванням і згідно зі скануючою моделлю. Цей характер трансльції (на відміну від внутрішнього рибосомального сайту реципієнта (internal ribosomal entry site — IRES)) підтверджується експери-

ментами на ссавцях, які показують, що 5'-UTR, 3'-UTR та inter-ORF послідовності елемента L1 є обов'язковими для ретротранспозиції, кодувальна ділянка ORF1 може інтенсивно мутувати без задіяння ретротранспозиції і що трансльція, ініційована з 5'-UTR мобільного елемента L1 людини, є кеп-залежною (Han, Boeke, 2004; Dmitriev et al., 2007). Елементи, транскрибовані *polII*, такі як R1/R2-елементи, можуть трансльовуватися через IRES. У біцистронних транскриптах трансльція другої ORF2 ґрунтується

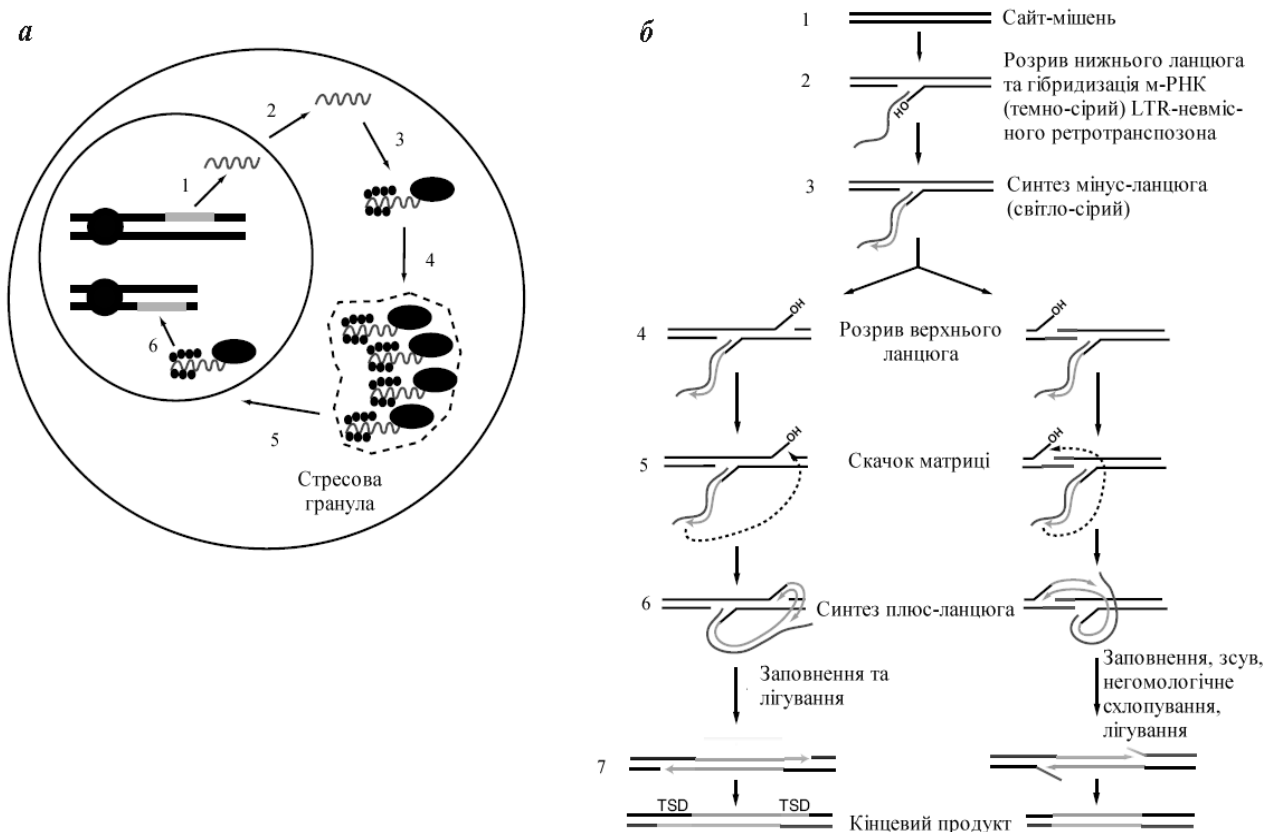


Рис. 3.20. Реплікація LTR-невмісних ретротранспозонів:

а — реплікативний цикл LTR-невмісних ретротранспозонів: 1 — транскрипція повномірних активних елементів; 2 — експорт мРНК з ядра; 3 — трансляція білків ретротранспозона; 4 — проникнення крізь цитоплазматичну гранулу; 5 — імпорт нуклеопротейної часточки (RNP) в ядро; 6 — інтеграція у цільовий праймер за допомогою зворотної транскрипції (target-primed reverse transcription — TPRT);

б — модель TPRT: 1 — вихідний немодифікований цільовий сайт (сайт-мішень). Послідовність цього сайту варіює залежно від специфічності ендонуклеази ретротранспозона; 2 — розрив одного ланцюга сайту-мішені (нижній ланцюг на рисунку) за допомогою ендонуклеази; 3 — синтез мінус-ланцюга з використанням мРНК ретротранспозона як матриці; 4 — протягом або після синтезу мінус-ланцюга відбувається розрив верхнього ланцюга за допомогою ендонуклеази ретротранспозона або клітинної ендонуклеази. Лівий шлях розщеплення (downstream) веде до дуплікації цільового сайту (TSD). Правий шлях розщеплення (upstream) веде до делеції цільового сайту; 5 — скачок матриці від мРНК до верхнього ланцюга цільового сайту; 6 — синтез плюс-ланцюга з використанням верхнього ланцюга як праймера; 7 — лівий шлях: завершення синтезу та заповнення прогалини (сірий колір) веде до дуплікації цільового сайту; правий шлях: завершення синтезу та деградація негомологічних ділянок за допомогою невідомих нуклеаз веде до делеції цільового сайту. Наявні й інші продукти, які не наведено для спрощення (за: Han, 2010)

на незвичайній її ініціації. Дослідження мобільного елемента *SART1* шовкопряда й елемента *L1* людини свідчать про подібні трансляційні механізми, в яких трансляція ORF2 є залежною від трансляції ORF1 (Alisch et al., 2006). Рибосома, що транслувала ORF1, може реініціювати трансляцію ORF2 або мобілізувати іншу рибосому для цієї мети.

У більшості випадків LTR-невмісні ретротранспозонні РНЧ локалізовані переважно в цитоплазмі. Прикладами ядерних РНЧ LTR-невмісних

ретротранспозонів є теломеронацілені елементи, які, очевидно, є сприятливими для функціонування клітини (Matsumoto et al., 2004; Pardue et al., 2005).

Докладніший аналіз non-LTR ретротранспозонних РНЧ виявив їх локалізацію поблизу гранул стресу — цитоплазматичних тілець, тісно пов'язаних із так званими Р-тільцями (Goodier et al., 2007). Гранули стресу були описані як депо нетранслюючих мРНК (Balagopal, Parker, 2009). Проте ще невідомо, чи асоційовані зі стресовими

гранулами РНЧ LTR-невмісних ретротранспозонів призначені для деструкції, чи проходження через стадію стресової гранули є важливим етапом дозрівання ретротранспозонних РНЧ. Однак прикметно, що втрата компонентів Р-тілець у дріжджів приводить до зменшення активності *Ty1* та *Ty3* (LTR-вмісних ретротранспозонів), що свідчить про важливу роль Р-тілець і/або гранул стресу у життєвому циклі ретротранспозонів (Nyswaner et al., 2008; Checkley et al., 2010).

Динаміка LTR-невмісних ретротранспозонних РНЧ найкраще вивчена на прикладі фактора *I* у дрозофіли. РНЧ фактора *I* з'являються у клітинах-няньках, потім разом з іншими компонентами клітини-няньки переходять у цитоплазму ооцита. В ооциті РНЧ мігрують від заднього до переднього коркового шару після мікротрубочки організуючого центру і ядра. Залежність цього процесу від мікротрубочок свідчить про те, що РНЧ LTR-невмісних ретротранспозонів можуть мігрувати по цитоскелету. Є також ознаки того, що ORF1-білок елемента *L1* взаємодіє із проміжними волокнами, що також підтверджує цю гіпотезу (Kirilyuk et al., 2008). У певний момент LTR-невмісна ретротранспозонна РНЧ, очевидно, має доступ до хромосоми, а тому, можливо, транспортується в ядро, де відбувається зворотна транскрипція (Kubo et al., 2006; див. також огляд: Nan, 2010).

Опинившись на відповідному сайті хромосомної мішені, LTR-невмісний ретротранспозон може почати копіювати свою генетичну інформацію у цьому новому локусі. Механізм цього процесу було названо мішене-спрямованою зворотною транскрипцією (TPRT — target primed reverse transcription), а початкові стадії було переконливо продемонстровано у дослідях *in vitro* на мобільному елементі R2 *Bombyx mori*.

Очищений білок R2, змішаний із РНК R2 і відповідним сайтом ДНК мішені, здатний розривати один із ланцюгів ДНК (нижній ланцюг на рис. 3.20, б). Отриманий вільний 3'-кінець ДНК слугує як праймер зворотної транскрипції РНК R2 (синтез мінус-ланцюга). Подібна система із застосуванням ORF2 *L1*-елемента людини також свідчить про цю реакцію, хоча продукти не можна було спостерігати безпосередньо з причини їх низького виходу і неоднорідності (ORF2 *L1* на відміну від ORF R2 не розриває жорстко визначену цільову ДНК).

Цільовий сайт non-LTR-ретротранспозонів визначається некодованим нуклеазним доменом. Древні клади LTR-невмісних ретротранспозонів, такі як CRE, R2 та R4, кодують ензимоподібні ендонуклеази рестрикції, що розпізнають специфічні послідовності. Цей ендодомен був заміщений ендонуклеазою на початку еволюції non-LTR-ретротранспозонів, що у більшості випадків приводило до послаблення специфічності цільового сайту.

Значення ендонуклеазного домену полягає у продукуванні праймера для зворотної транскрипції. Якщо відповідний праймер створюється через інший механізм, non-LTR-ретротранспозиція відбувається в ендонезалежний спосіб. Найяскравіший випадок ендонезалежної non-LTR-ретротранспозиції має місце у дрозофіли, в якій ко-залежні non-LTR-ретротранспозони TART, HeT-A та TAHRE ретротранспозують до хромосомних кінців, формуючи теломери (Pardue et al., 2005). Подібну реакцію було відтворено на хромосомних кінцях ссавців зі сконструйованим ендомутантним *L1*-елементом людини (Morrish et al., 2007), що свідчить про наявність ери «пре-ендо»-non-LTR-ретротранспозонів, яка продовжила і/або репарувала вільні кінці ДНК.

Наступні кроки non-LTR-інтеграції залишаються дещо незрозумілими, але припускається, що вони відбуваються, як це зображено на рис. 3.20, б (див. огляд: Nan, 2010). Після або під час синтезу мінус-ланцюга відбувається другий розрив ланцюга цільового сайту (на верхньому ланцюгу, рис. 3.20, б). Залежно від конкретного задіяного LTR-невмісного ретротранспозона другий розрив ланцюга відбувається нижче, вище чи на одній лінії з нижнім розривом ланцюга, генеруючи дуплікації цільового сайту (TSD — target site duplication), делеції цільового сайту або сліпі вставки. Як вибирається положення другого розриву ланцюга, не зовсім зрозуміло, і, очевидно, воно відрізняється у різних елементах. У деяких випадках другий розрив ланцюга, очевидно, наперед визначений ендо-доменом ретротранспозона. Щодо мобільних елементів ссавців, є дані, що мікрогомолія до щойно синтезованого нижнього ланцюга диктує розщеплення другого ланцюга (Zingler et al., 2005). Однак у більшості випадків ще не відомо, як відбувається розщеплення цього другого ланцюга.

Внаслідок розщеплення другого ланцюга створюється праймер для синтезу плюс-ланцюга. Із щойно синтезованого мінус-ланцюга зіскакують матриці ретротранспозонної РНК до цільового сайту ДНК верхнього ланцюга. Синтез плюс-ланцюга починається від другого розриву. Деякі класи non-LTR-ретротранспозонів набули Н-домену РНКаз, який, очевидно, видаляє матрицю мРНК у міру синтезу мінус-ланцюга. В інших елементах немає ознак Н-домену РНКаз, і мРНК просто може бути зміщена синтезом

другого ланцюга (Kurzynska-Kokorniak et al., 2007). У разі нижнього розриву другого ланцюга прогалини заповнюються, утворюючи дуплікації цільового сайту (TSDs) (рис. 3.20, б, лівий шлях). У разі верхнього розриву другого ланцюга (рис. 3.20, б, правий шлях) негомологічні ділянки (flaps) видаляються невідомими факторами, генеруючи делеції цільового сайту. Після завершення синтезу ДНК решта розривів зшиваються, завершуючи вставку.

3.7.2.2. Хазяйські чинники сприяння LTR-невмісним ретротранспозонам

Як відзначено в огляді (Han, 2010), вважається, що кодовані хазяїном фактори необхідні для реакції повної інтеграції (TPRT). Ця думка ґрунтується на тому, що для жодного LTR-невмісного ретротранспозона не показано ні біохімічно, ні біоінформаційно, що він кодує білки з усіма потрібними властивостями, необхідними для завершення такої реакції. Так, розриви, генеровані TPRT, після синтезу ДНК потребують «загоювання» (sealed), але в non-LTR-елементах кодованої лігазної активності не було виявлено. У разі делецій цільового сайту неідентифіковані нуклеази елімінують неспарену ДНК (рис. 3.20, б, правий шлях, 7-й етап). Крім того, процес повної ретротранспозиції ніколи не було відтворено *in vitro* з очищеним субстратом і білками LTR-невмісних ретротранспозонів. Це могло бути пов'язано зі складною багатоетапною природою інтеграції

LTR-елементів і нездатністю експериментатора знайти відповідні штучні умови. Однак сиквенс-аналіз процесів геномної інтеграції свідчить про участь механізму репарації ДНК хазяїна в деяких випадках інтеграції LTR-невмісних ретротранспозонів (Zingler et al., 2005; Ichiyanagi et al., 2007). Експериментальні дані підтверджують залежність LTR-невмісних ретротранспозонів від шляхів репарації ДНК хазяїна (див.: Han, 2000). У цілому, накопичені дані свідчать про участь факторів хазяїна у завершенні TPRT; однак обмеження застосованих аналізів не виключають альтернативних пояснень. У цьому відношенні non-LTR-ретротранспозони не є унікальними, оскільки інші класи транспозонів також потребують факторів хазяїна для завершення процесів транспозиції проміжних продуктів і/або репарації донорного сайту.

3.7.2.3. Регуляторні механізми хазяїна, що обмежують LTR-невмісні ретротранспозони

LTR-невмісні ретротранспозони експресуються і ретротранспозують головним чином у генеративних клітинах, це особливо стосується тварин. Еволюційний «успіх» транспозона залежить від транспозиції в генеративній лінії клітин, проте геномний вибух надлишкових транспозицій може мати негативний вплив на хазяїна. Тому клітини хазяїна зазвичай репресують транспозонну активність. Це означає, що генеративні клітини є головним еволюційним «полем битви» між транспозонами і хазяїном, де втрата транспозонної репресії може мати драматичні наслідки. Так, гібридний дисгенез — давно відоме явище у дріозофілі, коли потомство транспозон-невмісних (transposon-naïve) самок і транспозон-вмісних самців зазнає низки син-

дромів, включаючи мутації, хромосомні перебудови і стерильність. Цей синдром пов'язаний із нездатністю хазяїна контролювати транспозонну активність. Драматичний ефект вивільненого надлишку транспозицій у генеративній лінії ссавців став очевидним, коли з'ясувалося, що апрогуляція *L1*- та *IAP*-елементів призводить до стерильності (Aravin et al., 2007; Soper et al., 2008).

Наявність процесів РНК-інтерференції (РНКі) дозволила припустити, що малі РНК задіяні у сайленсингу транспозонів шляхом метилювання ДНК і деградації РНК транспозона. Генетичний скринінг показав, що РНКі-мутанти дійсно можуть приводити до загальної дерепресії транспозонів. Наразі відомо, що клітини експресують

різні класи малих РНК: мікроРНК (miRNAs), ендегенні малі інтерферуючі РНК (endo-siRNAs) та Ріві-взаємодіючі РНК (piRNAs). Значна частка endo-siRNAs та piRNAs відповідає транспозонній послідовності, що визначає механізми впізнання і репресії. Ці РНК для виконання своїх регуляторних функцій взаємодіють із членами родини білків Argonaute (Hutvagner, Simard, 2008). piRNAs є специфічними для генеративних клітин, у той час як endo-siRNAs є повсюдними.

Мутація партнерів Argonaute — endo-siRNA та piRNA — веде до अपрегуляції транспозона. Апрегуляція транспозона пов'язана з дефектами розвитку генеративної клітини, підкреслюючи значення транспозонного сайленсингу (Soper et al., 2008). У генеративних клітинах «пінгпонгова» ампліфікація не лише розщеплює мРНК транспозона, що веде до посттранскрипційної репресії, а й слугує для генерування сиквенса-специфічних субстратів для проведення метилювання ДНК. Механізм «пінгпонгової» ампліфікації полягає в тому, що смисловий ланцюг piRNA спрямовує розщеплення і формування антисмислового ланцюга, і навпаки.

Відомо, що транспозони пов'язані з метилюванням ДНК, а воно відіграє важливу роль у довготерміновому сайленсингу транспозонів. Мутації у MIL1 та MIWI2 приводять не лише до дефектів piRNA, а й до зриву відповідного метилювання ДНК транспозона, що забезпечує генетичний зв'язок між утворенням piRNA і можливим метилюванням ДНК транспозона (Kuramochi-Miyagawa et al., 2008). Припускається, що ефекторні комплекси piRNA якимось мобілізують *de novo* ДНК метилтрансферази DNMT3A, DNMT3B та їх супутній білок DNMT3L для метилювання транспозонних локусів. Як це здійснюється, ще не зрозуміло, а молекулярні механізми, що лежать в основі цих процесів, наразі активно досліджуються. Очевидно, що цей процес нагадує добре вивчені шляхи формування гетерохроматину у різних організмів (див.:

Grewal, Elgin, 2007; Henderson, Jacobson, 2007). Слід підкреслити, що ці механізми не є специфічними лише для LTR-невмісних ретротранспозонів, вони стосуються всіх транспозонів.

Внутрішньоклітинний захист від LTR-невмісних ретротранспозонів може відбуватися і за допомогою білків родини APOBEC (див. огляд: Han, 2010).

Для інгібування LTR-невмісних ретротранспозонів представниками родини білків APOBEC існує щонайменше два різних механізми: дезаміназо-залежний і дезаміназо-незалежний. Відсутність гіпермутації кодувального ланцюга від G до A за дезаміназо-залежного механізму може бути пов'язана зі швидкою деградацією мінус-ланцюгів заново синтезованої кДНК, що містять урацил. Механізм дезаміназо-незалежного APOBEC3-інгібування LTR-невмісних ретротранспозонів наразі незрозумілий, хоча аналіз особливостей локалізації специфічних білків може наблизити до розуміння їх можливої функції.

Відомо, що APOBEC3A та інгібітори B, C і H мобільного елемента *L1* людини локалізуються, принаймні частково, в ядрі, засвідчуючи можливість наявності функції блокування інтеграції елемента *L1*. Білки APOBEC3DE, F та G з'являються переважно у цитоплазмі. Вони можуть відігравати роль у цитоплазматичній ізоляції РНЧ, хоча частина APOBECs може також переміщатися до ядра і виконувати функцію в ньому. Показано, що APOBEC3G локалізуються у Р-тілцях і стресових гранулах (Gallois-Montbrun et al., 2007). Враховуючи присутність РНЧ елементів *L1* у стресових гранулах, APOBEC3G може ізолювати *L1* у цих гранулах. Коекспресія білка ORF1 з Alu (неавтономним LTR-невмісним паразитом елемента *L1*) переміщує частину транскриптів з ядра до ORF1p-вмісних гранул стресу. Цікаво, що APOBEC3G інгібує також Alu-елементи, а колокалізація APOBEC3G, *L1* та Alu може свідчити про спільний, але ще недостатньо вивчений механізм їх дії.

3.7.3. Короткі розсіяні елементи (SINEs) або ретрогени

Процес зворотної транскрипції, очевидно, лежить в основі переміщення не тільки LTR-вмісних ретротранспозонів і LINE-елементів, а й низки інших транскрибованих послідовностей.

Завдяки своїй високій гетерогенності і відносно невеликим розмірам такі послідовності отримали назву *ретрогенів*, або *SINEs-елементів* (від *short interspersed elements* — короткі розсіяні елементи).

SINEs-елементи є неавтономними ретроелементами, що використовують для переміщення ферментативний механізм автономних LINEs (довгих вкраплених елементів). Тобто SINEs-елементи не кодують білків узагалі і паразитують на апараті транспозиції LINEs-елементів. Їх довжина — 80–500 п. н. Більшість SINEs-елементів є химерними молекулами, в яких 5'-ділянка походить від гена тРНК хазяїна, середня частина невідомого походження, а 3'-регіон — від 3'-кінця LINEs-елементів (Ogiwara et al., 1999). Саме ця частина розпізнається функціональним білком LINEs-елементів. Частина, що походить від тРНК, має дві консервативні послідовності, які слугують промоторами транскрипції за допомогою РНК-полімерази III. Термінуються такі ретрогени багатими на А або Т послідовностями (Wessler, 2001; див. також: Deragon, Zhang, 2006).

Незважаючи на широку представленість SINEs-елементів у геномі ссавців (зокрема у геномі людини кількість так званих Alu-повторів може бути понад 1 млн), у рослин такі послідовності впродовж тривалого часу були невідомими. Лише в кінці минулого століття у геномі рису було виявлено невелику родину, близько 100 копій, слабогетерогенних Alu-подібних повторів *p-SINE1*, кожен з яких містить 125 п. н. Внутрішні ділянки цих повторів містять мозаїчний промотор для РНК-полімерази III, тому припускається, що елемент *p-SINE1* є фрагментом гена, який спочатку кодував структуру тРНК.

Окремі копії елемента *p-SINES* були досить мобільними в еволюційній історії роду *Oryza*, про що свідчить різна локалізація цих повторів у геномах декількох споріднених видів рису (див. далі). Пізніше SINEs-елементи було знайдено в геномах тютюну (*TS*), у представників

роду *Brassica* (*SI*). Розмір цих елементів сягає кількох сотень п. н. (Schmidt, 1999).

На сьогодні відомо, що SINEs-елементи є здебільшого видо- або родоспецифічними. Це дало підставу говорити про утворення таких елементів *de novo*, проте механізм цього процесу досі невідомий.

Нещодавно було розроблено спосіб, названий SINE-Finder, для цільового знаходження тРНК-контрольованих SINEs-елементів і проаналізовано дані сиквенсу 16 рослинних геномів, включаючи 13 покритонасінних і 3 голонасінних. Ідентифіковано 17 829 повномірних і усічених SINEs-елементів, які входять до складу 31 родини. Це засвідчує широке розповсюдження SINEs-елементів у вищих рослин. Дослідження на картоплі дозволило виявити сім різних родин SolS SINEs-елементів, що складаються з 1489 повномірних і 870 5'-усічених копій. Консенсусні послідовності повномірних представників варіюють за розміром від 106 до 244 п. н., залежно від SINE-родини. SolS SINEs-елементи населяли геноми споріднених видів і еволюціонували окремо, що дало кілька чітких підродин. SINEs-елементи Solanaceae розкидані по хромосомах і розподілені, не утворюючи чітких груп, інтегруючи переважно у короткі мотиви, багаті на А. Вони виникли понад 23 млн років тому і видо-специфічно ампліфікувалися під час розповсюдження картоплі, томату (*Solanum lycopersicum*) і тютюну (*Nicotiana tabacum*). Встановлено, що ретротранспозони тютюну TS є складними SINEs-елементами, які успішно колонізують геноми. Запропоновано еволюційний сценарій формування елементів TS як спонтанний процес, який є типовим для родин SINEs-елементів (Wenke et al., 2011).

3.7.3.1. SINEs рослин. Походження і класифікація

На сьогодні відома відносно невелика кількість родин рослинних SINEs-елементів, оскільки донедавна сиквенси рослинних геномів були рідкісними, а у зв'язку з низьким рівнем природного переміщення цих елементів і їх малого розміру, що робить SINES-вставку менше шкідливою порівняно з більшим елементом, вони рідко виявлялись, інактивуючи ключовий клітинний ген. SINEs-елементи є дуже короткими і не мають консервативної кодувальної послідовності,

що робить їх вивчення за допомогою молекулярної гібридизації складним. Незважаючи на ці труднощі, SINEs було виявлено у багатьох родинах рослин, включаючи Gramineae, Commelinaceae, Rosaceae, Solanaceae, Fabaceae, Brassicaceae.

Усі рослинні SINEs-елементи мають спільні риси, включаючи тРНКове походження, внутрішній промотор полімерази III (що складається із А і В блоків) в їхній 5'-тРНК-спорідненій

ділянці, тРНК-споріднену ділянку різної довжини, коротку протяжність Т- чи А-основ на їхньому 3'-кінці і наявність фланкуючих прямих повторів. Рослинні SINEs здебільшого розсіяні у геномі випадково, хоча вони зрідка присутні у гетерохроматинових, перицентромernih ділянках і надають перевагу ділянкам, багатим на гени. Багато родин SINEs-елементів недавно було ампліфіковано, і виявлено інсерційний поліморфізм між близькоспорідненими таксонами, що є дуже бажаною ознакою для їх застосування як молекулярного генетичного маркера.

Перший SINE-елемент, описаний у рослин, р-SINE1, було виявлено у гені *Waxy* рису *Oryza sativa* (Umeda et al., 1991). Усі види роду *Oryza* поділяють на шість диплоїдних геномних типів (AA, BB, CC, EE, FF та GG) і чотири тетраплоїдних геномних типи (BBCC, CCDD, HHJJ та HHKK). Р-SINE1 і близькоспоріднені р-SINE2-елементи присутні в усіх видів роду *Oryza*, а поширення наймолодшої родини р-SINE3 обмежене підгрупою диплоїдних видів *Oryza*, що містять геном AA (Xu et al., 2005). Консенсусні послідовності трьох елементів рису р-SINE мають довжину 122–127 п. н., а кількість їх копій становить 6500 на гаплоїдний геном. Майже всі представники трьох родин р-SINE фланковані прямими повторами розміром 9–20 п. н., а кінець — короткими полі(Т)повторами (Xu et al., 2005a). Кілька інших послідовностей рису, анотовані як SINEs, депозитовано у REPOSITORY (Jurka et al., 2005).

Родину TS SINEs-елементів виявлено у геномі кількох видів Solanaceae: *Nicotiana tabacum* (тютюн), *Capsicum annuum* (червоний стручковий перець), *Lycopersicon esculentum* (томати), *Solanum tuberosum* (картопля) і в одного виду Convolvulaceae — *Pharbitis nil*. Кількість копій TS-елементів у тютюну складає 5×10^4 на гаплоїдний геном. Більшість TS-елементів мають розмір близько 200 п. н., закінчуються повтором TTG і фланковані короткими прямими повторами. Родину TS поділяють на дві великі підродини (TSa та TSb) за їх еволюційним віком, при цьому TSa є групою «молодших» елементів.

3.7.3.2. SINEs-елементи Brassicaceae

Повне сиквенування геному *Arabidopsis thaliana* і часткове — геному *Brassica oleracea* надало можливість ідентифікувати нові родини

Родина AU SINE найпоширеніша, ці елементи виявлено у видів Gramineae (*Aegilops umbellulata*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*), Fabaceae (*Medicago truncatula*, *Lotus japonicus*, *Glycine max*) та Solanaceae (*N. tabacum*, *L. esculentum*). AU SINEs мають розмір 170–200 п. н. Найбільшу кількість копій виявлено у *A. umbellulata* та *T. aestivum* (близько 1×10^4), в яких елемент зазнав недавнього вибухового збільшення числа копій (Yasui, 2001). В інших видів рослин кількість копій є набагато меншою (близько 100 копій на геном), а елементи є більш дегенерованими, засвідчуючи, що AU SINEs у них давно не ампліфікувалися.

Першу родину SINE Brassicaceae (названу SI) було ідентифіковано в амфідиплоїдного виду *Brassica napus* (ріпак, геном AACC), що порівняно недавно виник внаслідок об'єднання геномів двох диплоїдних видів *Brassica oleracea* (CC) та *Brassica rapa* (AA). Встановлено, що SI-елемент присутній у всіх видів триби Brassiceae. Охарактеризовано три родини SINEs-елементів під назвами RathE1, RathE2 та RathE3 (RathE3 і RathE1 називають також Atsn1 та Atsn2, відповідно), дві з яких є спільними для *A. thaliana* та *B. oleracea* (Lenoir et al., 2005). Одночасно було відкрито 15 нових популяцій SINEs-елементів *B. oleracea* (названих BoS) (Zhang, Wessler, 2005). Загальний опис родини SINEs-елементів Brassicaceae представлено в узагальненому вигляді у роботі (Deragon, Zhang, 2006). Розмір консенсусних SINEs-послідовностей дуже варіабельний (завдяки мінливості довжини тРНК-неспорідненої частини), і на відміну від інших рослинних SINEs вони закінчуються досконалою полі(А)-ділянкою (perfect poly(A)region).

Представники SINEs-елементів, очевидно, присутні також у *Funkia ovata* (мохи) і *Fagopyrum tataricum* (гречка), оскільки було отримано ПЛР-продукти очікуваних розмірів із застосуванням геномної ДНК і SINE-специфічних праймерів. Нинішнє розповсюдження відомих родин SINEs-елементів свідчить про те, що SINEs є повсюдними у рослин і що кількість охарактеризованих SINEs-родин зростатиме з кількістю сиквенованих рослинних геномів.

SINEs-елементів у Brassicaceae. *A. thaliana* та *B. oleracea* дивергували від спільного предка 16–19 млн років тому. Оскільки вік родини

Brassicaceae оцінюється щонайбільше у 20 млн років (виникла одночасно з формуванням середземноморського регіону), ці два види дивергували на початку еволюції даної родини рослин. Саме тому група SINEs-елементів, спільна для *A. thaliana* та *B. oleracea*, очевидно, присутня у більшості, якщо не в усіх видів Brassicaceae. З огляду на велике різноманіття родин і підродин SINEs-елементів у Brassicaceae, було запропоновано більш систематизовану і зручну класифікацію цих ретроелементів (Deragon, Zhang, 2006).

Запропоновано усі родини SINEs-елементів Brassicaceae йменувати як «SB», а потім ставити номер. Щоб вказати конкретний вид походження, ініціали виду ставлять перед назвою (так, AtSB6 та BoSB6 є SB6 родиною *Arabidopsis thaliana* і *Brassica oleracea*, відповідно), у той час як підродина позначається кінцевою літерою (BoSB6A є підродиною «А» BoSB6). (Деталі і приклади див.: Deragon, Zhang, 2006.)

Визначено для *A. thaliana* і оцінено для *B. oleracea* число копій у всіх родинах SINEs-елементів. Для *A. thaliana* виявлено 308 SINEs-елементів, розподілених по шести різних родинах, що репрезентує 0,05 % геному. Найбільшою родиною є AtSB2 із 144 представниками, у той час як найменша родина AtSB7 має лише 3 представники. У *B. oleracea* число копій для SINEs-елементів становить 4290, що репрезентує 0,16 % геному. У *B. oleracea* присутні всі SINE-родини, за винятком SB4; найбільшою родиною є BoSB6 (735 представників, розподілених по п'яти різних підродинах), а найменшою — BoSB15 (із 40 представниками).

3.7.3.3. Походження різних родин SINEs-елементів у *A. thaliana* і *B. oleracea*

Усі консенсусні послідовності SINEs-елементів Brassicaceae мають потенційно активний внутрішній промотор, що складається із А і В блоків, який реактивує механізм РНК полімерази III. Структура цього промотора свідчить, що SINEs-елементи Brassicaceae походять, вірогідно, від однієї чи кількох послідовностей тРНК. Вихідна подія, коли одна (чи кілька) тРНК перетворилася на SINE-елемент, є очевидно давньою. Більшість SINEs, що походять від тРНК, можна поділити на тРНК-споріднену і тРНК-неспоріднену частини. тРНК-споріднена

Встановлено, що наймолодший за часом вибух SINE-ампліфікації у *A. thaliana* відбувся у родині AtSB5-елементів. Родини AtSB2, AtSB3 та AtSB6 також мають кілька близькоспоріднених копій SINEs-елементів, засвідчуючи, що ці родини у *A. thaliana* все ще можуть бути активними і сьогодні. У *B. oleracea* наймолодший вибух SINE-ампліфікації генерувала підродина BoSB1A. Геномна копія-засновник, задіяна у цьому вибухові SINE-ампліфікації (під назвою па7), була детально охарактеризована, також встановлено, що вона експресується *in vivo* (Arnaud et al., 2001) і генерує ретротранспозицію посередника (Pelissier et al., 2004). Встановлено також, що ампліфікація SINE-елементів є більш динамічною у *B. oleracea* порівняно з *A. thaliana*.

Розмір різних консенсусних SINE-послідовностей є доволі варіабельним, при цьому найменший SINE-елемент коротший від 100 п.н. (BoSB8A: 95 п.н.), у той час як найбільший — довший ніж 350 п.н. (BoSB7B: 353 п.н.). Можливо, що родини SINE з великими елементами (SB3, SB6 та SB7) є «димерними» й утворилися внаслідок злиття «мономерних» копій. (Димеризацію SINEs, що походять від тРНК, спостерігали для різних родин SINEs-елементів.) Для BoSB3 та AtSB3 цей сценарій підтверджується фактом наявності дещо дегеноерованих А і В блоків у «правому (правильному) мономері» (the right monomer) елемента (Lenoir et al., 2005). Однак для SB6 та SB7 не вдалося знайти залишків цих мотивів, і чи є ці елементи довгими мономерними, чи димерними SINEs — залишається невідомим (деталі і посилання див.: Deragon, Zhang, 2006).

частина визначається від положення «один» елемента до 14 нуклеотидів після кінця В блоку (звичний кінець молекули тРНК), у той час як тРНК-неспорідненою частиною є решта послідовності. Різні консенсусні послідовності SINE-елемента мали гомологію основної послідовності у своїх тРНК-споріднених частинах, а не в тРНК-неспоріднених частинах, засвідчуючи, що тРНК-споріднені частини можуть «тасуватися» і зливатися з «новими» тРНК-неспорідненими частинами, генеруючи різні SINEs. Філогенетичне дерево, сконструйоване на осно-

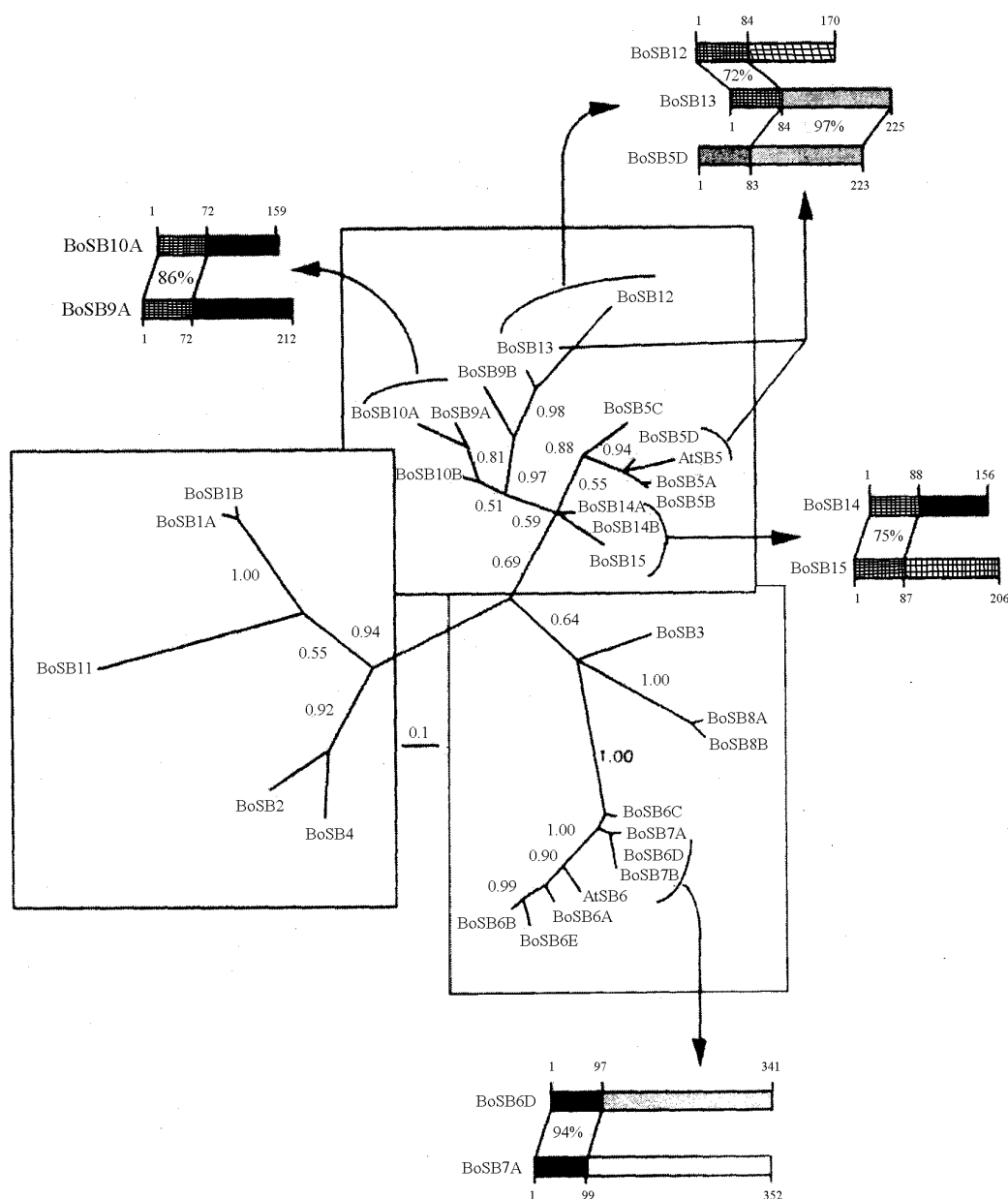


Рис. 3.21. Філогенетичний консенсус (Бейєсіанівське дерево), який описує зв'язки між тРНК-спорідненими ділянками різних родів та підродів SINE з Brassicaceae (SB)

Виділено три вірогідних різних напрями диференціації (обмежені квадратами). В середині двох із трьох генеалогічних ліній, імовірно, виникли нові SINE-родина шляхом перетасовки тРНК-споріднених ділянок. Представлено можливі пізніші процеси перетасовки та показано рівень ідентичності (у %) між тРНК-спорідненими ділянками різних SINE-родів. Подібність у складі послідовностей позначена ідентичними забарвленнями, відсутність гомології послідовностей представлена різними відтінками сірого кольору. Зафіксовано одиничну подію переміщення тРНК-неспорідненої ділянки SINE (між BoSB5D та BoSB13). Число поблизу точок перетину ліній позначає оцінку можливості (достовірність) монофілетичних таксонів.

Наведено числа, вищі за 0,5 (за: Deragon, Zhang, 2006)

ві тРНК-спорідненої частини консенсусних послідовностей різних родів і підродів SINEs-елементів, підтверджує висловлене припущення (рис. 3.21) (деталі і посилання див.: Deragon, Zhang, 2006).

Механізм, відповідальний за ці процеси перетасування, ще невідомий, але він, очевидно, включає матричне переключення під час зворотної транскрипції, яке вже описане для ретро-транспозонів (див. підрозділ 3.3.4).

3.8. Виділення ретротранспозонів

Наші уявлення про різноманіття і еволюційні тенденції МГЕ дуже збагатили дані зі сиквенування геномів — практично всі рослинні ретротранспозони були ідентифіковані завдяки виконанню проектів із сиквенування геномів рослин.

Найпоширеніший основний метод виділення LTR-вмісних ретротранспозонів включає такі ключові етапи:

- ретротранспозонні послідовності мають бути ампліфіковані за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) геномної або кДНК із застосуванням праймерів, комплементарних дуже консервативним послідовностям

LTRs чи RT-домену ретротранспозонів;

- утворені ПЛР продукти клонуються і сиквенуються або безпосередньо сиквенуються;
- гадані ретротранспозонні послідовності порівнюються із раніше визначеними рослинними LTR-вмісними ретротранспозонами.

Із застосуванням цього підходу було ідентифіковано низку *gypsy*-подібних *env*-ретротранспозонів у багатьох видів рослин, зокрема у *H. vulgare*, *O. sativa*, *Gossypium sp.* тощо. Цей підхід є також досить простим і універсальним методом ізоляції *env*-подібних генів у рослин (деталі і посилання див. у огляді: Todorovska, 2007).

3.9. Ендогенні параретровіруси (EPRVs) як особливий клас ретроелементів

До ретроелементів, окрім ретротранспозонів, відносять і віруси, які використовують зворотну транскриптазу для реплікації геному. Вірусні ретроелементи трапляються в екзогенній і ендогенній формах. Відомі ретровіруси, які містять у капсиді РНК, і параретровіруси, що містять дволанцюгову ДНК. На відміну від ретровірусів, для їх реплікації інтеграція у геном хазяїна не є обов'язковою. Тому у них відсутні властивості, необхідні для інтеграції і реплікації, зокрема відсутня інтеграза чи довгі кінцеві повтори.

Ендогенні рослинні параретровіруси (EPRVs — endogenous plant pararetroviruses) представляють собою повторювані елементи, які часто локалізуються у гетерохроматинових

прицентромерних ділянках хромосом поблизу ретротранспозонових послідовностей. У різних видів рослин, як однодольних, так і дводольних, все частіше виявляють інтегровані послідовності з майже повною ідентичністю до епісомних послідовностей — і це незважаючи на їх неінтегративний реплікаційний цикл.

Очевидно, EPRVs, як частина групи ретротранспозонів, є повсюдними у рослинному царстві. Подібно до їхніх ендогенних аналогів, EPRVs класифікують на *retrovirus*-подібні елементи, *badnavirus*-подібні елементи і представники *cavemo*- та *tungro*-вірусів згідно з кількістю та організацією відкритих рамок зчитування (ORFs) (табл. 3.1).

3.9.1. Структура й інтеграція

Детальне вивчення структури ДНК і локалізації EPRVs у геномах тютюну, томата, петунії, банана, рису показало, що ендогенні послідовності являють собою лінійні форми вихідної кільцевої вірусної ДНК. Лише кілька з проаналізованих локусів EPRV складались із суцільних протяжностей вірусних послідовностей. При цьому кількість копій EPRV варіює від кількох десятків до кількох сотень. У більшості випадків повномірний вірусний геном має реконструюватися із різних сегментів, які походять від кількох геномних локусів.

Сиквенування виявило наявність розірваних і вкорочених EPRVs з делеціями, інсерціями, ду-

плікаціями чи інверсіями. Вважається, що це є наслідком процесів незаконних чи гомологічних рекомбінацій між EPRVs та епісомними вірусними послідовностями, що відбуваються випадково (рис. 3.22).

Встановлено у деяких випадках зв'язок EPRVs із ретротранспозонами, зокрема з представниками родини *Metaviridae* (елементами *Ty3/gypsy*). Очевидно, це співіснування випадкове і пов'язане зі спільністю (близькістю) хромосомної локалізації або може вказувати на коампліфікацію (і розосередження) EPRVs із *Metaviridae*. З іншого боку, складні і вкорочені структури можуть

Таблиця 3.1

Поширення ендегенних параретровірусів (EPRVs) у геномах рослин (за: Staginnus, Richert-Pöggeler, 2006)

Рослина-хазяїн	Структурна класифікація EPRV	Здатні до активації послідовності EPRV	Не здатні до активації послідовності EPRV	Подібність до епісомного вірусу
<i>Musa acuminata</i>	Badnavirus	ND	BEV1–BEV8, BEV10, BEV12, BEV13, BEV24, BEV31, BEV32	BSUgBV, BSUgDV, BSUgEV, BSUgFV, BSUgGV
<i>Musa balbisiana</i>	Badnavirus	ND	BEV9, BEV11, BEV14, BEV15, BEV20, BEV21, BEV23, BEV25, BEV26, BEV27	BSUgCV
		BSOEV	BSMysV, BSIImV, BSOEV, BSGfV	BSMysV, BSIImV, BSOEV, BSGfV
Міжвидові АВ-ге-номні гібриди <i>Musa</i>	Badnavirus	ND	BEV16, BEV17, BEV18, BEV19, BEV22, BEV28, BEV29, BEV30, BEV33	ND
<i>Musa schizocarpa</i>	Badnavirus	ND	BEV10, BEV13	BSUgBV, BSUgGV
<i>Oryza sativa</i> (japonica, indica), також <i>Oryza</i> sp.	Tungrovirus	NK	ERTBV-A, ERTBV-B, ERTBV-C	RTBV
<i>Petunia hybrida</i> , також <i>Petunia</i> sp.	Petuvirus	ePVCV	ePVCV	PVCV
<i>Poncirus trifoliata</i>	Petuvirus	NK	ePVCV гомологічна послідовність локусу CTV.20	PVCV
<i>Nicotiana edwardsonii</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> , також <i>Nicotiana</i> sp.	Cavemovirus	TVCV	TVCV	TVCV
<i>Nicotiana sylvestris</i> , <i>N. tabacum</i> , також <i>Nicotiana</i> sp.	Cavemovirus	NK	NsEPRV (TEPRV, TPVL)	TVCV
<i>Nicotiana tomentosiformis</i> , <i>N. tabacum</i> , також <i>Nicotiana</i> sp.	Cavemovirus	NK	NtoEPRV	TVCV
<i>Solanum tuberosum</i>	Cavemovirus	NK	SotuI, SotuIII	TVCV
<i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Lycopersicon hirsutum</i> , також <i>Lycopersicon</i> sp.	Cavemovirus	NK	LycEPRV	TVCV

Скорочення: ND — не визначено; NK — не відомо.

бути результатом геномних (рекомбіногенних) перебудов, викликаних фланкуючими транспозонами. Незаконні і гомологічні рекомбінації є, очевидно, основними механізмами інтеграції

послідовностей PRV у рослинний геном (див. огляд: Staginnus, Richert-Pöggeler, 2006).

Оскільки ДНК-вмісні віруси рослин зазвичай не інфікують репродуктивні клітини, дов-

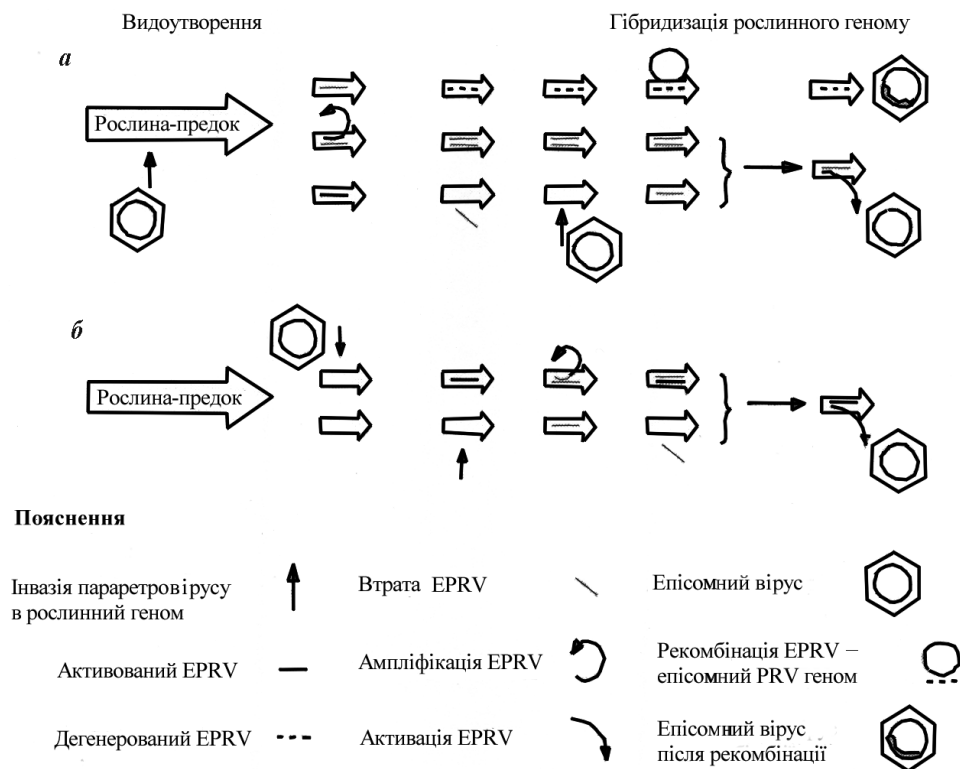


Рис. 3.22. Шляхи колонізації рослинного геному мігруючими параретровірусами (PRVs)

PRV-інвазія може траплятися перед (**а**) або після (**б**) видової диференціації. Різні фази ампліфікації, делеції, консервації чи дегенерації визначають долю інтегрантів. Рекомбінація з екзогенним вірусом або активація забезпечує міграцію ендегенно параретровірусу (EPRV) до існуючої основи геному (за: Staginnus, Richert-Pöggeler, 2006)

гий час було не зрозуміло, як успадковуються результати інтеграції. Випадкова інтеграція параретровірусів може відбуватися в соматичних клітинах. Проте лише внаслідок дедиференціювання клітин під час вегетативного розмноження чи утворення калюсу після поранення відкривається шлях їх потрапляння до потенційно репродуктивних клітин.

3.9.2. Еволюція EPRVs

Згідно з філогенією EPRVs входять до групи ретротранспозонів і ретровірусів (Hansen, Heslop-Harrison, 2004; Grandbastien, 2008) і дуже поширені в рослинному царстві (див. вище). Деякі рослинні геноми, наприклад геном тютюну чи банана, містять багато різних споріднених з EPRVs інтегрантів, які представлені різним числом копій і різними стадіями їх дегенерації. Вони, очевидно, є наслідком незалежних інтеграційних процесів (Matzke et al., 2004; Geering et al., 2005). Усі згадані геноми містять EPRVs лише одного роду *Caulimoviridae* (див. табл. 3.1),

Цікаво, що промоторно-енхансерний елемент, виявлений у одного з EPRVs пасльонових — *NsEPRV* (B1 box), діє специфічно в апікальних меристемах проростків (Mette et al., 2002). Це може свідчити про те, що екзогенний аналог *NsEPRV* міг реплікуватися у меристематичній тканині і безпосередньо інтегруватися у репродуктивні клітини, що робило ці EPRVs мейотично успадковуваними.

проте це може бути результатом ще недостатнього вивчення.

Параретровіруси, незважаючи на відмінності у циклі реплікації порівняно з відповідними їм епісомними формами, мають вражаючу еволюційну подібність до ендегенних форм ретровірусів (ERV) (Gifford, Tristem, 2003). Такі еволюційні паралелі свідчать про спільні регуляторні шляхи колонізації еукаріотних геномів. Стосовно ERVs можна очікувати різних фаз колонізації, починаючи з початкової інвазії геному з наступною ампліфікацією елементів, відповіддю хазя-

їна, що веде до фіксації та/або втрати і, нарешті, інактивації EPRV завдяки накопиченню шкідливих мутацій (див. рис. 3.22). Тому заключний перехід від горизонтального до вертикального способу передачі (в якості EPRV) з точки зору вірусу може розглядатися як «глухий кут», що веде до його зникнення (вимирання). Однак, стаючи частиною рослинного геному, вірусні послідовності можуть стати резервуаром генетичної мінливості екзогенного вірусу, що буде реалізовуватися шляхом рекомбінації чи активації (див. рис. 3.22).

3.9.3. Активація і контроль EPRVs

Активація інтегрованих PRVs детально описана для банана, петунії і тютюну, в яких вона приводила до фенотипу, характерного для інфекції відповідним вірусом, що супроводжувалося формуванням мініхромосом в ядрі і наступним збиранням вірусних частинок, які реплікуються і рухаються від клітини до клітини (Lockhart et al., 2000; Staginnus, Richert-Pöggeler, 2006).

Вважається, що активація пов'язана з епігенетичними модифікаціями, що мають місце під час геномної гібридизації (Mette et al., 2002a; Richert-Pöggeler et al., 2003), а передумовою для цього є асиметричне співвідношення копій EPRV між батьківськими геномами (Lockhart et al., 2000; Harper et al., 2002; Lheureux et al., 2003). Епігенетичний контроль послаблюється через тимчасове гіпометилування EPRVs, яке, можливо, також відповідає за активацію після поранення (Richert-Pöggeler et al., 2003) і під час культивування тканин *in vitro* (Ndowora et al., 1999; Dallot et al., 2001). Активація EPRV спостерігається також внаслідок дії абіотичних стресів, таких, наприклад, як посуха, тепловий стрес чи зміна тривалості дня (Lockhart et al., 2000; Richert-Pöggeler et al., 2003). Навіть експресії одного геномного локусу EPRV достатньо, щоб привести до вірусної інфекції. Це має серйозні економічні наслідки, особливо для банана й овочевого банана, які розмножуються вегетативно, і перешкоджає створенню нових селекційних ліній на основі міжвидової гібридизації (Lheureux et al., 2003; Meins et al., 2005).

Матриці для активації ґрунтуються, очевидно, на двох основних структурних шаблонах:

- тандемній організації EPRVs, яка може безпосередньо давати початок більше, ніж по-

У банана виявлено як здатні до активації, так і дегенеровані елементи, а порівняння їхніх послідовностей засвідчило, що впродовж еволюції мали місце кілька незалежних інтеграційних процесів (Geering et al., 2005). Відмінності за наявністю EPRV і кількістю їхніх копій у геномах томата, тютюну, петунії, рису і банана, можливо, пов'язані з кількістю процесів інвазії чи наступними фазами ампліфікації або елімінації з геному хазяїна (Kalendar et al., 2000; Gifford, Tristem, 2003; Matzke et al., 2004; Skalicka et al., 2005).

вномірному транскрипту (Richert-Pöggeler et al., 2003);

- двох фрагментах послідовностей EPRV, які можуть об'єднуватися, утворюючи кільце шляхом двоетапної гомологічної рекомбінації (Ndowora et al., 1999).

Обидві моделі потребують безперервних, повних протяжностей послідовностей EPRV і приводять до утворення молекул, еквівалентних повним епісомним вірусним мініхромосомам.

Припускають, що в культурі тканин саме хромосомні перебудови підтримують рекомбінаційні процеси, що приводять до активації інтегрованих копій послідовностей вірусу банана BSOEV (Ndowora et al., 1999). Metaviridae, які часто фланкують EPRVs, також відіграють роль в їх активації (Matzke et al., 2004), але, очевидно, не всі EPRVs можуть бути активовані, незважаючи на їх зв'язок із ретротранспозонами (Kunii et al., 2004). Отже, потенційно інфекційні структури EPRV можуть бути активовані «зовнішніми» чинниками, що запускають рекомбінацію чи деметилування ДНК і модифікацію хроматину. Аналіз сегрегуючої популяції триплоїдних гібридів банана (AAB) привів до виявлення регуляторного фактора експресії EBSOEV, пов'язаного із В-геномом, який, очевидно, дозволяє експресію EBSOEV лише у гетерозиготному стані С після геномної гібридизації (Lheureux et al., 2003).

На прикладі пасльонових Solanaceae встановлено, що рослини-хазяї для контролю EPRVs застосовують епігенетичні механізми, інтегровані послідовності метилуються в симетричних і асиметричних цитозинових залишках (рис. 3.23).

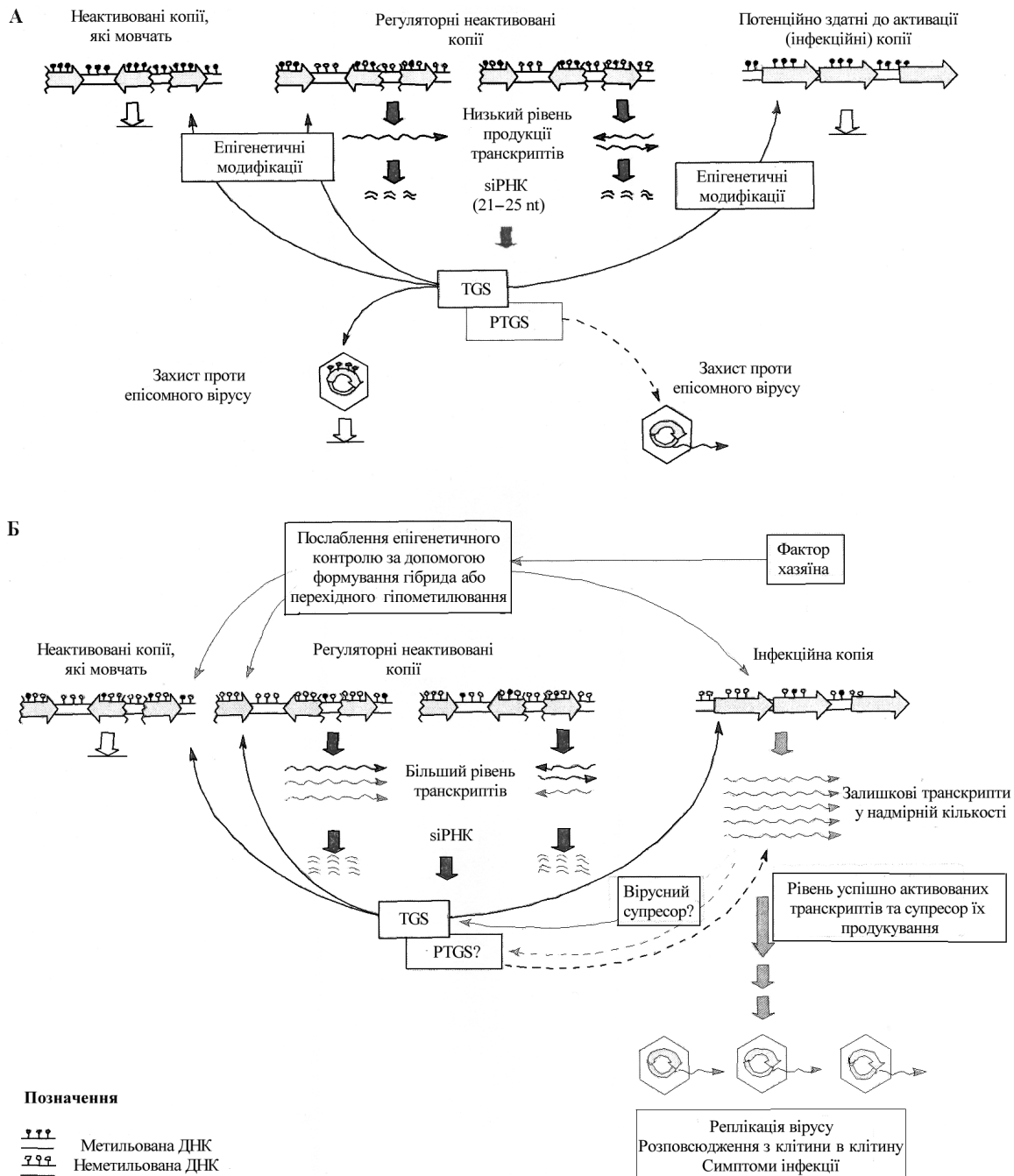


Рис. 3.23. **А** — модель епігенетичного контролю ендопаретровірусу (EPRV). Генوم містить метильовані, гетерохроматинові (мовчазні) копії і декілька копій, доступних для ДНК полімерази, яка продукує транскрипти у незначній кількості. Зазвичай у них немає відповідної структури для збирання інфекційної копії, хоча така структура може бути присутня в деяких геномах. Транскрипти забезпечують матриці, необхідні для продукування siPHK, які індукують або зберігають епігенетичні модифікації (метилування ДНК, формування гетерохроматину) гомологічних локусів шляхом TGS (transcriptional gene silencing — транскрипційний генний сайленсинг) і жорстко контролюють потенційно інфекційні копії чи інвазивні екзогенні віруси. Крім того, тригером (перемикачем) може бути механізм PTGS (post-transcriptional gene silencing — посттранскрипційний генний сайленсинг) (пунктирна стрілка).

Б — модель активації ендопаретровірусу (EPRV). Епігенетичний контроль послаблено, наприклад, за допомогою утворення гібридів або тимчасового гіпометилування, що спричиняє збільшення рівня транскрипції і приводить до продукції молекул РНК у великій кількості або просто з маси тандемних повторів, або шляхом рекомбінації. Ці транскрипти є критичними для вірусної реплікації. Збільшення продукції вірусних білків може зумовлювати вірусний супресор, який розбалансовує систему захисту рослини. Обидва механізми призводять до системного інфікування та появи симптомів хвороби у рослини-хазяїна. До того ж, фактор(и) хазяїна одного з батьків може індукувати експресію EPRVs у гібриду (за: Staginnus, Richert-Pöggeler, 2006)

Метилування відбувається як у здатних, так і у не здатних до активації копіях та включає кодувальні і некодувальні ділянки. Разом з тим, транскрипти EPRVs трапляються не лише у рослин з активованими епісомними видами вірусів. Бази даних містять відомості про послідовності, гомологічні кодувальним і міжгенним послідовностям EPRVs у картоплі, томата і деяких їхніх диких родичів.

Такі транскрипти можуть служити як попередники малих інтерферуючих РНК (siRNAs), що визначають транскрипційний (TGS) і пост-транскрипційний генний сайленсинг (PTGS) (рис. 3.23, А). Зокрема, метилування цитозинів *de novo*, яке забезпечують DRM-метилази, потребує постійного сигналу siRNA. До того ж, диметилування лізинового залишку гістону 3 у положенні 9 (H3K9) — ознаку гетерохроматину, тісно пов'язану із сигналюванням siRNA і метилуванням ДНК (Matzke, Birchler, 2005), спостерігали у копій ePVCV у петунії *P. hybrida*. Більше того, siRNAs розміром 21–25 нуклеотидів (nt) виявлено у *LycEPRVs* та ePVCV. Різні розміри молекул siRNA вказують на дію численних Dicer-подібних ферментів. Геномний стрес, що порушує епігенетичний контроль (наприклад, транзйентне гіпометилування чи утворення гібрида), сприяє активації EPRV та інфекції (рис. 3.23, Б).

РНК-опосередкований механізм сайленсингу, що обмежує кількість транскриптів, може надавати селективних переваг хазяїну, захищаючи його від гомологічних вірусних патогенів, як це було показано для EPRVs тютюну і банана (Hull et al., 2000; Mette et al., 2002; Geering et al., 2005). Така властивість, як захисна роль, може поясни-

ти їх консервацію в деяких геномах (Geering et al., 2005). Цікаво, що сайленсинг і метилування трансгена з промоторними послідовностями, що походять від EPRV, відбувалися у тютюну, який містить у своєму геномі гомологічні промоторні елементи. Однак конструкція була активною і не метилувалася у геномі арабідопсиса *A. thaliana*, в якого відсутні послідовності, еквівалентні EPRV.

Окрім сиквенс-специфічних механізмів, на EPRVs, як і на інші повторювані геномні компоненти, очевидно, діють механізми геномних змін і вищого порядку. Наприклад, С–Т перехід, індукований метилуванням цитозину як вторинним впливом TGS, може викликати дегенерацію функціональних рамок зчитування; це описано для багатьох сиквенованих копій EPRV, наприклад для *NsEPRV* (Jakowitsch et al., 1999). Процеси крупномасштабної елімінації описано на прикладі тютюну для копій *NtoEPRV* після формування синтетичних алотетраплоїдів (Skalicka et al., 2005); такі процеси, очевидно, відбуваються у тютюнів і в природі (Matzke et al., 2004). Вважається, що лабільність цієї групи EPRV викликана, можливо, хромосомними перебудовами і може бути пов'язана з рекомбіногенними ефектами близькоасоційованих елементів *Ty3-gypsy* (Metaviridae) (Gregor et al., 2004; Matzke et al., 2004; Skalicka et al., 2005).

Таким чином, EPRVs можна розглядати або як специфічний тип повторюваного компонента в рослинному геномі, або як «інкорпоровані віруси» — «природні трансгени», що зберігають інфекційність залежно від ступеня їх консервації. Вони зберігають здатність до активації, але можуть надавати хазяїнові і сприятливих ознак.

3.10. Ретротранспозони — ключові ознаки, роль у формуванні розміру й еволюції геному рослин. Підсумок

Ретротранспозони рослин є гетерогенною групою мобільних генетичних елементів, спільною ознакою яких є реплікативний характер транспозиції. Першими елементами, що засвоїли такий механізм переміщення, були, очевидно, інтегровані копії генетичного матеріалу ретровірусів, які пізніше започаткували LTR-вмісні ретротранспозони. Кодована ретротранспозонами зворотна транскриптаза виявилася здатною ви-

користувати як матриці різноманітні поліаденильовані транскрипти гена *POL*, що поступово привело до виникнення широкого спектра LINEs-елементів. Аналогічні процеси, очевидно, могли відбуватися і на інших типах транскриптів, зокрема на tРНК, у результаті чого сформувалися відносно короткі SINEs-елементи.

Незважаючи на зазвичай низький ступінь мобільності, ретротранспозони рослин можуть

становити досить істотну частку геному. Переважна більшість сучасних досліджень, спрямованих на пошук і вивчення нових ретротранспозонів, певною мірою зачіпає питання еволюції і належності описуваного елемента до тієї чи іншої філогенетичної групи. У наш час пошук і опис МГЕ ведеться на основі повних геномних послідовностей, що значно розширює можливості дослідників. На жаль, більшість досліджень є вузькоспрямованими і стосуються переважно лише модельних об'єктів. Тому дослідження ретротранспозонів, їх еволюції, поширення і різноманітності все ще далекі від завершення. Включення до аналізу все нових і нових видів, як і застосування різних підходів, комбінація біоінформативних і експериментальних методів дослідження щодня розширюють наші знан-

ня про цю групу елементів геному і про їх роль в еволюції і функціонуванні геному еукаріотів, у тому числі й рослин.

Слід підкреслити, що дослідження ретротранспозонів рослин надає інформацію про роль ретротранспозонів в організації геному вищих еукаріотів. Відмінності у розмірах геномів рослин прямо пов'язані з кількістю ретроелементів. Установлено, що збільшення розмірів геномів рослин у процесі еволюції пов'язане з активними переміщеннями ретротранспозонів, тоді як зменшення розмірів відбувається внаслідок елімінації ретротранспозонів за рахунок рекомбінаційних процесів (Vitte, Panaud, 2005). Зокрема, встановлено, що основну роль у геномній диференціації і еволюції видів рису *Oryza* відіграють саме ретротранспозони (Zhang et al., 2007).

Розділ 4. ДНК-ТРАНСПОЗОНИ

Загальну характеристику рухомих елементів геному рослин, у тому числі й деяких ДНК-транспозонів, наведено у розділах 2 і 3. Тут проведено детальніший аналіз біології ДНК-транспозонів.

На відміну від ретротранспозонів, які використовують реплікативний принцип переміщення, властиві рослинам мобільні елементи II класу мігрують за рахунок вирізання (ексцизії) та наступного вбудовування (реінтеграції) у геном. В основу такого механізму покладено характерну структуру ДНК-транспозонів, насамперед їх інвертовані кінцеві повтори TIR (terminal inverted repeats), потрібні для рухливості окремої копії елемента (рис. 4.1). Крім того, безпосередньо до інвертованих кінцевих повторів звичайно прилягають порівняно довгі ділянки, що містять багаторазово повторений олігонуклеотидний мотив. Ці ділянки, що отримали назву субтермінальних, також необхідні для транспозиції, однак ні вони, ні інвертовані кінцеві повтори самі не здатні забезпечити мобільність елемента. Для здійснення успішної транспозиції кінцеві ділянки елемента повинні розпізнаватися певним білком, що має назву транспозаза. Структура цього білка кодується геном *TNP*, який міститься у внутрішній ділянці

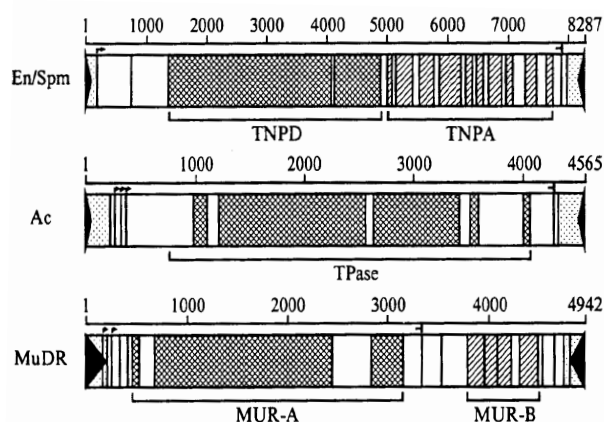


Рис. 4.1. Структура ДНК-вмісних транспозонів кукурудзи *En/Spm*, *Ac* та *MuDR*

Кожна повномірна копія ДНК-транспозона містить інвертовані кінцеві повтори (їх вказано чорними трикутниками), а також несе у своїй внутрішній ділянці структурні гени білків, що безпосередньо обслуговують транспозицію. Сайти ініціації та напрямку транскрипції вказано маленькими стрілками. Екзонні ділянки заштриховано для кожного продукту по-різному (за: Лутова и др., 2000)

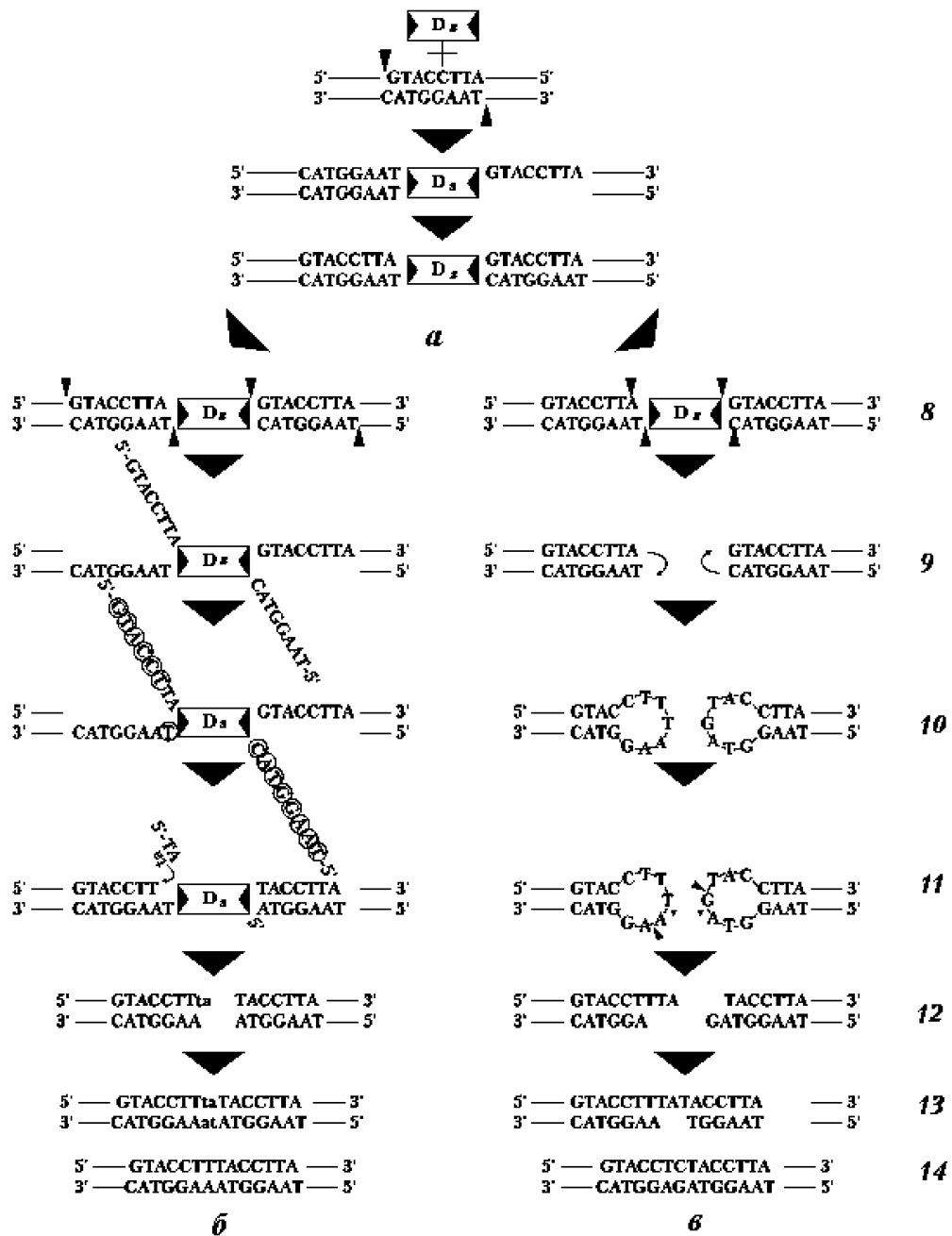
мобільного елемента. Відповідно до цього повноцінні копії ДНК-транспозонів здатні переміщуватися в автономному режимі, якщо не враховувати ферментативні системи «хазяїна», що забезпечують експресію гена *TNP*. Більшість функціонально активних копій зберігають свою здатність до автономного переміщення також і в гетерологічних системах.

Транспозиція є сполученням тісно взаємопов'язаних процесів вирізання та наступної реінтеграції мобільного елемента. ДНК-транспозон вбудовується в ділянку геному, яка називається *сайтом мішені*. Вбудовування зазвичай пов'язане з асиметричним розкриттям сайту мішені, внаслідок чого на кінцях інтегрованої копії мобільного елемента виникають короткі прямі повтори (рис. 4.2, а). Розмір сайтів мішені є для одного й того самого ДНК-транспозона сталою величиною, в той час як їх нуклеотидна послідовність може варіювати у досить широких межах.

Якщо процес інтеграції ДНК-транспозонів є зрозумілим, то механізм їх вирізання ще до кінця не вивчено. Встановлено, що точна ексцизія елемента, яка супроводжується повним відновленням вихідного сайту мішені, відбувається у рослин надзвичайно рідко. Здебільшого на місці елемента, що мігував, знаходять характерний «слід», що являє собою дві видозмінені копії вихідного сайту мішені. Один і той самий мобільний елемент у процесі незалежних актів своєї транспозиції може залишати в хромосомній ДНК кілька типів «слідів» суворо визначеної структури. Ґрунтуючись на цих даних, для елемента *Ds* кукурудзи побудовано дві можливі моделі ексцизії.

Згідно з однією з них (рис. 4.2, б) перший етап полягає в утворенні одноланцюгових розривів точно на 5'-кінцях дуплікованого сайту мішені. Внаслідок такої ендонуклеазної атаки транспозон вирізається з хромосоми разом із двома одноланцюговими фрагментами, які в подальшому деградують.

Водночас аналогічні одноланцюгові фрагменти, що залишились у складі хромосомної ДНК, зменшуються на один нуклеотид, а потім за допомогою репаративного синтезу добудовуються до так званих «тупих кінців». Лігування

Рис. 4.2. Міграція ДНК-транспозона *Ds* кукурудзи:

a — інтеграція транспозона у ділянку дволанцюгового розриву з «липкими кінцями». У результаті такого процесу відбувається дуплікація сайту мішені з боків інтегрованого транспозона; *б* — вирізання транспозона з репаративною забудовою утвореної бреші за механізмом можливої зміни матриці (гіпотеза); *в* — вирізання транспозона з репаративною забудовою утвореної бреші за механізмом проміжних шпильок (гіпотеза); *1* — внесення розривів у ДНК; *2–4* — утворені одностанцюгові ділянки підлягають частковій деградації (відповідні нуклеотиди обведені кружальцями), після чого добудовуються до «тупих кінців» з можливою зміною матриці; *5–7* — лігування дволанцюгових розривів, що залишилися після виходу *Ds*-елемента. Залежно від того, які процеси відбувалися на етапах 2–4, структура кінців, що підлягають лігуванню, може виявитися дещо різною. З цієї причини незалежні транспозиції одного і того ж *Ds*-елемента приводять до виникнення різних варіантів «слідів». Так, у разі зміни матриці «слід», що утворюється, нестиме два додаткових нуклеотиди (їх позначено маленькими літерами); *8* — внесення розривів у ДНК; *9–10* — вільні кінці кожного хромосомного фрагмента замикаються один на одного з утворенням шпильки; *11–14* — асиметричне розкриття шпильок (точки розривів показані великими стрілками) з наступним лігуванням обох хромосомних фрагментів. Оскільки утворені вільні кінці можуть зазнавати різних варіантів укорочення (маленькі стрілки), «слід», що незалежно утворюється, також є дещо різними (за: Лутова и др., 2000)

останніх відновлює цілісність хромосоми, яка тепер позбавлена мобільного елемента, а замість вихідного сайта мішені містить нову послідовність з 14 нуклеотидів. Процес добудовування одного з одноланцюгових фрагментів може супроводжуватися випадковою зміною матриці, внаслідок чого відповідний фрагмент (а разом із ним і весь залишений транспозоном «слід») подовжується на додатковий динуклеотид. Отже, ця схема ексцизії передбачає можливість утворення двох типів «слідів» різного розміру.

Відповідно до альтернативної моделі (рис. 4.2, в) ексцизія *Ds*-елемента відбувається внаслідок одноланцюгових розривів, що виникають зі зсувом на один нуклеотид безпосередньо біля кінця транспозона. У ділянці цих розривів комплементарні ланцюги хромосомної ДНК замикаються один на інший з утворенням петлеподібних структур, які потім асиметрично розкриваються і взаємно лігуються з відновленням цілісності хромосоми. Ділянка лігування містить локальні неспарені ділянки, які в подальшому репаруються або по одному, або по іншому ланцюгу, що приводить до утворення двох типів «слідів».

Обидві моделі однаковою мірою пояснюють формування двох типів «слідів» у незалежних актах транспозиції одного і того самого *Ds*-елемента. Наразі відсутні дані, які дозволяють зробити вибір на користь тієї чи іншої моделі. Не виключено, що реальний механізм ексцизії *Ds*-елемента цілком може суміщати окремі етапи обох розглянутих схем.

Вирізані копії деяких ДНК-транспозонів, зокрема *Ac*-, *MuI*- і *Mu I.7*-елементів кукурудзи, інколи вдається виявити у вигляді позахромосомних ковалентно замкнутих кілець. Проте все ще незрозуміло, що представляють такі кільця — проміжну фазу, яка закономірно виникає у ході міграції елемента, чи якийсь продукт аномальної ексцизії. У будь-якому разі вирізані ДНК-транспозони, очевидно, залишаються у позахромосомному стані нетривалий час і швидко вступають у процес реінтеграції. Вірогідно, цьому сприяє тісний фізичний контакт, який тимчасово виникає між вихідним (донорним) і новим (акцепторним) сайтами локалізації транспозона. Обидва сайти, як правило, розташовані у межах однієї і тієї самої хромосоми на відносно незначній відстані один від одного.

Копія мобільного елемента, що мігрувала, фланкована прямими дуплікаціями нового (акцепторного) сайта мішені і може залучатися в аналогічні цикли транспозиції. Такі цикли закономірно відтворюються навіть за штучного перенесення функціонально активного ДНК-транспозона в інші види рослин, які не мають власних мобільних елементів II класу. Це вказує на те, що всі ключові етапи транспозиції, у тому числі розпізнавання кінцевих ділянок елемента, а також утворення специфічних розривів у процесі ексцизії і реінтеграції, втілюються саме транспозазою. Дійсно, продукт гена *TNP* зв'язується *in vitro* з інвертованими кінцевими повторами й особливо ефективно — із субкінцевими ділянками відповідного елемента. Між тим, для жодної з досліджених транспозаз не виявлено наявності ендонуклеазної активності.

Генетичні наслідки транспозиції полягають не лише у фізичному переміщенні мобільного елемента, а також і в зміні експресії генів, що локалізовані в ділянці старого і нового сайтів мішені. Так, вбудовування ДНК-транспозона у промоторну або кодувальну частину функціонально активного гена звичайно призводить до утворення мутантної алелі, що характеризується рецесивним проявом. У свою чергу, інтегрована копія мобільного елемента здатна до подальшої ексцизії, що зумовлює високу нестабільність такої мутантної алелі. З урахуванням, що залишені ДНК-транспозонами «сліди» мають невеликі розміри і в багатьох випадках навіть не порушують відкриту рамку зчитування, ексцизія мобільного елемента може проявлятися як реверсія мутантної алелі до псевдонормального стану. Саме висока нестабільність певних мутантних алелей зазвичай слугує формальною генетичною основою для виявлення мобільних генетичних елементів.

Незважаючи на подібність механізму переміщення ДНК-транспозонів, різні представники цього класу характеризуються низкою специфічних ознак, що зумовлені, перш за все, різною структурою інвертованих кінцевих повторів, які слугують сайтами пізнання для відповідних транспозаз. Саме тому структура кінцевих ділянок покладена в основу сучасної класифікації ДНК-транспозонів. Згідно з цією класифікацією властиві рослинам мобільні елементи II класу

поділяють на кілька основних груп, що отримали своє позначення від найбільш вивчених представників у геномі кукурудзи:

- група *Ac*-подібних елементів, для яких характерні короткі інвертовані кінцеві повтори (5–15 п. н.), що містять консервативний мотив 5'-CAGGGATGAAA-3';
- *En/Spm*-подібні елементи, кінцеві ділянки яких представлені короткими (переважно 13 п. н.) інвертованими повторами, що починаються мотивом 5'-САСТА-3'. Тому такі транспозони називають САСТА-елементами;
- *Mu*-подібні елементи, які різко виділяються серед інших ДНК-транспозонів своїми довгими кінцевими повторами (близько 220 п. н.).

У міру сиквенування все нових і нових геномів відкриваються і нові, навіть досить великі групи МГЕ, які належать як до транспозонів, так і до ретротранспозонів.

Наприклад, нещодавно було визначено і проаналізовано нову надродину різноманітних ДНК-транспозонів, названу *Ginger* (*Gypsy* *InteGrasE* Related). Кінці елементів *Ginger* є подібними до кінців *Gypsy*-елементів, що належать до LTR-вмісних ретротранспозонів. Існує припущення, що LTR-вмісні ретротранспозони еволюціонували (виникли) у геномах ранніх евкаріотів із LTR-невмісного ретротранспозона, з'єднаного з ДНК-транспозоном (Bao et al., 2010). *Ginger*-елементи поділяють на дві групи — *Ginger1* та *Ginger2/Tdd*. *Ginger1* містять термінальні інвертовані повтори (TIRs) розміром 40–270 п. н., які облямовані CCGG-специфічними або CCGT-специфічними послідовностями дуплікації сайту мішені (TSD). Транспозази, кодовані *Ginger1*-елементом, містять N-кінцеву ділянку розміром близько 400 амінокислот, що має високу подібність до *Gypsy*-кодованих інтеграз, включаючи YPYY-мотив, цинковий палець, DDE-домен і, що важливо, GPY/F-мотив, який є ознакою *Gypsy* та інтеграз ендеогенних ретровірусів (ERVs). Транспозази *Ginger1* також містять C-кінцеві домени: яєчниковий пухлино-специфічний протеазний домен (OUT) або Ulp1-протеазний домен. У геномах хребетних виявлено щонайменше два гени хазяїна, які раніше вважалися такими, що походять від *Gypsy*-інтеграз, насправді ж вони еволюціонували від транспозазних генів елемента *Ginger1*. Автори

виділили і другу групу *Ginger*-елементів, яку позначили як *Ginger2/Tdd* і яка включає ДНК-транспозон *TDD-4*. Таким чином, на думку авторів, надродина ДНК-транспозонів *Ginger* представляє евкаріотні ДНК-транспозони, тісно пов'язані з LTR-вмісними ретротранспозонами. *Ginger*-елементи дали можливість розробити уявлення про еволюцію мобільних генних елементів і певних генів, що походять від МГЕ (подробити див.: Bao et al., 2010).

Виявлено короткий елемент, який містить на кінцях короткі інвертовані повтори, переміщується по геному за механізмом «вирізання-вбудовування» і тому є транспозоном. Цей елемент, названий «МІТЕ», як виявилось, не кодує власної транспозази і здатен переміщуватися за рахунок транспозази якогось іншого, «автономного» елемента, що належить до тієї самої родини.

У вищих рослин виявлено кілька неавтономних ДНК-транспозонів. До них належать: *Cin3*-елемент кукурудзи (містить довгі кінцеві повтори, але не має гомології з транспозонами *Mu*-групи), три ДНК-транспозони (*Tat1* із геному арабідопсиса, *Tourist* та *Stowaway* із геному кукурудзи), для кожного з яких характерними є унікальні кінцеві ділянки (табл. 4.1). Ця група ДНК-транспозонів вивчена, порівняно з іншими, дещо менше. Проте тут значно частіше з'являються нові й нові дані, що розширюють наші знання про біологію МГЕ.

Наприклад, у геномі цукрового буряку виявлено три родини мініатюрних інвертовано повторюваних транспозабельних елементів (VulMITEs), що походять, очевидно, від представника родини транспозонів *Vulmar*. VulMITEs I є типовими *stowaway*-подібними MITEs, а VulMITEs II та VulMITEs III — перебудованими *stowaway*-елементами більшого розміру. Встановлено, що відбувається інтенсивна інтеграція різних помірно- і високоповторюваних послідовностей у VulMITEs II і VulMITEs III, відповідно. Ампліфікація повторюваної ДНК MITEs зумовлює збільшення розміру геному з відомими наслідками для еволюції рослинного геному (детальніше ця проблема обговорюється у розділі 10). За допомогою флуоресцентної гібридизації вперше візуалізовано розподіл ДНК-транспозона *stowaway* MITE на рослин-

Таблиця 4.1

ДНК-транспозони рослин (за: Лутова и др., 2000)

Назва транспозона	Автономність переміщення	Об'єкт	Кількість копій	Розмір транспозона	Розмір і структура TIR, п. н.	
Транспозони типу <i>Ac</i> (дуплікація сайта мішені 8 п. н.)						
<i>Ac</i>	+	Кукурудза	0–2	4565 п.н.	11	5' CAGGGATGAAA* 3' TAGGGATGAAA
<i>Ds</i>	– (дефектна копія <i>Ac</i>)	Кукурудза	>50	До 30 т. п.н.		— ” —
<i>Bg</i>	+	Кукурудза	?	4869 п.н.	5	CAGGG
<i>rDT</i>	–	Кукурудза	До 20	704 п.н.	14	5' CAGTGTTTTTAAATC 3' CAATGTATTAAATC
<i>Tam3</i>	+	Садіві ротики	25–30	3629 п.н.	12	TAAAGATGTGAA
<i>Slide-124</i>	+	Тютюн	Багато	3733 п.н.	8	TAATGCT
<i>dTnp1</i>	–	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	1–2	565 п.н.	14	5' CAGTGCCGGCTCAA 3' CAAGGGCGGCTCAA
<i>Tst1</i>	–	Картопля	>10	736 п.н.	11	5' CAGGGGCGTAT 3' CAGAGGCGTAT
<i>Ips-r</i>	–	Горох	?	0,8 т. п.н.	12	TAGGGGTGGCAA
<i>Tag1</i>	?	Арабідопсис	0–3	3299 п.н.	22	CAATGTTTTCACG...
<i>Tpc1</i>	–	Петрушка	?	927 п.н.	11–12	5' TAGGG•TGTA 3' TAGGGCTGTA
<i>dTph1</i>	–	Петунія	>50	283 п.н.	12	CAGGGGCGGAGC
<i>Gulliver</i>	?	Хламідомонада	12	12 т. п.н.	15	CAGGGGTCGTATCTT
Транспозони типу <i>En/Spm</i> (дуплікація сайта мішені 3 п. н.)						
<i>En/Spm</i>	+	Кукурудза	0–2	8287 п.н.	13	CACTACAAGAAAA
<i>I/dSpm</i>	– (дефектна копія <i>En/Spm</i>)	Кукурудза	>50	0,9– 8,3 т. п.н.		— ” —
<i>MPI1</i>	?	Кукурудза	?	9 т. п.н.	13	CACTACCGGATT
<i>Tnr3</i>	–	Рис	Багато	1536 п.н.	13	5' CACTAGAAGGGAT 3' CACTAGTACAGAT
<i>Tam1</i>	+	Садіві ротики	15–20	15 т. п.н.	13	CACTACAACAAA
<i>Tam2,3,4...</i>	– (дефектна копія <i>Tam1</i>)	Садіві ротики	До 10	До 7 т. п.н.	13–14	CACTACAACAAAAA
<i>Tgm1</i>	–	Соя	До 50	3,5 т. п.н.	13	CACTATTAGAAAA
<i>Pis1</i>	?	Горох	>100	2,5 т. п.н.	12	CACTACGCCAAA
<i>Tpn1</i>	?	Myrabilis	>50	6412 п.н.	28	CACTACAAGAAAAA...
Транспозони типу <i>Mu</i> (дуплікація сайта мішені 9 п. н.)						
<i>MuDR</i>	+	Кукурудза	0–2	4942 п.н.		Близько 220 п. н.
<i>Mu1,2,3...</i>	– (дефектна копія <i>MuDR</i>)	Кукурудза	До 50	1–2 т. п.н.		— ” —
Інші типи ДНК-транспозонів						
<i>Tat1</i>	–	Арабідопсис	>4	431 п.н.	13	TGTGGATGTCGGA
<i>Stowaway</i>	–	Багато видів квіткових	?	80–323 п.н.	11	CTCCCTCCGTT**
<i>Tourist</i>	–	Багато видів однодольних	1000– 50 000	125– 142 п.н.	14	GGCCTTGTTTCGGT**
<i>Cin2</i>	–	Арабідопсис	4	1213 п.н.		Відсутні
<i>Cin3</i>	–	Арабідопсис	Багато	1771 п.н.		624 п. н.

* Жирним шрифтом виділені нуклеотидні положення, що не збігаються у 5'- і 3'-повторів TIR.

** Наведено консенсусний мотив, який значно варіює у різних копіях мобільних елементів.

них хромосомах і виявлено у цукрового буряку розсіяну локалізацію VulMITEs по всіх його хромосомах. При вивченні фланкуючих послідовностей знайдено цільовий сайт інтеграції *stowaway*-елемента VulMITE I, яким виявилися розсіяні послідовності. На основі результатів вивчення інсерційного поліморфізму різних сортів і видів буряку припускається недавня транспозиція VulMITE I, яка відбулася, очевидно, під час доместикації культурного буряку *Beta vulgaris* (Menzel et al., 2006).

Порівняно недавно відкрито новий клас евкаріотних транспозонів — гелітронів (*Helitrons*), які, на відміну від інших транспозонів евкаріотів, не мають термінальних повторів і не викликають дуплікацій цільового сайту ДНК, саме тому їх виявлення є досить проблемним. Гелітрони були спочатку виявлені за аналізу бази даних геномів арабідопсиса, рису, кукурудзи, а на сьогодні їх знайдено у представників практично всіх евкаріотів (див. огляди: Bennetzen, 2005; Шпильчин, Терновська, 2010, а також експериментальне дослідження: Yang, Bennetzen, 2009).

Автономні гелітрони містять відкриті рамки зчитування (ORFs), що кодують ДНК-геліказу, одну або дві копії нуклеази або лігази, подібно до прокаріотних репліконів за типом «обруча, що котиться», властивого бактеріальним транспозонам (Mahillon, Chandler, 1998; Kapitonov, Jurka, 2001; Burt, Trivers, 2006). Проте більшість гелітронів є неавтономними, вони не кодують повного набору функціональних білків, а мають лише подібні до автономних представників кінцеві послідовності.

3'-кінці гелітронів містять ділянку, що може сформувавши шпильку розміром 12–18 п. н. із неспареною петлею розміром 2–4 п. н., за якою на 5–8 п. н. нижче міститься консенсусна послідовність CTRR, а 5'-кінець містить термінальну послідовність TC. Ці консервативні компоненти є єдиними *cis*-послідовностями, необхідними для транспозиції гелітрону. Гелітрон вставляється у цільову послідовність AT, між A і T нуклеотидами, тому 5'-кінець є завжди послідовністю A/TC, а 3'-кінець — послідовністю CTRR/T (Burt, Trivers, 2006). (Детальніше опис гелітронів наведено у розділі 4.4.)

Рослинні транспозони вперше було досліджено та виділено з послідовностей ДНК, роз-

ташованих поблизу активних генів. Зазвичай вони демонстрували незвичайну поведінку та були нестабільними. Наприклад, перші дослідження показали, що такі транспозони, як *Mu1* та *Spm*, вбудовуються переважно в неметильовані ділянки геному кукурудзи. Інші представники даного класу транспозонів — *Ac/Ds*, MITEs, гелітрони — також надають перевагу неметильованим, еухроматиновим ділянкам поблизу активних генів (Fedoroff, 2000). Роль гелітронів у створенні нових генів розглянуто нижче (див. розділ 10.2).

Отже, інвертовані кінцеві повтори, що входять до складу різних ДНК-транспозонів, істотно відрізняються один від одного як за розміром, так і за конкретною нуклеотидною послідовністю. Кожен тип інвертованих кінцевих повторів специфічно пізнається певною транспозазою, яка кодується внутрішньою ділянкою того самого мобільного елемента. У свою чергу, кожен тип транспозаз використовує сайти мішені лише певного розміру. Відповідно, основні групи ДНК-транспозонів відрізняються одна від одної не лише структурою інвертованих кінцевих повторів, а й нуклеотидними послідовностями гена *TNP*, а також розміром сайтів їх мішені.

Структура будь-якого мобільного елемента може порушуватися різними мутаціями, які блокують його функціональну активність. Залежно від локалізації такі мутації здатні приводити до ефектів двох типів. Зокрема, мутантні копії ДНК-транспозонів, які несуть пошкодження у гені *TNP*, кодують дефектну транспозазу, а тому втрачають здатність до автономного переміщення. Разом з тим, подібні копії зберігають повністю нормальні кінцеві ділянки і можуть мігрувати за наявності у геномі хоча б однієї функціонально активної алелі гена *TNP*. Здатність до пасивної транспозиції зберігається у таких копіях навіть при заміщенні їхніх внутрішніх ділянок будь-якими неспорідненими послідовностями, наприклад селективними або репортерними генами. Ця особливість мобільних елементів II класу широко застосовується за проведення транспозонового мутагенезу (див. розділ 18).

На відміну від мутацій по гену *TNP*, дефектність інвертованих кінцевих повторів призводить до повної нерухомості елемента. Між тим, подібний елемент містить у своїй внутрішній ді-

лянці нормальну алель гена транспозази, здатну забезпечувати пасивне переміщення споріднених неавтономних копій.

Таким чином, кожен тип ДНК-транспозонів представлений у геномі щонайменше трьома варіантами:

- повноцінні мобільні елементи, здатні переміщуватися навіть у гетерологічній системі;
- неавтономні елементи, мобільність яких може забезпечуватися лише за рахунок функціонально активної транспозази, що кодується іншими копіями даного транспозона;
- повністю нерухомі елементи, здатні тим не менше активувати транспозицію споріднених неавтономних копій.

Успішну транспозицію може забезпечувати комплементарна взаємодія між нерухомими і

неавтономними копіями навіть за повної відсутності функціонально активних елементів.

Усі відомі на сьогодні ДНК-транспозони еукаріотів поділяють за механізмами транспозиції на такі великі групи:

- транспозони «виріж і встав» (відомо 17 надродин);
- самореplikуючі транспозони (*Polinton/Maverice*);
- транспозони типу «обруча, що котиться» (гелітрони);
- тирозин-рекомбінантні транспозони (*Crypton*) (див.: Winker et al., 2007; Kapitonov, Jurka, 2008; Bao et al., 2009, 2010).

Розглянемо детальніше особливості деяких ДНК-транспозонів рослин.

4.1. *Ac*-елемент і його похідні — *Ds*-елементи

У вищих рослин найкраще дослідженими ДНК-транспозонами є *Ac*-елемент кукурудзи, а також його різноманітні неавтономні копії, що отримали назву *Ds*-елементів (див. рис. 2.1, табл. 4.1). Описані Б. МакКлінток ще в 1947 р., вони стали першими виявленими у природі транспозонами. Кінцеві ділянки *Ac*-елемента складаються із 11-нуклеотидних інвертованих повторів, не ідентичних за своїм першим положенням: 5'-CAGGGATGAAA — 3'-AAAGTAGGGAT-5'. Заміна цих повторів на аналогічні ділянки іншого *Ac*-подібного транспозона, наприклад *Tam3*-елемента ротиків (*Antirrhinum*), у якого 7 із 11 положень збігаються з такими у кукурудзи, призводить до повної втрати мобільності. Тобто інвертовані кінцеві повтори *Ac*-елемента, незважаючи на свою неідентичність, є абсолютно необхідними для його переміщення.

Велику роль у забезпеченні мобільності *Ac*-елемента відіграють і його субтермінальні ділянки. Кожна з них має розмір приблизно 240 п. н. і містить багаторазово повторені мотиви AAACGG, організовані у невеликі кластери. Штучне вкорочення цих ділянок призводить до пропорційного послаблення мобільності елемента аж до її повної втрати. Пояснюється це тим, що саме субтермінальні ділянки слугують сайтами переважного приєднання молекул транспозази. Мінімальний розмір кожної із цих

ділянок, необхідний для забезпечення транспозиції, складає близько 100 п. н.

Незважаючи на свою структурну подібність (наявність інвертованих кінцевих повторів, а також дуже подібних субтермінальних ділянок), лівий (5') і правий (3') кінці *Ac*-елемента, вірогідно, не є взаємозамінними. Наприклад, штучно сконструйовані копії, фланковані двома однаковими 5'- або 3'-кінцями, не здатні до переміщення.

Внутрішня ділянка *Ac*-елемента кодує одну крупну поліпептидну молекулу, яка складається з 807 амінокислотних залишків. Відповідний ген *TNP* має мозаїчну структуру, а його продукт виявляється в ядрі у вигляді крупних філаментоподібних (нитчастих) агрегатів. Цей продукт, очевидно, є функціонально активною транспозазою, оскільки він має властивість забезпечувати мобільність неавтономних *Ds*-елементів. N-кінцевий сегмент транспозази, який складається з близько 200 амінокислотних залишків, містить три сигнали ядерної локалізації, наявність кожного окремого з них є достатнім для імпорту білка в ядро. До складу цього сегмента входить також і двокомпонентний ДНК-зв'язувальний домен (залишки 159–206). Остання частина молекули, очевидно, відповідає за утворення агрегатів, які є функціонально активним станом транспозази. Цікаво відзначити, що коли велика

низка різних делецій у гені *TNP* повністю інактивує транспозазу, відсутність 102-х *N*-кінцевих залишків амінокислот не лише не порушує, а навіть посилює її функцію.

Транспозаза *Ac*-елемента має низьку спорідненість з його інвертованими кінцевими повторами. Разом з тим, вона ефективно зв'язується з гексануклеотидами 5'-AAACGG-3', багаторазово повтореними у його субтермінальних ділянках. Тому специфічне розпізнавання *Ac*-елемента, очевидно, починається з кооперативного приєднання молекул транспозази до кожної з його субтермінальних ділянок. Вважається, що зв'язані з ДНК молекули транспозази активно агрегують одна з одною, у результаті чого кінцеві ділянки елемента зближуються (рис. 4.3).

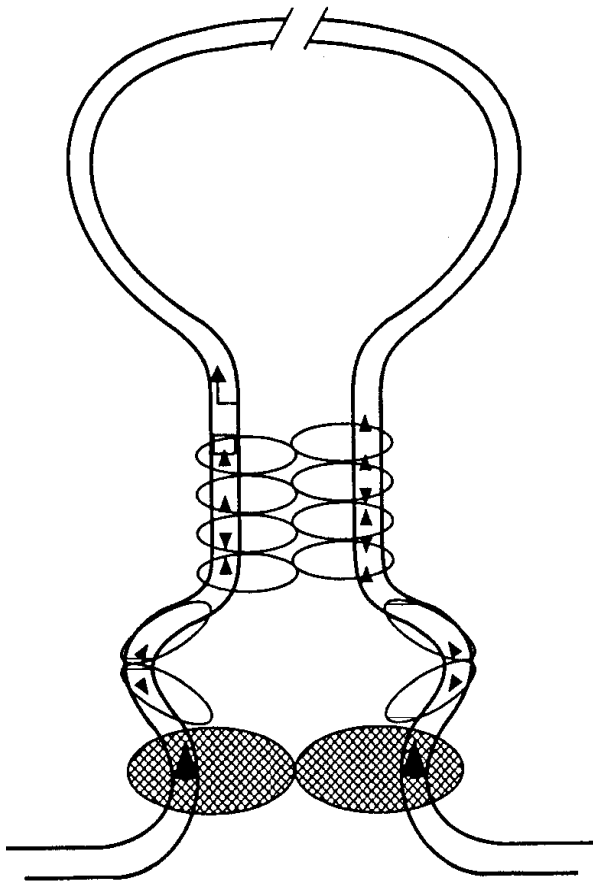


Рис. 4.3. Зближення меж ДНК-транспозона *En/Spm* за рахунок агрегації білків *Tnp*

Білки *TnpA* зв'язуються з субтермінальними повторами (зображені у вигляді маленьких трикутників) та агрегують один з одним, тісно зближуючи кінцеві інвертовані повтори. У свою чергу, тісно зближені кінцеві інвертовані повтори (великі трикутники) розпізнаються білком *TnpD*, який здійснює вирізання транспозона (за: Лутова і др., 2000)

Для здійснення транспозиції необхідним є специфічне розпізнавання інвертованих кінцевих повторів, а також їх взаємодія з новим (акцепторним) сайтом мішені. Конкретні механізми цих процесів все ще не вивчені, проте є безсумнівним, що транспозиція *Ac*-елемента є тісно пов'язаною з реплікацією хромосомної ДНК і відбувається або під час, або відразу після *S*-періоду клітинного циклу. Дійсно, у тому випадку, коли ексцизія елемента відбувалася б ще до подвоєння хромосом, обидві сестринські хроматиди були б позбавлені відповідної копії. Між тим, ексцизія ДНК-транспозонів завжди відбувається лише в одній із двох сестринських хроматид. Припускають (див.: Тиходеев, 2000), що цей ефект зумовлений асиметричним метилюванням сестринських копій *Ac*-елемента.

На користь цього припущення свідчать такі факти:

- молекули транспозази здатні зв'язуватися лише з неметилюваними повторами 5'-AAACGG-3';
- деметилювання хромосомної ДНК приводить до стрімкого зростання частоти транспозиції;
- щонайменше для 3'-кінця *Ac*-елемента характерною є істотна асиметричність щодо орієнтації субтермінальних повторів.

Виходячи із загального неометилювання нових ланцюгів ДНК сестринські копії *Ac*-елемента повинні взаємодіяти з молекулами транспозази різними своїми ланцюгами (рис. 4.4). При цьому здатність (компетентність) конкретної копії до транспозиції залежить, очевидно, від переважної орієнтації неметилюваних 3'-субтермінальних повторів.

Однією з характерних особливостей *Ac*- і *Ds*-елементів є їх здатність індукувати розриви хромосом. Саме ця властивість покладена в основу позначення *Ds* (від англ. dissociation). Усі *Ds*-елементи поділяються на дві основні групи:

- *Ds*-елементи I типу, які часто викликають розриви хромосом, але проявляють низьку мобільність;
- *Ds*-елементи II типу, які рідко викликають розриви хромосом, але здатні до ефективної транспозиції.

Ds-елементи II типу є типовими неавтономними копіями, які фланковані стандартними

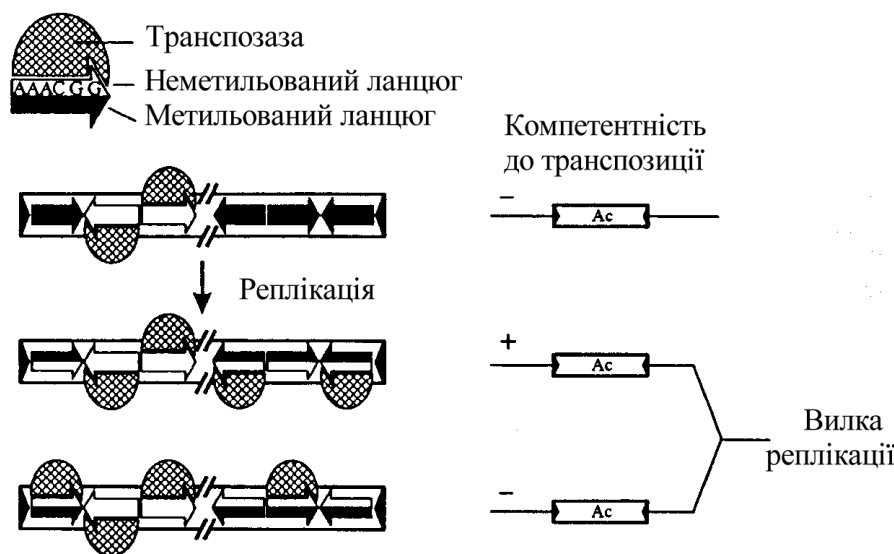


Рис. 4.4. Роль неометильованості нових ланцюгів ДНК у визначенні компетентності двох сестринських копій ДНК-транспозона *Ac*

Молекули транспозази зв'язуються лише з неметильованими повторами 5'-AAACGG-3' (зображені у вигляді стрілок). Тому після реплікації в кожній зі сестринських копій елемента *Ac* розпізнається лише новий (неометильований) ланцюг. Імовірно, саме внаслідок цього здатність до міграції (компетентність) властива тільки одній з двох сестринських копій транспозона *Ac* (за: Лутова и др., 2000)

5'- та 3'-кінцями. Такі копії називаються *протими*.

Ds-елементи I типу мають складнішу структуру. Деякі з них містять одночасно декілька кінцевих ділянок, інші є тісно зчепленими копіями *Ac*- або простих *Ds*-елементів, що протилежно орієнтовані.

В основі механізму виникнення хромосомних розривів лежить процес аномальної транспозиції. Найпростіша транспозоноподібна структура, яка забезпечує високу частоту хромосомних розривів, являє собою стандартні 5'- та 3'-кінці *Ac*-елемента, розташовані не у звичайній (інвертованій), а в прямій орієнтації один відносно одного. У цій аномальній ситуації компетентними до транспозиції виявляються 5'- та 3'-кінці, локалізовані в різних сестринських хроматидах. Залучення таких кінців у процес транспозиції може призводити до утворення дигетеричної хромосоми, яка розривається в процесі наступних поділів клітини. *Ds*-елементи I типу внаслідок неавтономності можуть брати участь у подібній аномальній транспозиції (тобто індукувати розриви хромосом) лише в присутності повноцінних *Ac*-копій. Відповідно, *Ac*-елементи здатні забезпечувати не лише власне переміщення, а й активацію хромосомних роз-

ривів, що зумовлюються *Ds*-елементами I типу. Саме це покладено в основу позначення *Ac* (від англ. activation).

Детальний порівняльний аналіз хромосомного розподілу *Ac*-подібних елементів (haT-родина) на прикладі екологічно контрастних популяцій трьох диплоїдних видів *Triticeae* (*Aegilops speltoides*, *Triticum urartu*, *Hordeum spontaneum*) наведено в роботі (Altinkut et al., 2006). Зокрема, автори точно картували кластери транспозонів і пов'язали їх з відомими хромосомними маркерами — сайтами рДНК, центромерами і гетерохроматиновими ділянками. Вони виділили такі найхарактерніші особливості хромосомного розподілу *Ac*-подібних елементів:

- *Ac*-елементи концентруються переважно в проксимальних ділянках хромосом;
- високий відсоток кластерів міститься на межі між eu- і гетерохроматином;
- характерним для *Ac*-елементів є комплементарне хромосомне розташування відносно *En/Spm*-транспозонів (САСТА-транспозонів);
- наявність популяційно специфічних вставок у центромери;
- більші відмінності у загальному числі кластерів між популяціями самозапилюючих, ніж між популяціями перехреснозапилюючих видів.

4.2. *En/Spm*-елемент

Перший представник САСТА-транспозонів кукурудзи був незалежно описаний двома дослідниками. Тому він має дві назви: *En* (від Enhancer) та *Spm* (Suppressor-mutator) і позначається як *En/Spm*.

Інвертовані кінцеві повтори цього елемента утворені ідентичними 13-нуклеотидними послідовностями 5'-САСТАСААГАААА-3', які забезпечують його мобільність. Відсутність у послідовності всього лише перших двох нуклеотидів різко знижує частоту транспозиції.

5'- і 3'-субтермінальні ділянки *En/Spm*-елемента мають різну довжину (близько 180 і 300 п.н. відповідно) і в сумі містять 24 копії гетерогенного 12-нуклеотидного мотиву 5'-ТААГАГТГТССГ-3'. Із внутрішньої ділянки повноцінного *En/Spm*-елемента зчитується один великий транскрипт, який у результаті альтернативного сплайсингу перетворюється у дві матричні РНК розміром 2,4 і 6,0 т.п.н. Продуктами цих мРНК є білки TnpA і TnpD відповідно.

4.3. *Mu*-елементи

Ці елементи отримали назву від високого рівня інсерційного мутагенезу (до 10^{-4} у перерахунку на ген за покоління), що спостерігається за їх наявності. Цей ефект пов'язаний не лише з активним переміщенням *Mu*-елементів, а й здатністю їх до поступового підвищення копійності завдяки так званій дуплікативній транспозиції. В основі цього явища лежать два послідовних процеси (рис. 4.5):

- звичайна (стандартна) нереплікативна транспозиція *Mu*-елемента, що зумовлює виникнення дволанцюгової бреші на місці його вихідної локалізації;
- репарація виниклої дволанцюгової бреші за рахунок одностанцюгової ділянки ДНК зі складу сестринської хроматиди або гомологічної хромосоми, якщо вона також несе *Mu*-елемент у відповідному положенні.

Ці процеси приводять до відновлення початкової структури копії *Mu*-елемента, що мігрував. Тепер у геномі поряд з «вихідною» (відновленою) копією транспозона наявна ще й «нова» (та,

Молекули білка TnpA ефективно зв'язуються з неметильованими копіями субтермінального мотиву, а також містять у С-кінцевому домені типові сигнали, що відповідають за утворення агрегатів. Ці молекули, очевидно, виконують допоміжну роль, забезпечуючи тісне зближення кінців елемента, оскільки вони не здатні зв'язуватися з інвертованими кінцевими повторами. Отже, функціонально активною транспозазою у випадку *En/Spm*-елемента, очевидно, є білок TnpD. Проте у цього білка поки що не вдалося виявити ні ДНК-зв'язувальної, ні ендонуклеазної активності.

Отже, внутрішня ділянка елемента *En/Spm* кодує двокомпонентну систему білків, що здатна забезпечувати його автономне переміщення навіть в інших видах рослин (наприклад, у тютюні, картоплі, арабідопсисі). Різні делеції, що зачіпають структуру цієї ділянки, зумовлюють виникнення різноманітних неавтономних копій, які позначаються *I/dSpm*.

що мігрувала) копія. У подальшому кожна з них здатна до аналогічних актів дуплікативної транспозиції, внаслідок чого копійність *Mu*-елемента може зростати в кілька разів за одне генеративне покоління. З цієї ж причини переважна більшість (до 90%) гібридів F_2 , отриманих під час схрещування між *Mu*-вмісними та *Mu*-невмісними лініями, несе в своїх геномах хоча б одну копію *Mu*-елемента. Саме тому успадкування *Mu*-елементів відбувається за менделівським типом.

Характерною структурною особливістю всіх *Mu*-елементів є їх довгі інвертовані кінцеві повтори довжиною близько 200 п.н., які мають високий рівень гомології між різними копіями. Проте структура внутрішньої ділянки *Mu*-елементів є різною. Наприклад, повноцінні копії, що отримали позначення *MuDR*, містять у внутрішній ділянці два мозаїчних гени *mudr-A* і *mudr-B*. Оскільки продукт гена *mudr-A* (білок MURA) має високий рівень гомології з прокаріотними транспозонами, а крупні делеції в цьому гені призводять до повного при-

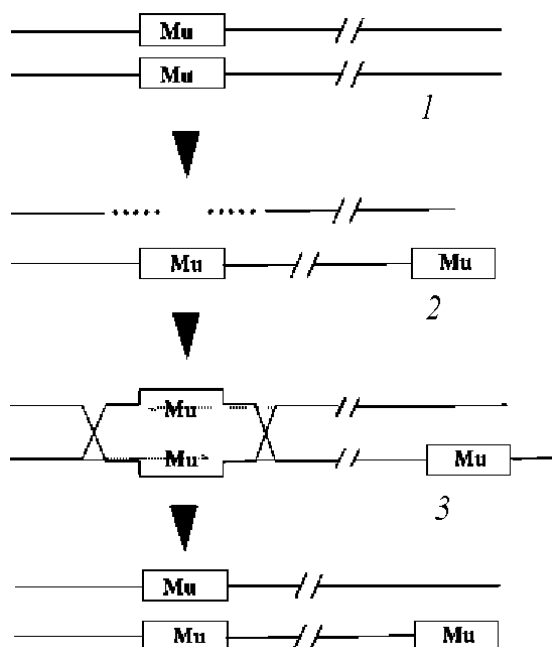


Рис. 4.5. Дуплікативна транспозиція *Mu*-елемента: 1 — утворення бреші в одному з гомологів внаслідок транспозиції *Mu*-елемента; 2 — забудова бреші шляхом гомологічної рекомбінації; 3 — повне відновлення міграної копії транспозона (за: Лутова и др., 2000)

гнічення транспозиції, вважається, що саме ген *mudr-A* відіграє основну роль у переміщенні *Mu*-елементів, тобто він кодує можливу транспозазу. Функція білка MURB, що кодується хелперним геном *mudr-B*, лишається невідомою.

На відміну від повноцінних копій, неавтономні *Mu*-елементи (*Mu1–Mu8*, *MuA* та ін.), як правило, містять у внутрішніх ділянках неспоріднені між собою послідовності, які замінюють собою гени *mudr-A* і *mudr-B*. У більшості випадків походження цих послідовностей невідоме.

4.4. Гелітрони

Гелітрони (*Helitrons*) — це новий клас рухомих елементів геному, які було відкрито за комп'ютерного аналізу повторюваної ДНК геному арабідопсиса (Kapitonov, Jurka, 2001). Структурна гомологія гелітронів з генами, що кодують геліказоподібний білок (Rep/helicase-like protein) і реплікаційний білок (A(RPA)-like protein), свідчать про те, що вони переміщуються за допомогою механізму «обруча, що котиться» (*rolling-circle mechanism*), проте це припущення ще не підтверджено експериментально.

Отже, характерними ознаками ДНК-транспозонів є:

- наявність коротких інвертованих повторів, які фланкують (облямовують, перебувають обабіч) мобільний елемент;
- здатність до нереплікативної транспозиції шляхом вирізання вихідної копії елемента з наступною реінтеграцією в геном; усі основні етапи цього процесу зумовлюються високоспецифічною транспозазою, яка кодується внутрішньою ділянкою мобільного елемента; в деяких випадках мобільний елемент містить інформацію не лише про транспозазу, а й про деякі, можливо, допоміжні білки;
- наявність неавтономних ДНК-транспозонів, що є різноманітними делеційними варіантами повноцінних копій.

На цьому тлі різко виділяються *Mu*-елементи кукурудзи, які відрізняються від останніх ДНК-транспозонів рослин за кількома параметрами. Зокрема, *Mu*-елементи містять довгі інвертовані кінцеві повтори, що здатні до дуплікативної транспозиції, а також можуть замінювати свою внутрішню ділянку на різні (не споріднені одна з одною) послідовності.

Загалом же, *Mu*-подібні елементи (MULEs), що містять *mudr-A*-гомологи і довгі термінальні інвертовані повтори, широко розповсюджені серед одно- і дводольних рослин; кожен з видів має свої численні підродини MULEs (Lisch et al., 2001, див. також рис. 4.6, 4.7). Розподіл різних підгруп MULEs у рослинному світі є «плямистим», що може свідчити про горизонтальне перенесення цих транспозонів (Diao et al., 2006) (див. розділи 10.2 і 15).

Гелітрони на 5'-кінці мають послідовність TC, а на 3'-кінці — CTRR, а також невелику шпилькову структуру поблизу послідовностей CTRR 3'-кінця. Встановлено, що вони переважно вставляються у динуклеотид AT. Деякі елементи кодують Реп/геліказоподібні і RPA-подібні білки, що можуть бути задіяними у процесі транспозиції. Елементи, що кодують Реп/геліказу, вважаються потенційними автономними елементами.

З часу їх відкриття у арабідопсиса гелітрони виявлено ще у кількох видів квіткових рослин,

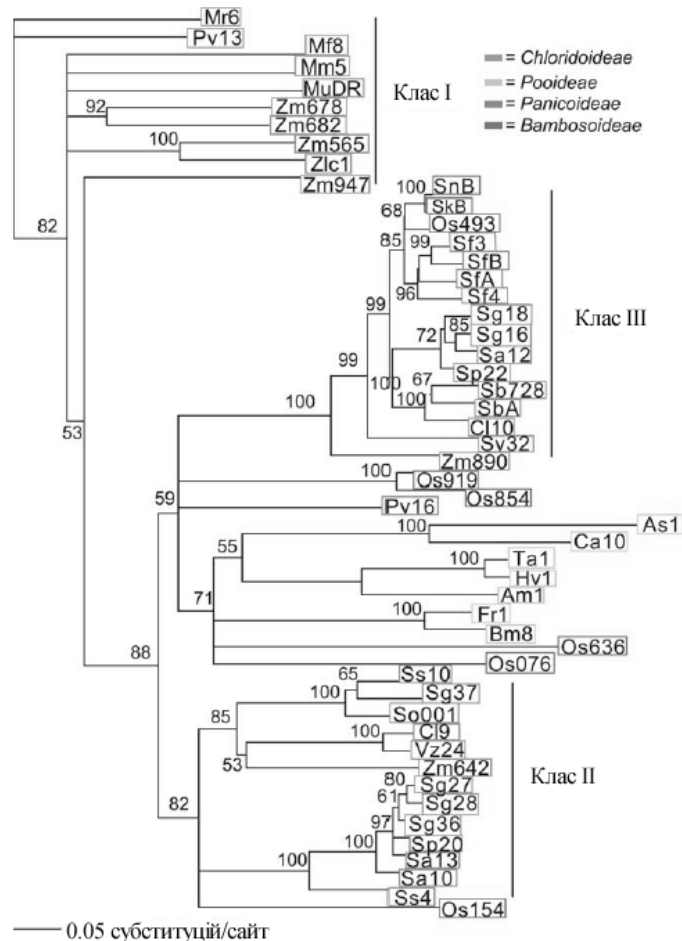


Рис. 4.6. Філогенетичний аналіз різних *mudrA*-гомологічних послідовностей рослин, що є характерними для кількох основних підродин трав

Позначення: Zm — *Zea mays*; Zl — *Zea luxurians*; Sv — *Setaria viridis*; Sa — *S. anceps*; Sf — *S. faberi*; Ss — *S. sphacelata*; Sg — *S. glauca*; Sp — *Setaria palmifolia*; Sb — *Sorghum bicolor*; Cl — *Coix lacryma*; Os — *O. sativa*; Pv — *P. virigatum*; Vz — *Vetiveria zizanioides*; Mr — *Muhlenberia rigens*; Mm — *Muhlenbergia macroura*; So — *Saccharum officinarum*; Sk — *Shibataea kumasaca*; Sn — *Sinarundinaria nitida*; As — *Avena sativa*; Ca — *Calamagrostis acutifolia*; Ta — *Triticum aestivum*; Hv — *Hordeum vulgare*; Am — *Ammophila arenaria*; Fr — *Festuca rubra*; Bm — *Briza maxima*.

Числа позначають окремі клони кожного виду або останні три цифри колекційного номера, якщо послідовність отримано із NCBI. Різні відтінки сірого кольору блоків вказують на основні підродини: Panicoideae, Chloridoideae, Pooideae, Bambusoideae. Довжини гілок пропорційні відстані, на що вказує масштабна лінійка (за: Diao et al., 2010)

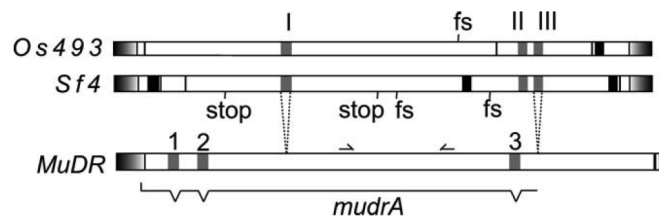


Рис. 4.7. Схематичне зображення MULE-елементів рису (*Os493*) та *Setaria faberi* (*Sf4*)

Чорні прямокутники представляють ділянки, делетовані у тій чи іншій послідовності. Сіримі прямокутниками позначені можливі інтрони, які у рухомих елементах рису і *Setaria* пронумеровані римськими цифрами I–III. У *mudrA* кукурудзи другий інтрон колінеарний із третім. Інтрони *mudrA* пронумеровані як 1–3. Заштриховані прямокутники на кінцях рухомих елементів вказують на кінцеві інвертовані повтори. Для порівняння також включений 5'-кінець *MuDR* кукурудзи (який включає ген *mudrA*). Важливо, що лише третій інтрон гена *mudrA* і третій інтрон рису і *Setaria* представлені у всіх трьох елементах. Положення RF2 і RR2 ПЛР-праймерів вказано на *MuDR*-елементі. Стоп-сигнали і зсуви рамок у рухомих елементах *Setaria* і рису (за умови, що інтрони сплайсовані) перебувають у вказаних положеннях. Штрихові лінії, що зв'язують *MuDR* із *Sf4*, вказують на ділянки подібності (за: Diao et al., 2010)

а також у мохів, грибів, черв'яка *Caenorhabditis elegans*, морського їжака, риб та кажанів (посилання див. у роботі: Yang, Bennetzen, 2009). Гелітрони часто захоплюють генні фрагменти, іноді фрагменти мультиплікованих генів, що в нормі перебувають у місцях, не пов'язаних з хромосомами (Lal et al., 2003, 2005; Gupta et al., 2005; Xu, Messing, 2006; Wang, Dooner, 2006). Хоча механізм захоплення генних фрагментів ще не відомий, він, очевидно, відбувається на рівні ДНК, оскільки в межах захопленої ДНК знайдено інтрони й екзони. Деякі з захоплених гелітроном генних фрагментів є химерними транскриптами (Lal et al., 2003; Morgante et al., 2005). У кількох виявлених випадках захоплені інтрони сплайсуються, часом альтернативно, а стики між фрагментами можуть процесуватися, як інтрони, що тільки-но виникли *de novo* (Lal et al., 2003; Brunner et al., 2005). Цей процес досить подібний до моделі, запропонованої для пояснення походження інтронів (Gilbert, 1987). Однак за Gilbert, «перетасовка екзонів» — це злиття перших коротких матриць окремих пептидних доменів для створення потенціалу для ситнезу складних білків із розрізнених субодиниць; вона була запропонована як можливий механізм, що діяв здебільшого у перші дні життя на Землі — більше, ніж мільярд років тому. Morgante et al. (2005) підраховали, що в окремого інбреда кукурудзи більше ніж 4000 генних фрагментів, запозичених за допомогою гелітронів, і це засвідчує, що перетасовка екзонів наразі є дуже активним процесом, принаймні у геномах деяких квіткових рослин (детальніше див. розділ 10.2).

Як уже згадувалося вище, гелітрони накопичуються переважно у ділянках хромосом, бідних на гени. Невідомо, викликано це інсерційною специфічністю, скажімо повільнішими темпами видалення ДНК у гетерохроматинових ділянках, бідних на гени, чи добором протигелітронних вставок у ділянки, багаті на гени. Краще за все на це питання можна відповісти за аналізу геномів з дуже активними гелітронами, в яких вставки *de novo* можна аналізувати до початку дії природного добору чи деградації і видалення послідовності, але це завдання майбутніх досліджень.

Виявляється, що різні евкаріотні геноми накопичують різну кількість гелітронів. За да-

ними роботи (Yang, Bennetzen, 2009), геноми сорго (близько 750 м.п.н.), *Medicago* (близько 250 м.п.н., сиквеновані з 460 м.п.н.), рису (400 м.п.н.), *Arabidopsis* (120 м.п.н.), *Drosophila* (150 м.п.н.) та *C. elegans* (100 м.п.н.) містять, відповідно, мінімум 22, 2, 8, 2, 0 та 2 м.п.н. гелітронів. Жоден з цих елементів не є головним чинником, який визначає розмір геному у будь-якого з вивчених видів. Привертає увагу також те, що їх абсолютні кількості не корелюють із розміром геному. Це може свідчити про те, що характеристики (механізми) хазяїна, які визначають різний рівень і темп ампліфікації і видалення LTR-вмісних ретротранспозонів (Vitte, Bennetzen, 2006), не діють подібним чином стосовно гелітронів.

Однією з великих загадок функції гелітронів є їх здатність набувати нові внутрішні послідовності. Якщо ці послідовності є частинами генів, їх захоплення збільшує можливості для створення нового гена. Дослідження на кукурудзі показали, що фрагменти генів захоплюються послідовно, можливо, під час транспозиції, що має місце на обох кінцях елемента (Brunner et al., 2005). Спостереження за процесом захоплення послідовностей на 3'- та 5'-кінцях показало можливість того, що гелітрони можуть «зискати» з вихідного кінця, набуваючи надалі нових послідовностей (Yang, Bennetzen, 2009). На думку авторів, можливо, це не єдиний спосіб набуття гелітронами нових послідовностей. Так, інтеграза, подібна тій, що спостерігається в інтегронах, може ініціювати процес сайт-специфічної рекомбінації, яка також веде до процесів захоплення генів (Hall, Collis, 1995), хоча ще невідомо, щоб інтеграза цього типу кодувалася в будь-якому з гелітронів.

Модель «rolling-circle»-транспозиції припускає, що під час транспозиції гелітрон у геліказа розкручує дволанцюгові ДНК, а шпилька слугує стоп-сигналом закінчення процесу транспозиції; встановлено, що шпилька гелітронів має високу температуру плавлення (T_m) і саме це дозволяє їй бути потужним стоп-сигналом транскрипції та/або «rolling-circle»-реплікації. Мабуть, за присутності інших гелітронів у геномі та інших послідовностей, подібних до кінців гелітронів, такі послідовності можуть захоплюватися із багатьох місць (локусів) геному, у тому

числі і сусідніх із гелітроном, утворюючи химерні елементи (див. також розділ 10.2).

Слід підкреслити, що наразі механізми транспозиції і процесів захоплення генів, а також доля набутих фрагментів геному залишаються невідомими. Для вирішення цих проблем потрібні подальші дослідження, які краще проводити на видах, що мають велику вірогідність вмісту активних гелітронів. Зручною моделлю для цих робіт є кукурудза, в якій недавно відкриті нові цікаві мутації і встановлено високу гаплотипну мінливість, зумовлену присутністю/відсутністю гелітронів (Lal et al., 2003; Gupta et al., 2005; Morgante et al., 2005).

Порівняльне сиквенування інбредних ліній кукурудзи показало у них відмінності і велике різноманіття послідовностей (Fu, Dooner, 2002; Song, Messing, 2003; Brunner et al., 2005). Близько 50 % послідовностей в алельних локусах інбредних ліній є різними, при цьому більшість відмінностей пов'язана із недавно вбудованими LTR-ретротранспозонами. Такий рівень негомології послідовностей всередині виду є безпрецедентним, проте подібне явище має місце й у деяких інших видів трав'янистих рослин (Scherger et al., 2005).

Важливо, що відмінності між інбредними лініями кукурудзи не зводилися лише до різниці у складі повторюваних елементів, а стосувалися й генних послідовностей, зазвичай це були псевдогени. Такі псевдогени часто представлені у геномі у вигляді кластерів. У цілому, шляхом порівняльного сиквенування п'яти алельних локусів двох різних інбредних ліній кукурудзи 23 із 68 досліджених генних фрагментів було визнано різними, а цілогогеномне порівняння генного вмісту виявило у них до 10 000 відмінностей між генними фрагментами (Brunner et al., 2005; Morgante et al., 2005).

Встановлено, що псевдогенні кластери у кукурудзи є частинами неавтономних гелітронних елементів (Morgante et al., 2005). Як відзначалося вище, гелітрони є ДНК-транспозонами, які реплікуються за механізмом «обруча, що котиться» (*rolling-circle*-механізм) і, очевидно, мають скопійовані та інкорпоровані генні сегменти з різних геномних локусів хазяїна. Вони групуються у кластери і дуплікуються за допомогою механізму переміщення «скопійованої-зітри» (*copy-*

paste) до неалельних локусів геному (Feschotte, Wessler, 2001; Kapitonov, Jurka, 2001; Lal et al., 2003; Poulter et al., 2003; Meyers et al., 2004). Цей механізм є відповідальним за багато з виявлених внутрішньовидових генних неколінеарностей у кукурудзи, а також лежить в основі відхилення від консервативності синтениї у кукурудзи і рису (Brunner et al., 2005a). Цей тип повторюваних елементів не тільки збільшує геном кукурудзи, а й впливає на кодуючу фракцію ДНК.

Як уже відзначено вище, гелітрони вставляються у сайт АТ мішені, не викликають дуплікації цільового сайту і мають 5'-ТСТ-кінець та 3'-СТАГ-кінець, якому передують ділянка 18–25 п. н., здатна до формування шпилькової структури. Гелітрони були ідентифіковані за комп'ютерного аналізу у черв'яка *Caenorhabditis elegans*, арабідопсиса та рису як повторювані елементи, що містять відкриту рамку зчитування (ORF), яка кодує білок геліказу й активність ініціатора реплікації (*HEL*). Рослинні елементи також містять реплікаційний білок A(RPA)-подібний білок із можливою ssDNA-зв'язувальною (ssDNA — одноланцюгова ДНК) активністю (Kapitonov, Jurka, 2001). На відміну від «класичних» ДНК-транспозонів, гелітрони не мають термінальних інвертованих повторів і не утворюють дуплікацій цільового сайту, як це характерно для «класичних» ДНК-транспозонів. Гелітрони згодом було ідентифіковано й у тварин (Poulter et al., 2003).

У кукурудзи неавтономні гелітронні вставки, що містять генні фрагменти, є відповідальними за мутації, які ведуть до втрати функції у гені *schrunk2* та гені *barren stalk1* (Lal et al., 2003; Gupta et al., 2005). Додаткові неавтономні гелітронні елементи було ідентифіковано у геномному огляді послідовностей (GSS — genome survey sequences) кукурудзи та в ВАС-клонах. Вважають, що гелітрони захоплюють та переміщують генні послідовності клітини хазяїна (Gupta et al., 2005; Kapitonov, Jurka, 2001; Lal et al., 2003). Було встановлено, що вісім із дев'яти неалельних генних вставок у кукурудзи, описаних у роботі (Brunner et al., 2005), мають основні ознаки гелітронів (Morgante et al., 2005). Крім того, у кукурудзи виявлено кілька можливо автономних гелітронів і для них ідентифіковано експресуючі сиквенс-ярлики (ESTs — expressed sequence tags) (Morgante et al., 2005).

Наведені дані свідчать про те, що у кукурудзи гелітрони є активними або були активними в недавній історії. До того ж, гелітрони здатні мобілізувати чи захоплювати копії генів хазяїна, мультиплікувати і модифікувати їх та зумовлювати виникнення нових генних функцій. У цьому гелітрони подібні до Pack-MULEs, іншого типу ДНК-транспозонів у кукурудзи, рису та арабідопсиса і неавтономного *BsI*-ретротранспозона кукурудзи (Jin, Bennetzen, 1994; Turcotte et al., 2001; Yu et al., 2000; Jiang et al., 2004).

Деякі генні фрагменти, що містять гелітрони, очевидно, транскрибуються (Morgante et al., 2005). Наприклад, транскрипти мутантного локусу *Shrunken-2* містять сплайсовані чужинні екзони, що походять від генів, захоплених вставленим гелітроном (Lal et al., 2003). У рису також виявлено химерні транскрипти, що походять від Pack-MULEs, і деякі із захоплених генів можуть бути функціонально активними (Jiang et al., 2004).

Зупинимося детальніше на одному з характерних досліджень, в якому наведено докази участі гелітронів у швидкій еволюції геному кукурудзи, зокрема за мультиплікації спорідне-

них генних фрагментів у всьому геномі (Brunner et al., 2005a). Автори описали родину чотирьох близькоспоріднених, неавтономних гелітронів кукурудзи та вивчили місця їх вставки у чотирьох неалельних генетичних локусах геному кукурудзи: два — специфічних для інбредної лінії В73 і два — для інбредної лінії Мо17.

Один із цих гелітронів був описаний у попередній роботі (Brunner et al., 2005). Ще три близькоспоріднених гелітрони виявлено за комплексного ПЛР-скринінгу ВАС-бібліотек геномів інбредних ліній кукурудзи В73 та Мо17. Позитивні клони виявлено і сиквеновано як у В73, так і в Мо17 ВАС-бібліотеках. Усі чотири гелітрони генетично картовано у популяції гібридів кукурудзи В73 × Мо17. Два елементи трапляються в інбредній лінії кукурудзи В73, але не в Мо17, у той час як два інших представники зустрічаються лише в інбреді Мо17, тобто усі чотири елементи не є алельними у цих двох інбредних ліній. Чотири гелітрони мають спільний сегмент з високою гомологією повторів і кілька вставок генного фрагмента (N, O, P, TT; рис. 4.8), але інші генні фрагменти трапляються лише у двох чи в трьох із чотирьох гелітронів

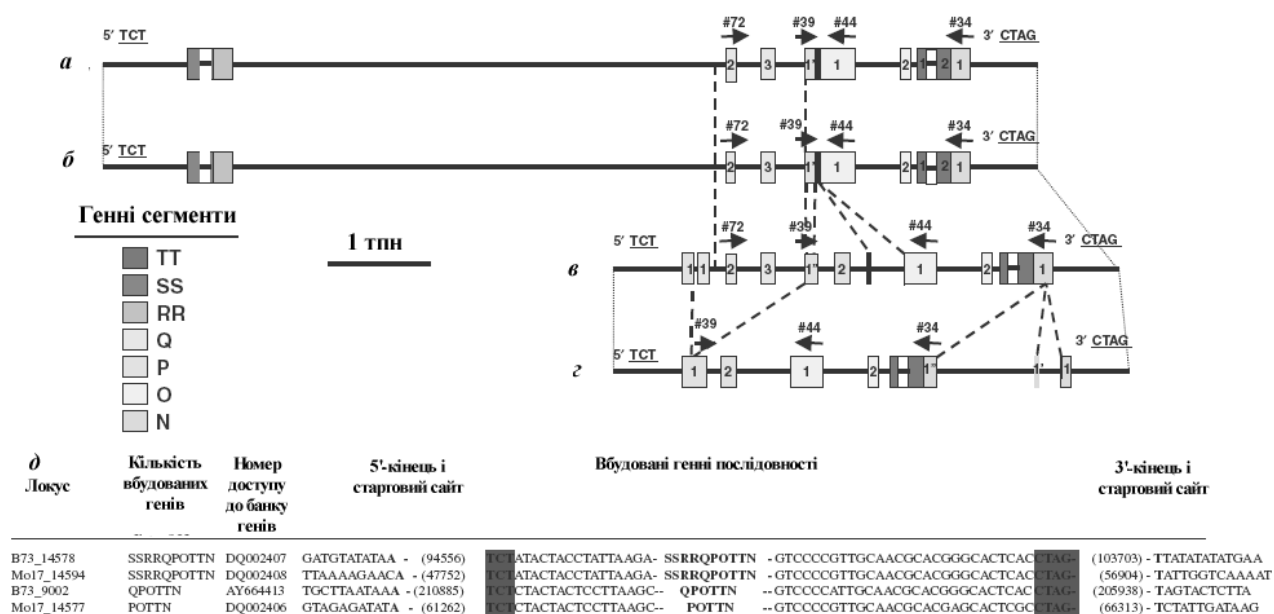


Рис. 4.8. Порівняння гомологів гелітронів:

a — B73_locus14578: 6S (bin 6.00/01); *б* — Mo_17 locus14594: 1L (bin 1.07); *в* — B73_locus9002: 1L (bin 1.08); *з* — Mo_17 locus14577: 9L (bin 9.05). Ідентичні ТСТ 5'-кінці та СТІАГ 3'-кінці з'єднані тонкою лінією (дрібним пунктиром). Інсерції та делеції вказані пунктиром. Екзони цілісних фрагментів генів розміщені у комірках різних відтінків сірого кольору і пронумеровані відповідно. Сполучник «і» позначає фрагменти екзонів, що розщеплені інсерціями. Праймери, використані в геномному і РТ-ПЛР, позначено стрілками; *δ* — інсерції сайтів індивідуальних гомологів гелітронів. 5'- та 3'-кінці і вбудовані сайти позначено жирним шрифтом на темно-сірому фоні (за: Brunner et al., 2005)

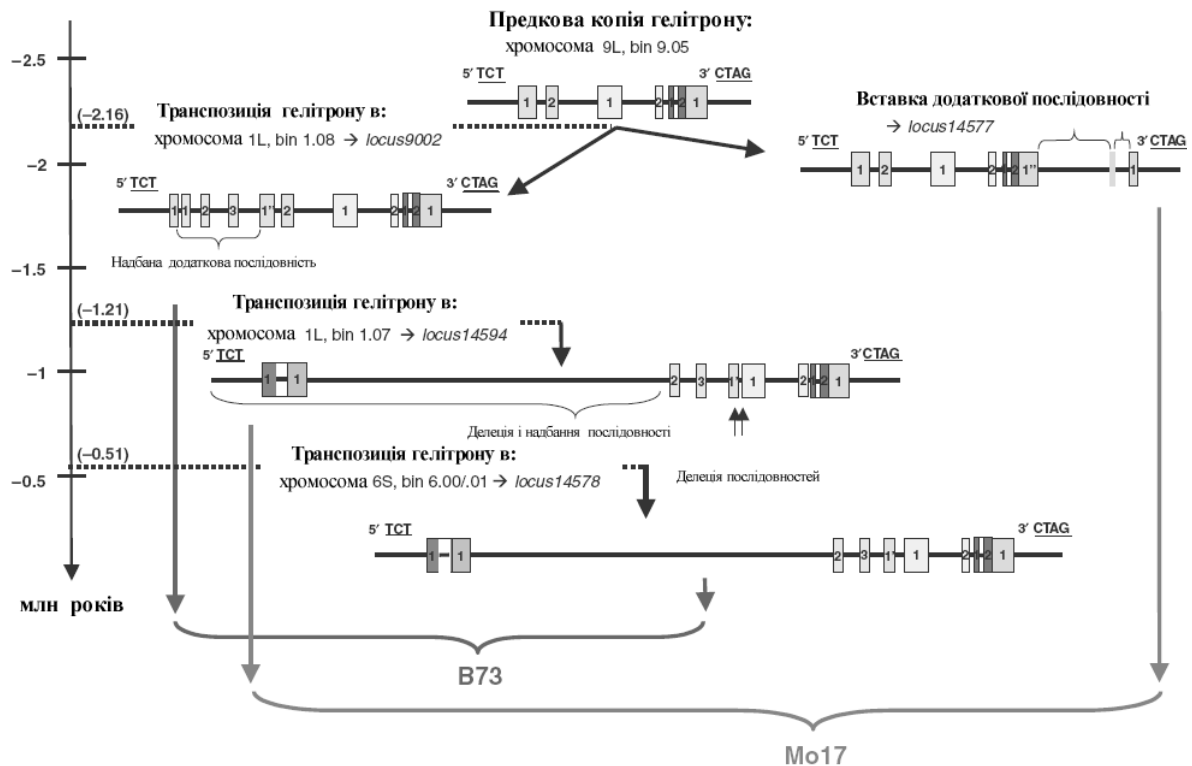


Рис. 4.9. Схема еволюції різних гомологів гелітронів NORQ9002

Події транспозицій гелітронів розраховано на основі частоти синонімічних замін у генах пшениці (за: Brunner et al., 2005)

Таблиця 4.2

Дивергенція послідовностей чотирьох гомологічних гелітронів (за: Brunner et al., 2005)

а) матриця: ділянка розміром 2,1 т.п.н. вище 3'-кінця кожного гелітронного гомолога

локус	K	SE (K)	DT	SE (DT)
B73 locus14578	—	—	—	—
Mo17 locus14594	0,00664	0,00178	0,51	0,07
B73 locus9002	0,01578	0,00276	1,21	0,11
Mo17 locus14577	0,02800	0,00371	2,16	0,14
Mo17 locus14594	—	—	—	—
B73 locus9002	0,00999	0,00219	0,77	0,08
B73 locus9002	—	—	—	—
Mo17 locus14577	0,02753	0,00369	2,12	0,14
Mo17 locus14594	—	—	—	—
Mo17 locus14577	0,02801	0,00372	2,16	0,14
B73 locus9002	—	—	—	—
Mo17 locus14577	0,03100	0,00300	2,39	0,12

б) матриця: повний розмір гелітронних гомологів

локус	K	SE (K)	DT	SE (DT)
B73 locus14578	—	—	—	—
Mo17 locus14594	0,00200	0,00000	0,15	0
B73 locus9002	—	—	—	—
Mo17 locus14577	0,03100	0,00300	2,39	0,12

а — дані дивергенції послідовностей, підраховані у гелітронних гомологів у ділянці на 2,1 т.п.н. вище 3'-кінця гелітронів;
 б — дані дивергенції послідовностей, підраховані у гелітронних гомологів між найближчими гомологами — B73 locus14578 порівняно з Mo17 locus14594 та B73 locus9002 порівняно з Mo17 locus14577, із застосуванням повномірної гелітронної послідовності;

K — нуклеотидні відмінності між гелітронами; SE (K) — стандартна похибка K; DT — достовірні відмінності у часі в мільйонах років; SE (DT) — стандартна похибка DT у мільйонах років

(Q, RR, SS; рис. 4.8). На основі аналізу характеру вставок і делецій було висловлено припущення про можливий еволюційний зв'язок між цими гелітронами (рис. 4.9) (Brunner et al., 2005).

Підтвердженням цього припущення є також еволюційна дивергенція консервативних елементів розміром 2,1 т.п.н., що містяться вище 3'-кінця, і підрахунок віку LTR-ретроелементів, в які вставлено два гелітрони (табл. 4.2; рис. 4.8). Пращурна гелітронна послідовність виникла щонайменше 2,16 млн років тому, а інші представники родини виникли через різні інтервали часу, при цьому найтісніше споріднені локуси 14594 та 14578 розділилися приблизно 0,5 млн років тому. У цілому, ці дані свідчать, що гелітрони були активними стосовно реплікації і захоплення нових генних фрагментів упродовж проміжків часу, близьких за тривалістю до таких багатьох інших родин транспозонів кукурудзи,

включаючи ретроелементи (Messing et al., 2004; Brunner et al., 2005).

Слід підкреслити, що Pack-MULEs рису являє собою найхарактерніший приклад повторюваного елемента, що здійснює рух генів (Jiang et al., 2004). Елемент рису, очевидно, переміщується набагато частіше, ніж гелітрони кукурудзи. Але порівняно з Pack-MULEs гелітрони кукурудзи, очевидно, містять більше різноманіття неповних кодувальних послідовностей, захоплених з різних геномних локусів.

Очевидно, й інші механізми, такі як незаконна рекомбінація і делеції, також можуть позначатися на кількості і локалізації гелітронів, зумовлювати повздовжній неалелізм геному кукурудзи, як це описано і для інших видів рослин (Devos et al., 2002; Ilic et al., 2003; Ma, Bennetzen, 2004; Ma et al., 2004).

4.4.1. Механізм транспозиції і захоплення генів гелітронами

Виявлена у роботі (Brunner et al., 2005) чітка консервація не 5'-, а 3'-кінця (поряд із шпильковою петлею) гелітронів суперечить попереднім припущенням про те, що 5'-кінець потрібен для ініціації транспозиції і прихованого даунстрим-паліндрому, задіяного у механізмі поставки термінаторних послідовностей (Feschotte, Wessler, 2001). Автори (Brunner et al., 2005) запропонували інший гіпотетичний механізм, який полягає в такому. Транспозиція ініціюється на 3'-кінці, можливо, шляхом зв'язування такого протеїнового фактора, як геліказа, з послідовністю, що складається зі структури спіраль — петля, яка приводить до конформаційної зміни ДНК від дуплексної до хрестоподібної. RPA-подібний білок із можливою ssDNA-зв'язувальною активністю (ssDNA — односпіральна ДНК), експресований із автономного гелітронного елемента, може потім утворювати комплекси. Під час реплікаційного процесу набуття додаткових генних фрагментів на 5'-кінці може відбуватися за ще не відомим механізмом.

Такі щойно сформовані гелітрони залишаються активними щодо утворення нових копій. Наприклад, дві пари гелітронних 5'-кінців є майже ідентичними (*B73_локус9002* та *Mo17_локус14577*; *B73_локус14578* та *Mo17_локус14594*, відповідно) (рис. 4.8; 4.10), що свідчить про їх походження від недавніх процесів транспозиції (2,39 та 0,15 млн років тому, відповідно; табл. 4.2, б). Найближчими гомологами неспільних генних фрагментів є переважно одиничні копії генів (див. нижче), які присутні в обох інбредних лініях кукурудзи. Неповні генні послідовності, захоплені гелітронами, очевидно, набувались індивідуально з цих локусів. Таким чином, гелітрони Pack-MULEs та, меншою мірою, такі ретротранспозони, як *Bs1*, впливають на мультиплікацію споріднених генних фрагментів у геномі кукурудзи і на збільшення генної, низькокопійної фракції геному (Jin, Bennetzen, 1994; Jiang et al., 2004; Brunner et al., 2005).

4.4.2. Походження й еволюційне значення генних послідовностей у гелітронах

У процесі дослідження у базі даних EST і в геномних бібліотеках було ідентифіковано найкращі гомологи всіх генних фрагментів, захоплених гелітронним елементом. Специфічний

ПЛР-аналіз їхніх 5'- та 3'-кінців виявив, що вони в геномі кукурудзи присутні як одиничні копії і, очевидно, є пращурними копіями, захопленими в результаті вихідного процесу транспозиції

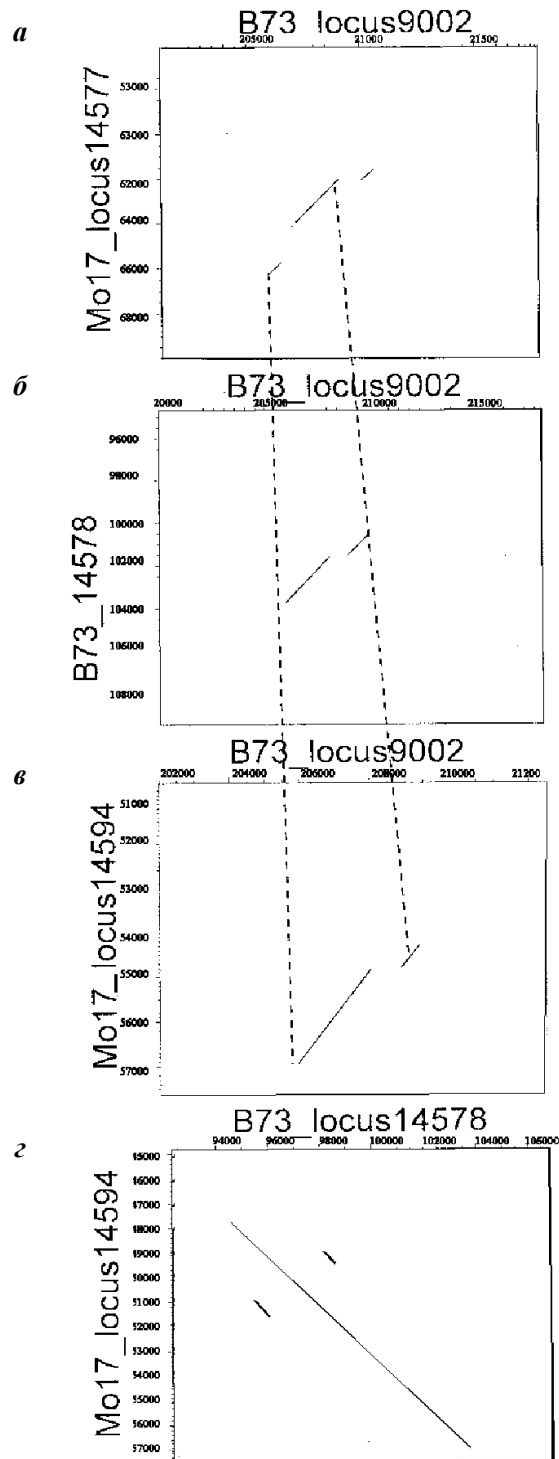


Рис. 4.10. Dot-матричний аналіз ВАС-клонів, що містять чотири різних гомологи гелітрону

Високу гомологічність послідовностей спостерігали тільки в межах ділянок, фланкованих гелітроном. 3'-кінці фрагментів з'єднано пунктирними лініями.

a — *B73_locus9002* проти *Mo17_locus14577*: два елементи гелітрону є ідентичними, за винятком однієї вставки *B73_locus9002* та двох вставок в *Mo17_locus14577*; *б* — *B73_locus9002* проти *B73_locus14578*: два елементи гелітрону показують велику подібність, за винятком однієї вставки біля 3'-кінця, тоді як на 5'-кінці подібність переривається 5'ТСТ мотивом; *в* — *B73_locus9002* проти *Mo17_locus14594*: два елементи гелітрону показують високу подібність тільки біля 3'-кінця, тоді як на 5'-кінці подібність переривається 5'ТСТ мотивом; *г* — *B73_locus14578* проти *Mo17_locus14594*: два елементи гелітрону є ідентичними, за винятком кількох SNP і невеликих інделів (за: Brunner et al., 2005)

гелітронів понад 2 млн років тому. Однак ПЛР одиничних екзонів цих генів показала, що вони присутні у вигляді численних копій у різних хромосомах. Цей факт свідчить про можливість того, що інші гелітронні родини можуть містити додаткові копії подібних генних фрагментів, можливо, у комбінації з іншими псевдогенами. Однак детальніші дослідження за допомогою ПЛР, що охоплювали пари генів у кластерах фрагментів (Morgante et al., 2005), виявили специфічну комбінацію фрагментів N, TT, O та P лише у чотирьох геномних локусах.

Внаслідок транспозицій збільшується різноманіття у родині гелітронів і розширюється набір різних неавтономних елементів. Висока частота неколінеарності алелей підвищує гетерогенність популяції транспозонів гелітронної родини, зменшуючи частоту рекомбінації в самих елементах.

4.4.3. Зв'язування гелітронними транскриптами екзонів різних генів

У кукурудзи виявлено химерні транскрипти, що, можливо, походять від гелітронів і які містять екзони від різних генів (Morgante et al., 2005). Пізніше було охарактеризовано повномірний, розміром понад 2,5 т. п. н. транскрипт, що походить від специфічної геномної копії гелітронів (*Mo17_локус14594*; рис. 4.11; див.: Brunner et al., 2005). Три інші, споріднені гелітронні копії (див.

Це відбувається тому, що лише певні батьківські комбінації містять алельні гелітронні елементи. Різноманіття негомолів, трансмісія яких забезпечується гелітронами, очевидно, пройшло через «шию пляшки» (bottleneck) доместикиції. Різні набори генерованих гелітронами негомолів комбінуються також за схрещувань; цей процес значно впливає на зростання генного різноманіття всередині виду (Fu, Dooner, 2002; Song, Messing, 2003; Brunner et al., 2005, 2005a). Такі процеси погано піддаються класичному популяційному генетичному аналізу, який зазвичай обмежується вивченням спільних генів.

Неалельні гелітрони можуть виникати також внаслідок делеційних механізмів, зокрема таких, як незаконна рекомбінація (Devos et al., 2002; Plic et al., 2003; Ma, Bennetzen, 2004; Ma et al., 2004; Brunner et al., 2005).

вище) у проаналізованих тканинах є транскрипційно мовчазними або транскрибуються на дуже низькому рівні, про що свідчить сиквенування зразків клонуваних продуктів RT-ПЛР-аналізів, які охоплюють родинно-специфічну генну комбінацію. Транскрипт є поліаденільованим і правильно сплайсованим, із одним альтернативно сплайсованим інтроном. Транскрипційна оди-

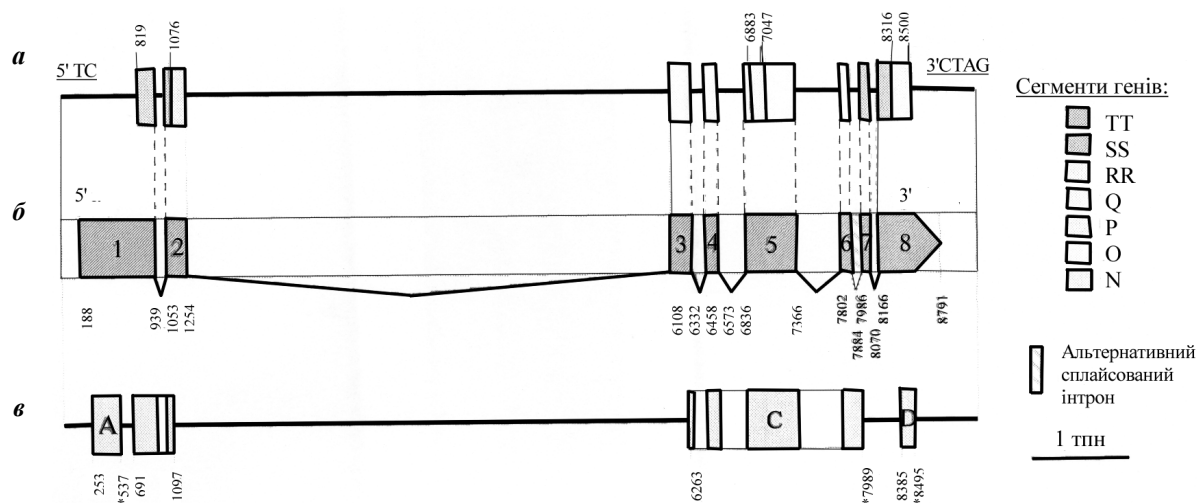


Рис. 4.11. Порівняння BLASTX послідовності геномного гелітронів у ділянці *Mo17_локус14594* із послідовністю химерного транскрипта та його передбачуваною +3 рамкою ORF:

a — анотація BLASTX гелітронів в *Mo17_локус14594*; **б** — сплайсований патерн химерного транскрипта. Екзони позначено темно-сірим і пронумеровано, інтрони показано пунктиром; **в** — прогнозована ORF послідовності химерного транскрипта. Вертикальні числа вказують позицію в п. н. від 5'-кінця гелітронів; пунктирні лінії позначають консервативні інтрон/екзонні структури між химерним транскриптом та найбільш гомологічним EST кукурудзи; тонкі пунктирні лінії вказують на неконсервативні сплайсовані послідовності; * — стоп-кодон (за: Brunner et al., 2005)

ниця охоплює майже весь гелітронний елемент і включає вісім екзонів і сім інтронів, один із яких є надзвичайно довгим, понад 4,8 т. п. н. Екзони, що містяться в цьому гелітроні, походять від семи різних пращурних генів. Транскрипційним стартом є даунстрим-послідовність розміром 188 п. н. від 5'-кінця гелітрону. Транскрипція, очевидно, є результатом вставки гелітрону поблизу промоторної послідовності. З іншого боку, не можна виключити прямий чи *цис*-транскрипційний сайленсинг трьох інших досліджених гелітронів у результаті їх інтеграції у сайленсовані LTR-вмісні ретротранспозони або у потім метильовані блоки ретроелементів (Mette et al., 2002; Plasterk, 2002; Dawe, 2003; Schramke, Allshire, 2003), оскільки гелітрон у *B73_локус14578* локалізований у внутрішній частині *ji* LTR-вмісного ретротранспозона.

Зчитування транскриптів з рухомих елементів із суміжними послідовностями зазвичай ініціюється із промоторів, які містяться на 3'-кінцях LTR-вмісних чи соло-LTR-ретротранспозонів (Kashkush et al., 2003). У рисі лише 9% PACK-MULEs є зчитуваними транскриптами, при цьому переважна більшість ініціюється із промоторів у самому елементі (Jiang et al., 2004). У випадку, що розглядається для інбредних ліній кукурудзи, можливо, існує LTR-промотор, локалізований поряд, який орієнтований від гелітрону. Автори припускають, що транскрипцію визначає *non*-LTR-промотор, локалізований поряд з гелітроном (Brunner et al., 2005).

Химерні транскрипти у рослин зазвичай вважаються артефактами конструкцій, які містяться у бібліотеці кДНК. Однак дослідження на арабідопсисі, томатах і кукурудзі показали, що такі транскрипти у рослин існують у природі (Thimmarugam et al., 2005). Такий химерний транскрипт є аденільованим і сплайсованим і походить лише від однієї з чотирьох споріднених гелітронних копій (див.: Brunner et al., 2005). Подібні химерні транскрипти відносно часто трапляються у кукурудзі і, без сумніву, можуть бути виявлені в бібліотеках кДНК.

Формування химерних транскриптів полегшується пластичністю сайтів сплайсингу 5'-кінців, властивою для багатоклітинних евкаріотів (Ast, 2004). Це дає організму можливість продукувати новий транскрипт, який може кодувати нову

функцію, не порушуючи вихідного репертуару транскриптів, що продукується геном. Інтрони 2 і 6 транскрипта, описаного в роботі (Brunner et al., 2005), є прикладами такої пластичності.

Порівняно з пращурними складовими екзонів, в аналізованому транскрипті виявлено зсув рамки і внутрішньорамкові стоп-кодони, хоча передбачається кілька ще не виявлених відкритих рамок зчитування. Слід також враховувати, що наявність химерного транскрипта може приводити до генного сайленсингу за допомогою низки вже відомих механізмів (Hannon, 2002; Tsuchisaka, Theologis, 2004). Група різноманітних фрагментів екзонів гелітронного походження може утворювати химерний білок з біологічною активністю. Очевидно, може виникати й нова біохімічна функція. Тобто гелітрони можуть бути активними чинниками генної еволюції, що детально обговорюється у низці публікацій (Long et al., 1995; Britten, 2005; Brunner et al., 2005).

Слід також підкреслити, що експресія генів, які містяться в неалельних сегментах геному, у реципрокних гібридів є домінантною. Інбреди кукурудзи, що містять неспільні (*non-shared*) гени, у відповідному гібриді можуть мати функціональну комплементацию. Це може стосуватися явища гетерозису (див.: Brunner et al., 2005).

Таким чином, вивчаючи геном двох інбредних ліній кукурудзи, автори (Brunner et al., 2005) відкрили чотири близькоспоріднених неавтономних гелітрони, два з них зустрічались у одного інбрета, а два — в іншого. Один із цих елементів — Mo17-специфічний гелітрон на хромосомі 1 (bin 1,07) — є транскрипційно активним, можливо, внаслідок вставки поблизу промотора. Важливо те, що він продукує альтернативно сплайсований і химерний транскрипт, який об'єднує разом генні сегменти різного хромосомного походження, що містяться в гелітроні. Цей транскрипт потенційно кодує до чотирьох відкритих рамок зчитування. В ході еволюції транскрибовані гелітрони, що містять численні генні фрагменти, можуть давати початок новим біохімічним функціям шляхом комбінаторної зборки екзонів. Так, гелітрони не тільки постійно переформатовують геномну організацію кукурудзи і суттєво позначаються на її різноманітності, а й, можливо, беруть участь в еволюції генної функції (див. також розділ 10).

Розділ 5. ЕВОЛЮЦІЯ МОБІЛЬНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ЕЛЕМЕНТІВ РОСЛИН

Геноми різних покритонасінних за розміром можуть відрізнятися на понад три порядки (більше ніж у 1000 разів), і ця мінливість корелює із вмістом мобільних генетичних елементів (рис. 5.1). У видів рослин із порівняно малими геномами, наприклад у *Brachypodium distachyon* чи *Arabidopsis* spp., ДНК, що походить від МГЕ, зазвичай складає 20–30% геному. Види з більшими геномами мають відповідно більші відсотки ДНК, що походить від транспозонів, складаючи понад 85% геномів кукурудзи *Zea mays* і ячменю *Hordeum vulgare* (див. рис. 2.2). Враховуючи, що середній розмір диплоїдного геному покритонасінних складає близько 6400 м.п.н. (<http://data.kew.org/cvalues>) і що більші геноми є типовішими для вищих рослин, можна зробити висновок про те, що більшість ДНК нині існуючих покритонасінних походить від МГЕ (рис. 5.1) (Tenaillon et al., 2010).

Порівняльні геномні дослідження показали швидкість, з якою може змінюватися розмір геному завдяки активності МГЕ. Так, кукурудза, бавовник *Gossypium* spp. та один із видів рису

Oryza australiensis за останні близько 5 мільйонів років щонайменше подвоїли розмір геному завдяки проліферації МГЕ. Процес може бути настільки швидким, що відмінні виявляються навіть у межах виду. Наприклад, два сиккенованих геноми кукурудзи відрізняються за розміром на 22%, при цьому 90% цієї відмінності пов'язана з накопиченням повторюваних елементів (Vielle-Calzada et al., 2009). Відмінності у розмірі геному здебільшого зумовлені змінами кількості МГЕ класу I, які є ретроелементами, що «копіюються і вставляються» через РНК-посередника, оскільки ретроелементи складають близько 90% серед МГЕ обох класів у таких видів, як кукурудза, арабідопсис та рис (Mao et al., 2000; Wei et al., 2009). Тим не менше, елементи класу II (ДНК-транспозони), які проліферують через механізм «вириж і встав», також впливають на відмінності у розмірі геному (Charles et al., 2008). (Детальніше див. розділ 10.)

Враховуючи швидкість, з якою МГЕ можуть диференціювати геноми рослин як всередині виду, так і між видами, вивчення динаміки МГЕ

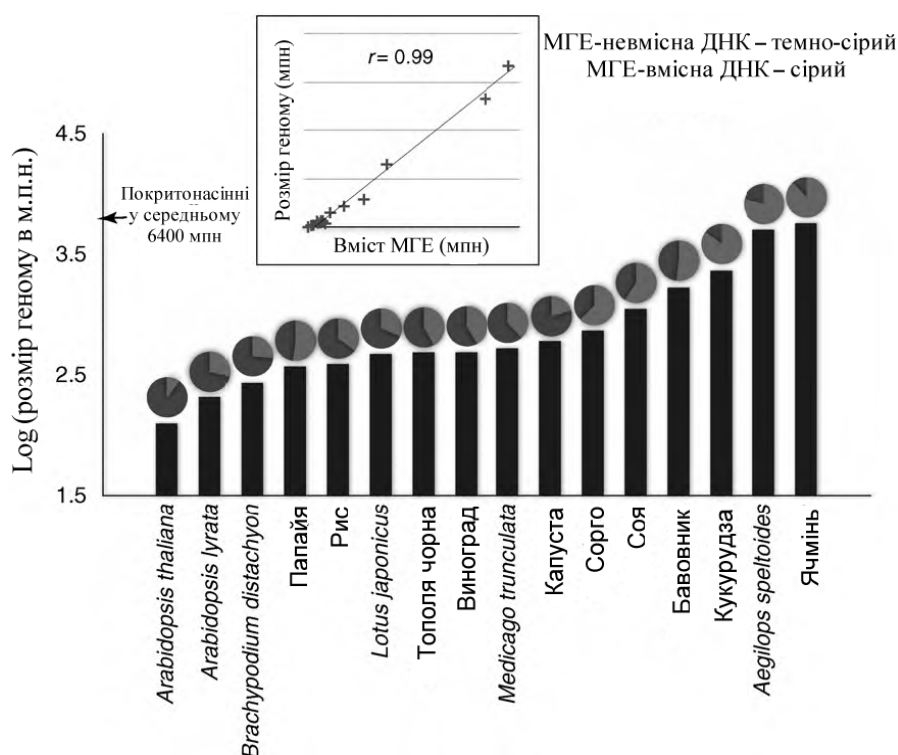


Рис. 5.1. Розмір геному і вміст МГЕ у покритонасінних тісно корелюють
Усі наведені види є диплоїдами (за: Tenaillon et al., 2010)

є вирішальним для розуміння еволюції розміру рослинного геному, його структури і функції (Biemont, 2008; Tenaillon et al., 2010). З цієї точки зору розглянемо головні аспекти еволюції МГЕ, складові якої відповідають трьом основним си-

лам, що визначають динаміку МГЕ: транспозиції, видалення МГЕ і популяційні процеси, перш за все роль природного добору. Разом ці сили регулюють розподіл МГЕ у рослинних геномах.

5.1. Контроль транспозиції МГЕ

Виявлені факти швидкої диференціації розміру геному у видів і навіть організмів свідчать про те, що явище транспозиції має бути частим і безперервним процесом. Проте мало відомостей про абсолютні швидкості транспозицій, оскільки все ще недостатньо виявлено елементів, що були активними у своїх рослинних хазяях. Тому важко охарактеризувати швидкості транспозицій експериментально. Кількома виключеннями тут є:

- транспозон *Mutator* (*Mu*), для якого в окремих ліній кукурудзи активність сягає одного процесу транспозиції на мобільний елемент за генерацію (Alleman, Freeling, 1986);
- система *Associator/Dissociator* (*Ac/Ds*), швидкість транспозиції якої складає близько 10^{-6} на локус на тестовану хромосому (Walbot, 2000);
- *mPing*, швидкість транспозиції якого в середньому оцінюється у близько 56 копій у рису особин F_1 і F_2 (Naito et al., 2006).

Було проведено вивчення здатності автономних *mariner*-подібних мобільних генетичних елементів транспозувати неавтономні елементи МГЕ, а саме *stowaway*. Після аналізу 119 різних комбінацій *mariner*-подібний $\times$ *stowaway* автори виявили лише чотири випадки (3%), коли автономний елемент успішно транспозував неавтономний. В одному з цих чотирьох випадків неавтономний елемент транспозував приблизно у 3000 разів частіше, ніж його автономний аналог. Наступний молекулярний аналіз виявив, що автономний елемент містив сиквенс-мотив, який репресував швидкість транспозиції і який був відсутній у елемента *stowaway* (Yang et al., 2009). На основі результатів цього дослідження зроблено два важливі висновки:

- автономні мобільні генетичні елементи можуть містити мотиви, що лімітують частоту своєї транспозиції. Можливо, елементи розвинули обмеження частоти своєї транспози-

ції подібно до того, як патогени зменшують свою вірулентність;

- важливим є генетичне тло, оскільки лише кілька комбінацій автономних і неавтономних МГЕ приводили до транспозиції.

Транспозиція МГЕ може бути обмежена не лише послідовностями їхніх молекулярних мотивів, а й реакцією хазяїна, особливо епігенетичним сайленсуванням. У рослин епігенетичне сайленсування МГЕ відбувається за допомогою малих інтерферуючих РНК (siRNA), тобто міРНК-опосередкованими шляхами (Almeida, Allshire, 2005). міРНК керують даунстрим-білковими комплексами, що ініціюють і підтримують метилювання як ДНК, так і гістонів (Zhang, 2008; Teixeira et al., 2009). Значення метилювання у сайленсуванні було продемонстроване на мутантах зі зниженим рівнем метилювання, таких як *ddm1 A. thaliana*, у яких зростання рівня транскрипції МГЕ часто пов'язане зі збільшенням транспозиції. Проте у таких мутантів порівняно невелика частина потенційно рухомих МГЕ стають активними (Lippman et al., 2004). На прикладі кукурудзи показано, що у мутантів зі зниженою активністю РНК-полімерази 2 (RDR2) активність МГЕ падала, незважаючи на те, що RDR2 є істотним компонентом шляхів РНК-спрямованого метилювання. Ці й інші подібні спостереження свідчать про те, що механізми сайленсування є складними і багато подробиць все ще залишаються невідомими (Lisch, 2009).

Яким чином МГЕ зберігають потенціал активності за присутності різних механізмів (шляхів) сайленсування? Розглянемо це на прикладі даних, наведених в огляді (Tenaillon et al., 2010):

- по-перше, геномні стреси можуть реструктурувати епігенетичні сигнали, що веде до сплесків транспозиції. Ці стреси можуть бути зумовленими як біотичними чинниками, такими, наприклад, як інфекція, гібриди-

зація, поліплоїдія, так і абіотичними, такими, наприклад, як температура (Lisch, 2009) (детальніше див. розділ 7). Прямі докази такого причинного зв'язку отримано на синтетичних поліплоїдах, у яких спостерігали реструктурування епігенетичних маркерів (Madlung et al., 2002) і підвищений рівень транспозицій деяких родин МГЕ (Kashkush et al., 2002; Madlung et al., 2005; Parisod et al., 2009). У природі також знайдено свідоцтва подібного значного впливу поліплоїдії і гібридизації. Наприклад, для еволюційно недавніх поліплоїдів *Spartina* встановлено епігенетичне ремоделювання поблизу розташування МГЕ (Parisod et al., 2009a), а гібридний вид соняшнику в 1,5 разу збільшив розмір геному завдяки сплескам транспозицій, які припали на час гібридизації (Ungerer et al., 2006), що, можливо, відображає вплив горизонтального перенесення (деталі див.: Tenaillon et al., 2010). Проте епігенетична модифікація і активація МГЕ не завжди мають місце після процесів поліплоїдії (Charles et al., 2008). Тому слід підкреслити, що сигнали (події), які ведуть до епігенетичного реструктурування, залишаються все ще мало вивченими;

- по-друге, можливо, МГЕ виробили засоби уникнення і протидії механізмам сайленсування свого хазяїна. Деякі родини транспозонів, такі як *MuDR* та *Spm* кукурудзи, кодувають транспозази, що мають здатність деметилувати представників родини (Lisch, 2009), і тому, можливо, обмежують вплив сайленсування на транспозицію. Інші надродини зазвичай під час транспозиції захоплюють генні фрагменти (Jiang et al., 2004; Du et al., 2009). Недавно припустили, що захоплення генів є механізмом уникнення метилювання шляхом фактичного «збивання з пантелику» захисної системи хазяїна (Lisch, 2009). Якщо

хазяїн націлюється на захоплені генні фрагменти в МГЕ для сайленсування, тоді він також ризикує пригнітити ендегенний ген. Ця гіпотеза підтверджується тим, що представники родини транспозонів MULE експресуються частіше, коли вони містять численні генні фрагменти (Hanada et al., 2009), засвідчуючи, що МГЕ, які містять численні генні фрагменти, є успішнішими щодо уникнення сайленсування;

- по-третє, неавтономні мобільні елементи володіють власною стратегією уникнення епігенетичного сайленсування. Неавтономні елементи, як правило, рідше, ніж автономні МГЕ, є мішенями міРНК, оскільки вони короткі, часто містять короткі спільні послідовності зі своїми автономними аналогами і транскрибуються нечасто (Hollister, Gaut, 2009). Можливо також, що малі неавтономні елементи, такі як МІТЕs, надають якусь перевагу для свого хазяїна, діючи як джерело міРНК для регуляторного контролю (Feschotte, 2008) або слугуючи як «звалище», що конкурує за транспозазу з автономними елементами, транспозиція яких може бути шкідливішою.

У цілому, характер, рівень і контроль транспозиції МГЕ все ще недостатньо зрозумілі і нині багато важливих проблем, що стосуються цих явищ, є ареною активних досліджень. Зокрема, порівняно нещодавно отримано важливі результати експериментів щодо рівня і механізмів транспозиції (Yang et al., 2009; Naito et al., 2009), поступово розв'язуються проблеми ініціації і підтримання сайленсингу, навіть всупереч обмеженням, що накладаються зміною поколінь (Slotkin et al., 2009), приділяється підвищена увага чинникам хазяйського геному, що модифікують ендегенну мобільність ретротранспозонів (Risler et al., 2012), тощо.

5.2. Видалення МГЕ шляхом рекомбінації

Проліферація МГЕ частково врівноважується видаленням ДНК. Свідчення видалення ДНК мобільних генетичних елементів отримано за вивчення повних і фрагментованих LTR-вмісних ретротранспозонів. Було досліджено геном *A. thaliana* на вміст інтактних LTR-вмісних ре-

тротранспозонів, а також на вміст деградованих елементів, типовим представником яких є соло-LTRs. Автори встановили, що кількість інтактних елементів і соло-LTRs була приблизно однаковою, засвідчуючи, що видалення ДНК ретроелемента було звичним явищем. Можливим

механізмом видалення може бути нерівна внутрішньоланцюгова гомологічна рекомбінація (unequal intra-strand homologous recombination — UHR) між двома LTRs інтактного елемента, що приводило до формування соло-LTR. Крім того, виявлено дуже деградовані LTR-вмісні ретротранспозони, які, можливо, утворилися шляхом незаконної рекомбінації (illegitimate recombination — IR) (Devos et al., 2002).

Також встановлено, що відношення інтактних елементів до соло-LTRs варіює в різних хромосомних ділянках, у різних особин і у різних видів (Kalendar et al., 2000; Vitte, Bennetzen, 2006). Відмінності між хромосомними ділянками, можливо, пов'язані з тим, що механізми UHR та IR змінюються як функція мейотичної рекомбінації. Так, відношення інтактних елементів до соло-LTRs є вищим у центромерних порівняно із нецентромерними ділянками хромосом (Ma, Benntzen, 2006), а LTR-вмісні ретроементи у середньому коротші в ділянках з високою мейотичною рекомбінацією (Tian et al., 2009). Відношення інтактних елементів до соло-LTRs варіює між видами від 0,5 у *A. thaliana* і

ячменю до 5,4 у кукурудзи (Kalendar et al., 2004; Vitte, Bennetzen, 2006). Проте ці дані важко однозначно інтерпретувати. Різні співвідношення між видами можуть свідчити про відмінності у відносній ефективності видалення ДНК шляхом UHR або ж вони можуть просто вказувати на те, що у деяких видів недавні чи тривалі процеси транспозиції випереджають процеси видалення ДНК.

Дослідження свідчать, що UHR та IR є потужними механізмами видалення ДНК. Так, оціночно за останні чотири мільйони років вони видалили понад 190 м. п.н. ДНК із близько 400 м. п.н. геному рису (Ma et al., 2004). Ця оцінка навіть може бути занижена з двох причин:

- вплив ектопічної рекомбінації між МГЕ на різні хромосомні локуси не може бути виміряний сучасними методами, однак теоретично такі події можуть видаляти великі ділянки геному;
- особливості видалення ДНК досить добре описані для LTR-вмісних ретротранспозонів, проте відносно мало даних щодо ступеня видалення ДНК для інших типів МГЕ.

5.3. Вплив популяційних процесів на транспозиції і делеції МГЕ

Вважається, що поширення і накопичення МГЕ у рослинному геномі є балансом між вставками МГЕ і видаленням їхньої ДНК (Bennetzen, 2007; Charles et al., 2008; Hawkins et al., 2009; Yang et al., 2009). Це твердження правдиве, але неповне (див.: Tenaillon et al., 2010). Справа в тому, що транспозиція і видалення МГЕ викликають мутації в організмі, але популяційні процеси визначають подальшу долю цих мутацій; ці процеси, особливо природний добір, діють як сито, що фільтрує мутації. Значення популяційних процесів робить їх центральною складовою триєдиного процесу еволюції (рис. 5.2).

Популяційні процеси вивчаються щонайменше трьома способами:

- перший — це математичне моделювання. Інтенсивно моделювалися сили, що визначають накопичення МГЕ, у тому числі розроблено моделі, що відрізняються поглядами на рівномірність добору проти МГЕ, систему спарювання та здатність МГЕ до саморегулювання числа копій (див.: Tenaillon et al., 2010).

Ці моделі були детально проаналізовані (Le Rousic, Decelie, 2005), але головне призначення такого аналізу — показати вплив гіпотетичних чинників на динаміку МГЕ, а також чітко визначити параметри, що мають еволюційне значення. Мабуть, найважливішою є ефективність добору проти МГЕ, яка представлена параметром $N_e s$, де s є силою добору, а N_e — ефективний розмір популяції (див. рис. 5.2);

- другий метод — це комп'ютерне моделювання. Недавні дослідження значно удосконалили цей метод (Le Rousic et al., 2007). Автори ввели кілька удосконалень у моделювання процесів популяційної динаміки МГЕ, що включали кінцевий розмір популяції, деградацію активних копій за допомогою мутацій та мінливість ефекту вставок МГЕ на пристосованість хазяїна. У більшості моделей мав місце циклічний характер інвазії і регресії МГЕ, що було наслідком балансу між автономними і неавтономними копіями. Ця циклічна

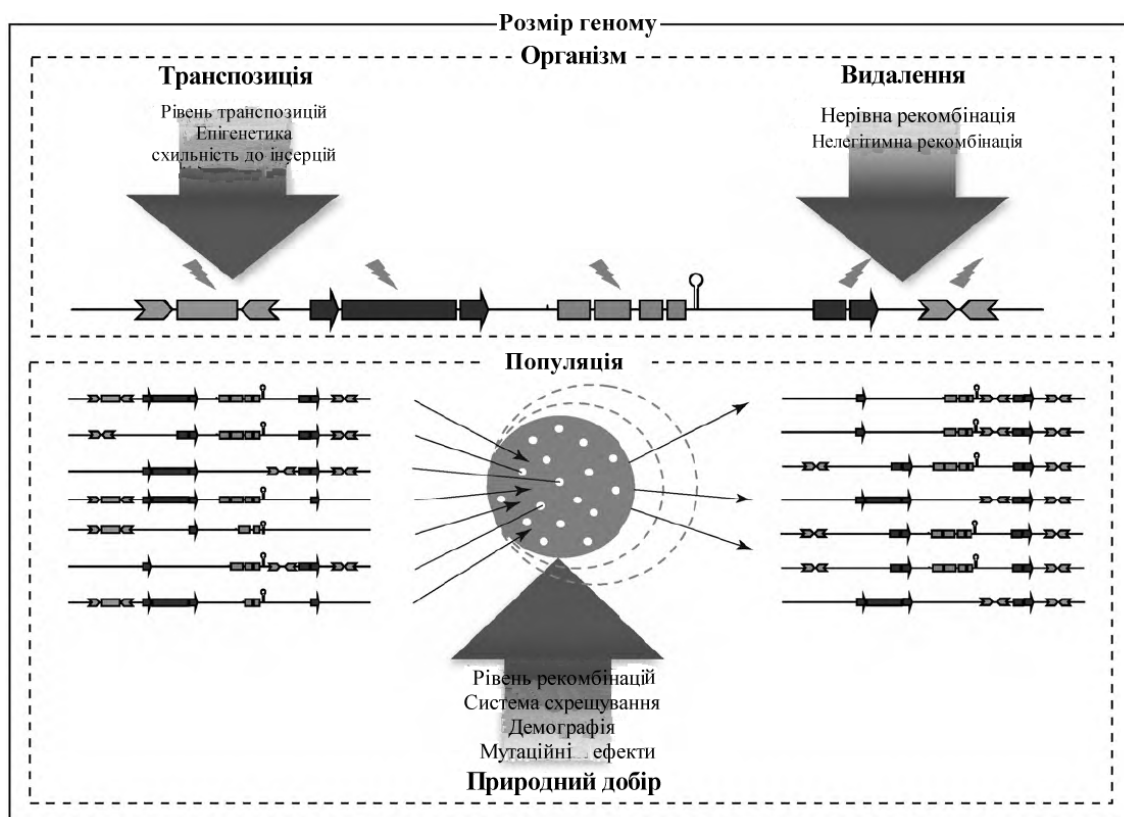


Рис. 5.2. Три еволюційних фактори, що визначають існування МГЕ. Транспозиція і видалення діють у межах організму

На діаграмі зображено вставку ДНК-елемента з термінальними інвертованими повторами (TIRs), LTR-вмісного ретротранспозона і гелітрону (зліва направо), а також видалення ділянок TIR та LTR елементів. Природний добір діє на популяційному рівні і є селективним ситом, що визначає можливість еволюційного існування. У такому разі популяція зліва модифікується природним добром так, що вся довжина TIR рухомого елемента втрачається із популяції. Розмір селективного сита варіює з розміром популяції, як показано пунктирними кільцями (за: Tenaillon et al., 2010)

поведінка свідчить про те, що загальне припущення про рівновагу між транспозицією і добром може не справджуватися за реалістичних умов еволюції МГЕ. Хоча цей факт істотно зменшує значення математичних підходів, він переконливо свідчить про те, що будуть корисними додаткові і реалістичніші способи і підходи моделювання транспозиції і видалення МГЕ;

- третій метод — це аналіз емпіричних даних із застосуванням порівняльної геноміки і популяційної генетики. Головна мета цих досліджень — зрозуміти ефективність добору проти МГЕ і засадні механізми цього процесу. Ці підходи виявили, що ефективність добору є функцією локалізації вставки МГЕ. Вставки в екзони безумовно мають здатність перешкоджати генній функції і тому є дуже

шкідливими. Підтвердженням є те, що всі види, вивчені донині, мають брак вставок МГЕ у екзони (Wright et al., 2003). Однак ще не ясно, що його генерує. Можливо, що МГЕ вставляються у кодувальні ділянки, а потім ефективно видаляються за допомогою добору. З іншого боку, МГЕ може виробити інсерційні преференції, щоб уникати порушення екзонів. Остання можливість задокументована для *mPing* (Naito et al., 2009), але механізм, за допомогою якого цей транспозон уникає екзонів, не відомий.

Місце локалізації вставки МГЕ є важливим також стосовно рекомбінації, яка позначається на ефективності добору такими двома шляхами:

- у ділянках хромосом з низьким рівнем рекомбінації малошкідливі мутації вибраковують-

ся неефективно, що частково і пояснює накопичення у більшості рослинних геномів МГЕ саме у гетерохроматинових ділянках з низьким рівнем рекомбінації (Gaut et al., 2007);

- ектопічні процеси є вірогіднішими у ділянках хромосом з високим рівнем рекомбінації, і вони часто продукують шкідливі хромосомні аномалії. Тому велика кількість копій МГЕ, які забезпечують матрицями ектопічну рекомбінацію, навряд чи зможуть накопичуватися у ділянках з високою частотою рекомбінації (Langley et al., 1988).

Однак чітко й однозначно встановити зв'язок між рекомбінацією і розподілом МГЕ важко, оскільки осередки сайленсованих МГЕ зупиняють рекомбінацію (Dooner, He, 2008). Не завжди можна однозначно стверджувати, що деякі МГЕ вставляються переважно у ділянки з низькою рекомбінацією чи натомість вони своєю присутністю продукують ділянки з низьким рівнем рекомбінації.

Інша функція локалізації — це можливість МГЕ впливати на генну експресію, коли вони розташовані близько до експресуючих генів (Kashkush, Khasdan, 2007; Pereira et al., 2009). Зокрема, у арабідопсиса рівень експресії гена сильно негативно корелює зі щільністю МГЕ, особливо метильованих елементів (Hollister, Gaut, 2009). Це свідчить про можливість існування як позитивних, так і негативних наслідків метилювання МГЕ: перевага полягає у сайленсуванні, а втрата — в опосередкованому впливі на генну експресію. Дані популяційної генетики узгоджуються з уявленнями про те, що є плата за метилювання, оскільки метильовані МГЕ, які містяться поблизу (на відстані менше 1,5 т. п. н.) генів, зазнають сильнішого «очищувального» добору, ніж неметилювані МГЕ чи елементи, які розміщені далі від генів (Hollister, Gaut, 2009). Однак ще не ясно, чи є це явище загальною особливістю рослинних геномів. Наприклад, в іншій роботі не виявлено жодних свідчень того, що вставки елемента *mPing* пригнічують генну експресію (Naito et al., 2009), але це може бути наслідком того, що вставки були зовсім недавніми і, можливо, неметилюваними. У будь-якому разі взаємодія метилювання, генної експресії та популяційної генетики МГЕ потребує додаткових досліджень на інших видах рослин.

Ефективність добору ($N_e s$) є також функцією N_e (див. рис. 5.2). Тому мінливість розміру популяції може впливати на еволюційну долю як вставок, так і делецій МГЕ. Мінливість N_e забезпечується величезною кількістю механізмів, таких як популяційні «вузькі шийки пляшки» (тобто через втрату ареалу розповсюдження, доместикацію чи поліплоїдію), популяційну експансію, міграцію і особливості системи схрещування (розмноження). За інших ідентичних умов самозапильні генеалогічні лінії мають значення N_e , що становить половину такої перехресно-запильної генеалогічної лінії (Nordborg, 2000). Зменшення розміру популяції збільшує стохастичні ефекти генетичного дрейфу. Ефект дрейфу сильно залежить від числа копій будь-якої конкретної родини МГЕ; у середньому численніша родина МГЕ краще амортизує втрату через генетичний дрейф (Le Rouzic et al., 2007). Важливо, що показник N_e позначається не тільки на ефективності добору, а й впливає навіть за відсутності добору.

За винятком деяких досліджень, в емпіричній роботі вплив показника N_e на накопичення і розподіл МГЕ майже повністю ігнорувався. Перше виключення — це порівняння поліморфізму МГЕ у перехресно- і самозапильних видів арабідопсиса (Wright et al., 2001; Lockton, Gaut, 2010). Ці дослідження вказують на те, що показник $N_e s$ стабільно нижчий у самозапильного *A. thaliana* порівняно з *Arabidopsis lyrata*. Оскільки цей факт підтверджується для всіх родин МГЕ, відмінності у системі розмноження (схрещування) є рушійною силою, як і передбачено математичними моделями (Morgan, 2001). Однак варто зауважити, що популяційна динаміка також значно варіює між різними родинами МГЕ (Lockton, Gaut, 2010).

Друге виключення представляють результати порівняння різних популяцій *A. lyrata*. Досліджували демографічну історію згаданих популяцій із застосуванням даних поліморфізму ДНК для оцінки N_e у шести окремих популяціях (Ross-Ibarra et al., 2008). Порівнювали також характер поліморфізму МГЕ в популяціях і між ними (Lockton et al., 2008). У цілому дослідники дійшли висновку, що МГЕ зазнають слабого тиску добору і що його ефективність варіює між популяціями як функція N_e . Тому демографічні

чинники є головними, що визначають динаміку МГЕ в рослинних генеалогічних лініях.

Еволюційні моделі, як правило, припускають, що МГЕ є або шкідливими, або нейтральними. Тепер відомо, що МГЕ можуть також позитивно впливати на геноми. Мобільні генетичні елементи:

- прискорюють дію добору, викликаючи генетичну мінливість (Chao et al., 1983);
- доместикуються як функціональні гени (Hudson et al., 2003; Lin et al., 2007);
- сприяють формуванню нових генів через зворотну транскриптазу (Wang et al., 2006);
- впливають на підтримання цілісності центромери і ділення клітини (Ma, Bennetzen, 2006; Biemont, 2009; Weber, Schmidt, 2009);

5.4. Проблеми і перспективи. Підсумок

У кожній із викладених вище трьох частин цього розділу наразі все ще є великі прогалини у наших знаннях. Зокрема, недостатньо даних і тому мало зрозуміло є динаміка транспозиції у рослинних геномах, відсутнє розуміння чинників, що ведуть до ініціації і підтримання епігенетичного сайленсингу. Ми також ще мало знаємо про ефективність видалення ДНК у різних видів і у різних родинах МГЕ. Практично відсутня інформація про поліморфізм МГЕ у популяціях рослин. Для кращого розуміння цих життєво важливих аспектів геномної мінливості рослин необхідно інтенсифікувати дослідження природної генетичної мінливості із застосуванням високоефективного секвенування.

Однак, на думку (Tenaillon et al., 2010), аналіз таких даних, особливо щодо точної локалізації МГЕ, ставить під сумнів наш нинішній набір біоінформаційних підходів (див.: Cridland, Thornton, 2010). І все ж, без таких даних щодо поліморфізму важко навіть починати вивчати популяційні процеси, що діють на МГЕ. Однак наші найбільші прогалини в знаннях витікають

- є джерелом *cis*-регуляторних елементів і міРНК (Feschotte, 2008) та, очевидно,
- справляють адаптивні ефекти через МГЕ-генну епігенетичну корегуляцію (Slotkin, Martienssen, 2007);
- можуть також відігравати значну роль у гетерозисі (Springer, Stupar, 2007; McMullen et al., 2009).

Проте наразі не відома точна частота цих «позитивних» процесів. Очевидно, близько 1% експресованих генів *A. thaliana* містить фрагменти, «подаровані» МГЕ (Lockton, Gaut, 2009), засвідчуючи, що адаптивні ефекти МГЕ є закономірними впродовж великого відрізка еволюційного часу (див. також розділ 10).

із нерозуміння того, як описані вище складові еволюції МГЕ — транспозиція, видалення і популяційні процеси — пов'язані, створюючи єдину цілісну картину. Наприклад, припущення, що метилювання не тільки позначається на транспозиції, а й може зробити деякі МГЕ шкідливішими (Holliser, Gaut, 2009), може свідчити про наявність важливого зв'язку між двома складовими. Це ж стосується і того, що *mPing* уникає екзонів (Naito et al., 2009), оскільки це означає слабший добір щодо *mPing* у зв'язку з іще невідомим механізмом транспозиційного націлювання. І, як справедливо підкреслюють деякі дослідники (див.: Tenaillon et al., 2010), звичайно ж, потрібні додаткові дослідження, щоб підтвердити загальність обох наведених спостережень, але чи існують й інші зв'язки? Прикладів обмаль. Важливий момент полягає в тому, що хоча зроблено великі кроки щодо вивчення і порівняння вмісту МГЕ у різних видів, але все ще багато потрібно довідатися про процеси, що формують превалюючий компонент геному вищих рослин — мобільні генетичні елементи.

Розділ 6. ФАКТОРИ, ЩО ВПЛИВАЮТЬ НА АМПЛІФІКАЦІЮ МГЕ. УЗАГАЛЬНЕННЯ

Вище наведено дані про те, що геном багатьох видів рослин, зокрема таких, як кукурудза, пшениця, ячмінь, було значно збільшено за рахунок ампліфікації МГЕ. Разом з тим, у геномі, наприклад, пшениці не виявлено жодної копії LTR-вмісних ретротранспозонів, яка була б порівняно нещодавно активною (Choulet et al., 2010). Мала ж кількість транскрибованих послідовностей, гомологічних ретротранспозонам, наприклад 1,5 % від усіх EST (expressed sequence tags) у кукурудзи, дозволяє припускати, що певні механізми, очевидно, епігенетичні, ефективно репресують транскрипцію МГЕ у геномах рослин (Vicent, 2010).

Життєвий цикл LTR-вмісних ретротранспозонів включає в себе чотири етапи:

- транскрипцію;
- трансляцію;
- зворотну транскрипцію;
- інтеграцію ДНК-елемента у геномну послідовність.

Для здійснення транспозиції ДНК-транспозона також необхідними є транскрипція і трансляція для утворення білка транспозази. Регуляція на кожній із цих стадій може лімітувати активність елемента (Сергеева, Салина, 2011).

Інформація про чинники, що визначають активність МГЕ, почала з'являтися з моменту відкриття першого мобільного елемента у кукурудзи — сайта хромосомного розриву, названого *Dissociation (Ds)*. *Ds* може переміщуватися тільки у присутності елемента-активатора *Activator (Ac)*, який може забезпечувати також і свою власну транспозицію.

Разом *Ac* і *Ds* складають родину МГЕ, яка включає автономний (*Ac*) і неавтономний (*Ds*) елементи (див. розділ 4.1). Пізніше було встановлено, що різні родини ДНК-транспозонів є причиною нестабільних мутантних фенотипів у інших рослин, наприклад у ротиків, петунії, сої, сорго та ін. (Craig et al., 2002).

Детальне вивчення мутацій, що відповідають за стабільні мутантні алелі у кукурудзи, привели до виявлення LTR-вмісних ретротранспозонів. П'ять різних родин LTR-ретротранспозонів (*Bs1*, *Stonor*, *Magellan*, *Hopscoth* і *B5/G*) було ви-

явлено у складі восьми мутантних алелей (Johns et al., 1985; Varagona et al., 1992; Vignols et al., 1995).

Розглянемо, які чинники визначають активацію МГЕ у геномі, спираючись, переважно, на відомості, наведені в огляді (Сергеева, Салина, 2011).

На доповнення до прямої інактивації шляхом накопичення мутацій у послідовності елементів клітини виробили механізм контролю активності МГЕ, який включає сайленсинг шляхом метилювання ДНК (транскрипційний генетичний сайленсинг) або сайленсинг за допомогою РНК-інтерференції (посттранскрипційний генетичний сайленсинг) (Casacuberta, Santiago, 2003). Дослідження арабідопсиса і рису показали, що значна кількість транспозонів є неактивними, метильованими, зв'язаними з малими інтерферуючими РНК (Kasschau et al., 2007; Zilberman et al., 2007; Lister et al., 2008).

Метилювання ДНК є основним механізмом сайленсингу у рослин. Так, ще Б. Мак-Клінток під час аналізу нестабільних мутацій у кукурудзи описала успадковувані і зворотні зміни активності елементів *Ac* і *Spm (Suppressor-Mutator)*, за яких, як було встановлено пізніше, відбувається зміна статусу метилювання. Дослідження активних і неактивних стадій мобільного елемента *Mutator* кукурудзи показало, що його активність корелює з метилюванням залишків цитозину (Chandler, Walbot, 1986). У всіх випадках неактивні елементи були гіперметилювані у порівнянні з їх активними копіями.

У мутантів арабідопсиса *ddm1 (decreased DNA methylation 1)*, які характеризуються зниженим рівнем метилювання CpG, відбувалась активація транскрипції і транспозиції транспозонів *Mutator* і *CACTA*, при цьому мобільні елементи могли залишатися активними в ряду поколінь (Kato et al., 2004). Спостерігали також активацію транскрипції ретротранспозонів *Tar17*, *Athila4* і *Athila5* (Hirochika et al., 2000; Wright, Voytas, 2002).

МГЕ здійснюють транскрипцію і навіть транспозицію за різних біотичних і абіотичних стресових впливів або у клітинній культурі, а та-

кож за міжвидової гібридизації (Hirochika, 1993; Mhiri et al., 1997; Kashkush et al., 2002; Ramallo et al., 2008; Picault et al., 2009). Наприклад, після індукованої стресом транскрипції кількість копій LTR-ретротранспозона *Tos17* у клітинах рису деяких ліній зросла з 2 до 30 копій (Hirochika et al., 1996). Активацію у культурі клітин показано і для LTR-ретротранспозона *Tos17*, і для ДНК-транспозона *mPing* рису (Hirochika et al., 1996; Jiang et al., 2003). Одним із відомих прикладів тут також є активація транскрипції LTR-вмісних ретротранспозонів *Tnt1* і *Tto1* обробкою екстрактами грибів і бактерій, інфікуванням патогенами, пораненням та різними абіотичними чинниками (Grandbastien et al., 1997, 2005; Takeda et al., 1999). Такі стресові впливи можуть приводити до зниження рівня метилювання ДНК і знижують його, внаслідок чого відбувається активація МГЕ. Слід відзначити, що така активація може бути й зворотною. На прикладі ротиків *Antirrhinum majus* показано, що низькі температури приводять до деметилювання ДНК і активації ДНК-транспозона *Tam3*, але цей процес може бути припинений підвищенням температури (Hashida et al., 2003).

Транспозони можуть вносити істотний вклад в адаптацію геномів рослин і тварин шляхом дії на гени за активації у стресових умовах (див. огляди: Васильєва и др., 2007; Чересиз и др., 2008; Сергеева, Салина, 2011). МГЕ часто вбудовуються в еухроматинові ділянки поряд з генами або в самі послідовності генів і, таким чином, можуть впливати на їх експресію (Bennetzen, 2000, 2005). Наприклад, у кукурудзи транспозон *Mutator* специфічно вбудовується у послідовності генів (Cresse et al., 1995), а *MITE*-елементи зчеплені з кодувальними ділянками у геномах ячменю, кукурудзи, рису, сорго (Bureau, Wessler, 1994; Iwamoto, Higo, 2003; Sabot et al., 2005). Відомо чимало прикладів поліморфних інсерцій *MITE* у промотори, інтрони, 3'-фланкуючі послідовності між ортологічними і паралогічними генами (Bureau, Wessler, 1994; Bureau et al., 1996). Інсерції МГЕ можуть також створювати альтернативні промотори, екзони, термінатори і сайти сплайсингу (Bennetzen, 2000). Виявлено також, що *CACTA*-транспозони пшениці, *MULEs* рису, *Helitrons* кукурудзи можуть містити у собі фрагменти і копії генів хазяїна, захоплювати і пере-

тасовувати екзони (Wicker et al., 2003; Morgante et al., 2005; Choulet et al., 2010). Транспозони, вірогідно, брали участь у збільшенні числа генів і порушенні їх колінеарності у пшениці шляхом МГЕ-опосередкованих міжхромосомних дуплікацій і захоплення генів (Akhunov et al., 2007).

Загальною рисою МГЕ, що викликають інсерційні мутації, є відносно низький рівень їхніх копій (кількість — менше 100) у геномі хазяїна. Наприклад, LTR-ретротранспозон *Bs1*, який уперше був виявлений як інсерція у гені алкогольдегідрогенази (*adh1*), представлений у геномі кукурудзи у кількості всього 1–5 копій (Johns et al., 1985). Очевидно, на активність елементів, представлених більшою кількістю копій у геномі, крім метилювання ДНК, діють ще й додаткові чинники. Зокрема, показано, що рівень транскрипції деяких МГЕ у кукурудзи у тканинах апікальної меристеми пагонів і у генеративних клітинах є дуже високим. Проте, незважаючи на активну транскрипцію МГЕ, транспозиція у кукурудзи — подія рідкісна (Vicient, 2010). Встановлено також, що за міжвидової гібридизації пшениці відбувається активація експресії транспозонів, наприклад широко представлено у геномі ретротранспозона *WIS*, проте зростання частоти інсерцій при цьому не відбувається (Kashkush et al., 2002, 2003). Можливо, що клітини можуть контролювати транспозицію на посттранскрипційному рівні.

Деякі МГЕ можуть здійснювати транскрипцію і за нормального розвитку рослини, як це показано, наприклад, для ретротранспозонів *BARE-1* ячменю, *Grande* кукурудзи, *Rider* томатів і різних МГЕ сорго (Muthukumar, Bennetzen, 2004; Gomez et al., 2006; Cheng et al., 2009). Два нових класи транскрипційно активних транспозон-подібних послідовностей, *Revolver* і *Superior*, знайдено у жита (Tomita et al., 2008, 2009).

Показано, що низка МГЕ була активною у недавньому минулому. Високий ступінь подібності, властивий для багатьох родин *MITE*, означає, що ці родини могли поширитись у геномі хазяїна порівняно нещодавно. З цією точкою зору збігається той факт, що сайти інсерції *MITE* в окремих локусах часто є поліморфними за порівняння особин одного виду (Bureau, Wessler, 1994; Bureau et al., 1996; Zhang et al., 2000).

Ампліфікація МГЕ може бути пов'язана з адаптивною еволюцією хазяїна. Так, описана МГЕ-опосередкована реструктуризація геному у популяції дикого ячменю *Hordeum spontaneum*. Реструктуризація геному виявляється у наявності внутрішньовидової варіації розміру геному за рахунок ампліфікації LTR-ретротранспозона *BARE-1*. Кількість копій цього елемента у популяціях, які підлягали різним ступеням посухи, варіює між 8300 і 22 100, що відповідає 1,8–4,7% ядерної ДНК (Vicent et al., 1999; Kalendar et al., 2000). Відомо також, що ампліфікація *MITE*-елемента *mPing* відбувалася переважно у сортах рису, адаптованих до екстремальних умов довкілля (Jiang et al., 2003).

Очікували виявити вибух транспозицій за утворення міжвидових гібридів. Проте аналіз геномних послідовностей пшениці показав, що 90% мобільних генетичних елементів були ампліфіковані ще до входження у геном алополіплоїда, у тому числі й специфічний для В-геному ретротранспозон *Fatima* (Charles et al., 2008; Salina et al., 2011). Відомий також специфічний для геному С *CACTA*-транспозон *Bot1* у видів роду *Brassica*, який зіграв визначальну роль у дивергенції геномів на диплоїдному рівні. Після утворення алополіплоїда *B. napus* (геном ААСС) не виявлено поширення цього елемента на хромосоми іншого, А-геному (Alix et al.,

2008). На основі цього факту зроблено висновок, що алополіплоїдизація ніяк не вплинула на частоту транспозиції (Сергеева, Салина, 2011).

Проте через певний час після утворення алополіплоїда можливе переміщення мобільних генетичних елементів по всьому геному, однак це залежить від конкретного виду рослини. Наприклад, у алополіплоїдів бавовнику (*Gossypium*) різні родини МГЕ поширилися з одного геному в інший уже після алополіплоїдизації (Zhao et al., 1998), а в алополіплоїдів роду *Nicotiana*, що виник близько 1 млн років тому, відбувся суттєвий обмін мобільними елементами між геномами, що увійшли до його складу (Lim et al., 2007).

Таким чином, викладені вище відомості свідчать про те, що ампліфікація мобільних генетичних елементів вносить істотний вклад в еволюцію геному рослин. За рахунок ампліфікації МГЕ відбулися істотне зростання розміру геномів рослин, а також дивергенція послідовностей споріднених видів. Також дуже важливо для процесів адаптації саме те, що, очевидно, ампліфікація МГЕ є адаптивною відповіддю на стрес. Тобто мобільні генетичні елементи є ключовим компонентом, який забезпечує пластичність рослинного геному. Конкретні і детальніші підтвердження цих положень наведено далі, у наступній частині.

Частина II

БІОЛОГІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ МОБІЛЬНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ЕЛЕМЕНТІВ

Нині є загальновизнаним, що надлишкова ДНК, яка включає МГЕ і некодувальні повторювані послідовності, є рушійною силою еволюції, що приводить до появи нових генних функцій, викликає хромосомні перебудови і різноманіття геномів (Kazazian, 2004; Biemont, Vieira, 2006; Lakhotia, 2006; Патрушев, Минкевич, 2007; Matsunaga, 2009; Геращенко, Рожнова, 2010). Уявлення про надлишкову ДНК як «сміттеву» («junk»), «еґоїстичну» («selfish») чи «паразитичну» («parasitic») частину геному, що панувало нещодавно, поступається місцем уявленню про неї, як про «геномний скарб». Зокрема, транспозони тепер вважають архітекторами геному, оскільки вони перетасовують екзони, беруть участь в утворенні псевдогенів, химерних ретрогенів, сегментних дуплікацій, впливають на еволюцію геномів шляхом контролювання генної активності, є одними з основних інструментів природної генної інженерії і створення не лише нових форм, а й, можливо, нових видів рослин (Kumar, Bennetzen, 1999; Bennetzen, 2000, 2005, 2007; Makalowski, 2003; Колотова и др., 2004; Овчаренко та ін., 2006; Todorovska, 2007; Підпада та ін., 2008; Belyayev et al., 2010).

Оцінка відносної частки МГЕ у геномах близьких видів за їх сиквенування дала можливість вирішення так званого «С-парадоксу». Він полягає у тому, що геноми близьких видів часто різко відрізняються за розміром, а відмінності за рівнем плоідності далеко не завжди здатні пояснити такі відмінності.

Дослідження останніх років, зокрема дослідження з використанням даних сиквенсу низки геномів, показали, що саме LTR-вмісні ретротранспозони відіграють ключову роль в еволюції геномів рослин і саме вміст МГЕ визначає вражаючу різницю у розмірі геномів філогенетично близьких видів рослин. Сьогодні вже не підлягає сумніву, що саме за рахунок мобільних елементів відбувалися (і відбуваються) різкі зміни розмірів геному у багатьох рослин.

Причини збільшення розмірів геному за допомогою ампліфікації і поширення МГЕ й ендогенних вірусів по геномах рослин до кінця ще не встановлені і можуть бути пов'язані як з різними змінами довкілля, так і з «геномними стресами», які індукують ретротранспозиції.

Мобільні генетичні елементи можуть вставлятися у гени чи генні регуляторні елементи, потенційно порушуючи генну функцію, і запускати хромосомні перебудови (див. каталог генів, ушкоджених транспозонами: Rebollo et al., 2012; <https://sites.google.com/site/tecatalog>). Хромосомні перебудови є ще одним із основних механізмів еволюції рослинного геному. Наприклад, у роботі (Raskina et al., 2004) за допомогою флюоресцентної *in situ* гібридизації (FISH) у малих ізольованих периферійних (маргінальних) популяціях егілопса *Aegilops speltoides* було виявлено:

- причетність *En/Spm*-подібних елементів до хромосомних перебудов і, відповідно, до створення нових фертильних геномних форм;
- приуроченість транспозонів до «гарячих точок» хромосомних перебудов;
- асоціацію між кластерами рибосомної ДНК і *En/Spm*-транспозонами, а також їх здатність до спільного переміщення по геному.

Деякі МГЕ були «одомашнені» геномом хазяїна і виконують функції генів чи регуляторних елементів генів, вони є, по суті, джерелом інновацій для організму.

Знання процесів і механізмів регуляції цих елементів дозволить зрозуміти, як умови існування організму впливають на експресію його генів (генотипу), формуючи конкретні фенотипи (ознаки) у конкретних умовах, у тому числі адаптивні ознаки фенотипу.

Розглянемо детальніше явища, які розкривають величезну біологічну роль мобільних генетичних елементів у процесах життєдіяльності рослин, на конкретних прикладах.

Розділ 7. ІНДУКЦІЯ ТРАНСПОЗИЦІЙ МГЕ І СТРЕС

У 1983 р. Б. МакКлінток у своїй нобелівській промові висунула гіпотезу про те, що індукція переміщень мобільних елементів стресовими чинниками як внутрішнього, так і зовнішнього походження є, вірогідно, реакцією геному на неочікувані зміни. Це був час піку панування уявлень про «егоїстичну» природу МГЕ. Тому саме припущення про те, що транспозиційні події являють собою реакцію геному у відповідь на «шок», причому реакцію особливого типу, було не лише новим, а й неочікуваним. Поряд з відповіддю «теплого шоку» в екаріотів або SOS-відповіддю бактерій, що представляють собою жорстко запрограмовану послідовність клітинних подій, які дозволяють пом'якшити ефект шоку, як відзначала Б. МакКлінток, геному притаманні й менше запрограмовані реакції на непередбачувані зміни стресового характеру, до яких належить й індукція переміщень МГЕ (McClintock, 1984).

Слід особливо підкреслити, що ще однією подібною «незапрограмованою» реакцією геному, яка дозволяє йому модифікуватись у відповідь на неочікувану зміну умов, вона назвала події, що відбувалися з геномом за введення клітин і тканин в культуру *in vitro*. На той час вже було відомо, який широкий спектр змін (фенотипних, каріотипних, генотипних) зазнають клітини при культивуванні *in vitro* (детальніше див. монографію: Кунах, 2005), однак ще практично не було відомо, що за цих умов індукується переміщення мобільних елементів. Цей приклад був згаданий серед інших випадків подібних реакцій геному на «події травматичного характеру» (як вона їх охарактеризувала): приводяться і вірусні інфекції, і міжвидові схрещування, і різні отруйні хімічні сполуки. Всі ці види стресу, як ми знаємо сьогодні, здатні викликати транспозиції МГЕ.

Б. МакКлінток також припустила, що щонайменше деякі біологічні види утворилися у результаті реконструкції геному у відповідь на якийсь «геномний шок», яким могла бути міжвидова гібридизація — остання, як тепер добре відомо, може серед інших ефектів викликати масові переміщення МГЕ («вибухи транспозицій»). Наразі вважається доведеним, що чимала

низка видів виникла в результаті дії цього механізму (Fontdevila, 2005).

Подальші дослідження підтвердили гіпотезу Б. МакКлінток і зрушили уявлення про транспозони як про «геномні паразити» біологічних видів до ідеї про «одомашнення» МГЕ видами-хазяями під час їх коеволюції. Вважається, що види, які несуть у своєму геномі МГЕ (а таких більшість), виробили механізми клітинного контролю, що дозволяють контролювати переміщення транспозонів у нормальних умовах довкілля та клітинного гомеостазу. За таких умов мобільні елементи або стабільні, або переміщуються у гетерохроматинових ділянках, де їхні інсерції або опосередковані ними хромосомні перебудови не ведуть до утворення мутацій, що впливають на адаптивність хазяїна. Однак за умов стресу здійснюється індукція МГЕ, яка призводить до підвищення мутабельності за рахунок вищої частоти їх переміщень та/або «переспрямування» їхніх інсерцій у ділянки активного еухроматину. Наслідком є підвищення рівня генетичної варіабельності популяції, що, як вважається, підвищує її шанси пристосовуватися до зміни умов (Чересиз и др., 2008).

Накопичені відомості, на думку деяких авторів (див., наприклад, огляд: Чересиз и др., 2008), свідчать про жорсткий контроль переміщень МГЕ у нормальних фізіологічних умовах факторами клітин-хазяїв і вкладаються у рамки висловленої Б. МакКлінток гіпотези про індукцію переміщень МГЕ як найважливіше джерело генетичної варіабельності клітин-хазяїв в умовах стресу. Показано активацію або, навпроти, пригнічення переміщень екаріотних МГЕ широким спектром стресових чинників. При цьому часто-густо структурно близькі транспозони дають протилежну відповідь на дію одного і того самого чинника. Тому потрібно обережно інтерпретувати ті дані, які не прив'язані до конкретних систем стресової відповіді клітини-хазяїна до уточнення їх молекулярних механізмів.

На сьогодні вже відомо, що індукувати масові переміщення МГЕ і таким чином індукувати і підтримувати процеси нестабільності геному як

генеративних, так і соматичних клітин можуть різні чинники. Найсильніший вплив на індукцію транспозицій виявляють внутрішньогеномні процеси:

- гібридний дисгенез;
- ізогенізація;
- інбридинг;
- аутбридинг.

7.1. Вибух транспозицій у геномах гібридів

Внаслідок успішної віддаленої гібридизації, особливо між рослинами різних видів, утворюються нові геноми, які є зручною експериментальною моделлю еволюційної геноміки. Злиття двох різних геномів в одній клітині приводить до значної реконфігурації хроматину і часто супроводжується геномними дуплікаціями і хромосомними перебудовами. Ці великі геномні модифікації запускають каскади нових регуляторних взаємодій і типів експресії генів.

Одним із найцікавіших наслідків гібридизації як «геномного шоку» є мобілізація і транспозиція мобільних генетичних елементів, що було прогнозовано відкривачем самої транспозиції — Барбарою МакКлінток, а потім описано у низці конкретних досліджень (детальніше див., наприклад: Michalak, 2009). Враховуючи, що мобільні елементи складають велику частку евкаріотних геномів (яка нерідко перевищує 50% їх вмісту), їх динаміка у гібридних геномах має важливе значення для розуміння еволюції геномів. Розглянемо це на одному з типових прикладів, де описано вибух транспозицій МГЕ у геномах гібридних соняшників.

У трьох видів соняшнику: *Helianthus anomalus*, *H. deserticola* та *H. paradoxus* було встановлено суттєву індукцію МГЕ, яка відбувалася як наслідок гібридизації (Ungerer et al., 2006). Усі три види є гібридами двох прашурних видів — *H. annuus* та *H. petiolaris*. Часто гібридизація, що веде до виникнення нового рослинного виду, пов'язана із геномними дуплікаціями (алополіплоїдизацією). Однак у випадку соняшнику це не так, оскільки всі п'ять видів є диплоїдами з однаковим числом хромосом ($2n=34$), незважаючи на те, що три види — похідні гібридів, мають геноми, щонайменше на 50% більші за такі їхніх батьківських видів. Встановлено, що зрос-

На цей процес впливають також різні хімічні сполуки і фізичні чинники (низькі і високі температури, гамма-радіація та ін.) (див. огляд: Юрченко и др., 2011), а також різні інфекції, різкі зміни умов існування, введення клітин і тканин у культуру *in vitro* тощо. Розглянемо окремо вплив деяких із таких чинників на індукцію переміщень мобільних генетичних елементів.

тання розміру геному у гібридів може бути частково зумовлене проліферацією послідовностей *Ty3/gypsy*-подібних LTR-вмісних ретротранспозонів (Ungerer et al., 2006).

Пізніше у гібридів соняшнику було вивчено іншу велику надродину LTR-вмісних ретротранспозонів — групу *Ty1/copia*-подібних елементів і встановлено її відносну багаточисленність (Kawakami et al., 2010). *Ty3/gypsy*-подібні та *Ty1/copia*-подібні надродини відрізняються, головним чином, порядком білкових доменів у *pol*-ділянці, що містить гени, необхідні для синтезу кДНК та інтеграції кДНК у хромосоми хазяїна (Kumar, Bennetzen, 1999). Автори показали, що *Ty1/copia*-подібні ретротранспозони також зазнають вибуху транспозицій у геномах гібридів соняшнику, хоча і менш інтенсивного порівняно з *Ty3/gypsy*-подібними МГЕ. На відміну від *Ty3/gypsy*-подібних МГЕ, вибух *Ty1/copia*-подібних транспозонів відрізнявся у різних гібридів і був найбільш вираженим у *H. paradoxus*, що є видом, який трапляється в солоній воді (*H. anomalus* та *H. deserticola* зростають в умовах, близьких до умов пустелі). Хоча чинники зовнішнього стресу можуть впливати на дерепресію МГЕ, автори припускають, що у вивченому ними випадку зв'язок «умови довкілля — частота транспозицій» є чисто випадковим (Kawakami et al., 2010).

З метою встановлення часу, коли гібридний вид зазнав вибуху транспозицій, автори сиквенували пул ПЛР-ампліконів від гібриду і батьківських видів, що являли собою *Ty1/copia*-подібні послідовності. Послідовності вивчених п'яти таксонів виявлено також в інших видів рослин, що свідчить про те, що ці *Ty1/copia*-подібні генеалогічні лінії є древніми і передують появі групи гібридів соняшнику. Однак більшість (70%) по-

слідовностей, що лежать в основі вибуху МГЕ, виникли від однієї генеалогічної лінії елементів, і це говорить про порівняно недавній процес їх проліферації.

Це дослідження, на думку П. Міхалак (Michalak, 2009), ставить низку суттєвих питань для майбутнього вивчення. Зокрема, чи дерепресуються ці ретроелементи також у щойно створених синтетичних гібридів між *H. annuus* та *H. petiolaris*? Чи вивільняє гібридизація також інші типи мобільних елементів? Який молекулярний механізм дерепресії в усіх випадках? Корисну інформацію може надати порівняння рівнів цілогоеномного метилювання батьківських і гібридних видів *Helianthus*, оскільки саме метилювання ДНК розгортається як частина геномної «імунної» системи проти мобільних елементів. Тим паче, що вже відомо, що гібридизація змінює метилювання ДНК у синтетичних алотетраплоїдів *Arabidopsis thaliana* × *A. arenosa* (Madlung et al., 2002), диплоїдів *Solanum tuberosum* × *S. kurtzianum* (Marfil et al., 2006), синтетичних гібридів пшениці *Triticum aestivum* (Ozkan et al., 2001) тощо.

Оскільки мобілізація і проліферація мобільних елементів, зумовлені гібридизацією, є широко розповсюдженими у рослин, припускається, що наступні гібридні дуплікації геному (алополіплоїдизація), що мають місце у багатьох рослинних таксонах, слугують захисною реакцією на шкідливий вплив мобілізації і проліферації МГЕ. Можливо, геноми із «зайвими» генними дуплікатами більше здатні до реактивації мобільних елементів (Michalak, 2010).

Алополіплоїдія — добре відомий шлях видоутворення у рослин, який полягає у дуплікації міжвидового гібридного геному. Однак еволюція двох дуплікованих батьківських геномів (тобто гомеологічних субгеномів) в алополіплоїда у більшості випадків залишається неясною через відсутність інформації про початковий стан гібридного геному. У більшості природних поліплоїдів з часу процесу гібридизації батьківські види еволюціонували чи й вимерли. *Spartina anglica* С.Е. Hubard (Poaceae) — один з небагатьох добре відомих алополіплоїдів, що виник недавно. *Spartina anglica* виник близько 1890 р. у південній Англії (Southampton Water) після гібридизації між місцевим *S. maritime* Fernald

($2n = 60$) та інтродукованим зі сходу Північної Америки *S. alterniflora* Loiseleur ($2n = 62$). Хромосомне подвоєння у стерильного гібриду (*Spartina* × *townsendii*) дало початок новому алоплоїдному виду ($2n = 120, 122$ та 124). Цей вид — фертильна, багаторічна рослина, що активно колонізувала соляні болота і дельти річок Британії і Франції, розпочинаючи з 1890 та 1906 рр. відповідно. Цей кореневищний вид характеризується значною насіннєвою продукцією і сильним латеральним клональним ростом. Як молодий вид (віком менше ніж 150 років) *S. anglica* є особливо зручною моделлю для вивчення еволюції алополіплоїдного геному, оскільки його батьківські види надійно ідентифіковані і дожили до наших днів.

Тому досить цікавими є результати дослідження активації ретротранспозонів батьківських видів у популяціях цього порівняно молодого алополіплоїдного виду *Spartina anglica*, що наведені у роботі (Baumel et al., 2002). Автори вивчили еволюційні зміни, що супроводжують стабілізацію цього виду. Оскільки алополіплоїдія є геномним шоком, що викликає інсерційну активність ретроелементів, вивчали, чи активуються ретротранспозони батьківських видів у геномі *S. anglica*. Для цієї мети використовували методи IRAP-аналізу, які є методами, що ґрунтуються на багатолокусній ПЛР, яка виявляє процеси інтеграції ретротранспозона у геном. Виявили, що вивчені популяції склалися здебільшого з одного великого багатолокусного генотипу, ідентичного першому поколінню гібрида *S. × townsendii*. У молодому алополіплоїдному геномі траплялося кілька нових інтеграційних сайтів. У алополіплоїда також виявили чітку адитивність батьківських субгеномів. Ці два важливі факти, на думку дослідників, вказують на те, що геном *S. anglica* не зазнав великих змін з часу його формування (Baumel et al., 2002). Це вступає у протиріччя з раніше отриманими численними даними про швидкі структурні зміни геному в експериментально ресинтезованих алополіплоїдів (див., наприклад: Грант, 1984, 1991).

Очевидно, що гібридні генетичні дисфункції зростають не лише внаслідок дивергенції повторів несумісних алелей, але й також є результатом великого різноманіття механізмів, пов'язаних із підтриманням цілісності хроматину. Зокрема, гі-

бридизація у рослин і тварин порушує характер метилювання ДНК й імпринтингу. Ці епігенетичні зміни можуть бути пов'язані з транскрипційною активацією і мобілізацією рухомих генетичних елементів у гібридів (Michalak, 2009).

Наразі стає зрозумілим, що неможливо розглядати роль транспозонів за гібридного дисгенезису окремо від епігенетичних механізмів і шляхів, у яких задіяні малі РНК. Так, встановлено, що активація ретроелементів у гібридів від міжвидового схрещування зумовлена суттєвим недометилюванням ДНК, що узгоджується із уявленням про метилювання як захисну систему хазяїна проти проліферації мобільних елементів. Малі РНК, такі як siРНК та piРНК, очевидно, розвивалися головним чином як засоби репресії МГЕ. Складність взаємодій додатково посилюється тим, що некодуючі малі РНК є активними гравцями епігенетичної регуляції, можливо, забезпечуючи сиквент-специфічну зону контакту між послідовністю ДНК і її епігенетичним станом. Так, встановлено, що у дрозофіли Piwi сприяє еухроматиновим гістонним модифікаціям і транскрипції piРНК у субтеломерному гетерохроматині (Yin, Lin, 2007).

Модель несумісності Добжанського – Мюллера припускає, що гібридні дисфункції є результатом негативних епістатичних взаємодій між алелями, що дивергували в різних популяціях чи видах. Josefsson et al. (2006) запропонували

«DMI-розширення» — «дозозалежну індукцію» до моделі кількісних взаємодій між материнськими і батьківськими факторами і пояснили дозову чутливість, яку вони спостерігали у гібридів арабідопсиса. Ця модель припускає, що чоловічі і жіночі клітини відрізняються за кількістю регуляторних і цільових сайтів і що жіночі гамети мають доставляти достатню кількість факторів репресії, щоб наситити сайти зв'язування, що походять від чоловічих гамет. Якщо кількість недостатня, то і материнські, і батьківські (чоловічі) цільові сайти уникнуть сайленсування. Так, якщо має місце диференціальний розподіл материнських малих РНК між видами або якщо ці малі РНК відрізняються за своєю здатністю супресувати свої мішені, то проявлятимуться дерепресія мобільних елементів чи інші порушення підтримання цілісності хроматину. Ця модель дозволяє робити нові передбачення, що піддаються перевірці. Наприклад, материнські постзиготичні ефекти мають супроводжуватися відмінностями у материнському внеску транскриптів. Якщо у гібридів пошкоджено piРНК-шлях, це має приводити до дерепресії мобільних елементів. Якщо ж ці ефекти є дозозалежними, тоді підвищений материнський внесок до зиготи має приводити до повної чи часткової супресії гібридних дисфункцій, що і спостерігали в арабідопсиса (деталі і посилення див.: Michalak, 2009).

7.2. Генотоксичний стрес і мобілізація транспозонів

Ще однією формою клітинного стресу, для якого була показана участь в індукції багатьох МГЕ, що належить до різних родин і навіть класів, є генотоксичний стрес, який призводить до появи різних форм пошкоджень ДНК під дією зовнішніх або клітинних факторів. Гіпотеза про те, що транспозони є джерелом геномної нестабільності і, у свою чергу, генотоксичний стрес може сприяти їх мобілізації, була висловлена Б. МакКлінтоком. Її експерименти були пов'язані з вивченням варіацій фенотипу за самозапиленням рослин кукурудзи, отриманих схрещуванням двох батьків, кожен з яких ніс у своєму геномі хромосому з кінцевою транслокацією. Розриви хромосом у кожного з батьків сталися в анафазі мейозу, і в подальшому кожна з аберантних

хромосом проходила через серію хромосомних пошкоджень за типом розрив — злиття — міст у декількох послідовних анафазах мітозу за розвитку чоловічого та жіночого гаметофітів (McClintock, 1984). Стресовий фактор, який викликав переміщення деяких мобільних генетичних елементів і, завдяки цьому, варіацію забарвлення зерен кукурудзи — дволанцюгові розриви ДНК, у сучасній літературі однозначно був би визначений як генотоксичний стрес. Пізніше, використовуючи цілу низку біотичних і абіотичних стресових чинників, включаючи УФ-світло та γ -випромінювання, Б. МакКлінток та інші дослідники феномена генетичної нестабільності у кукурудзи неодноразово спостерігали появу зерен з варіацією забарвлення, пов'язаною

з переміщеннями ДНК-транспозонів (Wessler, 1996).

На сьогодні відома низка чинників фізичної природи, хімічних речовин та природних процесів, здатних призводити до пошкоджень ДНК, серед яких УФ і рентгенівське випромінювання, велика кількість фармакологічних препаратів і ксенобіотиків, клітинний поділ та багато інших факторів. Пошкодження ДНК різними агентами мають різну структуру і репаруються різними клітинними механізмами. Переміщення МГЕ, так само як і окислювальний стрес, веде до подвійних розривів ДНК (DSB), які можуть усуватися репарацією зі з'єднанням негомологічних кінців (non-homologous end joining — NHEJ). Пошкодження основ нуклеотидів з утворенням димерів індукуються УФ-спектром випромінювання, в тому числі і за довгострокового перебування під прямим сонячним світлом, і репаруються за допомогою ексцизиї основ. Зупинка реплікаційної вилки в клітинах, що діляться, призводить до пошкоджень ДНК, які є субстра-

тами для гомологічної рекомбінації. Подвійні розриви ДНК, які найчастіше пов'язані з переміщеннями МГЕ, являють собою гостру форму генотоксичного стресу, що загрожує цілісності геному, активує пункти контролю клітинного циклу (cell cycle checkpoints) і нерідко веде до загибелі клітини (Farkash, Prak, 2006).

Продемонстровано активацію низки МГЕ генотоксичними агентами та участь клітинних факторів репарації в їх переміщенні, приклади яких наведено в огляді (Чересиз и др., 2008).

У бактерій репарація пошкоджень ДНК проходить у результаті активації системи SOS-відповіді на генотоксичний стрес. Для евкаріотів подібна система ще не описана, але припускається існування таких механізмів у рослин (Burr, Burr, 1988), і є свідчення наявності її в клітинах евкаріотів у культурі *in vitro*, яку запропоновано називати VAMOS (Variation Modulation System) — система модуляції варіабельності (Bregliano et al., 1995; Capu et al., 2000).

7.3. Активація МГЕ у культурі клітин і тканин

Культивування клітин евкаріотів *in vitro* також може бути стресовим чинником, що визначає поведінку МГЕ, які містяться в геномі цих клітин. Розглянемо детальніше активацію транспозонів різних родин за умов культивування *in vitro*.

В умовах культури тканин було встановлено активацію ДНК-транспозонів *Ac* і *Spm* кукурудзи (Peschke et al., 1987; Peschke, Phillips, 1991), ретротранспозонів *Tnt1* (Grandbastien et al., 1989) і *Tto1* (Hirochika, 1993) тютюну, *Tos17* (Hirochika et al., 1996; Liu et al., 2004) і *mPing* (Kikuchi et al., 2003) рису, ДНК-транспозона *Isaac* у сорго (Ельконин и др., 2010) тощо. При цьому в потомстві рослин-регенерантів у деяких випадках виявляли широкий спектр мутацій, зумовлених активністю МГЕ.

Вперше переміщення ДНК-транспозонів *Activator (Ac)* і *Suppressor-mutator (Spm)* у результаті культивування тканин *in vitro* було виявлено у рослин-регенерантів кукурудзи, виявлялися вони у вигляді рідкісних плямистих зернівок (Peschke et al., 1987). До речі, саме подібний мозаїчний фенотип було виявлено Б. МакКлінток при відкритті існування «рухомих» генів.

Перший виявлений *copia*-подібний ретротранспозон тютюну *Tnt1* («транспозон *Nicotiana tabacum*») було ідентифіковано за його інсерцією в ген нітратредуктази, що відбулася під час культивування протопластів тютюну. Оскільки ретротранспозони переміщуються за допомогою РНК-посередника, дослідники припустили, що якийсь із чинників культивування активував транскрипцію *Tnt1* (Grandbastien, 1998). Пізніше було встановлено, що для *Tnt1* притаманна органоспецифічна експресія, яка обмежує активність МГЕ тканинами кореня, але несподівано у ході отримання культури протопластів відбулася його індукція. Вважається, що причиною її став грибовий екстракт, який використовується для лізису клітинної стінки і є індуктором захисної відповіді рослин (так звана гіперчутлива відповідь). Одночасно цей екстракт активував промотор, що міститься на 5'-кінці *Tnt1*, який контролюється сигналами, що запускали захисну відповідь рослин (Wessler, 1996).

У подальшому за пошуку ретротранспозонів типу *copia* на основі ПЛР з використанням пари праймерів до консервативних ділянок гена

зворотної транскриптази були відкриті ще два ретротранспозони тютюну — *Tto1* і *Tto2*. Спочатку їхні транскрипти було виявлено в культурі тканин, але не в клітинах рослини *in vivo*. Ця транскрипція привела до значного збільшення кількості копій МГЕ в культурі клітин і регенованих з них рослин.

Слід підкреслити, що ретротранспозон тютюну *Tto1* — це один саме з тих ретротранспозонів, що активується у культурі тканин. Регулюється він на транскрипційному рівні. Виявлено, що експресія елемента *Tto1* індукується у листках тютюну стресом, викликаним пораненням. Додаток екзогенного метилжасмонату — потенційного індуктора генів, що індукуються у рослин пораненням, посилює експресію РНК *Tto1*. Ця РНК виявляється протягом 2–4 год після поранення (надрізу тканини), і її підвищений рівень зберігається впродовж наступних 48 год. Рівень експресії РНК *Tto1* вищий у молодих листків порівняно зі зрілими, що свідчить про роль фізіологічних чинників регуляції відповіді мобільного елемента *Tto1* на рановий стимул. Виявлена експресія конструкції, що містить LTR *Tto1* і ген β -глюкуронідази (LTR:GUS), свідчить, що *Tto1* містить цис-регуляторні ділянки, які відповідають за рановий стимул і реакцію на метилжасмонат (Takeda et al., 1998).

Подібним шляхом було ідентифіковано і перші активні ретротранспозони рису — *Tos10*, *Tos17* і *Tos19* (від — транспозон *Oryza sativa*), транскрипти яких також виявляли лише в культурі клітин, а кількість копій у геномі рослин-регенерантів зростала.

Особливий випадок представляє пролонгована транскрипція *Tos17*, яка постійно відбувається впродовж вирощування клітин і призводить до накопичення копій МГЕ за тривалого культивування *in vitro*. Таким чином, *Tos17* представляє нову парадигму активації МГЕ в культурі клітин, що відрізняється від одномоментної індукції *Tnt1* або МГЕ дрозофіли за використання процедури переводу клітин у культуру. Крім того, перманентний характер активності *Tos17* вказує на один із механізмів, що лежить в основі вищої частоти прояву соматональних варіацій у рослин, отриманих за регенерації із довгострокових культур клітин порівняно з короткотривалими (Wessler, 1996).

Окрім наведених вище прикладів продуктивної мобілізації МГЕ рослин у культурі тканин, слід відзначити досить часту детекцію транскриптів низки ретротранспозонів за відсутності даних про недавні переміщення відповідних МГЕ. Протопласт-специфічні РНК-последовності ретротранспозонів, які належать до родини *copia* — *Prt1^c*, *Prt3^c*, *Prt4^c*, *Prt5^c* та *Prt6^c*, знайдено у картоплі. До тієї самої родини МГЕ належить елемент *Bare-1* ячменю, який експресується в калюсних культурах і в отриманих із листків протопластах. Транскрипція *SINE*-елемента *SI* у калюсних культурах сої доповнює ці дані і свідчить, що всі основні класи МГЕ можуть активуватися в культурі тканин (Grandbastien, 1998).

Хоча активація в умовах культури *in vitro* є загальною рисою рослинних МГЕ, не слід вважати, що всі подібні події є варіаціями єдиного механізму відповіді рослинних МГЕ на перебування у культурі клітин. Наприклад, транспозиція *Tnt1A* в ген нітратредуктази була виявлена в рослинах, регенованих із культури клітин, отриманої з протопластів. Однак транскрипції *Tnt1A* в суспензійних культурах клітин не спостерігали, незважаючи на деяке збільшення числа копій цього транспозона у таких культурах. На противагу цьому, в культурі клітин тютюну були виявлені як експресія, так і транспозиції *Tto1*, *Tos10* і *Tos17*. Експресія *Tto1* ще більше посилювалася за ізоляції протопластів, тоді як для *Tos17* нічого подібного не спостерігали. Диференціальну експресію різних МГЕ різними умовами *in vitro* можна пояснити тим, що регуляція як мінімум двох каскадів генів — системи захисту і системи клітинного поділу — може по-різному модулюватися в різних клітинних культурах, і рослинні МГЕ, що перебувають під контролем чинників однієї з цих систем або під подвійним контролем, будуть по-різному поводитися в умовах *in vitro* (Grandbastien, 1998).

Слід відзначити, що і до сьогодні культура тканин є джерелом все нових і нових МГЕ. Зокрема, нещодавно був відкритий новий *hAT*-транспозон у культурі тканин кукурудзи, так званий *tissue culture Up-regulated (TCUP)* — транспозон, який транскрибується у відповідь на обробку 5-аза-2-дезокситидином (деметилуювальним агентом). Вважається, що *TCUP* — це

транспозони, які є особливо чутливими до стресових чинників довкілля, зокрема до умов культури тканин, а епігенетичні зміни (наприклад,

деметилювання) посилюють реакцію геному на стрес за клонального розмноження рослин (Smith et al., 2012).

7.4. Вплив температури

Залежність переміщень транспозонів від температури найкраще показана для дрозофіли (Чересиз и др., 2008; Козерецкая, 2010), відома така залежність і для МГЕ інших класів еукаріотів. Наприклад, присутність у довгих інвертованих повторах та в середині самої послідовності транспозона *DIRS-1*, знайденого у дріжджів *Dictyostelium*, промоторів, подібних до консенсусних промоторів генів теплового шоку дрозофіли, робить його експресію залежною від температури довкілля. Здатність промоторів *DIRS-1* індукувати синтез РНК у дріжджів вказує на консерватизм механізму теплового шоку в еукаріотів (Zuker et al., 1984).

Підвищення температури від 22 °С (фізіологічна температура для дріжджів) до 30 °С знижує втричі транспозиційну активність ретротранспозона дріжджів *Ty3*. Подальший підйом температури всього до 33 °С призводить до надзвичайно різкого зниження числа транспозицій (ще в 370 разів), а при 37 °С транспозиції *Ty3*, як й іншого ретротранспозона дріжджів *Ty1*, не спостерігали зовсім. На прикладі кукурудзи встановлено, що холодний шок активує ретротранспозони, механізмом чого є сильне гіпометилювання ДНК клітин рослини (Casacuberta, Santiago, 2003). Подібне явище описане і для риків *Antirrhinum* (Lukens, Zhan, 2007).

7.5. Вплив інфекцій вірусного, бактеріального і грибового походження

У рослин індукція переміщень показана за бактеріальних та вірусних інфекцій. Промотор першого з виявлених активних транспозонів рослин — *Tnt1*, *copia*-подібного ретротранспозона тютюну, індукується низкою біотичних та абіотичних чинників, серед яких інфекції вірусного, бактеріального і грибового походження (Grandbastien, 1998), які активують систему захисту рослинної клітини, що також називається системою надчутливої відповіді (Wessler, 1996). Поряд з іншими чинниками вірусні атаки є причиною індукції іншого транспозона тютю-

ну — *Tto1*. Для цих двох транспозонів виявлено зв'язок їх індукції із захисною відповіддю рослинної клітини. Поки невідомо, чи існує такий зв'язок для інших МГЕ. Проте транскрипти ще одного ретротранспозона тютюну — *Tto5* — виявляються у тканинах, заражених вірусом. Транспозиція *Bs1*-ретроелемента кукурудзи в ген алкогольдегідрогенази також встановлена після вірусної інфекції, хоча безпосереднього зв'язку між мобілізацією МГЕ та інфекцією не встановлено (Johns et al., 1985; Grandbastien, 1998; див. також розділ 3.9).

7.6. Яровизація рослин і транспозони

Для рослин, як прикріплених автотрофів, дуже важливим є своєчасне відчуття зовнішніх змін та ініціювання у відповідь зміни генної експресії. Реакція може бути короткотерміною (наприклад, синтез захисних молекул проти стресу) і довготерміною (наприклад, фенотипова пластичність зі зміною програм розвитку), оскільки тканини рослин, як правило, мають ту перевагу, що у них відсутній жорсткий план розвитку. Епігенетичні системи мають бути частиною естафети від самого початку — відчуття (реєстрації) зміни

в навколишньому середовищі до зміни в експресії геномів. Здатність цих систем змінюватися швидко і зворотно, зберігаючи при цьому потенціал до збереження стабільної «пам'яті» впродовж багатьох клітинних поділів, пояснює гнучкість реакції рослин на зовнішнє середовище. Можливо, тому епігенетичні системи рослин є складними і містять деякі унікальні складові, яких немає в інших еукаріотів (детальніше див.: Кунах, 2011, 2011a).

Одним із прикладів епігенетичної реакції рослин на зовнішні зміни є регуляція часу цві-

тіння (тобто ініціювання розвитку цвітіння) у *Arabidopsis thaliana* у відповідь на тривалі періоди низьких температур, відомі як яровизація. Деякі генотипи цього виду при підготовці до цвітіння потребують тривалого періоду низьких температур, поводячи себе як озимі однорічники. Ця потреба в яровизації блокує цвітіння, поки не настане сприятлива весняна погода. Інші генотипи для індукції цвітіння не потребують холодової обробки. Значні генетичні відмінності між цими генотипами виявлено у двох локусах — *FRIGIDA (FRI)* та *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. Молекулярні дослідження показали, що *FLC* діє як репресор цвітіння, а *FRI* підвищує кількість *FLC*, тому ці два білки діють синергічно, блокуючи цвітіння. Яким чином обробка холодом блокує цю репресію? Обробка холодом, очевидно, «реєструється і зберігається рослиною», оскільки коли температура зростає і мітотичні поділи клітин продовжуються, пам'ять про обробку холодом ще зберігається, як і здатність до цвітіння. Наразі показано, що зберігання цієї епігенетичної інформації є вирішальним для реакції на яровизацію. За обробки холодом впродовж значного проміжку часу хроматин у локусі *FLC* змінюється, при цьому зменшується ацетилювання гістонів у H3 K9 та K14 сайтах і зростає метилювання у H3 K9 та K27 сайтах, що зумовлює формування гетерохроматину (Bastow et al., 2004; Sung, Amasino, 2004). Є відомості, що цей локус має зменшене триметилювання H3 K4, а це є міткою транскрипційної активації після яровизації (Amasino, 2004). З'ясувалося, що кінцевий результат тривалої обробки холодом — це формування гетерохроматину і сайленсінг *FLC*, що інгібує його як основний репресор цвітіння.

Для нас важливим і цікавим є те, що експресія алелів *FLC* із мобільними елементами, вставленими в інтрон, знижується і рослина швидко цвіте без яровизації, оскільки присутність транспозона індукує стабільне формування гетерохроматину в локусі, імітуючи індукований яровизацією гетерохроматин (Amasino, 2004).

Робота з вивчення яровизації надала чіткий приклад рослин, що набули і використовують інформацію з навколишнього середовища, при цьому епігенетична інформація не стає спадково стабільною. У яровизованих рослин епіге-

нетична пам'ять про холод передається через мітоз, але не мейоз — у потомства від оброблених холодом рослин час цвітіння не змінений. За репродуктивного розвитку має існувати система, яка перевстановлює цей специфічний гетерохроматиновий стан після того, як сигнал до ініціації цвітіння було передано. І дійсно, для *FLC* не відомі стабільні епімутації/епіалелі, які позначаються на часі цвітіння, є лише варіанти послідовностей, зокрема наявність/відсутність транспозонових вставок. Чому ж цей особливий гетерохроматиновий стан перевстановлюється так ефективно? Одна з причин полягає в тому, що *FLC*-локус є частиною домену, відповідального за яровизацію, і він може мати свої власні унікальні хроматинові мітки. Показано, що на *FLC* та сусідній локус (з невідомою функцією) координовано впливає яровизація (Finnegan et al., 2004). При цьому трансгени, вставлені у цю ділянку, набувають яровизаційної реактивності, і якщо саму послідовність цієї ділянки перенести в іншу частину геному, вона зберігає свою яровизаційну реактивність і може позначатися на сусідній послідовності. У цілому це говорить про те, що ділянка *FLC* є вирішальною для набуття особливого гетерохроматинового інформаційного стану, який згодом може розповсюджуватися за її межі до сусідньої послідовності. Подальший аналіз властивостей цього домену з метою вивчення, чому і як він потім втрачає цю гетерохроматинову мітку і яка роль у цих процесах транспозонів, є надзвичайно важливим.

Розглянемо таке цікаве явище, як спонтанне виникнення ярих рослин у популяціях деяких озимих злакових культур.

Відомо, що швидкість і тип розвитку рослин визначаються складною взаємодією як їхніх генетичних систем, так і генотипів з ґрунтово-кліматичними умовами зростання. Вияв цих властивостей у ярих пшениць, жита, тритикале багато в чому залежить від системи домінантних генів, які визначають реакцію рослин на яровизацію (еволюцію цих генів, механізми їх дії і відповідні посилання наведено у роботі (Степочкин, Артемова, 2008)).

Спонтанні ярі мутації виникають рідше, ніж індуковані мутанти (Рутц, 2005). Проте дослідження тритикале показали, що умови, за яких

формувалося насіння вихідної популяції, і умови, в яких вегетували рослини, що з нього вирости, можуть значно змінювати частоту появи ярих рослин. Зокрема, були виявлені кореляції між частотою виникнення ярих рослин у популяціях озимих форм тритикале і різними факторами довкілля в умовах Сибіру — температурою повітря у червні, кількістю опадів у липні. На це явище впливали навіть терміни зберігання насіння (Степочкин, Артемова, 2008).

Одним із механізмів спонтанної появи ярих рослин, на думку авторів (Степочкин, Артемова, 2008), може бути участь у спадкових змінах рослин їхніх мобільних генетичних елементів, можливо, ДНК-транспозонів, які розміщені безпосередньо поблизу або саме у регуляторній ділянці гена *Vrn1* (головний ген, що виробляє транскрипт, який переключає розвиток рослин від вегетативного до генеративного). Активність однієї або кількох копій мобільних елементів поблизу регуляторної частини гена могла привести до утворення делеції сайту зв'язування репресора у промоторній ділянці внаслідок низки можливих механізмів: вирізання/вбудовування МГЕ, рекомбінації між копіями МГЕ або утворення локальних пошкоджень ДНК (у першу чергу дволанцюгових розривів) з наступним утворенням делеції у ході роботи систем клітинної репарації. Домінантна депресивна алель сайту зв'язування репресора у гені *Vrn1* може виникнути і в результаті виникнення великої за розміром інверсії між двома копіями МГЕ, впродовж якої сайт зв'язування репресора «переноситься» на суттєву відстань від ділянки початку транскрипції гена, або навіть незначної інверсії, яка роз'єднує сайт зв'язування і початок транскрипції за рахунок упровадження між ними бар'єрної/інсуляторної послідовності (яка обмежує цис-взаємодії між регуляторними ділянками, що містяться по обидва боки від неї).

Утворення дерепресованої домінантної алелі *Vrn1* внаслідок активності МГЕ може відбуватися постійно з частотою, що відповідає характерній для даного виду частоті МГЕ-опосередкованих подій. За відсутності тиску специфічних чинників добору (температурний режим, фотоперіодизм) виникнення ярого фенотипу, відповідного такій домінантній алелі, не буде викликати зрос-

тання ступеня пристосування його носіїв, і такі алелі з часом будуть елімінуватись із популяції. Однак у популяціях помірного кліматичного поясу ярий фенотип адаптується до сезонних змін клімату, і домінантні *Vrn1* алелі, з'явившись одного разу, будуть мати селективну перевагу і зберігатись у високій концентрації.

Екологічні чинники у таких популяціях можуть носити стресовий характер, а вплив таких факторів на геном веде до мобілізації геномних МГЕ. Індукція експресії та/або переміщення МГЕ широким спектром стресових чинників, як геномних, так і довкілля, особливо характерна для рослин. У низку таких чинників, як ми вже відзначали вище, входять вірусні, бактеріальні і мікозні інфекції, культивування рослинних клітин *in vitro* (отримання калюсних культур, ізоляція протопласта тощо), обробка низкою хімічних препаратів, поранення, а також кліматичні чинники, зокрема холодострес.

Індукована стресом активація рослинних ретротранспозонів пов'язується з наявністю в їх промоторній ділянці (5'-кінцевий довгий повтор) *cis*-регуляторних послідовностей, схожих з регуляторними послідовностями генів системи стресової відповіді рослин, здатних відгукуватись на різні стимули (Grandbastien, 1998). Альтернативний шлях стресової активації МГЕ рослин містить у собі механізм релаксації геномного сайленсингу під дією стресу, що продемонстровано на прикладі активації ретротранспозонної послідовності *ZmM11* рисового геному, яка викликана сильним деметилуванням локусу, що її містить, під дією холоду (Steward et al., 2002).

На думку П. Г. Стьопочкина і Г. В. Артьомової (2008), у рослинних популяціях озимих злаків помірних широт можна чекати на спалахи мутабільності, пов'язані з активністю МГЕ під впливом екологічних чинників, і підвищену частоту фіксації тих інсерційних алелей, наявність яких буде пов'язана з адаптацією до діючих стресових чинників і буде надавати селективну перевагу їхнім носіям. Видається цілком вірогідним, що згадані вище чинники могли привести до появи делеційних дерепресованих алелей *Vrn1*, які запускають адаптивну генетичну програму, характерну для ярих рослин.

7.7. Молекулярні механізми індукції транспозицій

Зрозуміти закономірності поведінки конкретних МГЕ під дією того чи іншого стресового чинника неможливо без знання молекулярних механізмів, які лежать в основі такої регуляції. Одним із механізмів індукції як ДНК-транспозонів, так і ретроелементів, є підвищений рівень транскрипції, який приводить до підвищених концентрацій функціональних білків МГЕ, необхідних для транспозиції, а у випадку ретротранспозонів — і геномної РНК. Це може, почасти, забезпечуватися наявністю стрес-індукованого промотора, який регулюється клітинними факторами, що беруть участь в індукції стресової відповіді клітин. Так, наявність *hsp*-подібного промотора у мобільних елементів *DIRS-I* у *Dictiostellum*, *copia* і *mariner* у *Drosophila* робить активацію цих МГЕ залежною від низки стресових чинників, які індукують систему білків теплового шоку. Можна припустити, що протеолітичний каскад, який запускається стресом, приводить до звільнення транскрипційних факторів, які необхідні для індукції генів антистресового захисту й одночасно активують ті транспозони, промотори яких містять сайти зв'язування цих транскрипційних факторів (Capy et al., 2000).

У літературі про транспозони неодноразово трапляються відомості про кореляцію індукції генів системи захисту і деяких МГЕ. Так, індукція кількох добре вивчених ретротранспозонів рослин різними стресовими чинниками характеризується складною диференційною регуляцією їх активності, пов'язаною з активністю двох генних каскадів — системи генів стресової відповіді, яка активується після патогенної атаки, і системи генів клітинного поділу і росту. Це добре демонструє мобілізація ретротранспозонів тютюну в культурі протопластів, калюсних і клітинних культур, адже саме гени захисту і клітинного поділу активуються в цих культурах (Grandbastien, 1998). Протопласт-специфічна експресія *Tnt1A*, як показано, в основному викликається обробкою клітин грибовим екстрактом. Крім того, промотор *Tnt1A* активується низкою інших речовин бактеріального походження, саліциловою кислотою, пораненням або вірусною, бактеріальною чи грибовою інфекцією. Подібні індуктори (вірусна інфекція, поранення, са-

ліцилова кислота) характерні і для іншого транспозона тютюну — *Tto1*, вказуючи на зв'язок експресії обох МГЕ з активацією генів системи захисту рослинної клітини. Однак експресія *Tto1*, а не *Tnt1 A*, в суспензійних культурах демонструє різницю в регуляції: *Tto1* може перебувати під подвійним контролем генів захисту і клітинного поділу, як це показано для кількох рослинних генів з протопласт-специфічною експресією. Такі тонкі відмінності у профілях стрес-індукованої активації пов'язують із наявністю в їхній промоторній ділянці (5'-кінцевий довгий повтор) декількох *cis*-регуляторних послідовностей, здатних відгукуватися на різні стимули (Grandbastien, 1998).

У випадку *Tnt1* є три підродина цього МГЕ — *Tnt1A*, *Tnt1B* і *Tnt1C*, які активуються різними стресовими чинниками, що асоційовані із захисними реакціями рослин. Відмінності в їхній транскрипційній регуляції зумовлені наявністю у ділянці U3 їхнього 5'-кінцевого повтору різних *cis*-регуляторних елементів. Пара таких елементів у *Tnt1A* має послідовність, подібну до промоторів генів захисної відповіді рослин (Casacuberta, Santiago, 2003).

Експресія іншого ретротранспозона тютюну, *Tto1*, під час захисної відповіді визначається послідовністю довжиною 13 п.н., яка специфічно зв'язується з різними транскрипційними факторами родини MYB. Один із таких факторів, LBM1, є ідентичним іншому фактору MYB-1, що індукується вірусною інфекцією. Підвищена експресія іншого, NtMYB2, одночасно активує транскрипцію *Tto1* і гена захисної відповіді PAL у тютюну. Крім того, виявлено гомологію між промоторними послідовностями *Tto1* і геном захисної відповіді *Aopr1* у спаржі (Casacuberta, Santiago, 2003).

Викладене свідчить про те, що сумісна індукція захисної відповіді і ретротранспозонів рослин зумовлюється гомологічними промоторами, але не дає відповіді на питання про еволюційну природу цієї гомології. Разом з тим, подібність послідовностей ретротранспозонових промоторів з промоторами захисних генів та існування єдиної системи їх регуляції транскрипційними факторами, очевидно, є результатом конвергентної еволюції.

Одним із найважливіших механізмів, що здатні індукувати переміщення транспозонів у відповідь на стрес, є клітинні механізми репарації, які відповідають за відновлення структури ДНК при подвійних розривах. Більшість МГЕ

викликають подвійні розриви за переміщень і тому залежать від клітинних систем репарації, які забудовують ці розриви, в першу чергу — від системи негомологічної репарації зі з'єднанням кінців ДНК.

7.8. Епігенетичний контроль і місцеспрямування інсерцій як відповідь на екологічні впливи

Більшу частину геномів еукаріотів складають висококопійні мобільні генетичні елементи. Вважається, що вони відіграють ключову роль в еволюції генів і геномів. Одним із невирішених питань лишається те, як геном хазяїна може витримувати вибухи сотень і тисяч вставок, які, очевидно, не такі вже й рідкісні в природі.

Стабільність багатьох транспозонів забезпечує епігенетичний контроль. Наприклад, CpG-метилування є основним механізмом транскрипційного сайленсингу *L1*-елемента, і деметилування 5'-нетрансльованої ділянки цього транспозона буде приводити до його активної транскрипції і ретротранспозиції. Метилування 5'-UTR *L1*-елемента, можливо, опосередковується метил-CpG-зв'язувальним білком 2 (MeCP2), який інгібує ретротранспозицію *L1* в культурі тканин. Оскільки відомо, що окислювальний стрес знижує афінність MeCP2 до ушкодженої метильованої ДНК, то поява ушкоджень ДНК, викликаних таким стресом, поблизу сайту локалізації *L1* приводить до його дерепресії. Ушкодження ДНК можуть мати і глобальний ефект на метилування геномних *L1*-елементів (приклади і посилення див. у огляді: Чересиз и др., 2008).

Ще одним прикладом стресової активації МГЕ, яка залучає механізм релаксації епігенетичного сайленсингу, може бути також індукція переміщень рослинних ретротранспозонів за дії певних стресорних чинників. Зокрема, показано, що холодний шок приводить до дуже сильного гіпометилування ДНК клітин і активації ретротранспозонових послідовностей у кукурудзи (Casacuberta, Santiago, 2003). Подібний механізм деметилування холодним шоком індукуює реактивацію транспозона *Tam3* у локусі *nivea* у ротиків *Antirrhinum majus*. Цей транспозон, який міститься в промоторній ділянці локусу, що кодує фермент, відповідальний за забарвлення квіток, за високих температур є сильно метильованим,

і це зумовлює проявлення білого забарвлення квітки. За низьких температур гіпометилування приводить до високої частоти ексцизій *Tam3* із цього локусу, і з'являються квітки з червоною пігментацією (Lukens, Zhan, 2007).

Відкриття механізму регуляції активності ретротранспозона дріжджів *Ty5*, здатного направляти інсерції цього МГЕ з гетерохроматину в ділянки активного еухроматину і викликати мутації, які можуть мати пристосувальний характер за дефіциту поживних речовин (Dai et al., 2007), підтверджує дані щодо мобілізації «спрямованих» інсерцій *LINE-1*-елемента (Morrish et al., 2007). Це дослідження особливо привертає увагу тим, що крім встановлення самого факту індукції адаптивних мутацій ретротранспозоном *Ty5* у відповідь на екологічний фактор — дефіцит амінокислот, азоту або вуглецю в живильному середовищі — детально описує молекулярний клітинний механізм, який лежить в основі цього явища. Показано, що в С-кінцевій ділянці інтегрази цього транспозона міститься домен, відповідальний за вибір сайту інтеграції (TD, Targeting Domain). Фосфорилування лише однієї амінокислоти S1095 у цьому сайті, яке відбувається за росту клітин дріжджів у нормальних умовах, підвищує зв'язувальність TD-інтегрази з білковим фактором гетерохроматину Sir4p і спрямовує інтеграційний комплекс у гетерохроматин. Зниження рівня фосфорилування TD за несприятливих умов (дефіцит поживних речовин у живильному середовищі) негайно переспрямовує інсерції *Ty5* в еухроматинові ділянки, де активно працюють гени (Dai et al., 2007). Цю роботу було названо найцікавішим дослідженням транспозонів десятиріччя (див. огляд: Чересиз и др., 2008).

У геномі арабідопсиса транспозони сайленсуються метилуванням ДНК, і це метилування може усуватися мутаціями хроматин-

реконструювального гена *DDM1* (Decrease in DNA Methylation1). Мутація *ddm1* індукує різні типи аномалій розвитку шляхом дерепресії транспозонів і повторів. Відомо механізм *ddm1*-індукованого синдрому, що зветься *bonsai* (*bns*). За допомогою аналізу генетичного зчеплення і наступного транскрипційного аналізу ідентифіковано ген, відповідальний за фенотипи *bns*. Ці фенотипи пов'язані зі сайленсуванням гена *APC13* (Anaphase-Promoting Complex13). Сайленсинг гена *BNS* був зумовлений гіперметилуванням ДНК, що контрастує із *ddm1*-індукованим гіпометилуванням в інших геномних ділянках. Це парадоксальне гіперметилування *BNS* відтворювалося індукувалося під час самозапилення мутанта *ddm1* і опосередковувалося LINE-транспозоном, що фланкує ген *BNS* (Saze, Kakutani, 2007). Можливі молекулярні механізми й еволюційне значення опосередкованих транспозоном епігенетичних змін у локусі *BNS*, а також епігенетичні механізми сайленсування експресії і мобільності різних транспозонів детально розглянуто у публікаціях (Saze, Kakutani, 2007; Slotkin, Martienssen, 2007). На прикладі вивчення різних сортів рису було встановлено, що, наприклад, ДНК-транспозони *mPing* збільшують число своїх копій приблизно на 40 на рослину за покоління. За вивчення впливу вставки на експресію генів (проведено високоефективне секвенування 24 окремих рослин і за допомогою порівняльного мікроерей-аналізу визначено вплив вставки на експресію 710 генів)

встановлено, що переважна більшість вставок транспозонів збільшує рівень експресії генів або ж помітно не впливає на неї. Незначний вплив вставок зумовлений тим, що *mPing* уникають екзонів і віддають перевагу вставкам у 5'-фланкуючі послідовності генів (Naito et al., 2009).

Окрім того, було виявлено, що частина *mPing*-вставок приводить до утворення нових регуляторних генних мереж, які перетворюють прилеглі гени у стрес-індуцибельні. Це може підвищувати стійкість рослин, наприклад, до посухи і засолення. Автори вважають, що таким чином у рису й інших самозапилюючих рослин може швидко створюватися генетичне різноманіття в умовах постійно змінюваного довкілля. У цілому ж, дослідники отримали найсучасніші докази існуючих моделей участі мобільних генетичних елементів та інших повторюваних послідовностей у реструктуруванні геному і генній регуляції (деталі і посилання див.: Naito et al., 2009).

Відомі й інші механізми епігенетичної регуляції геному. Один із таких досить цікавих адаптивних механізмів описано на прикладі дріжджів *S. cerevisiae*. Він полягає в ампліфікації генів, кількість продуктів експресії яких потрібно збільшити шляхом утворення кільцевих мікрохромосом за допомогою рекомбінації транспозонів, що розташовані на флангах відповідної ділянки батьківської хромосоми. Кількість таких хромосом у клітині може регулюватися залежно від потреби (детальніше див. розділ 14.3) (Libuda, Winston, 2006).

7.8.1. Динаміка ретротранспозонів ячменю *BARE-1* у різних умовах зростання

Ретротранспозони переміщуються за допомогою реплікативного механізму, що здатен створювати і вставляти дочірні копії у геном, збільшуючи тим самим його розмір. Схильний до помилок характер реплікації ретротранспозонів за допомогою зворотної транскриптази, мутагенний потенціал транспозиційної інтеграції, ефекти накопичення і рекомбінації — усе це разом свідчить про те, що активні ретротранспозони можуть бути основними діючими чинниками геномної диверсифікації у рослин.

Викладені вище дані свідчать про те, що ретротранспозони рослин, тварин і грибів реагують на різні форми стресу. Якщо стресові чинники у навколишньому середовищі варіюють

екогеографічно, то і характер розповсюдженості ретротранспозонів і інсерції їхніх послідовностей можуть варіювати відповідно. Це було доведено на прикладі найближчого дикого прашура культурного ячменю (*Hordeum vulgare*), *Hordeum spontaneum* (Kalendar et al., 2000). Цей вид є зручним для аналізу інсерцій ретротранспозонів і їх ролі у геномі завдяки присутності великої й активної родини ретротранспозонів і наявності добре вивчених диких популяцій рослин, поширених у різних умовах існування. У геномах видів *Hordeum* родина ретротранспозонів *BARE-1* у середньому складає 14×10^3 копій. Представники цієї родини транскрипційно і трансляційно активні, кодують і поліпротеїн, і

сигнали процесингу, які функціонально консервативні. Кількість копій *BARE-1* позитивно корелює як із розміром геному, так і з аридністю умов існування *H. spontaneum*.

Автори (Kalendar et al., 2000) дослідили роль ретротранспозона *BARE-1* у диверсифікації геному в окремих організмів, що зростали в різних місцевостях, — Evolution Canyon, Lower Nahal Oren та Mount Carmel в Ізраїлі. Ця завширшки 400 м ерозійна ущелина, що датується з Пліо-Плейстоценової ери, має схили, які виходять на північ і на південь (NFS та SFS, відповідно) зі спільною геологією, але з мікрокліматами, що різко відрізняються за сонячним опроміненням і аридністю. Біотично NFS є євразійським кліматом, а SFS — афро-азійським із середземноморським контекстом. Досліджували *H. spontaneum* уздовж північно-південного перетину через схили каньйону, щоб довідатися, чи існують локальні зразки регіональних генотипів. У рослин, що зростали в умовах каньйону, визначали число копій *BARE-1* і особливості (патерни) інсерційного поліморфізму, а також сумарний розмір геному особин.

Встановлено, що кількість повномірних копій *BARE-1* у індивідів *H. spontaneum* в Evolution Canyon у місцевості Lower Nahal Oren варіювала від 8,3 до $22,1 \times 10^3$ на гаплоїдний геном. Ця майже трикратна відмінність у кількості повномірних елементів *BARE-1* у особин однієї мікрорегіональності вказує на те, що така родина ретротранспозонів недавно була інсерційно активною.

У всіх особин виявлено надлишок довгих кінцевих повторів (ДКП або LTRs), очевидно solo-повторів. Вони, вірогідно, є результатом внутрішньохромосомної рекомбінації між парами ДКП у межах повномірних мобільних елементів. Надлишок ДКП збільшує кількість елементів *BARE-1*, підтверджуючи, що рекомбінація між елементами геному є адитивною. Отримані авторами результати також підтверджують те, що чим більша кількість solo-LTRs відносно повномірних елементів *BARE-1*, тим меншу частину геному складають *BARE-1*. Це свідчить про те, що варіації у відносних рівнях рекомбінації й інтеграції позначаються на здатності родини ретротранспозонів розповсюджуватись у геномі і що ці варіації можуть спостерігатись у межах

одного виду в одній і тій самій місцевості зростання.

Показано зв'язок між кількістю *BARE-1* і екогеографією місця зростання в Evolution Canyon: виявлено більше копій *BARE-1* і пропорційно менше solo-ДКП у верхніх, сухіших місцях, особливо на верхівці SFS, ніж у нижчих, вологіших місцях. Окрім того, починаючи з 1995 р. Е. Нево зі співробітниками показав зменшення різноманіття видів покритонасінних і збільшення різноманіття алозимної і випадково ампліфікованої поліморфної ДНК вгору по каньйону, і це корелює зі збільшенням стресу вгору по обох схилах, при цьому більш стресовим схилом є SFS (посилання і деталі див.: Kalendar et al., 2000). Крім того, верхні ділянки на кожному схилі зазвичай сухіші навіть під час вологого сезону. Локальні дані на цій одній мікрорегіональності збігаються з даними регіональних спостережень по Ізраїлю: кількість копій *BARE-1* корелює з аридністю у межах ареалу *H. spontaneum*, при цьому обидві групи даних узгоджуються з присутністю у межах промотора *BARE-1* елементів, які реагують на абсцизову кислоту, що характерно для генів, які індукуються водним стресом. Автори вважають, що ці дані свідчать про те, що експресія і розповсюдження елемента *BARE-1* можуть бути стрес-індукованими, а також про те, що чим вище у каньйоні зростає рослина, тим нижчий у неї рівень втрати інтегрованих копій шляхом рекомбінації.

Величезну відмінність між організмами, що ростуть на NFS- і SFS-ділянках Evolution Canyon, які розділені відстанню максимум у 300 м, виявив аналіз поліморфізму REMAP-маркерів. Оскільки REMAP-патерн отримують внаслідок короткорозмірних ампліфікацій (сотні нуклеотидів), відмінності, що виявляються за допомогою REMAP-аналізу, очевидно, генеруються вставкою ретротранспозона *BARE-1* незалежно від інших генетичних змін у вивчених рослин. Враховуючи малий відсоток сумарних копій *BARE-1*, візуалізованих сімома використаними комбінаціями праймерів, ці дані означають, що інтеграційна активність *BARE-1* у каньйоні більша, ніж геномна гомогенізація, яка визначається генним потоком шляхом розповсюдження пилку у здебільшого самозапильного (у середньому на 98,4%) *H. spontaneum* або за допомогою роз-

повсюдження насінням. Маркери REMAP виявляють більше різноманіття генотипів на NFS, ніж серед рослин, що зростають на SFS-схилі (більш стресовому схилі). Це дослідники пояснюють плямистістю умов NFS-схилу, який має відкриті ділянки, оптимальні для *H. spontaneum*, що перериваються затіненими, порослими деревами зонами, на відміну від SFS-схилу. За достатньо високих рівнів інтеграційної активності *BARE-1* рослини, що зростають на цих відмінних «плямах», очевидно, стали генотипово відмінними за характером інсерцій *BARE-1*.

На тлі флюктуацій вмісту інших ретротранспозонів і повторюваної ДНК вставка і збереження повномірних копій *BARE-1* дещо збільшують розмір геному. Автори вважають, що виявлена

інтеграційна активність ретротранспозонів, що веде хай і до не дуже значного, але збільшення розміру геному, є адаптивною. На підтвердження наведено дані про те, що у Середземноморському басейні, регіоні, де процеси росту йдуть переважно у прохолодні, вологі зими, а не сухим літом, відбувається добір на великі геноми. За прохолодних умов ріст ефективніший шляхом збільшення об'єму клітини, а не збільшення кількості клітин, оскільки за низьких температур рівень клітинних поділів зменшується. Тим паче, що у багатьох організмів здатність до збільшення клітинного об'єму прямо корелює з розміром геному і відповідним об'ємом ядра (деталі і посилення див.: Kalendar et al., 2000).

7.9. Активація МГЕ стресовими чинниками. Підсумок

Вище наведено дані про те, що мобільні генетичні елементи можуть активуватися у своїх видах-хазяях за впливу різних стресових чинників. Транскрипційно активні ретротранспозони найчастіше трапляються у родинях з невеликою кількістю копій у геномі. Наприклад, мобільний елемент *Tos17* представлений у геномі рису у кількості від 1 до 5 копій і активується в культурі клітин.

Вважається, що більшість LTR-вмісних ретротранспозонів рослин транскрипційно інактивовані або транскрипційно неактивні у соматичних тканинах, проте активуються на певних етапах розвитку рослин або за умов стресу (Grandbastien, 1998; Takeda et al., 1998). Елементи *Tto1* та *Tnt1* представлені у геномі тютюну у кількості 30 та 100 копій відповідно. Експресія елементів *Tnt1* (*Tnt1C*) і *Tto1* (*Tyl/copia*) тютюну значно підсилюється під дією абіотичного стресу, наприклад саліцилової кислоти, хлорної міді, поранення тощо (Mhiri et al., 1997; Beguiristain et al., 2001). Аналогічне збільшення експресії *Tnt1*-та *Tto1*-елементів спостерігається за дії біотичних стресових факторів, наприклад за введення вірусних, бактеріальних або грибкових патогенів. Активувати ретротранспозицію також можуть і умови довкілля (холод, підвищена температура тощо). Так, різка зміна мікроклімату призводить до зміни кількості копій елемента *BARE-1* у геномі дикого ячменю (Kalendar et al., 2000).

Дані про активацію транскрипції і транспозиції LTR-вмісних ретротранспозонів рослин свідчать про наявність у структурі ретротранспозонів певних регуляторних механізмів, що контролюють експресію елементів у клітині хазяїна. Транскрипція LTR-ретротранспозонів контролюється регуляторними *cis*-елементами, які розміщені в 5'-LTR і в нетрансльованих ділянках. Регуляція транскрипції *Tnt1*- і *Tto1*-елементів добре вивчена і, як показують результати досліджень, строго контролюється. Промотор *Tnt1-A* містить дві різні регуляторні послідовності (коротку паліндромну послідовність B1 і послідовність, яка є тандемним повтором розміром 31 п. н., — B11) в 5'-LTR. Ці послідовності виявляють активний вплив на транскрипцію елемента і мають схожість з послідовностями промоторів рослинних генів, які беруть участь у розвитку відповіді на стрес. Одна з послідовностей (B1) специфічно взаємодіє з білками, які активуються за відповіді організму хазяїна на стрес (Vernhettes et al., 1997). У промоторі елемента *Tto1* визначена регуляторна *cis*-послідовність довжиною 13 п. н., що впливає на експресію *Tto1* під час відповіді на стрес (Takeda et al., 1999). Цікаво, що даний мотив пов'язується з різними транскрипційними факторами MYB, у тому числі з фактором LBM1, схожим з фактором MYB-1, який індукується вірусними інфекціями (Sugimoto et al., 2000). Експресія іншого транскрипційного MYB фактора

NtMYB2 активує транскрипцію елементів *Tto1* і *PAL* у тютюну (Sugimoto et al., 2000). Окрім того, існує гомологія між послідовністю промоторів *Tto1* і гена стресової відповіді спаржі *AoPRI* (Takeda et al., 1999). Усі наведені дані дозволяють припустити, що обидва елементи — *Tnt1* і *Tto1* — активуються у стані стресу, оскільки їхні промотори мають схожість з промоторами рослинних генів, що беруть участь у розвитку відповіді на стрес, і зв'язуються з тими самими транскрипційними факторами, що активуються стресом. Достеменно не відомо, чи існує якась селективна перевага для ретротранспозонів або клітин рослин, здатних до індукції, зумовленої стресом.

Деякі транскрипти ретротранспозонів виявлено також і в нормальних, не стресових, умовах, особливо в мітотично активних тканинах, таких як ембріональні, тканини кінчиків коренів та бруньок. Це явище описане для широко розповсюджених елементів із геному ячменю *BARE-1* і *Sukkula* (Manninen, Shulman, 1993; Kalendar et al., 2004).

Експресія транскрипційно активних ретротранспозонів може підсилюватися за впливу різних стресових чинників. Мобільні генетичні елементи родини *CIRE1* (*Ty1/copia*) транскрипційно активні у клітинах кореня *Citrus sinensis* та не активні у клітинах листків (Rico-Cabanas, Martinez-Izquierdo, 2007). Обробка рослин регуляторами росту і розвитку жасмонатом або ауксином нафтилоцтовою кислотою (НОК) збільшує рівень транскрипції *CIRE1* у листках. Високий рівень транскрипції елементів *CIRE1* у клітинах кореня, вірогідно, пов'язаний з високим вмістом фітогормонів (ауксину) або постійним пошкодженням клітин внаслідок росту кореня, що не характерно для тканин листка. Зміна експресії у відповідь на обробку НОК, вірогідно, зумовлена тим, що НОК бере участь у передачі сигналів у клітині під час відповіді на стрес. Однакова зміна транскрипційної активності *CIRE1*-елементів на різні зовнішні дії свідчить про те, що *trans*-чинники у промоторній ділянці таких елементів однаково реагують на різні стимули (Rico-Cabanas, Martinez-Izquierdo, 2007). Експресія *FaREL Ty1/copia*-ретротранспозона з геному *Fragaria spp.* у тканинах листка також активується під дією екзогенних фітогормонів (He et al., 2010). За вивчення активації транспозиції іншого активного *Ty1/copia*-ретротранспозона

OARE-1 у геномі вівса за дії абіотичних чинників патерн зміни експресії був схожий з патерном гена *PAL* (Phenylalanine Ammonia Lyase). Окрім того, *OARE-1* активується у результаті інфікування грибом *Puccinia coronata* (Kimura et al., 2001). Показано, що на експресію ретротранспозона *Remel* (*Ty1/copia* із геному дині *Cucumis melo*) впливає тільки ультрафіолетове опромінювання; зміни експресії генів домашнього господарства *Cucumis melo* під впливом УФ випромінювання не виявлено (Ramallo et al., 2008).

Поряд з активними ретротранспозонами з надродини *Ty1/copia* у геномах рослин описані й деякі транскрипційно активні *Ty3/gypsy*-елементи. У геномі *Lotus japonicus* знайдено родину транскрипційно активних ретротранспозонів *LORE1* (*Ty3/gypsy*). Аналіз експресії показав активність *LORE1* у всіх вивчених тканинах рослини (Madsen et al., 2005). Елемент *RIRE9* із геному рису транскрипційно активний у тканинах листка та стебла (Li et al., 2000). Транскрипційно активні елементи *Beetle1* і *Beetle2* із геному дикого буряку містять інтактну кодувальну ділянку, але характеризуються високим ступенем метилювання. Детектована експресія *Beetle*-елементів, очевидно, є наслідком активності деяких елементів з відмінним патерном метилювання, який уникнув інактивації (Weber, Schmidt, 2009). У геномі деяких ліній зеленої водорості *Chlamydomonas reinhardtii* показано високий рівень експресії унікального *Ty3/gypsy*-ретротранспозона *REM1* (Perez-Alegre et al., 2005).

Таким чином, мобільні послідовності відіграють ключову роль у перебудові геномів. Їх здатність впливати на сайти структурного сайленсингу робить їх особливо важливими при дослідженні онтогенетичної пластичності рослин. Показано, що ретротранспозони специфічно активуються зовнішніми стресовими сигналами. Зв'язок між активацією ретротранспозона і стресом найкраще вивчений для ретротранспозонів тютюну *Tnt1* та *Tto1*. Встановлено, що здатність до реагування реалізується через індукцію транскрипції й індукується вона різними формами стресу, включаючи еліситори, атаку патогенів, саліцилову кислоту, поранення, процедуру виділення протопластів, культивування *in vitro*, ауксини НОК і 2,4-дихлорфеноксицтову кислоту (2,4-Д), метилжасмонат, іони важких металів, окислювальний стрес тощо. Дані, отримані на прикладі

трьох підродин *Tnt1*-елементів, свідчать про те, що варіабельна U3-ділянка ретротранспозонів є вирішальною для невідповідних реакцій у відповідь на стрес. Різні стресові чинники індукували різні популяції РНК *Tnt1*-елементів, які відрізнялися за U3-последовностями. Так, якщо *Tnt1B* переважно індукувався умовами вирощування клітинної культури, то транскрипти *Tnt1A* сильно активувались еліситором криптогеїном і метилжасмонатом; спостерігали також диференціальну індукцію популяцій РНК *Tnt1 C* саліциловою кислотою і 2,4-Д. Крім того, хоча індуковані популяції РНК *Tnt1 C* відрізняються за їхніми U3-последовностями, у цій ділянці ідентифікується один і той самий промоторний елемент. Ці дані вказують на прямий зв'язок між стресовими чинниками й активацією специфічних ретроелементів за допомогою певних промоторних елементів.

У геномах рослин до 85% ядерної ДНК може складатися із мобільних елементів залежно від розміру геному (арабідопсис містить близько 14%), і велика їх частина розкидана по всьому геному у вигляді повторюваних последовностей. У минулому накопичено багато даних, які свідчать про високу варіабельність повторюваної ДНК рослин в онтогенезі і за стресу, особливо в дослідях з культурою тканин; виявлено індукований зовнішнім середовищем поліморфізм ДНК (Кунах, 2005, 2011, 2011a). Очевидно, велику роль у встановлених явищах відіграють МГЕ (Arnoldt-Schmitt, 2004; Кунах, 2011).

Інтригуючу особливість рослинних ретротранспозонів, яка полягає в тому, що вони містять регуляторні мотиви, подібні до таких клітинних генів, пояснюють такі гіпотетичні механізми:

- спадкові захоплення ретротранспозонами последовностей клітин за допомогою механізмів, подібних до ретровірусної трансдукції;
- обумовлене ретротранспозоном перенесення регуляторних последовностей до клітинних генів: є дані про присутність мобільних елементів у регуляторних ділянках генів та їх участь у генній регуляції; зроблено припущення, що нові регуляторні ознаки можуть набуватися клітинними генами після вставки мобільного елемента поблизу та наступного зникнення інсерції за допомогою випадкового дрейфу;
- поява ретротранспозонових регуляторних елементів шляхом конвергентної еволюції:

прикладом є висока пластичність U3-ділянки мобільних елементів родини *Tnt1*. Кілька регуляторних мотивів, пов'язаних із різноманітними захисних генів, було виявлено у підродині *Tnt1 A* (наведено за: Todorovska, 2007).

Жодна з наведених гіпотез не є повністю задовільною, але не можна виключити можливість того, що ці й інші механізми могли поєднуватись із такими ж хазяїна під час коеволуції ретротранспозонів, створюючи нинішню ситуацію.

Очевидно, лише подальше вивчення еволюції особливостей LTR-вмісних ретротранспозонів інших родин надасть інформацію про походження і долю регуляторних последовностей ретротранспозонів.

Одним із важливих питань є можливе біологічне значення активації ретротранспозонів. Разом із роллю у диверсифікації генетичного матеріалу припускають, що активація ретротранспозонів є ключовим чинником, задіяним у процесах адаптації хазяїна до змін довкілля. Ретротранспозони можуть вставлятись у регуляторні последовності генів рослинних клітин, змінюючи таким чином їх експресію. Припускають, що як один із головних модифікаторів регуляції генної експресії мобільні генетичні елементи є головним чинником макроеволюції. Значною є їх роль у зміні розмірів геному (див. розділи 10, 24).

Наведені особливості регуляторних елементів ретротранспозонів вказують на те, що вони є чутливими маркерами стресу рослин і можуть бути використані для різних біотехнологічних застосувань, спрямованих на розвиток резистентності рослин до патогенів, вони можуть бути інструментом для вивчення захисної реакції рослин. Крім того, злиття ділянок ДКП, що містять промоторні елементи, відповідальні за активну транспозицію ретротранспозонів у сигнальний(ні) ген(и), може бути чутливим індикатором рослинної реакції на стрес довкілля чи агрохімікати і забруднювачі. Оскільки ретротранспозони можуть залишатись активними і стабільно успадковуються після вставки в різні ділянки геному хазяїна, було б цікаво визначити, чи є їх експресія менше чутливою до локальних геномних умов (генного оточення місця вбудовування), ніж трансгенів, які контролюються промоторами клітинних генів (детальніше див. розділ 19).

Розділ 8. ЕВОЛЮЦІЙНА РОЛЬ «ОДОМАШНЕНИХ» МГЕ

Ключовий фермент мобільних генетичних елементів — транспозаза, як відомо, може виконувати дві функції:

- пізнавати певні послідовності ДНК і прикріплюватися до них;
- вирізати і перемішувати фрагменти ДНК.

Ці властивості можуть бути використані клітиною, коли їй вдається «приручити» будь-який транспозон, тобто зробити його невід'ємною частиною свого геному. Наслідком такого «молекулярного одомашнювання» (molecular domestication) є втрата рухливості за рахунок мутаційної «поломки» і використання корисної для організму функції. Найвідомішим прикладом тут є здатність «приручених» транспозаз, так званих RAG-білків, вирізати і перемішувати фрагменти ДНК, що є основним механізмом системи надбаного імунітету (RAG-білки створюють різноманітні гени антитіл шляхом вирізання і перекомбінації фрагментів геномної ДНК — «заготовок», які передаються у спадок).

Ще більше еволюційних можливостей містить у собі здатність транспозаз розпізнавати певні послідовності нуклеотидів ДНК. Кінцеві обернені повтори багатьох мобільних елементів, тобто ділянки ДНК, що розпізнаються транспозонами, бувають дуже схожими за послідовністю нуклеотидів на сайти зв'язування транскрипційних факторів (ТФ). В обох випадках поширеними є паліндромні мотиви послідовності ДНК, що однаково читаються в обидва боки. Тому припускалося, що у ході еволюції приручені транспозази можуть інколи брати на себе роль транскрипційних факторів, а фрагменти кінцевих повторів транспозонів можуть інколи опинятись у таких позиціях, де вони здатні функціонувати як сайти зв'язування ТФ. Порівняно недавно таке перетворення було експериментально підтверджено. Розглянемо детальніше цей дослід.

У квіткових рослин важливу роль у фоторецепції відіграє фітохром А, який реагує на світло з довжиною хвилі 700–750 нм («дальнє червоне»). Під дією світла фітохром А переходить у біологічно активну форму і транспортується із цитоплазми в ядро клітини, де він «включає» цілу низку генів, що регулюють різні процеси життєдіяльності, зокрема цвітіння, дозрівання

насіння тощо. Світлозалежний транспорт фітохрому А в ядро здійснюється за допомогою білків FHY1 і FHL. Відомо ще два білки — FHY3 і FAR1, без яких транспорт фітохрому А в ядро порушується. Проте конкретна біохімічна функція цих білків була невідома. Саме ці два білки і вивчені у роботі американських дослідників (Lin et al., 2007).

Проведений авторами аналіз нуклеотидних послідовностей генів *FHY3* і *FAR1* виявив високу подібність з генами транспозаз, що входять до складу транспозонів *Mutator* і *Jittery*. (Обидва транспозони широко розповсюджені у геномах квіткових рослин і належать до надродини транспозонів, що зветься MULE (Mutator-like elements).) Подібність генів *FHY3* і *FAR1* з транспозонами виявилася настільки великою, що автори вважають їх генами «приручених» транспозаз. Було встановлено, що білки FHY3 і FAR1 необхідні для активації генів *FHY1* і *FHL*, саме тих генів, які кодують білки, що транспортують активований світлом фітохром А в ядро. Виявилось, що ці «приручені» транспозази регулюють активність обох генів не поодиноці, а сумісними зусиллями. Вони проникають в ядро і прикріплюються безпосередньо до регуляторної ділянки (промотора) генів *FHY1* і *FHL*, що приводить до різкого зростання їх експресії. Тобто «приручені» транспозази FHY3 і FAR1 працюють, як справжнісінькі транскрипційні фактори.

Ці ж дослідники також ідентифікували конкретну послідовність нуклеотидів (CACGCGC), яку розпізнають білки FHY3 і FAR1 у промоторах генів *FHY1* і *FHL*. Ця послідовність присутня також у промоторах низки інших генів, що беруть участь у фоторецепції, регуляції розвитку і добових ритмів, таких як *PHYTOCHROME B*, *CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 (CCA1)* і *EARLY FLOWERING 4 (ELF 4)*. Не виключається, що «приручені» транспозази регулюють активність і цих генів також.

Було встановлено, що активність самих генів «приручених» транспозаз пригнічується фітохромом А, який надходить в ядро. В результаті утворюється контур зворотного зв'язку, завдяки якому сигнальна система спрацьовує за певного

освітлення і потім відключається, а не працює постійно, поки освітленість не зміниться.

Головне значення цієї роботи в тому, що авторам уперше вдалося продемонструвати перетворення «приручених» транспозаз у повноцінні транскрипційні фактори. Автори вважають, що приручення одного або й декількох транспозонів родини MULE відбулося невдовзі після появи квіткових рослин (приблизно у середині крейдяного періоду близько 100 млн років назад) і було пов'язане з освоєнням першими квітковими різних широтних зон, тобто місцезаселень з різною сезонною динамікою освітлення (Lin et al., 2007). Цікаві приклади з «одомашнювання» транспозонів і утворення на цій основі нових генів в евкаріотів, зокрема генів, що регулюють розвиток рослин, наведено також у роботі (Volff, 2006).

Висока насиченість геному МГЕ, розкиданість їхніх копій по всьому геному створюють широкі можливості для гомологічної рекомбінації, здатної викликати хромосомні перебудови. Так, рекомбінація між гомологічними мобільними елементами на одній хромосомі залежно від орієнтації транспозонів може призводити або до делецій чи дуплікацій, або до інверсій. За рекомбінації між двома мобільними елементами, які розташовані на різних хромосомах, можуть виникати транслокації. Оскільки в процесі такої транспозиції задіяні кінці транспозонів, розміщених на різних молекулах ДНК (на різних хро-

мосомах), вона називається нелінійною транспозицією або NLT (від англ. nonlinear transposition). NLT може швидко розривати і возз'єднувати хромосоми і тому відіграє важливу роль у виникненні структурної гетерогенності під час геномної еволюції. Детальніше цей механізм розглянуто у наступному розділі на прикладі кукурудзи (див. розділ 9).

МГЕ є не лише «гарячими точками» рекомбінації, а й місцями фрагментації чи ламкості хромосом та переважної інтеграції вірусів. Гени, які розташовані у ламких ділянках, часто містять підвищену кількість *LINE*- та *LTR*-елементів. Крім того, вбудовування транспозона в промоторну ділянку може інактивувати частину її регуляторних компонентів і, в результаті, істотно змінити характер експресії відповідного гена. «Сліди», що залишають транспозони, приводять до зміни вихідних сайтів мішені, а тому також можуть відігравати певну роль в еволюційних процесах. І наступне, кодована ретротранспозонами зворотна транскриптаза може залучатися до процесів дуплікації різних транскрибованих послідовностей і тим самим створювати вихідний матеріал для виникнення нових генів.

Запропоновано концепцію, яка в загальних рисах описує напрямки функціонування МГЕ. Оскільки МГЕ містять різноманітні мотиви функціональних сайтів, що вказує на потенційні можливості, їх розглядають як «рухливі касети елементів управління» (рис. 8.1). Маючи у своїй

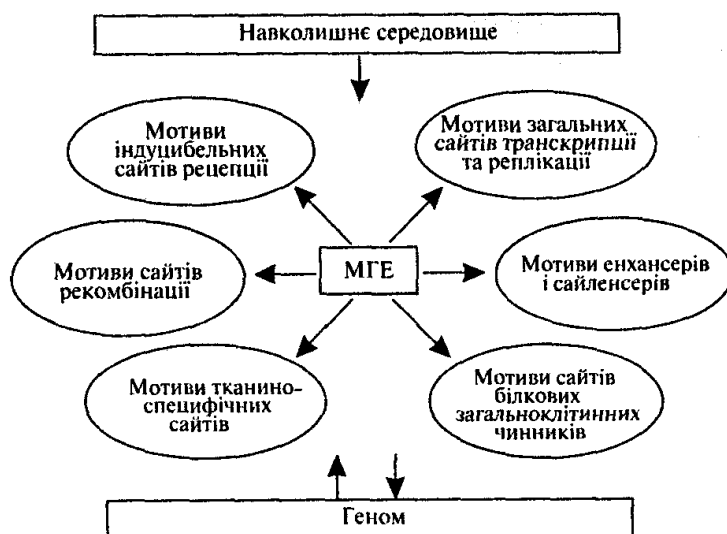


Рис. 8.1. Мобільні генетичні елементи (МГЕ) — рухливі касети функціональних сайтів чи елементів управління (за: Ратнер, Васильєва, 2000)

структурі мотиви енхансерів і сайленсерів, МГЕ можуть впливати на активність сусідніх генів. Через сайти рецепції зовнішніх сигналів вони можуть індукувати транскрипцію і транспозицію. Через тканиноспецифічні і гормоночутливі сайти вони можуть залучатися до онтогенетичного управління і диференціювання, а також дедиференціювання. МГЕ можуть стати «гарячими точками» рекомбінацій і хромосомних перебудов. Перемішуючись у геномі, а також захоплюючи інші елементи управління, вони можуть змінювати підпорядкування і експресію генів.

На сьогодні вважається, що велику роль в еволюції рослин відіграють ретротранспозони. Вони можуть складати до 50% і більше всієї ядерної ДНК і є дуже подібними структурно і функціонально з ретротранспозонами і ретровірусами інших евкаріотів. Від останніх їх звичайно відрізняє висока частота повторюваності елементів (units), які формують даний клас ретротранспозонів, висока гетерогенність їхніх «популяцій» у геномах і характер розподілу в хромосомах.

У геномах рослин присутня множина класів («популяцій») ретротранспозонів, які відрізняються за нуклеотидною послідовністю. Багатьма дослідженнями виявлено важливу роль ретротранспозонів у епігенетичних процесах (див. розділ 11), тобто вони є важливим компонентом молекулярно-генетичних систем управління (МГСУ).

Кількісний вміст ретротранспозонів у геномах рослин надзвичайно лабільний і може, щонайменше, частково пояснити «C-value»-парадокс (див. розділ 10). Вважається, наприклад, що розмір геному кукурудзи за останні 3 млн років практично подвоївся за рахунок «розмноження» міжгенних ретротранспозонів. Геном кукурудзи, як і геноми інших вищих рослин, виявився досить мінливим, «пластичним», таким, що швидко (і не лише в історичному масштабі) змінюється. Тут наведемо приклад, що відмінності були виявлені у bz-ділянці навіть двох ліній кукурудзи (Fu, Dooner, 2002) або у хромосомах близьких форм ячменю (Shirasu et al., 2000). Кількісний вміст певних транспозонів може визначатися умовами росту рослини (Kalendar et al., 2002).

Досить детально вивчено ретротранспозони злаків (див., наприклад, Vicient et al., 2001).

Особлива увага до ретротранспозонів злаків визначалася тим, що за кількісним складом ДНК на гаплоїдний набір хромосом різні види злаків можуть сильно відрізнятися, ця різниця може сягати близько 10–100 разів.

У геномах рослин найчастіше трапляються *gypsy*-подібні і *coria*-подібні ретротранспозони. Це довгі послідовності, побудовані з 5–10 т.п.н. І весь ядерний геном рослин складається із «островів генів» і «морів транспозонів», що їх розділяють.

Ретротранспозони кодуєть специфічні білки, більша частина яких є необхідною для їх синтезу і здійснення перебудов геномів. Багато досліджень було присвячено вивченню структури ретротранспозонів у голонасінних і покритонасінних рослин, і ці дані були успішно використані для встановлення філогенетичних зв'язків окремих груп рослин.

Аналізуючи біологічну роль транспозонів у рослин, О. Н. Тиходеев звертає увагу на те, що обидва модельних об'єкти — кукурудза і ротики садові *Antirrhinum*, які є у рослин джерелами ДНК-транспозонів, що автономно переміщуються, належать до культурних форм. Геном ротиків містить щонайменше дві родини подібних генетичних елементів — *Tam1* і *Tam3*, а геном кукурудзи — щонайменше чотири (*Ac*, *Bg*, *En/Spm*, *MuDR*). А для всіх видів, що зростають у природі, властивими є лише неавтономні, дефектні ДНК-транспозони. Припускається, що в останніх видів можуть бути присутніми і поки що не виявлені повноцінні копії мобільних елементів. У такому випадку виходячи з нерухливості дефектних копій повноцінні ДНК-транспозони, очевидно, мають бути інактивовані певними регуляторними системами «хазяїна». Звідси, не виключено, що така яскраво виражена активність ДНК-транспозонів, що спостерігається у ротиків і кукурудзи, є побічним ефектом штучного добору (Тиходеев, 2000; див. також: Menzel et al., 2006).

Детально роль транспозонів, результати їх аналізу як чинників різних перебудов і модифікацій у геномах інших евкаріотів — грибів — викладено в огляді (Шнырева, 2003); структуру, розподіл і функціональну роль МГЕ геному людини — в огляді (Підпала та ін., 2008), а наслідки для геномів соматичних клітин — у роботі (Collier, Largaespada, 2007).

Розділ 9. ГЕНОМНІ ПЕРЕБУДОВИ ЗА ДОПОМОГОЮ НЕЛІНІЙНОЇ (АЛЬТЕРНАТИВНОЇ) ТРАНСПОЗИЦІЇ (на прикладі кукурудзи)

Мобільні генетичні елементи давно вважаються потенційними чинниками широкомасштабних геномних реорганізацій завдяки їх здатності викликати хромосомні перебудови, такі як делеції, дуплікації, інверсії, реципрокні транслокації. Особливі (певні) конфігурації кінців транспозонів можуть викликати хромосомні перебудови з високою частотою. В одному з таких процесів транспозиції задіяними можуть бути кінці транспозонів, розміщені на різних молекулах ДНК, і такий процес називається нелінійною транспозицією (nonlinear transposition — NLT) або альтернативною транспозицією. Оскільки NLT може швидко розривати і возз'єднувати хромосоми, вона має важливе значення під час геномної еволюції як джерело виникнення структурної гетерогенності геному.

Транспозиція є по суті біохімічною реакцією. Транспозаза — це фермент, що каталізує цю реакцію, а субстратами транспозази є 5'- і 3'-кінці транспозона. Теоретично, несуміжні 5'- і 3'-кінці транспозонів можуть слугувати субстратами транспозази, а в процес транспозиції можуть бути залучені кінці транспозонів, розміщені на різних хромосомах. Акти транспозиції за участю рознесених кінців транспозонів можуть призводити до крупних хромосомних перебудов, у той час як звичайна транспозиція суміжного елемента змінює лише локалізацію транспозона в геномі. Однак геноми, що містять множинні копії споріднених транспозонів, зазвичай досить стабільні. Це свідчить про те, що транспозиція за участю несуміжних кінців транспозонів є рідкісною.

Встановлено, що геном кукурудзи містить близько 30–50 копій *Ac/Ds*-подібних транспозонів (Fedoroff et al., 1983). Однак не відомо, яка кількість цих копій здатна до транспозиції, оскільки певна їх частина може бути нерухомими фрагментами або інактивованими епігенетичними модифікаціями, пов'язаними з гіперметилуванням ДНК. У разі *Ac/Ds*-елементів кукурудзи здатність розсіятих транспозонів брати участь у реакціях транспозиції може бути ще більше обмежена відмінностями у часі реплікації окремих кінців транспозонів та станом

метилування кінців транспозонів (Wang, Kunze, 1998).

Процеси транспозиції, що призводять до розриву хромосом або інших порушень, можуть бути виявлені за використання генетичних маркерів. Ще Б. МакКлінток помітила, що транспозиція *Ds*-елемента часом супроводжувалася хромосомними перебудовами — делеціями, дуплікаціями, інверсіями і реципрокними транслокаціями. Оскільки ці перебудови відбувалися лише за наявності *Ac*-елемента, автор дійшла висновку, що вони утворюються шляхом *Ac/Ds*-транспозиції (McClintock, 1956, 1978). У подальшому пов'язані з транспозиціями перебудови хромосом спостерігали також у ротиків *Antirrhinum*.

Більшість хромосомних перебудов, виявлених Б. МакКлінток, не вивчали на молекулярному рівні, за винятком алелі *sh-m5933*. Ця алель містить інвертовану дуплікацію розміром понад 30 т.п.н., фланковану «дубль» (подвоєними) *Ds*-елементами (один *Ds*, вставлений в інший *Ds* у протилежній орієнтації) (див.: Döring et al., 1989). Припускалося, що інвертована дуплікація в алелі *sh-m5933* утворилася шляхом реакції транспозиції за участі *Ds*-кінців, розміщених на сестринських хроматидах (Fedoroff, 1989). Пізніше, щоб пояснити явище *Ds*-індукованого розриву хромосом, припускалося, що реакції транспозиції за участі *Ds*-кінців на сестринських хроматидах мають генерувати реципрокні делеції і дуплікації. Такі перебудови і справді було виявлено у трансгенного тютюну (English et al., 1993). Однак місця перебудованих з'єднань не було сиквеновано, щоб виявити характерні зміни нуклеотидних послідовностей, які б свідчили про процес транспозиції. Це так звані «сліди» (англ. footprint) у місці ексцизії (вирізання) транспозона і направлена дуплікація сайту послідовностей хазяїна в місці вставки транспозона.

Детальніше розглянемо дані про те, як несуміжні кінці транспозонів можуть слугувати субстратами незвичних процесів транспозиції і тим самим генерувати крупні геномні перебудови, на прикладі перебудованих хромосом, виявлених

у класичного здвоєного сектора кукурудзи. Згідно з наведеними у роботі (Zhang, Peterson, 1999) даними одна хромосома має велику (4,6 сМ) делецію, а інша містить цей сегмент як інвертовану дуплікацію. Перебудовані точки розриву містять

сліди і дуплікації певного сайту, як правило, генеровані транспозицією *Ac*-елемента. Ці послідовності доводять, що перебудовані хромосоми є реципрокними продуктами одного акту нелінійної транспозиції (NLT).

9.1. Походження нової алелі *PI-ww* з великою інвертованою дуплікацією

Ген *PI* регулює синтез червоного флюбафенового пігменту квіткових органів у кукурудзи, включаючи перикарпій (поверхневий шар зерна, що походить від стінки зав'язі) і стрижень початка. Дволітерний суфікс *PI* вказує на його експресію в перикарпії і в стрижні початка. Наприклад, *PI-rr* означає червоний перикарпій і червоний стрижень початка, а *PI-ww* означає білий перикарпій і білий стрижень початка. Стандартна алель *PI-vv* означає плямистий перикарпій і плямистий стрижень початка. Алель *PI-vv* містить мобільний *Ac*-елемент, вбудований в інтрон 2 гена *PI-rr*. Алель *PI-vv* започаткувала алель *PI-ovov-III4* (позначає помаранчево-плямисті перикарпій і стрижень початка) шляхом внутрішньогенового переміщення *Ac*-елемента; числа, поставлені після дволітерного суфікса, вказують на номер культури походження кожної алелі. Алелі з однаковим фенотипом, але з різним номером культури можуть мати різну генну структуру. Алель *PI-ovov-III4* у свою чергу започаткувала *PI-vv-9D9A*, яка містить *Ac*-елемент, перебудований фрагмент гена *PI* (гР) розміром 112 п. н. і термінально делетований *Ac*-елемент, що позначається *fAc* (фракціонований *Ac*),

вставлений в інтрон 2 алелі *PI-rr* (рис. 9.1). Елемент *fAc* в алелі *PI-vv-9D9A* містить 3'-ділянку *Ac*-елемента розміром 2039 п. н. Інтактний *Ac*-елемент може вирізатися з *PI-vv-9D9A*, утворюючи ревертантну алель з *PI-rr*-фенотипом червоного перикарпії і червоного стрижня початка. Це свідчить про те, що *rP*- і *fAc*-вставки в інтрон 2 алелі *PI-rr* не заважають експресії *PI-rr*. З великого багатозерного сектора з білим перикарпієм, виявленого у початка рослини з генотипом *PI-vv-9D9A/PI-ww*, було виділено нову алель *PI-ww*, яку позначили як *PI-ww 12:27-3* (Zhang, Peterson, 1999).

Геномний Саузерн-аналіз, геномне клонування і сиквенування ДНК показали, що алель *PI-ww 12:27-3* містить дуже велику, розміром понад 30 т.п.н., вставку в *PI-vv-9D9A* на стику 3'-кінця *fAc* і 5'-ділянки *PI* гена *PI* (заштрихована смужка на рис. 9.1). Вставка є інвертованою дуплікацією, що виникла з послідовності *PI-vv-9D9A*: від гР вона тягнеться вверх до *fAc* і далі за 5'-кінець гена *PI*. Послідовності на стиках *Ac/fAc*-кінців і гена *PI* в *PI-vv-9D9A* і *PI-ww-12:27-3* ідентичні, за винятком заміни двох п. н. в *PI-ww-12:27-3* на стику гР і 5'-ділянки

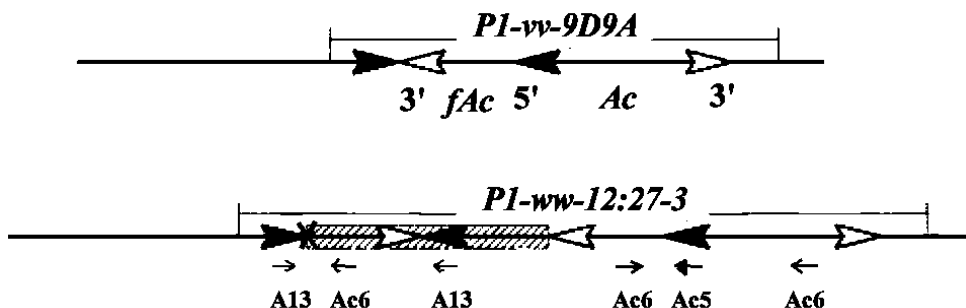


Рис. 9.1. Схематичне зображення структури прашурної алелі *PI-vv-9D9A* (верхня) і алелі *PI-ww-12:27-3*

Лінії зі стрілками позначають *Ac* або *fAc* (fractured *Ac*), а незафарбовані і зафарбовані стрілки показують 3'- та 5'-кінці, відповідно, *Ac/fAc*. Коротка чорна лінія між *Ac* та *fAc* в *PI-vv-9D9A* позначає перебудовану *PI* послідовність розміром 112 п. н. (гР), що у *PI-ww-12:27-3* дуплікується (без дотримання масштабу). Заштрихована смуга, що містить гР, *fAc* та 5'-ділянку гена *PI* і його апстрим-послідовність, позначає велику вставку в *PI-ww-12:27-3*. Стрілки нижче структури ДНК позначають положення і орієнтацію ПЛР-праймерів. X на стику гР і сірої стрілки вказує на положення зміни послідовності розміром 2 п. н. в *PI-ww-12:27-3* (за: Zhang, Peterson, 1999)

гена *PI* (рис. 9.1). Зміни послідовності з А на Т і з С на G є подібними до типових слідів, які утворюються при *Ac*-транспозиції, що свідчить про

те, що складна структура *PI-ww-12:27-3*, можливо, виникла в результаті незвичного процесу транспозиції.

9.2. Підтвердження явища нелінійної транспозиції (NLT)

Виходячи зі структури інвертованої дуплікації і сліду можливої *Ac*-транспозиції було висловлено припущення, що алель *PI-ww-12:27-3* виникла шляхом NLT (рис. 9.2). Головною особливістю моделі є те, що кінці транспозона, розміщені на різних молекулах ДНК, можуть

використовуватись як субстрати транспозази. Транспозон, що утворився (тобто внутрішня ДНК відносно *Ac*-кінців), є нелінійним і дуже великим, у цьому випадку таким, що охоплює близько 70 сМ короткого плеча хромосоми 1 кукурудзи (рис. 9.2, Б). Послідовності, що спочат-

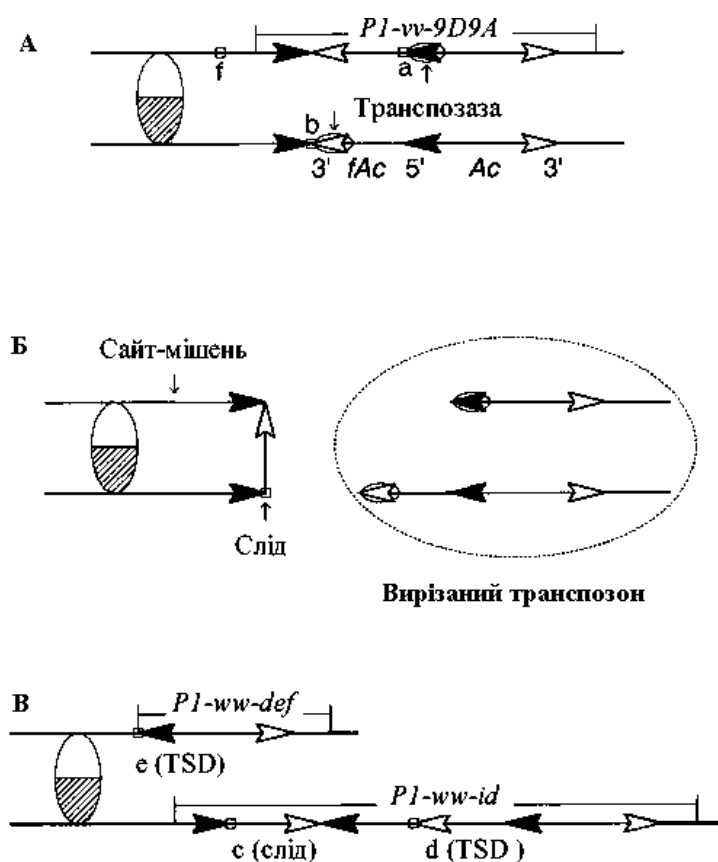


Рис. 9.2. Модель нелінійної транспозиції (NLT)

Дві лінії означають сестринські хроматиди, об'єднані центромерою (овал). Усі символи мають таке ж значення, що і на рис. 9.1: **А** — *Ac*-транспозаза (малі овали) зв'язується з 5'-кінцем *Ac* однієї сестринської хроматиди і з 3'-кінцем *fAc* іншої сестринської хроматиди; **Б** — розрізання відбувається на *Ac* і *fAc* кінцях. Два нетранспозонних кінці з'єднуються, утворюючи хроматидний міст, і на стику мають місце невеликі зміни, формуючи транспозонний слід; **В** — вирізані транспозонні кінці вставляються у цільовий сайт, генеруючи одну сестринську хроматиду (*PI-ww-id*) з інвертованою дуплікацією та другу сестринську хроматиду з відповідною делецією (*PI-ww-def*). Сестринські хроматиди *PI-ww-id* та *PI-ww-def* за наступного мітотичного поділу сегрегують у дочірні суміжні клітини, формуючи потенційний здвоєний сектор. Малі квадратики, позначені літерами від а до ф, позначають перебудови послідовностей на стику, включаючи слід, цільовий сайт і TSD (на рис. А і Б для ясності взаємодії між транспозазними молекулами не показані). На рис. Б описано повністю вирізаний транспозон, але реакція транспозиції може проходити і через послідовні етапи розрізання і зшивки, за яких вільні посередники не утворюються. На рис. Б і В показано результат вставки вирізаного транспозона у верхню хроматиду цільового сайту. Проте може відбуватися вставка й у нижню хроматиду цільового сайту, що дасть протилежну орієнтацію *fAc* та *rP* у *PI-ww-id* (не показано) (за: Zhang, Peterson, 1999)

ку фланкують *Ac/fAc*-кінці, пізніше з'єднуються, утворюючи хроматидний міст, при цьому в місці з'єднання відбуваються деякі невеличкі зміни послідовності з утворенням типового сліду вирізання транспозона (рис. 9.2, Б). Вставка нелінійного транспозона у певному місці хроматидного моста генерує дві нерівні хроматиди: одну, що містить інвертовану дуплікацію (*PI-ww-id*), і ще одну з відповідною делецією (*PI-ww-def*; рис. 9.2, В). *PI-ww-id* містить слід транспозиції і дуплікацію відповідного сайту (TSD — target site duplication), у той час як *PI-ww-def* містить іншу TSD. Структура інвертованої дуплікації *PI-ww-12:27-3* і положення заміни послідовності розміром дві пари нуклеотидів (сліду) точнісінько такі, які варто було б очікувати для алелі *PI-ww-id*, що утворилася згідно з моделлю нелінійної транспозиції (див. рис. 9.1 і рис. 9.2, В).

Однак автори не виявили прогнозованої алелі *PI-ww-def* як продукту NLT реакції. Можливо, це сталося тому, що клітинний клон, який містить алель *PI-ww-def*, дав початок внутрішній ділянці стрижня початка, і тому вона не успадковується. Тому було розпочато пошук реципрокних продуктів одного акту нелінійної транспозиції. Такі реципрокні продукти можна виявити й отримати у кукурудзи завдяки зв'язку між перикарпієм і зародком. Якби процеси нелінійної транспозиції відбувалися під час розвитку кукурудзяного початка, перебудовані сестринські хроматиди розходилися б у мітозі в обидві дочірні клітини. Подальші мітотичні поділи дочірніх клітин призводили б до утворення подвійного сектора, в якого одна половинка містить інвертовану хромосому дуплікацію (*P-ww-id*), а інша — відпо-

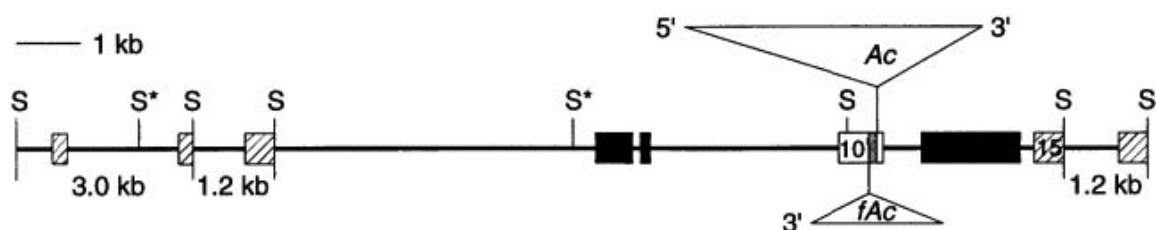
відну делецію (*P-ww-def*). Оскільки як делеція, так і вставка порушують функцію гена *PI*, обидві здвоєні алелі визначатимуть незабарвлений перикарпій замість смугастого перикарпію, який кодується пращурною алеллю *PI-ww-9D9A*. Після мейозу кожна зернина у здвоєному секторі матиме 50% шансів нести алель *PI-ww-id* або *PI-ww-def*.

Щоб виявити реципрокні продукти нелінійної транспозиції, схрещували зразки *PI-ww-9D9A/PI-wr* з *PI-wr*, *r-m3::Ds* пилком. Алель *r-m3::Ds* є тестерною алеллю для *Ac*-елемента: *Ac*-індуковане вирізання *Ds*-елемента з *r* локусу дає початок пурпуровому антоціановому пігменту в алейронових клітинних клонах. Із приблизно 1500 проаналізованих початків один мав великий сектор незабарвленого перикарпію, в якому зернівки в межах сектора були фенотипово спарені за антоціановою пігментацією: одна частина мала зернини з великими пурпуровими алейроновими секторами, а інша — зернини з малими пурпуровими алейроновими секторами. Зі здвоєного сектора отримано дві алелі — *PI-ww-def1* і *PI-ww-id1*. Подібно до *PI-ww-12:27-3*, алель *PI-ww-id1* характеризувалася домінантною затримкою в часі розвитку *Ac*-індукованих *Ds*-вирізання з *r-m3::Ds*, про що свідчила наявність малих пурпурових алейронових секторів. Навпаки, алель *PI-ww-def1* мала нормальні *Ac*-індуковані *Ds*-вирізання, що видно з великих пурпурових алейронових секторів. Алель *PI-ww-def1* передається з нормальною частотою як через пилки, так і через зав'язь, але гомозиготних за алеллю *PI-ww-def1* рослин отримати не вдалося (див.: Zhang, Peterson, 1999).

9.3. Молекулярний аналіз спарених алелей

Як і передбачається за NLT-моделлю, Саузерн-блот-аналіз показав, що як зонд локусу *PI* (фрагмент 15), так і *PI*-пов'язаний зонд (p1.5 B22, 3.5 cM з *PI* локусу) є делетованими в алелі *PI-ww-def1* і дуплікованими в *PI-ww-id1* (рис. 9.3). Щоб з'ясувати, чи алель *PI-ww-id1* має інвертовану дуплікацію, було перебрано геномну *PI-ww-id1* бібліотеку за допомогою як зонда гена *PI* (зонд 10'), так і *Ac*-зонда (1,6 т.п.н. внутрішнього *HindIII*-фрагмента *Ac*-елемента). Отримано вісім клонів, що гібридизувалися з обома зон-

дами, які було розбито на два типи: тип I (п'ять клонів) містив *fAc* і 5'-ділянку гена *PI*, а тип II (три клони) містив *Ac*, *fAc* і 3'-ділянку гена *PI*. Жоден клон не містив разом 5'- і 3'-ділянки гена *PI*. Цей результат передбачається моделлю нелінійної транспозиції, оскільки велика вставка в *PI-ww-id1* розділяє 5'- і 3'-ділянки гена *PI*. Блот-гібридизація і сиквенс-аналізи клонів показали, що *PI-ww-id1*, як і *PI-ww-12:27-3*, містить інвертовану дуплікацію, яка починається в gP і тягнеться далі 5'-кінця гена *PI*. Однак ду-

Рис. 9.3. Структурний аналіз секторів спарених алелей. Рестрикційна карта *P1-vv-9D9A*

Стрижнем є *P1-rr*, суцільно зафарбовані прямокутники означають екзони, пронумеровані прямокутники — гібридизаційні зонди, а заштриховані прямокутники означають послідовності, гомологічні зонду 15.S, *SalI*; S* — метильований сайт *SalI*. Вставка фракціонованого (fractured) *Ac* (*fAc* — менший трикутник), гР (малий сірий прямокутник) та *Ac* (великий трикутник) в інтрон 2 *P1-rr* дає початок *P1-vv-9D9A* (за: Zhang, Peterson, 1999)

плікація *P1-ww-id1* продовжується за дистальну кінцеву точку дуплікації *P1-ww-12:27-3*.

Було перевірено ще кілька передбачень згідно з NLT-моделлю. На стику гР і 5'-ділянки гена *P1* (рис. 9.2, В) алель *P1-ww-id1* має містити слід *Ac*-типу; цей слід було виявлено за допомогою ПЛР таким способом. У *P1-vv-9D9A* олігонуклеотидні праймери А13 і Ас6 не можуть давати продукту ПЛР, оскільки Ас6-гомологічна послідовність у *fAc* має таку ж орієнтацію, що і А13, а Ас6 міститься в *Ac* на відстані 5,2 т.п.н. від А13 у *P1-vv-9D9A* (рис. 9.1). Однак після нелінійної транспозиції Ас6 у *P1-ww-id*-вставці лежить протилежно відносно А13, а відстань між ними дорівнює 1,4 т.п.н. (рис. 9.1). ПЛР-ампліфікація дає передбачуваний продукт з *P1-ww-id1*, але не з *P1-vv-9D9A* чи *P1-ww-def1/P1-wr*. Порівняно з послідовностями пращурної алелі *P1-vv-9D9A* (рис. 9.4, А, Б) алель *P1-ww-id1* містить типовий слід *Ac*-типу точно на стику гР і 5'-ділянки гена *P1* (рис. 9.4, В); дві пари нуклеотидів змінені (А на Т і С на G).

За транспозиції *Ac*-елементи в місці вставки генерують TSD-послідовності розміром вісім пар основ. Модель NLT передбачає, що TSD, яка складається з восьми пар основ, має утворюватися точно в місці вставки транспозона. Однак, оскільки NLT-транспозон складається з двох сестринських хроматид, TSD має розміщуватися в перебудованих точках розриву хромосом, що несуть спарені алелі. В алелі *P1-ww-id1* TSD має перебувати суміжно з *fAc*; в алелі *P1-ww-def1* комплементарна послідовність розміром 8 п.н. має перебувати суміжно з 5'-кінцем *Ac*-елемента (рис. 9.2, В). ДНК-фрагмент, що містив 3'-кінець *fAc* з клонів типу II *P1-ww-id1*, був субклонований і сиквенований. Послідовність,

А	GGGTTGTAGTCAGGGA CCCAACATCAGTCCCT
Б	CAACTACAAGTCTACAAACC GTTGATGTTGATCCCT
В	CAACTACAAGTCTACAAACC GTTGATGTTGATCCCT
Г	TGAGCGAGCGAGGCTAGGGA ACTCGCTCGCTCCGATCCCT
Д	GCCGCCGCCTCGCTCAGGGA CGGCGGCGGAGCGAGTCCCT
Е	GCCGCCGCCTCGCTCGCTCA CGGCGGCGGAGCGAGCGAGT

Рис. 9.4. Сліди і дуплікації цільового сайту алелей *P1-ww-def1* та *P1-ww-id1*, утворені нелінійною транспозицією. Послідовності від А до Е відповідають послідовностям квадратиків від а до ф на рис. 9.2. Слід і дуплікація послідовностей цільового сайту підкреслені. Подальші подробиці див. у тексті. А — стик гР та *Ac* 5'-кінців у *P1-vv-9D9A*; Б — стик 5'-ділянки гена *P1* і 3'-кінця *fAc* у *P1-vv-9D9A*; В — стик 5'-ділянки гена *P1* і *rP* у *P1-ww-id1*, що містить слід транспозона розміром 2 п.н.; Г — стик інвертованої дуплікації і 3'-кінця *fAc* у *P1-ww-id1*; Д — стик делетованої кінцевої ділянки і 5'-кінця *Ac* у *P1-ww-def1*; Е — вихідна послідовність цільового сайту у *P1-vv-9D9A* (за: Zhang, Peterson, 1999)

яка за припущенням суміжна 3'-кінцю TSD, є AGCGAGGC (рис. 9.4, Г). Фрагмент ДНК, що містив підозрювану TSD в *P1-ww-def1*, було клоновано за допомогою модифікованої ЛМ-ПЛР. Послідовність продукту ПЛР містила

очікувану TSD (GCCTCGCT, комплементарну послідовності AGCGAGGC) на стику 5'-кінця *Ac*-елемента і перебудованих точок розриву в *Pl-ww-defl* (рис. 9.4, Д). Наявність ідентичних TSD на 5'-кінці *Ac*-елемента в *Pl-ww-defl* і 3'-кінці *fAc* у *Pl-ww-idl* переконливо свідчить про те, що перебудови генеруються одним актом транспозиції.

Згідно з моделлю нелінійної транспозиції кінцеві точки перебудов в алелях *Pl-ww-defl* і *Pl-ww-idl* мають міститись у прашурній алелі *Pl-vv-9D9A* одна біля одної. Було сконструйовано праймери для кожної кінцевої точки і використано цю пару праймерів, щоб ампліфікувати геномну послідовність за допомогою ПЛР із *Pl-vv-9D9A*-матриці. Розмір продукту ПЛР (240 п. н.) збігався з розміром, що впливав з положення праймера. ПЛР-продукт містив одну копію GCCTCGCT відповідного сайту, а послідовності, що фланкують GCCTCGCT, були

такими самими, що й ті, які містилися на кінцевих точках *Pl-ww-defl* і *Pl-ww-idl* (рис. 9.4, Е). Таким чином, перебудовані точки розриву, виявлені в алелях *Pl-ww-defl* і *Pl-ww-idl*, утворилися в результаті вставки кінців *Ac*-транспозона у відповідний сайт GCCTCGCT прашурної хромосоми.

Алелі *Pl-ww-12:27-3* і *Pl-ww-idl* містять інвертовані дуплікації, що починаються на ділянці гР алелі *Pl-vv-9D9A* і продовжуються далі за 5'-кінець гена *Pl*. Згідно з NLT-моделлю дуплікацій мають закінчуватися в сайті вставки транспозона, розміщеного у хроматидному мості (рис. 9.2, Б). Дійсно, картування за допомогою ПДРФ показало, що кінцеві точки інвертованих дуплікацій в алелях *Pl-ww-12:27-3* (p1.5 B22) і *Pl-ww-idl* (pJZPX) картується на відстані 3,5 та 4,6 сМ, відповідно, проксимально локусу *Pl*, в порядку: *Pl* 3'-кінець, *Pl* 5'-кінець, p1.5 B22, pJZPX, центромера (див.: Zhang, Peterson, 1999).

9.4. Механізми і відносні частоти нормальної і нелінійної (альтернативної) транспозицій та цитогенетичні підтвердження хромосомних перебудов

Згадаємо, що в кінці 1940-х рр. Б. МакКлінток, досліджуючи хромосомні розриви у кукурудзи, відкрила систему рухомих елементів *Activator/Dissociation (Ac/Ds)* (McClintock, 1946, 1947, 1948, 1949, 1950). Вона виявила лінію кукурудзи, в якій розрив часто відбувався в певному сайті короткого плеча хромосоми 9; автор назвала цей локус *Dissociation (Ds)* у зв'язку з його здатністю розривати хромосоми. Б. МакКлінток також встановила, що розрив хромосоми у локусі *Ds* потребує присутності в геномі ще одного чинника — активатора (*Activator, Ac*). За присутності *Ac* *Ds*-елементи, що індукують розриви хромосом (*Ds*, стан I), можуть переходити в інший стан (*Ds*, стан II), за якого рідко виникає хромосомний розрив (McClintock, 1949). Коли *Ds*-елементи стану II було клоновано з низки локусів, сиквенс показав, що значна частина з них — це делетовані варіанти *Ac*. Певну кількість *Ds*-елементів стану I було також клоновано. Вони склалися з подвоєних елементів (*double Ds*, стан II *Ds*-елементів, вставлених у ще одну копію того самого елемента у протилежній орієнтації) та їхніх похідних із внутрішньою делецією (*sesqui Ds*) (делеталі і посилення див.: Yu et al., 2010).

Ac-елемент містить 4565 п. н. і кодує мРНК розміром 3,5 т.п.н., що може бути трансльована у транспозазу, яка складається з 807 амінокислот. Транспозаза використовує 5'- та 3'-кінці пари *Ac/Ds* як субстрати: два 5'-кінці *Ac* так само, як і два 3'-кінці *Ac* не здатні до транспозиції. Функціональні тести показали, що 238 та 209 п. н. 5'- та 3'-кінців *Ac*, відповідно, необхідні для ефективного вирізання *Ac/Ds*. Ці послідовності містять термінальні інвертовані повтори розміром 11 п. н. і численні копії субтермінальних гексамерних мотивів (AAACGG і т.п.), з якими *Ac*-транспозаза зв'язується (Becker, Kunze, 1997; Kunze, Weil, 2002). *Ac/Ds*-елементи транспозують за допомогою механізму «виріз і встав»: донорний елемент вирізається фізично і зазвичай реінтегрує у нову ділянку геному. Вирізання *Ac/Ds*-елемента часто залишає «слід» (невелику зміну послідовності) у донорному сайті, а повторна вставка у новому локусі облямовується (фланкується) дуплікаціями цільового сайту розміром 8 п. н. (Kunze, Weil, 2002).

За допомогою ПЛР та сиквенс-аналізів було встановлено, що *doubleDs* або два *Ds*-елементи у протилежних орієнтаціях можуть викликати

хромосомний розрив шляхом реакцій альтернативної транспозиції за участі 5'-кінця *Ds*-елемента однієї хроматиди та 3'-кінця *Ds* сестринської хроматиди. Вирізання цих кінців *Ds* і зшивання послідовностей, що їх облямовують, приводить до формування хроматидного мосту, який рветься у наступному мітотичному поділі. Аналіз структури елемента *doubleDs* і функціональні випробування на тютюні *Nicotiana tabacum* показали, що пари 5'- та 3'-кінців *Ds*-елементів у прямій орієнтації достатньо, щоб здійснити розрив хромосоми (English et al., 1993, 1995); ця ж конфігурація наявна в хромосоморозривальних структурах, включаючи *doubleDs*, *sesquiDs* (Martinez-Ferez, Dooner, 1997) та два *Ds*-елементи у протилежній орієнтації у локусі кукурудзи *wx1* (Weil, Wessler, 1993). Крім того, деякі пари тісно зчеплених *Ac/Ds* або *Ac/fAc* (*fracturedAc* — термінально делетована послідовність, що містить тільки 5'- чи 3'-кінець *Ac*) елементів поблизу локусу кукурудзи *bz1* може також індукувати хромосомний розрив, але їх відносні орієнтації не відомі (Ralston et al., 1989; Dooner, Belachew, 1991; Weil, Wessler, 1993; Martinez-Ferez, Dooner, 1997). На основі транспозиції частково реплікованого макротранспозона було запропоновано модель хромосомного розриву (див.: Ralston et al., 1989).

Зворотний зв'язок між частотами хромосомних розривів порівняно з нормальним вирізанням спостерігали також у рослин тютюну, що містили генно-інженерні *Ds*-конструкти: подвійні *Ds*-елементи сприяють виникненню хромосомних розривів з великою частотою, але швидкість їх вирізання набагато менша, ніж у простих *Ds*-елементів. Отже, присутність подвійної *Ds*-конфігурації інгібує просте вирізання окремих *Ds*-субодиниць. Причина цього не зрозуміла, але було висловлено припущення, що повторювані 3'- і 5'-кінці *Ds*-елемента, коли вони присутні разом у подвійному *Ds*-елементі, як субстрат для *Ac*-транспозази мають перевагу перед кінцями нормальної орієнтації. У випадку алелі *PI-vv-9D9A* просте вирізання інтактного *Ac*-елемента легко виявити за наявністю червоних ревертантних секторів і зародкових *PI-rr*-ревертантів (див. розділ 9.1). Характер строкатості (червоні смуги), що визначається алеллю *PI-vv-9D9A*, дуже подібний до строкатості стан-

дартної алелі *PI-vv*, яка містить одну *Ac*-вставку в гені *PI-rr*. Отже, просте вирізання *Ac* помітно не інгібується прилеглим *fAc*-елементом в алелі *PI-vv-9D9A*, хоча ця алель містить безпосередньо повторювані 3'- і 5'-кінці у такій же конфігурації, що і природні, і сконструйовані подвійні *Ds*-елементи (див.: English et al., 1993, 1995).

І навпаки, нелінійні транспозиції *Ac/fAc*-елементів в алелі *PI-vv-9D9A* фрагментуватимуть ген *PI* і генеруватимуть незабарвлені сектори перикарпію. З 1500 початків, що мають алель *PI-vv-9D9A*, було отримано 15 початків з великими багатозерновими секторами з незабарвленим перикарпієм, які свідчили про перебудовані алелі, характерні для нелінійної реакції транспозиції. Описана частота NLT є заниженою порівняно з дійсною з кількох причин: по-перше, були відібрані для досліджень лише великі, що легко розпізнаються, багатозернові сектори початка. Незабарвлені сектори, менші за розміром, ніж одне зернятко, важко відрізнити від фону строкатого перикарпію, який сам є мозаїкою червоних смуг на безбарвному фоні перикарпію (фото таких початків див.: Zhang, Peterson, 1999). Наслідком деяких NLT може бути нежиттєздатність, яку не враховували. Тим не менше, для алелі *PI-vv-9D9A* нелінійна транспозиція відбувається набагато рідше, ніж частота простої *Ac*-ексцизиї (вирізання). Параметри, що впливають на схильність певних *Ac/Ds*-кінців брати участь у нормальних і аберантних реакціях транспозиції, ще не вивчені.

Порівняно нещодавно унікальні можливості локусу кукурудзи *p1*, зокрема алель *p1-vv9D9A*, що містить повномірний *Ac*-елемент і *fAc*-елемент (2039 п. н. від 3'-кінця *Ac*), вставлені в нітрон 2 гена *p1*, було використано для вивчення структурних особливостей *Ac/Ds*-індукованого хромосомного розриву (Yu et al., 2010). Застосовуючи простий візуальний скринінг змін пігментації перикарпа зерна, автори виділили серію з 15 алелей, в якій *Ac*-елемент у *p1-vv9D9A* транспозував у сусідній сайт, у той час як *fAc*-елемент залишався у вихідному положенні. У кожній алелі 5'-кінець *Ac* і 3'-кінець *fAc* перебувають у прямій чи зворотній орієнтації; до того ж, деякі алелі містять сегменти геномної ДНК, фланковані *Ac/fAc*-елементами, що можуть поводити себе як макротранспозони (рис. 9.5). Було визначено

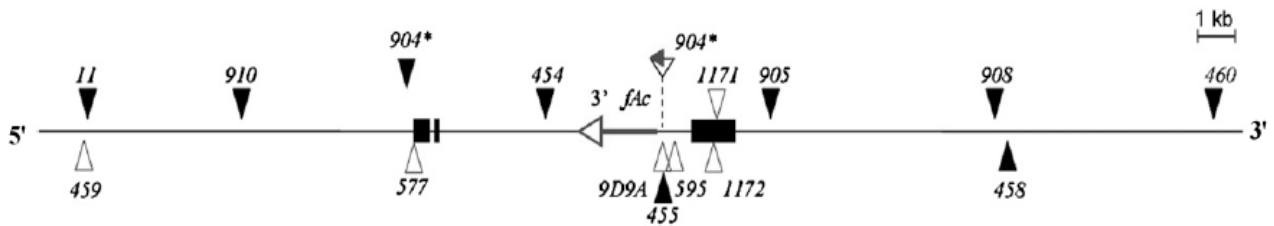


Рис. 9.5. Схема транспозицій мобільного елемента *Ac* у ген *P1* кукурудзи: локалізації вставок *Ac* і *fAc* у різних алелях гена *p1* деяких зразків кукурудзи

Суцільні чорні прямокутники (зліва направо) позначають екзони 1, 2 і 3 гена *p1*. Трикутники з номерами алелей вказують на сайти вставки *Ac/fAc* в кожній алелі. Незабарвлені трикутники позначають *Ac*-елементи у тій самій транскрипційній орієнтації, що і ген *p1* (від 5' до 3', зліва направо), забарвлені трикутники означають *Ac*-вставки у протилежній орієнтації. Алель *P1-rr904* помічено зірочкою, оскільки вона містить інтактну вставку рухомого елемента *Ac* і, до того ж, вставку *fAc* розміром 685 нт у тій же позиції, що й елемент *Ac* у *p1-rr9D9A* (за: Yu et al., 2010)

частоту хромосомних розривів, індукованих кожною алеллю, використовуючи візуальну оцінку втрат зчепленого маркерного гена *Dek1*. Отримані дані показали, що пара кінців *Ac*-елемента у танDEMній чи зворотній орієнтації може викликати хромосомний розрив і що частота хромосомних розривів обернено пропорційна відстані між *Ac*-кінцями. Цікаво, що значних хромосомних розривів не було виявлено, якщо *Ac/fAc*-кінці перебували у макротранспозонних конфігураціях. Крім того, застосовуючи цитогенетичні методи, було підтверджено наявність мостів і фрагментів у частині алелей. Ці результати важливі для створення моделі хромосомних розривів на основі реакцій альтернативної транспозиції.

У звичайних реакціях транспозиції задіяні 5'- та 3'-кінці окремого транспозона. У реакціях макротранспозиції беруть участь зовнішні кінці складного елемента (макротранспозона). Кінцевий результат звичайної транспозиції чи макротранспозиції — це зміна положення елемента у геномі.

Навпаки, у реакціях альтернативної транспозиції задіяні 5'- та 3'-кінці різних елементів у прямій чи зворотній орієнтації. Альтернативна транспозиція може приводити до великих змін у структурі геному (Huang, Dooner, 2008; Zhang et al., 2009). Алелі, здатні зазнавати реакцій альтернативної транспозиції, індукують значні хромосомні розриви як прямий наслідок злиття сестринських хроматид. У разі прямо орієнтованих кінців *Ac/fAc* (сестринська хроматидна транспозиція) вирізання кінців елемента з наступною зшивкою фланкуючих послідовностей дає ковалентне зчеплення між двома сестринськими

хроматидами (рис. 9.6, А). Якщо вирізані *Ac*-кінці не вставляються у геном або вставляються не у сайт хроматидного мосту, у наступній анафазі дві центромери в сестринських хроматидах рухатимуться до протилежних полюсів, що веде до розриву хроматидного мосту (рис. 9.6, А).

У разі зворотно орієнтованих кінців *Ac/fAc* *Ac*-транспозаза сприймає 5'- та 3'-кінці на одній і тій же хроматиді як субстрати (Zhang, Peterson, 2004; Zhang et al., 2006). За цим сценарієм вставка вирізаних кінців *Ac*-елементів у сайт сестринської хроматиди формуватиме хроматидний міст, який розірветься у наступній анафазі (рис. 9.6, Б). Крім того, вставки в інші хромосоми генеруватимуть реципрокні транслокації (Zhang et al., 2009), половина з яких будуть дицентричними. Ці останні випадки також вважаються процесами розриву хромосом, хоча частота міжхромосомної транспозиції є низькою (Huang, Dooner, 2008; Zhang et al., 2009).

Модель альтернативної транспозиції припускає, що злиття хроматид відбувається як прямий і безпосередній наслідок транспозиції між сестринськими хроматидами (рис. 9.6, А). Отже, усі транспозиції між сестринськими хроматидами генерують хроматидні мости. Єдиним винятком є ті випадки, за яких вирізані транспозонні кінці знову вставляються у проксимальний сайт хроматидного мосту, коли генеруються хроматидні делеції/дуплікації (Zhang, Peterson, 1999). Навпаки, лише частина процесів транспозиції ревертованих *Ac*-кінців (тобто тих, що знову вставляються у сестринську хроматиду) дає хроматидні чи хромосомні мости (рис. 9.6, Б). Отже, сестринська хроматидна транспозиція дає

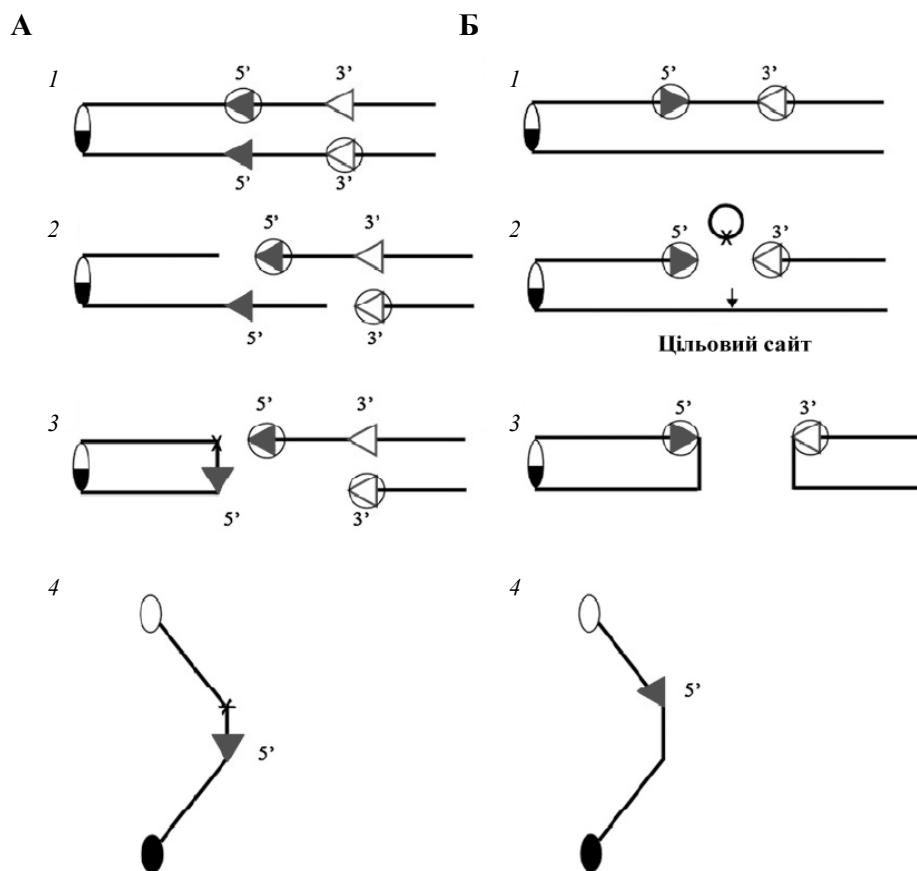


Рис. 9.6. Моделі утворення хромосомних розривів за допомогою мобільних генетичних елементів на прикладі кукурудзи: **А** — модель розриву хромосом у випадку прямо орієнтованих *Ac/Ds*-кінців (сестринської хроматидної транспозиції). Дві лінії означають сестринські хроматиди, з'єднані при центромєрі (овал). Зафарбовані і незафарбовані трикутники репрезентують 5'- та 3'-кінці *Ac/fAc*. Позначка «X» означає «слід», генерований транспозицією. 1 — *Ac*-транспозаза (незафарбовані кружальця) розпізнає 3'- та 5'-кінці *Ac/fAc* на різних сестринських хроматиди; 2 — розщеплення транспозазою відбувається у *Ac*- чи *fAc*-кінцях; 3 — розщеплення приводить до вирізання цілого хромосомного плеча, дистальніше гена *p1*; 4 — формується хроматидний міст. Міст розірветься у наступній анафазі. Утворюється також ацентричний хромосомний фрагмент. **Б** — модель розриву хромосом у випадку зворотно орієнтованої *Ac/Ds*-структури: 1 — *Ac*-транспозаза розпізнає зворотно орієнтовані 3'- та 5'-кінці *Ac/fAc* на одній і тій же хроматиді; 2 — розщеплення транспозазою відбувається у кінці елемента *Ac* чи *fAc*; 3 — вирізані 5'- та 3'-кінці *Ac/fAc* вставляються у цільовий сайт сестринської хроматиди (чорна стрілочка); 4 — формується хроматидний міст. Міст розірветься у наступній анафазі. Утворюється також ацентричний хромосомний фрагмент (за: Yu et al., 2010)

більшу частоту розривів хромосом, ніж транспозиція ревертованих *Ac*-кінців. Проте не встановлено значних відмінностей у частоті хромосомних розривів внаслідок прямо орієнтованих і зворотно орієнтованих *Ac*-кінців (табл. 9.1). Можливо, це зумовлено втратою *Dek1*, що при аналізі може завищувати частоту хромосомних розривів, які виникають у результаті транспозиції ревертованих кінців. Після транспозиції ревертованих кінців вирізані *Ac*-кінці можуть знову вставлятись у сайти, дистальні до локусу *dek1*. Залежно від орієнтації, з якою знову вставляються транспозонні кінці, генерується делеція

або інверсія (Zhang et al., 2006, 2009). У результаті делеції втрачаються ділянки, які містять *Dek1*, що за наслідком імітує процес розриву хромосоми. Таким чином, втрата *dek1* не супроводжується хромосомним розривом. Як правило, аналізи, що ґрунтуються на втраті сусіднього маркерного гена, мають тенденцію завищувати частоту хромосомних розривів, індукованих транспозицією ревертованих *Ac*-кінців (подробіці див.: Yu et al., 2010).

За цитогенетичного дослідження кінчиків коренів сіянців виявили кілька випадків хромосомних мостів у рослин, що містять алелі

Таблиця 9.1

Частота хромосомних розривів у різних алелях гена *P1* кукурудзи (за: Yu et al., 2010)

Назва алелі	Відстань між 3'- і 5'-кінцями <i>Ac/fAc</i> (нт) ^a	Рівень розривів в окремих початках (загальна кількість початків)	Середній рівень розривів (СР)
Прямо орієнтовані			
<i>Ac/fAc</i>			
<i>P1-rr459</i>	17,840	2, 1, 1, 1 (4)	1,3 (0,3)
<i>p1-vv577</i>	8,889	2, 2 (2)	2,0 (0,0)
<i>p1-vv1171</i>	3,621	2, 3, 3 (3)	2,7 (0,3)
<i>p1-vv1172</i>	3,550	2, 2, 2, 3 (4)	2,3 (0,3)
<i>p1-vv595</i>	2,611	3, 3 (2)	3,0 (0,0)
<i>p1-vv9D9A</i>	2,151	3, 3, 3, 3, 3, 3, 3 (7)	3,0 (0,0)
Зворотно орієнтовані			
<i>Ac/fAc</i>			
<i>P1-rr11</i>	13,175	1, 1, 1, 1, 1, 1 (6)	1,0 (0,0)
<i>P1-rr910</i>	8919	2, 2, 2, 2 (4)	2,0 (0,0)
<i>P1-ovov454</i>	823	3, 3 (2)	3,0 (0,0)
Макротранспозони			
<i>P1-ovov455</i>	6,809	0, 0, 0, 0 (4)	0,0 (0,0)
<i>P1-rr905</i>	9,774	0, 0, 0, 0, 0, 0, 1 (8)	0,1 (0,1)
<i>P1-rr908</i>	16,060	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 (8)	0,0 (0,0)
<i>P1-rr458</i>	16,538	0, 0, 0, 0 (4)	0,0 (0,0)
<i>P1-rr460</i>	21,741	0, 0, 0, 0 (4)	0,0 (0,0)
Контроль			
<i>p1-vv</i>	N/A	0, 0, 0, 0 (4)	0,0 (0,0)
<i>P1-rr::fAc</i>	N/A	0, 0 (2)	0,0 (0,0)
<i>P1-rrfAc; r1-nj::Ac</i>	N/A	0, 0 (2)	0,0 (0,0)
Інші			
<i>P1-rr904</i>	9,178/6716/2151 ^б	4, 4, 4, 4 (4)	4,0 (0,0)

Позначення:

^a нт — нуклеотиди;^б алель *P1-rr904* містить інтактну вставку *Ac* і додаткову вставку *fAc* розміром 685 нт у тому ж положенні, що й елемент *Ac* у *p1-vv9D9A*. Алель має три можливі пари *Ac/fAc*-кінців.

p1-vv9D9A та *P1-rr11*. Однак у мітозі дуже конденсовані хромосоми кукурудзи важко ідентифікуються (візуалізуються). Навпаки, у мікроспороцитах кукурудзи, що за розміром набагато більші, ніж мітотичні клітини, хромосоми можна візуалізувати значно детальніше, і впродовж першого мейотичного поділу гомологічні хромосоми перебувають на стадії «букета» (синаптична стадія), що значно полегшує цитогенетичні аналізи. У разі *p1-vv9D9A* транспозиція у сестринських хроматидах прямо орієнтованих кінців *Ac*-елемента сама по собі не генерує хроматидного мосту в анафазі I мейозу, оскільки

цей поділ сегрегує гомологічні хромосоми, а не сестринські хроматиди. Однак транспозиція у сестринських хроматидах з наступним кросинговером між гомологічними хромосомами будь-де в ділянці між центромерою і *p1*-локусом (на відстані близько 50 сантиморганід) генерує міст, який видно на стадії анафази I. Аналогічно, транспозиція ревертованих кінців з наступним проксимальним кросинговером між гомологами може також генерувати міст у анафазі I. Міжхромосомна транспозиція може також генерувати дицентричні хромосоми, але це відбувається зі значно меншою частотою (Zhang et al., 2009).

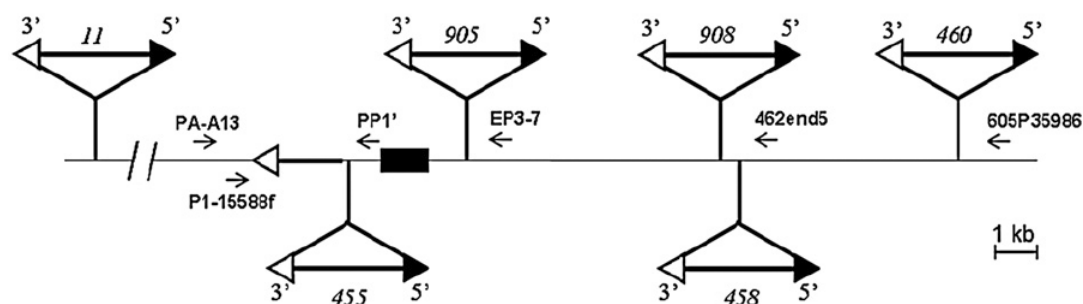


Рис. 9.7. Виявлення явища вирізання соматичного макротранспозона за допомогою ПЛР у кукурудзи

Молекулярні структури алелів гена *p1*, що містять можливі макротранспозони. П'ять алелів (*P1-ovov455*, *P1-rr905*, *P1-rr908*, *P1-rr458* та *P1-rr460*) мають рухомий елемент *Ac*, розташований нижче елемента *fAc* таким чином, що 5'-кінець *Ac* і 3'-кінець *fAc* функціонують разом як макротранспозон. Великі зафарбовані і незафарбовані стрілки позначають 5'- і 3'-кінці *Ac/fAc*. Положення олігонуклеотидних праймерів, застосовані для ПЛР, вказані малими стрілками. Рисунок відповідає масштабу, за винятком того, що ділянка довжиною 8,5 т. п. н. (позначена двома рисками як //), яка містить 5'-ділянку гена *p1*, екзон 1, інтрон 1, екзон 2 і частину інтрона 2, не показана (за: Yu et al., 2010)

Таким чином, отримано цитологічні свідчення того, що процеси альтернативної транспозиції можуть продукувати мости і фрагменти в анафазі I і телофазі I мейозу (детально результати цього дослідження викладено у роботі: Yu et al., 2010).

Спираючись на результати, отримані Yu et al. (2010) і викладені вище, та дані, наведені у роботі (Huang, Dooner, 2008), *Ac/Ds*-індуковані хромосомні розриви можна повністю пояснити як наслідок процесів альтернативної транспозиції. Хоча реакції альтернативної транспозиції відбуваються рідше, ніж звичайна транспозиція (Huang, Dooner, 2008; Zhang et al., 2009), алелі, що містять певні *Ac/Ds*-конфігурації, можуть індукувати хромосомні розриви з досить високою частотою (рис. 9.7). Ці алелі індукують спадкові делеції, дуплікації, інверсії і транслокації. Такі перебудови можуть бути корисними для функціонального геномного аналізу або хромосомної інженерії (Zhang, Peterson, 1999, 2004, 2005; Huang, Dooner, 2008). Для застосування у функціональній геноміці створено колекції ліній, що містять вставки, марковані *Ds*-послідовностями (Ahern et al., 2009).

Припускається, що реакції альтернативної транспозиції є додатковою можливістю застосування описаних ліній кукурудзи з *Ds*-вставками.

9.5. Значення NLT-індукованих перебудов

Низка фізичних і генетичних чинників може викликати у рослин делеції у випадкових сайтах. Навпаки, NLT сестринських хроматид має

Перші генетичні дослідження на кукурудзі показали, що *Ac/Ds*-елементи часто транспозують від реплікованого донорного сайту до сусіднього нереплікованого цільового сайту (Greenblatt, Brink, 1962; Greenblatt, 1984). Це може генерувати пари тісно зчеплених елементів, які, за передбаченнями, можуть зазнавати процесів альтернативної транспозиції й індукувати хромосомний розрив; такі спарені елементи можна ідентифікувати шляхом скринінгу ліній, що мають втрату дистальних хромосомних маркерів (Yu et al., 2010). Подібна стратегія була застосована Neuffer (1995) для ідентифікації ліній, що містять хромосоמו-розривальні *doubleDs*-елементи, вставлені у 10 хромосомних плечей кукурудзи. У такий спосіб пари тісно зчеплених *Ac/Ds*-елементів можливо ідентифікувати і використовувати для генерування хромосомних перебудов у специфічних (визначених) ділянках, включаючи делеції, дуплікації, інверсії і транслокації (див.: Huang, Dooner, 2008; Zhang, Peterson, 1999, 2005; Zhang et al., 2009; Yu et al., 2010). Здатність генерувати ці типи крупних хромосомних перебудов доповнює методи маркування окремих генів і, тим самим, збільшує корисність ліній кукурудзи із *Ac/Ds*-вставками для потреб функціональної геноміки.

сайтів. Делеція кінцевих точок являє собою сайти інсерції нелінійного транспозона; у разі транспозиції за участю *Ac*-елемента ці сайти можуть опинитися відносно близько один від одного завдяки тенденції *Ac* переміщатися до прилеглих ділянок. Утворювані осередки делецій можна використовувати, щоб швидко картувати молекулярні маркери у відносно малому генетичному інтервалі, чого важко досягти за стандартного мейотичного картування внаслідок його малої роздільної здатності. Отримувати делеції за допомогою сестринської хроматидної транспозиції можливо і в сайтах по всьому геному шляхом трансформації трансгенних конструктів, що містять *Ac*-кінці і репортерний ген, втрата якого легко виявляється. Крім того, NLT можуть утво-

рювати дуплікації різного розміру, що може бути корисним для вивчення впливу дози гена на рівень експресії.

NLT-модель передбачає, що вставка нелінійного транспозона в певний сайт на іншій хромосомі генеруватиме різні хромосомні перебудови, зокрема транслокації, ацентричні фрагменти і дицентричні хромосоми. Отже, саме нелінійна транспозиція може бути причиною крупних хромосомних перебудов, що спостерігаються у споріднених видів (Bennetzen et al., 1998). Більше того, оскільки хромосомні перебудови у потомства, гетерозиготного за пращурним генотипом, часто можуть призводити до часткової стерильності, NLT веде до репродуктивної ізоляції і, отже, є важливим першим кроком видоутворення.

Розділ 10. РОЛЬ МГЕ В ЕВОЛЮЦІЇ ГЕНОМУ РОСЛИН

Геноми рослин дуже варіюють за своїм розміром. Наприклад, у злаків розміри геному складають від $2,7 \times 10^8$ п. н. у *Brachypodium distachyon* до $1,7 \times 10^{10}$ п. н. у м'якої пшениці *T. aestivum*. Такі великі відмінності неможливо пояснити відмінностями вмісту генів, тому що цей вміст є достатньо консервативним у різних видів (Bennetzen, 2000, 2007).

Одним із поширених механізмів збільшення розмірів геному у квіткових рослин є поліплоїдія (Грант, 1991; Wendel, 2000, Патрушев, Минкевич, 2007). Окрім поліплоїдії, відмінності розмірів геному значною мірою зумовлені варіюючою кількістю повторюваних послідовностей ДНК, що підтверджується даними сиквенування геномів рослин (табл. 10.1).

Так, у рослин з малим розміром геному, таких як *Brachypodium distachyon*, *Arabidopsis thaliana* і *Oryza sativa*, МГЕ складають 14–34% геному. Види з великим розміром геному мають вищий вміст МГЕ, наприклад 84% — у кукурудзи та 70–90% — у видів із триби Triticeae, таких як *Hordeum*, *Aegilops* і *Triticum* (Paux et al., 2006; Charles et al., 2008; Wicker et al., 2009; Choulet et al., 2010).

Показано, що за останні 5 млн років геноми кукурудзи, бавовнику і виду рису *Oryza australiensis* збільшилися майже вдвічі за рахунок ампліфікації МГЕ (SanMiguel et al., 1998; Hawkins et al., 2006; Piegu et al., 2006).

Найвагоміший вклад у збільшення розмірів геномів рослин внесли МГЕ I класу, зокрема LTR-вмісні ретротранспозони (Bennetzen, 2000, 2007), частка яких складає близько 20% геномних послідовностей у рису і не менше 60% у пшениці та кукурудзи (Choulet et al., 2010).

Переважаання ретротранспозонів пояснюється їх розмноженням за допомогою механізму «копіюй-встав», який дає можливість різкого збільшення числа копій. Величезний потенціал ампліфікації *LINE*-ретротранспозонів показано у видів роду *Lilium*: 14 проаналізованих видів мають величезні геноми розміром близько 30–45 млрд п. н., що є результатом ампліфікації ретротранспозонів (Joseph et al., 1990; Leeton, Smyth, 1993).

ДНК-транспозони також вносять свій вклад у збільшення розміру геному, незважаючи на те, що нереплікативний спосіб розмноження «вириж-встав» обмежує їхню ампліфікацію.

Таблиця 10.1

Розміри геномів деяких видів* рослин і частка мобільних генетичних елементів у них
(за: Сергеева, Салина, 2011)

Вид	Розмір геному, п. н. (10^6)	Вміст МГЕ, %	Літературне джерело
<i>Brachypodium distachyon</i>	270	26	The International Brachypodium Initiative, 2010
<i>Oryza sativa</i>	389	34	International Rice Genome Sequencing Project, 2005
<i>Sorghum bicolor</i>	730	63	Paterson et al., 2009
<i>Zea mays</i>	2300	84	Schnable et al., 2009
<i>Triticum aestivum</i>	17 000	88	Choulet et al., 2010, аналіз $1,3 \times 10^7$ п. н. хромосоми 3В
<i>Arabidopsis thaliana</i>	125	14	The Arabidopsis Genome Initiative, 2000
<i>Vitis vinifera</i>	487	41	Jaillon et al., 2007
<i>Populus trichocarpa</i>	485	42	Tuskan et al., 2006
<i>Carica papaya</i>	372	52	Ming et al., 2008
<i>Cucumis sativus</i>	243	24	Huang et al., 2009
<i>Glycine max</i>	1100	59	Schmutz et al., 2010

* Представлено види, геноми яких сиквеновано (за винятком *Triticum aestivum*).

Існують альтернативні механізми збільшення кількості копій ДНК-транспозонів: за рахунок транспозиції під час реплікації геномної ДНК хазяїна, коли інсерція відбувається у ще нерепліковану ділянку з уже реплікованої; за рахунок репарації дволанцюгового розриву після вирізання елемента (генна конверсія) (Feschotte, Pritham, 2007). У пшениці, ячменю та егілопса серед ДНК-транспозонів найбільш відомою є надродина *CASTA* (більше 87% усіх ДНК-транспозонів) — на неї припадає 5–10% геному (Charles et al., 2008; Wicker et al., 2009; Choulet et al., 2010). Геноми рослин також несуть велику кількість *MITE*-елементів у кількості до сотень тисяч копій, на які припадає близько 5,5% геномної послідовності.

Окрім збільшення розміру геному за рахунок ампліфікації МГЕ, існують також протидіючі механізми видалення послідовностей ДНК із геномів. Один із таких механізмів пов'язаний з рекомбінацією між LTR-вмісними ретротранспозонами. У тому випадку, коли йде незаконна рекомбінація між двома LTR, що фланкують один елемент, утворюється solo-LTR, при цьому термінальний повтор і внутрішня послідовність елемента губляться. Нерівний кросинговер між двома гомологічними LTR-транспозонами, що мають різну геномну локалізацію залежно від хромосомної локалізації і орієнтації елементів, може викликати делецію чи дуплікацію послідовності ДНК або такі геномні перебудови, як інверсії і реципрокні транслокації (див. розділ 9). Показано, що у геномах арабідопсиса і рису незаконна рекомбінація між LTR-ретротранспозонами веде до втрати геномної ДНК шляхом накопичення коротких делецій (Devos et al., 2002; Ma et al., 2004). Дія цих процесів привела до того, що більшість LTR-вмісних ретротранспозонів, ідентифікованих у геномах рослин, є відносно молодими (час інсерції у геном — 4 млн років тому) (Devos et al., 2002; Ma et al., 2004; Bennetzen et al., 2005). Аналіз часу інсерції МГЕ у геномах п'яти видів покритонасінних (*Lotus japonicus*, *Medicago truncatula*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Triticum monoccoccum*) показав, що швидкість видалення LTR-вмісних ретротранспозонів із геномів варіює між різними таксономічними групами, наприклад, у геномах злакових вона нижча, ніж у геномах бобових. Однак більш сут-

тєвим чинником, який впливає на розмір геному, є ампліфікація МГЕ (Vitte, Bennetzen, 2006). Наприклад, протягом останніх 2–5 млн років із геному рису було видалено більше 190 млн п. н. послідовностей LTR-ретротранспозонів за високої швидкості ампліфікації ретроелементів, що у підсумку привело до збільшення геному (Ma, Bennetzen, 2004).

Таким чином, наразі вважається, що структура рослинного геному значною мірою визначається специфічністю, кількістю й активністю рухомих генетичних елементів — як ДНК-транспозонів, так і ретротранспозонів (Casacuberta, Santiago, 2003; Bennetzen, 2005; Vitte, Bennetzen, 2006; Патрушев, Минкевич, 2007; Tian et al., 2009; Nielen et al., 2010; Сергеева, Салина, 2011). У рослин ампліфікація і видалення (редукція кількості) МГЕ є досить швидкими еволюційними процесами, що пояснює, зокрема, загальну відсутність гомології генів у видів, що дивергували понад 10 млн років тому.

Встановлено, що такі процеси дивергенції можуть відбуватися досить швидко. Наприклад, за вивчення культурного арахісу *Arachis hypogea* ($2n = 4x = 40$, тетраплоїд з АВ-геномом, виник близько 3500 років тому) і його предкових форм *A. duranensis* ($2n = 20$, А-геном) та *A. ipaensis* ($2n = 20$, В-геном) було відкрито новий *Ty3/gypsy* *Athila*-подібний досить довгий інтердисперсний евхроматиновий LTR-вмісний транспозон FIDEL (Fairly long Inter-Dispersed Euchromatic LTR-retrotransposon). Вивчення значення цього транспозона для еволюції і дивергенції різних геномів арахісу показало, що він частіше зустрічається в А-, ніж у В-геномі з числом копій на гаплоїдний геном — близько 3000 у *A. duranensis*, 820 у *A. ipaensis* та 3900 у *A. hypogea*. Філогенетичний аналіз зворотно-транскриптажних послідовностей показав їх відмінну еволюцію у видів-пращурів. Виявлено дисперсний розподіл в евхроматині і відсутність послідовностей транспозона в центромерах, теломерних ділянках і ділянці ядерцевого організатора. Встановлено, що біля консервативних предкових генів МГЕ вставляються рідше, ніж біля швидко еволюціонуючих генних гомологів, зокрема біля генів стійкості до хвороб (Nielen et al., 2010).

Припускається, що ядерні геноми квіткових рослин мають близьку кількість генів та подіб-

ний їх колінеарний порядок (розташування) на хромосомі. Колінеарність геному покритонасінних існує поряд із більше ніж 800-кратною відмінністю розмірів геномів у різних видів (Bennet, Leith, 1995).

Більша частина мінливості розмірів ядерних геномів зумовлена диференціальною ампліфікацією і/або утриманням транспозонів, що містять довгі кінцеві повтори (LTRs) (Bennetzen, 2002, 2005). У видів з великими геномами, таких як кукурудза, ячмінь або пшениця, гени часто розташовані у вигляді малих острівців, оточених морями LTR-ретротранспозонів. У них ортологічні гени часто мають екстенсивну колінеарність, яку ще називають мікроколінеарністю. Однак транспозабельні елементи й інші послідовності у міжгенних ділянках зазвичай зовсім різні навіть за порівняння таких видів, як сорго і кукурудза чи пшениця і ячмінь, що востаннє мали спільних предків менше ніж 15 млн років тому (Tikhonov et al., 1999; Ramakrishna et al., 2002). Крім того, у більшості ортологічних геномних сегментів різних рослинних видів, включаючи такі випадки, коли порівнювалися достатньо споріднені види, такі як кукурудза і сорго або *Arabidopsis thaliana* і *Capsella rubella*, виявлено кілька неколінеарних генів (Tikhonov et al., 1999; Voivin et al., 2004). Більшість цих порівняльних аналізів проводили на злаках, переважно на ку-

курудзі, сорго і рисі, для яких встановлено, що близько 35 % генів перемістилось у нові локуси за близько 12 млн років з часу, коли кукурудза і сорго дивергували від спільного предка (Lai et al., 2004). У той же час для ссавців описано значно вищий рівень консервації порядку і вмісту генів. Причини цієї дивної різниці ще не зрозумілі.

У рису і кукурудзі описано незвичні частоти внутрішньовидових генних перебудов. Висновки про те, що багато генів рису (Feng et al., 2002; Han, Xue, 2003) і понад 30 % генів кукурудзи (Brunner et al., 2005) не є колінеарні навіть усередині виду, здавалося б суперечать фактам, що будь-яка колінеарність є консервативною за віддаленіших порівнянь. Однак подальші аналізи показали, що більшість, а можливо, і всі неколінеарні гени рису є транспозонами, які хибно трактувались як гени (Han, Xue, 2003; Ma, Bennetzen, 2004), і що більшість неколінеарних послідовностей, які трактувались у кукурудзі як гени, насправді є фрагментами генів (Brunner et al., 2005). Спираючись, головним чином, на дані, наведені в оглядах (Bennetzen, 2005; Bennetzen et al., 2005), розглянемо походження неколінеарностей, які спостерігаються у геномах квіткових рослин. Вони свідчать про активні процеси створення генів у квіткових рослин, які конкурують із механізмами постійного видалення генів і зменшення геному.

10.1. Зміна кількості послідовностей ДНК

Як і всі інші евкаріоти, рослини збільшують вміст ДНК в ядерних геномах шляхом поліплоїдії, сегментної дуплікації та ампліфікації транспозонів. З ще не відомих причин рівень принаймні деяких з цих процесів у рослин виключно високий. Майже 100 % сучасних квіткових рослин є поліплоїдами або ж виникли внаслідок палеополіплоїдних процесів упродовж 200 млн років їх еволюції (Adams, Wendel, 2005). Порівняльні генетичні карти вказують на наявність сегментних дуплікацій, частина з яких охоплює цілі хромосоми чи хромосомні плечі, а аналіз за допомогою ВАС-послідовностей (bacterial artificial chromosomes) свідчить про безліч тандемних родин генів. У всіх досліджених покритонасінних з гаплоїдними геномами, більшими за 2000 млн п.н. (м.п.н.), понад 50 % ядерної

ДНК складається з LTR-вмісних ретротранспозонів й інших повторів. Враховуючи, що розмір 1С геному покритонасінних рослин складає сотні і тисячі м.п.н., можна зробити висновок, що більшість рослинної ДНК на планеті складається з транспозонів. Переважна кількість їх є недавніми вставками. Наприклад, понад 80 % інтактних LTR-ретротранспозонів усіх проаналізованих покритонасінних датуються як вставки, що мали місце впродовж останніх п'яти мільйонів років (Ma et al., 2004). Зокрема, показано, що *Oryza australiensis* — дикий родич азійського культурного рису *O. sativa* — зазнав недавніх вибухів трьох родин LTR-транспозонів. За останні три мільйони років цей геном накопичив більше, ніж 90 000 копій ретротранспозонів, що привело до швидкого двократного збільшення його роз-

міру. Фенетичні аналізи цих ретротранспозонів підтвердили, що геномні вибухи відбулися після еволюційної радіації видів, що є прямим доказом мінливості розміру геному в рослинному роді, обумовленому ретротранспозонами (Piegu et al., 2006).

Такий винятковий темп зростання кількості ДНК рослинних геномів конкурує з такою ж високою швидкістю видалення послідовностей. Нерівна гомологічна рекомбінація, зазвичай шляхом внутрішньохроматидних процесів, може перетворити інтактний LTR-вмісний ретротранспозон у solo-LTR або видалити хромосомні послідовності між двома LTR-ретротранспозонами тієї ж родини (Ma et al., 2004; Ma, Bennetzen, 2004; Bennetzen et al., 2005). На прикладі арабідопсиса, рису і пшениці показано, що видалення більшості таких хромосомних послідовностей, очевидно, зумовлене маленькими делеціями внаслідок незаконної рекомбінації. І хоча точний механізм ще не відомий, вірогідним кандидатом може бути делеція, пов'язана з репарацією дволанцюгових розривів (Kirik et al., 2000).

Проведено дослідження особливостей елімінації ДНК у LTR-вмісних ретротранспозонах рису *O. sativa*, зокрема, вивчено розподіл і структурну мінливість LTR-вмісних ретротранспозонів у зв'язку з рівнем локальної генетичної рекомбінації (ГР) і щільності генів (Tian et al., 2009). Автори встановили позитивну кореляцію між рівнем ГР і щільністю генів та негативну кореляцію між щільністю LTR-вмісних ретротранспозонів і ГР та щільністю генів. Було також виявлено тенденцію для LTR-транспозонів і їхніх фрагментів до їх вкорочення у ділянках з високим рівнем ГР. Укорочення МГЕ відбувалося, очевидно, завдяки нерівній гомологічній рекомбінації з утворенням solo-LTR-транспозонів. Порівняння різних підвидів рису — *indica* і *japonica* — виявило особливості набуття і втрати LTR-вмісних ретротранспозонів у різних еволюційних проміжках часу. Зокрема, показано, що різні родини цих ретротранспозонів мали різний характер розподілу і структурних змін, але в цілому склад LTR-транспозонів і гени були організовані у геномі відповідно до градієнтів ГР. Дослідження LTR-невмісних ретротранспозонів і ДНК-транспозонів виявило негативну кореляцію між генною щільністю і чисельністю ДНК-транс-

позонів та слабку кореляцію між рівнем ГР і чисельністю LINE/SINE-елементів. Тобто ці дослідження засвідчили, що рівень локальної генетичної рекомбінації (ГР) і генна щільність відіграють ключову роль у формуванні динамічної структури геному рису (детальніше див.: Tian et al., 2009).

Порівняльний аналіз змін послідовностей у кількох родин ретротранспозонів, проведених на рисі й арабідопсисі, показав, що в обох видів рослин відбулося накопичення малих делецій, викликаних нерівною гомологічною і незаконною рекомбінаціями. Відносний внесок нерівної ГР порівняно з незаконною рекомбінацією був вищим у рису порівняно з арабідопсисом. Однак у обох видів ретротранспозони швидко видалялися, про що свідчить однаковий вік інтактних елементів (у більшості випадків менше 3 млн

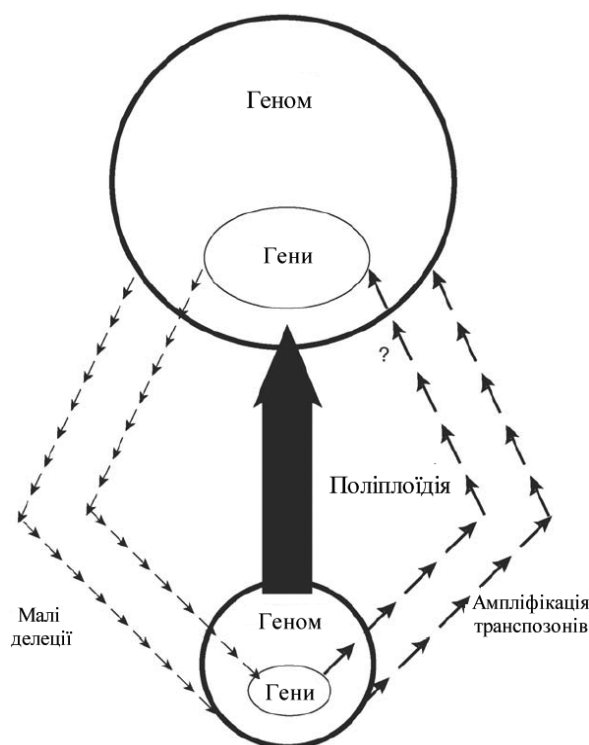


Рис. 10.1. Схематичне зображення процесів, що генерують якісні і кількісні зміни у кількості і вмісті сумарної ДНК в ядерних геномах рослин

Малі стрілки позначають незначні процеси, великі стрілки вказують на великі процеси. Сегментна дуплікація може також бути фактором, що збільшує кількість генів, але у меншому масштабі, ніж поліплоїдизація. Знак питання вказує на те, що ще не ясно, до якої міри транспозони, подібні до *Helitrons* та *Pack-MULEs*, насправді можуть створювати нові гени, а не просто збирати химерні структури, які схожі на нові гени, або подвоювати існуючі гени (за: Bennetzen, 2005)

років) у цих двох і всіх інших досліджених видів рослин. Автори вважають, що відмінності між видами в активності механізмів регуляції ретротранспозонів чи генеруванні делецій можуть пояснити нинішні відмінності у розмірі геному без будь-якої потреби у природному доборі, що діє на цю ознаку, хоча результати не виключають селекції як впливового чинника. Припускається, що значні відмінності у розмірі геному зумовлені спадково-специфічними відмінностями молекулярних механізмів ампліфікації і видалення ДНК, які створюють високу мінливість за вмістом ДНК, що може слугувати субстратом для добору на адаптивність (Bennetzen et al., 2005).

У квіткових рослин найчастіший розмір делецій — це 1–2 п.н., ці й більші делеції можуть приводити до дуже ефективного видалення всіх класів ДНК, які не підтримуються природним добором. Так, період напівжиття послідовностей LTR-вмісних ретротранспозонів у рису менший, ніж три мільйони років. Цим може бути обумовлене видалення понад 194 м.п.н. ДНК LTR-ретротранспозонів за останні вісім мільйонів років. Разом з тим відомо, що геноми двох підвидів рису — *japonica* та *indica* — за останні кілька сотень тисяч років зросли більше ніж на 2 % зде-

більшого за рахунок LTR-вмісних ретротранспозонів, частота ампліфікації яких випередила частоту видалення ДНК шляхом малих делецій (Ma, Bennetzen, 2004).

Високий рівень мінливості розміру геному покритонасінних нині пояснюється просто — або генеалогічні лінії відрізняються за рівнем частоти зростання геному, скажімо, в результаті нечастої поліплоїдії та/або транспозонних вибухів, або ж вони відрізняються за якісними та/або кількісними особливостями видалення послідовностей ДНК (рис. 10.1). Так, репарація дволанцюгових розривів у невеликому геномі *A. thaliana* супроводжується меншою кількістю інсерцій і більшим середнім розміром делецій, ніж у значно більшому геномі *Nicotiana tabacum* (Kirik et al., 2000). Можливо, що на активність цих двох конкуруючих геном-збільшувальних і геном-зменшувальних механізмів істотно впливають чинники змін у внутрішньому і зовнішньому середовищі, про що свідчить активація рухомих елементів геномним стресом (наприклад, розривом хромосом) або індукція процесів видалення послідовностей у результаті поліплоїдизації *de novo* (McClintock, 1984; Shaked et al., 2001; Madlung, Comai, 2004).

10.2. Створення генів

Більшість близькоспоріднених організмів мають ті самі типи генів, хоча кількість копій генів і їх регуляція можуть змінюватися впродовж коротких проміжків часу еволюційної дивергенції. Навіть явно «нові» чи «сирітські» (англ. — orphan) гени часто можна вивести від великої первинної послідовності, яка дивергувала від предкового гена (Schmid, Aquadro, 2001; Kellis et al., 2003). Отже, більшість справді нових генів, можливо, були створені із «сирої» геномної послідовності сотні мільйонів років тому. Припускається, що пізніше створення химерних генів з новими генетичними функціями відбувалося за допомогою процесу «перетасування екзонів», за якого фрагменти генів зливаються разом, частково виходячи з того, що химерні інтрони часто внаслідок процесингу в остаточному продукті мРНК можуть сформувати інтактні екзони (Gilbert, 1978).

Дійсно, на прикладі квіткових рослин відкрито дуже високий темп створення генів шля-

хом захоплення транспозонами і подальшого перетасування екзонів (Jiang et al., 2004; Gupta et al., 2005; Lai et al., 2005; Morgante et al., 2005). Раніше на кукурудзі було показано, що транспозони можуть захоплювати специфічні генні послідовності й ампліфікувати їх у геномі (Bennetzen, 2005). Наприклад, LTR-вмісним ретротранспозоном кукурудзи *Bs1* захоплювалася частина АТФазного гена, можливо, на рівні РНК, оскільки всі інтрони були втрачені, проте наступна дивергенція селективно утримувала трансмембранні домени гена (Bureau et al., 1994; Jin, Bennetzen, 1994; Palmgren, 1994). *Bs1* кукурудзи був першим LTR-ретротранспозоном, для якого виявлено, що він захоплює генний фрагмент. Пізніше було виявлено ще багато випадків подібних явищ (Wang et al., 2006). Описані також численні випадки запозичення нових послідовностей і захоплення генів спорідненою мобільною ДНК (ДНК-транспозонами), особ-

ливо у системі *Mutator* (Talbert, Chandler, 1988; Jiang et al., 2004). Зокрема, захоплення MULEs-елементами генних послідовностей у кукурудзи й арабідопсиса (Yu et al., 2000), захоплення генів ретровірусами тварин (Malik et al., 2000) тощо.

Встановлено, що захоплення генних фрагментів MULEs-елементами є нерідкісним явищем, а радше важливою рисою структури геному рису (Jiang et al., 2004). У геномних послідовностях рису виявлено понад 3000 MULEs, що містять фрагменти генів, які було названо «Pack-MULEs». Малі геномні фрагменти (розміром у середньому 325 п.н. з розмахом 47–986 п.н.) захоплювалися на рівні ДНК екзонів й інтронів, але іноді в захопленій послідовності виявлялися різні перебудови. Ці перебудови можуть виникати під час або після процесу захоплення. Встановлено, що генні фрагменти з різних генів рису разом складають 23 % Pack-MULEs і щонайменше 5 % їх експресується. Понад 90 % експресованих Pack-MULEs, очевидно, були транскрипційно ініційовані у самому елементі (Jiang et al., 2004). Отже, за критерієм експресії на рівні РНК багато з цих Pack-MULEs є вже новими генами. І, таким чином, деякі види рослин мають надзвичайно високий рівень перебудов послідовностей ДНК та здатні утворювати велику кількість нових генів і нових генетичних функцій (Bennetzen, 2005).

Механізм захоплення генних фрагментів Pack-MULEs не розкрито, але запропоновано як

можливий шлях «перетворення ектопічного гена внаслідок утворення «хрестоподібної структури із зарубкою» (ectopic gene conversions a nicked cruciform structure) (Bennetzen, Springer, 1994). Очевидно, MULEs-елементи є численними компонентами геномів покритонасінних, проте кількість Pack-MULEs не визначали у жодного виду, крім рису (Jiang et al., 2004). Однак попередній аналіз даних вивчення геномних послідовностей *Lotus japonicum* — далекого родича рису — свідчить, що у них чисельність Pack-MULEs є близькою, засвідчуючи, що вони є головними компонентами більшості або усіх геномів квіткових рослин (див. огляд: Bennetzen, 2005).

Дослідження кукурудзи показали наявність численних кластерів генних фрагментів, при цьому всі фрагменти перебувають в одній і тій же передбачуваний транскрипційній і трансляційній орієнтації. Встановлено, що один із таких кластерів фактично був гелітроном (*Helitron*), який недавно вбудувався в ген кукурудзи *Sh2* і викликав інактивуючу мутацію (Lal et al., 2003). Точний механізм захоплення генних послідовностей гелітронами також ще не відомий, очевидно, генні фрагменти поступово вбудовуються у кілька можливих положень, включаючи 5'-кінець чи біля 3'-кінця послідовності (рис. 10.2) (Brunner et al., 2005; див. також розділ 4.4). Ідентичні копії деяких гелітронів можна виявити більше ніж в одній геномній локалізації. Це свідчить про те,

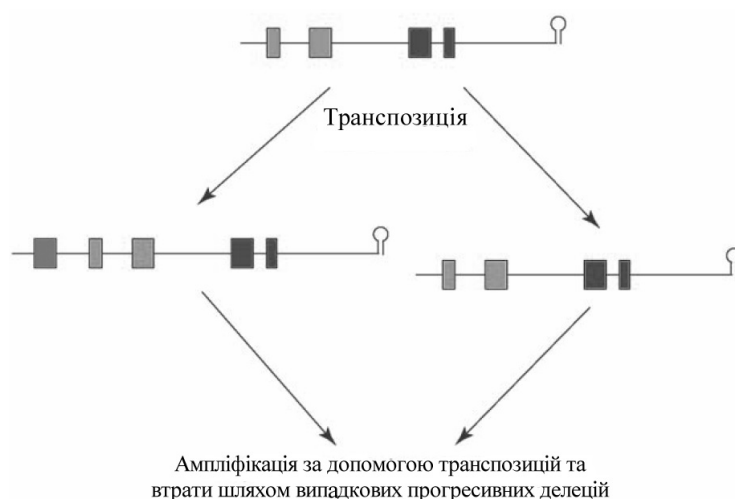


Рис. 10.2. Структура батьківського неавтономного гелітроні (зверху) і двох гелітронів, що утворилися з нього шляхом транспозицій (внизу)

Прямокутники позначають екзони, а різні відтінки сірого кольору вказують на різні гени, що дали ці екзони та інтрони, які вклинилися між ними. Гелітрон внизу зліва набув нового генного фрагмента. Петльова структура з правого (3') кінця кожного гелітроні в цих елементах є консервативною, вона зображена більшою за масштаб (за: Bennetzen, 2005)

що транспозиція не потребує перебудови самого елемента. Не відомі обмеження розміру захоплених послідовностей, але більшість вставок є відносно малими, при цьому більші гелітрони зазвичай складаються з малих вставок, що походять від багатьох генів, а не з кількох великих генних інсерцій. Так, уже згадувана гелітронна вставка розміром 17,7 т.п.н. у ген кукурудзи *Sh2* містить 12 ідентифікованих фрагментів генів (Lal et al., 2003). Особливо цікавим при захопленні нової послідовності є той факт, що генні фрагменти зазвичай перебувають в одній і тій же передбачуваній транскрипційній і трансляційній орієнтації, як у випадку з геліказою і RPA-подібними ORFs; це властиво навіть для дефектних елементів, у яких відсутні ці ORFs.

10.3. Втрата новостворених генів

Геноми багатьох рослин містять, очевидно, багато Pack-MULEs і гелітронів, але у будь-якому окремому геномі кількість копій окремих їхніх елементів є досить малою. Наприклад, у рису виявлено понад 3000 Pack-MULEs (Jiang et al., 2004), проте більшість окремих елементів мали число копій менше п'яти. Це розумно контрастує з набагато численнішими рослинними LTR-вмісними ретротранспозонами, які можуть мати число копій, що перевищує 10 000 на геном (Bennetzen, 2002, 2005). Цей факт свідчить про те, що Pack-MULEs і гелітрони, перш ніж ампліфікуватися до великих кількостей у ядрі, швидко сайленсуються (Meuer, 2005). Враховуючи їхню структуру і здатність до експресії, багато з цих елементів можуть продукувати химерні РНК і об'єднані (fused) пептиди, які можуть взаємодіяти з усіма тими генами і генними продуктами, з яких вони запозичені. Отже, можливо, що багато химерних РНК гелітронів чи Pack-MULEs не лише індують власну епігенетичну регуляцію (наприклад, сайленсинг), а й впливають на епігенетичну регуляцію інтактних генів, що надали генні фрагменти елемента (Morgante et al., 2005). За трансляції химерні пептиди Pack-MULEs чи гелітронів можуть також змінювати клітинну ензимологію та/або регуляцію, наприклад, слугуючи домінантними негативними інгібіторами внаслідок «отруєння» (poising) мультипротеїнових комплексів. У випадках, за яких ці

Подібно тому, як це описано для Pack-MULEs, виявлено транскрипти, що мають гомологію до гелітронів, включаючи і ті з них, що містять вставки з множинними генними фрагментами (Brunner et al., 2005; Morgante et al., 2005). Ці транскрипти здебільшого сплайсуються правильно, видаляючи інтрони, об'єднуючи таким чином різні гени в єдиний транскрипт у спосіб, подібний до Pack-MULEs.

Отже, гелітрони кукурудзи продукують химерні транскрипти, які можуть приводити до створення нових генів. Більш детально особливості гелітронів і їх роль у захопленні генів і зв'язуванні екзонів різних генів розглянуто вище, у розділі 4.4.

химерні РНК чи білки позначаються на фенотипі, селекція за чи проти їхньої експресії стає значним чинником їх збереження чи видалення, відповідно.

Якщо недавно зібрані химерні послідовності всередині гелітронів чи Pack-MULEs не є ознакою, сприятливою для рослини-хазяїна, точкові мутації й інделі зрештою закріплюються в *cis*-компонентах елементів, тим самим роблячи перманентною інактивацию, що була спочатку епігенетичною. (Інделі — це змінені послідовності ДНК, для яких невідомо, викликані вони вставкою в один хромосомний сегмент чи делецією в іншій ортологічній хромосомній ділянці.)

Як і всі інші послідовності рослинного геному, Pack-MULEs і гелітрони зазнають постійних процесів видалення послідовностей у вигляді коротких делецій, зумовлених незаконними рекомбінаціями (Ma, Bennetzen, 2004; Ma et al., 2004) (див. також розділ 9). Отже, більшість потенційних химерних генів Pack-MULEs чи гелітронів поступово втрачаються впродовж кількох мільйонів років. Ті рідкісні винятки, за яких химерні гени виживають впродовж довгого періоду часу, дають переконливі свідчення значного впливу цих транспозонів на створення генів і результуючу біологічну диверсифікацію. Генний фрагмент, вставлений в *Bs1*, і деякі (понад 10%) з прогнозованих (predicted) химерних

генів у Pack-MULEs мають характеристики послідовностей ДНК, що є наслідком селекції консервативної білкової функції (Jiang et al., 2004); однак ця селекція була спрямована на функцію елемента (наприклад, на вищу ефективність транспозиції), а не для якогось біологічного процесу хазяїна.

На думку Джефрі Беннетцена, переконливим доказом збереженої функції у будь-якому химерному гені на рівні послідовностей може бути її проявлення у Pack-MULEs чи генах гелітронного походження, які втратили свою мобіль-

ність (скажімо, шляхом термінальних делецій). Також переконливим доказом створення нового гена за допомогою Pack-MULE чи обумовленого гелітроном тасування екзонів є ідентифікація зміненого фенотипу у рослини як мутації (скажімо, інактивації) у будь-якому химерному гені транспозонного походження. Для жодного з передбачуваних нових генів, створених гелітроном чи Pack-MULE, ще не було наведено таких доказів тому, що такі вичерпні статистичні й експериментальні аналізи не було проведено на жодному виді рослин (див.: Bennetzen, 2005).

10.4. Генні і геномні перебудови

Гіперваріабельність негенних послідовностей, що складають більшість геномної ДНК покритонасінних, здебільшого обумовлена тим, що вони є мобільними послідовностями, і тим, що рослини дуже швидко видаляють ядерну ДНК, яка не підтримується природним добром (див. рис. 10.1). Деякі транспозони стимулюють також інші типи геномних перебудов, зокрема інверсії, дуплікації та делеції суміжної ДНК шляхом розриву хромосом, незавершеної (aborted) транспозиції чи ектопічної рекомбінації між гомологічними транспозабельними елементами у різних хромосомних локусах (див. розділ 9). Отже, структура геному у будь-якому організмі є здебільшого результатом дії транспозабельних елементів і клітинних процесів, що діють на транспозони (деталі таких процесів див. у розділі 11).

У рослин більшість генів, очевидно, зберігають подібність чи ідентичність своєї функції навіть у дуже відмінних хромосомних умовах, властивих для різних видів рослин. Наприклад, ген *adh1* і ще один суміжний з ним ген з невідомою функцією, що були у спільного предка кукурудзи і сорго, перемістилися в іншу хромосому. Саме тому ген *adh1* перебуває у несинтенній локалізації порівняно з його локалізацією у філогенетично більш віддалених злаків, таких як рис чи пшениця. Незважаючи на це переміщення плюс наступну делецію суміжного мобілізованого гена і накопичення величезної кількості оточуючих LTR-вмісних ретротранспозонів, тканинна специфічність, індукційний профіль і онтогенетичний час експресії гена *adh1* не змінилися. Ці й інші результати досліджень свідчать

про те, що рослинні гени дуже добре ізольовані від функціонального впливу хромосомного середовища, що їх оточує. Отже, переміщення інтактного гена у нову хромосомну ділянку зберігає його функцію, тим самим забезпечуючи його збереження за дії природного добору.

Підсумовуючи сучасні дані щодо можливої участі транспозонів у генних переміщеннях, слід підкреслити таке. На відміну від великих хромосомних перебудов, наприклад у кукурудзи (див. розділ 9), які зазвичай пов'язуються з дією рухомих генетичних елементів, одногенні перебудови, що набагато частіше виявляються за порівнянь різних видів рослин (Lai et al., 2004), ще однозначно не асоційовані з жодним відомим молекулярним механізмом. Реципрокні тандемні реплікації та/або делеції і малі інверсії, очевидно, викликаються нерівною рекомбінацією, але не зрозуміло, чи часто переміщення генів від хромосоми до хромосоми у рослин відбувається за допомогою цього самого процесу. У рослин неселектована ДНК може випадково втрачатися, а разом з нею швидко зникають і «сиквенс-мітки» генного переміщення транспозона. Такі мітки можуть виявлятися лише у зовсім недавніх генних перебудов (Ramakrishna et al., 2002; див. також огляд: Bennetzen, 2005).

Отже, явище частого захоплення генних фрагментів транспозонами Pack-MULEs та гелітронами (*Helitrons*) свідчить про можливу роль цих МГЕ у перерозподілі генів по геному. На основі здатності як захоплювати, так і об'єднувати фрагменти рослинних генів може виникати вихідний матеріал для створення нових генів і

нових генетичних функцій. Багато з таких щойно зібраних химерних кандидатів у гени експресуються, засвідчуючи, що деякі з них можуть уникнути епігенетичного сайленсингу і мутаційної руйнації.

Обидва згадані типи транспозонів захоплюють, очевидно, фрагменти, значно менші, ніж більшість інтактних генів. Можливо, що деякі рідкісні захоплення фрагментів включають і цілий ген, але жодного такого випадку ще не виявлено. Слід також враховувати, що за аналітичної оцінки мікроколінеарності прогнозовані продукти злит-

тя химерних генів у Pack-MULEs чи *Helitrons*, на думку деяких дослідників, можуть хибно трактуватись як гени, тим самим засвідчуючи нижчий від справжнього рівень колінеарності генів (Feng et al., 2002; Han, Xue, 2003; Lai et al., 2004).

У цілому ж, наведені й інші літературні дані свідчать про те, що різні розмір, вміст і структура геномів вищих рослин є наслідком однієї і тієї ж низки механізмів, проте діють вони у різних генеалогічних лініях рослин з різною відносною ефективністю (Casacuberta, Santiago, 2003; Vitte, Bennetzen, 2006).

10.5. Диференційна ампліфікація МГЕ і дивергенція геномів

МГЕ є фракцією геномів еукаріотів, яка швидко еволюціонує і вносить основний вклад у міжвидову дивергенцію геномів. Вивчення еволюції різних МГЕ представляє собою великий інтерес, особливо в геномах споріднених видів, які за рахунок гібридизації утворили алополіплоїди, як, наприклад, види родів *Triticum* і *Aegilops*. Ці результати важливі як для вивчення еволюції безпосередньо МГЕ, так і еволюції геномів.

Показано, що ретротранспозони присутні у вигляді гетерогенних популяцій у всіх таксонах вищих рослин. У геномах дивергованих видів часто існують гомологічні пари ретротранспозонів, як це, наприклад, показано для *copia*-елементів у видів Poaceae і родини *copia*-ретротранспозонів *Tra28* голонасінних (подібність між гомологічними мобільними елементами у видів, що дивергують, 80–85 %) (Stuart-Rogers, Flavell, 2001). Розподіл багатьох ретротранспозонів між видами є дискретним — родина МГЕ може бути присутньою у геномі одного зі споріднених видів і бути відсутньою у геномі іншого.

Вважається, що основні групи МГЕ були присутні у пращурному геномі рослин до утворення сучасних видів і потім у процесі еволюції дивергували у гетерогенні підгрупи, при цьому відбувалося вертикальне перенесення МГЕ за умови добору, який діє на консервативні домени. При цьому присутність гомологічних елементів у різних видів і дискретність розподілу не протирічають версії горизонтального перенесення. Однак у рослин описано небагато достовірних випадків перенесення МГЕ; наприклад,

перенесення *Mu*-подібного ДНК-транспозона між просом *Setaria* і рисом (Diao et al., 2006) та перенесення LTR-вмісного ретротранспозона *RIRE1* серед видів рису (рід *Oryza*) (Roulin et al., 2008). Тому вірогіднішим поясненням дискретності розподілу є те, що деякі групи МГЕ у геномах окремих таксонів були втрачені у ході еволюції.

Збільшення розмірів геномів відбувалося за рахунок ампліфікації окремих родин МГЕ. Так, у геномах видів Triticeae широко представлені МГЕ із групи споріднених *copia*-родин *BARE-1*, *Wis* і *Angela*. У ячменю елементи *BARE-1* складають 3 % геному (Vicent et al., 1999a, 2001a). У геномі пшениці ця група представлена елементами родин *Wis* і *Angela*, на які припадає 70–80 % усіх *copia*-елементів геному. Серед родини *gypsy*-елементів у пшениці переважають родини *Sabrina* і *Fatima*, на кожну з яких припадає близько 20 % від загальної кількості *gypsy*-транспозонів (Charles et al., 2008). Для ДНК-транспозонів також показана перевага окремих родин у геномних послідовностях, наприклад, деякі родини *CACTA*-елементів представлені у геномах рослин великою кількістю копій: *BoC1* і *BoC2* у *Brassica oleraceae*, *Tp1* у райграці *Lolium perenne* і *Caspar* у Triticeae (Langdon et al., 2003; Wicker et al., 2003; Zhang, Wessler, 2004).

У геномі пшениці ідентифіковано 944 родини МГЕ, при цьому на 8 із них (*Fatima*, *Jorge*, *Angela*, *Laura*, *Sabrina*, *WIS*, *Wilma* і *Nusif*) припадає понад 50 % усієї фракції МГЕ. Значна ж частина МГЕ слабо повторювана у геномі. Так,

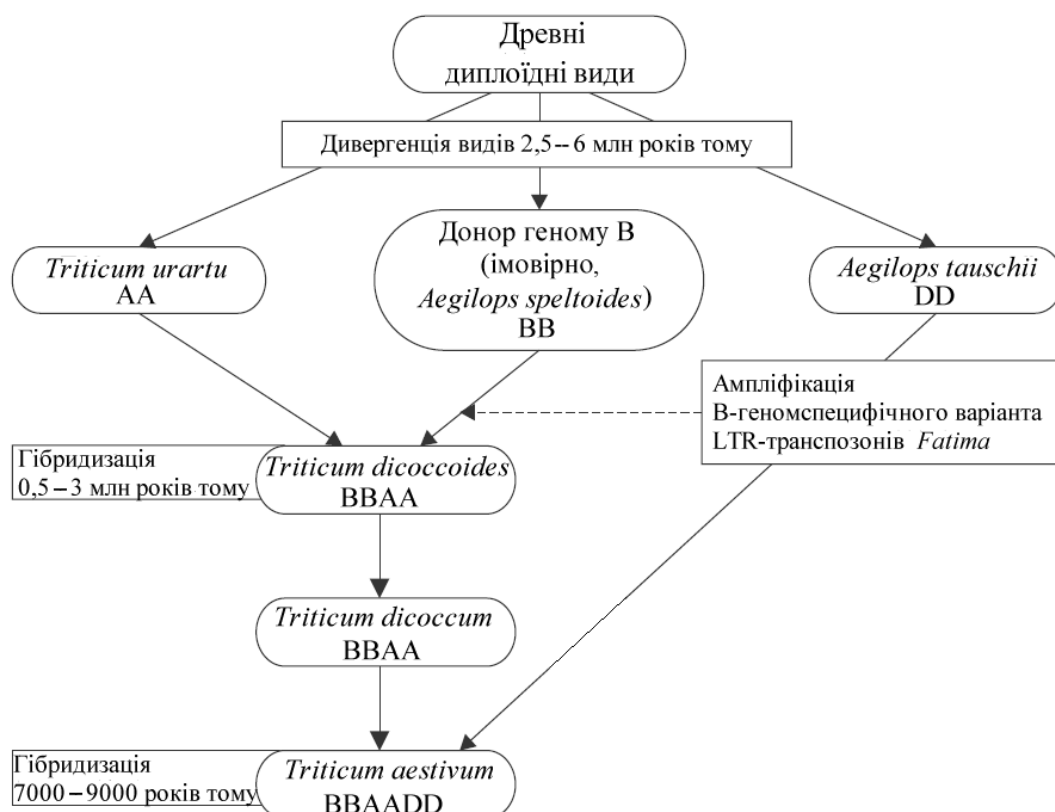


Рис. 10.3. Схема утворення алополіплоїда *Triticum aestivum* та ампліфікація геном-специфічних варіантів ретротранспозона *Fatima* у донора геному В (за: Сергеева, Салина, 2011)

елементи, що належать до 818 родин, склали лише 13,9% фракції МГЕ (Choulet et al., 2010).

Диференційна ампліфікація певних родин МГЕ була показана для геномів кукурудзи (Meyers et al., 2001; Kronmiller, Wise, 2008), бавовнику (Hawkins et al., 2006), геномів диплоїдних прасурів м'якої пшениці (Charles et al., 2008). На прикладі алогексаплоїдної м'якої пшениці *T. aestivum* показано, що ампліфікація В-геном-специфічних варіантів ретротранспозона *Fatima* мала місце в геномі диплоїдного прасура В-геному *Ae. speltoides* до того моменту, як він увійшов до складу дикої алотетраплоїдної пшениці *T. dicoccoides* (Salina et al., 2011) (рис. 10.3).

Також показано існування геном-специфічних груп *CASPA*-транспозонів родини *Caspar*. Елементи цієї родини локалізуються в основному в субтеломерних ділянках хромосом пшениці та ячменю, і філогенетичний аналіз показав, що ампліфікація окремих геном-специфічних груп *Caspar* у геномах Triticeae відбувалася незалежно. Таким чином, диференційна ампліфікація

мобільних генетичних елементів родини *Caspar* внесла суттєвий вклад у формування і дивергенцію субтеломерних ділянок хромосом видів Triticeae (Wicker et al., 2009; Sergeeva et al., 2010).

Диференційна ампліфікація МГЕ може також зумовлювати відмінності за вмістом сателітної ДНК у споріднених видів. Так, ДНК-транспозони часто містять сателітну ДНК, і разом з диференційною ампліфікацією елементів у різних геномах це пояснює суттєві відмінності, наприклад, у вмісті тандемного *Afa*-повтору Triticeae, який є компонентом деяких *CASPA*-родин МГЕ (Wicker et al., 2003).

Очевидно, виникнення й ампліфікація геном-специфічних варіантів ретротранспозонів, які проходили, в основному, у диплоїдних видів, є характерною рисою еволюції трьох геномів гексаплоїдної пшениці. За аналізу 13 м. п. н. геномних послідовностей пшениці показано, що інсерції 90% LTR-вмісних ретротранспозонів у пшениці відбулися протягом останніх 3 млн років, при цьому сплеск ампліфікації припав

на період 1,4 млн років тому (до утворення ало-тетраплоїда *Triticum dicoccoides*) (Choulet et al., 2010). Таким чином, диференційна ампліфікація внесла великий вклад у дивергенцію геномів А, В і D м'якої пшениці і могла сприяти успішному формуванню алополіплоїдного геному.

Кожна родина LTR-вмісних ретротранспозонів має специфічний спектр активності. Ампліфікація більшої частини МГЕ проходила у межах відносно короткого часового інтервалу (менше 1 млн років), після чого відбувався сайленсінг елементів, а інші родини ампліфікувалися протягом тривалого проміжку часу — понад 2,5 млн років. Також специфічним для кожної родини МГЕ є і час, на який припала основна маса подій транспозиції. Таким чином, геном пшениці

сформований послідовними хвилями ампліфікації МГЕ, які залучали до себе різні родини мобільних елементів (Choulet et al., 2010).

Механізм диференційної ампліфікації різних родин МГЕ не відомий, як вірогідні причини називають:

- відмінність репродуктивного потенціалу елементів;
- зміни регуляції епігенетичного сайленсінгу;
- послаблення тиску добору на певну групу мобільних елементів, який може виникнути за стресових умов різного роду.

Жодна з гіпотез не є виключною, і за існуючими наразі даними не можна ні підтвердити, ні спростувати жодну з них (детальніше див.: Vitte, Bennetzen, 2006; Charles et al., 2008).

10.6. Ендогенний мутагенез, МГЕ й «альтруїстична некодувальна ДНК»

Залежно від причин, що викликають мутації, їх поділяють на спонтанні та індуковані. Спонтанні мутації виникають самочинно впродовж життя організму в нормальних для нього умовах існування. Індуковані мутації з'являються внаслідок тих чи інших мутагенних впливів середовища, що оточує геном, або за експериментальних впливів різними мутагенними чинниками. Ендогенний мутагенез, зумовлений внутрішніми причинами, лежить в основі виникнення спонтанних мутацій. У результаті пошкодження ДНК або включення в її ланцюг неправильно (помилкового) нуклеотида виникає премутація, яка після завершення реплікації перетворюється в мутацію, якщо система репарації не впоралася з проблемою, що виникла. При цьому кількість виникаючих у геномі мутацій прямо пропорційна кількості попередніх премутацій, тобто кількості пошкоджень ДНК, що виникли.

Відомо про такі три основні причини спонтанного виникнення премутацій:

- молекули ДНК *in vivo* характеризуються хімічною нестабільністю. За нейтральних значень рН і нормальної температури відбувається гідролітична депуринізація ланцюгів ДНК з утворенням апуринових (AP-) сайтів із наступним розривом фосфодіестерних зв'язків, дезамінування залишків С та 5-мС з утворенням U і Т, відповідно, тощо;

- помилки синтезу ДНК *in vivo*. За реплікації хромосомної ДНК відбувається помилкове включення нуклеотидів (misinsertion), некомплементарних матричному ланцюгу ДНК, з частотою 10^{-7} – 10^{-8} /нт; крім того, під час реплікації іноді має місце «просковзування» (slippage) 3'-кінця ланцюга ДНК, що росте, вздовж матриці (misalign), що може призвести до мутацій зі зсувом рамок зчитування; здатність до зміни матриці ДНК-полімеразою під час синтезу ДНК, тобто до переходу молекули ДНК-полімерази з однієї матричної ДНК на іншу без термінації синтезу ДНК (template switching), відкриває шлях до одночасної заміни великої кількості нуклеотидів;
- у процесі нормальної життєдіяльності еукаріотних клітин виникають численні ендогенні мутагени, які після взаємодії з ДНК пошкоджують нуклеотиди, що у низці випадків може змінити її кодувальний потенціал. Ще частіше виникають адукти ендогенних мутагенів з нуклеотидами-попередниками ДНК внутрішньоклітинного пулу, які можуть включатися у ДНК і змінювати її структуру (деталі і посилення див.: Патрушев, Минкевич, 2007).

Нещодавно розроблено кількісну модель, згідно з якою некодувальні нуклеотидні послідовності геному еукаріотів формують нову, ще одну систему захисту частин геному від ендогенних

мутагенів (Патрушев, Минкевич, 2007). Згідно з цією моделлю ендегенні мутагени та їх попередники, які надходять в ядро через його поверхню, взаємодіють з численними внутрішньоядерними макромолекулами та низькомолекулярними сполуками, у тому числі й з нуклеотидами ДНК (як у кодувальній, так і некодувальній частинах геному) або нуклеотидами внутрішньоядерного пулу, і дезактивуються. При цьому кількість пошкоджених кодувальних і некодувальних нуклеотидів ДНК є пропорційною їх вмісту в ядрі, тобто некодувальні нуклеотидні послідовності виступають як додаткові пастки мутагенів і виводять мутагени з внутрішньоядерного пулу. Зі зростанням розміру геному у філогенезі відбувається збільшення розмірів ядра, що само по собі є додатковим захисним чинником. Поверхня ядра збільшується повільніше за його об'єм, що знижує потік мутагенів на одиницю ядерного об'єму. Некодувальна ДНК геному еукаріотів поводить себе «альтруїстично», підставляючись під удар замість генів.

З урахуванням детально розглянутої захисної ролі некодувальних нуклеотидних послідовностей розроблено схему еволюції еукаріотного геному (рис. 10.4, 10.5). Упродовж всього життя ядерна ДНК перебуває у безперервному потоці ендегенних мутагенів (рис. 10.4). Мутагени, які уникали нейтралізувальній дії системи антимутагенезу, пошкоджують азотисті основи ДНК, а некодувальні нуклеотидні послідовності захищають гени від таких пошкоджень і мутацій. Більша частина пошкоджень поновлюється системами репарації ДНК. Все це разом забезпечує припустимий генетично детермінований рівень спонтанного мутагенезу кодувальних послідовностей.

Підвищення внутрішньоядерної концентрації мутагенів збільшує частоту мутацій кодувальних нуклеотидних послідовностей геному, серед яких присутні ген(и) молекулярного сенсора. Мутаційні зміни сенсора мобілізують ретротранспозони, що приводить до локального збільшення числа їхніх копій, зростання

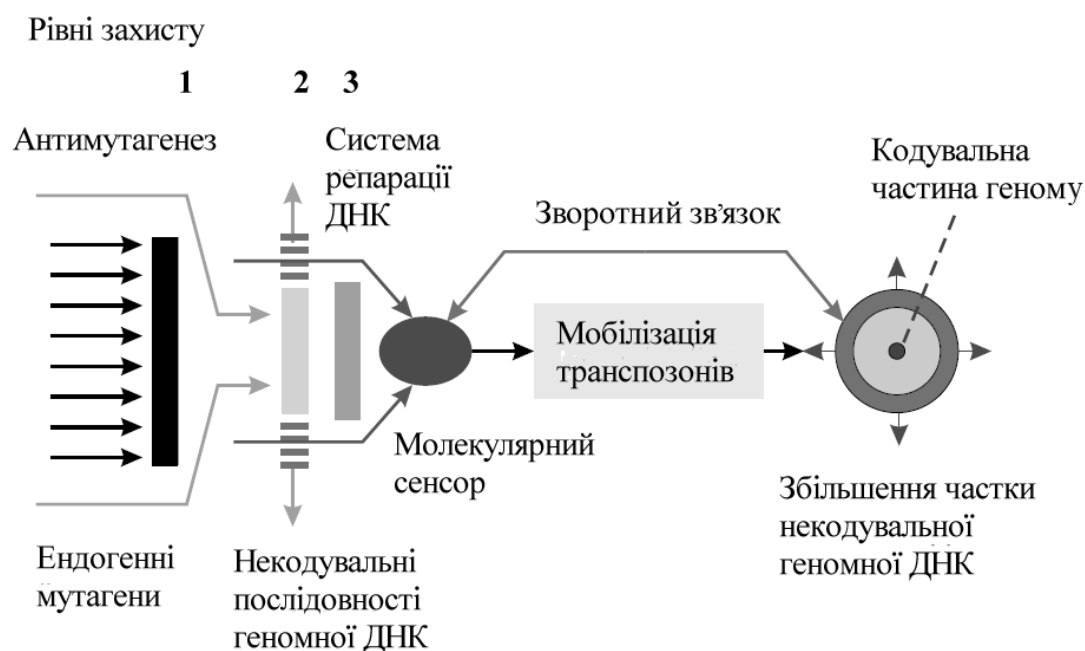


Рис. 10.4. Можливий механізм контролю вмісту некодувальної ДНК в еукаріотному геномі

Зображено три рівні захисту еукаріотного геному від ендегенних хімічних мутагенів (горизонтальні чорні стрілки зліва), які сформовано: 1) системою антимутагенезу (чорний прямокутник); 2) некодувальними нуклеотидними послідовностями (світло-сірий прямокутник); 3) системою репарації ДНК (сірий прямокутник). У тому випадку, коли всі три системи не забезпечують необхідного захисту генів, відбувається мутаційна зміна гіпотетичного молекулярного сенсора (темно-сірий овал), що супроводжується мобілізацією транспозонів, збільшенням некодувальної частини геному та зменшенням частоти виникнення спонтанних мутацій до вихідного оптимального рівня. Кодувальну частину геному зображено темно-сірою точкою у центрі світло-сірого кола, а тонкі стрілки сірого кольору вказують на збільшення розміру геному (за: Патрушев, Минкевич, 2007)

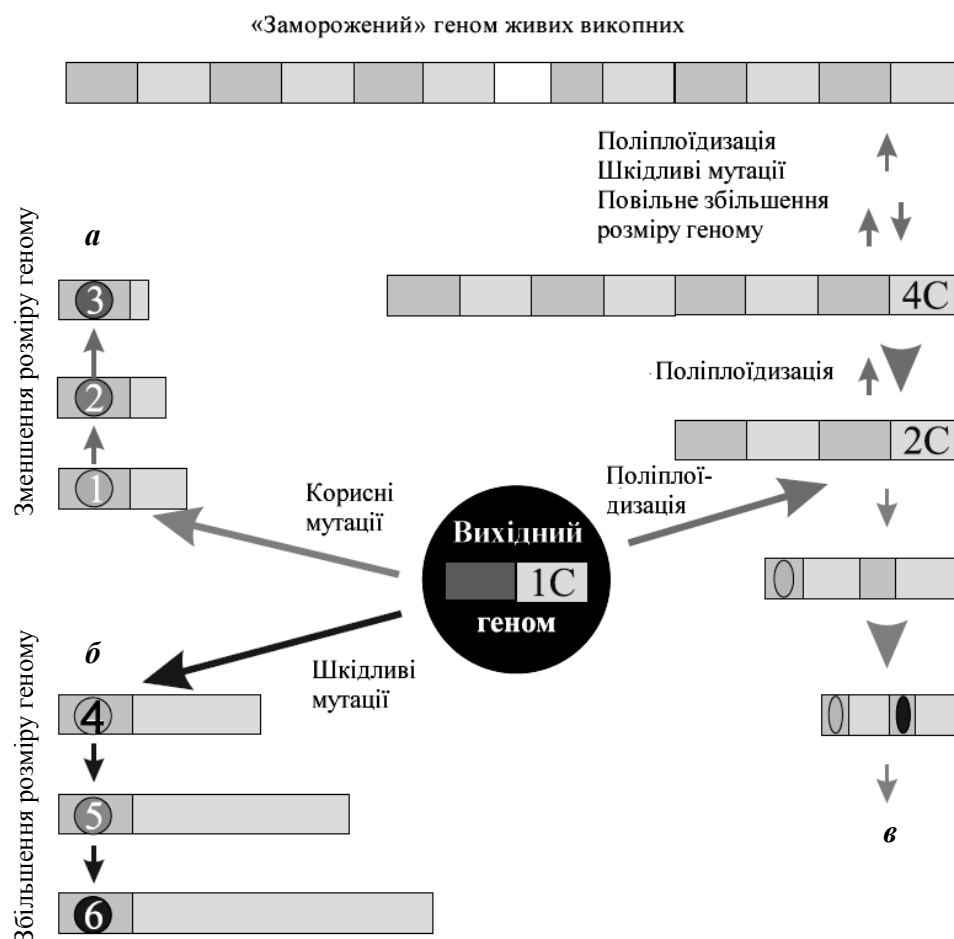


Рис. 10.5. Можливі шляхи еволюції геному еукаріотів

Вихідний геном-попередник (у центрі чорного кола) складається з кодувальних і некодувальних нуклеотидних послідовностей (темно-сірий та світло-сірий прямокутники, відповідно). Для нього є характерним певний оптимальний рівень захисту генів від спонтанного мутагенезу за участі ендогенних хімічних мутагенів. Цей рівень захисту забезпечується координованою дією класичних систем захисту (антимутагенезу та репарації ДНК), а також нуклеотидами некодувальної частини геному. Пояснення у тексті (за: Патрушев, Минкевич, 2007)

розміру геному і зменшення вірогідності виникнення мутацій у відповідних кодувальних послідовностях. (Про можливість не випадкового переміщення транспозонів у геномі, так званого «секторіального мутагенезу», див. у розділі 18.) У результаті система «геном — ендогенні мутагени» у конкретних генетичних локусах сягає нового стаціонарного стану. Зниження фонові внутрішньоядерної концентрації мутагенів буде супроводжуватися повільним зменшенням розміру геному під дією спонтанних делецій у тепер уже надлишкових (з точки зору виконання захисної функції) його нуклеотидних послідовностях. Дійсно, наведені у попередніх розділах результати досліджень рослин і тварин показали, що транспозони можуть ефективно видалятися з еукаріотного геному.

Активність транспозонів перебуває під суворим контролем, і акти транспозиції є рідкісною подією навіть в організмів, для яких відома порівняно висока активність транспозонів. Стресові умови, такі як тепловий шок, вірусна інфекція або дія агентів, що пошкоджують ДНК, сприяють активації транспозонів (див. розділ 7). Мобілізація транспозонів потребує участі кодованих ними білків, а отже, транскрипції відповідних генів РНК-полімеразами II і III. Тому механізми, задіяні у контролі транскрипції генів цими РНК-полімеразами, можуть бути використані і для контролю мобілізації транспозонів (див. розділи 2, 3).

Відомі щонайменше два молекулярних механізми, що беруть участь у контролі активності мобільних генетичних елементів: РНК-інтер-

ференція за участі малих інтерферуючих РНК (siRNA) і метилювання нуклеотидних послідовностей ДНК (див. розділ 7). Оскільки механізми РНК-інтерференції задіяні і в процесах метилювання, не виключена взаємозалежність цих двох механізмів. Сенсором для мобілізації транспозонів можуть бути залишки С, метилювання яких є критичним для мобілізації транспозонів. Мутаційні заміни G→A, які проходять, зокрема, у результаті дії активних форм кисню (АФК), могли б знижувати статус метилювання відповідних ділянок геному, приводити до активації розташованих поряд ретротранспозонів і локального збільшення кількості копій. Зміна просторової структури відповідних генетичних локусів під дією транспозонів, убудованих у нові ділянки геному, могла б супроводжуватися зміною рівня захищеності цих ділянок від ендогенного мутагенезу і забезпечувала б їх індивідуальну захищеність.

Зміна стаціонарної концентрації внутрішньоядерних мутагенів може викликатися різними причинами. Це може бути наслідком повільних змін довкілля, які приводять до зміни рівня мутагенних впливів на організми, які живуть у цих умовах. До тих же наслідків можуть приводити мутаційні зміни ферментних систем антимутагенезу і репарації ДНК, а також метаболічних процесів, що генерують ендогенні мутагени (рис. 10.5). Наприклад, підвищення ефективності функціонування класичних систем захисту геному від дії мутагенів — антимутагенезу і репарації ДНК — повинно знімати тиск добору на розмір геному, який тепер може зменшуватися під дією спонтанних делецій у результаті нерівного кросинговеру і подібних механізмів (рис. 10.5, а). З іншого боку, шкідливі наслідки мутацій у генах тих самих систем, що незначно знижують їх ефективність, могли б компенсуватися повільним зростанням розміру геному до оптимальної величини з точки зору виконання ним захисної функції, у тому числі як наслідок мобілізації транспозонів (рис. 10.5, б). Активність транспозонів у відносно короткі проміжки часу, які можна співвідносити з часом існування виду, може приводити до значних змін розміру геному. Це, зокрема, продемонстровано для злаку *Oryza australiensis*, у якого одна тільки активність ретротранспозонів без поліплоїдиза-

ції привела до двократного збільшення розміру геному (Piegu et al., 2006). (Інші подібні приклади див. вище у розділах 10.1–10.5.)

Швидким вирішенням проблеми високої пошкоджуваності кодувальних нуклеотидів може бути збільшення розмірів геному в результаті поліплоїдизації. Згідно з розглянутою моделлю стрибкоподібне збільшення розмірів геному в результаті поліплоїдизації після подолання першого періоду генетичної нестабільності повинно різко знижувати частоту пошкодження вихідних кодувальних нуклеотидних послідовностей (і, як наслідок, частоту мутацій), яку викликають хімічні (у тому числі ендогенні) мутагени. Після успішної поліплоїдизації, тобто подолання неополіплоїдом первинного періоду генетичної нестабільності, потенційно можуть реалізовуватися два сценарії еволюційних подій (рис. 10.5, в):

- відсутність у виниклих поліплоїдів тиску добору на підтримку надлишкових нуклеотидних послідовностей зумовлює їх спонтанне видалення із геному в результаті нерівного кросинговеру й інших подібних механізмів;
- у поліплоїдів можуть відбутися мутації, які знижують ефективність роботи систем репарації ДНК та/або антимутагенезу без шкідливих наслідків для організму, оскільки надлишкові послідовності візьмуть на себе частину захисних функцій цих систем. У цьому випадку зменшення розмірів поліплоїдного геному буде неможливим через шкідливі мутагенні наслідки для всього організму.

Як уже відзначено вище, у більшості досліджених рослин-поліплоїдів проходить зменшення сумарного розміру геному, який наближається до розміру базального геному (Leitch, Bennett, 2004). Еволюційне зменшення розмірів геному за цим сценарієм могло б проходити у диплоїдних організмів-мутантів з більш ефективно працюючими системами репарації ДНК та/або антимутагенезу, ніж у організму-попередника дикого типу (див. рис. 10.5, а). Передбачуване розглянутою моделлю різке зниження частоти спонтанних мутацій після поліплоїдизації може по-новому пояснювати пригнічення видоутворення в організмів з великими геномами: відомо, що кількість біологічних видів у таксоні зворотно пропорційна розмірам геномів організмів, що входять у цей таксон (Knight et al., 2005).

У зв'язку з цим велетенські розміри геномів, характерні для «живих викопних організмів», пояснюють еволюційну консервативність таких видів. Відповідно до розглянутої концепції у цих організмів могло відбуватися пригнічення некодувальними нуклеотидними послідовностями утворення спонтанних мутацій у кодувальних частинах генів. У даних видів у результаті активності транспозонів, тандемних дуплікацій і поліплоїдизації розмір геному перевищив допустимий пороговий рівень і, як підкреслює С. Оно, він став «замороженим», а самі види опинилися в еволюційному глухому куті (Оно, 1973). При цьому тиск добору у даних конкретних видів може бути спрямований на нуклеотип, зокрема на розмір їхніх клітин, а це зберігає непотрібну для стабільності геному надзахищеність генетичних локусів від ендегенних мутагенів і підтримує незмінним велетенський розмір геному цих організмів.

Підсумовуючи свій розлогий огляд, автори (Патрушев, Минкевич, 2007) підкреслюють, що проведений ними аналіз проблеми варіабельності розмірів геному еукаріотів виявив наявність у них нової (третьої) системи захисту кодувальних нуклеотидних послідовностей від мутацій, викликаних дією хімічних мутагенів. При цьому автори особливо підкреслюють, що саме ендегенні мутагени постійно створюють умови, в яких еволюціонує еукаріотний геном. Ця високодинамічна система, яка функціонує у тісній взаємодії з двома іншими системами (антимутагенезу і репарації пошкоджень ДНК), вносить суттєвий вклад у загальний захист геному. Відповідно до розрахунків авторів одна лише наявність некодувальної частини у геномі людини забезпечує йому ~100-кратний захист кодувальних послідовностей від хімічних мутагенів різної природи. Цей внесок є ще більш значним в організмів з більшими розмірами гено-

му. Геном великого розміру допускає зниження ефективності функціонування систем антимутагенезу і репарації, що відкриває додаткову можливість їх еволюціонування, тобто накопичення мутацій у генах, що кодують макромолекулярні компоненти цих систем.

Розроблена концепція не виключає теорії «егоїстичної» ДНК і ДНК як нуклеоскелета, що формує нуклеотип організмів. Кожна з них по-своєму висвітлює різні боки єдиного процесу еволюції еукаріотного геному. Дійсно, некодувальна ДНК, яка могла б розповсюдитись у геномі перших еукаріотів за «егоїстичним» механізмом, виявилася корисною для виконання нею захисних і нуклеоскелетних функцій. Відповідно, еволюціонування систем, які забезпечують захист клітин від «егоїстичної» ДНК і захист генетичної інформації від мутагенезу, могло проходити одночасно, паралельними курсами.

Можливість генетичної детермінованості частот виникнення пошкоджень (і мутацій) у конкретних генетичних локусах, на яку вказує висунута концепція, у свою чергу, припускає наявність генетичного контролю напрямків філогенезу і виявляє матеріальну основу потенціальної можливості виникнення адаптивних мутацій в еукаріотів (Кунах, 2011, 2011a). Це може дати новий імпульс ідеї номогенезу (філогенетичного розвитку видів на основі закономірностей) (Берг, 1977), який протистоїть класичній дарвінівській еволюції (Тимофеев-Рессовский и др., 1969). З цієї ж точки зору можна було б пояснити закон гомологічних рядів М.І. Вавілова, відповідно до якого у споріднених видів, родів і навіть родин рослин спостерігаються схожі ряди фенотипової мінливості (Вавілов, 1987). Генетично детермінована структурою хроматину мінливість генотипів могла би забезпечити формування гомологічних рядів даних фенотипових ознак, прискорюючи процес видоутворення.

10.7. Структурне різноманіття ретротранспозонів і особливості еволюції геномів рослин

На сьогодні мало відомо про причини різних розмірів геному, складу геномів і генних перебудов у рослин. Чому геном арабідопсиса містить лише близько 12 м. п. н. LTR-вмісних ретротранспозонів (близько 9% геному), у той час як геном кукуру-

дзи містить понад 1800 м. п. н. цих елементів (понад 70% геному)? Одна з відповідей — це різна інтенсивність процесів видалення ДНК у різних таксонах. Наприклад, припускається, що різні рівні видалення LTR-вмісних ретротранспозонів

шляхом нерівної рекомбінації мають місце завдяки вищому відношенню соло-LTRs до інтактних елементів у рисі порівняно з арабідопсисом (Ma et al., 2004). Встановлено, що відносна частота і розмір делецій, пов'язані з репарацією подвійних розривів, більші в арабідопсиса, ніж у геномі тютюну, розмір якого сягає 5100 м.п.н. З іншого боку, деякі представники квіткових рослин останнім часом характеризуються активнішою ампліфікацією транспозонів, про що свідчать більша кількість і різноманіття LTR-ретротранспозонів у кукурудзи і недавня лініеспецифічна ампліфікація деяких LTR-ретротранспозонів у бавовнику *Gossypium*. Однак усі вивчені рослинні геноми, очевидно, містять здебільшого «молоді» LTR-вмісні ретротранспозони (Bennetzen et al., 2005). Цей факт трактувався як доказ незвичного вибуху LTR-ретротранспозонної активності, що відбувся в останні кілька мільйонів років у всіх квіткових, але ж насправді він був викликаний тим, що видалення LTR-ретротранспозонів шляхом гомологічної і незаконної рекомбінації робило важким або неможливим розрізнення старіших елементів. Дійсно, геноми, такі як кукурудзяний, за останні 2–3 млн років були б щонайменше вдвічі меншими без ампліфікацій LTR-ретротранспозонів, але це зовсім не означає, що геном кукурудзи був удвічі меншим за його нинішній розмір 2–3 млн років тому. Наприклад, у рисі гомологічна і незаконна рекомбінації за останні 2–5 млн років видалили понад 190 м.п.н. LTR-вмісних ретротранспозонів, але його геном одночасно збільшився завдяки високому рівню ампліфікації тих самих ретротранспозонів (Ma et al., 2004).

Оскільки ретроелементи не вирізаються за транспозиції, то немає організованої селекції на транспозиційну функцію елемента після того, як він був вставлений. Більшість LTR-вмісних ретротранспозонів також не впливають на сусідні гени, значною мірою тому, що вони зазвичай епігенетично сайленсовані. Якби рослинні гени не були добре відокремлені від більшості транспозонів, що їх оточують, тоді б було неможливим для різних гаплотипів кукурудзи (наприклад, навколо локусу *bronze*) (Fu, Dooner, 2002) чи ортологічних генів різних видів злаків мати одну і ту саму генну регуляцію і функцію, незважаючи на зовсім різний склад геномів. Отже, більшість LTR-вмісних ретротранспозонів є селективно

нейтральними у рослинному ядерному геномі. Досліджуючи зміни послідовностей у цих елементах, можна виявити справжні явища, зумовлені змінами послідовностей ДНК, їх характером і відносною частотою за відсутності суворого контролю, здійснюваного природним добром. Отже, відносна нейтральність і велика кількість LTR-вмісних ретротранспозонів робить їх зручними для молекулярного аналізу особливостей еволюції геному в цілої низки видів рослин.

Цікавими у цьому плані є робота з вивчення особливостей розподілу LTR-ретротранспозонів і їх відмінностей у п'яти видів рослин (ячменю, лотоса, кукурудзи, *Medicago truncatula* та диплоїдної пшениці *T. monoccum*) і порівняння цих результатів із подібними даними, отриманими на арабідопсисі та рисі (Ma et al., 2004), виконаними К. Вітте та Дж. Бенетценом. Показано, що всі ці геноми дуже динамічні, але з різними механізмами нестабільності, вплив яких у різних видів різний. Автори показали, що застосований ними підхід до аналізу послідовностей зразків є ефективним способом визначення геномної еволюційної динаміки (Vitte, Bennetzen, 2006).

Розглянемо деякі ключові результати цього дослідження.

Було обрано, як уже згадувалося, п'ять видів квіткових рослин для вивчення відмінностей розмірів їхніх геномів, філогенетичної дисперсії і наявності даних про достатньо довгі суміжні послідовності геномів. Серед п'яти обраних видів лише для одного (кукурудзи) була відома значна кількість даних про різні випадково відібрані (randomly selected) BACs (Haberer et al., 2005). Тому в роботі використовували лише ті BACs кукурудзи, що містили гени, щоб результати можна було порівняти з такими для ген-вмісних BACs, що є в інших об'єктів. Будь-які інші LTR-ретротранспозони, які містилися у ділянках без генів, таких як, наприклад, перицентромерний гетерохроматин, не аналізували.

Другим застереженням до цих досліджень є те, що вони стосуються лише найчисленніших родин LTR-вмісних ретротранспозонів у кожному виді.

І нарешті, мобільні елементи, що містять кілька чи зовсім не містять представників інтактної родини, не представлені чи мало представлені у цій роботі.

У результаті автори встановили таке.

10.7.1. Великі геноми квіткових рослин збільшуються завдяки активності кількох родин LTR-ретротранспозонів, які є різними у різних видів

Усі геноми квіткових рослин мають велику кількість LTR-ретротранспозонів, але лише великі геноми містять родини, кількість представників яких сягає 10 000 чи більше. Отже, дуже великі рослинні геноми збільшуються не за рахунок величезної кількості додаткових родин LTR-ретротранспозонів, а мають кілька родин з великою кількістю копій. Причини цієї особливості не зрозумілі. Можна припустити, що вони можуть бути такими:

- більші геноми якимось чином підтримують більше різноманіття родин LTR-ретротранспозонів, щоб одна чи більше з них мали шанс ампліфікуватися до дуже великого числа копій;
- у більших геномах рослин є невідомий аспект епігенетичного сайленсингу, який дозволяє певним родинам елементів досягати великої кількості копій;
- певні рослинні генеалогічні лінії чи види мають набуті, можливо, шляхом міжвидового схрещування або іншого горизонтального процесу, LTR-ретротранспозони, які мають здатність до масованої ампліфікації у реципієнтному геномі.

10.7.2. Час вставки LTR-вмісних ретротранспозонів

У всіх проаналізованих видів рослин більшість виявлених LTR-вмісних ретротранспозонів, очевидно, були вставлені впродовж останніх максимум 4 млн років. Це не означає, що LTR-ретротранспозони лише недавно стали активними, оскільки всіх старіших елементів, очевидно, вже немає у геномі тому, що вони зазнали делецій. Коли датуються вкорочені елементи, що містять сегменти двох спільних LTRs, деякі з них виявляються дуже старими інсерціями (наприклад, віком понад 10 млн років) (Ma et al., 2004).

Прикметно, що для п'яти вивчених видів квіткових рослин розмір геному і філогенетич-

Жодна з названих можливостей не є абсолютною, і жодна з них не є добре обґрунтованою чи такою, що може бути відкинута наявними даними. Однак різні рівні ампліфікації різних родин ретроелементів у різних геномах свідчать про те, що мінливість репродуктивного потенціалу самих елементів відіграє у сумарній ефективності механізмів сайленсингу більшу роль, ніж відмінності між хазяями.

Проаналізовані LTR-ретротранспозони не формують якоїсь особливої групи. Деякі з них є *гурсу*-подібними, а інші — *соріа*-подібними елементами. Навіть у межах цих суперродин немає очевидного філогенетичного кластерингу елементів у різних видів чи в межах виду. Отже, багато різних типів LTR-ретротранспозонів мають здатність ставати високоповторюваними і таким чином сильно впливають на загальний розмір рослинного геному. Той факт, що розмір рослинного геному може змінюватися так швидко і завдяки, здебільшого, невеликій кількості родин LTR-ретротранспозонів, свідчить про те, що активація цих елементів є дуже динамічним процесом (деталі і посилання див.: Vitte, Benetzen, 2006).

ні зв'язки мають той самий напрямок, що і відмінності у середній даті інсерції LTR-вмісних ретротранспозонів. За підрахунками, види, що мають найстаріші дати вставки, є близькоспорідненими видами з найбільшими геномами — *T. monosocum* і ячмінь. На іншому кінці спектра розташовані види з наймолодшими вставками LTR-ретротранспозонів: два види з найменшими геномами і обидва бобові. Цей факт свідчить про те, що видалення ДНК може бути швидшим у бобових, ніж у Triticeae (деталі і посилання див.: Vitte, Benetzen, 2006).

10.7.3. Нерівна рекомбінація — основний чинник видалення ДНК

Аналіз LTR-вмісних ретротранспозонів показав, що нерівна гомологічна рекомбінація — важливіший процес видалення кількості ДНК у рису, ніж у арабідопсиса (Ma et al., 2004). Про це свідчить відношення LTR-вмісних ретротранспозонів —

інтактні : рекомбінантні : вкорочені — приблизно 0,8 : 1 : 0,9 у арабідопсиса і 0,5 : 1 : 0,5 у рису. Врахована кількість вкорочених елементів включає лише ті, в яких є щонайменше один частково інтактний LTR, оскільки анотація крихітних залишків

Таблиця 10.2

Загальне уявлення про структуру LTR-вмісних ретротранспозонів і різноманіття їх віку
(за: Vitte, Bennetzen, 2006)

Види	Інтактні елементи, %	Intact: Rec.	Trunc.: Rec.	Кількість датованих інтактних елементів	Час інсерції, млн р.		Ts: Tv	(Ts + Tv): Indel
					розмах	середнє		
<i>A. thaliana</i>	30	0,5	0,9	87	0,2–4,4	1,9	ND	ND
<i>O. sativa</i>	27	0,8	0,5	260	0–5,9	1,3	ND	ND
<i>L. japonicus</i>	57	6,0	3,5	13	0–3,0	0,3	2,5	7,3
<i>M. truncatula</i>	37	1,6	1,8	19	0–0,6	0,2	2,4	3,6
<i>Z. mays</i>	61	5,4	2,4	47	0–2,3	0,7	3,9	8,2
<i>H. vulgare</i>	35	1,5	1,8	17	0–3,8	1,3	1,6	12,0
<i>T. monococcum</i>	50	4,3	3,3	30	0–3,3	1,0	1,9	8,7

Позначення: Rec. — рекомбіновані; Trunc. — усічені; млн р. — мільйонів років тому; Ts — транзиція; Tv — трансверсія; Indel — інсерція або делеція; ND — не визначено.

укорочення є недостовірною. Це обмеження не позначається на точності підрахунку відношення інтактних елементів до рекомбінованих, але воно значно занижує кількість укорочених елементів.

За невеликої кількості даних порівняння між видами спотворюються тим, що можуть бути пропущені LTR-вмісні ретротранспозони з кількома інтактними елементами. За більшої кількості отриманих даних для арабідопсиса і рису виявлено деякі LTR-ретротранспозони з дуже малим числом інтактних елементів і дуже низькими відношеннями інтактних до рекомбінованих чи вкорочених елементів (Ma et al., 2004). Отримано численні дані також про те, що для кукурудзи, ячменю і диплоїдної пшениці великі відмінності, знайдені у розподілі типу елемента, вказують на великі відмінності геномних механізмів видалення ДНК (див.: Vitte, Bennetzen, 2006).

Особливо цікаво те, що у вивчених видів відносна кількість інтактних LTR-ретротранспозонів прямо не корелює з розміром геному. Кукурудза і лотос (великий і малий геноми) мають найвищі відсотки інтактних елементів (61 %

та 57%, відповідно), у той час як ячмінь і сорго (великий і малий геноми) мають найнижчий відсоток інтактних елементів (35 % та 37%, відповідно) (табл. 10.2). Цей факт свідчить про те, що відмінності у темпах видалення ДНК у цих генеалогічних ліній є менш значними у визначенні розміру геному і що відносні відмінності у темпах ампліфікації LTR-вмісних ретротранспозонів є істотнішим чинником.

Отже, результати вивчення п'яти різних видів квіткових рослин свідчать про дуже різну відносну ефективність видалення ДНК шляхом нерівної гомологічної рекомбінації чи малих делецій, пов'язаних із незаконною рекомбінацією. Немає явної кореляції відносної ефективності видалення ДНК шляхом нерівної гомологічної чи незаконної рекомбінації з філогенетичною віддаленістю чи розміром геному. Цей факт говорить про те, що відносна активність цих механізмів видалення ДНК часто змінюється в ході еволюційного розвитку рослинних генеалогічних ліній і що це не головна детермінанта розміру геному (Vitte, Bennetzen, 2006).

10.7.4. Заміщення й індели у дивергуючих довгих кінцевих повторах (LTRs)

Парні LTRs в інтактному мобільному елементі завдяки їх нейтральному статусу для природного добору і їх ідентичності під час інсерції, порівняно з генами і генними ділянками, є зручнішими і достовірнішими маркерами первинного якісного і кількісного характеру дивергенції

послідовностей у рослин. У розглянутих дослідженнях усі види рослин показали більшу кількість інделів відносно точкових мутацій.

Більшість мутацій нуклеотидного заміщення в усіх вивчених видів — транзиції. Це звичайне явище для LTR-ретротранспозонів у рослин, і

вважається, що воно є результатом високого ступеня метилювання цитозинів у послідовностях CG та CNG. Метилювання цитозину у п'ятому положенні викликає збільшення темпу дезамінування, а це приводить до прямої транзиції 5meC до T. Тому 5meC постійно виявляється як гаряча точка для мутацій транзиції. Цікавим фактом є високе значення показника відношення транзицій до трансверсій у *T. monosocum* та ячменю. Можливо, ці два види Triticeae є незвично багатими на епігенетично не сайленсовані LTR-ретротранспозони.

Більшість інделів, виявлених у LTR-ретротранспозонах у вивчених видів, малі і невідомого походження, багато з них розташовані у про-

стих повторях послідовностей і являють собою кінцеві прямі дуплікації. Очевидно, що вони є наслідком незаконної рекомбінації. Цей процес і нерівна гомологічна рекомбінація — це основні чинники, відповідальні за видалення ДНК у всіх досліджених наразі видів рослин (Ma et al., 2004; Vitte, Benntzen, 2006). Поки що невідомо, чи процеси видалення ДНК у вивчених видів рослин інтенсивніші за фактори збільшення геному (здебільшого ампліфікації LTR-вмісних ретротранспозонів). Проте зрозуміло, що всі молекулярні процеси збільшення і зменшення розміру геному постійно модифікують структуру вивчених геномів досліджених квіткових рослин.

10.7.5. Динаміка геномів. Підсумок

Накопичені результати аналізів структури LTR-вмісних ретротранспозонів у геномах покритонасінних рослин свідчать про дуже різні рівні різних типів геномних відмінностей. Види мали недавню мобільність LTR-вмісних ретротранспозонів, а також високу інтенсивність видалення ДНК шляхом нерівної гомологічної рекомбінації і незаконної рекомбінації. Більші рослинні геноми містили багато родин LTR-ретротранспозонів, які нараховували понад 10 000 копій на гаплоїдний геном, у той час як менші геноми містили менше чи зовсім не містили родин LTR-ретротранспозонів, які б мали понад 1000 копій. Це свідчить про те, що саме різний потенціал ампліфікації ретроелемента є основним чинником мінливості розміру геному у покритонасінних. У вивчених видів рослин середнє відношення транзиційних до трансверсійних мутацій (Ts/Tv) для різних LTRs складає більше 1,5. Це свідчить про те, що ці елементи здебільшого метильовані по цитозинах у 5-му положенні і перебувають у епігенетично сай-

ленсованому стані. Однак диплоїдна пшениця *Triticum monosocum* та ячмінь мають незвично низькі Ts/Tv значення (відповідно 1,9 та 1,6) порівняно з кукурудзою (3,9), люцерною (3,6) і лотосом (2,5), засвідчуючи, що цей сайленсинг є менш повним у представників Triticeae. Такі характеристики, як відношення точкових мутацій до інделів (інсерцій і делецій) і відносна інтенсивність видалення ДНК шляхом нерівної гомологічної рекомбінації порівняно з незаконною рекомбінацією серед видів дуже варіюють. Ці останні варіації не корелюють із розміром геному чи філогенетичною відстанню, вказуючи на те, що вони часто змінюються в ході еволюції рослинних генеалогічних ліній. У цілому викладені вище дані свідчать про те, що різні розмір, вміст і структура геномів покритонасінних є результатом однієї і тієї ж низки процесів молекулярної механіки, які діють, проте, з різною відносною ефективністю у різних рослинних генеалогічних лініях (див. табл. 10.2).

Розділ 11. МОБІЛЬНІ ЕЛЕМЕНТИ Й ЕПІГЕНЕТИКА РОСЛИН

Які механізми утворення різноманіття геномів? Упродовж тривалого часу основну увагу на рівні послідовностей ДНК приділяли таким змінам, як делеції, дуплікації, інверсії, точкові мутації, хромосомні перебудови, та особливостям розвитку (динаміки) геномів і генофондів популяцій у часовому вимірі. Безперечно, такі зміни важливі для генерування мінливості, як нейтральної, так і не нейтральної, за якої добір може діяти безпосередньо. Цікаво, що частота мутацій метильованих цитозинів значно вища, ніж немодифікованих цитозинів: мутації виникають внаслідок дезамінування метил-цитозину до тиміну. Це означає, що має місце «мутаційне покарання» за метилювання послідовностей, яке є суворішим для густометилюваних послідовностей, наприклад, таких як повторювані послідовності ДНК. Тому припускається, що характер метилювання ДНК може значною мірою визначати частоту мутацій послідовностей у рослин. Транспозони і повторювані ДНК, призначені для RdDM та гетерохроматизації, мають вищий рівень мутацій, ніж евхроматинові ділянки, що, можливо, відіграє захисну роль. Припускають, що цей механізм діє у рослин за елімінації ектопічних промоторів у кодувальних ділянках генів (Tran et al., 2005).

Інше велике джерело мінливості геному рослин — це мінливість, індукована транспозонами. З часу відкриття мобільних елементів їх модифікуючий вплив на геном хазяїна добре вивчений. Цей вплив варіює від чітко мутагенного, наприклад, розриву кодувальних генів вставкою мобільного елемента, утворення «слідів» (footprints) за циклів вставки і вирізання, до майже не помітного. Наприклад, ектопічна рекомбінація може відбуватися між гомологічними елементами за мейозу, призводячи до хромосомних перебудов, і, можливо, в результаті цього можуть утворюватися «макротранспозони», здатні переміщувати навіть відносно великі послідовності, захоплені ДНК хазяїна, до нових сайтів геному (Gray, 2000). Система захисту, описана вище, для недосягнення небезпечно високих рівнів транспозиції усуває в еволюціонуючому структурованому геномі більшість результатів транспозиційної активності, весь їхній спектр від нейтральних до шкідливих наслідків. Звичайно,

система захисту, індукуючи формування гетерохроматину на основі виявлених детектованих транспозонових послідовностей, може сама викликати шкідливий ефект, сайленсуючи сусідні послідовності хазяїна.

Останнім часом відбулася зміна в оцінці мобільних елементів і точка зору на них як на егоїстичні паразити змінилася на розуміння їх як геномних симбіонтів. Багато з рослинних геномів надзвичайно багаті на такого роду послідовності, разом з тим в інших евкаріотів розвинулись ефективні механізми, які позбавляють геном від цих послідовностей. У цілому дані свідчать про те, що співжиття дає організму певні переваги. Найпереконливіше про це свідчить структура центромерних і теломерних ділянок геномів, які є важливими для цілісності геному і багатими на такі послідовності.

На прикладі таких культурних рослин, як кукурудза та ротики садові *Antirrhinum*, давно показано, що інтеграція рухливих елементів у кодувальні гени чи поряд з ними у рослин генерує нову фенотипову мінливість (Kumar, Bennetzen, 1999). Однак є великі відмінності між популяціями культивованих рослин і рослинами у природних популяціях, де природний добір «шліфує» геном. Підтвердженням припущення про те, що рухливі генетичні елементи можуть формувати геном і обумовлювати характер генної експресії в природі, є той факт, що в евхроматинових послідовностях генів повсюдно трапляються «випокні рештки» послідовностей транспозонів. Багато генів рослин мають тісні зв'язки з рухливими елементами, виявлено рослинні гени, які, можливо, мають кодувальні ділянки генів, запозичені від генних послідовностей *copi*-ретротранспозона. У багатьох генів, у їх апстрим- і даунстрим-фланкуючих послідовностях послідовності транспозонів дегенерували; відомо, що у деяких випадках така послідовність має прямий регуляторний вплив на експресію гена. Цікавий приклад — це імпринтований епігенетично чутливий ген *FWA*, тісно пов'язаний із SINE-ретротранспозонними послідовностями (Lippman et al., 2004). У цій роботі було також виявлено siRNAs, що відповідають такій послідовності, і дані вказують на те, що імпринтинг

і транскрипція *FWA* безпосередньо контролюються цією ретротранспозонною послідовністю. Кодувальні гени часто можуть «присвоювати» інтегровані чи сусідні послідовності транспозонів, перетворюючи такі елементи у рушійну силу генерування мінливості і новизни в геномі; тому припускають, що, можливо, всі рослинні гени містять більші чи менші частини транспозонів (Kumar, Bennetzen, 1999). Оскільки основні регулятори цих елементів — це епігенетичні системи, то їх вплив на молекулярну і фенотипову еволюцію рослин оцінюють як суттєвий (Grant-Downton, Dickinson, 2006).

Виявлено ще один зв'язок між повторюваною ДНК і еволюцією епігенетичного контролю генної експресії. За аналізу послідовностей генів мікроРНК арабідопсиса було показано, що ці гени виникають з інвертованих повторів кодувальних генів. В арабідопсиса виявлено гени міРНК, що є проміжними між інвертованими повторами і типовими генами міРНК, оскільки їх послідовність має значну гомологію до цільового гена поза ділянкою зв'язування процесованої міРНК (Allen et al., 2004). Дійсно, один із «проміжних» генів — ASRP1729 — не поводить себе як міРНК, оскільки він не має цільової функції і його процесинг є не чутливим до DCL-1 мутацій, можливо, являючи собою проміжну стадію розвитку функції міРНК. Очевидно, ці «посередники» стають трансдіючими siRNAs (Peragine

et al., 2004; Vazquez et al., 2004). У такий спосіб можуть виникати без значних труднощів нові гени міРНК, що контролюють нові типи експресії цільових генів. Припускається, що, маючи дуже еволюціонуючу природу, молоді малі РНК ідеально підходять для індукції швидкої адаптації і їх, мабуть, набагато більше у рослин, що зазнали стресу (Voinnet, 2004). Реального претендента на некодувальну РНК, задіяну у транскрипційних реакціях на стрес, було виявлено шляхом Т-ДНК маркування у *Craterostigma plantagineum* (Bartels, Salamini, 2001). Ця послідовність задіяна у негативно регульованих генах толерантності до висихання, і вона дуже схожа на послідовність SINE-подібних ретротранспозонів. Проте ніякої гомології до неї не виявлено в арабідопсиса. Постає питання, як швидко ця регуляторна РНК еволюціонує, для вирішення якого треба вивчити, чи існують подібні послідовності у найближчих родичів — представників родин Scrophulariaceae та Gesneriaceae. З іншого боку, є свідчення вражаючої консервативності міРНК та їхніх цільових послідовностей, що говорить про те, що якщо вже ця регуляторна система є і контролює велику кількість транскриптів, то вона стає дуже каналізованою. Наприклад, міРНК HD-Zip транскрипційних факторів класу III усіх досліджених рослин зберегли сайт зв'язування miR165/166 (Floyd, Bowman, 2004).

11.1. Еволюція шляхом мутацій у генах, які керують епігенетичними системами

Епігенетичні системи можуть генерувати нову мінливість у популяціях рослин шляхом індукції мутацій у генах, що характеризуються великим регуляторним ефектом, наприклад, у таких генах, як *MET1* та *DDM1*. Відсутність певної функції не завжди є летальною для рослини, а може привести до утворення стабільних епіалелей генів, важливих для розвитку і морфології, а також до активації рухливих елементів. Є цікаві дані про те, що деякі епіалелі можуть зберігатися незалежно від мутації втрати функції, що забезпечила їх генезис; відновлення епігенетичної функції шляхом повернення до дикого типу може врятувати епігенетичні регуляційні системи, але зі збереженням епіалелі. Деметильовання локусу *FWA* у арабідопсиса є спадковим й індукує екто-

пічну експресію білка *FWA*, що призводить до фенотипу пізнього цвітіння (Sorre et al., 2000). Ген *FWA* зовсім не експресується у дорослих тканинах дикого типу, його експресія має місце лише в центральній клітині мегагаметофіту і в утворюваній після запліднення тканині ендосперму (Kinoshita et al., 2004), у яких експресія пов'язана з меншим метильованням ДНК. Пасивний стан гена *FWA* — метильований і сайленсований, за винятком термінально диференційованих репродуктивних тканин, але його реактивація й ектопічна експресія шляхом спорадичного деметильовання призводить до неочікуваної появи фенотипу пізнього цвітіння. Цікаво, що на тлі гіпометильованих *met1* та *ddm1* мутантів арабідопсиса гомеотичні гени квітки *SUPERMAN* та

AGAMOUS характеризуються спадковим гіперметилуванням і генним сайленсингом. Чіткі фенотипи як наслідок сайленсингу — це переконливий приклад наявності епіалелей.

Ще один цікавий приклад — генерування суперекспресуючих *bal* епіалелей локусу *CPR1* (constitutive expressor of pathogenesis related proteins 1) на тлі мутанта *ddm1* арабідопсиса (Stokes, Richards, 2002; Stokes et al., 2002). Епімутанти *bal* мають такі ознаки фенотипу, як скарлочені листки, карликовість і знижена фертильність, подібні до ознак фенотипу *cpr1-1*, отриманого після обробки мутагеном етилметилсульфонатом. Встановлено, що вони є двома різними епіалелями і ніяк не пов'язані з нуклеотидними змінами. Цікаво, що серед потомства

від самозапилення гетерозигот *bal/cpr1-1* зустрічається близько 20% рослин з фенотипом дикого типу, що, можливо, є наслідком епігенетичної дестабілізації і реверсії, що виникли внаслідок схрещування (Stokes, Richards, 2002). Показано також, що реактивація мобільних генетичних елементів на тлі *ddm1* може давати нові вставки з фенотиповими наслідками (Miura et al., 2001). Так, будучи активованими мутацією *ddm1*, транспозони можуть зберігати свою активність, навіть якщо функція DDM1 є збереженою (Lippman et al., 2004). Припускається, що стрибкоподібні спадкові зміни епігенетичних міток і фенотипу можуть виникати за широкого спектра впливів, істотну роль у механізмах виникнення яких відіграють МГЕ (Grant-Downton, Dickinson, 2006).

11.2. Епігенетичне перепрограмування і сайленсинг МГЕ малими РНК

Мобільні генетичні елементи є мішенню обумовленого малими інтерферуючими РНК (siRNAs) сайленсингу у тварин, грибів і рослин. У *Arabidopsis thaliana* siRNAs, задіяні у посттранскрипційному сайленсингу, є 21-нуклеотидними за довжиною і їх мішенню є МГЕ (Kasschau et al., 2007), у той час як siRNAs, задіяні у формуванні гетерохроматину, є 24-нуклеотидними (Hamilton et al., 2002). Кожний клас siRNAs зв'язується різними білками Argonaute, з яких 10 знайдено у арабідопсиса. У тварин, на відміну від рослин, утворюються додаткові, розміром 25–29 нуклеотидів (nt) *piwi*-взаємодіючі РНК (piRNAs), які утилізуються клядом PIWI білків Argonaute. piRNAs виникають з повторюваної ДНК за Dicer-незалежного механізму (Aravin et al., 2007). У дрозозіли їх мішенями є МГЕ клітин зародкових ліній самців і самок, а білки PIWI задіяні у гетерохроматиновому сайленсингу (Brennecke et al., 2007; Brower-Toland et al., 2007). У гризунів piRNAs, утворювані в зародковій лінії самців і самок, сайленсують МГЕ і прямо чи опосередковано опікуються цими районами для метилування ДНК (Carmell et al., 2007) — сигналу сайленсингу, що потенційно успадковується в ряді клітинних поділів після того, як piRNAs більше вже немає.

Нещодавно було проведено дослід, в яких показано, що у процесах сайленсингу *MuDR*-елементів кукурудзи істотну роль відіграють

елементи, названі *Mu killer* (Skibbe et al., 2012). Ці елементи містять частково інвертований дуплікований ген транспозази *mudrA* і дві копії ділянки термінальної інвертованої послідовності A (TIRA) хазяйського *MuDR*-елемента кукурудзи. *Mu killer* може ефективно сайленсувати окремі копії *MuDR/Mu*. Припускається, що РНКова шпилька довжиною 4 т.п.н. утворюється в результаті транскрипції фланкуючого гена і цей транскрипт є субстратом для утворення siRNA.

На відміну від тварин, у яких клітини зародкової лінії закладаються на ранніх стадіях розвитку, у рослин клітини зародкової лінії диференціюються із соматичних клітин у дорослого організму. Мейоцити чоловічих статевих клітин у пиляку, що розвивається, дають початок чотирьом мікроспорам. Мікроспори зазнають наступного мітотичного поділу, даючи двоядерне пилкове зерно, при цьому менша клітина повністю міститься усередині більшої. Менша (генеративна) клітина в подальшому ділиться на дві сперматичні клітини. За подвійного запліднення зріле пилкове зерно, що виходить з пиляку, містить дві ідентичні сперматичні клітини, які роблять генетичний внесок від батька у зиготу й ендосперм. Доставка сперматичних клітин контролюється пилковим вегетативним ядром, яке має деконденсований хроматин на відміну від компактного хроматину сперматичних клітин і не вносить ДНК ні до зиготи, ні до ендосперму (McCormick, 1993).

Вивчення профілів експресії зрілого пилку арабідопсиса за допомогою мікроерей-аналізу виявило, що тут експресується відносно мало генів — найменша кількість порівняно з усіма іншими дослідженими тканинами (Becker, Feijo, 2007; Schmid et al., 2005), і що багато з генів, задіяних у біогенезі siRNA і сайленсингу, не експресуються у пилку або ж експресуються на низькому рівні (Pina et al., 2005).

Встановлено, що хроматин-перебудовна АТФаза *DECREASE IN DNA METHYLATION 1* (*DDMI*) накопичується лише у спермійальних клітинах, у вегетативному ядрі вона не виявляється (Slotkin et al., 2009). *DDMI* є регулятором активності МГЕ в арабідопсиса, оскільки у *ddm1*-мутантів більшість МГЕ позбавляються метилювання ДНК, репресивних модифікацій гістону та 24-нуклеотидних siRNAs (Lippman et al., 2004). Одночасно з втратою *DDMI* із зрілого пилку зникають 24-нуклеотидні siRNAs, що збігається із накопиченням транскриптів різних мобільних елементів, а також із транспозицією МГЕ. Однак ця транспозиція обмежена пилковим вегетативним ядром, тому транспозуючі елементи не передаються наступному поколінню. Порівняння послідовностей siRNA пилку, очищених спермійальних клітин та *ddm1*-мутантних рослин виявило, що зникнення *DDMI* із вегетативного ядра призводить до реактивації мобільних елементів і накопичення 21-нуклеотидних siRNAs із родини *Athila* ретротранспозонів кла-

су *gypsy*. Ці siRNAs *Athila* накопичуються переважно у сусідніх спермійальних клітинах. За цим механізмом активація ретротранспозонів у вегетативному ядрі виявляє їх присутність у геномі і, можливо, направляє їх сайленсинг у спермійальні клітини, перешкоджаючи транспозиції і сприяючи сайленсингу мобільних елементів у ряді поколінь (Slotkin et al., 2009). Розглянемо результати цього дослідження детальніше.

Встановлено, що у вегетативному ядрі пилку різні МГЕ тимчасово скоординовано активуються, і це приводить до нових соматичних транспозицій (Slotkin et al., 2009). Низка отриманих даних свідчить, що реактивація МГЕ у пилку обмежена вегетативним ядром. Це такі дані, як:

- характер забарвлення GUS цитоплазми пилку;
- дані аналізу транскриптому спермійів і пилку;
- відсутність успадкування транспозуючих елементів;
- знижене метилювання ДНК, ізольованої з цілих пилкових зерен порівняно з очищеними сперміями (ілюстрації і підтвердження див.: Slotkin et al., 2009).

Ця епігенетична реактивація МГЕ збігається зі значною втратою гетерохроматину. Слід підкреслити, що як у арабідопсисі, так і у лілії варіанти гістонів H3 та H2A є специфічними для спермійальних клітин (Ueda, Tanaka, 1995; Talbert et al., 2002; Okada et al., 2006; Ingouff et al., 2007), що свідчить про цілогономне перепрограмування у пилку.

11.2.1. Перепрограмування в онтогенезі

Глобальна реактивація МГЕ у вегетативному ядрі пилку, очевидно, залежить від зниження експресії генів, потрібних як для біогенезу siRNA, так і для формування гетерохроматину. Втрата одного лише шляху 24-нуклеотидної siRNA (*rdr2ldcl3*), принаймні в організмі рослини, не приводить до транспозиції *AtMul*. Транспозиція відбувається лише у мутантів, що втрачають як модифікацію гетерохроматинового гістону, так і метилювання ДНК, таких як *ddm1* (Miura et al., 2001; Singer et al., 2001). МГЕ можуть також реактивуватись у насінні, що розвивається. Експресія *DDMI* знижується у незрілому насінні, а експресія ДНК-метилтрансферази *MET1* знижується у деяких клітинах жіночого гаметофіту (Jullien et al., 2008). Це може впливати

на експресію МГЕ в ендоспермі, яка обмежена лише кількома клітинами на пізніх стадіях розвитку насіння і також не впливає на ДНК зародка.

Окрім умов нормального плану розвитку арабідопсиса, виявлено 21-нуклеотидну siRNA *Athila* у культивованих суспензійних клітинах, у яких також реактивуються деякі МГЕ (Tanurdzic et al., 2008). Це свідчить, що 21-нуклеотидні siRNAs *Athila* специфічно пов'язані з активними МГЕ і потенційно — з клітинами, що діляться. МГЕ як у культивованих клітинах, так і у пилку вибірково гіпометилювані (Tanurdzic et al., 2008). У пилку знижене метилювання ДНК *AtMula* у вегетативному ядрі, очевидно, є результатом активного процесу, оскільки лише один клітинний поділ відділяє його від спер-

міальної генеративної клітини, і асиметричне метилювання послідовностей контексту СНН зникає з обох ланцюгів ДНК. Припускається, що деметилаза ДНК є активною лише у вегетативному ядрі пилку, що дозволяє вибірково усувати метилювання ДНК в деяких МГЕ (Slotkin et al., 2009). Описано потенційний механізм деметилювання за участю siRNA-зв'язувального білка ROS3, який, очевидно, опікується ДНК глікозилазою ROS1 за деметилювання своїх мішеней (Zheng et al., 2008). Однак у пилку ROS3 експресується слабо, тому, очевидно, тут за цей процес відповідає інший білок чи механізм.

Реактивацією МГЕ у вегетативному ядрі пилку, очевидно, можливо пояснити явище сомат-

клональної мінливості у подвоєних гаплоїдів рослин, отриманих у культурі пилку, що є методом, який широко використовують у селекції рослин. Наприклад, мобільні елементи МГЕ активуються у культурах пиляків рису (Kikuchi et al., 2003). Відомо, що безнасі́ннєві трахеофіти (такі як плауни і папороті), незважаючи на їх дуже складну гаметофітну фазу, не мають супутніх сперматичних клітин, подібних до тих, які виявлено у покритонасі́нних. Геноми папоротей великі, й у них транспозони і гени слабо диференційно метильовані (Rabinowicz et al., 2005), а тому припускається, що еволюція спермо-супутнього вегетативного ядра пилку могла сприяти сайленсингу МГЕ у покритонасі́нних (Slotkin et al., 2009).

11.2.2. Механізми прояву і сайленсингу МГЕ у зародковій лінії клітин

Реактивація мобільних елементів у вегетативному ядрі пилку являє собою специфічне для кожного типу клітин епігенетичне перепрограмування, що ефективно «виявляє» присутність МГЕ у геномі. Пилкове вегетативне ядро термінально диференційоване, але це термінальне диференціювання, очевидно, не відповідає за програмовану реактивацію МГЕ у пилку. Так, мобільні елементи арабідопсиса не скоординовано реактивуються у термінально диференційованих старіючих клітинах листка. Активація МГЕ перебуває під повним контролем хазяїна (рослини), оскільки експресія генів, що відповідають за захист від МГЕ, у вегетативному ядрі знижена (Slotkin et al., 2009). Це, на думку авторів, свідчить про те, що перепрограмування МГЕ у вегетативному ядрі пилку розвинулося у його функцію.

Автори ставлять питання: навіщо потрібна епігенетична реактивація МГЕ у вегетативному ядрі пилку? Можливою відповіддю вважають те, що розташування вегетативного ядра поряд із сперматичними клітинами є важливим для сайленсингу МГЕ у наступному поколінні (Slotkin et al., 2009). Далі автори наводять дані про те, що у тварин під час перепрограмування зародкової лінії епігенетичні мітки спочатку зникають, а потім енергійно перевстановлюються в кожному поколінні, призводячи до тимчасової і парадоксальної експресії мобільних елементів. Наступне реметилювання і сайленсинг у спермі залежать від piRNA (Carmell et al., 2007). У рос-

лин у пилку також відбувається тимчасова реактивація мобільних елементів, але вона обмежена вегетативним ядром, що пояснює цей парадокс. Ця реактивація потенційно сигналізує сайленсинг МГЕ у сусідній спермі через *Athila* 21-нуклеотидну siRNA, які накопичуються у великій кількості у зрілих сперматичних клітинах і діють у зрілому пилковому зерні (див. модель, рис. 11.1) або безпосередньо перед заплідненням, у міру того як сперматичні клітини проходять повз дегенеруюче вегетативне ядро в пилковій трубці перед тим, як потрапити в яйцеклітину. Результатом реактивації МГЕ у вегетативному ядрі, на думку авторів, може бути сайленсинг елементів *Athila* у сперміях. Підкреслюється, що сперматичні клітини у зрілому пилку арабідопсиса зупиняються у S-фазі (Friedman, 1999) — фазі клітинного циклу, коли епігенетичні мітки (такі як модифікація гістону) встановлюються за допомогою siRNA (Kloc et al., 2008).

Поряд із перепрограмуванням МГЕ у зародковій лінії клітин рух малих РНК в генеративні клітини є дуже консервативним. У тютюну і в арабідопсисі плазмодесми (cytoplasmatic connection) між сперматичними клітинами та вегетативним ядром спостерігали і раніше (Yu et al., 1989; McCormick, 2004), і вони є каналом для 21-нуклеотидних siRNAs. Це підтверджується тим, що генами, необхідними для транслюючого біогенезу siRNA (RDR6, DCL1 і DCL4) є деякі гени RNAi, що експресуються у пилку і необхідні для руху siRNA в інших частинах рос-



Рис. 11.1. Модель реактивації МГЕ пилку і потенційного перепрограмування

Пилкові вегетативне ядро та спермії відрізняються за локалізацією DDM1, експресією МГЕ, рухливістю та метилюванням ДНК. Реактивовані ретротранспозони *Athila* з вегетативного ядра продукують siRNAs розміром 21 нт, які накопичуються в сперміях. Отже, ретротранспозони *Athila* можуть бути «виявлені» за допомогою епігенетичного перепрограмування специфічно до мішені і можуть закріплювати свій сайленсінг у спермійних клітинах (за: Slotkin et al., 2009)

лини (Dunoyer et al., 2005; Nimber et al., 2003). З іншого боку, механізм сайленсінгу *Athila* в спермійних клітинах може діяти через вірус-індукований шлях сайленсінгу, оскільки *Athila* є близькоспорідненим до LTR-ретровірусів.

У дрозофіли соматичні фолікулярні клітини, суміжні зі стовбуровими клітинами жіночої зародкової лінії, є місцем інгібування *Gypsy* через *Flamenco* та piRNAs. При цьому обумовлена piRNA репресія гібридного дисгенезу за допомогою LTR-невмісних ретротранспозонів залежить від експресії повномірних автономних елементів у ядрах клітин-няньок, суміжних із овоцитом. А у протистів комунікація між старим соматичним макронуклеусом і гермінативним мікронуклеусом приводить до елімінації пов'язаних з МГЕ послідовностей із нових макронуклеусів і залежить від siRNAs, хоча і в межах тієї ж самої клітини. Отже, накопичення siRNA в гермінативних клітинах через перепрограмування МГЕ у супутніх клітинах може бути консервативним механізмом сайленсінгу мобільних елементів у еукаріотів (посилання і подробиці див.: Slotkin et al., 2009).

Таким чином, мутагенна активність МГЕ пригнічується епігенетичним сайленсінгом і малими інтерферуючими РНК, особливо в гаметах, що можуть передавати транспозуючі елементи наступному поколінню. У пилку модельної рослини арабідопсиса мобільні елементи реактивуються і транспозують, але лише у вегетативному ядрі пилку, яке супроводжує спермійні клітини, але не вносить ДНК до заплідненої зиготи. Експресія МГЕ збігається зі зниженням експресії гетерохроматинового ремоделера *DECREASE IN DNA METHYLATION 1* (DDM1) і багатьох siRNAs. Із ретротранспозонів *Athila* утворюються 21-нуклеотидні siRNAs, які накопичуються у пилку і спермійних клітинах, засвідчуючи, що siRNAs із активованих у вегетативному ядрі мобільних елементів можуть здійснювати сайленсінг у гаметах. Припускається консервативна роль у перепрограмуванні клітин зародкової лінії їхніх компаньонів, таких як клітини-няньки у комах чи вегетативні ядра пилку у рослин, а також у виявленні інтактних МГЕ у геномі і в регуляції їх активності у гаметах (Slotkin et al., 2009).

Розділ 12. РОЛЬ ТРАНСПОЗОНІВ У РОСЛИННИХ ПОПУЛЯЦІЯХ

Елементарною еволюційною одиницею вважається популяція, під якою розуміють сукупність особин (організмів) одного виду, які протягом тривалого часу (великої кількості поколінь) населяють певну ділянку довкілля і так чи інакше ізольовані від особин інших сукупностей (популяцій) того самого виду. Практично всі популяції за своєю структурою є генетично не однорідними: кожна популяція, навіть та, що складається з фенотипово подібних організмів, є сукупністю різних генотипів, які постійно виникають внаслідок спонтанного мутаційного процесу. За інтенсивного тиску певного, зазвичай зовнішнього, чинника, його різкої зміни в популяціях, особливо в крайових (маргінальних), відбувається зміна генотипової структури. Така зміна вважається елементарним процесом мікроеволюції.

Найважливішим внутрішнім джерелом змін генетичної структури популяції вважаються мобільні генетичні елементи — вони здатні індукувати мутації, змінювати експресію генів, викликати хромосомні аберації (Kidwell, Lisch, 1997, 1998, 2001; Kumar, Bennetzen, 1999), істотно впливають на організацію (структуру) і функцію геному (Belyayev et al., 2010; див. також розділи 8–11).

Генетична теорія популяцій припускає, що динаміка транспозонів у природних популяціях відображає баланс між тенденцією цих елементів до зростання їх кількості шляхом транспозиції і зменшення завдяки природному добору, що діє проти особин з великою кількістю їхніх копій. На різних об'єктах було встановлено, що представники однієї і тієї ж родини МГЕ характеризуються як внутрішньовидовою варіабельністю, так і змінами у часі (Belyayev et al., 2005; Picot et al., 2008; Ray et al., 2008). Саме дослідження внутрішньовидової динаміки МГЕ, особливо в крайових популяціях, де мікроеволюційні процеси інтенсифіковані, може значно поліпшити розуміння процесів видоутворення.

Одним із найефективніших шляхів вивчення динаміки транспозонів у часовому і просторовому вимірах є екологічний підхід, за допомогою якого досліджуються кілька поколінь рослин у природних популяціях. Як приклад розглянемо недавнє дослідження динаміки кількох родин

МГЕ, що належать до класів I і II, проведене на прикладі малої, крайової зникаючої популяції егілопса *Aegilops speltoides* ($2n=2x=14$) (Belyayev et al., 2010).

Цей вид є диким родичем різних видів пшениці, має великий за розміром геном, який містить багато різних МГЕ, особливо LTR-вмісних ретротранспозонів (Eilam et al., 2007). Він є диморфним видом (ssp. *aucheri* та ssp. *ligustica*), характеризується перехресним запиленням, проте здатен і до самозапилювання. Досліджена популяція поширена на західному березі річки Кішон (Kishon, район затоки Хайфа, Ізраїль). Популяція характеризується високою внутрішньопопуляційною гетероморфністю і мінливістю, перш за все морфологією колоса, яка контролюється блоком тісно зчеплених генів, і має широкий спектр хромосомних аномалій, включаючи додаткові (надкомплектні) В-хромосоми, гетерозиготність за транслокаціями і поліморфізм за кількістю і розташуванням на хромосомах сайтів 45S- і 5S-рДНК (Raskina et al., 2004a, 2004b). Автори припустили, що мінливість на морфологічному і хромосомному рівнях пов'язана з мінливістю на молекулярному рівні і, особливо, з проліферацією МГЕ, і поставили за мету вивчити, чи пов'язана динаміка транспозонів з морфологічними чи каріотипними змінами, з яких деякі є потенційно важливими для еволюційного процесу.

Для вивчення було взято три контрастні рослини. Фенотипово один із вибраних генотипів G9 (генотип 9) мав ознаки *ligustica*, а генотипи 13 і 14 (G13 і G14 відповідно) належали до типу *aucheri* (рис. 12.1, Б). Потомство від кожного зразка отримували в трьох поколіннях самозапилення (S1-, S2-, S3-покоління). Геномні формули досліджених рослин були такими: G9 ($2n=14+3B$), G9 в S1- і S2-поколіннях ($2n=14+5B$), G13, S1, S2, S3 ($2n=14$), G14 ($2n=14+2B$), G14S1 ($2n=14+3B$), G14S2 ($2n=14+4B$), G14S3 ($2n=14+3B$).

Аналіз динаміки МГЕ впродовж трьох самозапильних поколінь показав, що у рослин дослідженої популяції і «самозапильного» потомства різні родини транспозонів значно варіюють за числом копій і що флюктуації кількості

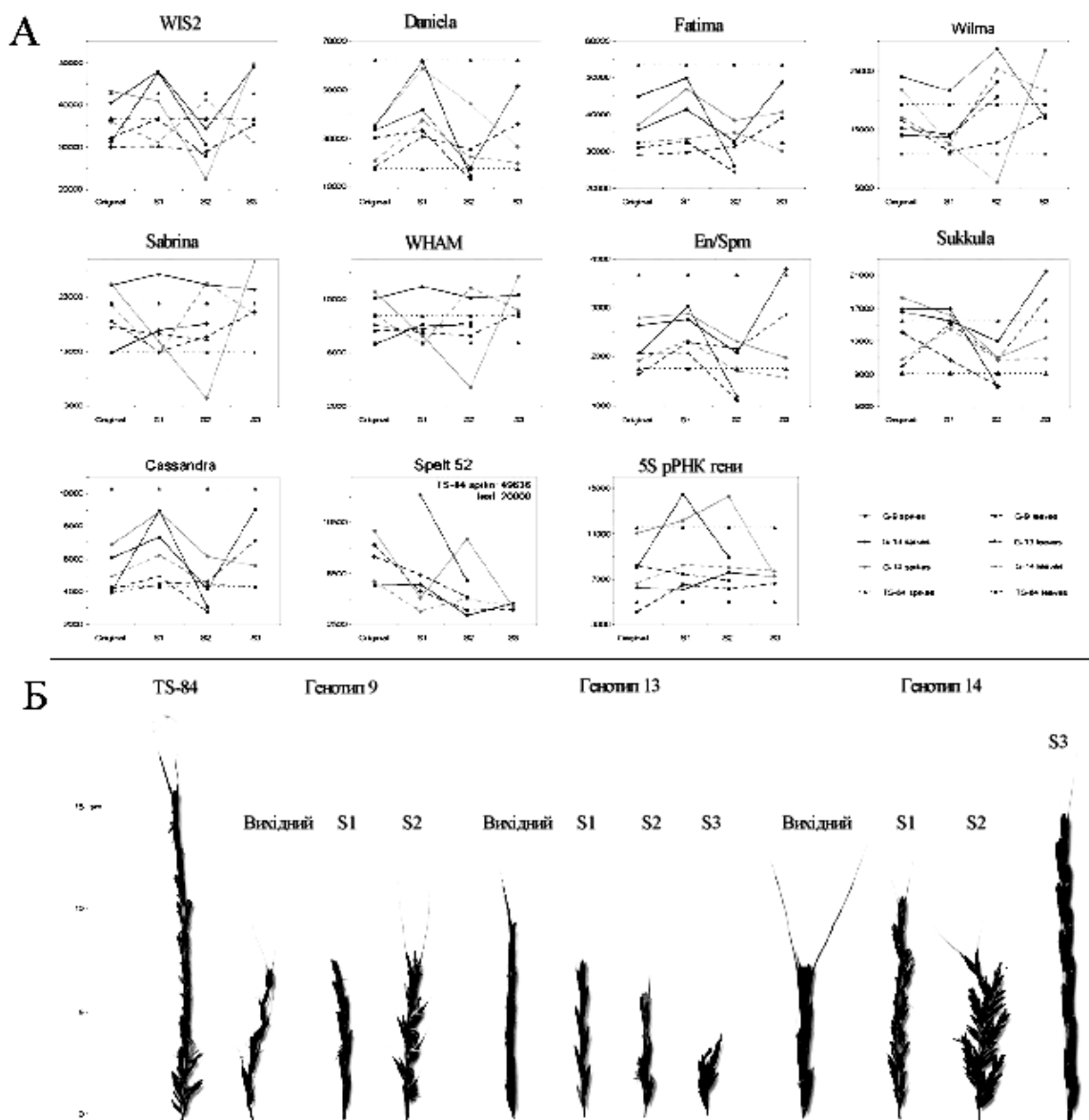


Рис. 12.1. Число копій МГЕ і морфологія колосків у егілопса:

А — динаміка числа копій мобільних генетичних елементів (МГЕ) у трьох самозапильних поколіннях трьох генотипів *Aegilops speltoides* із популяції Kishon. Кількість копій МГЕ популяції TS-84 використано як контроль. Кількість копій МГЕ для наявних сибсів у самозапильних поколіннях показано окремими крапками; **Б** — зміни морфології колоска в трьох самозапильних поколіннях трьох генотипів *Ae. speltoides* із популяції Kishon. Морфологія колоса рослин популяції TS-84 слугувала контролем (за: Belyayev et al., 2010)

копій є специфічними для різних родин МГЕ (рис. 12.1, А). Це особливо стосувалося генеративних тканин на стадії чоловічого гаметогенезу, де для елементів *Sabrina* (родина *Athila*) впродовж одного покоління спостерігали більше, ніж шестикратну зміну числа копій. У вегетативних тканинах максимальне збільшення було лише двократним (елементи *Wilma*). У цілому, найактивнішими у колоску були такі транспозони,

як *WIS2*, *Wham*, *Sabrina* та *Wilma*, у той час як *Fatima*, *Daniela*, *Sukkula*, *Cassandra* та *En/Spm* мали найбільші флюктуації від покоління до покоління в листках. Це свідчить, що відмінності між спорофітним і гаметофітним поколіннями є набагато істотнішими, ніж відмінності між різними тканинами рослини.

Різні стадії життєвого циклу ретротранспозонів, від транскрипції мРНК до інтеграції

кДНК, передбачають взаємодію з білками. Різна поведінка двох вивчених груп ретротранспозонів відображає, очевидно, відмінності їх взаємодії з білками клітини.

У цілому, аналізи виявили, що чисельність МГЕ мало змінювалася в поколіннях спорофітів, у той час як число їхніх копій у гаметофітах досягало мінімуму в S2-поколінні і максимуму — в S3-поколінні, що корелювало з каріотипними змінами. Моделювання часової динаміки числа копій МГЕ показало, що у гаметофітів виявлена кількість ретроелементів у потомстві одного генотипу не може бути пояснена простим хромосомним успадкуванням і принаймні частина мінливості, властива для всієї сукупності транспозонів, може бути наслідком їх активації і наступної вставки нових копій та специфічною втратою інтегрованих МГЕ.

Припускається, що певний відсоток транспозонів, кількість копій яких збільшується, є транспозиційно активним і вони можуть вставлятися у нові локуси, діючи як справжні мутагени.

Автори встановили, що рослини, які вижили, мали низку цитологічних змін і виявлені зміни кількості МГЕ зумовлені втратою чи набуттям хромосомних сегментів, що відрізняються за своїм набором транспозонів. Відомо, що різні типи транспозонів скупчуються в сайтах рДНК і навколо них. МГЕ формують хромосомні мінікластери в еухроматині, а також складають величезну частину гетерохроматину (див. огляд: Raskina et al., 2008). Будь-який кластер транспозонів є додатковою мішенню для гомологічної і гетерологічної рекомбінації, що може викликати повні чи часткові делеції гетерохроматинових блоків, збагачених на МГЕ. У такий спосіб хромосомні перебудови можуть позначатися на кількості копій транспозонів.

Авторам не вдалося чітко віддиференціювати вплив надкомплектних В-хромосом на динаміку транспозонів від впливу інших хромосомних аномалій, не виявлено чіткої кореляції між збільшенням числа В-хромосом і одночасним сплеском кількості копій МГЕ. Тим не менше, певну кореляцію було встановлено. Так, в одного з генотипів (форма G9) збільшення кількості В-хромосом з трьох до п'яти корелювало зі значним зростанням числа копій транспозонів *WIS2*, *Daniela*, *Fatima* та *En/Spt* у S2-поколінні.

У наступному S3-поколінні повтори ДНК В-хромосом слугували додатковими мішенями для незаконної рекомбінації, яка вважається головною рушійною силою зменшення розміру геному. Тому одна подія (збільшення кількості В-хромосом) індукує іншу (незаконну рекомбінацію), а це корелює зі зменшенням числа копій кількох типів транспозонів. Для іншої форми, генотипу G14, ця тенденція настільки чітко не виявилася, можливо, тому, що число В-хромосом у неї змінювалося не так сильно.

Таким чином, автори (Belyayev et al., 2010) встановили таке:

- в організмів однієї і тієї самої популяції *Ae. speltoides* і в їхніх нащадків, отриманих шляхом самозапилення, представники різних родин МГЕ значно варіюють за числом копій;
- флюктуації за числом копій транспозонів є родиноспецифічними;
- існує велика відмінність у рівнях збільшення чи зменшення числа копій МГЕ між гаметофітами і спорофітами;
- певний відсоток транспозонів, кількість копій яких зростає, може вбудовуватися в нові локуси, і вони можуть бути справжніми мутагенами.

В обговоренні отриманих результатів автори підкреслюють, що згідно з теорією новому генетичному варіанту важко стати фіксованим, за винятком його виникнення в малих, інбредних популяціях (Husband, 2004). Зменшення розміру популяції збільшує вірогідність фіксації шкідливих мутацій і приводить до геномної диверсифікації шляхом накопичення молекулярних змін (Ohta, 2002). Крім того, менші розміри популяцій можуть полегшувати пасивне накопичення вставок транспозонів (Lynch, Conery, 2003). Із 2000 до 2005 р. популяція *Ae. speltoides*, що вивчалася, зменшилась у розмірі втричі, вона розташована на південному краю ареалу виду, де зазнає абіотичних стресів. Стреси, яким вона підлягає, можуть одночасно активувати МГЕ, збільшувати частоту самозапилення і, тим самим, компенсувати описані явища, обмежувати розмір популяції, збільшуючи вірогідність фіксації геномних змін. Очевидно, генетичні й епігенетичні зміни у комбінації з каріотипними змінами дозволяють видам з пластичними геномами за інтенсивного зовнішнього тиску виживати як у вигляді нових форм, так, можливо, і у вигляді нових видів (Belyayev et al., 2010).

12.1. Динаміка транспозонів й інших фракцій високоповторюваної ДНК як індикатор процесів видоутворення

На сьогодні найцікавішими і важливими дослідженнями генетичних основ адаптації рослин до екстремальних умов зростання і еволюції рослинних видів є, безумовно, дослідження, проведені в Інституті еволюції університету Хайфи (Ізраїль) під керівництвом професора Еватара Нево. Розглянемо деякі результати цих досліджень на прикладі динаміки високоповторюваної фракції ДНК, як індикатора процесу видоутворення, у деяких видів родини Poaceae, коротко викладені у роботі (Беляев, Раскина, 2010).

Автори вивчали складові високоповторюваної фракції ДНК, що складає до 99% у крупних геномах злаків, у першу чергу — МГЕ у диплоїдних предків культурної пшениці, зокрема у видів секції Sitopsis (*Aegilops*, Poaceae) (див.: Беляев, 2009). Для порівняння вивчали й інші види, що належали до різних гілок родини Poaceae. Спочатку було проведено пошук «гарячих точок» еволюції на хромосомах, тобто визначення ділянок хромосом з підвищеним вмістом видоспецифічних нуклеотидних послідовностей. Для визначення в межах хромосом *Ae. speltoides* ділянок різного ступеня консервативності та їх фізичного картування автори розробили і застосували модифікацію методу геномної *in situ* гібридизації (GISH) (Belyayev et al., 1998, 2001). Ідея цього підходу полягає в одночасній гібридизації з хромосомами модельного виду суміші двох по-різному мічених геномних ДНК — власної та іншого виду. В результаті ділянки хромосом модельного виду, збагачені видоспецифічними повторами, флюоресціюють у зеленому спектрі. Метод дозволив виявити найнестабільніші ділянки хромосом *Ae. speltoides*, які першими змінюють свій нуклеотидний склад у процесі еволюції. Ними виявилися більшість термінальних гетерохроматинових ділянок. Автори припустили, що МГЕ можуть викликати значні зміни нуклеотидного складу цих ділянок хромосом.

Наступні гібридизаційні експерименти *in situ* як із сумішшю фрагментів зворотної транскриптази МГЕ, так і з клонованими фрагментами зворотної транскриптази та транспозази

підтвердили результати, отримані за допомогою GISH і показали, що:

- МГЕ типу Ty1-*copia* LINE утворюють великі кластери в гетерохроматинових ділянках хромосом, збагачених видоспецифічними нуклеотидними повторами, тобто можуть відігравати певну роль у перетворенні високоповторюваної фракції ДНК за видоутворення (Belyayev, Raskina, 1998);
- внутрішньовидова мінливість хромосомного розподілу Ty3-*gypsy* та Ac-елементів дає можливість припустити, що активність МГЕ може викликати хромосомні аномалії, особливо в популяціях з екстремальними для даного виду умовами зовнішнього середовища, і, в першу чергу, в крайових (маргінальних) популяціях (Belyayev et al., 2005; Altinkut et al., 2006);
- виникнення частини нерегулярних кластерів рДНК пов'язане, найвірогідніше, з активізацією транспозонів *En/Spm* у мейозі (Raskina et al., 2004a).

Спираючись на викладені дані, автори моделювали реальні процеси, що проходять у невеликій крайовій популяції *Ae. speltoides*, коли за несприятливих зовнішніх умов перехресно запилювані рослини переходять до самозапилення. Вивчили динаміку МГЕ, які належать до різних класів, впродовж трьох циклів самозапилення у геномах модельних рослин, що характеризуються хромосомними абераціями і несуть додаткові В-хромосоми (Raskina et al., 2004a, 2004b). Для визначення копійності МГЕ використовували два типи ДНК — із листків та з колосків на стадії мікроспорогенезу. Дані з копійності МГЕ отримані RT PCR, і результати перевірялися методом dot-blot і 454-піросиквенуванням. Було встановлено таке:

- копійність різних МГЕ значно варіює у різних представників (генотипів) однієї популяції та їхніх нащадків;
- існує суттєва різниця за копійністю МГЕ між генеративними та вегетативними тканинами однієї рослини;
- IRAP-аналіз показав, що невеликий відсоток МГЕ може бути транспозиційно активним.

Підвищений рівень змін копійності МГЕ у низці поколінь за переходу до самозапилення супроводжувався інтенсивними перебудовами каріотипу, що свідчить на користь гіпотези про значну роль МГЕ у стимулюванні хромосомних аберацій (Belyayev et al., 2010).

Беручи до уваги, що зміни патерна рДНК пов'язані з активністю МГЕ і в той же час є індикатором видоутворення у пшениць, було проведено порівняльне дослідження хромосомного патерна (розподілу по хромосомах) рДНК рослин з двох невеликих крайових популяцій видів секції *Sitopsis* — перехреснозапильного, диморфного *Ae. speltoides* та спорідненого самозапильного *Ae. sharonensis*. На основі багаторічних польових спостережень над даними популяціями дослідники висунули гіпотезу про те, що *Ae. sharonensis* є похідним видом від *Ae. speltoides*, адаптованим до специфічних ґрунтових умов — легких піщаних ґрунтів. Отримані авторами цитогенетичні та молекулярно-генетичні дані свідчать на користь цієї гіпотези. Зокрема, було виявлено, що в невеликій периферійній популяції *Ae. speltoides* з високим рівнем активності МГЕ класів I та II постійно виникають певні хромосомні перебудови, які приводять до утворення нових геномних форм з *sharonensis*-типом хромосомного патерна рДНК. Потомство рослин, що мають додаткові блоки рДНК, в основному успадковують батьківський генотип при самозапиленні. Разом з тим автори постійно спостерігали як утворення нових сайтів рДНК, так і їх елімінацію («нормалізацію» геному). Як наслідок, невелика кількість фертильних, гомозиготних та здатних до самозапилення форм із *sharonensis*-типом хромосомного розподілу рДНК колонізують розташовані поблизу дюни, які недоступні для материнського виду. Таким чином, можна говорити про існування певного «еволюційного каналу», який веде від пластичного геному *Ae. speltoides* до геному *Ae. sharonensis*.

Формально присутність проміжних генотипів може бути пояснена явищем інтрогресії. Проте автори з самого початку відкинули цю можливість з таких причин:

- як було показано низкою досліджень, природна гібридизація між диплоїдними видами

Aegilops трапляється досить рідко, незважаючи на те, що ці види часто ростуть поруч;

- відповідно до польових досліджень між двома вивченими видами існує як сезонна ізоляція, так і ізоляція за типом розмноження — самозапильний *Ae. sharonensis* квітує на 1–1,5 місяця раніше, ніж перехреснозапильний *Ae. speltoides*;
- незважаючи на близьке просторове розташування двох видів, не було знайдено змішаних груп, що говорить про екологічну ізоляцію.

Можна припустити, що процес зміни хромосомного розподілу блоків рДНК у процесі формо/видоутворення починається з простого перенесення невеликих фрагментів рДНК на нове місце. Механізмом перенесення можуть бути ектопічні обміни, гетерологічна рекомбінація або пряме перенесення рДНК мобільними елементами. Непостійні кластери, у свою чергу, є мішенню для гетерологічного синапсу і рекомбінації, при цьому розмір кластера може змінюватися.

Просторова близькість популяцій *Ae. speltoides* та *Ae. sharonensis* свідчить про швидке симпатричне видоутворення у невеликій, екологічно стресованій популяції на периферії ареалу (див.: Грант, 1984, 1991). Однією з характерних ознак цього типу видоутворення є відсутність гібридної зони між двома видами завдяки строгій біологічній ізоляції, що і спостерігали в описаних дослідках.

На основі отриманих результатів автори пропонують таку картину мікроеволюційних змін, які проходять у невеликих крайових популяціях *Ae. speltoides*. Під впливом мінливих кліматичних умов голоцену популяції значно скорочуються за площею. Більшість рослин у популяції переходить до самозапилення, що викликає інбредну депресію, але значно активує пул МГЕ ядерного геному. Активність МГЕ особливо проявляється під час гаметогенезу в генеративних тканинах. Це призводить до гамето-специфічних мутацій на молекулярному та епігенетичному рівнях і до епігенетичних змін геному, продукує геномну і, як наслідок, морфологічну варіабельність. Комбінація генетичних/епігенетичних змін з перебудовами каріотипу дозволяє видам з пластичним геномом вижити як новій формі (чи й виду) за інтенсивного впливу зовнішнього середовища (Беляев, Раскина, 2010).

Розділ 13. МГЕ Й ЕВОЛЮЦІЯ СТАТІ

Усі організми, які розмножуються статевим шляхом, є евкаріотами. Це свідчить про складну еволюційну історію становлення статі. На сьогодні відомо кілька гіпотез, які пояснюють еволюцію статевого розмноження, і вони, згідно з оглядом (Геращенко, Рожнова, 2010), групуються, по суті, у двох напрямках:

- походження статі;
- підтримка статі в еволюції (відповідні посилення див. в огляді: Геращенко, Рожнова, 2010).

Проте більшість гіпотез обходять такий важливий момент, як молекулярні чинники в еволю-

ції статевого розмноження. Винятком є гіпотеза, яка розглядає виникнення статі внаслідок активності МГЕ. Згідно з цією гіпотезою МГЕ — це геномні паразити, трансмісія яких відбувається завдяки статевому процесу. Вінцем цієї гіпотези стала теорія походження статевого розмноження у результаті активності МГЕ (Hickey, 1982; Попад'їн, 2003).

Розглянемо детальніше особливості статевих хромосом і структурно-функціональну значущість МГЕ у підтриманні статі у рослин.

13.1. Еволюція статевих хромосом

Більшість видів вищих рослин не мають диференційованих статевих хромосом головним чином тому, що дводомні складають меншість серед квіткових рослин, усього 5–6% від загальної кількості видів (див. огляд: Геращенко, Рожнова, 2010). Це вказує на незалежний розвиток дводомності в деяких генеалогічних лініях (Charlesworth, 2002). У багатьох дводомних рослин гетероморфних статевих хромосом не знайдено, навіть тоді, коли детермінація статі регулюється генетично. У таких випадках, оскільки статеві хромосоми не можуть ідентифікуватися за розміром чи формою, вони ідентифікуються трисомним аналізом або з використанням генетичних маркерів. Саме так було ідентифіковано хромосоми 1 та 5 як статеві хромосоми у *Spinacia oleraceae* і *Asparagus officinalis*, відповідно. Гомоморфні статеві хромосоми також було ідентифіковано у папаї разом з локусом, який визначає стать і був генетично картований. Пізніше встановили, що чоловічо-специфічний Y-хромосомний локус є дегенерованим: для нього характерними є низька генна щільність, висока щільність ретротранспозонів і повторюваних послідовностей та пригнічена рекомбінація (Ming et al., 2007; Jamilena et al., 2008; Kejnovsky et al., 2009). Таким чином, статеві хромосоми виникли в обмеженої кількості дводомних квіткових рослин, і тільки деякі було охарактеризовано на цитологічному та/або молекулярному рівнях (Charlesworth, 2002).

Головна подія в еволюції статевих хромосом — це пригнічення рекомбінації. Без цього чоловічі або жіночі стерильні мутації могли б ревертувати до гермафродитизму (Charlesworth, 2002). Типові особливості «молодих» статевих хромосом — це пригнічення рекомбінації всередині та навколо статі-визначального локусу та помірна дегенерація чоловічо-специфічної ділянки (Ming et al., 2007). Вони часто викликані перебудовою або модифікацією послідовностей ДНК. Хоча склад ділянок з пригніченою рекомбінацією еволюціонує швидко, самі ділянки, мабуть, залишаються на тому самому місці протягом тривалих періодів. Зокрема, поступове зниження швидкості рекомбінації може вважатися частиною загального процесу пригнічення рекомбінації X- і Y-хромосом у смілки *Silene*. Метилування ДНК — другий можливий механізм пригнічення рекомбінації, як це виявлено у гриба *Ascobolus immerses* (Maloisel, Rossignol, 2006).

Припускають, що пригнічення рекомбінації між хромосомами X і Y виникало саме тому, що рекомбінація цих локусів могла би дати неадекватні фенотипи, наприклад проміжні за статтю індивідууми. «Протосексуальні» хромосоми, вірогідно, походять від гомологічних хромосом, які несуть рецесивні гени, зчеплені як з чоловічою стерильністю, так і з жіночою фертильністю (прото-X), і домінантні фактори, зчеплені з чоловічою фертильністю та жіночою

супресією (прото-Y) (Ming et al., 2007). Таким чином, рекомбінація між чоловічими та жіночими детермінантами повинна бути пригнічена, щоб стабілізувати дводомність у популяції. Інші чинники також могли вносити свій вклад у шляхи детермінації статі у рослин. Це такі фактори, як асоціація дводомності з гомоморфними або гетероморфними статевими хромосомами, пригнічення рекомбінації у невеликій частині або на більшості X- і Y-хромосом, чоловіча гетерогаметність, або такі детермінанти, як Y-активна або X/A системи визначення статі. У будь-якому випадку питання про молекулярний чинник цих еволюційних змін залишається відкритим.

Еволюція статевих хромосом може бути поділена згідно з (Ming et al., 2007) на п'ять стадій на основі розміру нерекомбінуючої ділянки, ступеня дегенерації та розміру Y-хромосоми:

- формування прото-X- та прото-Y-хромосом. Чоловічо- та жіночо-стерильні мутації локалізовані на хромосомі, рекомбінація у цьому локусі пригнічена і безпосереднє сусідство призводить до ініціації дегенераційних процесів. Однак YY-генотип життєздатний. Прото-X відрізняється від прото-Y-хромосом тільки за стать-визначальними генами, які формують просту діалельну систему детермінації статі. Приклад *SUPERMAN* (*SUP*) гена в арабідопсиса, мутація якого викликає досконалу унісексуальність, міг би теоретично ілюструвати виникнення примітивних систем визначення статі (Negruțiu et al., 2001). Приклади цієї стадії — скажений огірок звичайний *Ecballium elaterium* та заячий холодок (спаржа) *A. officinalis*;
- пригнічення рекомбінації розповсюджується на додаткові зчеплені локуси, що призводить до дегенерації малої хромосомної ділянки і утворення чоловічо-специфічної ділянки на примітивній Y-хромосомі. Втрата генного змісту досить суттєва, щоб викликати летальність YY-генотипів навіть у тому випадку, якщо статеві хромосоми все ще видимо гомоморфні на цитологічному рівні. Статеві хромосоми папаї *Carica papaya* і смілки *S. latifolia* перебувають на цій ранній стадії;
- накопичення МГЕ і дуплікації в чоловічо-специфічній ділянці викликають експансію вмісту ДНК на Y-хромосомі. Нерекомбіную-

ча ділянка поширюється на більшу частину Y-хромосоми, і відбувається подальша дегенерація. На цій стадії хромосоми X та Y гетероморфні, а Y-хромосома фізично крупніша, ніж X-хромосома. Статеві хромосоми *Silene* мають такі властивості. Наприклад, статеві хромосоми *S. latifolia* більші за аутосоми, Y-хромосома більша за X-хромосому і містить приблизно 9% тотального диплоїдного геному чоловічої особини (Matsunaga, 2006);

- деяка дегенерація Y-хромосоми викликає втрату функції більшості генів, і це робить можливими делеції нефункціонуючих послідовностей Y-хромосоми, що приводить до скорочення розміру Y-хромосоми. Приклад — статеві хромосоми ссавців. Однак статеві хромосоми вищих рослин на цій стадії не відомі. Можливо, прикладом цього етапу еволюції є дводомний печінковий мох *Marchantia polymorpha*, Y-хромосома якого найменша в чоловічому диплоїдному геномі (Ishizaki et al., 2002). Така маленька Y-хромосома, вірогідно, відображає наслідок дегенерації, яка настає після пригніченої рекомбінації;
- пригнічення рекомбінації розповсюджується на всю Y-хромосому. Подальше зменшення розміру Y-хромосоми призводить до повної втрати рекомбінуючої псевдоаутосомної ділянки. Y-хромосома повністю втрачена, і формується система визначення статі за рахунок співвідношення X/A. Нова Y-хромосома може виникнути, але не буде мати ніякого впливу на визначення статі. Статеві хромосоми щавлю *Rumex acetosa*, японського хмелю *Humulus japonicus*, дрозofiли *Drosophila* та нематоди *Caenorhabditis elegans* перебувають на цій стадії. Y-хромосоми конопель *Cannabis sativa* також більші у чоловічому геномі. Хоча Y-хромосома *R. acetosa* розділена на Y₁ та Y₂, її сумарний вміст більший у чоловічому геномі.

Таким чином, структура статевих хромосом у різних видів рослин демонструє різні етапи дегенерації Y-хромосоми. Стає зрозумілим, що накопичення повторюваної ДНК, включаючи МГЕ та сателіти, відіграє важливу роль у дивергенції і збільшенні розміру Y-хромосом рослин і у зменшенні генної щільності (Mariotti et al.,

2006; Jamilena et al., 2008; Kejnovsky et al., 2009; Matsunaga, 2009).

Статеві хромосоми, вірогідно, багаторазово і навіть зовсім недавно еволюціонували в різних таксонах. Так, припускають, що роздільна статевість могла виникати більше 100 разів у квіткових рослин, оскільки 160 родин мають дводомних представників. Статеві хромосоми рослин, можливо, перебувають головним чином на ранніх стадіях еволюції, але щавель і японський хміль є винятками. Хоча статеві хромосоми щавлю і японського хмелю виникли зовсім недавно (покритонасінні рослини виникли близько 158–179 млн років тому), порівняно з

віком статевих хромосом ссавців і *Drosophila* у 300 млн років вони, можливо, перебувають на більш пізній стадії еволюції, оскільки дві Y-хромосоми не містять стать-визначальних генів. Це може свідчити, що швидкість дегенерації Y-хромосоми змінюється серед рослинних видів або що деякі молекулярні події могли драматично змінити хід еволюції статевих хромосом.

Таким чином, велика питома вага МГЕ у структурі статевих хромосом рослин дозволяє припускати їх активну участь в еволюції статі у рослин (Kejnovsky et al., 2009; Matsunaga, 2009; Геращенко, Рожнова, 2010).

13.2. Роль МГЕ у формуванні статевих хромосом і генетичного різноманіття

Як уже відзначено вище, МГЕ розповсюджені скрізь і являють собою значний суттєвий компонент більшості рослинних геномів. Вони складають щонайменше 45 % геному людини і 50–90 % геному деяких рослинних видів (Wessler, 2006).

Вплив МГЕ на розмір геному очевидний. Так званий «парадокс С-розміру», під яким розуміють значне варіювання розміру геномів за відсутності очевидної варіації числа генів, наразі сприймається як результат різної представленості численних повторів, серед яких велику питому вагу складають МГЕ, особливо ретротранспозони (Gregory, 2005; Патрушев, Минкевич, 2007). При цьому надлишкова ДНК взагалі і МГЕ зокрема можуть вносити свою лепту у збільшення розміру Y-хромосоми рослин з гетероморфними статевими хромосомами (Lakhota, 2006; Matsunaga, 2009). Крім того, особливості впливу МГЕ на перебіг мейозу як ключовий елемент статевого процесу можуть бути зумовлені величезними відмінностями у розмірах геному різних рослин (Cai, Xu, 2007). Очевидно, при цьому розмір геному може мати значні наслідки для структурно-функціональної організації хромосоми і геному, упаковки ДНК у хроматин і розподілу генів та повторюваних послідовностей ДНК, які, в свою чергу, впливають на механізм спарювання та вибору сайту рекомбінації.

Були знайдені кілька МГЕ, специфічних відносно статі та статевих хромосом рослин

(Sakamoto et al., 2000; Obara et al., 2002; Matsunaga et al., 2002; Pritham et al., 2003; Khadka et al., 2005). Відповідно до математичних моделей та експериментальних даних в нерекомбінуючих частинах Y-хромосоми накопичуються повторювані послідовності ДНК, як МГЕ, так і тандемні повтори (Charlesworth, 2002; Ming et al., 2007; Kejnovsky et al., 2009; Matsunaga et al., 2009). Зокрема, ці приклади включають LTR-невмісні ретротранспозони у конопель *Cannabis sativa*, тандемні повтори у щавлю *Rumex acetosa*, унікальні повтори у печіночника *Marchantia polymorpha*, ретротранспозони у чоловічо-специфічній ділянці примітивної Y-хромосоми папаї, а також МГЕ, тандемні повтори, мікросателіти і хлоропластну ДНК у смілки *Silene latifolia*.

МГЕ, які діють як безперервні мутагенні агенти внаслідок своєї здатності до ампліфікації та рухомості, вірогідно, є головним джерелом генетичного різноманіття (див. розділ 10). Сьогодні відомо кілька шляхів, завдяки яким МГЕ реструктурують геноми хазяїна:

- опосередковане МГЕ пошкодження та відновлення структури хромосом;
- дія МГЕ як інсерційних мутагенів;
- епігенетична регуляція геному хазяїна (Wessler, 2006).

Достатньо сказати, наприклад, що понад 90 % усіх спонтанних мутацій у вивчених з цієї точки зору організмів пояснюється вбудовою або неправильним вирізанням МГЕ з «нормальних»

структурних генів (Shibata et al., 2000). Розглянемо відомі характерні приклади.

Наслідком транспозиції МГЕ може стати мутація. МГЕ часто знаходять поблизу генів, і їх епігенетичний сайленсинг може впливати на експресію сусідніх генів. Таким прикладом є випадок інсерції *Mutator*-подібного елемента (*Mutator-like element, MULE*) у перший інтрон *FLC*-гена, залучений до процесу цвітіння в арабідопсиса. Наявність цієї *MULE*-вставки в деяких екотипів, таких як *Landsberg erecta*, може пояснити таку репродуктивну особливість фенотипу, як раннє цвітіння (Deragon et al., 2008). Епігенетичний контроль статі за участі МГЕ описано для дині *Cucumis melo* (Martin et al., 2009). Показано, що в гіноєцичних лініях (які несуть лише жіночі квітки) трансформація чоловічих квіток у жіночі відбувається внаслідок епігенетичних змін у промоторі транскрипційного фактора *CmWIP1*. Ця успадковувана епігенетична зміна відбувається у результаті інсерції ДНК-транспозона *Gyno-hAT*, який необхідний для ініціації і підтримки процесу розповсюдження метилювання ДНК у напрямку промотора *CmWIP1*. Тобто експресія гена *CmWIP1* призводить до загибелі плодолистка і до розвитку одностатевих чоловічих квіток. Таким чином, тісна асоціація МГЕ з генами хазяїна може привести до формування епіалелей (Lisch et al., 2009; Martin et al., 2009), алельних варіантів, які залежать від відмінностей у модифікаціях ДНК та гістонів у первинній структурі ДНК. Оскільки епіалелі часто метастабільні і потенційно піддаються впливу зовнішнього середовища, їх існування має важливе значення в еволюції статі.

Проте вплив МГЕ на геном не є одностороннім. МГЕ також перебувають під дією добору з боку геному хазяїна. Оскільки МГЕ, безумовно, найдинамічніший компонент будь-якого геному, вони представляють собою швидкоеволюціо-

нуючий пул потенційно корисної інформації, від нової ензиматичної функції до нової перебудови існуючих ДНК-послідовностей. Очевидно, МГЕ слугують своєрідним динамічним резервуаром послідовностей в еволюції генних функцій. Таким чином, «живучість» і розповсюдженість «егоїстичних» елементів у геномі може розглядатись як підсумок специфічної взаємодії МГЕ і геному хазяїна. «Одомашнювання» МГЕ геном хазяїна — приклад такого взаємовигідного співробітництва (Volf, 2006; Sinzelle et al., 2009; див. також розділ 8). У такому випадку, окрім своєї здатності модифікувати генну експресію, МГЕ можуть бути джерелом нових клітинних генів. ДНК-зв'язувальна та каталітична активність транспозаз присутня в клітинних генах, які в деяких випадках, вірогідно, походять від давніх транспозаз. У рослин приклади «одомашнювання» описані для різних родин ДНК-транспозонів. Найвідоміший приклад — це *FAR1* і *FHY3* гени арабідопсиса, що кодують транскрипційні фактори; вони залучені в трансдукцію фітохром А-опосередкованих сигналів у рослин, мутації яких призводять до світлозалежних фенотипів (Hudson et al., 2003; див. також розділ 8). Так, транспозазні гени, що кодуються елементами з надродини *hAT*, були «одомашнені» у різних евкаріотних лініях. Порушення роботи *hAT*-подібного транспозазного гена *Daysleeper* призводить до дефектів росту і розвитку арабідопсиса. Похідні від МГЕ гени, а саме хазяйські гени родини *Mustang* (що походить від транспозазного гена *Mutator*), *hAT*-подібний транспозазний ген *gary* знайдені у багатьох видів рослин (Wessler, 2006; Volf, 2006; Sinzelle et al., 2009). Також можливе походження внаслідок «одомашнювання» деяких генів рослин, які мають високу гомологію з ДНК-транспозонами надродини *Pogo*. «Одомашнюванню» МГЕ належить важлива роль у реалізації вторинного безстатевого розмноження, яке розглянуто далі.

13.3. МГЕ та системи розмноження рослин

Первинною рушійною силою розповсюдження більшості МГЕ є їх добір за здатністю давати нащадків, а не якісь надані ними переваги для хазяїна. Разом з тим, «живучість» і розповсюдженість мобільних елементів у підсумку

можуть розглядатись як баланс між їх трансмісійною перевагою та різними шкідливими ефектами, пов'язаними з їх активністю. Внесок МГЕ в архітектуру геному хазяїна та поява генетичної новизни, вірогідно, буде залежати, щонайменше

частково, від різноманіття МГЕ, механізму їх переміщення у геномі, системи розмноження рослин (статевої чи безстатевої) та деяких інших особливостей.

Очевидно, тип розмноження (статевий або безстатевий) — один з головних чинників, що впливають на еволюцію МГЕ в евкаріотів. Вперше припущення про зв'язок між статевим розмноженням та МГЕ було висловлено у 1980 р. у двох незалежно опублікованих роботах (Doolittle, Sapienza, 1980; Orgel, Crick, 1980), присвячених егоїстичній природі МГЕ. Трохи пізніше було підкреслено, що розповсюдження «егоїстичних» елементів відбувається, перш за все, завдяки статевому розмноженню (Hickey, 1982).

Незважаючи на існування молекулярних механізмів, які обмежують активність МГЕ, показано, що навіть МГЕ, які викликають шкідливі ефекти, можуть розповсюджуватись у статевих популяціях завдяки своїй здатності розмножуватись і колонізувати обидві гомологічні хромосоми у зиготі (Hickey, 1982). При цьому в безстатевих популяціях МГЕ залежать повністю від виживання своїх хазяїв і навряд чи збереглися б у тривалому ряді поколінь. Таким чином, МГЕ приречені на вимирання разом зі своїми хазяями або на «одомашнювання» (Arkhipova, Meselson, 2000; Nuzhdin, Petrov, 2003). На підтвердження цієї ідеї показано відсутність активних ретротранспозонів у геномах коловерток *Bdelloidea*, які, можливо, стали безстатевими ще мільйони років тому, а в усіх інших вивчених організмів, включаючи споріднені статеві родинні групи коловерток, ретротранспозони були детектовані (Arkhipova, Meselson, 2000). Єдиними МГЕ, знайденими у коловерток, були ДНК-транспозони, подібні до елементів *Mariner*. Пізніше було встановлено, що знайдені у коловерток ретротранспозони, які містять інтрони, і теломерні ретротранспозони у *Giardia lamblia* «одомашнені» та/або не здатні до шкідливих інсерцій у своїх безстатевих хазяїв (Lisch, 2009). На основі цих даних було висловлено припущення, що молекулярні механізми контролю активності МГЕ у статевих форм тварин можуть бути асоційовані з мейозом. При цьому важлива особливість еволюційної переваги статевого розмноження над безстатевим полягає у здатності амфіміксису обмежувати внутрішньогеному проліферацію МГЕ, очищаючи геном від

їх шкідливої дії. В експериментах з дріжджами на *Ty3*-ретротранспозонах і ендонуклеазних генах було показано, що обидва типи елементів мають тенденцію розповсюджуватись в сексуальних, а не в безстатевих популяціях (Goddard, 2001).

Разом з тим даних про можливу участь МГЕ у реалізації статевого й апоміктичного розмноження рослин дуже мало. Так, за дослідження можливих напрямків коеволюції репродуктивної моди (статевої і апоміктичної) та розміру геному при тестуванні 71 виду і підвиду роду *Eupragium* було виявлено, що у філогенетично молодій однойменній секції *Eupragium* відносний вміст ДНК у апоміктів був збільшений виключно завдяки поліплоїдизації. Апомікти еволюційно старішої секції *Ascyreia* мали значно більший геном, ніж усі інші види, завдяки поліплоїдизації і підвищеній кількості ДНК на хромосому. Припускається, що саме накопичення ретротранспозонів у цієї групи апоміктів може спричинювати збільшення розмірів геному (Matz et al., 2003). Також було виявлено, що число копій і різноманіття деяких ретротранспозонів (перш за все *gypsy*) було меншим у *Poncirus*, ніж у *Citrus aurantium*, який відрізняється меншою пенетрантністю апоміксису (Bernet, Asins, 2003).

Фізичне та функціональне картування геномної ділянки, зчепленої з апоспорією у *Pennisetum squamulatum* і *Cenchrus ciliaris*, показало, що маркерна ділянка ASGR (apospory specific genome region) збагачена на МГЕ і бідна на гени. Зокрема, цей регіон включав високоповторювані послідовності з *Orie-2*-подібної родини ретротранспозонів, які є звичайними для цієї ділянки геному (Akiyama et al., 2004). FISH-аналіз показав, що ця ділянка локалізована на єдиній хромосомі і не має гомологів. Особливості локусу ASGR нагадували особливості хромосомних сегментів, багатих на «егоїстичну ДНК» (Ozias-Alkins et al., 2003). Було припущено, що механізм генної регуляції апоміксису у *Pennisetum* ґрунтується на транскрипційній активності ретротранспозонів. Питання про те, чи є повторювана ДНК та ASGR молекулярним «паразитом» чи «геномним симбіонтом», який дає хазяїну якісь переваги, може бути вирішеним після повного дослідження локусу, зчепленого з апоміксисом.

Порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей підродин ретротранспозонів у чо-

тирьох безстатевих рослинних видів показав достатньо високу внутрішньо- та міжвидову консервативність цих ретротранспозонів і високу синонімічність замінів. Високу консервативність нуклеотидних послідовностей ретротранспозонів у геномах рослин із статевим та безстатевим розмноженням автори пояснюють тим, що безстатеве розмноження у досліджених таксонах виникло відносно недавно і тому суттєво не змінило структуру і різноманіття ретротранспозонів (Docking et al., 2006). Однак причина високої консервативності ретротранспозонів у статевих і апоміктичних форм, можливо, полягає перш за все в особливостях реалізації апоміксису у квіткових рослин. Нагадаємо, що у рослин апоміксис не є облігатним: апоміктичні і статеві популяції апоміктичних видів організовані в агамні комплекси зі складною структурою репродуктивних взаємовідносин. Так що суворой репродуктивної ізоляції між статевими й апоміктичними формами не існує (Кашин, 2006). Є кілька можливих пояснень факту виявлення інтактних ретротранспозонів у папороті *Vittaria appalachiana* (Docking et al., 2006):

- по-перше, це недавнє походження ретротранспозонів у цьому геномі (завдяки можливій інфекції шляхом горизонтального перенесення). Однак, якщо горизонтальне перенесення дійсно проходить між безстатевими видами і їх статевими родичами, повна втрата МГЕ у безстатевих форм може ніколи не статися;
- друга можливість — інсерції МГЕ не є строго шкідливими. Розглянуте вище «одомашнення» МГЕ слугує цьому підтвердженням (див. розділ 8).

Особливо слід згадати багаторічні дослідження з пошуку й аналізу *mei*-мутацій, які порушують мейоз у кукурудзи. Мутагенез з використанням транспозона *Mul* виявився надзвичайно плідним для отримання *mei*-мутацій, які реалізувались у різних хромосомах. Ці дослідження показали прямий зв'язок між ключовою подією статевого процесу — мейозом — і активністю МГЕ у рослин (Голубовская, 2001).

Окрім проблеми виявлення функціонально активних МГЕ у безстатевих таксонах, дуже цікава і важлива проблема — це підтримка безстатевого розмноження у цих популяціях. Безстатеві популяції мають ризик накопичення мутацій

і погіршення пристосованості та можливість довгострокового еволюційного існування в тому випадку, якщо не мають МГЕ або здатні пригнічувати їх (Arkhipova, Meselson, 2000; Nuzhdin, Petrov, 2003). Таким чином, у процесі еволюції існування статевих і безстатевих типів розмноження і наявність МГЕ є взаємообумовленими.

Накопичені дані дозволили поставити питання про пошук молекулярних маркерів на основі МГЕ для генетичного аналізу систем розмноження у квіткових рослин. Цікавим у цьому плані є дослідження, виконане на видовому комплексі *Boechera* (Геращенко и др., 2009). Цей комплекс видів є високополіморфним таксоном, що включає як сексуальні, так і апоміктичні форми. Вони виявляють апоміксис на різних рівнях плоідності, включаючи диплоїдний $2n=2x=14$ (що є рідкісним явищем за апоміксису), триплоїдний ($2n=3x=21$) і тетраплоїдний ($2n=4x=28$). Важливо також, що форми боечери мають мінімальний розмір геному серед відомих апоміктів. Проведені дослідження дозволили вперше виявити потенційні маркери, які асоційовані з апоміксисом у боечер як із нідерландської, так і з німецької колекцій. За дослідження генетичного поліморфізму спектрів МГЕ у центромерній ділянці геному в досліджених форм *Boechera* методом класичної ПЛР було проаналізовано (5×19 МГЕ) = 95 варіантів праймерних комбінацій. Знайдено потенціальний маркер, що асоційований з апоміксисом, на основі LTR-вмісного транспозона, який належить до класу 1 МГЕ, *BARE-1*+MCenR4 розміром 410 п. н.

За дослідження генетичного поліморфізму спектрів МГЕ у теломерній частині геному в досліджених форм *Boechera* методом класичної ПЛР проаналізовано (3×19 МГЕ) = 57 варіантів праймерних комбінацій. Для теломерних ділянок геному асоціативних комбінацій у зв'язку з типом репродукції не виявлено.

Методом транспозон-дисплея виявлено такі маркери, асоційовані з апоміксисом. Це маркери на основі LTR-невмісного транспозона, який належить до класу 1 МГЕ, Cin4a + Vtat з розмірами 220 п. н., 240 п. н. і 380 п. н., і маркер на основі ДНК-транспозона, що належить до класу 2 МГЕ, Isaak = Vcaa розміром 230 п. н. Одержані результати можуть свідчити на користь гіпотези про можливу участь МГЕ у генетичному контролі апоміксису у *Boechera*.

13.4. Шляхи і напрями еволюції статі. Підсумок

Зазвичай стать визначається як властивість, що дозволяє класифікувати організми (звичайно, як жіночі або чоловічі) одного виду на основі їхніх репродуктивних органів і функцій. Сексуальний диморфізм — це пізнє онтогенетичне вирішення проблеми статі під час життєвого циклу рослин, обмежене флоральним органогенезом або репродуктивною диференціацією (див. огляд: Геращенко, Рожнова, 2010).

Системи розмноження рослин демонструють широку і дивну різноманітність (Батыгина, Васильєва, 2002). Відомо, що статеве/насіннєве розмноження — характерна особливість квіткових рослин, при цьому безстатевонасіннєве розмноження, або апоміксис, виникає як результат специфічної модифікації статевого розмноження на етапах мейозу та запліднення. Безумовно, розуміння шляхів і молекулярно-генетичних механізмів еволюції статі у квіткових рослин є давньою і центральною проблемою еволюційної біології і ботаніки. Особливості структурно-функціональної організації рослинних геномів дозволяють ставити питання про молекулярні чинники в еволюції статі.

Надлишкова ДНК взагалі і МГЕ в тому числі є суттєвими компонентами більшості рослинних геномів, і таке розуміння еволюційної динаміки може бути ключем до розуміння еволюції рослинних геномів і систем розмноження рослин. Показано, що МГЕ вносять величезний вклад у структуру хромосом, включаючи теломери і центромери, і можуть брати участь у реалізації генетичних функцій, таких як мейоз і рекомбінація, приводячи при цьому до великомасштабних перебудов хромосом і епігенетичної регуляції ознак (Голубовский, 2001; Lisch, 2009).

Відомо, що стать є важливим чинником, який визначає успіх МГЕ у популяціях, і їх вплив був досліджений на прикладі низки генетичних об'єктів (Docking et al., 2006; Lockton, Gaut, 2010). Оскільки, на думку деяких дослідників, МГЕ не мають очевидної селективної переваги, вони будуть втрачені через якийсь час, коли мутації і дрейф призведуть до більшої швидкості деградації і втрати МГЕ, ніж поява або реінфікування, які відбуваються за формування зиготи і горизонтального перенесення. Тому очікується, що строго безстатеві організми будуть у кінці кінців звільнені від МГЕ. Таким чином, виникнення і підтримка статі є рушійним чинником в еволюції геномів.

Виявлено ретротранспозони, специфічні стосовно статі і статевих хромосом, у тому числі у рослин (Shibata et al., 2000; Sakamoto et al., 2000; Obara et al., 2002; Matsunaga et al., 2002; Pritham et al., 2003; Khadka et al., 2005). Молекулярний аналіз статевих хромосом показав накопичення в їх складі «надлишкової ДНК», яка несе МГЕ і сателіти (Kejnovsky et al., 2009; Matsunaga, 2009). Еволюційним наслідком цього, вірогідно, стали пригнічення рекомбінації вздовж більшості ділянок X- та Y-хромосом, концентрація зчеплених зі статтю генів на статевих хромосомах, генетична ізоляція та ерозія Y-хромосоми, дозова компенсація X-хромосоми тощо. Очевидно, системи хромосомного визначення статі можуть бути еволюційним наслідком природного добору на користь дводомності.

Статеві хромосоми не з'явилися випадково у тварин або рослин. Скоріше за все, це пара аутосом, що несуть стать-визначальні гени, яка еволюціонувала в напрямку формування специфічних особливостей, наприклад дегенерації Y-хромосоми, що приводить до гетероморфності, яка стала ознакою статевих хромосом (Vyskot, Hobza, 2004). Ці дві системи статевих хромосом (активна Y-система і балансова X/A-система) можуть відображати дві різні стадії еволюції статевих хромосом.

Вірогідно, не існує єдиного уніфікованого механізму, який пояснює детермінацію статі у рослин. Так, відкриття явища чоловічого апоміксису, по суті андрогенезу *in vivo* (Pichot et al., 2001), вказує на багатолику багатовікову природу явищ, що виникають на основі специфічних модифікацій статевого процесу. Також здається вірогідним, що нема єдиного загального (епі)генетичного шляху, який контролюється МГЕ. Можна припускати множину точок типів активності МГЕ і генних ансамблів, які залучені в маніфестацію статі і безстатевонасіннєвості у рослин.

Таким чином, гіпотеза про активну участь МГЕ в еволюційному походженні статі (Hickey, 1982; Попадьин, 2003), будучи трансформованою в гіпотезу про МГЕ як важливий молекулярний чинник подальшої диверсифікації статі, цілком узгоджується із сучасними уявленнями про шляхи і напрями еволюції статі у рослин (див.: Геращенко, Рожнова, 2010).

Розділ 14. РОЛЬ МОБІЛЬНИХ ЕЛЕМЕНТІВ В ОРГАНІЗАЦІЇ ХРОМОСОМ

Хромосома рослин на рівні нуклеотидів складається із послідовностей, які можливо умовно поділити на дві великі групи, що показують різну еволюційну динаміку:

- невелика консервативна частина, яка підлягає тиску добору і відповідає генному простору;
- велика варіабельна частина, яка зазнає динамічних змін і охоплює МГЕ, а також дупліковані гени і фрагменти генів.

У рослин з великим розміром геному, таких як кукурудза, ячмінь, пшениця, генний простір організовано у вигляді генних острівців, що оточені МГЕ. Генні острівці не знайдені у рослин з маленьким розміром геному, наприклад у *Arabidopsis thaliana* і *Brachypodium* (Huo et al., 2009). У пшениці вміст МГЕ дуже сильно відрізняється між різними ділянками хромосом. Дистальні ділянки містять відносно малу кількість мобільних елементів (59,2%) порівняно з проксимальними ділянками, які практично повністю складаються із МГЕ і не несуть жодного гена (Choulet et al., 2010).

Цікавими є результати вивчення *Amborella* — древнього (архаїчного) примітивного роду безсудинних квіткових рослин. Це єдиний представник родини Amborellaceae, ендемік Нової Каледонії, вічнозелений чагарник висотою до 8 м. Розмір його геному — 870 м.п.н. *A. trichopoda* є сестринським кладом усіх квіткових рослин. Її геном є унікальним еталоном (reference) для вивчення і розуміння еволюції геномів квіткових рослин, оскільки він може бути базовим видом за кореневих порівняльних аналізів.

Сиквенс-аналіз показав, що щільність LTR-вмісних ретротранспозонів і в цієї родини негативно корелює зі щільністю генів, які кодуєть білки. Аналіз послідовностей ВАС *Amborella* і сиквенсованих геномів *A. thaliana*, *Populus trichocarpa*, *Vitis vinifera* і *Oryza sativa* показав, що темп структурних змін був швидшим у генеалогічних ліній, що вели до арабідопсиса та рису, порівняно з тополею та виноградом (деталі див.: Zuccolo et al., 2011).

Мобільні елементи (переважно LTR-вмісні ретротранспозони) внесли основний вклад у формування міжгенних ділянок, зокрема у збіль-

шення їхніх розмірів і дивергенцію ортологічних локусів хромосом (див. огляд: Сергеева, Салина, 2011). Наприклад, охарактеризовано ортологічні ділянки рису та пшениці, які містять чотири гени, порядок і послідовність яких є консервативними. При цьому ген-вмісна ділянка рису складає 9556 п.н., а відповідна їй ділянка пшениці — 29 612 п.н. Збільшення довжини даної ділянки геному у пшениці виникло за рахунок міжгенного простору, де відбулося вбудовування МГЕ (Salina et al., 2009).

Характерною рисою рослин є формування множинних інсерцій за рахунок переважної інтеграції в певні послідовності або в одні й ті самі ділянки геному. Відомі випадки колонізації деяких ділянок хромосом ретротранспозонами. Зокрема, ретротранспозони родин *gypsy*, *crwydryn* та *cereba-1* є одними з основних компонентів центромер Poaceae, а деякі *copia*- і *LINE*-ретротранспозони кластеризуються у термінальному гетерохроматині хромосом ячменю та егілопса (Belyayev et al., 2001; Hudakova et al., 2001).

Описана колонізація різних ділянок хромосом також ДНК-транспозонами. Зокрема, *SACTA*-транспозон *Caspar* локалізується у субтеломерних хромосомних ділянках видів Triticeae (Wicker et al., 2009; Sergeeva et al., 2010). При цьому збільшення вмісту елементів *Caspar* корелює зі швидкістю рекомбінації. Можливо, що механізм, який лежить в основі збільшення числа копій ДНК-транспозонів *Caspar* у субтеломерних ділянках, полягає в активному використанні процесу рекомбінації для транспозиції МГЕ. Наприклад, ділянки з високими показниками рекомбінації доступніші для інсерцій ДНК-транспозонів: для ініціації мейотичної рекомбінації необхідно формування дволанцюгових розривів, які ДНК-транспозони можуть використовувати для інсерцій. Іншим можливим механізмом є генна конверсія, яка активно використовується ДНК-транспозонами для ампліфікації.

Слід звернути особливу увагу на дані шведського генетика Гуннара Ізінга, отримані за вивчення діючих у природі процесів реорганізації геному. Він дослідив переміщення по геному у різних ліній дрозофіли великого транспозона, який містив у своєму складі ген *white* і розташо-

ваний поблизу ген «грубі очі». Цей величезний транспозон виник спонтанно. Завдяки великому розміру він виявлявся у ділянках свого вбудовування на політенних хромосомах слинних залоз у вигляді надлишкових дисків. Дослідники цього МГЕ ідентифікували понад 200 транспозицій. Переміщуючись по геному, цей супертранспозон

захоплював фрагменти сусідніх локусів. Г. Ізінгу вдалося виявити надзвичайно важливе явище: транспозон убудувався у ділянку центромери, захопив сегмент центромерної ДНК і перетворився у мініхромосому (Block, Ising, 1990; цит. за: Голубовський, 2011). Таким шляхом можуть виникати нові хромосоми і нові генні конструкції.

14.1. Особливості розподілу МГЕ на хромосомах

Нерівномірний розподіл мобільних елементів на хромосомах рослин трапляється доволі часто, при цьому спектри розподілу ДНК-транспозонів і ретротранспозонів різняться.

Ретротранспозони мають дисперсну локалізацію вздовж плечей хромосом з найбільшою концентрацією в ділянках із низькою частотою рекомбінації (ділянки прицентромерного гетерохроматину, а також теломери) (Heslop-Harrison et al., 1997; Copenhaver et al., 1999; Wright et al., 2003; Jin et al., 2005; Neumann et al., 2011).

Детальне вивчення у хромосомах різних генетичних елементів, позиційних мутацій, флюктуацій і кореляцій між генами, інделами, поліморфізмом одиничних нуклеотидів (single nucleotide polymorphisms — SNPs), ретротранспозонами, тандемними повторами розміром 180 п. н. і консервативними центромерними послідовностями (conserved centromeric sequences — CCSs) показало певну закономірність у просторовому розподілі всіх цих елементів. У межах хромосом профілі щільностей усіх елементів мали низьку частоту флюктуацій, що свідчить про наявність регіонального кластерингу. З іншого боку, індивідуальні профілі щільностей у широких межах корелювали один з одним. Таку особливість автори пояснюють впливом великих хромосомних структур, таких як центромери. У менших межах кореляції послаблювалися, що свідчить, на думку дослідників, про те, що *cis*-взаємодії мало або й зовсім не впливають на розміщення різних вивчених елементів. Це свідчить проти загального уявлення про те, що на сайти інсерції ретротранспозонів сильно впливають *cis*-взаємодії. Вирішальний вплив на внутрішньохромосомний розподіл елементів геному виявляють великі хромосомні структури, і саме вони зумовлюють загальну ієрархію організації геному арабідопсиса (Kendal, Suomela, 2005).

Відомо, що центромерні і прицентромерні ділянки хромосом рослин колонізовані ретротранспозонами *Ty3/gypsy*, де вони формують клади хромовірусів CRM. Нещодавно проведено комплексне дослідження цих клад з акцентом на особливості їхнього розмаїття (гетерогенності), структури, розподілу по хромосомах і транскрипційної активності. Вивчили 190 елементів CRM, що належать до 81 родини ретротранспозонів, отриманих від представників 33 видів хазяїв, що належать до 12 різних родин рослин. Послідовності на С-кінцях їхніх інтеграз виявилися неочікувано гетерогенними — вважається, що саме кінці відповідають за «орієнтацію» (targeting) на центромери. На основі цих відмінностей вивчені клади CRM було поділено на 3 групи (A, B, C), члени кожної групи відрізняються за місцем розташування на хромосомі. Відмінності розподілу по хромосомах збігалися з відмінностями послідовностей С-кінця інтегрази, де міститься цільовий тандем PTD (putative targeting domain). Більшість елементів групи А мають мотив CR і зосереджені у центромерній ділянці, члени групи С мають тип II хромодому і розсіяні по всьому геному. Представники групи В не мають PTD будь-якого типу, і вони виявляються переважно у центромерах. Усі протестовані елементи виявилися транскрипційно активними (Neumann et al., 2011).

Наведені дані свідчать про те, що дійсно «центромерними» ретротранспозонами є лише невелика частина кладу CRM (група А). Ці центромерні ретротранспозони представляють собою активний компонент центромери у покритонасінних, відіграють важливу роль в еволюції рослинних центромер. Окрім того, транскрипційна активність центромерних ретротранспозонів має важливе значення для нормального функціонування центромер (подробіці див.: Neumann et al., 2011).

ДНК-транспозони також нерівномірно розподілені вздовж плечей хромосом. Так, на прикладі хромосом *Arabidopsis thaliana* виявлено негативну кореляцію між щільністю генів і наявністю МГЕ, тобто розподіл МГЕ більшою мірою зумовлений добором проти порушення експресії генів (Wright et al., 2003). У рисі короткі ДНК-транспозони, такі як *ISS/Tourist* і *IS630/Tc1/mariner*, показали позитивну кореляцію і з ступенем рекомбінації, і з щільністю генів, можливо, завдяки ефекту добору проти ектопічної рекомбінації. У кукурудзи частота сайтів інсерції ДНК-транспозона *Mutator* корелює зі ступенем рекомбінації — фактором, який визначає щільність сайтів мейотичної рекомбінації і сайтів інсерції (Liu et al., 2009) тощо.

Таким чином, згідно з даними, наведеними, зокрема, в огляді (Сергеева, Салина, 2011), спектр розподілу МГЕ вздовж хромосом визначається дією низки генетичних чинників, а саме таких, як:

- дія негативного добору проти «шкідливих» інсерцій МГЕ;
- дія добору проти транспозиційної активності МГЕ;
- дія проти ектопічної рекомбінації.

Крім того, вплив чинять специфічні характеристики певних ділянок хромосом, як, наприклад:

- структура хроматину;
- наявність послідовностей певного типу;
- специфічні властивості самих МГЕ.

Міра дії цих чинників залежить від специфіки і характеристик виду, таких як:

- система розмноження;
- ефективний розмір популяції.

Крім того, фактори можуть корелювати один з одним і зі швидкістю мейотичної рекомбінації, у результаті розподіл МГЕ у кожному конкретному випадку визначається домінуючими тут чинниками (деталі і посилання див. в огляді: Сергеева, Салина, 2011).

14.2. Мобільні елементи і В-хромосоми

У дуже цікавій роботі з вивчення флюктуацій рухливості транспозонів у крайовій (маргінальній) популяції *Aegilops speltoides* було вивчено можливий зв'язок мінливості транспозицій з

Цікавим є огляд М. Євгенєва, в якому розглянуто закономірності розподілу основних класів МГЕ у геномах різних організмів (переважно тварин) і по окремих хромосомах, і по типах хроматину (Євгенєв, 2007). Наведено численні дані про різноманітну роль елементів у регуляції клітинних генів і в еволюції складних евкаріотних геномів. Підкреслюється, що специфічність і, відповідно, розподіл МГЕ по геному залежить від багатьох причин:

- по-перше, має значення специфічність ендонуклеаз (інтеграз і транспозаз), що відповідають за вбудовування МГЕ;
- по-друге, важливим є стан хроматину, куди відбувається вбудовування;
- по-третє, доля нових інсерцій залежить від функціональної значущості генних локусів, куди вони вбудувалися.

Відповідно, всі мобільні елементи поділяються на три категорії:

- до першої відносять елементи, які, подібно до рестриктаз, володіють високою специфічністю за транспозицій і трапляються лише в певних, суворо визначених хромосомних сайтах;
- до другої відносять елементи, які хоч і мають певну специфічність вбудовування, але ця специфічність виражена не так яскраво і елементи цього типу можуть бути знайдені у десятках і навіть сотнях місць геному;
- до третьої категорії відносять усі останні МГЕ, специфічність яких на нуклеотидному рівні прямо не показана і які здатні, очевидно, вкорінюватися практично в будь-яке місце геному, хоча, зазвичай, і з неоднаковою частотою.

Проте підкреслюється, що для транспозиції переважної більшості елементів вирішальне значення має не нуклеотидний склад сайтів-мішеней, а стан хроматину (деталі, приклади і посилання див.: Євгенєв, 2007).

мінливістю кількості В-хромосом (Belyayev et al., 2010). Досліджена популяція характеризувалася високою гетероморфністю і мала широкий спектр хромосомних аномалій, включаючи

надкомплектні В-хромосоми, гетерозиготність за транслокаціями і мінливість розташування на хромосомах кількості сайтів 45S і 5S рибосомних ДНК (рДНК). Вивчали мінливість на морфологічному і хромосомному рівнях, можливий зв'язок із мінливістю на молекулярному рівні і, особливо, з проліферацією МГЕ.

З дикої популяції *Ae. speltoides* взяли для дослідження три морфологічно різних генотипи (G9, G13, G14) з хромосомними абераціями, динаміку мінливості МГЕ було простежено впродовж трьох циклів самозапилення, в поколіннях S1, S2 та S3 відповідно. Геномні формули досліджених рослин були такими: G9 ($2n=14+3B$), G9S1, G9S2 ($2n=14+5B$), G13, S1–S3 ($2n=14$), G14 ($2n=14+2B$), G14S1 ($2n=14+3B$), G14S2 ($2n=14+4B$), G14S3 ($2n=14+3B$).

Вивчені рослини, одержані внаслідок самозапилення, мали низку цитогенетичних змін, а виявлені зміни кількості рухомих елементів були пов'язані з втратою чи набуттям хромосомних сегментів, що відрізняються за своїм набором транспозонів (див. рис. 12.1). Проте, розглядаючи додаткові В-хромосоми, автори не змогли відокремити їх вплив на динаміку рухомих елементів від такого інших хромосомних аномалій. Отримані авторами дані не показують чіткої і однозначної кореляції між збільшенням числа В-хромосом і одночасним зростанням кількості копій рухомих елементів. Точний вміст транспозонів у В-хромосомах досліджених рослин не встановлено. В аналізованій роботі було досліджено лише 9 МГЕ із більше ніж 100, що були виявлені для *Ae. speltoides* у базах даних GenBank та Triticeae Repeat (TREP). Тим не менше, певну кореляцію було виявлено. Так, у генотипу G9 збільшення кількості В-хромосом з трьох до п'яти корелювало зі значним зростанням числа копій мобільних елементів *WIS2*, *Daniela*, *Fatima En/Spm* у S2-поколінні (див. рис. 12.1). У наступному поколінні повторювані ДНК В-хромосом слугують додатковими мішенями для незаконної рекомбінації, яка вважається головною рушійною силою зменшення розміру геному. Тому одна подія (збільшення кількості В-хромосом) індукує іншу (незаконну рекомбінацію), а це корелює зі зменшенням числа копій кількох елементів. Для генотипу G14 ці тенденції видно не настільки чітко, може, тому,

що число В-хромосом у ньому змінювалося не так значно.

Мобільні генетичні елементи, очевидно, відіграють певну роль і в утворенні В-хромосом рослин (див.: Кунах, 2005, 2010). Наприклад, було встановлено, що більша частина В-хромосом кукурудзи складається з повторюваних елементів, звичайних для А-хромосом. Точний механізм перенесення цих послідовностей у В-хромосому ще не вивчено, проте є результати, які свідчать, що тут важливу роль відігравала транспозиція. Зокрема, при сиквенуванні знайдено чіткі відбитки у деяких клонованих послідовностях, що вказують на вставку двох послідовностей А-хромосом шляхом транспозиції РНК ретротранспозона (RIRE2) і ДНК МІТЕ-елемента (*mPIF*) (Cheng, Lin, 2004). Описано також низку послідовностей, специфічних саме для В-хромосоми. Зокрема, у В-хромосомі виявлено порівняно багато копій такого елемента, як *Stark-B*, який має ретротранспозонне походження (Lamb et al., 2007).

Для В-хромосом жита також встановлено їх А-хромосомне походження. Порівняно недавнє ретельне дослідження транскрипції В-хромосом виявило наявність кількох В-специфічних транскрибованих послідовностей (зокрема В1334, В8149 та В2465), які належать до висококопійних родин, подібних до мобільних генетичних елементів (Carchilan et al., 2009). Транспозиційно активна послідовність В1334 була подібною до транспозазної ділянки транспозоно-активного гена «*Revolver*» (див.: Tomita et al., 2008). При цьому встановлено подібну організацію В1334-подібних елементів і на А-, і на В-хромосомах. Накопичення «*Revolver*»-подібних елементів відбувалося на В-хромосомах (Carchilan et al., 2009).

Про накопичення В-специфічних мобільних елементів повідомлялося раніше і для інших евкаріотів (Ziegler et al., 2003). Вважається, що накопичення мобільних елементів у В-хромосомах може мати велике функціональне й еволюційне значення. Оскільки В-хромосоми кодують невелику кількість генів, накопичення В-хромосом, вочевидь, не погіршує життя рослин. Є дані, які свідчать про те, що наявність В-хромосом може підвищувати адаптивну здатність рослин (Кунах, 2010, 2011). Окрім того, швидке накопи-

чення повторів і транспозонів на новоутвореній В-хромосомі може зменшити її рекомбінаційну здатність з хромосомами А-набору, а тому приводить до дивергентної еволюції В-хромосом (Camacho et al., 2000).

Таким чином, мобільні генетичні елементи (транспозони) переміщуються переважно по генетично «не активних» гетерохроматинових ділянках хромосом. Транспозиція — переміщення ДНК, є одним із поширених видів перебудов геному і, цілком вірогідно, одним із механізмів формування нових хромосом, у тому

числі таких важливих компонентів хромосом, як теломери (див., наприклад, огляд: Грач, 2011). Завдяки варіабельності гетерохроматинових ділянок В-хромосом і рухливим мобільним елементам створюється різноманітність геному, яка зумовлює прискорення його еволюційних перетворень. Вважається, що гетерохроматинові ділянки і В-хромосоми здатні здійснювати глобальний контроль над адаптацією видів до умов середовища і визначати еволюцію нових видів (Кунах, 2005, 2010, 2011, 2011а; Борисов, 2011, 2012).

14.3. Утворення кільцевих мікрохромосом у дріжджів як адаптивний механізм ампліфікації генів

Порівняно нещодавно відкрито цікаве і важливе біологічне явище — відновлення втраченої у результаті мутацій (делецій) функції шляхом ампліфікації генів за допомогою механізмів транспозиції. Цей механізм підтримки геномної цілісності клітини продемонстровано на прикладі дріжджів *Sacharomyces cerevisiae*. У них для генів, що кодують гістони, виявлено ампліфікацію цих генів у відповідь на зменшення кількості копій генів під впливом делецій. Показано, що це — адаптивна відповідь дріжджів, спрямована на відновлення рівня експресії гістонових генів. Розглянемо детальніше особливості такої відповіді.

Усі опосередковані хроматином процеси, перш за все транскрипція і хромосомні сегрегації, визначальною мірою залежать від наявності у клітині відповідної кількості гістонів. У дріж-

джів *S. cerevisiae* гістони H2A і H2B кодуються двома парами генів, які названо *HTA1–HTB1* і *HTA2–HTB2*. Відомо, що у мутантних форм з делецією генів *HTA2–HTB2* наявні дози генів *HTA1–HTB1* компенсують транскрипційні зміни. Було описано й інший механізм дозової компенсації на рівні числа копій гена, який відбувається за делеції генів *HTA1–HTB1*. У цьому випадку гени *HTA2–HTB2* ампліфікуються шляхом утворення і подальшого розмноження нових, малих кільцевих хромосом. Така дуплікація розміром 39 т.п.н. хромосоми II містить у собі гени *HTA2–HTB2*; локус *HNF1–HHT1*, що кодує гістони H3–H4; центромеру й ориджин реплікації. Формування нової хромосоми відбувається внаслідок рекомбінації між двома *Ty1*-ретротранспозонами, що розташовані обабіч цього локусу (рис. 14.1). Виникнення таких

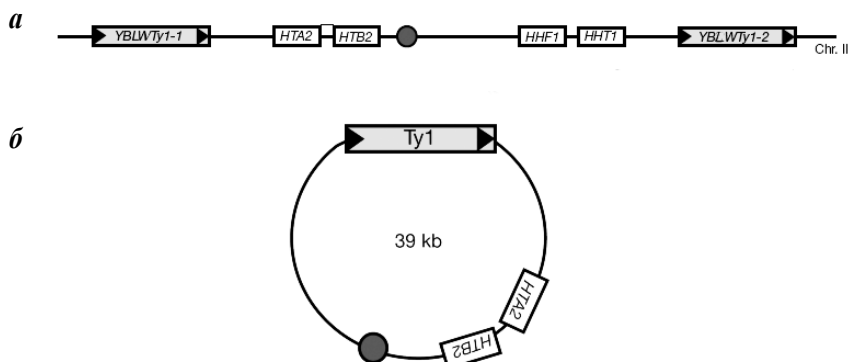


Рис. 14.1. Спрощені генетичні карти ділянки гістонових генів *HTA2–HTB2* на хромосомі II *Sacharomyces cerevisiae* (а) та кільцевої хромосоми, утвореної внаслідок рекомбінації між двома *Ty1*-елементами (*YBLWTy1-1* і *YBLWTy1-2*) (б). Білими прямокутниками позначено локуси гістонів *HTA2–HTB2* і *HNF1–HHT1*, сірими прямокутниками — *Ty1*-елементи (*YBLWTy1-1* і *YBLWTy1-2*), чорними трикутниками — довгі термінальні повтори (LTRs), сірим кружечком — центромеру (в основі схем — дані, наведені у статті: Libuda, Winston, 2006)

хромосом приводить до підвищення рівня синтезу гістонів у мутантних форм дріжджів до рівня диких форм. Автори припускають, що зниження рівня гістонів H2A і H2B цілеспрямовано індукує виявлену ампліфікацію гістонових генів (Libuda, Winston, 2006).

Автори особливо підкреслюють, що вони вперше виявили приклад біологічної ролі Ту-елементів, яка відзначається особливостями локалізації транспозонів у батьківському геномі. Відкритий механізм ампліфікації генів дозволяє

тимчасово модулювати кількість гістонів у клітинах також дикого типу у відповідь на підвищену потребу у гістонах. Ампліфікація може відбуватися, коли потрібно більше гістонів, а коли потреба зникає — кільцеві хромосоми швидко втрачаються. Дослідники вважають, що подібні «транспозон-опосередковані» механізми адаптивної ампліфікації генів, очевидно, мають місце і в інших еукаріотів, включаючи геном людини (подробиці і посилення див.: Libuda, Winston, 2006).

Розділ 15. ГОРИЗОНТАЛЬНЕ ПЕРЕНЕСЕННЯ ГЕНІВ І МГЕ

15.1. Явище горизонтального перенесення

Горизонтальне перенесення — це процес, завдяки якому може здійснюватися переміщення геномів у репродуктивно ізольованих видів. Більшість прикладів горизонтального перенесення генів еукаріотів так чи інакше пов'язана з мобільними генетичними елементами. Найчастіше горизонтальне перенесення залучають як пояснення існування дуже близьких послідовностей в еволюційно далеких видів. Здатність мобільних елементів переміщатися і змінювати свою локалізацію у геномі робить їх одними з основних об'єктів для вивчення явища горизонтального перенесення (Сормачева, Блинов, 2011).

Серед ретротранспозонів описано декілька прикладів горизонтального перенесення між близькоспорідними видами. Один із найкраще описаних випадків горизонтального перенесення LTR-вмісних ретротранспозонів — перенесення мобільних елементів родини *RIRE1* між видами роду *Oryza* протягом короткого періоду часу (Roulin et al., 2008). У дослідженнях було виявлено як мінімум 7 випадків горизонтального перенесення елементів даної родини на основі високої подібності послідовностей із репродуктивно ізольованих диких видів рису. Механізм горизонтального перенесення *RIRE1* (*Ty3/gypsy*)-елементів невідомий, а найцікавішою є гіпотеза перенесення ретротранспозонів через спільних патогенів (Roulin et al., 2008).

Rider (*Ty1/copia*) — транскрипційно активний елемент, очевидно, був перенесений горизонтально у геном томата з геномів представників роду *Arabidopsis*. Мобільний елемент *Rider* не було виявлено у геномах інших представників *Lycopersicon*, таких як картопля, тютюн і кава, що інтерпретується як результат втрати елемента *Rider* у цих видів у рамках вертикального успадкування. Даний елемент із геному томата показав високу подібність з елементами *Rider-like1* і *Rider-like2* арабідопсиса (Cheng et al., 2009).

Горизонтальне перенесення генів (ГПГ) між філогенетично віддаленими таксонами є одним із ключових рушійних факторів еволюції у прокаріотів. Саме завдяки дослідженням у галузі

геноміки стало очевидно, що ГПГ відіграло важливу роль в еволюції прокаріотів (Keeling, Palmer, 2008). Перенесення генів від прокаріотів до еукаріотів може відбуватися за прямих фізичних контактів між організмами, у системах ендосимбіозу, паразитизму, фаготрофії, за поглинання ДНК із середовища, через різні канали генетичної комунікації, у тому числі за участі плазмід, вірусів, транспозонів, ретровірусоподібних елементів тощо.

Горизонтальне перенесення може зумовлюватися переміщенням прашурних бактеріальних генів із субгеномів органел у ядро (Timmis et al., 2004; Keeling, Palmer, 2008). Подібні ГПГ належать до ранніх етапів еволюції, але їх результати можуть зберігатися за передачі по вертикалі у геномах сучасних видів. До другої категорії ГПГ належить безпосереднє набуття генів від філогенетично віддалених організмів. Ці дані проаналізовано в огляді (Шестаков, 2009).

Серед вищих еукаріотів особливо цікавими виявилися факти активного ГПГ у рослин (Diao et al., 2006; Richardson, Palmer, 2007; Keeling, Palmer, 2008). Висока частота ГПГ стосується, в основному, мітохондріальних генів, подій горизонтального перенесення ядерних генів встановлено ще небагато.

Слід відзначити, що першим, достовірним, підтвердженням і добре задокументованим прикладом горизонтального перенесення кодованих саме ядром генів між вищими рослинами є дослідження транспозонів MULE-типу. Проведене авторами сиквенування цих транспозонів від низки видів мишію (*Setaria*) і аналіз отриманих даних показали їх надзвичайно високу подібність до малої родини MULEs рису. Порівняння некодувальних і синонімічних послідовностей виявило, що ця подібність не є результатом селекції на рівні амінокислот. Аналізуючи час дивергенції цих родів рослин, автори виключають можливість простої вертикальної передачі транспозонів вивченого класу MULE (Diao et al., 2006).

Перенесення мітохондріальних генів між рослинами виявили за вивчення гена *nad1*, що кодує субодиницю НАДН-дегідрогенази. Сегмент цього гена, який містить інтрон 1 і частину

екзонів, перенесено з покритонасінної рослини в мітохондріальний субгеном однієї з ліній азійської ліани (Gnetum). У мітохондріях споріднених ліній цієї голонасінної рослини даний сегмент відсутній (Won, Renner, 2003). В іншій роботі (Bergthorsson et al., 2003) показано горизонтальне перенесення генів двох рибосомальних білків *rsp2* і *rsp11*. Алелі цих генів, знайдені у мітохондріальній ДНК ківі (Actinidia) і деревника (жимолості, *Lonicera*), отримані від філогенетично далеких видів квіткових рослин. У представника макових *Sanguinaria canadensis* функціонування химерного мітохондріального гена *rsp11* (половина від однодольної, інша частина — від дводольної рослини) свідчило про повноцінність ГПГ. За філогенетичного аналізу геномів виходило, що виявлені події ГПГ, можливо, сталися в еволюції порівняно недавно (від 80 до 100 млн років тому). На відміну від мітохондріальних генів, перенесень між рослинами пластидних генів не виявлено (Richardson, Palmer, 2007).

Множинне перенесення генів мітохондрій виявлено в однієї з найдревніших рослин *Amborella trichopoda* (Bergthorsson et al., 2004), у мітохондріальній ДНК якої поряд із 31 резидентним геном міститься 20 чужинних генів, кожен з яких має інтактний гомолог у мітохондріальному субгеномі амборели. Чужинні гени отримані від різних донорів: 7 від лишайників і 19 (включаючи гени *nad5* і *atp1*) від різних груп дводольних. Транскрипт набутого гена *atp1* редагується, що свідчить про його функціонування, тоді як половина перенесених горизонтальним шляхом мітохондріальних генів є псевдогенами. Екологічна особливість цього об'єкта полягає

в тому, що ендемічний вид *A. trichopoda* росте в унікальних умовах вологого тропічного лісу в тісному товаристві з різними епіфітами, що прикривають листя та стебла рослини. Припускається, що перенесення мітохондрій (або їхніх ДНК) зумовлене прямими фізичними контактами в місцях пошкоджень або в результаті проникнення клітинних ексудатів.

Набуття мітохондріальних генів може проходити різними шляхами: за злиття і рекомбінації мітохондрій донора і реципієнта (що спостерігається за соматичної гібридизації з протопластами), через «незаконне» запилення, за участі різного роду векторних систем — бактеріального, грибного або вірусного типу, через активне поглинання ДНК, яка потрапляє в організм, зокрема з ґрунту тощо. Одним із найефективніших способів ГПГ є паразитизм, а квіткові рослини можуть слугувати як донорами, так і реципієнтами. Показано перенесення мітохондріального гена з паразитичних рослин (можливо, *Cuscuta*) у неспоріднену групу бур'яну *Plantago* (Mower et al., 2004), у субгеномі якого знайдено чужинний псевдоген за наявності інтактного гомолога в реципієнті. Паразитична рослина рафлезія отримала мітохондріальні гени від свого хазяїна-ліани (Davis, Wurdack, 2004). До числа таких генів належить ген *atp1*, який, як і в *Amborella*, функціонує, і його транскрипт підлягає правильному редагуванню (Barkman et al., 2007). Оскільки відомо понад 4 тис. видів паразитичних рослин, то можна припустити, що системи ГПГ «паразит — хазяїн» широко розповсюджені у природі і, вочевидь, впливають на еволюцію (коеволуцію) партнерів.

15.2. Можливі механізми горизонтального перенесення МГЕ

Відомо кілька гіпотез, які пояснюють горизонтальне перенесення мобільних елементів. Найвідомішими серед них є такі (за: Сормачева, Блинов, 2011):

- найпростіше можна пояснити горизонтальне перенесення елементів групи LTR-вмісних ретротранспозонів, оскільки деякі з них (*Ty1/copia*- і *Ty3/gypsy*-елементи) здатні формувати вірусоподібні часточки. Деякі *Ty3/gypsy*-елементи можуть переноситись як

міжклітинні вірусоподібні часточки без допомоги додаткового вектора і володіють певною інфекційністю за рахунок експресії гена *env*;

- друга гіпотеза полягає у прямій передачі ДНК між двома рослинами, які перебувають у близькому контакті. Деякі випадки участі паразитичних рослин у горизонтальному перенесенні ДНК підтверджують, що горизонтальне перенесення від рослини до рослини прямо можливе: горизонтальне перенесен-

ня мітохондріального гена *atp1* між паразитичними рослинами груп *Orobanchaceae* і *Convolvulaceae* і рослинами роду *Plantago* (Mower et al., 2004); горизонтальне перенесення ядерних генів між паразитичним видом рослин *Striga hermonthica* та видами родини *Poaceae* (Yoshida et al., 2010). Ця гіпотеза пояснює велику кількість розглянутих вище фактів горизонтального перенесення мітохондріальних генів між наземними рослинами і *Amborella trichopoda* (Bergthorson et al., 2004). Таким чином можна пояснити горизонтальне перенесення будь-яких послідовностей ДНК, у тому числі і мобільних елементів;

- згідно з третьою гіпотезою міжвидові гібриди можуть слугувати посередником у передачі генетичної інформації між видами (Silva, Kidwell, 2000; de Almeida, Carareto, 2005).

Однак ці гіпотези не можуть пояснити відомі випадки горизонтального перенесення LTR-вісних ретотранспозонів родини *RIRE1* між видами роду *Oryza* (Roulin et al., 2008). Висока частота горизонтальних перенесень (у горизонтальне перенесення залучено 7 видів) супере-

чить гіпотезі про передачу прямо від рослини до рослини, тому що такі види мають різний ареал зростання. Також неможливо пояснити це явище як результат семи незалежних міжвидових гібридизацій.

Ще одна, вже четверта, гіпотеза припускає участь вектора у горизонтальному перенесенні між видами. У тварин можливими векторами, які залучені в горизонтальне перенесення, можуть бути бактерії, гриби або будь-які внутрішньоклітинні паразити (Kondo et al., 2002; Shen et al., 2003). Зокрема, векторами горизонтального перенесення у тварин можуть виступати віруси. Так, було показано, що *SINE*-елемент може переноситись із геному рептилії у геном ссавців (Piskurek, Okada, 2007). У випадку горизонтального перенесення мобільних елементів рослин на сьогодні не виявлено векторів, але припускається, що горизонтальне перенесення може проходити аналогічно. Більш того, деякі паразитичні комахи можуть бути потенційними векторами, але ця гіпотеза потребує експериментальних підтверджень (Fortune et al., 2008).

15.3. Критерії горизонтального перенесення МГЕ

Більшість прикладів горизонтального перенесення евкаріотних генів пов'язано з МГЕ (Hartl et al., 1997; Diao et al., 2006; Шестаков, 2009; Карпова, Малюта, 2011). Для розпізнавання процесу ГПГ можливо застосовувати три критерії.

Перший критерій — це невідповідність між філогеніями МГЕ і видів-хазяїв. Традиційно про горизонтальне перенесення йшла мова, коли дуже подібні рухомі елементи виявляли у неспоріднених таксонах і це явище не можна було пояснити вертикальним успадкуванням (Hartl et al., 1997). Проте існують потенційні проблеми із застосуванням цього критерію для виявлення ГПГ. Зокрема, у геномах можуть бути присутні численні генеалогічні лінії МГЕ, до того ж МГЕ є мультикопійними компонентами геномів. Порівняння паралогічних копій МГЕ замість ортологів, а також різні темпи еволюції їхніх послідовностей є основним джерелом невідповідності за філогенетичного аналізу, що може бути хибно ідентифікована як ГПГ.

Другий критерій, який є найсильнішим доказом, — це вищий ступінь подібності послідовностей, що спостерігається у МГЕ порівняно з функціональними генами, так званий «уповільнюючий вплив на темпи еволюції» (slow down effect on evolutionary rates). Будучи вставленою, нова копія транспозабельного елемента еволюціонує без функціональних обмежень. Так, бути зафіксованими мають однакові шанси всі типи мутацій. Це означає, що темпи синонімічних і несинонімічних нуклеотидних замін є ідентичними, а кодувальні ділянки розриваються стоп-кодонами та інделами. Нижча, ніж очікувана, сиквенс-дивергенція МГЕ порівняно з немобільними ядерними генами виду-хазяїна може пояснюватися сильними селективними обмеженнями змін послідовностей МГЕ та жорсткою вертикальною трансмісією або горизонтальним перенесенням (Novikova et al., 2008). Відомо, що вставка рухомого елемента може змінити генну експресію і може бути селективно вигідною.

Однак лише деякі з таких мобільних генетичних елементів еволюціонують за селективного тиску (Ono et al., 2001).

Третій критерій розпізнавання МГЕ — це переривчастий розподіл мобільних елементів серед споріднених таксонів, тобто присутність транспозонів в одній генеалогічній лінії і їх відсутність у сестринській генеалогічній лінії. Такий

переривчастий розподіл може бути пов'язаний із випадковою втратою МГЕ, спадковим поліморфізмом і незалежним сортином копій у видинащадки. Сам по собі цей вид доказів дає слабе підтвердження ГПГ, оскільки транспозон може бути втрачений через популяційну динаміку чи екологічні впливи, які важко відтворити (Lohe et al., 1995).

15.4. Горизонтальне перенесення LTR-невмісних ретротранспозонів

Горизонтальне перенесення широко відоме для ДНК-транспозонів і LTR-вмісних ретротранспозонів, а LTR-невмісні ретротранспозони, як свідчать накопичені експериментальні дані, зрідка зазнають горизонтального перенесення, і їх філогенія здебільшого збігається з такою їхніх хазяїв (Malik et al., 1999; Silva, Kidwell, 2004). Аналіз темпів сиквенс-змін МГЕ спонукав деяких авторів заперечувати більшість раніше описаних випадків ГПГ. Висловлено припущення, що LTR-невмісні ретротранспозони рідко переносяться горизонтально, можливо, що

і зовсім не переносяться горизонтально і способу їх транспозиції може бути достатньо для пояснення цього факту, оскільки РНК-посередник LTR-невмісних ретротранспозонів безпосередньо зворотно транскрибується у хромосомний цільовий сайт (Malik et al., 1999). Тим не менше, відомо кілька випадків імовірного ГПГ для LTR-невмісних ретротранспозонів, описаних на прикладі деяких комах, ссавців, риб і грибів (див. огляд: Novikova et al., 2009, tabl. 1).

Значно розширити можливості спостереження за розповсюдженням і еволюційною іс-

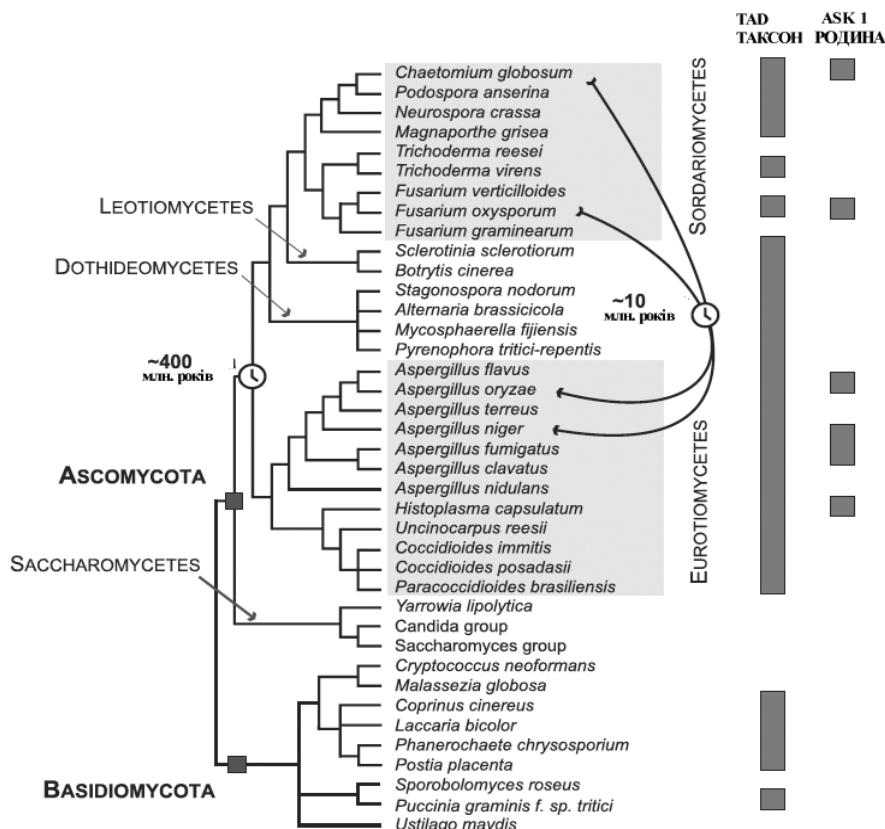


Рис. 15.1. Горизонтальне перенесення TAD-елементів від Sordariomycetes (*Chaetomium globosum* і *Fusarium oxysporum*) до Eurotiomycetes (*Aspergillus oryzae* та *A. niger*), можливо, мало місце 10 млн років тому (за: Novikova et al., 2009)

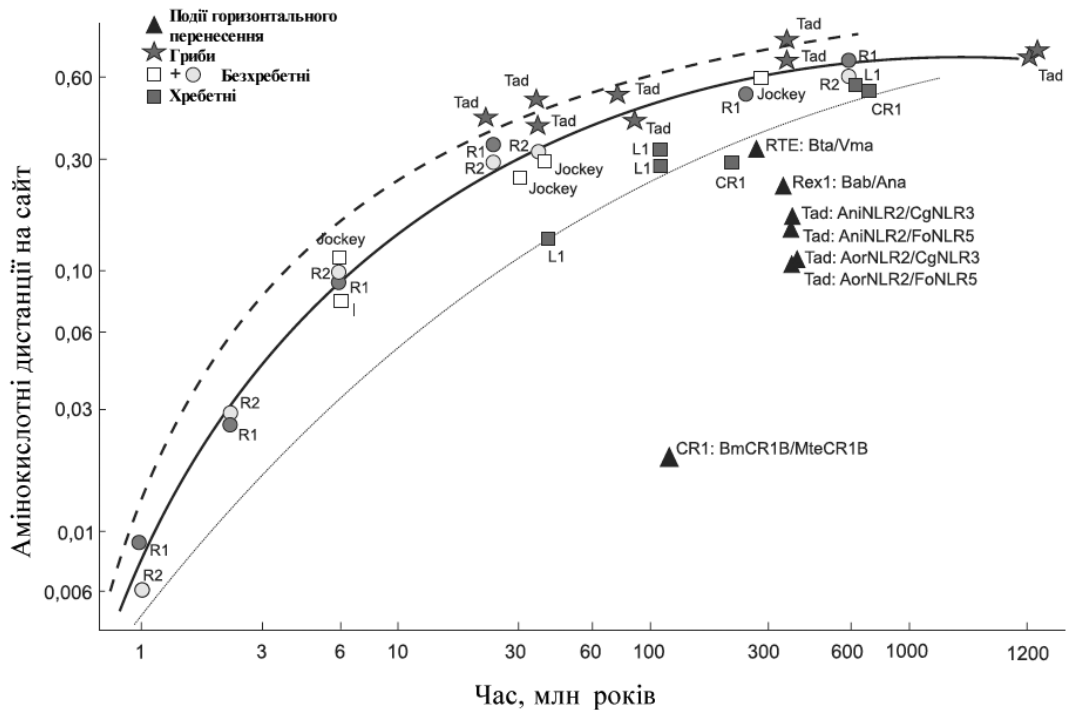


Рис. 15.2. Дивергенція LTR-невмісних ретротранспозонів у процесі еволюції. Підраховано відстані за амінокислотними послідовностями на основі послідовностей домену повномірної зворотної транскриптази (RT) (за: Novikova et al., 2009)

торією LTR-невмісних ретротранспозонів у різних евкаріотних таксонах та ідентифікації нових випадків ГПГ можуть біоінформаційні підходи. Найзручнішою групою евкаріотів для таких досліджень виявилися гриби. У різних геномних базах даних розміщено більше ніж 100 геномів грибів, і їх кількість постійно зростає. Гриби мають малі геноми, зазвичай з обмеженою кількістю повторюваної ДНК (включаючи LTR-невмісні ретротранспозони), що робить геномний аналіз порівняно швидким і легким.

Дійсно, геномний аналіз великого набору геномів грибів виявив можливий випадок ГПГ Tad-подібних LTR-невмісних ретроелементів між Eurotiomycetes та Sordariomycetes, який мав місце менше ніж 10 млн років тому (рис. 15.1). Елементи з Eurotiomycetes *Aspergillus niger* та *A. oryzae* (*AniNLR2* і *AorNLR2*) мали більшу подібність з елементами із Sordariomycetes *Chaetomium globosum* та *Fusarium oxysporum* (*CgNLR3* і *FoNLR5*), ніж з іншими LTR-невмісними ретротранспозонами з *Aspergillus*; цього не можна пояснити виключно вертикальною еволюцією. Аналіз дивергенції порівняно з віком, а також порівняльний аналіз еволюційних темпів для функціональних генів і

описаних елементів підтвердили наявність уповільнюючого впливу на еволюційні темпи, який завжди супроводжує можливі ГПГ (рис. 15.2) (Novikova et al., 2008).

Таким чином, як свідчать накопичені результати досліджень, значну частину яких наведено і проаналізовано в огляді (Novikova et al., 2009), горизонтальне перенесення генів (ГПГ) LTR-невмісних ретротранспозонів, очевидно, є не просто артефактом аналізу, як припускали раніше. LTR-невмісні ретротранспозони фактично можуть переноситися горизонтально, хоча це рідкісний процес порівняно з іншими типами транспозабельних елементів. Для евкаріотних МГЕ справжні механізми горизонтального перенесення ще не відомі, оскільки неможливо показати експериментально, яким чином ГПГ відбувається. Потенційними векторами горизонтального перенесення, як уже згадано вище, можуть бути паразити, симбіонти, бактерії, віруси чи й самі «чужинні» нуклеїнові кислоти (Keeling, Palmer, 2008; Карпова, Малюта, 2011). Існує думка, що завдяки мобільним елементам генофонди всіх організмів об'єднані в загальний генофонд живої природи (посилання див. в огляді: Карпова, Малюта, 2011).

Розділ 16. ФУНКЦІОНАЛЬНЕ ЗНАЧЕННЯ МГЕ. ПІДСУМОК

Барбара МакКлінток відкрила мобільні генетичні елементи в 1940-х роках, вивчаючи кукурудзу. За цю роботу у 1983 р. вона отримала Нобелівську премію з медицини. Вона побачила, що характер кольору зерен кукурудзи змінювався за різних схрещувань й інтерпретувала результати своїх експериментів регуляцією генної активності такими собі «контролюючими елементами», що мають здатність переміщуватися з місця на місце на хромосомах. У міру того, як ці елементи рухаються, коли клітини діляться і проліферують, вони викликають мутації генів лише в деяких клітинах — зміни кольору пов'язані з їх впливом на гени пігментації. Основний висновок Б. МакКлінток полягав у такому: «контролюючі елементи» мають великий вплив на розвиток організмів. Відкриття у 1970-х роках того, що бактерії, дріжджі і плодові мушки мають ДНК-елементи, здатні рухатися (зніматися з місця і вставлятися деінде в геномі), спонукало до експериментів, результати яких ідентифікували рухливі елементи як головні складові геному (подробити див. у розділі 1).

Найхарактернішими для дії МГЕ є соматичні мутації, але ці елементи індукують мутації також у генах зародкової лінії, приводячи до спадкових генетичних змін. Інтерес до МГЕ зростав і далі в міру того, як ставав відомий склад різних геномів і з'ясувалося, що практично більша частина геномної ДНК складається із МГЕ. Але тоді їх роль у генній регуляції не була відома. Наразі МГЕ вважаються головним компонентом більшості геномів, а уявлення Б. МакКлінток про те, що вони можуть контролювати генну активність, повністю підтвердилися.

Наразі відомо, що наявність мобільних геномних елементів у геномах еукаріотів приводить до низки різноманітних генетичних наслідків. Найвідомішими серед них на сьогодні є:

- *переміщення і вбудовування мобільних елементів у гени може викликати мутації*. Величезна, а може й переважна, кількість «спонтанних» мутацій — це наслідок інсерцій МГЕ. Вбудовуючись у ген, мобільний елемент може пошкодити екзон, «розірвавши» його. У такому випадку ген буде позбавлений можливості

кодувати білок. Влучаючи у ділянку промоторів чи енхансерів, мобільний елемент може пошкодити регуляторну зону гена. Інсерція у ділянку інтрона може виявитися нешкідливою, оскільки вся послідовність інтрона разом з мобільним елементом буде вирізана під час процесингу мРНК, а сусідні екзони безперешкодно можуть сплайсуватися. Якщо ж транспозон вбудовується у ділянку інтронів, яка контролює процес сплайсингу, може відбутися мутація. Найтиповіший приклад — це розробка експериментальних схем, які дозволяють отримувати велику кількість мутацій у дрозофіли, індукованих мобільними *P*-елементами, причому інсерція присутня у мутантів у єдиному екземплярі (детальніше див.: Жимулев, 2003, розділ 6.7). Стосовно рослин дані подібних експериментів наведено в розділах 9–11;

- *зміна стану активності генів*. Довгі кінцеві повтори (ДКП або LTRs) є промоторами ретротранспозона, причому як LTR, так і сам ретротранспозон містять нуклеотидні послідовності, що є енхансерами транскрипції. Тому переміщення цих сигналів у геномі може змінювати регуляцію активності генів. Наприклад, якщо мобільний елемент виявився біля «мовчазного» гена, то результатом може бути його експресія. Стосовно ретротранспозонів особливі можливості для перенесення і зміни регуляторних сигналів виникають тоді, коли сам елемент видаляється за рахунок кросинговеру між LTR з ідентичними послідовностями (рис. 16.1, *а*), внаслідок чого зберігається лише один ДКП (solo-LTR) на місці вбудови ретротранспозона. Це явище особливо поширене в клітинах дріжджів. Установлено, що такі поодинокі LTR істотно впливають на регуляторні системи клітини дріжджів. Відомі й інші механізми епігенетичної регуляції ознак (Голубовский, 2001; Lisch, 2009);
- *формування хромосомних перебудов*. Внаслідок кросинговеру між однаково орієнтованими мобільними елементами виникає делеція і дуплікація матеріалу, розташованого між інсерціями (рис. 16.1, *б*). Якщо ж інсерції оріє-

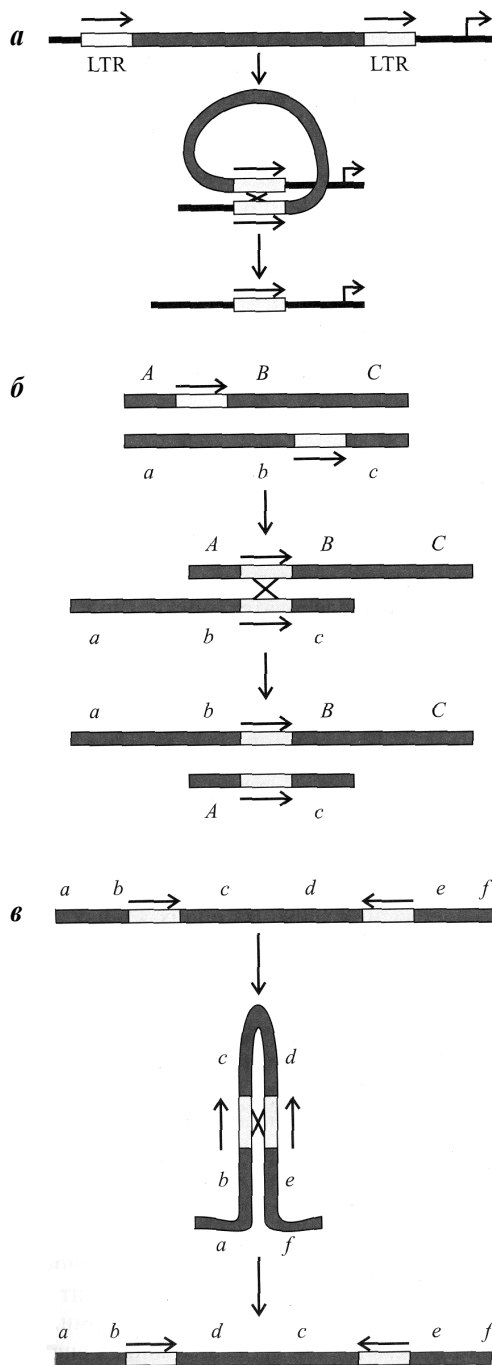


Рис. 16.1. Виникнення рухомого промотору шляхом кросинговеру між двома LTRs (а), делеції та дуплікації завдяки кросинговеру між орієнтованими в один бік мобільними елементами (б) або інверсії завдяки кросинговеру між протилежно орієнтованими елементами (в)
(за: Жимулев, 2003)

єнтовані в протилежних напрямках, виникає інверсія (рис. 16.1, в) (див. також: Belyaev et al., 2010);

- *формування структури хромосом, включаючи центромери, теломери*. Найвідоміший приклад стосовно теломер — це дрозофіла, у якої відсутня теломеразна «машина», але кінці ДНК подовжуються за рахунок переміщень ретротранспозонів (Голубовский, 2001; Lisch, 2009; Neumann et al., 2011) (див. також: Жимулев, 2003, розділ 9.6);
- *участь у горизонтальному перенесенні генів*. Інфекційні ретровіруси здатні заражати організми, що належать до різних видів, і переносити власний генетичний матеріал, утворюючи копії ДНК, що вбудовуються у геном. Саме таким шляхом могли поширюватися ретротранспозони. Цей спосіб передачі генів отримав назву горизонтального на відміну від вертикального успадкування із покоління у покоління. Наприклад, широке поширення транспозона *mariner* серед філогенетично віддалених груп комах може свідчити про повторні переходи даного елемента від виду до виду. Зокрема, один із ретротранспозонів дрозофіли, а саме *gypsy*, як виявилось, є справжнім ретровірусом: шляхом ін'єкції або згодовування вірусних часточок вдається заразити мух, які не несуть ці транспозони. Стосовно рослин такі приклади наведено в розділі 15;
- *регуляція статі і вплив на мейоз тощо*.

Ці й інші генетичні та епігенетичні ефекти зумовили широке застосування транспозонів для прикладних завдань — для трансформації у евкаріотів, клонування генів, пошуку енхансерів тощо. Прикладні аспекти застосування рухливих генетичних елементів розглянуто у наступній частині книги.

Частина III

ПРИКЛАДНІ АСПЕКТИ

Рухомі генетичні елементи (транспозони) можливо застосовувати у багатьох напрямках сучасних генетичних і біотехнологічних досліджень. Найтипівішими прикладами таких використань є інсерційний (транспозоновий) мутагенез, маніпуляції з геномом, трансгенез, функціональні дослідження геному, генна терапія тощо (подробиці див.: Rajunen et al., 2010). Останнім часом значного поширення набуло застосування мобільних елементів, особливо ретротранспозонів, для створення молекулярних маркерів, які широко застосовують для аналізу генетичного різноманіття і варіабельності геному у прикладній генетиці, філогенетиці, молекулярній екогенетиці тощо (Сиволап и др., 2011; Kalendar, 2011).

Мобільні елементи є зручним інструментом геноміки рослин, що застосовується для марку-

вання і наступного клонування генів рослин, вивчення їх структурної організації і подальшого перенесення методами генної інженерії (Овчаренко та ін., 2006; Ayliffe et al., 2007; Todorovska, 2007; Qu et al., 2008; Böhmendorfer et al., 2010). Це має важливе значення для вирішення низки як фундаментальних, так і прикладних завдань. Для вирішення згаданих прикладних завдань, а також для успішного використання рухомих елементів геному як молекулярних маркерів, перш за все у філогенетиці і молекулярній екології, виявлення активних транспозонів та/або способів активації прихованих (неактивних) транспозонів було і є актуальним завданням.

У цій частині представлено аналіз результатів досліджень із застосуванням рухомих елементів геному переважно для вирішення деяких проблем прикладного характеру.

Розділ 17. УМОВИ І ФАКТОРИ КЛОНУВАННЯ ГЕНІВ І КОНТРОЛЮ ТРАНСПОЗИЦІЇ

Необхідною умовою клонування генів за допомогою МГЕ є можливість контролю за процесом транспозиції. Як низька, так і занадто висока частота транспозиції є небажаною, оскільки в першому випадку потрібно буде докласти значних зусиль для отримання інсерційних мутантів, а в другому — велика кількість копій та їх постійне переміщення значно ускладнять можливість молекулярного аналізу та інтерпретації отриманих результатів.

Існує зворотна залежність між рівнем метилювання цитозину геномної ДНК і активністю мобільних елементів. Активність транспозонів зростає на ранніх стадіях онтогенезу рослин, коли відбувається стирання і перенастроювання структури метилювання геному (Mckenzie et al., 2002; Kohli et al., 2004). Продовження стану гіпометилювання може значно збільшувати частоту транспозиції, що може бути корисним у деяких випадках за мічення транспозонів для їх подальшого клонування. Зокрема, показано, що частота транспозиції мобільного елемента *Ac* у рослинах рису, отриманих з насіння, була у 9 разів нижчою, ніж у рослин-регенерантів, отриманих у культурі тканин, де клітини підлягали дедиференціюванню. Крім того, і частота транспозицій у незчеплені сайти була значно вищою у рослин-регенерантів (Kohli et al., 2004).

Здатність до транспозиції часто залежить від хромосомного локусу. Позиційний ефект впливає на стан метилювання кінців транспозона, а не на активність транспозази. Метилювання ДНК кінців мобільного елемента, яке залежить від хромосомної локалізації, пригнічує ексцизійну активність. У тих випадках, коли транспозони представлені у геномі низкою незалежних копій з ідентичною структурою, але різною локалізацією, їх здатність до транспозиції може відрізнитися на порядки, наприклад, у 100 разів (Kitamura et al., 2001).

Для контролю часу експозиції за транспозоновим міченням генів було розроблено систему INAc (inducible activator) з використанням індукцибельних промоторів, зокрема таких, як PR-1a-промотор, що індукується саліциловою кислотою (Charng et al., 2000).

Нещодавно розроблено нову універсальну методологічну основу для аналізу частоти транспозиції *in vivo* мобільних елементів класу II, тобто ДНК-транспозонів (Rajunen et al., 2010). Принципи цієї методології полягають у тому, що клонування кінців транспозонів і спорідненого гена транспозази у три послідовних етапи у кожній конкретній транспозонній системі генерує багатofункціональну плазмиду, яка здійснює індукцибельну експресію гена транспозази і включає мобілізабельний репортерний транспозон, що містить *lacZ*. За аналізу переміщення процеси транспозиції реєструються як голубі мікроколонії у вигляді сосочків, що ростуть на індикаторних платівках між білуватими колоніями *Escherichia coli*. Використовуючи різні мутанти транспозази MuA, розроблено метод із застосуванням бактеріофага *Mu* як тест-моделі. Розроблений метод дозволяє проводити простий скринінг гіпер- чи гіпоактивних транспозазних мутантів незалежно від вихідного рівня активності (дикого типу). Розроблені універсальні принципи папіляційного (сосочкового) аналізу можуть бути застосовані для вивчення багатьох мобільних елементів. Їх можна використовувати у механістичних дослідженнях транспозиції і для скринінгу чи ретельного вивчення транспозазних мутантів і генів, що кодують фактори хазяїна.

Розроблено також підхід для отримання популяцій високогетерозиготних рослин з незалежними інсерціями транспозонів без проходження генеративної стадії, що є актуальним для клонально розмножуваних рослин — плодових дерев, картоплі тощо. Було застосовано метод культури протопластів для відбору окремих клітин і подальшої регенерації рослин із соматичними транспозиціями, придатних для клонування генів. Вихідний генотип при цьому може зберігатися без змін (Enckwort et al., 2000). Методи культури *in vitro* було також використано для підвищення виходу рослин з гермінальними ексцизіями у видів, у яких активність МГЕ є низькою (Mckenzie et al., 2002). У цих дослідженнях використання процесів калусоутворення та регенерації пагонів у селективних умовах дозволило отримати гермінальні ексцизиї у бро-

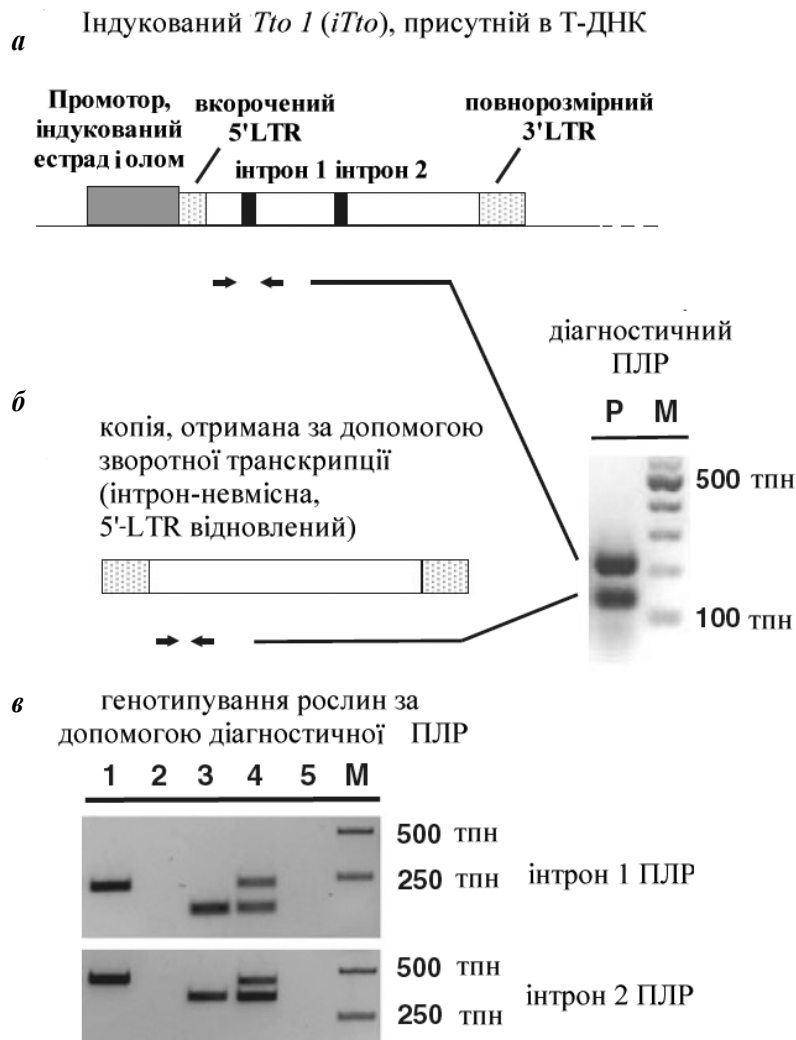


Рис. 17.1. Ретротранспозон *Tto1* містить два довгих термінальних повтори (LTRs), що фланкують центральну відкриту рамку зчитування, кодуючи білки, необхідні для переміщення

Сконструйований елемент *iTto*, присутній в Т-DNA векторі pERnewTto (**а**), має β-естрадіол-індуцибельний промотор, який заміщує 5'-промотор LTR і містить два інтрони (чорні прямокутники). Промоторні послідовності та інтрони не передаються зворотно-транскрибованим копіям (**б**), що дозволяє відрізнити вихідну копію від зворотних транскриптів. Р — ДНК із β-естрадіол-індукованих рослин була використана як матриця для ПЛР. М — маркер розміру ДНК (кроки — 100 нт). Діагностична ПЛР дозволяє швидко генотипувати рослини (**в**). Доріжка 1 — ДНК із трансгенної лінії *iTto* (немає індукції); доріжка 2 — ДНК із нетрансформованої рослини Col-0; доріжка 3 — ДНК із рослини з транспозицією після аутокросингу вихідної копії *iTto*; доріжка 4 — ДНК індукованої рослини з трансгеном *iTto*; доріжка 5 — негативний контроль без ДНК. М — смуги маркерів молекулярних розмірів на агарозному гелі (розмір вказано справа). Характер доріжки 4 не дозволяє відрізнити позахромосомну кДНК від щойно інтегрованих копій, у той час як характер доріжки 3 є характерним для копій *Tto1* кДНК, вбудованих у геном (за: Böhmendorfer et al., 2010)

колі *Brassica oleracea* var. *italica*. Це можливо пояснити підвищенням активності транспозона за дедиференціювання та впливом селективного тиску під час регенерації.

На основі ретротранспозона тютюну *Tto1* сконструйовано новий елемент — *iTto*, транспозиція якого запускається індукцибельним промотором. (Спочатку створили індукцибельний

вектор на основі β-естрадіол-індуцибельного промотора (вектор pER8).) Сконструйований елемент *iTto* за індукції β-естрадіолом формує біологічно активну молекулу мРНК. У результаті зворотної транскрипції копії транспозонів, отримані від *iTto*, були ідентичними природному елементу тютюну *Tto1* — за сплайсингу видаляються інтрони, а завдяки процесу зворотної

транскрипції індукбельний промотор заміщується повномірним LTR (рис. 17.1).

Транскрипція *Tto1* за допомогою індукбельного промотору приводить до появи у рослинній тканині позахромосомної кДНК. З метою інтеграції кДНК у генеративні клітини арабідопсиса застосували сконструйований вектор pERnewTto й індукували *iTto* в апікальній меристемі проростків (ця тканина є вихідною як для соматичних клітин, так і для гамет) β-естрадіолом. Із 70 досліджених рослин арабідопсиса три мали ознаки присутності кДНК *Tto1*, ці рослини давали потомство з новими вставками *Tto1*. Було показано, що *iTto* вставляється, переважно, в активно транскрибовані ділянки геному, подібно тому, як це відбувається для явища транспозиції *Tto1* у культурі тканин (Böhmdorfer et al., 2005). Посттрасляційні етапи виявилися ідентичними для *Tto1* і модифікованого елемента *iTto*. Порівняння транспозиції, виявленої у даному дослідженні в апікальній меристемі інтактних рослин, й індукція у калюсному матеріалі показали їх близьку за рівнем ефективність (Böhmdorfer et al., 2010).

Таким чином, автори застосували підходи синтетичної біології для функціонального аналі-

зу LTR-вмісного ретротранспозона *Tto1* з можливим використанням цього елемента для інсерційного мутагенезу. Особливості цього підходу такі:

- з метою зниження рівня індукованого повторами (repeat-induced) сайленсингу, який у нормі репресує активність МГЕ, у гетерологічний вид рослин (*A. thaliana*) було введено єдину копію елемента тютюну *Tto1*;
- елемент був устаткований індукбельним промотором, що дозволяє індукувати активність елемента за бажанням експериментатора й у певних клітинних лініях;
- для полегшення виявлення транспозуючих копій сконструйований елемент містить інтрони.

Показано, що індукбельна ретротранспозиція при застосуванні сконструйованого ретротранспозона *Tto1* може бути викликана у цілісних (інтактних) рослин з «диким» генотипом. Це надає нові можливості як для подальшого вивчення особливостей процесу транспозиції, так і для дослідження елемента *iTto* як інсерційного мутагена без застосування індукуючих умов культури тканин (Böhmdorfer et al., 2010).

Розділ 18. ТРАНСПОЗОНОВИЙ МУТАГЕНЕЗ

Мобільні генетичні елементи широко застосовують як інсерційні мутагени у функціональній геноміці, чому сприяє можливість використання їхніх послідовностей як молекулярних проб для прямого клонування мutowаних генів. Для мобільних елементів *Ac/Ds*, *En/Spm*, *Tam3* і *Tag1* показано здатність до ефективної транспозиції у низки видів, зокрема у таких модельних рослин, як *A. thaliana* і *N. tabacum*. У дослідженнях з мічення та клонування генів використовували види як з високоактивними ендегенними транспозонними системами, наприклад кукурудзу *Zea mays* (Fedoroff et al., 1984, 2004) і ротики садові *Antirrhinum majus* (Luo et al., 1991), так і ті, в які мобільні елементи кукурудзи вносили шляхом трансформації, наприклад арабідопсис, різні види тютюнів тощо.

Транспозоновий мутагенез має низку переваг порівняно з тим, який проводиться за допомогою Т-ДНК агробактерій, зокрема таких:

- непотрібним стає створення величезної кількості незалежних трансформантів;
- можливе отримання ревертантів за реактивації транспозона, що важливо для підтвердження того, що ген було марковано.

Вперше можливість транспозиції гетерологічного транспозона *Ac* було показано на тютюні, що започаткувало велику кількість подібних досліджень (Baker et al., 1986; див. також таблицю в огляді: Овчаренко та ін., 2006). Перші спроби полягали у введенні транспозонів, клонованих від кукурудзи. Однак, на відміну від тютюну, де транспозон мав високу активність, для інших видів характерною була низька частота транспозиції. Не було розроблено методу селекції рослин з переміщеними транспозонами, особливо важко було ідентифікувати нові мутації у поліплоїдних видів. Тому розроблено низку удосконалень, які дозволили застосувати транспозонові системи на різних видах рослин.

Першим удосконаленням при розробці ефективної транспозонової системи було введення зручних маркерних генів, які дозволили відстежувати і відбирати транспозиційні події. Транспозон у цій системі був розміщений у ділянці, що не транскрибується, між промотором і власне маркерним геном. Транспозиція приво-

дить до експресії гена. Для візуалізації процесу транспозиції як маркерні застосовували гени β -глюкуронідази та стійкості до антибіотиків і гербіцидів. Ефективність таких конструкцій показано у роботі (Yang et al., 1993). Автори вважають, що частота транспозиції *Ac/Ds*-системи у латуні (*Lactuca sativa*) була дуже низькою, оскільки конструкції, в яких не було генів для селекції ексцизії, не дозволили виявити жодного явища транспозиції. За використання конструкцій, які дозволяли проводити селекцію ексцизій цих подій, частота ексцизії мобільного елемента у латуні становила від 42,0% (*Ac*) до 82% (*Ds*) (див.: Овчаренко та ін., 2006).

Більшість маркерних генів не є клітинспецифічними (наприклад, гени стійкості) або методи виявлення їх активності деструктивні для рослини (ензиматичний тест на виявлення активності β -глюкуронідази), що перешкоджає отриманню регенерантів з незалежними транспозиціями з однієї рослини-трансформанта. Клітинна специфічність деяких генів (наприклад, *spt*) може змінюватися залежно від виду і навіть фази розвитку рослини. Наприклад, у броколі *Brassica oleracea* var. *italica*, на відміну від тютюну й арабідопсиса, ген *spt* є клітино-специфічним лише для калюсів, а не для регенерованих пагонів. Однак є дані про те, що розроблено системи прижиттєвого виявлення соматичної ексцизії у трансформантів з використанням генів *gfp* (зеленого флюоресцентного білка медузи) або *LucA* (люцифери світляка). Ці методи дозволяють отримувати лінії з незалежними транспозиційними подіями з єдиної трансформованої рослини у тих видів, де транспозони мають високу активність у соматичних тканинах і можлива регенерація з цих тканин (цит. за: Овчаренко та ін., 2006).

Подальші удосконалення полягали у застосуванні двокомпонентних систем транспозонів, де неавтономний елемент (*Ds* або *I/dSpm*) використовують як транспозон-мітку, тоді як автономний елемент (*Ac* або *Spm*) надає транспозазу. Іноді, для полегшення подальших аналізів, автономний елемент модифікують таким чином, що він діє тільки як джерело транспозазу і не здатний до власного переміщення. Для цього, як правило, делетують один з кінцевих повторів елемента.

Двокомпонентні системи мають такі переваги перед однокомпонентними:

- у неавтономний елемент може бути введено селективний ген, який практично не впливає на активність транспозона, але дозволяє проводити селекцію на наявність мобільного елемента у геномі, швидко ідентифікацію потомства, що несе вставку транспозона, та виявити косегрегацію транспозона і мутантного фенотипу в нащадків (перший крок при доведенні того, що ген марковано);
- при клонуванні генів джерело транспозази і сам транспозон можуть бути розділені за сегрегації, транспозон у цьому випадку стабілізується. Стабільний транспозон може бути використаний як мітка при клонуванні мутованого гена. Крім того, стабілізація транспозона попереджає мутації генів унаслідок утворення так званих «слідів» (footprints), послідовностей з кількох пар нуклеотидів, які залишаються на попередньому місці розташування транспозона після його переміщення. Гени з такими мутаціями неактивні, але їх неможливо клонувати через те, що вони не марковані транспозоном.

У цьому полягають переваги використання неавтономного елемента двокомпонентної системи перед автономним, який створює нестабільні мутації, бо може переміщуватися.

Ще одним удосконаленням було використання сильних промоторів для гена транспозази (p35S, pNOS). Використання 35S-промотора вірусу мозаїки цвітної капусти підвищило рівень експресії транспозази, привело до зростання частоти транспозиції. Детальніше це питання транспозонового мутагенезу розглянуто в огляді (Sundaresan, 1996).

Мобільні генетичні елементи вводили до гетерологічних видів за допомогою різноманітних методів генетичної трансформації (як правило, агробактеріальної, з використанням *Agrobacterium tumefaciens* та *A. rhizogenes*), іноді прямої. Використання методу прямої трансформації за введення гетерологічних транспозонів має низку недоліків:

- вбудовується більше однієї копії Т-ДНК, що ускладнює молекулярний аналіз;
- можливе вбудовування пошкодженої Т-ДНК, що призведе до експресії маркерного гена за відсутності транспозиції;
- можлива гомологічна рекомбінація.

Пізніше було запропоновано метод введення гетерологічних транспозонів у рослини видів, які важко трансформувати, шляхом соматичної гібридизації раніше трансформованого видоноора транспозона з видом-реципієнтом. Ефективність використання цього методу потребує подальших досліджень (див огляд: Овчаренко та ін., 2006, а також: Böhmdorfer et al., 2010).

Розділ 19. РЕТРОТРАНСПОЗОННІ ВЕКТОРНІ СИСТЕМИ ДЛЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

Ретротранспозони є численними складниками рослинних геномів, і хоча деякі рослинні ретротранспозони використовуються як інсерційні мутагени, ці мобільні генетичні елементи до останнього часу мало застосовувалися для маніпуляцій із рослинним геномом. У хребетних і дріжджів ретротранспозони і ретровіруси зазвичай змінюються, переносючи додаткові гени, які копіюються у комплементарну ДНК (кДНК) шляхом зворотної транскрипції. Інтеграція кДНК приводить до перенесення генів, а рекомбінація кДНК із гомологічними хромосомними послідовностями може створювати спрямовані генні модифікації. Тому рослинні вектори на основі ретротранспозонів відкривають нові можливості для конструювання рослинного геному (див.: Todorovska, 2007; Böhmendorfer et al., 2010).

Такі вектори можуть бути:

- важливим додатковим інструментом отримання трансгенних рослин лише з чітко визначеними вставками чужинної ДНК, що є

однією з необхідних умов забезпечення біобезпеки і комерціалізації;

- зручним інструментом перенесення генів, що може усунути деякі проблеми нині застосовуваних методів трансформації;
- крім того, на відміну від тварин, рослини не відокремлюють лінію генеративних клітин, й інфіковані соматичні клітини можуть дати початок органам квітки і насінню.

Однак, перш ніж широко застосувати ретротранспозони як вектори у генетичній трансформації, важливо правильно оцінювати можливість безпечного використання трансгенних рослин, а для цього треба чітко знати, як ці ретротранспозони впливають на процеси міжвидового потоку генів у природі. На додаток до викладеного у розділі 3.3 розглянемо деякі відомі аспекти життєвого циклу і механізми, що регулюють експресію ретротранспозонів і їх зв'язок із деякими клітинними процесами у рослин.

19.1. Деякі аспекти біології LTR-вмісних ретротранспозонів

Транспозони, які містять довгі кінцеві повтори (ДКП) — LTR-вмісні ретротранспозони, є мобільними генетичними елементами, що реплікуються шляхом зворотної транскрипції посередника — матричної, або інформаційної, РНК (мРНК). Оскільки LTR-вмісні ретротранспозони і ретровіруси подібні за своєю генетичною організацією і механізмом реплікації, у сукупності їх називають ретроелементами (див. розділ 3). Довгі кінцеві повтори (LTRs) визначають межі вставок ретроелемента і містять промотори і термінатори транскрипції, необхідні для створення мРНК ретроелемента. На 5'- та 3'-кінцях LTRs містяться праймер-зв'язувальний сайт (primer binding site — PBS) і поліпуринова ділянка (polypurine tract — PPT) відповідно, що слугують сайтами затравки для зворотної транскрипції. Усі ретроелементи мають два спільних гени: *GAG* кодує білки, що формують віруси чи вірусоподібні часточки (ВІПЧ або VLPs від virus-like particles), а ген *POL* кодує три ферменти, а саме: зворотну транскриптазу (re-

verse transcriptase — RT), інтегразу (IN) і протеазу (PR).

Реплікація ретроелемента починається із синтезу мРНК рухомого елемента, яка транслюється у білок, а також слугує матрицею для зворотної транскрипції в кДНК. Після трансляції *GAG* формує віруси чи вірусоподібні часточки (VLPs), в які запаковуються мРНК ретроелемента і продукти гена *POL*. Зворотна транскрипція за допомогою RT ініціюється у праймер-зв'язувальному сайті (PBS) із застосуванням кодової хазяїном транспортної РНК або праймера, що походить від тРНК. Синтез мінус-ланцюга ДНК іде від PBS до 5'-кінця мРНК, генеруючи сильну (strong) стоп-ДНК мінус-ланцюга. З причини надлишку послідовностей між 5'- та 3'-LTRs сильна стоп-ДНК «стрибає» до 3'-кінця тієї самої або іншої мРНК, спарюючись із комплементарними послідовностями. Потім синтез ДНК іде до 5'-кінця мРНК, завершуючи синтез мінус-ланцюга. Завдяки РНКазній активності RT видаляє РНК із гібриду РНК-ДНК, за винят-

ком РНК, спареної із поліпуриновою ділянкою (РРТ), яка слугує як праймер плюс-ланцюга. Коли ДНК плюс-ланцюга досягає кінця матриці, вона зазнає другого стрибка, спарюючись із послідовностями на 5'-кінці кДНК. Завершення синтезу плюс-ланцюга генерує повномірну, дволанцюгову кДНК, що є субстратом для інтеграції. кДНК переноситься в ядро інтеграційним комплексом, основним компонентом якого є інтеграза. Інтеграза розрізає ДНК і вставляє кДНК у геном хазяїна.

Здатність каталізувати інтеграцію кДНК робить ретроелементи хорошим знаряддям для перенесення генів (Miller, 1997; Hou et al., 2010). Системи перенесення генів на основі ретроелементів використовують, як правило, двокомпонентну стратегію. Один із компонентів — це вектор перенесення, який містить чужинний ген для доставки у геном хазяїна. Вектор перенесення має також усі *cis*-регуляторні послідовності, необхідні для вискоєфективної реплікації. Другим компонентом є допоміжний (хелперний — від *helper*) ретроелемент, який поставляє необхідні білки, необхідні для реплікації *in trans*. Якщо клітина експресує як хелперні, так і векторні елементи, формуються функціональні реплікативні посередники. У разі ретровірусів цими посередниками є вірусні частинки, що можуть бути зібрані і використані для інфекції клітин чи тканин, щоб перенести цільовий ген. У разі ретротранспозонів посередниками реплікації є VLPs, що містять копію мРНК векторного ретроелемента. Ця мРНК зворотно транскрибу-

ється у кДНК, яка потім може інтегрувати чи рекомбінувати з геномом хазяїна.

Двокомпонентні ретровірусні векторні системи завдяки їх здатності підтримувати постійну довготермінову експресію трансгена широко застосовують для перенесення генів, зокрема у клітини людини (див.: Miller, 1997). Двокомпонентні ретротранспозонні системи перенесення генів розроблені також для дріжджів, дротянок, що розмножуються брунькуванням (Xu, Boeke, 1990); однак для інших еукаріотів двокомпонентні вектори на основі ретротранспозонів для перенесення генів застосовують рідко.

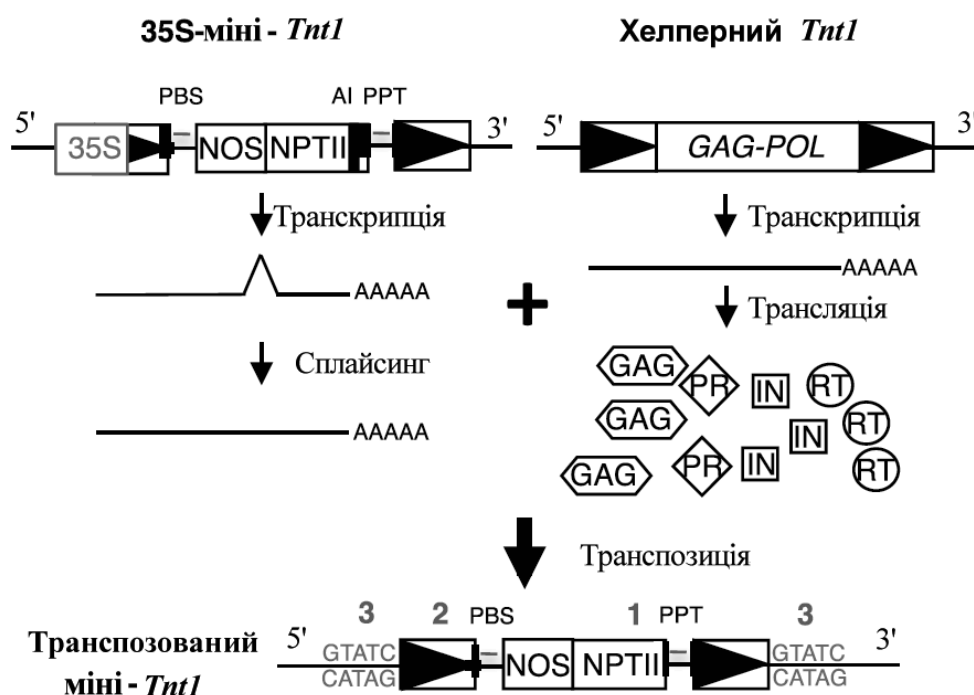
Особливо багато LTR-вмісних ретротранспозонів міститься у рослинних геномах, а першим описаним транскрипційно компетентним рослинним транспозоном був елемент *Tnt1*, знайдений у тютюну (Grandbastien et al., 1989). Мобільність *Tnt1* значно підвищується за дії таких стресових чинників, як фактори ізоляції протопластів, умови культури тканин, атака патогену (Grandbastien et al., 1989, 2005). Наприклад, щойно транспозовані копії *Tnt1* виявлено у майже 25% рослин тютюну, що регенерували з культури протопластів. Рухомі елементи *Tnt1* інтегрують переважно у кодуючих чи поблизу кодуючих послідовностей, і ці вставки, як правило, добре сприймаються хазяїном (Le et al., 2007). Крім того, елементи *Tnt1* мають високу транспозиційну компетентність у різних видів рослин, таких як арабідопсис, конюшина, латук *Lactuca sativa* та ін.

19.2. Розробка векторної системи на основі ретротранспозона *Tnt1*

Розглянемо особливості векторної системи на основі ретротранспозона *Tnt1*, що призначена для реплікації і доставки чужинних генів у цільові рослини. Розробку індукцйбельного ретроелемента на основі *Tnt1* для можливого використання в інсерційному мутагенезі розглянуто у розділі 18 (див. також: Böhmendorfer et al., 2010). Вектори перенесення *Tnt1* (міні-*Tnt1* елементи) сконструйовані шляхом заміщення більшої частини кодуюльної послідовності елемента *Tnt1* селективним маркером неоміцинфосфотрансферазою NPTII. Кодовані *Tnt1* генні продукти, необхідні для транспозиції, поставляються *in trans* ендеген-

ними елементами *Tnt1*, експресія яких індукується виділенням протопластів. Елементи міні-*Tnt1*, у яких немає функціональних генних продуктів, можуть бути ефективно доповнені *in trans* ендегенними хелперними *Tnt1*-елементами. У результаті було показано, що подібно до ретровірусів хребетних LTR-вмісні ретротранспозони можна сконструювати так, щоб вони були ефективними для перенесення генів у рослин. Розглянемо особливості такого конструювання на прикладі результатів, викладених у роботі (Hou et al., 2010).

Спочатку ретротранспозон *Tnt1* був ампліфікований за допомогою ПЛР із геномної ДНК

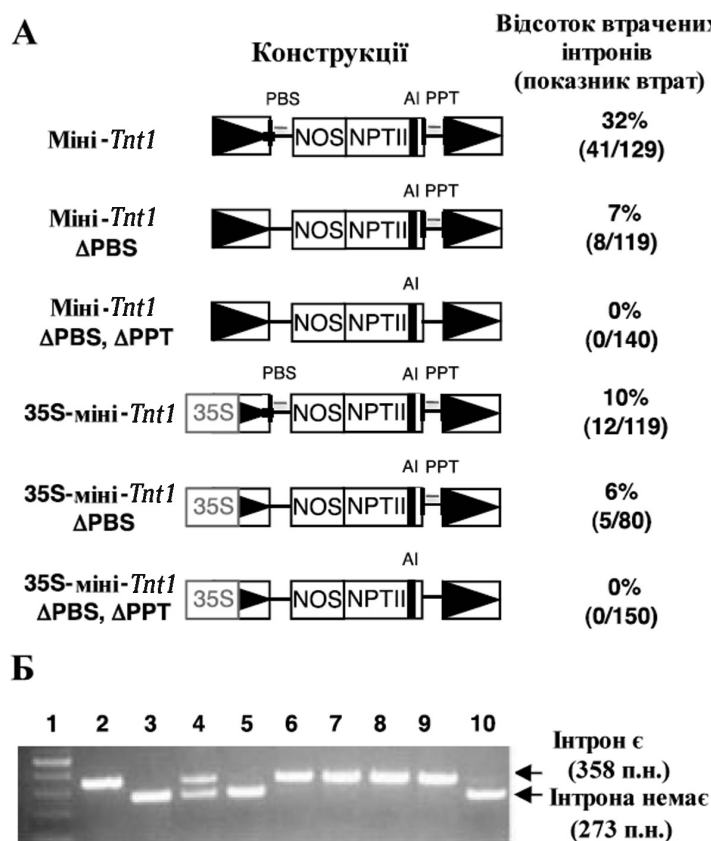
Рис. 19.1. Векторна система на основі мобільного елемента міні-*Tnt1*

Mini-*Tnt1* є неавтономним елементом, що містить ген неоміцин фосфотрансферази (NPTII), контрольований нопалін синтезним (NOS) промотором. У кодувальній послідовності NPTII присутній штучний інтрон (AI — чорний прямокутник). Послідовності довгих кінцевих повторів (LTRs) показані незафарбованими прямокутниками з чорними трикутниками всередині. 35S-міні-*Tnt1* має 35S-промотор вірусу мозаїки цвітної капусти, що заміщує частину 5'-LTR. Праймер-зв'язувальний сайт (PBS) і поліпуриновий тракт (PPT) позначені сірими лініями. Нижче 35S-міні-*Tnt1* міститься мРНК, що зазнає сплайсингу і слугує матрицею для зворотної транскрипції. Справа від 35S-міні-*Tnt1* зображено автономний (хелперний) ретротранспозон *Tnt1*, присутній у геномі тютюну. Автономний *Tnt1* продукує GAG та POL у транспозиції, забезпечуючи транспозицію мРНК міні-*Tnt1*. Продукти гена *POL* містять протеазу (PR), зворотну транскриптазу (RT) та інтегразу (IN). Реплікований міні-*Tnt1* (внизу рисунка) має кілька особливостей, характерних для транспозиції (цифри): 1 — у нього немає інтрона; 2 — він має повний 5'-LTR, який відтворюється під час зворотної транскрипції; 3 — він фланкований дуплікацією цільового сайту (сірі послідовності ДНК) (за: Hou et al., 2010)

тютюну і модифікований за допомогою олігонуклеотид-спрямованого мутагенезу так, що він був ідентичний опублікованій послідовності *Tnt1* (GenBank інвентарний номер X13777). Вектор міні-*Tnt1* сконструйовано з повними послідовностями LTRs на 5'- та 3'-кінцях, що забезпечує конструкцію сайтами ініціації і закінчення транскрипції, відповідно (рис. 19.1). Послідовності, що входять до складу перших 315 п. н. GAG, включено у 5'-внутрішній домен елемента *Tnt1*. Включено також послідовності некодувального внутрішнього домену поблизу 3'-LTR. Послідовності внутрішнього домену мають містити цис-діючі елементи (наприклад, сайти затравки), необхідні для зворотної транскрипції. Отримано модифіковану версію міні-вектора, у якого 5'-ділянка 5'-LTR (U3) була за-

мінена на 35S-промотор вірусу мозаїки цвітної капусти, який забезпечує конститутивну експресію міні-*Tnt1*. Цей міні-вектор названо 35S-міні-*Tnt1*.

В обидва міні-вектори, сконструйовані на основі елемента *Tnt1*, було вставлено ген NPTII з нопалінсинтезним (NOS) промотором. Рослинні клітини, що експресують NPTII, є канаміцин-стійкими. Ген NPTII містить також штучний інтрон розміром 85 п. н. (AI), який перебуває у тій же орієнтації, що і міні-*Tnt1*-транскрипт. Якщо міні-вектори *Tnt1* переносяться у протопласти тютюну, ендегенні елементи *Tnt1*, експресія яких індукується виділенням протопластів, дають генні продукти, необхідні для ретротранспозиції міні-*Tnt1* *in trans*. Були сконструйовані також міні-*Tnt1* і 35S-міні-*Tnt1* з делеціями PBS,

Рис. 19.2. Синтез кДНК міні-*Tnt1*:

А — схема конструкцій міні-*Tnt1*, які були введені у протопласти тютюну. Послідовності LTR позначено прямокутниками із забарвленими трикутниками. Тонкі сірі лінії позначають місцезнаходження PBS та PPT. Штучний інтрон (AI) показаний малим чорним прямокутником. Для кожної конструкції отримували канаміцин-стійкі калуси (Kan^r), які визначали за допомогою ПЛР за втратою інтрона у NPTII. Відсоток втрачених інтронів — це число Kan^r калусів із комплементарною кДНК (що визначається за відсутністю інтронів), поділене на загальну кількість підрахованих калусів і помножене на 100. Кількість підрахованих процесів вказана у дужках нижче відсотків. **Б** — типові результати скринінгу за допомогою ПЛР втрати інтронів серед Kan^r калусів. Доріжка 1 — маркери молекулярної довжини; доріжка 2 — дані ПЛР із застосуванням контрольної матриці, що має інтрон; доріжка 3 — дані ПЛР із застосуванням контрольної матриці без інтрона; доріжки 4–10 — дані ПЛР із зразків ДНК від окремих Kan^r калусів (за: Hou et al., 2010)

що слугували негативними контролями. Оскільки у таких PBS-мутантів ретротранспозиція дріжджового ретротранспозона *Ty1* не відбувається, очікувалося, що ці мутанти будуть порушувати транспозицію міні-*Tnt1*.

Конструкти міні-*Tnt1* передбачають три способи спостереження за зворотною транскрипцією і ретротранспозицією (рис. 19.1):

- по-перше, у щойно транспозованих елементів після сплайсингу мРНК і зворотної транскрипції інтрона NPTII може не бути. Це дозволяє за допомогою ПЛР відрізнити батьківські елементи від таких потомства;
- по-друге, за транспозиції буде відтворений повний 5'-LTR 35S-міні-*Tnt1* елемента, оскільки

ки U5 із 3'-LTR в мРНК використовується як матриця для синтезу U5 у 5'-LTR у елемента, який щойно транспозував. Відновлення 5'-LTR було показано у щойно транспозованого 35S-*Tnt1*-елемента арабідопсиса (Lucas et al., 1995);

- по-третє, якщо міні-*Tnt1*-елементи зазнають транспозиції, фланковані послідовності нових вставок будуть містити характерну дуплікацію сайту інтеграції розміром 5 п.н. (Grandbastien et al., 1989).

Протопласти тютюну електропорували окремо з конструктами міні-*Tnt1* і 35S-міні-*Tnt1* та з конструктами негативного контролю з PBS-делеціями (рис. 19.2).

Було показано, що обидва міні-*Tnt1*-вектори здатні до транспозиції.

Транскрипція ендегенних елементів *Tnt1* активується у процесі виділення протопластів, а продукти гена *pol*, що виробляються ендегенними елементами *Tnt1*, можуть виконувати синтез кДНК і інтеграцію міні-*Tnt1*-векторів. У разі застосування вектора міні-*Tnt1* з повним 5'-LTR процеси транспозиції було виявлено в одній третині калюсів, отриманих з протопластів. Якщо рослини регенерували із протопластів за відсутності добору, то ендегенні елементи *Tnt1* мали частоту транспозиції 25%. У разі застосування конструкції із 35S-промотором (35S-міні-*Tnt1*) транспозицію спостерігали у близько 10% трансформованих протопластів. У 35S-міні-*Tnt1* U3-ділянка 5'-LTR була заміщена 35S-промотором. U3 містить кілька *cis*-діючих елементів, що поводять себе як транскрипційні активатори (Grandbastien et al., 2005). Фактично, нативний 5'-LTR має вищу транскрипційну активність, ніж 35S-промотор у тютюну за швидкоплинного аналізу експресії. Оскільки транскрипція необхідна для ретротранспозиції, саме вищим рівнем транскрипції можна пояснити, чому елемент міні-*Tnt1* з нативним LTR транспозується з вищою частотою, ніж 35S-міні-*Tnt1*.

Під час зворотної транскрипції елемента *Tnt1* має місце матричне переключення. Це підтверджується тим, що:

- кДНК синтезувалася з міні-*Tnt1* елементів із PBS-делеціями. Очевидно, що синтез кДНК відбувається, коли мінус-ланцюг ДНК, сформований ендегенною мРНК *Tnt1*, переноситься до мРНК міні-*Tnt1* із PBS-мута-

цією — відомо, що жодна кДНК не утворюється з конструктів міні-*Tnt1* із PBS- та РРТ-мутаціями, оскільки РРТ необхідна для повної зворотної транскрипції;

- один із 5'-LTRs шойно транспозованого 35S-міні-*Tnt1* має додатковий повтор ВІІ в U3, який, можливо, утворився із ендегенної U3 *Tnt1*. Крім того, U3 в 3'-LTR того самого транспозованого елемента має таку саму послідовність, як і у 5'-LTR. Це свідчить про те, що мРНК ендегенних елементів *Tnt1* та 35S-міні-*Tnt1* упаковані в одну ВПЧ і що матричне переключення має місце під час синтезу мінус-ланцюга ДНК 35S-міні-*Tnt1*.

Те, що численні мРНК використовуються під час зворотної транскрипції різних LTR-вмісних ретроелементів, а рекомбінація і матричне переключення — звичайне явище, підтверджується й тим, що у трибі *Triticum* матричне переключення також має місце під час зворотної транскрипції ретротранспозонів. Ці дані потребують уточнення пояснень того, як виникли деякі складні вставки за участі LTR-вмісних ретротранспозонів (див.: Sabot, Shulman, 2007).

Таким чином, у розглянутій експериментальній системі білки, необхідні для мобілізації міні-*Tnt1*, постачалися ендегенними елементами *Tnt1*. Для використання міні-*Tnt1* для інших видів рослин потрібен хелперний *Tnt1*-елемент, що експресує *GAG-POL Tnt1*-елемента. Наприклад, коли міні-*Tnt1*-вектори вводили у клітини арабідопсиса разом з конструкцією, що експресує гени *GAG-POL Tnt1*, у цій гетерологічній системі хелперний *Tnt1* ефективно заміщував нативні елементи *Tnt1* (подробіці див.: Hou et al., 2010).

19.3. Перспективи застосування двокомпонентної системи векторів міні-*Tnt1*

Інсерційний мутагенез широко застосовують для попереднього генетичного аналізу рослин (Kumar, Hirochika, 2001), а найпопулярнішими інсерційними елементами слугують Т-ДНК агробактерій і транспозони класу II, такі як *Ac*, *En/Spm* та *Mutator* кукурудзи. Однак Т-ДНК є не дуже зручною як інсерційний мутаген у рослин з великими геномами, оскільки вона має тенденцію інтегрувати випадково; вона також не може бути використана у рослин, які важко трансформувати за допомогою агро-

бактерій. Мобільні генетичні елементи класу II транспозують за допомогою механізму «виріж і встав» і тому часто створюють нестабільні мутації. Ретротранспозон *Tnt1* усуває ці обмеження, оскільки він, по-перше, переважно інтегрує в кодувальних послідовностях чи поблизу них, а по-друге, і тому, що рухається за допомогою механізму «скопій і встав».

Повномірні елементи *Tnt1* використовували як інсерційні мутагени у низки видів рослин (посилання і подробіці див.: Hou et al., 2010).

Вектори міні-*Tnt1* можуть бути більше корисними для генного маркування з кількох причин:

- подібно до нативних *Tnt1*-елементів, міні-*Tnt1* вставляються у гени чи поблизу генів і транспозують з порівнянними частотами;
- міні-*Tnt1* можуть бути сконструйовані для перенесення гетерологічних генів (наприклад, маркерних генів) для полегшення ідентифікації клітин, в яких відбулися процеси транспозиції;
- з метою блокування транспозиції після трансформації хелперні елементи можуть бути видалені шляхом зворотного схрещування (бекросингу);
- половина транспозованих міні-*Tnt1*-елементів інтегрує у геном відразу після трансформації, спрощуючи отримання й аналіз сайтів їх інтеграції.

Цікавою є також можливість використання міні-*Tnt1* для отримання кДНК, що може бути задіяна у гомологічній рекомбінації зі спорідненими хромосомними послідовностями. Незважаючи на отримання направлених хромосомних розривів за допомогою нещодавно сконструйованих нуклеаз, все ж і до сьогодні у рослин важко досягти генної модифікації шляхом гомологічної рекомбінації. Хоча хромосомні розриви стимулюють рекомбінаційну репарацію,

все-таки має бути введена в клітину молекула донорної ДНК як репараційна матриця. Для введення ДНК у клітини рослин широко використовують два методи — інфікування за допомогою агробактерії і швидкісне бомбардування мікрочастинками. ДНК, що вводиться цими методами, перебуває у клітині короткий період часу. Оскільки гомологічна рекомбінація — явище не дуже часте, короткотермінова наявність внесеної ДНК не сприяє ефективній рекомбінації. Постійне внесення донорних кДНК за допомогою розроблених ретротранспозонних векторів збільшує частоту гомологічної рекомбінації (подробити див.: Hou et al., 2010).

Таким чином, розроблено і випробувано ретротранспозонну векторну систему на основі *Tnt1*-елемента тютюну. Вектори перенесення міні-*Tnt1* можуть бути мобілізовані *in trans* за допомогою білків GAG та POL, що продукуються ендегенними елементами *Tnt1*. Створені міні-*Tnt1*-елементи можливо використовувати у дослідках із трансгенного перенесення і мутагенезу. Міні-*Tnt1*-елементи є також зручною і лабільною системою для вивчення основних механізмів ретротранспозиції у рослин. Подібні конструкції, очевидно, можуть бути створені і на основі інших рухомих генетичних елементів.

Розділ 20. ОСОБЛИВОСТІ ТА ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ТРАНСПОЗИЦІЙ МГЕ У МЕЖАХ ОДНОГО ГЕНОМУ ТА МІЖ ГЕНОМАМИ

Поведінку мобільного елемента неможливо заздалегідь достовірно передбачити не тільки у новому виді-хазяїні, а навіть на різних стадіях розвитку рослини. Тому при застосуванні транспозонів для клонування генів у рослинах нового виду необхідним етапом є попереднє тестування активності мобільного елемента саме у представника даного виду.

Встановлено, що в геномі рослин хромосоми поділяються на дві групи — ті, в яких транспозиція МГЕ відбувається переважно у незчеплені локуси, та ті, що не мають такої переваги (Briza et al., 2002). Припускається, що транспозиція у незчеплені локуси може бути пов'язана з наявністю специфічних хромосомних територій. Тому транспозиція між двома близько розташованими хромосомами буде відбуватися з більшою ймовірністю, ніж між віддаленими (McKenzie et al., 2004).

Для *Ac*-елемента було показано, що транспозиція відбувається переважно в активно транскрибовані ділянки геному, що є зручним за процедури клонування генів, оскільки для дослідів можливо використовувати меншу кількість рослин (Greco et al., 2001; Kohli et al., 2004).

Родина *Spm*-елементів, на відміну від *Ac/Ds*, характеризується транспозицією у слабо або взагалі незчеплені локуси хромосом (Greco et al., 2004). На арабідопсисі показано, що частота транспозицій *Spm* у незчеплені локуси становила 8–20 %. Для *Ac*-елемента характерним є переміщення переважно у сайти однієї групи зчеплення, хоча не виключена можливість переміщення і у незчеплені локуси (Briza et al., 2002; McKenzie et al., 2004). Ця особливість *Ac*-елемента корисна тоді, коли завданням є насичення певної ділянки геному навколо сайту первинної інсерції, проте вона є незручною, коли необхідне отримання інсерцій по всьому геному (Kohli et al., 2004).

Транспозиція мобільних елементів відбувається, як правило, в межах кластерів розміром 10–50 т.п.н., що розділені ділянками розміром 60–100 т.п.н. (Stuurman et al., 1998). Наявність зон переважного вбудовування МГЕ дозволяє припустити, що є диференційний доступ транспозона до ДНК з різним упорядкуванням хро-

тину. Тому існує реальна загроза того, що деякі гени буде важко мітити за допомогою МГЕ.

Якщо транспозиція МГЕ між окремими хромосомами в межах одного геному є можливою (Briza et al., 2002), то процес транспозиції між геномами різних видів чітко не доведений. У процесах транспозиції мобільних елементів у межах одного геному та між геномами може існувати відмінність. Причина її може полягати в тому, що геноми різних видів у гібридному ядрі можуть бути просторово розділеними. У цьому випадку ефективність міжгеномної транспозиції може бути дуже низькою або взагалі відсутньою.

Було створено низку віддалених соматичних гібридів для перевірки можливості міжгеномного переміщення транспозона. У міжтрибних соматичних гібридів між *Arabidopsis thaliana*, геном якого містив *Spm* транспозон кукурудзи, та видами триби *Brassicae* (*Brassica juncea*, *Orychophragmus violaceus*, *B. napus*) було показано активність гетерологічної системи транспозонів. Отримання гібридів з активним гетерологічним МГЕ є одним із перших кроків на шляху вирішення низки важливих теоретичних і практичних проблем (Овчаренко та ін., 2005, 2005a).

Такі дані представляють особливий інтерес у зв'язку з тим, що не всі лінії та сорти сільськогосподарських культур, навіть у межах одного виду, придатні для ефективної генетичної трансформації. Традиційно за отримання трансгенних рослин комерційних сортів трансгени в них переносять шляхом схрещувань з лініями, які легко трансформуються. Для відтворення після цього вихідного генотипу сорту, який цікавить дослідника, необхідне багаторазове проведення повторних зворотних схрещувань. Така методика вимагає значних витрат часу, зусиль та не гарантує повної відсутності генетичного матеріалу лінії-донора. Тому заслуговує на увагу новий підхід, який, можливо, дозволить подолати подібні перешкоди. Суть цього методу полягає у використанні транспозонів, які можуть переміщувати гени по геному. Транспозиція гена, що становить інтерес, з геномного оточен-

ня первинно трансформованої лінії до геному комерційного сорту порушить групи зчеплення, чим прискорить добір рослин з генотипом комерційного сорту.

Відомо, що за певних комбінацій батьківських видів при гібридизації відбувається утворення нестабільних гібридів. Останні характеризуються тим, що спонтанно втрачають генетичний матеріал одного з батьківських видів на ранніх стадіях розвитку. Вид, хромосоми якого елімінуються у гібридах, може бути трансформованим конструкцією, що містить оточений послідовностями транспозона цільовий ген, з подальшим використанням цього виду як донора. Переміщення такого гена з геному виду-донора до геному реципієнта та наступна втрата генетичного матеріалу одного з батьків може привести до швидкого створення трансгенних комерційних сортів. Ймовірними причинами елімінації генетичного матеріалу в нестабільних гібридах є відмінності у мітотичному ритмі та тривалості фаз клітинного циклу в батьківських видів (див.: Кунах, 2005, розділ 4.2.3).

Отримання таких гібридів можливе як шляхом статевої, так і соматичної гібридизації. Нестабільні гібриди утворюються за статевої гібридизації *Brassica napus* × *Orychophragmus violaceus*, *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum*, *Avena sativa* × *Z. mays*, *Triticum turgidum* × *Z. mays*, *T. aestivum* × *Z. mays*, *T. aestivum* × *Pennisetum americanum*, *T. aestivum* × *H. bulbosum* тощо. Деякі з таких гібридів уже застосовують у селекційних програмах для отримання подвоєних гаплоїдів — гомозиготних диплоїдних ліній сільськогосподарських рослин (Кунах, 2005; Игнатова, 2011). Спонтанну елімінацію хромосом та утворення асиметричних соматичних гібридів було показано у *Arabidopsis thaliana* + *Brassica campestris*, *B. juncea* + *Eruca sativa*, *B. napus* + *B. nigra*, *B. napus* + *Raphanus sativus*, *B. napus* + *A. thaliana*, *B. napus* + *Lesquerella fendleri*, *R. sativus* + *A. thaliana*, *Lycopersicon peruvianum* + *Petunia hybrida*, *Nicotiana tabacum* + *Atropa belladonna*, *L. esculentum* + *N. tabacum* тощо (див. огляд: Овчаренко та ін., 2006).

Розділ 21. ТРАНСПОЗИЦІЇ ТА КЛОНУВАННЯ ГЕНІВ У ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ

Для детального дослідження транспозонів застосовують, зокрема, їх перенесення в клітини інших видів (гетерологічна система експресії), оскільки за дослідження їх активності в геномі господаря (гомологічна експресія) можлива присутність додаткових копій мобільного елемента, що ускладнює подальший аналіз. Розглянемо це на деяких конкретних прикладах.

Перелік видів рослин, у які вводили гетерологічні мобільні елементи (кількість таких видів складає близько 30), детально розглянуто у роботі (Овчаренко та ін., 2006). За дослідження процесів транспозиції зручними виявилися штучно створені МГЕ, які, крім власне мобільних елементів (як автономних, так і неавтономних), включали певні селективні та репортерні гени. Останні полегшували моніторинг активності транспозонів.

Транспозиція включає ексцизію мобільного елемента та реінтеграцію його у нове геномне оточення. Вона може відбуватись як у соматичних тканинах, так і в клітинах зародкової лінії. У першому випадку утворюються сектори тканини, які характеризуються новими інсерціями елемента, тоді як транспозиція у клітинах гаметофіту успадковується всіма клітинами нащадків.

Відповідно, оцінку активності транспозонів, зазвичай, проводять за двома параметрами: визначаючи ексцизію у соматичних тканинах (соматична ексцизія) або у зародкових клітинах (гермінальна ексцизія — англ. *germinal excision*).

Соматичну ексцизію виявляють фенотипово як пістрявість (строкате забарвлення тканин організму) після спеціальної обробки — гістохімічного виявлення активності β -глюкуронідази або без неї (з використанням, наприклад, селективного маркера стрептоміцину, який дозволяє виявляти ексцизію у вигляді стійких до антибіотика зелених секторів). Рухливість транспозонів може виявлятися візуально і без спеціальних обробок, наприклад, як пістрявість, часом нестабільна, плодів, листків, квіток тощо (див.: Кунах, 2005, розділ 4). Проте у соматичних тканинах досить складно визначити кількісно точ-

ну частоту ексцизії транспозона. Соматична ексцизія дозволяє виявити відмінності в активності транспозона на рівні окремих особин, показує час ексцизії.

Гермінальна ексцизія проявляється як однорідність забарвлення і показує, що в усіх тканинах даного організму відбулося переміщення транспозона. Гермінальну ексцизію досить легко підрахувати серед нащадків первинного трансформанта. Однак точність досліджень, в яких для порівняння використовують частоту гермінальної ексцизії, страждає від того, що на результат сильно впливає час ексцизії. Одна рання ексцизія може привести до утворення більшої кількості нащадків, які її успадковують, ніж велика кількість незалежних пізніх ексцизій (Dean et al., 1992).

Час активації мобільних елементів значно залежить від промотору, під яким перебуває транспозаза. Так, активація *En/Spm*-подібних елементів у *Aegilops speltoides* за експресії під власним промотором була виявлена в мейозі під час чоловічого гаметогенезу (Raskina et al., 2004a). За використання 35S-промотору транспозиції відбувалися протягом усього періоду онтогенезу рослин: починаючи від кількох днів після запилення і закінчуючи транспозиціями в окремих гаметах (Aarts et al., 1995).

Кількість транспозиційних подій, які передаються наступному поколінню, є важливим показником за вивчення придатності мобільного елемента для інсерційного мутагенезу та експериментів з мічення і клонування генів. Для *Ac*-елемента у кукурудзи цей показник становить 1–10%, тоді як у гетерологічних видів частота гермінальної ексцизії коливається від 0,4 до 80%. Частота гермінальної ексцизії *En/Spm* у кукурудзи становить декілька відсотків, але може іноді підвищуватися за вбудовування у певні алелі до 80%. Частота гермінальної ексцизії при транспозиції елемента *alm1 (pa-pu)* у гетерологічних видів становила до 80% у рису та 40% у *Arabidopsis thaliana* (цит. за: Овчаренко та ін., 2006).

Частота транспозиції мобільного елемента значною мірою залежить від розміру мобільного

елемента, зокрема наявності гена-вставки. Показано, що присутність у *dSpm*-елементі послідовностей, не споріднених з *En/Spm*, не анулює його здатності до транспозиції. Однак присутність генів *aadA*, *bar*, *DHFR* у *dSpm*-елементі знижувала на порядок ефективність транспозиції порівняно з немодифікованим *dSpm*-елементом, природним похідним *En/Spm* із внутрішньою делецією.

Виявлено різницю у співвідношенні між транскриптами (продуктами альтернативного сплайсингу первинного транскрипта) у різних видів. Так, у кукурудзи найпоширенішим є *tnpA* транскрипт, тоді як у картоплі він є міноним продуктом, а основним — *tnpB*. Можлива причина цього — аберантний сплайсинг генів однодольних у видів, що належать до класу дводольних: було показано, що сплайсинг *En/Spm* в однодольних (*Zea mays* та *Oryza sativa*) і дводольних (*Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*) проходить за дещо різними механізмами (Greco et al., 2004).

Ефективність транспозиції залежить від особливостей геному кожного конкретного виду. Наприклад, у *Oryza sativa* і *Medicago truncatula* активність привнесених мобільних елементів невисока і проявляється лише на ранніх стадіях культивування *in vitro*. Було висунуто припущення, що відмінності між рівнями активності транспозонів у різних видів пов'язані з присутністю у геномі виду-хазяїна власних мобільних елементів. У *A. thaliana*, геном якого майже не містить транспозонів, було показано значну активність транспозиції, тоді як види, для яких характерна наявність великої кількості ендегенних мобільних елементів, зазвичай характеризуються не дуже високим рівнем транспозиції гетерологічних мобільних елементів. Можливо, цим видам притаманні ефективні механізми сайленсингу, які спроможні попередити поширення нових мобільних елементів (див.: d'Erfurth et al., 2003; Greco et al., 2004).

Розділ 22. МГЕ ЯК ІНСТРУМЕНТ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

22.1. Транспозони у біотехнології рослин

Одне з основних завдань біотехнології полягає у поліпшенні існуючих та створенні нових сортів і форм культурних рослин. Для цього розробляють методи, які надають можливість маніпулювати з рослинними геномами та окремими генами. Зусилля зосереджуються переважно на таких напрямках:

- клонуванні нових генів рослин, які в подальшому можна буде вводити до сортів, що становлять інтерес;
- видаленні селективних та маркерних генів із трансгенних рослин (Puchta, 2003; Овчаренко та ін., 2006).

Перспективним підходом для досягнення цих завдань є використання транспозонів. Застосування МГЕ для мічення та клонування генів може допомогти при вирішенні першого завдання. Показано успішне застосування транспозонів також при створенні безмаркерних трансгенних рослин.

Для створення безмаркерних трансгенних рослин розроблено низку підходів з використанням транспозонів. Їх суть полягає в тому, що цільовий трансген або селективний маркер поєднують із послідовностями мобільних елементів таким чином, щоб їх можливо було контролювано відділити один від одного після трансформації та селекції. Якщо трансген оточений з обох боків послідовностями транспозона, то за активації останнього в присутності джерела транспозази відбувається переміщення цільового гена від локуса первинної інтеграції трансгена. Це дозволяє розділити господарсько-цінний трансген і селективний маркер шляхом

сегрегації у наступних поколіннях. Перевагою цього методу є можливість створення серій ліній рослин з інтеграцією трансгена у різні локуси, що є особливо цінним для рослин, які важко трансформувати. Таке переміщення трансгена дозволить досліджувати рівень його експресії за різних положень у геномі. Недоліком цього методу є довготривалість, обумовлена необхідністю сегрегації трансгена з маркером і тим, що більшість транспозонів переміщується у близько розташовані локуси, які належать до однієї групи зчеплення.

Інший підхід полягає у тому, що селективний маркер розміщується у транспозоні, який або переміщується у незчеплений локус, або втрачається під час транспозиції за відсутності реінсерції. Так, частота втрати мобільного елемента за транспозиції для *Ac/Ds* може становити від 10 до 50% (Sunderasan et al., 1996; Ebinuma et al., 1996). Для *En/Spm* також встановлено значну частоту втрати елемента після ексцизії та розглянуто можливі причини цього явища, яке дослідники пов'язують з транспозицією мобільного елемента під час реплікації хромосом (Dash et al., 1994). Перевагами цього підходу є можливість його застосування на рослинах, які розмножуються вегетативно, і в тих випадках, коли неможливо отримати сегрегацію генів шляхом схрещування (картопля, яблуна, виноград, суниці, хризантеми, банани, маніока тощо). Привабливою є можливість створення такого вектора, від якого після транспозиції залишатиметься лише господарськоцінний ген, оточений послідовностями Т-ДНК (Ebinuma et al., 1997).

22.2. Транспозонні технології для генної і клітинної інженерії

Згадаймо, що ДНК-транспозони є дискретними ділянками ДНК зі здатністю змінювати своє положення у геномі за допомогою механізму «вириж і встав» (cut and paste), що називається транспозицією. У природі ці елементи існують як окремі структурні одиниці, що містять транспозазний ген, фланкований термінальними інвертованими повторами, в яких розташовані транспозазо-зв'язувальні сайти (рис. 22.1, а).

У лабораторних умовах ДНК-транспозони можна використовувати як двокомпонентні системи, в яких фактично будь-яку послідовність ДНК, що являє інтерес (цільову ДНК), можна помістити між інвертованими кінцевими повторами (TIRs — terminal inverted repeats) транспозона і мобілізованою за допомогою *транс*-доповнення транспозазою у формі експресивної плазмиди (рис. 22.1, б). За процесу транспозиції транспоза-

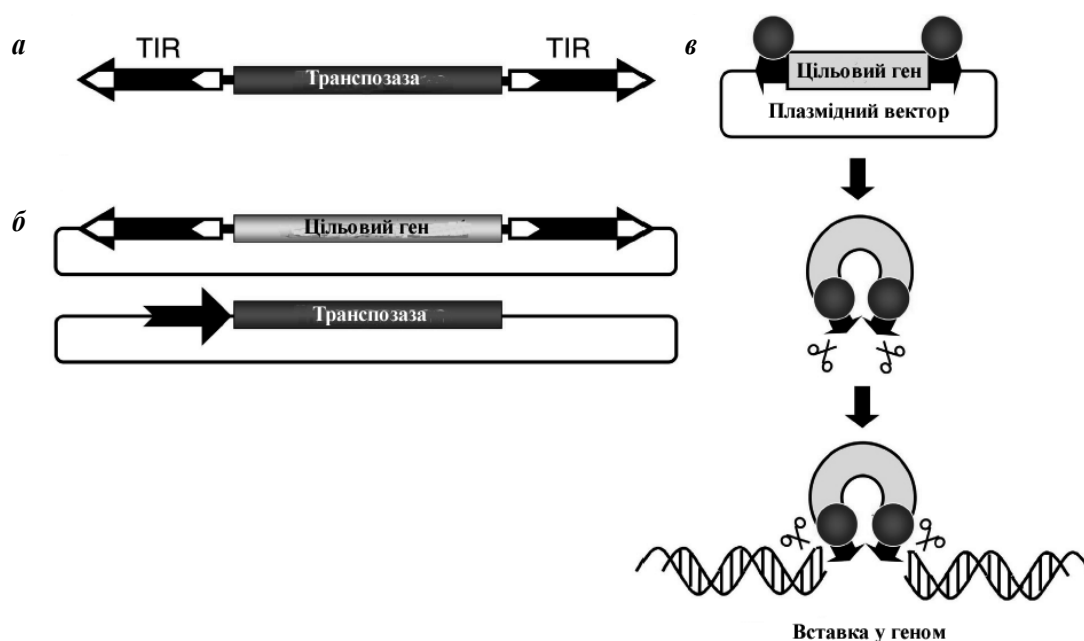


Рис. 22.1. Загальна організація та застосування ДНК-транспозонів як генних векторів:

а — автономні транспозони складаються з кінцевих інвертованих повторів (TIR; чорні стрілки), що фланкують (облямовують) ген транспозази; **б** — двокомпонентна транспозонна векторна система для перенесення трансгенів, що зберігаються в плазмідах. Один компонент містить цільову ДНК між кінцевими інвертованими повторами транспозона, що переноситься плазмідним вектором. Другий компонент є плазмідною, що містить транспозазу, здатну експресуватися; чорна стрілка позначає промотор, що здійснює експресію транспозази; **в** — транспозон, що несе цільову ДНК, вирізається з донорної плазмиди і вбудовується у хромосомний сайт за допомогою транспозази (за: Ivics, Izsvak, 2010)

за вирізає рухомий елемент із донорної плазмиди з наступною реінтеграцією транспозона у хромосомний локус (рис. 22.1, в). Ця особливість робить ДНК-транспозони природними і легко контрольованими засобами перенесення ДНК, які можуть бути використані для різноманітного застосування — від соматичного і генеративного трансгенезу до функціональної геноміки і генної терапії.

ДНК-транспозони успішно застосовують на рослинах і на безхребетних тваринах, включаючи арабідопсис, рис, *Caenorhabditis elegans*, дрозофілу тощо, для трансгенезу та інсерційного мутагенезу, але тривалий час не було відомо транспозонів, які були б достатньо активними, щоб їх можна було застосувати для таких цілей у хребетних тварин. Це тому, що транспозони, як правило, мають обмеження відносно видів, у яких вони переміщуються.

У 1997 році шляхом молекулярної реконструкції древнього, неактивного транспозона *Tc1/mariner*, виявленого у геномах кількох видів риб, було сконструйовано транспозонну систему

Sleeping Beauty (SB) (Ivics et al., 1997). Цей щойно реактивований мобільний елемент дозволив здійснити ефективне, обумовлене транспозоном перенесення генів на основних модельних видах хребетних без потенційного ризику перехресної мобілізації ендогенних транспозонних копій у геномах хазяїв. Це відбувалося тому, що геноми вивчених моделей не мають ендогенних транспозонних послідовностей з достатньою подібністю повторів ДНК для мобілізації за допомогою *SB*-транспозази, що постачається екзогенно. А відтак транспозон *SB* успішно застосовують як засіб генетичних модифікацій цілої низки клітинних ліній і видів хребетних, включаючи людину (Ivics et al., 2009, 2010).

Упродовж останнього десятиліття показано, що у хребетних і деякі інші рухомі елементи каталізують ефективну транспозицію. Наприклад, згідно з даними, наведеними в огляді (Ivics, Izsvak, 2010), МГЕ комах *piggyBac* та *Minos* викликають ефективну транспозицію в клітинах ссавців. *Minos* активний також у хордового *Ciona intestinalis*. Більше того, реконструйовано

ваний мобільний елемент амфібії *Frog Prince*, реконструйований елемент людини *Hsmar1*, реконструйований транспозон риби смугастого даніо (*zebrafish*) *Harbinger3_DR* та *Tol1* і *Tol2* елементи, виділені з медаки, виявились активними у хребетних. *Passport* — транспозон родини Tc1, виділений із риби *Pleuronectes platessa*, активний у клітинах багатьох хребетних, а транспозон *Ac/Ds*, спочатку виявлений у кукурудзи, зазнає активної транспозиції у зародках риби *zebrafish*. Очевидно, мобільні елементи *piggyBac*, *Minos* та *Ac/Ds* мають значно ширший спектр можливих хазяїв, ніж більшість інших транспозонів. Основними критеріями можливості застосовування транспозона на будь-якому даному модельному організмі є:

- достатній рівень транспозиційної активності у даного виду;
- селективні властивості цільового сайту.

Розглянуті та інші дані, зокрема ті, що наведені в огляді (Ivicz, Izsvak, 2010), свідчать, що сьогодні існує низка перспектив для геномних маніпуляцій у хребетних, включаючи трансгенез для отримання трансгенних клітин в культурі тканин, отримання для теоретичних і прикладних досліджень ліній трансгенних тварин, попереднього генетичного скринінгу функціонального генного анотування у модельних видів і терапії генетичних порушень у людини. *Sleeping Beauty (SB)* був першим виявленим транспозоном, здатним до перенесення генів у клітинах хребетних, а останні дані підтверджують, що

рухомий елемент *SB* може виконувати повний спектр генетичного інженерингу, включаючи трансгенез, інсерційний мутагенез і терапевтичне перенесення генів.

В огляді (Ivicz, Izsvak, 2010) описано наявні на той час основні транспозонні системи, обговорено різні параметри і міркування стосовно їх експериментального використання. Особливий наголос автори поставили на використанні представників мобільного елемента *SB*. Зокрема, розроблена гіперактивна транспозонна система *SB100X* виявилася дуже ефективною, стабільною відносно перенесення генів після невірусної доставки їх у відповідні первинні типи клітин тварин і людини, включаючи стовбурові клітини, а тому може полегшувати клінічне здійснення генних терапій як *ex vivo*, так і *in vivo*. Нині необхідним є пошук досконаліших моделей серед представників крупних тварин для здійснення *SB*-опосередкованої транспозиції *in vivo* та поліпшення профілів безпеки *SB*-векторів за допомогою мішень-селектованої інтеграції трансгена у геномні «безпечні гавані». Потрібно також з'ясувати, чи дасть клінічне застосування *SB*-транспозонної системи терапевтичний ефект. Такі випробування допоможуть переконатися у безпечності такого підходу. Дослідження, що проводяться, напевно, спонукатимуть до нових ідей і задумок у царині транспозонних технологій, що дедалі зростає, для генетичної і клітинної інженерії евкаріотів.

Розділ 23. МГЕ ЯК ГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ

Для встановлення спорідненості між таксонами, популяціями й окремими організмами, а також для вивчення генетичної структури угруповань широко застосовують молекулярні маркери (Созинов, 1985; Deragon, Zhang, 2006; Ray, 2007; Сиволап и др., 2011; Kalendar, 2011). Як вважають Ю. Сиволап та співавтори (Сиволап и др., 2011), молекулярний маркер в ідеалі повинен бути:

- поліморфним, тобто різним у порівнюваних об'єктів. Ступінь поліморфізму, що виявляється, залежить від відмінностей між порівнюваними зразками, а також від технології, яку використовують для його визначення;
- відтворюваним за лабораторних аналізів як у межах однієї і тієї самої лабораторії, так і в різних лабораторіях, що проводять ідентичні дослідження;
- кодомінантним. Обрана технологія повинна виявляти різні форми маркера і відрізняти гомозиготи і гетерозиготи. Гетерозиготна особина одночасно представляє генотипи обох гомозиготних батьків;
- рівномірно розповсюдженим по геному. Чим вищий ступінь розповсюдження і щільність покриття геному, тим точнішою є оцінка поліморфізму;
- високочутливим, тобто здатним виявляти відмінності між близькоспорідненими особинами;
- таким, що не зазнає впливу довкілля. Визначення генотипу за допомогою маркера не повинно залежати від середовища проживання чи стадії розвитку;
- нейтральним. Алель, що присутня у маркерному локусі, повинна бути незалежною, а також не зазнавати тиску добору, що діє на особину. Зазвичай це є припущенням, оскільки, як правило, немає даних для підтвердження чи заперечення цієї властивості;
- недорогим. Для застосування у генетико-селекційних масштабах маркерна система повинна бути простою і доступною для аналізу великої кількості зразків.

Автори (Сиволап и др., 2011) відзначають, що ідеальних маркерів немає, проте, вибираючи маркер, потрібно враховувати наведені вище умови.

Перспективи вивчення генетичної варіабельності, різноманіття і специфічності геномів,

взаємодій між геномами організмів і еволюційними процесами, побудови карт зчеплення відкрили методи алозимного електрофорезу. Проте недоліки біохімічних маркерів, таких як ізоферменти, змусили розробляти маркери на основі поліморфізму ДНК. Маркери цього типу генерують характерні спектри (patterns) смуг — фрагментів ДНК, т. зв. «відбитки пальців» (fingerprints), що виявляються за електрофорезу і забарвлення чи мічення. Розробка методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) стала проривом у технології молекулярних маркерів і базисом для створення багатьох методів на основі аналізу поліморфних ділянок ДНК. Ці методи поділяють на дві великі категорії:

- монолокусні методи, що виявляють одиничні локуси;
- мультилокусні методи, що виявляють багато локусів одночасно.

Першими мультилокусними методами були метод довільно ампліфікованої поліморфної ДНК — RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) (Williams et al., 1990; Welsh, McClelland, 1990) і метод аналізу поліморфізму (фінгерпринтинг) ампліфікованої ДНК — DAF (DNA amplification fingerprinting) (Caetano-Annoles et al., 1991). Ці методи полягають в ампліфікації випадкових повторюваних сайтів геному із застосуванням коротких праймерів довжиною, як правило, 8–12 нуклеотидів (нт). Для них є характерною швидкість і простота проведення реакції, а для конструювання праймерів не потрібна інформація про геномну послідовність. Проте проблеми відтворюваності, зумовлені присутністю великої кількості потенційних сайтів зв'язування у геномі і низькою температурою гібридизації праймерів, призводять до того, що цей метод застосовується все рідше.

Арсенал молекулярних методів аналізу розширило сиквенування ДНК, особливо аналіз послідовностей мітохондрійних геномів. Потім стали широко застосовувати гіперваріабельні генетичні маркери, такі як мікросателіти, а також аналіз поліморфізму довжини ампліфікованих фрагментів (AFLP — amplified fragments length polymorphism). Поліморфізми можуть бути виявлені як у ядерному геномі, так і у ДНК органел — мітохондрій і хлоропластів.

Кожен із методів молекулярно-генетичного аналізу має як переваги, так і недоліки. Наприклад, результати секвенування мітохондріального геному отримати порівняно легко, проте вони описують лише одну нерекombінуючу молекулу і, внаслідок специфічного успадкування, виявляють особливості еволюції лише материнської генеалогічної лінії. Мікросателіти дуже варіабельні й ефективні для вивчення генетичної структури популяції, проте створення мікросателітної бібліотеки трудомістке, а отримані локуси можливо використовувати лише для одного таксону.

Результати активного вивчення будови та механізмів функціонування рухомих елементів, зокрема ретротранспозонів, впродовж останнього десятиріччя дозволили створити на їх основі новий набір молекулярно-генетичних маркерів як ще один ефективний інструмент молекулярної філогенетики і молекулярної екології, у тому числі для вивчення структури популяцій, збереження генофонду (conservation genetics), генетики видоутворення, філогеографії, реконструювання філогенії тощо (Deragon, Zhang, 2006; Todorovska, 2007; Ray, 2007; Kalendar, 2011).

Широке розповсюдження в рослинних геномах і, особливо, своєрідність структури і реплікації надають ретротранспозонам як ДНК-маркерам такі переваги:

- вони містять довгі, визначені, консервативні послідовності, які можуть бути застосовані при створенні праймерів для вивчення фланкуючих послідовностей;
- реплікаційно активні представники родини ретротранспозонів продукують нові інсерції в геномі, що приводить до подальшого зростання поліморфізму. Нові інсерції можуть бути виявлені і використані для того, щоб простежити за інсерційними процесами в генеалогічній лінії, допомагаючи тим самим встановити філогенію.

Переміщення ретротранспозонів за допомогою РНК приводить до утворення стабільно вбу-

дованих у геном хазяїна дочірніх копій МГЕ, які сегрегують як менделівські локуси. Слід очікувати, що маркери на основі ретротранспозонів будуть кодомінантними. З іншого боку, ретротранспозони в принципі можуть інтегруватися в геном хазяїна в будь-якій орієнтації, що приводить до появи різних комбінацій — будь-які два представники родини ретротранспозонів можливо виявити в різних орієнтаціях: голова до голови, хвіст до хвоста чи голова до хвоста. Це може збільшувати кількість виявлених поліморфізмів залежно від застосованого методу і комбінацій праймерів. Отже, завдяки реплікативному способу транспозиції ретротранспозони набувають значних переваг як засіб для аналізу рослинних геномів, а саме:

- видоспецифічні МГЕ слугують генетичним інструментом для розробки ДНК-маркерів, розподілених по всьому геному;
- мобільні елементи представлені великою кількістю копій;
- вони рівномірно розподілені у геномі як у гетеро-, так і в евхроматинових ділянках;
- для МГЕ властивим є поліморфізм сайтів інсерції на між- та внутрішньовидовому рівнях.

Ці властивості надали можливість розробити на основі МГЕ низку молекулярних маркерів, таких як S-SAP, IRAP, REMAP, RBIP тощо (Kalendar et al., 1999; Kumar, Hirochika, 2001; Schulman et al., 2004; Сиволап и др., 2011; Kalendar, 2011). Ці молекулярні маркери успішно використовують за вивчення філогенетичних взаємовідносин, біорізноманіття і для складання карт зчеплення агрономічно важливих ознак у різних видів, таких як ячмінь, горох, рис, тютюн та ін. (Schulman et al., 2004). Дуже цінними є геном-специфічні молекулярні маркери, що ґрунтуються на послідовностях ISBP (insertion site-based polymorphism), які для ампліфікації ПЛР-фрагментів використовують інформацію про послідовності, що облямовують (фланкують) МГЕ. Цей тип маркерів успішно використовують, наприклад, для картування хромосом пшениці (Paux et al., 2010).

23.1. Типи ДНК-маркерів і їх застосування у молекулярно-генетичному аналізі

Однією з центральних тем у генетиці є аналіз генетичного різноманіття і вивчення ступеня спорідненості різних організмів, популяцій,

видів. Молекулярна маркерна технологія, що ґрунтується на поліморфізмі макромолекул, розпочалася у 60-х роках минулого століття з аналі-

зу запасних білків насіння та ізозимів (Созинов, 1985). Ці маркери були доповнені, а потім поступово майже витіснені методами ДНК-аналізу, що ґрунтуються на отриманні фінгерпринтів

23.1.1. ПДРФ-маркери

Аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ) був одним з перших методів виявлення між- і внутрішньовидової мінливості на рівні послідовності ДНК. Сутність ПДРФ полягає у зіставленні наборів смуг на електрофореграмах молекул ДНК різних особин після розщеплення ферментами рестрикції. Різні мутаційні події можуть по-різному впливати на молекули ДНК і зумовлюють утворення різних за довжиною фрагментів. Відмінності між генотипами звичайно візуалізуються як різнотипні набори фрагментів ДНК.

Перевагами ПДРФ-маркерів є:

- відтворюваність у різних лабораторіях;
- кодомінантне успадкування;
- відсутність потреби у знанні нуклеотидної послідовності;
- специфічність для локусів;

23.1.2. ПЛР-маркери

На сьогодні найширше застосування у роботі великої кількості різних методів аналізу геномів знайшла ПЛР — полімеразна ланцюгова реакція (англ. polymerase chain reaction — PCR). Із розробкою ПЛР застосування молекулярних маркерів значно розширилося. Вони знайшли своє застосування у різних напрямках дослі-

23.1.2.1. ПЛР із довільними праймерами

Категорію маркерів, що ґрунтуються на ПЛР з використанням довільних праймерів, складають три основних методи:

- довільно ампліфікованої поліморфної ДНК (randomly amplified polymorphic DNA — RAPD), введений у практику наприкінці 80-х років минулого століття (Williams et al., 1990);
- «відбитків пальців» на основі аналізу ампліфікованої ДНК (DNA amplification fingerprinting — DAF) (Caetano-Annoles et al., 1991);
- ПЛР з довільними праймерами (arbitrarily primed polymerase chain reaction — AP-PCR).

(«відбитків пальців»), тобто характерних наборів смуг фрагментів ДНК на електрофореграмах (Weissing, 2005; Сиволап и др., 2011).

- висока розпізнавальна здатність як на рівні видів та/або популяцій (однолокусні проби), так і на рівні особин (мультилокусні проби).

Проте існують і деякі особливості ПДРФ, які утруднюють широке застосування цієї технології. Ю. Сиволап та ін. (2011) серед них називають такі:

- потреба у порівняно великій кількості високоочищеної ДНК;
- неможливість автоматизації;
- низький рівень поліморфізму у деяких видів;
- потреба у бібліотеці відповідних проб;
- великі витрати часу, особливо за однокопійних проб;
- дорога методика;
- необхідність розповсюдження проб між лабораторіями, що співробітничать;
- помірні вимоги щодо устаткування;
- потреба у різних комбінаціях проб/ферментів.

джень з генетики, молекулярної та популяційної генетики, філогенетики, молекулярної екології, у селекції, насінництві, захисті авторських прав селекціонерів тощо.

Розглянемо детальніше деякі найпопулярніші різновиди ПЛР-аналізу.

У перших експериментах з використання ПЛР застосовували спрямовані праймери, комплементарні до ділянок, що облямовують певний сегмент ДНК. Для створення праймерів, які забезпечать копіювання фрагмента ДНК, необхідно мати інформацію про послідовність нуклеотидів матриці. Тому в 1990-х рр. застосування ПЛР-аналізу обмежувалося молекулярно-генетично вивченими об'єктами. Пізніше було розроблено технологію ПЛР з праймерами довільної («випадкової») структури, при цьому у дизайні послідовностей праймерів враховують ГЦ-склад і особливості структури геномів організмів, які

аналізують. Тому структура праймерів довільна, але зовсім не випадкова. Оскільки довільний праймер і матриця не повністю комплементарні, то температура є дещо нижчою тієї, яка потрібна для ідеальної гібридизації у реакції ПЛР. Було запропоновано використовувати відносно короткі 10-нуклеотидні праймери, і цей варіант отримав назву RAPD-аналізу (randomly amplified polymorphic DNA) — аналізу довільно ампліфікованої поліморфної ДНК (Williams et al., 1990).

Універсальність методу RAPD-аналізу дозволяє виявляти молекулярно-генетичний поліморфізм зразків ДНК людини, тварин, рослин і бактерій. Як простий і відносно дешевий метод, він став одним із найпопулярніших у дослідженні генетичного поліморфізму. Проте одним із його недоліків є недостатній рівень відтворюваності результатів у різних лабораторіях. За умов недостатньо суворого контролю реакції за використання різних приладів (термоциклерів) електрофоретичний профіль ампліфікованих фрагментів ДНК може дещо відрізнятись. Проте результати, отримані в одних і тих самих умовах, є відтворюваними і достовірними.

За порівняльних аналізів важливим є те, що метод RAPD-аналізу охоплює практично всі фракції геному (див.: Сиволап и др., 2011).

23.1.2.2. Метод AFLP (amplified fragment length polymorphism)

Метод AFLP (amplified fragment length polymorphism) — поліморфізм довжини ампліфікованих фрагментів — це високочутливий і досить швидкий метод виявлення поліморфізму ДНК, зумовленого змінами у сайтах рестрикції або в сусідніх з ними ділянках. Метод розроблено в 1995 р., і з тих пір його широко застосовують (Vos et al., 1995). Він придатний для аналізу генетичної мінливості будь-яких організмів за відсутності знань про нуклеотидну послідовність їхнього геному, проте порівняно трудомісткий і чутливий до будь-яких забруднень.

* * *

Наразі для аналізу генетичного поліморфізму за допомогою ПЛР частіше використовують

23.1.2.3. ПЛР із локус-специфічними праймерами

Перевагами методу ПЛР з використанням праймерів SSR (simple sequence repeats) є надійність, локус-специфічність, високий полімор-

ффізм, добра відтворюваність, кодомінантність, мультиалельний тип мінливості, широке геномне покриття і можливість за допомогою мікроса-

- розроблено метод, який дозволяє перетворити складний в інтерпретації та/або відтворюваності RAPD-фрагмент у надійний маркер SCAR — ампліфіковану ділянку з охарактеризованою нуклеотидною послідовністю. Основні етапи отримання цього маркера такі:
- із гелю з розділеними RAPD-фрагментами вирізають потенційно цікаву смугу;
- вибраний ДНК-фрагмент клонують у векторі і визначають його нуклеотидну послідовність;
- для даного фрагмента ДНК конструюють специфічні праймери довжиною, як правило, 16–24 нт;
- проводять повторну ампліфікацію матричної ДНК з новими праймерами.

У результаті отримують новий і простіший для інтерпретації набір ПЛР-продуктів.

Оскільки праймери для SCAR-маркерів є довшими за праймери, що зазвичай використовують у RAPD-аналізі, вони, як правило, дають краще відтворювані набори ПЛР-продуктів. SCAR-маркери зазвичай є кодомінантними, проте не в тих випадках, коли праймери перекривають ділянку зміненої послідовності ДНК, яку досліджують.

мікросателіти — тандемні повтори коротких мотивів ДНК. Спочатку застосовували метод дослідження послідовностей ДНК між простими мікросателітними повторами (ISSR — inter-simple sequence repeats) (Zietkiewitz et al., 1989, 1994), що був поступово доповнений надійнішим, локус-специфічним методом дослідження простих повторюваних послідовностей ДНК (SSR — simple sequence repeats) (Morgante, Olivieri, 1993).

Значними недоліками AFLP, RAPD та ISSR є те, що за цих методів використовують неспецифічні праймери, тобто праймери, які продукують багатолокусні спектри (multilocus banding patterns) домінантно успадковуваних маркерів.

фізм, добра відтворюваність, кодомінантність, мультиалельний тип мінливості, широке геномне покриття і можливість за допомогою мікроса-

телітного аналізу картувати геном (Morgante, Olivieri, 1993; Becher et al., 2000). Остання можливість є важливою для картування геномної ділянки, що містить цільові локуси.

Проте розробка SSR-маркерної системи для нових видів організмів є досить витратною, оскільки для цього потрібна інформація про нуклеотидну послідовність специфічних ділянок геному (сиквенс-інформація), а також результати випробування численних SSR-локусів. Якщо першочерговими є швидкість і простота, то потрібно обирати мультилокусні методи, наприклад, такі як AFLP.

На сьогодні для багатьох видів отримано інформацію про нуклеотидну послідовність, виділено численні повторювані мотиви, що формують мікросателіти, і це дозволило отримати локус-специфічні і надійні SSR, які почали широко застосовувати як маркери, у тому числі для ідентифікації сортів сільськогосподарських культур.

Мікросателіти зазвичай використовують для геномного картування, оцінки генетично-

го різноманіття, маркування генів і маркер-асоційованої селекції (MAS — marker assisted selection) (McCouch et al., 1997). Тому робоча група UPOV з біохімічних і молекулярних методів визначила SSR-маркери як найбільш адекватну і широко використовувану маркерну систему для дослідження рослинного різноманіття (UPOV, 2002).

Досить детально особливості розглянутих вище й інших варіантів методу ПЛР-аналізу викладено у книзі (Сиволап і др., 2011).

Упродовж останніх років було створено ще одну маркерну систему, що ґрунтується на використанні іншого класу дуже численних послідовностей — ретротранспозонів. Розповсюдженість і активна роль у створенні геномного різноманіття шляхом інтеграції стабільних фрагментів ДНК у різні хромосомні локуси робить ці мобільні елементи надзвичайно зручними для використання як молекулярних маркерів (див.: Kazazian, 2004; Deragon, Zhang, 2006; Ray, 2007; Todorovska, 2007; Kalendar, 2011).

23.1.3. Ретротранспозони як молекулярні маркери

Відомо, що, на відміну від ДНК-транспозонів, ретротранспозони розповсюджуються у геномі не шляхом вирізання з наступною вставкою, а транскрибуються і шляхом зворотної транскрипції вставляються в ДНК як копії материнського елемента. Саме елементи інсерційного сайту ретротранспозонів наразі вважаються найінформативнішими маркерами для філогенетичних і генеалогічних досліджень.

Розроблені на основі ретротранспозонів методи молекулярного маркування ґрунтуються на тому, що внаслідок інтеграції ретротранспозона в геномну ДНК між ними формується стик.

23.1.3.1. Методи S-SAP/TD

Метод поліморфізму довжини ампліфікованих фрагментів (AFLP), розроблений у середині 1990-х років, є методом анонімних маркерів. Він виявляє сайти рестрикції, ампліфікуючи частину всіх сайтів для даної ферментної пари в геномі між зшитими адаптерами (Vos et al., 1995). Метод вивчення поліморфізму ампліфікованих специфічних повторів ДНК або S-SAP (sequence-specific amplified polymorphism) був вперше описаний як модифікований метод AFLP

Ці стики (послідовності) можуть бути виявлені за допомогою ПЛР-ампліфікації за використання праймера, що відповідає ретротранспозону, і праймера, що відповідає сусідньому мотиву в геномі (Schulman et al., 2004). Цей метод аналізу поліморфізму ампліфікованих специфічних повторів ДНК (S-SAP — sequence-specific amplified polymorphism) дозволяє ідентифікувати домінантні маркери для визначення мінливості фланкуючої ДНК інсерційного сайту транспозона. Він походить від методу AFLP і є, по суті, його варіантом, об'єднуючи у собі загальний принцип AFLP із сиквенс-специфічною ПЛР.

з використанням ретроелемента *BARE-1* (Vaughn et al., 1997). Метод S-SAP характеризується вищим рівнем поліморфізму порівняно з AFLP. Зазвичай праймери конструюють до ділянки LTR, але вони можуть бути також гомологічними до внутрішньої частини мобільного елемента, як, наприклад, у разі поліпуринового тракту (PPT), який у ретротранспозонах міститься з внутрішнього боку відносно 3'-LTR (рис. 23.1, 23.2, а). Неселективні праймери використовують, якщо

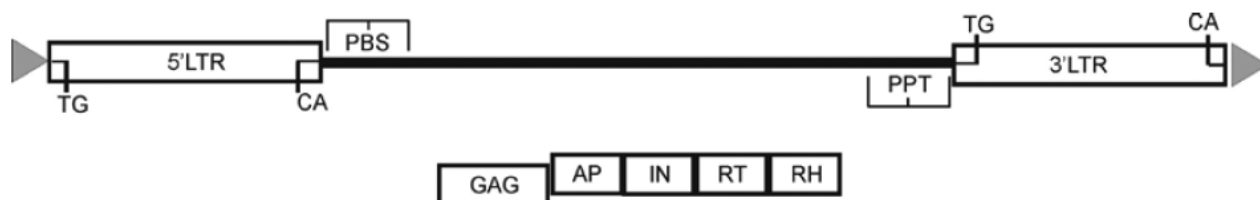


Рис. 23.1. Організація LTR-вмісного ретротранспозона

Ретротранспозон обмежений довгими кінцевими повторами (LTRs), які містять транскрипційний промотор і термінатор. LTRs містять короткі інвертовані повтори на кожному кінці, показані як сірі трикутники. Зворотна транскрипція ініціюється у PBS та PPT доменах, відповідно для (–) та (+) ланцюгів кДНК. Внутрішня ділянка ретротранспозона кодує білки, необхідні для його життєвого циклу: капсидний білок (GAG), аспартатпротеїназу (AP), що розщеплює поліпротеїн; інтегразу (IN), яка вставляє копію у геном, зворотну транскриптазу (RT), РНКазу Н (RH), які разом копіюють транскрипт у кДНК. Внутрішня ділянка містить еволюційно консервативні домени (позначені нижче елемента як чорні прямокутники), необхідні для функції, що може бути застосована для виділення ретротранспозонів із ще не вивчених видів рослин. ДКП (LTRs) зазвичай дуже консервативні в межах родин і можуть слугувати для конструювання праймерів (за: Kalendar, 2011)

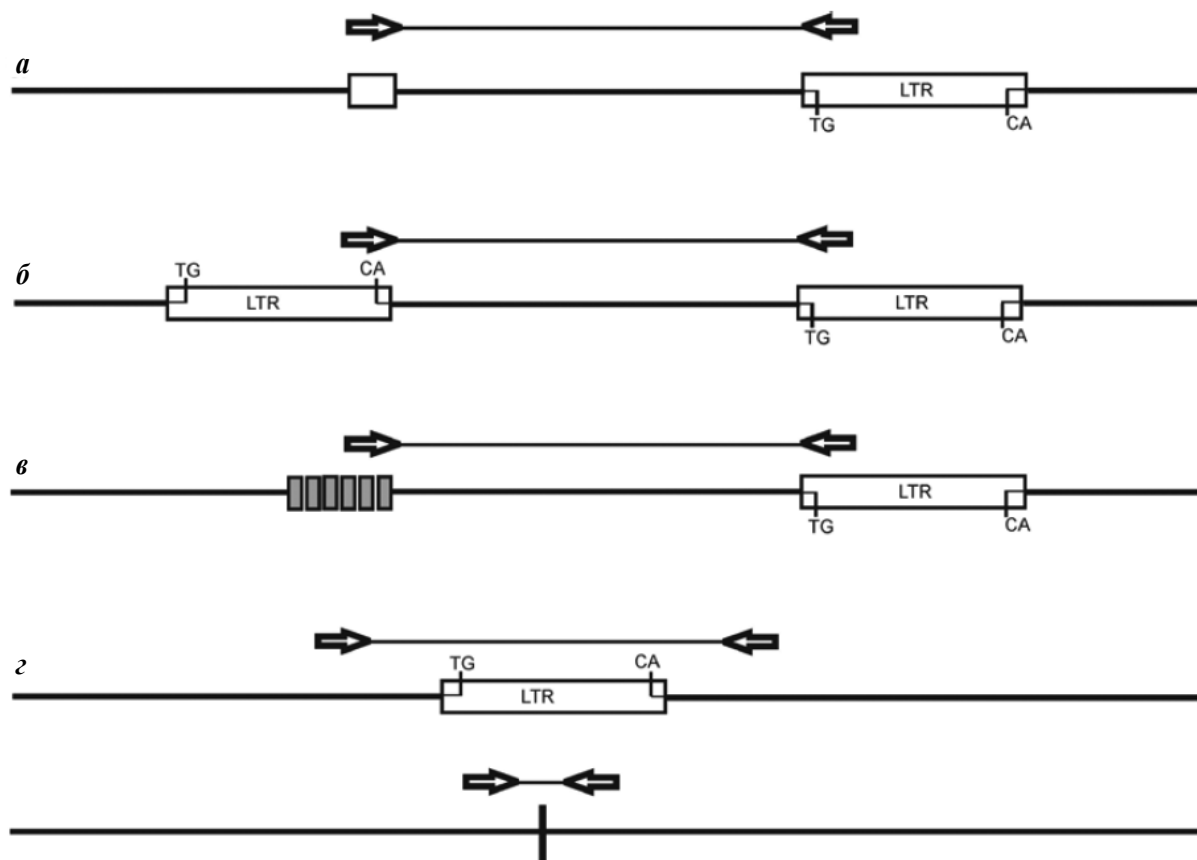


Рис. 23.2. Основні методи застосування молекулярних маркерів, створених на основі ретротранспозонів

Мультиплексні продукти різної довжини з різних локусів показані у вигляді ліній, розташованих вище чи нижче діаграм кожної реакції, а праймери вказані стрілками:

a — метод S-SAP. Для ампліфікації використовують праймери, які відповідають послідовностям адаптера (менший прямокутник) і ретротранспозона (більший прямокутник, що містить LTR); **б** — метод IRAP. Для ампліфікації використовують праймери, що відповідають послідовності між ретротранспозонами (лівий і правий прямокутники із LTR), які розташовані у геномі неподалік один від одного; **в** — метод REMAP. Застосовують праймер, закорнений до проксимального боку мікросателітного домену (вертикальні прямокутники) і ретротранспозона, ампліфікується ділянка, розташована між мікросателітним доменом (вертикальні прямокутники) і ретротранспозоном; **з** — метод RBIP. Альтернативна реакція між праймерами для лівого і правого флангів у заповненому сайті інгібується протяжністю ретротранспозона. Фланкувальні праймери здатні ампліфікувати порожній сайт, показаний у вигляді вертикальної риски внизу діаграми (за: Kalendar, 2011)

ферменти, застосовувані для розщеплення ДНК, мають довшу послідовність розпізнавання або коли число копій МГЕ є невеликим. Для висококопійних родин МГЕ кількість селективних нуклеотидів (довжина сайту розпізнавання) може бути збільшена.

У роботі (Kalendar, 2011) наведено дані про те, що у огірка *Cucumis sativus* маркерна система S-SAP на основі трьох послідовностей довгого кінцевого повтору (LTR) ретротранспозонів *Ty1-copia* мала вищий рівень поліморфізму, ніж AFLP. Вивчення S-SAP-вставок восьми родин ретротранспозонів у 10 видів винограду роду *Vitis* показало, що ці родини ретротранспозонів властиві для всього роду *Vitis*. Більшість із проаналізованих електрофоретичних смуг були поліморфними, засвідчуючи, що ці родини МГЕ були активними у винограду і після видоутворення (Moisy et al., 2008).

Метод S-SAP застосовують, головним чином, для аналізу розподілу і структури популяцій ретроелементів в організмі. Він був використаний з цією метою для аналізу вівса, люцерни *Medicago sativa*, ячменю, м'якої пшениці *Triticum aestivum* і її диких родичів, різних видів егілопса *Aegilops*, солодкокого батату, банана *Musa*, Луїзіанських ірисів, бавовнику, винограду, арахісу, гороху, артишоку, латуку та ін. S-SAP також ви-

користано для встановлення філогенезу кукурудзи, пшениці, тютюну (посилання див.: Kalendar, 2011). Цей метод оптимізовано для багатьох видів рослин і розроблено порівняно прості протоколи для швидкого отримання інформації про послідовності ретротранспозонів для конструювання S-SAP-праймерів (Syed, Flavell, 2007).

Розроблено варіант цього методу, коли в його основі лежить використання ДНК-транспозонів, т. зв. «транспозон-дисплей» (Transposon Display — TD). Наприклад, застосування Rim2/Hipa-TD дало високополіморфні профілі з гарною відтворюваністю як у межах виду, так і між видами роду *Oryza* (Shcherban et al., 2000; Kwon et al., 2005).

Як відзначає Р. Календар, зазвичай S-SAP має вищий рівень поліморфізму, більшу кодомінантність і ширше розповсюдження по хромосомах, ніж AFLP (Kalendar, 2011). Але S-SAP потребує рестрикційного перетравлювання геномної ДНК для отримання сайтів для зшивання з адаптером, як і в разі застосування методу AFLP. Чутливість до метилювання ДНК застосовуваних рестрикційних ферментів може дати помилкові результати генотипування. До того ж, метод S-SAP потребує радіоактивного або флюоресцентного мічення праймерів чи продуктів ампліфікації. Цих недоліків позбавлений метод IRAP.

23.1.3.2. Методи IRAP/REMAP

У рослин при застосуванні таких методів ПЛР, як метод поліморфізму ампліфікованих ділянок ДНК між двома сусідніми ретротранспозонами (inter-retrotransposon amplified polymorphism — IRAP) (рис. 23.2, б), поліморфізму ампліфікованих інсерційних сайтів між ретротранспозонами і мікросателітами (retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism — REMAP) (рис. 23.2, в) або inter-MITE застосовують розпорошені по геному численні повтори, такі як LTR-вмісні ретротранспозони і SINE-подібні послідовності. Використання цих послідовностей дає можливість ампліфікувати специфічний набір електрофоретичних смуг («відбитків пальців») ДНК із застосуванням праймерів, гомологічних до багатокопійних повторів. Створені на їх основі генетичні маркери є досить інформативними.

Метод IRAP дозволяє аналізувати поліморфізм міжретротранспозонних вставок (рис. 23.2, б)

(Kalendar et al., 1999). Використовують один чи два праймери, що направлені назовні від LTR, а тому ампліфікується ділянка ДНК між двома сусідніми ретротранспозонами. Два праймери можуть бути як від однієї і тієї ж родини ретротранспозонів, так і від різних родин. Продукти ПЛР є результатом ампліфікації від сотень до тисяч цільових сайтів у геномі, завдяки чому електрофореграми дуже насичені. Ретротранспозони, як правило, мають тенденцію скупчуватися у протяжних ділянках повторюваної ДНК («морях повторів»), що оточують «острівці генів» і можуть навіть гніздитись один в одному. Тому отримана картина буде відображати число копій МГЕ, характер вставки і розмір родини МГЕ.

Метод REMAP подібний до IRAP, але тут один із двох праймерів гомологічний до мікросателітного мотиву (рис. 23.2, в) (Kalendar et al.,

1999). Виявлені в усіх геномах мікросателіти, очевидно, пов'язані з ретротранспозонами і мають високий темп мутацій внаслідок «проковзування» полімерази. Тому окремі мікросателітні локуси характеризуються значною мінливістю у межах виду. За методу REMAP на 3'-кінці SSR-праймера розташовують якірні нуклеотиди, щоб уникнути його «ковзання» в межах SSR, а також виключити вплив на набір ПЛР-продуктів мінливості за кількістю повторів у межах мікросателіта.

Таким чином, IRAP та REMAP — це методи, що ґрунтуються на використанні праймерів, гомологічних до послідовностей ретротранспозонів і не потребують рестрикційного розщеплення ДНК. IRAP та REMAP застосовують для вивчення поліморфізму ретротранспозонних інсерційних сайтів: IRAP — ділянок між самими ретротранспозонами, а REMAP — між ретротранспозонами і мікросателітами (SSRs). Обидва методи застосовують праймери, направлені назовні від термінальних повторів ретротранспозона. Праймери конструюють так, щоб вони були комплементарними до значущого для експресії промотору (і сигналів процесингу) та сайту інтеграції LTR-послідовностей ретротранспозонів, які зазвичай є дуже консервативними. Можливо також використовувати праймери, комплементарні до дуже консервативних мінуса плюс-ланцюгів гена зворотної транскриптази.

Розглянуті методи є надійними, особливо враховуючи можливість утворення соло-LTRs (соло-LTR — одиничний довгий кінцевий повтор, який залишається в одиничному LTR-вмістному ретротранспозоні після нерівної внутрішньо-ланцюгової рекомбінації між двома ДКП (LTRs)). Хоча LTR-LTR рекомбінація може делетувати внутрішню ділянку елемента, наявність решти послідовності соло-LTR залишає можливість використання маркерних систем на основі LTRs. Це зумовлено тим, що рекомбінація не призводить до втрати сайту гібридизації, який для праймерів, застосовуваних за аналізу поліморфізму, розташований зазвичай поблизу зовнішнього краю LTR. До того ж, сконцетровані інсерції одного ретротранспозона в інший і наступні делеції в межах таких гнізд не позначаються на продуктах, отриманих з LTR вихідного елемента, оскільки ці процеси будуть «позаду»

чи з 5'-боку відносно розташування праймера (Schulman, Kalendar, 2005). Розроблено також нові ретротранспозонні маркерні системи, такі як RBIP (Retrotransposons-Based Insertion Polymorphisms) (рис. 23.2, з) та ТАМ (Tagged Microarray Marker), які реєструють наявність чи відсутність окремих інсерцій на основі специфічної ампліфікації ділянки між фланкуючими послідовностями (Flavel et al., 2003). Порівняно з методами S-SAP, IRAP та REMAP, які є мультиплексними і генерують анонімні маркерні смуги, RBIP дозволяє аналізувати наявність інсерції ретротранспозонів в окремі локуси.

Наприклад, у гороху *Pisum sativum* виявлено великий масив різних транспозонів. Особливу увагу за аналізу було приділено елементові *PDR-1* — представникові класу *Ty1-copia*. Цей малокопійний елемент було успішно використано у численних роботах з філогенії гороху. Індивідуальні інсерційні локуси *PDR-1* сиквеновано, деякі з них позиційно картовано і перетворено на високоефективні RBIP-маркери (Flavell et al., 2003; Jing et al., 2005). Однак подібне застосування потребує багатьох ПЛР-аналізів, щоб отримати достатньо необхідної інформації.

Проведено дослідження ще на одній групі ретротранспозонів — *Ty3-gypsy*, яких набагато більше, вони представлені тисячами копій і складають до 10–30 % геному гороху. Було досліджено такі ретротранспозони, як *Ogre*, *Cyclop*, *Pigy*, *PisTR-A* та мініатюрний інвертовано-повторюваний мобільний генетичний елемент MITE для використання в IRAP для швидкого і ефективного фінгерпринтингу генотипів гороху (Smykal, 2006).

Встановлено, що найефективнішим є IRAP з праймерами до ретротранспозонів *Cyclop* і *Ogre*, а використання інших елементів як в IRAP, так і в більш вимогливому форматі S-SAP ще потребує поліпшення методики. Певного поліпшення можна досягти, маніпулюючи з положенням LTR-праймерів, а практичний інтерес може представляти застосування інтер-MITE IRAP, оскільки підбір відповідного праймера біля чи в межах генів робить їх хорошим знаряддям маркер-асоційованої селекції (Chang et al., 2001).

Метод IRAP успішно застосовано для вивчення біорізноманіття і філогенії рослин —

представників родів *Brassica*, *Spartina* та ін. (Baumel et al., 2002). Метод виявився зручним для вивчення геномної еволюції трав (Kalendar et al., 2000; Vicient et al., 2001) і за генного картування ячменю (Mannien et al., 2000), пшениці (Boyko et al., 2002), вівса, пирикуляріозу рису (*Magnaporthe grisea* sp.), а також для фінгерпринтингу клонів яблуні (Venturi et al., 2006), сортів цитрусів (Breto et al., 2001), у низці інших досліджень, зокрема за визначення структури популяцій, модифікацій хроматину й епігенетич-

ного перепрограмування, подібності і походження, маркер-асоційованої селекції (MAS) у ячменю, банана, винограду, гороху, яблуні, егілопсів, пшениць, льону, соняшнику, низки лікарських рослин — *Adonis vernalis*, *Paeonia anomala*, *Adenophora lilifolia*, *Digitalis grandiflora* тощо. REMAP також показав себе як чутливий метод для виявлення геномних копій транспозонів серед ретротранспозонних кДНК, для вивчення геномної еволюції у дикого ячменю тощо (подробиці і посилання див.: Kalendar, 2011).

23.1.3.3. Методи RBIP/TAM

Ретротранспозон-обумовлений інсерційний поліморфізм (retrotransposons-based insertion polymorphism — RBIP) — це спосіб простого виявлення наявності чи відсутності вставок ретротранспозонів на основі специфічної ампліфікації ділянок між праймерами, що фланкують інсерційний сайт, і праймерами до самої вставки (див. рис. 23.2, з). Метод RBIP є локус-специфічною, високоефективною кодомінантною маркерною системою, яку було розроблено шляхом заміни гел-електрофорезу гібридизацією на фільтрі й успішно використано для молекулярно-генетичного аналізу (Flavell et al., 1998, 2003; Pierce et al., 2000; Schulman et al., 2004; Jing et al., 2005; Venturi et al., 2006).

ПЛР-реакції, що виявляють зайняті і не зайняті мобільними елементами ділянки геному, проводять разом, продукти наносять на мембрани і детектують за допомогою локус-специфічного зонда. Використання чутливої гібридизації з нанесеними ПЛР-продуктами — методу мічених мікроерей-маркерів (tagged microarray marker — TAM) — дозволило застосовувати дот-блотинг до мікроерей, що підвищило ефективність збору даних (Flavell et al., 2003). Використовуючи три праймери, за допомогою RBIP можливо виявляти наявність і відсутність вставок МГЕ і створювати однолокусні кодомінантні маркери. У разі використання ретротранспозона, праймер, сконструйований до LTR, використовують разом із праймером, створеним до фланкуючої

ділянки, і вони обидва дозволяють ампліфікацію інсерційного сайту, в той час як праймери, специфічні для 5'- та 3'-фланкуючих ділянок, застосовують для підрахунку відповідних «порожніх» (англ. — empty) сайтів. Вставки МГЕ зазвичай великі, це тисячі нуклеотидів, тому праймери порожніх сайтів не генерують ампліконів. Отже, RBIP виявляє наявність чи відсутність інсерції, але потребує знань послідовностей 5'- та 3'-фланкуючих ділянок. RBIP-аналіз був використаний, зокрема, за вивчення еволюційної історії гороху, рису тощо (див.: Kalendar, 2011).

Метод мічених мікроерей-маркерів (TAM) є методом, розробленим на основі методу RBIP з використанням мікроерей, що дозволяє аналізувати тисячі ДНК з використанням кодомінантного молекулярного маркера в мікроерей на предметному склі. RBIP також добре працює за використання маркерів одно-нуклеотидного поліморфізму (single nucleotide polymorphism — SNP) (Flavell et al., 2003; Jing et al., 2007). За цього підходу біотин-мічені алель-специфічні продукти ПЛР наносять на покриті стрептавідином предметне скло і візуалізують шляхом гібридизації флюоресцентного детектора олігонуклеотидів із мітками, прикріпленими до алель-специфічних ПЛР-праймерів. Використовують два мічених праймерних олігонуклеотиди на локус, і кожна мітка виявляється шляхом гібридизації, формуючи конкатемерний ДНК-зонд, мічений численними копіями флюорохрому.

23.1.3.4. Метод iPBS

Основний недолік усіх методів аналізу з використанням молекулярних маркерів на основі ретротранспозонів — це потреба у даних

сиквенування для конструювання специфічних до МГЕ праймерів. Хоча і розроблено методи швидкої ізоляції ретротранспозонів на основі

ПЛР із консервативним праймером для МГЕ, все ще доводиться клонувати і секвенувати сотні клонів для отримання кількох хороших праймерних послідовностей, бо LTR не містять консервативних мотивів, які б дозволили їх пряму ампліфікацію за допомогою ПЛР.

Є кілька методів з використанням рестрикції і адаптерів для клонування LTR, що ґрунтуються на консервативності зворотно-транскриптазного домену, особливо для МГЕ типу *Ty1-copia*. Більшість ретроелементів входять до Pseudoviridae (*Ty1-copia*), Metaviridae (*Ty3-gypsy*) і Retroposineae *LINE* (LTR-невмісні) груп. Усі зворотно-транскрибуючі мобільні елементи можуть бути ізолювані шляхом ПЛР із виродженими праймерами. Метод виділення зворотної транскриптази обмежений родинами ретротранспозонів, які містять цю послідовність. Так, наприклад, цей метод не дозволяє виділити TRIM чи LARDs і ще невідомі класи LTR-вмісних ретротранспозонів (Kalendar et al., 2008; Witte et al., 2001).

LTR-вмісні ретротранспозони і всі ретровіруси містять консервативний праймер-зв'язувальний сайт (PBS) тРНК для $tRNA^{Met}$, $tRNA^{Lys}$, $tRNA^{Pro}$, $tRNA^{Trp}$, $tRNA^{Asn}$, $tRNA^{Ser}$, $tRNA^{Arg}$, $tRNA^{Phe}$, $tRNA^{Leu}$ та $tRNA^{Gln}$. Елонгація від 3'-кінцевих нуклеотидів відповідної тРНК приводить до перетворення вірусного/ретротранспозонного РНК-вмісного геному на дволанцюгову ДНК і до її інтеграції у ДНК хазяїна. Процес зворотної транскрипції є консервативним у всіх ре-

тровірусів, проте специфічне захоплення тРНК є властивим не для всіх ретровірусів і ретроелементів. Послідовності LTR-вмісних ретротранспозонів завжди містять праймер-зв'язувальні ділянки (PBS). Отже, метод виділення LTR-вмісних ретротранспозонів, який ґрунтується на PBS-послідовності, дозволяє клонувати усі можливі LTR-ретротранспозони.

Нещодавно розроблено універсальний і ефективний метод генетичного аналізу iPBS (inter primer binding site), за якого використовують консервативні частини PBS-послідовностей як для прямої візуалізації поліморфізму організмів і поліморфізму транскрипційних профілей, так і для швидкого клонування ділянок LTR, виділених із геномної ДНК, або пошуку МГЕ *in silico* у базах даних (Kalendar et al., 2010). У такий спосіб можливо досліджувати будь-який еукаріотний організм, що містить LTR-вмісні ретротранспозони. Праймери, гомологічні до консервативних ділянок праймер-зв'язувальних послідовностей LTR-вмісних ретротранспозонів, виявилися дуже ефективними за ПЛР-ампліфікації геномної ДНК еукаріотів. Одиначні PBS-праймери можуть ампліфікувати лише «вкладені» (nested), розташовані один біля одного інвертовані ретротранспозони або споріднені з мобільними елементами послідовності, розпорошені по всій геномній ДНК. ПЛР-ампліфікація відбувається між двома вкладеними PBS і містить дві LTR-послідовності (рис. 23.3).

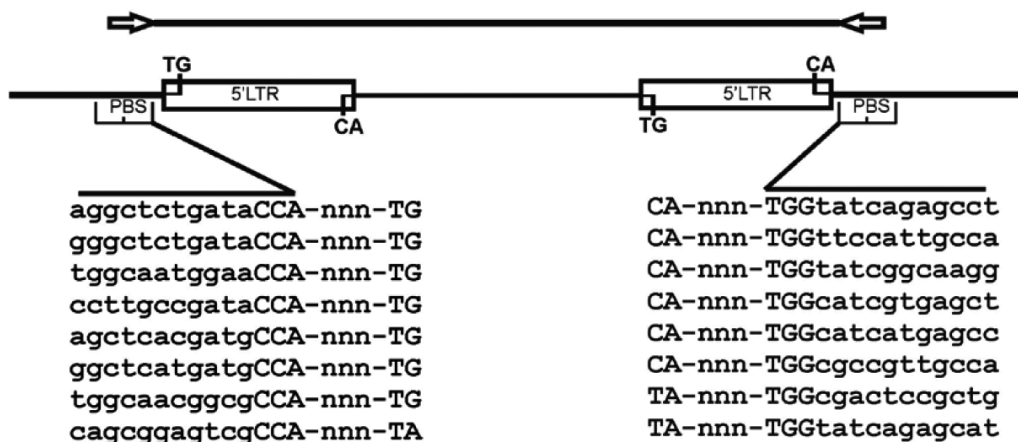


Рис. 23.3. Схема методу ампліфікації iPBS і структура LTR-вмісного ретротранспозона

Два LTR-вмісних ретротранспозони, вставлені в інвертованих орієнтаціях, ампліфікуються за допомогою одного праймера чи двох різних праймерів до сайтів зв'язування праймера (PBS). Продукти ПЛР містять на кінцях послідовності LTR та PBS. На рисунку схематично показано загальну структуру послідовностей PBS і LTR і кілька нуклеотидів довгих спейсерів між 5'-LTR (5'-.CA) та PBS (5'-TG..3') (за: Kalendar, 2011)

Більшість ретротранспозонів у складі хромосомних послідовностей є «вкладеними», змішаними, інвертованими чи усіченими, і їх можливо легко ампліфікувати із застосуванням консервативних PBS-праймерів у будь-якого виду рослин. Фрагменти LTR з внутрішніми частинами ретротранспозонів локалізуються поблизу інших ретротранспозонів. Тому PBS-послідовності дуже часто містяться одна поблизу одної. Це дозволяє використовувати PBS-послідовності для клонування LTR.

Після визначення у певної родини ретротранспозонів послідовностей їхніх LTR проводять їх аналіз з тим, щоб знайти в них най-

консервативнішу ділянку. У подальшому ці консервативні частини ділянок LTR використовують для конструювання інвертованих праймерів для ПЛР, для клонування цілого елемента, а також для IRAP, REMAP або S-SAP методів.

За рівнем поліморфізму, який виявляє метод іPBS-ампліфікації, його можна порівняти з методами IRAP та REMAP. Таким чином, це ефективний метод для виявлення поліморфізму кДНК і клональних відмінностей, які є результатом ретротранспозонної активності або рекомбінації після кросинговеру (Kalendar et al., 2010; Kalendar, 2011).

23.1.3.5. Ретротранспозони й аналіз генетичного різноманіття

Аналіз генетичного різноманіття і спорідненості між або в межах різних популяцій, видів і індивідів є центральним завданням генетики. Комбінація різних LTR-праймерів або їх застосування у комбінації з мікросателітними праймерами (REMAP) дозволяє отримувати величезну кількість унікальних маркерів.

В огляді (Kalendar, 2011) наведено дані про те, що за використання одних і тих самих праймерів окремо або у різних комбінаціях профілі ПЛР-продуктів суттєво відрізняються. Це свідчить, що більшість смуг за аналізу методами IRAP/REMAP походять від послідовностей, обмежених LTR або мікросателітом на одному кінці й іншим LTR на другому. За використання REMAP картина зазвичай є значно варіабельнішою, ніж відповідний профіль електрофореграми ISSR. Так само (але не завжди, залежно від послідовності LTR) профіль за IRAP-аналізу з комбінаціями праймерів часто має більшу варіабельність, ніж однопраймерна ПЛР.

Споріднені види організмів мають філогенетично споріднені послідовності МГЕ (ретроеlementів чи ДНК-транспозонів). Це означає, що ПЛР-праймери, створені для одного виду, можуть бути застосовані і для аналізу іншого. У такому разі кращими є праймери, гомологічні до консервативних послідовностей МГЕ. Мобільні елементи розпорошені по всіх хромосомах і зазвичай «перемішані» з іншими елементами і повторами. Тому комбінації ПЛР-праймерів із різних повторів допомагають поліпшити якість фінгерпринтів.

Для вивчення споріднених сортів чи селекційних ліній розробляють нативну ретротранспозонну систему. Це вимагає клонування і сиквенування мобільних елементів із геномів нових видів шляхом використання методу іPBS або ПЛР з праймерами до консервативних ділянок домену зворотної транскриптази. Цей процес починається з ампліфікації і клонування ділянок, розташованих між ретротранспозонними доменами, які значною мірою або повністю консервативні, розробки нових праймерів, специфічних для виявлених родин МГЕ, та їх тестування на ефективність як маркерів.

Ефективність методів, заснованих на ампліфікації повторів, позитивно корелює з розміром геному організмів; чим більший геном, тим легше розробити хороші праймери для вивчення поліморфізму (ячмінь, пшениця); організми з малим геномом, такі як *Brachypodium distachyon* чи *Vitis vinifera*, є важкими для розробки ПЛР-маркерів.

У зв'язку з великою кількістю утворюваних продуктів електрофоретичний аналіз ПЛР-продуктів у S-SAP зазвичай виконують на сиквенуючих гелях, у той час як у IRAP та REMAP-аналізі використовують агарозні гелі. Проте IRAP та REMAP можуть бути пристосовані для сиквенаторів. Ці методи генерують від десятків до сотень продуктів у кожній реакції ампліфікації, кількість яких залежить від розповсюдженості родини ретротранспозонів, особливостей другого праймера або сайту рестрикції і кількості селективних нуклеотидів у S-SAP та особливостей організації рослинного геному.

Будь-який мультилокусний анонімний маркер (S-SAP, IRAP чи REMAP) може бути перетворений на відповідний RBIP-маркер і навпаки. Маркери, застосовані у попередніх методах, можна швидко дослідити на інформативність перед розробкою відповідного RBIP-маркера. Продукти S-SAP, IRAP та REMAP-аналізів є результатом реакції ампліфікації від одного кінця ретротранспозонної вставки. Сиквенування окремих інформативних смуг дає змогу конструювати ПЛП-праймери, що відповідають фланкуючій геномній ДНК на одному кінці вставки. Однак потрібно встановити геномну послідовність, що облямовує інший кінець елемента, щоб було можливо оцінити порожній сайт. Цього можна досягти шляхом скринінгу генотипів, що є поліморфними за вихідною смугою (бендом), а потім проводити на них S-SAP-реакцію, за якої LTR-праймер заміщують праймером, сконструйованим до відомого флангу і який спрямований до сайту вставки (подробиці і посилання див.: Kalendar, 2011).

Таким чином, багато властивостей ретротранспозонів роблять їх привабливими для застосування як основи системи молекулярних маркерів. Вони є повсюдними, численними і розпорошеними компонентами еукаріотних геномів. Їх активність приводить як до диверсифікації геномів, так і дає засоби для її виявлення. Ретротранспозони є довгими елементами і продукують значні генетичні зміни у місці вставки, тим самим додають консервативні послідовності, які можуть бути використані для виявлення їх власної інтеграції. Цей процес не пов'язаний з видаленням мобільного елемента з іншого локусу, як у разі ДНК-транспозонів. Навіть втрата корового домену ретротранспозона за LTR-LTR рекомбінації не впливає на ефективність маркерних методів, що використовують LTR-праймери, які «спрямовані назовні» (англ. — outward facing).

Очевидний вихідний стан ретротранспозонної вставки — це «порожній» сайт (англ. — empty site). Цей факт є важливим за генеалогічних і філогенетичних досліджень. Подальші рекомбінаційні процеси у заповненому сайті на-

вряд чи відновлять вихідний «порожній» сайт. У той же час методи мікросателітного аналізу, SNP і методи, що ґрунтуються на набутті чи втраті рестрикційних сайтів (по суті — ті ж SNP), потерпають від відсутності знань про час змін, які вони виявляють, приводячи до виникнення проблеми гомоплазії. Слід підкреслити, що саме SINE-елементи допомогли визначити походження людини в Африці (Batzer et al., 1994; Watkins et al., 2003), визначити зв'язок китів з парнопалими копитоподібними (Shimamura et al., 1997), прояснити філогенетичні зв'язки між дикими видами рису (Cheng et al., 2003).

Генетичний аналіз із використанням ДНК-маркерів, заснованих на LTR-вмісних ретротранспозонах у тих чи інших проявах, описаних вище, називають «транспозон-дисплей» (англ. — transposon display). Їх застосування простягається від вивчення особливостей і механізмів активації і мобільності ретротранспозонів до дослідження біорізноманіття, еволюції геномів, модифікації хроматину, епігенетичного перепрограмування, картування генів і визначення генетичних відстаней, вивчення походження сортів, соматичної мінливості і кДНК-фінгерпринтингу. Ретротранспозонними вставками, що створюють корисні для організму поліморфізми, звичайно ж є лише ті, що проходять в яйцеклітині і пилку. На думку Р. Календаря (Kalendar, 2011), ретротранспозони можна вважати хворобами, що передаються статевим шляхом, хоча і такими, що потрапляють до нового хазяїна клітинним, а не позаклітинним шляхом.

Оскільки LTR-вмісні ретротранспозони є повсюдними, описані методи є універсальними. У рослин подібні підходи придатні і для аналізу LTR-невмісних ретротранспозонів, зокрема SINE-елементів. Молекулярні маркери, створені на основі ретротранспозонів чи ендегенних ретровірусів, застосовують також за вивчення структури популяцій, а також спадкових захворювань людини, вони є ефективними за вивчення тварин, включаючи ссавців і птахів (подробиці і посилання див.: Kalendar, 2011).

23.2. Особливості молекулярних маркерів на основі мобільних елементів

Для молекулярних досліджень застосування ретротранспозонів як генетичних маркерів має певні переваги над іншими, частіше застосову-

ваними генетичними підходами і маркерами, такими як, наприклад, використання мікросателітів чи даних сиквенсу. Перше і найголовні-

ше — це те, що маркери на основі ретротранспозонів значною мірою позбавлені такого явища, як гомоплазія. Іншими словами, на відміну від багатьох інших генетичних маркерів, причиною їх наявності є лише успадкування від спільного предка. Вони майже завжди ідентичні за походженням, але не ідентичні за станом. Отже, вони дають точну картину еволюційних зв'язків і виявилися дуже ефективними для уточнення філогенії деяких таксонів (Takahashi et al., 2001; Salem et al., 2003; Sasaki et al., 2004; Ray et al., 2005a; Watanabe et al., 2006).

Проте за використання ретротранспозонів як генетичних маркерів є факти отримання й хибних даних. За SINE-аналізу філогенетики відомо кілька потенційних джерел хибних результатів, а саме:

- точність встановлення родоводу генеалогічної лінії (lineage sorting);
- паралельна вставка (як поблизу, так і в тому самому місці);
- точне вирізання у тому самому місці (precise excision);
- паралогічна вставка.

Класифікація (sorting) генеалогічної лінії як одне із джерел хибних результатів викликається наявністю вставки, що була поліморфною у спільного предка і яка випадково стала фіксованою чи такою, що зникла з геномів дочірніх видів. Паралельні вставки включають наявність мобільних елементів у тому самому (precise-parallel) чи поблизу того самого місця (near-parallel, тобто в межах ПЛР-амплікона) у геномах різних таксонів. Можливість точного вирізання мобільного елемента з геному до недавнього часу не брали до уваги, оскільки були невідомі механізми перебігу такого роду процесів. Паралогічні вставки — це вставки, що мають місце у дуплікованих ділянках геному.

Такі помилкові результати також часто трапляються за дослідження даних філогенетичного аналізу, тобто при порівнянні таксонів, що не дуже давно дивергували. Це зумовлено динамікою вставок мобільних елементів. Відомо, що частота інсерційної гомоплазії у віддалених таксонів залежить від еволюційного часу і що відмінності у частоті явищ ретротранспозиції у різних видів можуть обмежувати застосування цих маркерів у деяких таксонів (Cantrell et al.,

2001). Внутрішньовидова мінливість, подібна до зображеної на рис. 23.4, трапляється досить часто (Ray, 2007). На популяційному рівні випадки помилкового виявлення вставок є практично нульовими (Salem et al., 2005).

Ще однією перевагою ретротранспозонів як маркерів для молекулярно-екологічних застосувань є їх здатність до успадкування і стабільність після інсерції в геном. Іншими словами, у будь-якому локусі відсутність елемента є спадковим станом, і якщо елемент вже наявний, то він майже завжди залишатиметься там постійно. Ці особливості дозволяють створити просту еволюційну модель. Така модель відрізняється від тих, що використовуються на основі сиквенсу. Так, за аналізу даних сиквенсу можливо зробити висновки про спадковість будь-якого нуклеотидного положення, проте неможливо бути певним щодо успадкування стану будь-якого конкретного сайту: сайт міг зазнати кількох індивідуальних змін, перш ніж стати об'єктом спостереження. Щоб подолати цю непевність, розроблено надзвичайно складні алгоритми. Так само проблему з визначення успадкування становлять мікросателіти, оскільки вони можуть збільшуватися і зменшуватися та змінюватися не поодиночці, а групами, залежно від розміру локусу. Тонкощі інтерпретації даних мікросателітного й інших типів аналізу, застосовуваних за популяційно-генетичного аналізу, детально розглянуто в огляді (Estoup, Cornuet, 1999).

Звичайно, складність аналізу будь-якого молекулярного маркера залежить від поставленого завдання. Для ретротранспозонів існує лише два можливих стани, що успадковуються, — відсутність чи наявність елемента у конкретному локусі. Тому, крім проблем, пов'язаних із зчепленням, тлумачення популяційних і філогенетичних даних здебільшого ґрунтується на застосуванні класичних методів, включаючи давно запропоновані і перевірені десятиліттями стандартні методики, такі як *F*-статистика та «Долло парсимонія» (Dollo parsimony) для популяційних і філогенетичних даних, відповідно. Неодноразово показано, що прості моделі дозволяють відносно легко виявляти швидкі процеси видоутворення (деталі і посилання див.: Ray, 2007).

SINEs та інші ретротранспозони мають також інші спільні переваги. Зокрема, більшість

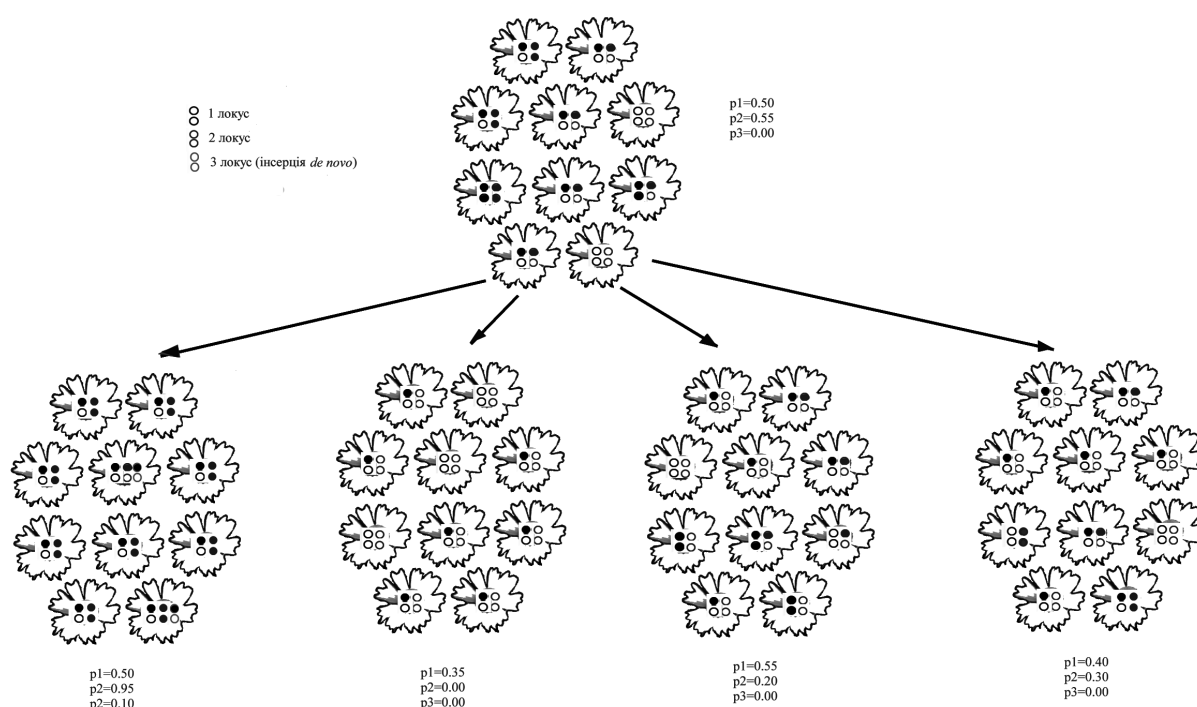


Рис. 23.4. Вставки ретротранспозонів можуть бути використані для спостереження за популяційними змінами і популяційною диференціацією

На представленій схемі прашурна популяція започатковує чотири дочірні популяції. Усі популяції мають свою власну комбінацію частот вставок у всіх досліджених локусах. Крім того, одна з популяцій набула *de novo* вставку, яка є для неї унікальною. Вказано наявність (забарвлене кружальце) чи відсутність (незabarвлене кружальце) вставки у всіх локусах (за: Ray, 2007)

вставок мобільних елементів у геномі є нейтральними. Процес генотипування особин для визначення наявності чи відсутності вставки у будь-якому даному наборі локусів також є відносно простим завданням. Довжина більшості SINEs варіює від 100 до 500 п. н. Тому «заповнення» (локус, що містить SINE-вставку) і «порожні» (локус без SINE-вставки) сайти легко відрізнити за розміром на звичайному агарозному гелі, забарвленому етидій бромідом. Можливою є мультиплікація локусів, для автоматизованого аналізу можна застосовувати флюоресцентно мічені праймери. Крім того, SINE та інші вставки мобільних елементів представляють «два в одному» (two-markers-in-one). Із даних наявності-відсутності збирається не тільки інформація про наявність, кожна вставка породжує нові сиквенс-дані, що можуть бути застосовані для подальших детальніших аналізів. Приклад клінальної мінливості частоти алелей SNP в Alu-елементі див. у роботі (Martinez et al., 2005).

Описані характеристики, які роблять інтерпретацію характеру вставки ретротранспозонів

відносно простою, застосовують за ампліфікації повних локусів, тобто за використання методів, що виявляють як «заповнені», так і «порожні» сайти. Це потребує знання фланкуючих послідовностей для всіх окремих локусів, які досліджують. Проте визначення фланкуючих послідовностей для численних локусів окремих ретротранспозонних вставок є непростим завданням. Разом із тим, розроблено низку методів, головним чином, для вивчення рослин, що використовують анонімні локуси вставки, наприклад SSAP, IRAP, REMAP, які успішно застосовували для досліджень на між- і внутрішньовидовому рівнях (Kalendar et al., 2000; Price et al., 2003; Vershinin et al., 2003; Prieto et al., 2005; Antonius-Klemola et al., 2006; Kalendar, 2011) (див. також попередній розділ 23.1). Істотними недоліками цих методів є важка інтерпретація результатів і непевність щодо справжньої природи поліморфізму, а саме, причини відмінностей у спектрі фрагментів із відсутністю/присутністю ретротранспозона або якоюсь іншою геномною мутацією, такою як сусідній індел чи втрата

рестрикційного сайту. Для поліпшення достовірності аналізів на основі ретротранспозонів краще за все мати дані сиквенсу обох ділянок, що фланкують вставку. Інформація дозволить

ампліфікувати специфічний локус вставки ретротранспозона і пересвідчитись у наявності чи відсутності вставки.

23.3. Застосування мобільних елементів у філогенії і популяційній генетиці

Найчастіше систему мобільних елементів застосовують для реконструкції філогенії. Таке застосування виявилось особливо успішним у приматів (подробити і посилання див. у огляді: Ray, 2007). Прямих застосувань ретротранспозонних вставок для вивчення особливостей філогенії рослин відомо менше. Серед успішних спроб можна назвати такі. Із застосуванням поліморфних LTR-вставок отримано дані про два різних джерела походження культурного рису (Vitte et al., 2004). В інших дослідженнях для вивчення зв'язків і визначення класифікації видів рису успішно використовували р-SINE1-елементи (Motohashi et al., 1997; Iwamoto et al., 1999; Cheng et al., 2002, 2003) тощо.

Маркери на основі ретротранспозонів ширше використовують у рослин для вивчення структури і складу геному, картування генів і хромосом, виявлення потоку генів між дикими і культурними видами, оцінки біорізноманіття, ідентифікації ліній, сортів і різновидностей рослин тощо. Особливо цікаві результати із застосуванням ретротранспозонів були отримані за вирішення деяких проблем молекулярної екології у роботі (Kalendar et al., 2000). Авторам вдалося продемонструвати мінливість розміру геному у природних популяціях ячменю *Hordeum spontaneum*, що може бути прямо пов'язана з активністю LTR-вмісних ретротранспозонів *BARE-1*. Мінливість розміру геному була також пов'язана з локальними умовами довкілля. Ці спостереження свідчать про можливий зв'язок між ретротранспозонною активністю, умовами довкілля і структуруванням геному (детальніше див. розділ 7.8).

Однією з причин відсутності використання мобільних генетичних елементів класу I у дослідженнях структури популяцій і крупніших таксонів є труднощі у виявленні великої кількості поліморфних локусів у межах виду.

З появою додаткових даних аналізу послідовностей геномів потужність SINE-методології зростатиме. Навіть для таксонів, що не є близько-

спорідненими з одним із сиквенованих організмів, застосування SINEs для молекулярної екології не є неможливим.

За відсутності реперних геномів будь-якого таксону для внутрішньопопуляційних досліджень досить ефективним методом ідентифікації корисних діалельних маркерів є аналіз діагностичних мутацій. Визначення фланкуючих послідовностей для будь-якого конкретного SINE чи іншого ретротранспозона можливе за допомогою кількох методів. Для унікальних геномних послідовностей зазвичай використовують інвертовану ПЛР (inverse PCR). За iPCR геномну ДНК перетравлюють і окремі фрагменти лігують, після чого утворюються кільцеві ДНК (Ochman et al., 1988). Потім для ампліфікації фланкуючих ділянок використовують праймери, гомологічні до послідовності транспозона і спрямовані назовні. Після сиквенс-аналізу ампліконів можливо сконструювати праймери, специфічні для окремої вставки. Цей метод був успішно застосований у дослідженнях рослин, грибів і тварин (Komatsu et al., 2003; Prieto et al., 2005; Ray et al., 2005b; Ray, 2007).

Для визначення фланкуючих послідовностей можуть бути використані також модифікації інших ретротранспозонних методів, згаданих раніше. SSAP, IRAP та REMAP дають смуги, що за відповідного аналізу дозволяють визначити послідовність одного флангу вставки. Застосовуючи стандартний метод «прогулянки геномом» (genome walking techniques), спрямований назад відносно вставки, можна визначити другий фланг (Schulman et al., 2004). Інший метод, описаний у роботі (Flavell et al., 1998), використовує властивість, спільну для всіх ретротранспозонних вставок, — дуплікацію цільового сайту (TSD). Усі ретротранспозонні вставки мають здатність внаслідок інсерції продукувати унікальну TSD. Використовуючи олігонуклеотидний праймер, який поєднує властивості ретротранспозонної вставки, що досліджується, й

унікальну TSD, пов'язану з цією вставкою у сполученні з випадковим праймером — AFLP-подібним методом або навіть з іншими методами, описаними вище, можна визначити другий фланг.

Інші методи, що включають скринінг геномних бібліотек, також можуть бути корисними, особливо для філогенетичних досліджень. Ця методологія включає конструювання простої геномної бібліотеки і скринінги із застосуванням

міченого SINE чи іншого ретротранспозонного зонда. Часто зонди є похідними від SINE-транскриптів, що були отримані шляхом транскрипції *in vitro*. Ці методи успішно застосували для вирішення проблематичних філогеній (Teraï et al., 2003; Okada et al., 2004; Sasaki et al., 2004; Nishihara et al., 2005).

Розглянемо деякі конкретні приклади використання МГЕ для уточнення філогенії.

23.3.1. Використання представників *Ty1/copia* та *gypsy*-подібних груп ретротранспозонів у філогенії злаків

Як уже відзначено вище, застосування маркерних систем на основі ретротранспозонів надає хороші можливості простежити за процесами інсерції і їх наступним вертикальним поширенням як за генеалогічних, так і за філогенетичних досліджень. На основі даних, наведених в огляді (Todorovska, 2007), розглянемо деякі результати побудови філогенетичних дерев ячменю і пшениці, а також результати порівняння *Ty1/copia* ретротранспозонів у цих та інших видів Gramineae.

Популяція ретротранспозонів ячменю надродини *Ty1/copia* складається з дуже гетерогенної низки ретротранспозонів, а також із набору послідовностей, споріднених із *BARE-1* елементом. Очевидно, більшість окремих копій ретротранспозонів групи *Ty1/copia* виникли на початку еволюції цього виду і є неактивними та за відсутності селективного стресу можуть накопичувати мутації у великій кількості (нуклеотидні заміни, делеції чи інсерції). Переважною мішенню деяких з них часто є інші ретротранспозони, що веде до порушення кодувального потенціалу і створення дуже гетерогенної групи ретротранспозонів *Ty1/copia*, що властиво також для багатьох груп ретротранспозонів *Ty1/copia* у кукурудзи. Пшениця також містить різноманітні популяції ретротранспозонів *Ty1/copia* (*W*-родина), більшість з яких формують нові підгрупи, більш споріднені з підгрупою *Tta12 BARE-1* та іншою підгрупою *Tta15*, а також з ретротранспозонними послідовностями, що не мають близької гомології з ними і формують іншу ще мало відому групу ретротранспозонів у пшениці.

Порівняння всіх визначених на той час ретротранспозонів надродини *Ty1/copia* у видів, що належать до Gramineae, виявило кілька ці-

кавих фактів. Близькоспоріднені з *BARE-1* гомологічні послідовності отримано також у жита і вівса. Це є свідченням того, що близька гомологія з *BARE-1* широко розповсюджена серед видів триби Triticeae. Ретротранспозонні послідовності групи *Ty1/copia* у рису є менш численними. Деякі представники цієї групи ретротранспозонів є членами супергрупи *Tta15* пшениці, але ніякої гомології не виявлено з ретротранспозонами групи *Ty1/copia* іншого виду, що належить до Gramineae.

Група *gypsy*-подібних ретротранспозонів є також гетерогенною у Gramineae, що, скоріше за все, пов'язано з присутністю/відсутністю *env*-домену. З іншого боку, послідовності *env gypsy*-подібних ретротранспозонів є дуже гетерогенними. Значний розмір і різноманіття послідовностей серед білків ретровірусної оболонки не дозволяє використовувати праймери, призначені для ампліфікації послідовностей *env* у не близькоспоріднених видів рослин. Це різноманіття послідовностей передбачає застосування різних підходів на основі праймерів не для ENV, а для домену RT, щоб показати повсюдність *env*-вмісних *gypsy*-подібних елементів у рослин. На основі цього підходу і подальшої класифікації 328 *gypsy*-подібних RT-послідовностей відомих ретротранспозонів і бази даних усіх організмів, побудованих на основі попередніх класифікацій, продемонстровано наявність цього класу ретроелементів у всіх досліджених геномах квіткових (Vicent et al., 2007). Утворене філогенетичне дерево на основі цих послідовностей та їх підгруп узгоджується з раніше відомими і показало, що рослинні *gypsy*-подібні елементи діляться на дві генеалогічні лінії: в одній зовсім немає *env*-доменів, а інша містить послідовності, ампліфі-

ковані разом з іншими елементами, що містять *env*-подібні чи довгі 3'-ділянки. Згідно з цим деревом філогенетичні відмінності (distinctness) клади *Athila gypsy*-подібних *env* ретротранспозонів (*Bagy-2*, *Rigy-2*, *Athila*, *Calipso*, *Cyclops*) можуть бути пояснені їх розповсюдженням між видами шляхом горизонтального перенесення (див. та-

кож розділ 15). Це підтверджує припущення про те, що рослинні ENVs можуть відігравати внутрішньоклітинну чи внутрішньорослинну, а не інфекційну роль у реплікації елемента або у русі від клітини до клітини у межах рослини (Vicient et al., 2007).

23.3.2. SINEs-елементи як джерело молекулярних маркерів

Короткі розсіяні елементи (SINEs) виявлено у багатьох видів рослин, у тому числі у таких сільськогосподарсько важливих культур, як пшениця, картопля, рис, ріпак, капуста тощо. Проте як джерело високоінформативних молекулярних маркерів вони наразі застосовуються недостатньою мірою. Відомими прикладами такого застосування на сьогодні є мобільні елементи р-SINE1 рису і SB1 Brassicaceae.

Зокрема, висновок про поліфілетичне походження культурного рису було зроблено на основі характеру вкрапленості р-SINE1-елемента (Cheng et al., 2003; Ohtsubo, 2004). Культурний *Oryza sativa* має п'ять диких родичів з АА геномом, що належать до роду *Oryza*. З них *Oryza rufipogon* є найближчим видом до азійського культурного *O. sativa* і, як вважається, є його предком. Виходячи з присутності-відсутності копій р-SINE1 у 101 лінії культурного і дикого рису ці дослідження показали, що дві різні групи *O. rufipogon* містяться біля витоків двох ліній (підвидів) азійського культурного рису (*indica* та *japonica*), і підтвердили поліфілетичне походження азійського культурного рису від *O. rufipogon*. В іншій роботі також було застосовано рSINE1-елементи, щоб перевірити, чи не є культурний африканський рис *O. glaberrima* найбільш близькоспорідненим із іншим видом дикого рису — *O. barthii* (Cheng et al., 2002). Філогенетичний аналіз на основі характеру вставок рSINE1 показав, що п'ять видів дикого рису з АА геномом формують чіткий кластер і що один з них — *Oryza longistaminata* (дикий африканський вид) — є найбільш близькоспорідненим з гіпотетичним предком. Ці результати свідчать про те, що рід *Oryza* з АА геномом виник в Африці, а не в Азії. І нарешті, рSINE1-елементи використовували також для підтвердження того, що *Oryza meridionalis* є видом, що відрізняється від *O. rufipogon* (Xu et al., 2005).

Вставку SI (SBI) SINEs Brassicaceae застосовували як класифікаційний критерій для вивчення зв'язків між дикими видами Brassicaceae, що належать до цитодеми *Brassica oleracea* (Tatout et al., 1999). У цій роботі було також використано мікросателітоподібну мінливість 3'-полі(А)ділянки SINE комплементарного класифікаційного критерію для отримання внутрішнього розподілу в різних кладах. Ця робота дозволила вперше простежити за походженням кількох диких видів. Так, було припущено, що *B. drepanensis* як вид виник з гібрида *Brassica incana* × *Brassica villosa* після зворотних схрещувань з *B. incana*. Дослідження також дозволило вивчити кілька інтрогресій, підтверджуючи, що ці дуже споріднені види здатні до генетичного обміну в природі. І нарешті, SI(SB1)-елементи було також використано для перевірки гіпотези про поліфетичне походження культурного *Brassica oleracea* за важливого внеску кількох середземноморських диких видів (див.: Deragon, Zhang, 2006).

В іншій роботі SI (SB1) SINE-маркери отримували, щоб оцінити ризик трансгенного потоку від культурного виду (*Brassica napus*) до природних популяцій близькоспоріднених видів *Raphanus raphanistrum* (Prieto et al., 2005). Щоб оцінити довготермінову стабілізацію культурних генів у геномі диких родичів, потрібно у природних популяціях провести пошук інтегрованих культурних генів. Однак це нереально з причини труднощів у ідентифікації специфічних маркерів культурних генів. Це особливо стосується випадків, коли культурний вид і його дикі родичі мають спільного предка і високий рівень внутрішньовидового різноманіття, як у разі *B. napus* та *R. raphanistrum*. Було отримано сорок сім SINE-маркерів, розподілених на всіх групах зчеплення С-геному, за якими два види добре відрізнялися, і використано для того, щоб

простежити за перебігом і частотою інтрогресій С-геномної ділянки *B. napus* у популяціях дикого *R. raphanistrum*. І на завершення створення нової колекції маркерів охарактеризовано SINEs, специфічні для А-геному (деталі див.: Deragon, Zhang, 2006).

Викладене свідчить, що SINE-методології мають великий потенціал для вивчення великої низки таксонів. Спочатку цю методологію застосовували для встановлення складних видових зв'язків і визначення еволюційно значущих одиниць (evolutionarily significant units — ESU). Визначення ESU для таксонів є проблемою як для молекулярних екологів, так і для спеціалістів зі збереження біоресурсів. ESUs визначаються як такі, що мають реципрокно монофілетичні гаплотипи мітохондріальної ДНК (мтДНК), а також дивергентні алельні частоти ядерних локусів (Moritz, 1996). Наявність фіксованих вставок в ізолюваних групах додатково підтверджує визначення популяції як еволюційно значущої одиниці. В одному з перших застосувань маркерів для аналізів внутрішньородових зв'язків на основі SINE-елементів було підтверджено конспецифічний (що належить до одного виду) характер трьох підвидів сіми *Oncorhynchus masou* (Murata et al., 1998). У цій роботі було показано, що вісім локусів постійно зустрічались у кількох популяціях цих підвидів, але вони були відсутніми в інших вивчених таксонів. Таким чином, ампліфікація «заповненого» сайту (filled site) у невідомого зразка може слугувати підтвердженням видової ідентифікації цього зразка. Цей підхід почали застосовувати для вивчення різних таксонів (Tatout et al., 1999; Gibbons et al., 2004; Xu et al., 2005; Ray, 2007).

Ампліфікація окремих локусів вставки, що є специфічними для таксону, є цінним знаряддям ідентифікації джерела зразка. У тих випадках, коли ДНК є лімітованою або навіть деградованою, застосування SINE-маркерів може мати переваги перед іншими методами. Зокрема, розроблено методи ідентифікації невідомих зразків із застосуванням внутрішньоелементного ПЛР для ампліфікації геномспецифічних підродів SINEs (Walker et al., 2003a, 2003b, 2004). Ці методи особливо корисні для деградованих зразків, оскільки амплікони зазвичай дуже короткі і мішені репрезентують природно ампліфіковану ділянку геному.

Застосовують ретротранспозони також для вивчення потоку генів, структури популяцій, інбридингу, оцінки генофонду популяцій, генетичного різноманіття, гетерозиготності, узгодження із очікуваннями рівноваги Харді – Вайнберга тощо. Наприклад, у двох підвидів бабуїнів виявили поліморфну Alu-вставку. Авторам (Szmulewicz et al., 1999) не тільки вдалося виявити унікальні алельні частоти для кожного підвиду, а й встановити, що гібриди мали частоти, проміжні до таких батьківських популяцій. Результати також свідчать про асиметричну інтрогресію Alu-вставки від одного підвиду до іншого. Приклад подібного застосування у рослин наведено у роботі (Tatout et al., 1999). Ці дослідники застосовували S1-SINEs для виявлення потоку генів між трьома видами *Brassica* й уточнення зв'язків між комплексом різних представників виду *Brassica oleracea* (див. вище).

Пізніше були детальніше вивчені рослинні SINE-елементи, які було використано як молекулярні маркери для дослідження філогенетичних зв'язків між дикими і культурними видами *Oryza* і *Brassica* (Deragon, Zhang, 2006). Показано, що у Brassicaceae порівняно з більш раннім, згаданим вище дослідженням (Tatout et al., 1999) подальше використання SINE-маркерів обмежене далеко не повним знанням родин ендегенних SINE-елементів (їх походження і еволюційної історії) та відсутністю чіткої класифікації. Щоб вирішити цю проблему, було проаналізовано філогенетичні зв'язки між усіма відомими SINEs Brassicaceae і запропоновано нову класифікацію — групування SINEs у 15 родин. Проаналізовано відносний вік усіх родин SINE-елементів Brassicaceae й описано філогенетично підтверджені підродина. Отримано дані, які свідчать, що у *Brassica oleracea* в результаті перетасування преіснуючих ділянок SINE порівняно недавно виникли нові потенційно активні SINE-елементи. Порівняння еволюційної історії родин SINE, наявних у *Arabidopsis thaliana* та *Brassica oleracea*, виявило, що SINEs у цілому були активнішими в генеалогічній лінії *Brassica*.

Обговорюючи значення отриманих даних для використання SINE-елементів Brassicaceae у майбутніх дослідженнях, автори підкреслюють, що порівняно швидке перетворення SINEs Brassicaceae дещо обмежує їх використання як

молекулярних маркерів (Deragon, Zhang, 2006). Вище згадувалося про використання SINE з «молодої» родини як молекулярних маркерів для вивчення зв'язків між дикими видами цитодему *Brassica oleracea* і родовами культурного виду *Brassica oleracea* (Tatout et al., 1999). Отримано колекцію SB1-маркерів, що дозволило простежити за потоком генів між культурним видом *Brassica napus* (ріпаком) і диким родичем *Raphanus raphanistrum* (Prieto et al., 2005). Усі важливі сільськогосподарські культури *Brassica* (турнепс, капуста, бруква, ріпак і гірчиця) є близькоспорідненими, і елементи з дуже молодих родин SINE-елементів, описані у цитованій роботі (елементи *BoSBI*, 5–7, 9 та 13–15), є надзвичайно корисним інструментом для оцінки зв'язків між дикими і культурними видами. Тому, на думку авторів (Deragon, Zhang, 2006), незважаючи на неможливість простежити довготривалі еволюційні процеси з використанням як молекулярних маркерів SINE-елементів, вони є ефективним знаряддям для встановлення філогенетичних зв'язків і моніторингу генного потоку між близькоспорідненими видами.

Таким чином, розроблені підходи дозволяють сьогодні вивчати вплив ретротранспозонів на процес еволюції геномів і його зв'язок із видовою диверсифікацією. Відомо, що повторювана ДНК може бути задіяна у перебудові геномів шляхом введення геномної нестабільності. Переміщення мобільних елементів може змінювати геноми шляхом інсерційного (вставочного) мутагенезу, геномні делеції часто опосередковані вставками й опосередкованою транспозиціями трансдукцією. Наявність значною мірою ідентичних фрагментів ДНК, розкиданих по всьому геному, сприяє рекомбінації, включаючи як рівні, так і нерівні кросоверні процеси, сегментну дуплікацію, генну конверсію, перетасовування екзонів, хромосомні перебудови тощо (деталі і посилення див. у огляді: Ray, 2007). Ці процеси можуть збільшувати генетичну мінливість у по-

пуляції, а отже, підвищувати внутрішньовидове і міжвидове різноманіття. Дослідження активності мобільних генетичних елементів, особливо у таксонів, що зазнали значної диверсифікації у недавньому минулому, може дати нам розуміння зв'язків між процесами, що змінюють геноми, і процесами, що дають початок видовому різноманіттю.

Підсумовуючи викладене у цьому розділі, слід особливо підкреслити, що застосування SINEs та інших мобільних генетичних елементів класу I є дуже перспективним для вирішення великої кількості філогенетичних проблем і більш специфічних внутрішньо-родових і внутрішньовидових проблем біології та екології. Аналіз ретротранспозонів є дуже зручним для таких досліджень з причин:

- ретротранспозонні маркери позбавлені багатьох недоліків, властивих для інших типових маркерів, таких як необхідність даних сиквенсу і мікросателітний поліморфізм;
- отримані дані легко інтерпретувати, і вони, як правило, не потребують складних математичних моделей (або алгоритмів), щоб зробити чіткі висновки;
- локуси легко генотипувати, оскільки необхідним обладнанням для визначення «заповнених» і/чи «порожніх» сайтів є лише термоциклер та установка для агарозного гелелектрофорезу;
- у той час як мікросателіти, як правило, обмежені внутрішньовидовими порівняннями, вивчення, наприклад, Alu-вставок показало, що ці маркери можливо застосовувати як на внутрішньовидовому рівні, так і на всіх інших рівнях, сягаючи міжродинних зв'язків; явище гомоплазії, як правило, не складає проблеми.

Саме тому застосування SINE-методу як засобу дослідження філогенетичних зв'язків і еволюційних закономірностей у різних таксонах набуває все більшого розповсюдження.

23.3.3. Застосування ДНК-транспозонів для філогенетичних досліджень на прикладі *Brassica rapa* L.

Вид *Brassica rapa* L. ($2n=20$, геном AA) включає економічно важливі олійні, овочеві і кормові культури, як листові, так і кореневі, він широко розповсюджений на земній кулі.

Згідно з даними, наведеними в роботі (Артемова и др., 2011), біоінформатичний порівняльний аналіз показав, що геноми *Arabidopsis thaliana* і капусти городньої *Brassica oleracea*

($2n=18$, геном CC), від якої виник вид *Brassica rapa*, містять одні й ті самі мобільні елементи, хоча і в різних співвідношеннях, що зумовлено, серед іншого, й відмінностями у розмірі геному (Zhang, Wessler, 2004). Цей результат перебуває у відповідності з високим рівнем геномного консерватизму між двома видами, що дивергували 15–20 млн років тому.

Незважаючи на те, що повністю сиквенований геном арабідопсиса містить усі відомі типи мобільних елементів, до сьогодні тільки невелика частина мобільних елементів *Brassica* вивчена на молекулярному рівні, при цьому головним об'єктом дослідження були МГЕ I класу (ретро-транспозони). Отримано дані про наявність послідовностей МГЕ II класу (ДНК-транспозонів) *Ac*, *MuDR*, *CACTA* та *Far1* у геномах шести видів роду *Brassica* (Соловьева и др., 2009), у геномі *Brassica oleracea* серед МГЕ II класу найбільш поширені елементи *CACTA* (Zhang, Wessler, 2004). (*CACTA* відносять до елементів з інвертованими кінцевими повторами (TIRs — Terminal Inverted Repeats) зазвичай довжиною 10–28 п.н., які закінчуються консервативним мотивом 5'-CACTC-3', при цьому внутрішні послідовності елементів *CACTA* є високоваріабельними.)

У рослин — представників роду *Brassica* *CACTA*-транспозон *Bot1* пройшов кілька раундів ампліфікації лише у геномі *Brassica oleracea* на відміну від геному *Brassica rapa*, що відіграло головну роль у недавній дивергенції обох геномів (Alix et al., 2008). Цими ж авторами було встановлено С-геном-специфічний сегмент *Bot1*.

У геномах *Brassica rapa* і *B. napus* (AACC) вони встановили присутність *Bot1*-подібних елементів, ідентифікували їх розмір і TIR-послідовності.

Нещодавно методом S-SAP з використанням праймерів, специфічних до транспозонів *CACTA*, проаналізовано велику колекцію рослин *B. rapa* (Артемьева и др., 2011). Встановлено, що використання МГЕ як маркерів дозволяє розділити культури виду на два основних кластери — східноазійські овочеві та індоєвропейсько-азійські олійні і коренеплідні культури, а перший кластер — на підкластери пекінської та китайської капуст, що відповідає ботанічному розподілу і результатам аналізу мікросателітів. Цінним доповненням до попереднього аналізу був розподіл пекінської капусти на групи, в тому числі вичленування її головчатих форм, уточнення положення форми Хірошимана, японської капусти, а також розподіл олійних культур у другому кластері за географічним походженням. Сумісне використання 149 SSR-маркерів та 123 S-SAP-маркерів для побудови SAHN-дендрограми дозволило отримати достовірніші положення кожного дослідженого зразка в системі виду. У цьому випадку тільки декілька морфологічно різних зразків європейської коренеплідної ріпи виявилися дисперсно розподілені між зразками другого кластера, у той час як половина зразків ріпи сформувала окрему групу в межах непальсько-індійського підкластера. Автори припускають, що це, можливо, найдревніші форми, близькі до першої окультуреної центральноазійської форми виду (детальніше див.: Артемьева и др., 2011).

ПІДСУМОК

Роль МГЕ в еволюції геному

Мобільні генетичні елементи були відкриті майже 70 років тому за допомогою класичних генетичних методів. Розвиток методів молекулярної біології дозволив відкрити та досліджувати нові й нові групи мобільних генетичних елементів і показати їх широку розповсюдженість у різних організмах. Ще 20–25 років тому активно проводили описання і класифікацію МГЕ, був сплеск публікацій з відкриття нових родин і навіть підкласів мобільних (рухомих) елементів. Докладно описано механізми переміщення різних класів МГЕ, характер кодованих ними властивостей, філогенетичні взаємини між різними класами і групами МГЕ. Нині переважають роботи з вивчення їх ролі в експресії структурних генів, в інших роботах їх використовують як вектори для введення генетичного матеріалу або мутагени, які дозволяють спрямовано порушувати функціонування того чи іншого «дикого» гена. Тобто на сьогодні МГЕ міцно зайняли своє місце серед основних фракцій геномної ДНК.

Здавалося б, така величезна кількість транспозонів, яка описана для геномів більшості рослин, комах, а останнім часом — хребетних тварин, повинна швидко дезорганізувати геном, однак цього не відбувається. Дослідження показали, що структура генів досить консервативна. Це можна пояснити тим, що в більшості випадків мобільні елементи перебувають у клітинах у неактивному стані й активуються за стресових впливів. Індукція транспозицій відбувається за дії як зовнішніх чинників (підвищена температура, іонізуюче випромінювання, умови культивування *in vitro*, інфекція патогенами), так і за внутрішньогеномних процесів (гібридного дисгенезу, інбридингу, аутбридингу тощо) (див. розділ 7). За цих умов МГЕ можливо розглядати як контролюючі та дестабілізуючі фактори геному генеративних і соматичних клітин. Вважається, що саме рухомі елементи геному відповідають за індукцію і підтримку процесів нестабільності геному, причому на різних рівнях як генеративних, так і соматичних клітин (Юрченко і др., 2011).

Існує низка протилежних думок щодо функціонального значення МГЕ, особливо щодо ролі мобільних елементів у процесах еволюції. Спо-

чатку була поширеною думка про те, що вони представляють собою «егоїстичну», суто паразитичну ДНК. Навіть досі чітко не виявлено прямої позитивної ролі транспозонів у підвищенні життєздатності окремих особин. Проте все більше дослідників припускають їх значний внесок у процес еволюції: вплив мобільних елементів на геноми рослин полягає у створенні різноманітних геномних перебудов, що надає первинний матеріал для еволюційного процесу. В принципі, на сьогодні вже доведено ключову роль транспозонів у реорганізації генетичного матеріалу, їх визначальний вплив на еволюцію рослинного геному. З'являється все більше даних про роль різних класів МГЕ в еволюції генів і геномів, у цілому про причинно-наслідковий зв'язок між ампліфікацією та інвазіями МГЕ у геном різних організмів і крупними еволюційними перетвореннями, з видоутворенням включно (Евгеньєв, 2007; Plant Transposons..., 2013).

Рухомі елементи, як відомо, здатні пересуватися по геному, і досить часто їх активність за інтеграції в ген виявляється фенотипово. Інколи такі вставки приводять до виникнення нових форм і сортів рослин, особливо тих, що розмножуються вегетативно. Наприклад, було встановлено, що брунькові мутації, які дали нові патентовані сорти яблуні «Gala» і «Braeburn», з'явилися в результаті вставки ретротранспозона (Venturi et al., 2006). Повідомлялося також про ретротранспозон-індуковану мутацію, пов'язану з втратою пігментації у білих сортів винограду *Vitis vinifera* (Kobayashi et al., 2004), встановлено відмінності за транспозонною активністю у деяких сортів цитрусів (Breto et al., 2001).

Мутації, викликані вставками ретротранспозонів у гени або біля генів, можуть змінювати генну експресію або структуру кодованих білків. Проте зазвичай такі інсерційні мутації соматично нестабільні, вирізання МГЕ з локусу відновлює активність гена в певній клітині та в її нащадків. Присутність транспозонів проявляється у вигляді строкатих фенотипів, які описано для багатьох життєвих форм, перш за все у вищих рослин (Кунах, 2005, розділ 4).

Хоча було проведено багато досліджень з вивчення активності транспозонів, не всі ме-

ханізми транспозиції досі досліджені. Використання гетерологічних видів-хазяїв дозволяє, по-перше, полегшити вивчення транспозиції та, по-друге, використати переваги транспозонів як генетичних інструментів у видів, де вони відсутні. Молекулярно-біологічні методи дозволили модифікувати природні транспозони так, щоб полегшити подальші методи аналізу. Модифікації полягають у введенні до складу транспозонів селективних та маркерних генів, розташуванні транспозона між промотором та кодуючою ділянкою маркерного гена, використанні двоконпонентних систем та делегуванні частини кінцевих повторів. Завдяки унікальним особливостям транспозони використовують за мутагенезу та клонування генів. Здатність мобільних генетичних елементів переміщуватися по геному дозволяє застосовувати їх для маніпулювання генами при вирішенні біотехнологічних завдань.

Сиквенування все нових і нових геномів надає свідчення того, що геноми всіх видів на Землі не є ізольованими, як думали раніше, а, скоріше, це сполучені посудини, здатні за допомогою мобільних елементів, вірусів й інших векторів обмінюватися генетичною інформацією. Вперше таку концепцію в найбільш повній формі сформулював Р.Б. Хесін (Хесин, 1984), дещо раніше подібні погляди викладено в книзі В.А. Кордюма (Кордюм, 1982).

Сформульовано концепцію пангеному для бактерій, відповідно до якої геном деяких видів бактерій представлено основним геномом, нуклеотидні послідовності якого виявляються в усіх бактеріальних штамів даного виду, а також його значною необов'язковою частиною з генами, характерними для конкретних ізолятів бактерій. Є пропозиції поширити поняття пангеному і на царство рослин, і може виявитися, що організація геномів у вигляді пангеному є широко розповсюдженим феноменом (Патрушев, Минкевич, 2007).

Сьогодні стає ясно, що обмін інформацією у процесі еволюції активно здійснюється не тільки між близькими видами, а й між різними класами і навіть типами організмів. Хоча в евкаріотних організмів відомо досить багато випадків, які можна пояснити тільки горизонтальним перенесенням, на жаль, поки не вдалося виділити вектор, що відповідає за таке перенесення.

Той факт, що частка мобільних елементів у геномах навіть дуже близьких видів, а також ліній і популяцій, і окремих особин цих видів може варіювати, дозволив М. Голубовському (Голубовский, 2000; Golubovsky, 2011) умовно поділити геном на облігатну частину, що містить структурні і регуляторні гени, необхідні для нормального розвитку організму, і на факультативну, варіюючу частину, яка містить мобільні елементи різних класів, а також інші форми повторів (див. рис. 1).

Наразі накопичуються все нові й нові факти, які свідчать про те, що тонка адаптація як популяції, так і окремого організму (найкраще це вивчено на прикладі рослин) до змінних умов зовнішнього середовища («швидке реагування») проходить за рахунок як кількісних, так і якісних (епігенетичних) змін саме факультативної частини геному (Евгеньев, 2007; Кунах, 2011, 2011а). Очевидно, що в деяких випадках такі зміни можуть призвести до генетичної ізоляції і видоутворення.

Дослідження зв'язків між змінами епігенетичної регуляції активності генів на різних стадіях розвитку організму, з одного боку, і змінами умов довкілля, розміру геному організму, розміру і структури популяції, з іншого, — надзвичайно важливе і цікаве завдання майбутніх досліджень. Виявлено біологічні системи, в яких можна вивчати такі факти. Наприклад, в арабідопсисі виявлена специфічна для різних ліній епігенетична мінливість, пов'язана з великою кількістю РНК LTR-невмісних ретротранспозонів (Rangwala et al., 2006). Такі дослідження обіцяють краще зрозуміти зв'язок між генотипом і фенотипом. Все це свідчить про те, що частина геному, яка колись уважалася сміттевою ДНК, сьогодні повинна розглядатись як головний учасник (двигун?) багатьох процесів, що формують геном, контролюють активність його генів і, в кінцевому рахунку, — фенотип організму.

Тобто мобільні генетичні елементи все частіше розглядають як головних ініціаторів генетичних змін, що дозволяють популяціям і, очевидно, окремим організмам адаптуватися до змін навколишнього середовища, а видам еволюціонувати (рис. 24.1). МГЕ можуть також переміщуватися між геномами різних видів. Такі горизонтальні перенесення дозволяють цим еле-

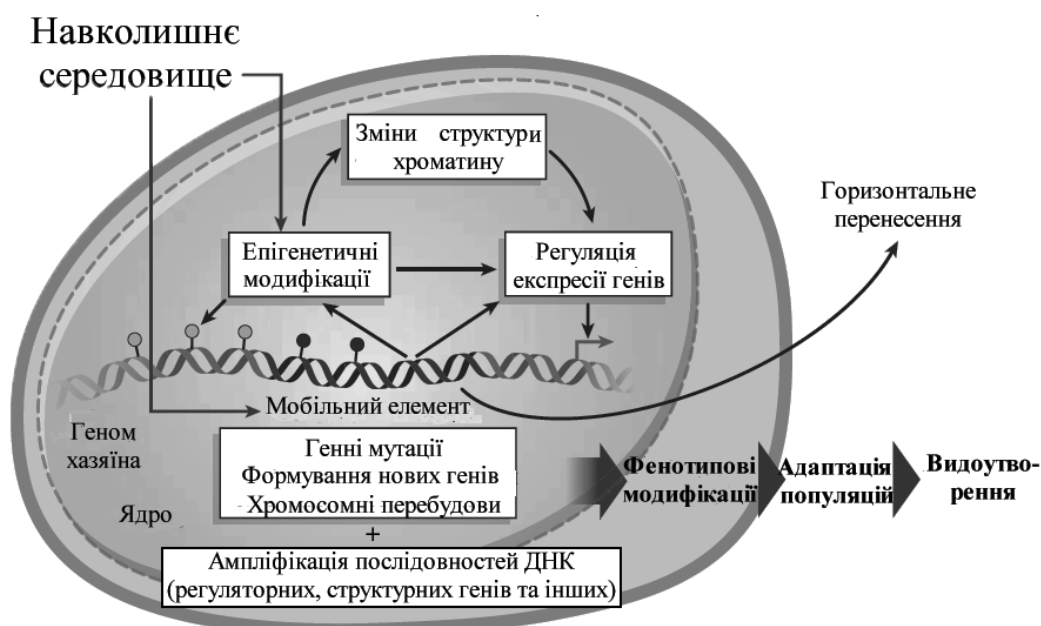


Рис. 24.1. Мобільні генетичні елементи і взаємодії геном – середовище

Мобільні генетичні елементи все частіше розглядають як головних ініціаторів генетичних змін, що дозволяють популяціям адаптуватися до змін, а видам еволюціонувати, як показано на рисунку. Вони можуть переміщуватися між геномами різних видів. Таке горизонтальне перенесення дозволяє цим елементам уникати дії різних регуляторних механізмів, що нав'язуються їм геномом їхніх хазяїв, і вторгатися в нові геноми, де вони збільшують число своїх копій, поки не виникнуть нові механізми, що обмежують їх розповсюдження. Хоча кількість копій і експресія багатьох МГЕ регулюються різними молекулярними механізмами, деякі лімітуючі сили спрацьовують на популяційному рівні. Існування таких чинників свідчить про те, що є добір, спрямований проти прямого шкідливого впливу вставок, навіть якщо ці впливи є малими, і проти хромосомних перебудов, що часто мають місце, коли в геномі присутні МГЕ однієї і тієї ж родини. Вплив таких сил (факторів) залежить від задіяних МГЕ, структури популяції та її репродуктивної системи. У результаті спостерігається тенденція до елімінації копій МГЕ або їх накопичення у геномах, час є важливим чинником формування особливостей геномів, уражених МГЕ. У результаті таких контролюючих сил геноми містять суміш МГЕ, серед яких деякі є все ще активними, а інші є давніми дегенерованими залишками (за: Biemont, Viera, 2006, з доповненнями)

ментам уникати різних регуляторних механізмів, що накладаються на них геномом їхніх хазяїв, і вторгатися у нові геноми, де вони збільшують число своїх копій, поки не виникнуть нові механізми, що обмежують їх розповсюдження.

Число копій і експресія багатьох МГЕ регулюються різними молекулярними механізмами, певні обмежувальні сили спрацьовують і на популяційному рівні. Ці сили можуть свідчити, що є селекція, спрямована проти прямого шкідливого впливу вставок, навіть якщо ці впливи є малими, і проти хромосомних перебудов, що часто мають місце за присутності в різних хромосомах рухомих елементів однієї і тієї ж родини. Вплив таких сил залежить від задіяних МГЕ, структури популяції та її репродуктивної системи. Це створює тенденцію до елімінації копій МГЕ або їх накопичення у геномах, роблячи час важливим чинником у формуванні структурних особливос-

тей геномів, що містять МГЕ. Внаслідок дії цих контролюючих сил геноми, очевидно, містять суміш МГЕ, з яких деякі є активними, а інші — це залишки древніх дегенерованих МГЕ.

Деякі дослідники вважають, що величезне різноманіття механізмів, за допомогою яких МГЕ впливають на функціонування і структуру геному, не дозволяє приписати їм якусь одну, чітко окреслену роль. Вважається, що про виконання важливих функцій тим чи іншим чином свідчить наявність консервативних послідовностей. У випадку рухомих елементів (транспозонів) спостерігається їх величезне розмаїття. Можливо, що у цьому випадку предметом збереження у процесі еволюції є не самі нуклеотидні послідовності, а ті принципи і механізми взаємодії окремих компонентів геному, в яких вони беруть участь. Можливо, що саме властива ретротранспозонам здатність взаємодіяти різними способами з гено-

мом клітини і є та особлива роль, яку вони відіграють у процесах, що перебігають у клітині. У будь-якому випадку немає сумнівів у тому, що рухомі генетичні елементи є древнім, важливим і впливовим компонентом практично будь-якого геному (Plant Transposons..., 2013).

Таким чином, відкриття МГЕ змінило уявлення про організацію і функціонування генетичного апарату клітини. Геном не є жорстко упорядкованою і стабільною послідовністю генів, а представляє собою достатньо вільно організовану структуру, що припускає значну динамічність (рухливість і навіть, за деякими визначеннями, «текучість»). Очевидно, саме МГЕ є одним із головних чинників пластичності геному клітини і, в результаті, адаптивності організму, генетичного різноманіття, мікроеволюції і видоутворення (Кунах, 2011, 2011а). Гени ж (структурні й регуляторні) — це дійсно острови у морі повторюваних послідовностей ДНК. Вивчення цього «моря» активізується.

І, насамкінець, цитуючи Т. Добжанського, що будь-яке біологічне дослідження має сенс тоді, коли воно стосується еволюції, спираючись на дані, наведені у роботах (Shapiro, 1999, 2010), можливо припустити такий сценарій еволюційних змін:

- спадкова зміна виникає в результаті не випадкової дії внутрішніх (built-in) біохімічних систем, що мобілізують ДНК і здійснюють природну генетичну інженерію;
- значні порушення екології організму запускають процеси реструктурування геному і клітини в цілому. Екологічні порушення можуть діяти безпосередньо — викликаючи стрес у організмів, або опосередковано — через зміни у біоті, яким сприяють незвичні взаємодії між організмами (злиття клітин, між-

видові гібридизації). Процеси реструктурування продовжуються, поки не виникне нова система, здатна утилізувати наявні ресурси;

- запущені екологічними змінами процеси реструктурування клітин і геному продукують організми, які з певною частотою матимуть адаптивні ознаки, що пасують до зміненого навколишнього середовища. Нові адаптивні ознаки можуть бути складними із самого початку, оскільки вони є результатом процесів, що діють на основі пре-існуючих функціональних систем, компоненти яких можуть бути ампліфіковані і перебудовані в нових комбінаціях. Конкуренція за ресурси (purifying selection) слугує для елімінації тих нових систем, які не є функціональними за нової екології;
- після того, як екологічна стабільність досягнута, функції природної генетичної інженерії пригнічуються, темп перебудов зменшується, а мікроеволюція може відбуватися шляхом доводки еволюційних «винаходів» за допомогою послідовних малих змін (див.: Shapiro, 2010).

Такий сучасний сценарій еволюції (адаптації) припускає велику роль клітинної чутливості і геномних реакцій, на які вказувала Б. Мак-Клінток у своїй нобелівській лекції у 1984 році. Сучасний погляд на еволюцію припускає зв'язок між екологічними змінами, реакціями клітини й організму, широко розповсюдженим реструктуруванням геному та швидкою появою адаптивних змін. Саме вивчення мобільної ДНК трансформувало теорію еволюції і адаптацій у найсучаснішу науку, зняло завісу чудодійності над можливістю успадкування «набутих ознак» (див.: Голубовський, 2000; Golubovsky, 2011; Кунах, 2011, 2011а).

CONCLUSION

Role of MGEs in evolution of genome

Mobile genetic elements (MGEs or MEs) or «transposable elements» (TEs) were discovered almost 70 years ago using classical genetic methods. The development of molecular biology techniques has allowed discovering and exploring ever new mobile genetic elements to show their wide prevalence in different organisms. As early as 20–25 years ago had been actively conducted researches on the description and classification of MGEs, there was a surge of publications on the discovery of new families and even subclasses of mobile elements. Transfer mechanisms of various MGE classes, the character of encoded by them properties, phylogenetic relationships between different MGE classes and groups are described in detail. Currently prevail works that explore their role in the expression of structural genes, other studies use them as vectors for introducing the genetic material or mutagens that can directionally disrupt functioning of that or the other «wild» gene. That is, today MGEs firmly took their place among the major fractions of genomic DNA.

It seemed likely that a huge number of transposons that is described for the genomes of most plants, insects, and more recently, vertebrates, should quickly disrupt the genome, but this is not happening. Studies have shown that the structure of genes is sufficiently conservative. This can be explained by the fact that in most cases the mobile elements are found in cells in inactive state and are activated by stress effects. Induction of transpositions occurs under the effect of both the external factors (increased temperature, ionizing radiation, cultivation conditions in vitro, infection by pathogens) and intragenomic processes (hybrid dysgenesis, inbreeding, outbreeding etc.) (see section 7). Under these conditions, MGEs can be treated as controlling and destabilizing genome factors of germ and somatic cells. It is believed that precisely moving parts of the genome are responsible for the induction and maintenance of genomic instability, moreover at different levels of both germ and somatic cells (Yurchenko et al., 2011).

There are a number of opposing views regarding the functional significance of MGEs, especially on the role of mobile elements in the process of

evolution. At first there was a widespread belief that they are «selfish», purely parasitic DNA. Even still now it is not revealed clearly a direct positive role of transposons in enhancing the vitality of certain individuals. However, ever more researchers suggest their contribution to the process of evolution: the impact of mobile elements on the genome of plants consists in creating a variety of genomic rearrangements, which provide the primary material for the evolutionary process. In principle, today a key role of transposons in the reorganization of genetic material, their critical influence on the evolution of plant genomes is proven. Appear ever more data on the role of different classes of MGEs in the evolution of genes and genomes, on the whole of the cause-effect relationship between amplification and MGE invasions into the genome of different organisms and major evolutionary transformations, including speciation (Evgen'yev, 2007; Plant transposons..., 2013).

Mobile elements are known as being capable to transpose themselves along the genome and rather frequently if they integrated into gene their activity is revealed phenotypically. Occasionally such insertions lead to appearance of new forms and cultivars of plants, especially those that propagate vegetatively. For example, it was established that bud mutations which have produced new patented apple cultivars «Gala» and «Braeburn» emerged as a result of retrotransposon insertion (Venturi et al., 2006). It was reported as well on retrotransposon-induced mutation associated with loss of pigmentation in white grape cultivars *Vitis vinifera* (Kobayashi et al., 2004); differences by the transposon activities in some citrus cultivars were found (Breto et al., 2001).

Mutations caused by retrotransposon insertions into genes or close to genes, can change gene expression or structure of encoded proteins. Such insertional mutations, however, are usually somatically unstable; MGE excision from the locus may restore gene activity in certain cell and its descendents. Transposon presence is manifested as a variegated phenotype that is described for many living forms, first of all in higher plants (Kunakh, 2005, Section 4).

Even though were performed many investigations into transposon activities, not all mechanisms of transposition were elucidated. Use of a heterologous host species allows, first, facilitating the study of transposition and, second, advantaging of transposons as genetic tools in species where they are absent. Molecular biological techniques have allowed modifying natural transposons in a way to facilitate further techniques of analysis. Modifications include the introduction into the transposon components the selective and marker genes, transposon location between the promoter and the coding portion of the gene marker, use of two-component systems and delegation of the terminal repeat fraction. Due to their unique features, transposons are used for mutagenesis and gene cloning. The ability of mobile genetic elements to move around the genome allows their use to manipulate genes in solving biotechnological problems.

Sequencing of ever new genomes provides evidence that the genomes of all species on Earth are not isolated, as was previously thought, but rather are communicating vessels capable of using mobile elements, viruses and other vectors to exchange genetic information. For the first time such a concept in the most complete manner formulated R.B. Khesin (1984), somewhat similar views earlier were stated by V.A. Kordyum in the book (Kordyum, 1982).

Recently it was formulated concept of pan-genome for bacteria, according to which the genome of some species of bacteria are presented by the main genome, whose nucleotide sequences are found in all bacterial strains of this species, as well as its considerable optional part with the genes typical for specific isolates of bacteria. There are proposals to extend the concept of pan-genome on the kingdom of plants as well, and it may be that the organization of genomes as pan-genome is a widespread phenomenon (Patrushev, Mynkevych, 2007).

Today it is becoming clear that the exchange by information in the course of evolution is actively carried out not only between related species, but also among different classes and even the types of organisms. Although eukaryotic organisms demonstrate a lot of examples that can be explained only by horizontal transfer, unfortunately, no one yet

succeeded in allocating a vector that is responsible for such carrying.

The fact that the share of mobile elements in the genomes of even very closely related species, as well as lines and populations and the individuals of the species can vary, allowed M. Golubovsky (Golubovsky, 2000; Golubovsky, 2011) subdividing on two subsystems: Obligate (that contains structural and regulatory genes required for the normal development of the organism), and Facultative genetic elements. FGEs include the hierarchy of intra and extra chromosomal elements in nucleus and cytoplasm. Nuclear FGEs comprise a highly repeated and nucleated DNA sequences, pseudogenes and retrotranscripts, transposons, amplicons, and even an additional, or B-chromosomes. In cytoplasm, FGEs include plasmids, amplified rod and circular segments, and endosymbionts/cytobionts (see Fig. 1).

Currently are accumulated ever new facts indicating that the fine adaptation of both population and individual organism (this is best exemplified by plants) to changing environmental conditions («quick response») proceeds through both quantitative and qualitative (epigenetic) changes, namely of the optional part of the genome (Evgen'yev, 2007; Kunakh, 2011, 2011). Obviously, in some cases, such changes may lead to genetic isolation and speciation.

Studies on relationships between the changes in epigenetic regulation of gene activity at different stages of organism development on the one hand and the changes in environmental conditions, the size of the organism genome, population size and structure on the other is a very important and interesting task for future research. Biological systems were found in which one can study such facts. For example, in *Arabidopsis* was revealed the epigenetic variability specific for different lines which is related with great amount of non-LTR retrotransposon RNA (Rangwala et al., 2006). Such studies promise better understanding the relationship between genotype and phenotype. This indicates that something which once was considered as junk DNA, today must be seen as a major participant (driver?) of many processes that shape the gene, control the activity of its genes, and ultimately — phenotype of the organism.

That is, mobile genetic elements are increasingly seen as the main initiators of genetic changes that allow populations and obviously individual

organisms adapting to environmental change and species evolving (Fig. 24.1). MGEs can also transpose between the genomes of different species. Such horizontal transfers allow these elements avoiding various regulatory mechanisms imposed on them by the genomes of their hosts and invading into new genomes, where they increase the number of their copies until arise new mechanisms that limit their distribution.

The number of copies and the expression of many MGEs is governed by different molecular mechanisms, certain restrictive forces also operate at the population level. These forces may indicate that there is a selection against the direct harmful effects of insertions, even if these effects are small, and against chromosomal rearrangements that often occur in the presence of MGEs of the same family. The influence of these forces depends on the participating MGEs, population structure and its reproductive system. This creates a tendency towards elimination of MGE copies or their accumulation within the genomes, making the time an important factor in shaping the structural features in genomes containing MGEs. As a result of these controlling forces the genomes seem to contain a mixture of MGEs, some of which are active while others present the remnants of ancient degenerated MGEs.

Some researchers believe that the great diversity of mechanisms by which MGEs affect the functioning and structure of the genome can not ascribe them a single, well-defined role. It is believed that the implementation of important functions in any way indicates the presence of conserved sequences. In the case of mobile elements (transposons) it is observed their great diversity. Perhaps in this case as a subject of conservation in the course of evolution are not the nucleotide sequences themselves, but the principles and mechanisms of interactions between the individual components of the genome in which they participate. It is possible that exactly inherent retrotransposons ability to interact by different ways with the genome of the cell is namely the special role they play in the processes occurring in the cell. In any case, there is no doubt that mobile genetic elements are an ancient, important and influential components of almost any genome (Fedoroff, 2011, 2012; Plant transposons., 2013).

Thus, the discovery of MGE changed the understanding of the organization and functioning

of the genetic apparatus of the cell. A genome is not rigidly ordered and stable gene sequence, but is a rather loosely organized structure that provides for considerable agility (mobility, and even, according to some definitions, «fluidity») Obviously, precisely MGE is one of the main factors of the cell genome plasticity and, as a result, of organism adaptability, genetic diversity, microevolution and speciation (Kunakh, 2011, 2011). Genes same, (structural and regulatory) are indeed islands in a sea of repetitive DNA sequences. The study of this «sea» is being activated.

And finally, citing T. Dobzhansky that any biological research makes sense when it concerns evolution, based on the data presented in the papers (Shapiro, 1999, 2010) one may suggest the following scenario of evolutionary changes:

- hereditary variation arises from the non-random action of built-in biochemical systems that mobilize DNA and carry out natural genetic engineering;
- major disruptions of an organism's ecology trigger cell and genome restructuring. The ecological disruptions can act directly, through stress on individuals, or indirectly, through changes in the biota that favour unusual interactions between individuals (cell fusions, interspecific hybridizations). Triggering events continue until a new ecology has emerged that is filled with organisms capable of utilizing the available resources;
- ecologically-triggered cell and genome restructurings produce organisms which, at some frequency, will possess novel adaptive features that suit the altered environment. Novel adaptive features can be complex from the beginning because they result from processes that operate on pre-existing functional systems, whose components can be amplified and rearranged in new combinations. Competition for resources (purifying selection) serves to eliminate those novel system architectures that are not functional in the new ecology;
- once ecological stability has been achieved, natural genetic engineering functions are silenced, the temp of innovation abates, and microevolution can occur to fine-tune recent evolutionary inventions through successions of minor changes (see Shapiro, 2010).

This modern scenario of evolution (adaptation) suggests an important role of a kind of cell sensitivity and genomic responses to which pointed B. McClintock in her Nobel Prize lecture in 1984. The modern view on evolution suggests link between the environmental changes, reactions of the cell and the body, widespread restructuring of the genome and the rapid emergence of adaptive

changes (inventions). Exactly study of mobile DNA transformed the theory of evolution and adaptation into a cutting-edge science, removed the veil of wonder-working over the possibility of inheritance of «acquired traits» (see Golubovsky, 2000; Golubovsky, 2011; Kunakh, 2011, 2011).

ЛІТЕРАТУРА

1. Артемьева А. М., Будан Х., Клоке Э., Чесноков Ю. В. Использование мобильных генетических элементов *САСТА* для уточнения филогенетических взаимоотношений внутри вида *Brassica rapa* L. // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2011. — **15**, № 2. — С. 398–411.
2. Батыгина Т. Б., Васильева В. Е. Размножение растений. — СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2002. — 232 с.
3. Беляев А. А. Роль мобильных элементов в микроэволюционных процессах у растений на примере *Aegilops speltoides* (Triticeae, Poaceae). Молекулярно-цитогенетический и молекулярно-генетический анализ: Дис. ... докт. биол. наук. — СПб., 2009. — 258 с.
4. Беляев А. А., Раскина О. М. Динамика высокоповторяющейся фракции ДНК как индикатор процесса видообразования у видов семейства Poaceae // Генетика. — 2010. — **46**, № 9. — С. 1266–1268.
5. Берг Л. С. Труды по теории эволюции. — М.: Наука, 1977. — 387 с.
6. Борисов Ю. М. Мобильные элементы, гетерохроматические участки, В-хромосомы и ускорение эволюционных процессов // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр.; В. А. Кунах (голов. ред.). — К.: Логос, 2011. — **10**. — С. 20–25.
7. Борисов Ю. М. Горный Алтай — место взрывной эволюции В-хромосом // Природа. — 2012. — № 5. — С. 10–19.
8. Вавилов Н. И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. — М.: Наука, 1987. — 259 с.
9. Васильева Л. А., Выхристюк О. В., Антоненко О. В., Захаров И. К. Индукция транспозиций мобильных генетических элементов в геноме *Drosophila melanogaster* различными стрессовыми факторами // Информ. вестник ВОГиС. — 2007. — **11**, № 3/4. — С. 662–671.
10. Георгиев Г. П. Гены высших организмов и их экспрессия. — М.: Наука, 1989.
11. Геращенко Г. А., Рожнова Н. А. Мобильные генетические элементы в эволюции пола у растений // Генетика. — 2010. — **46**, № 11. — С. 1445–1457.
12. Геращенко Г. А., Рожнова Н. А., Экольников Л. А., Горбунова В. Ю. Маркирование генов апомиксиса: Почему мы не ищем транспозоны // В кн.: Эмбриология, генетика и биотехнология. Материалы III Международной школы молодых ученых, 29 июня — 3 июля 2009 г. — Саратов: Изд-во Саратовского ун-та, 2009. — С. 133–135.
13. Глазко В. И., Глазко Г. В. Введение в ДНК-технологии и биоинформатику. — К.: Нора-Друк, 2001. — 544 с.
14. Глазко В. И., Глазко Г. В. Русско-англо-украинский толковый словарь по прикладной генетике, ДНК-технологиям и биоинформатике. — К.: КВПЦ, 2001. — 588 с.
15. Голубовская И. Н. Мейоз и гены // Природа. — 2001. — № 10. — С. 64–72.
16. Голубовский М. Д. Век генетики: эволюция идей и понятий. — СПб.: Борей Арт, 2000. — 262 с.
17. Голубовский М. Д. Нестабильность генов и мобильные элементы: к истории изучения и открытия // Историко-биологические исследования. — 2011. — **3**, № 4. — С. 60–78.
18. Грант В. Видообразование у растений. — М.: Мир, 1984. — 528 с.
19. Грант В. Эволюционный процесс. — М.: Мир, 1991. — 488 с.
20. Грач А. А. Альтернативные механизмы удлинения теломер // Цитология и генетика. — 2011. — **45**, № 2. — С. 69–81.
21. Евгеньев М. Б. Мобильные элементы и эволюция генома // Молекулярная биология. — 2007. — **41**, № 2. — С. 234–245.
22. Жакоб Ф., Вольман Э. Пол и генетика бактерий. — М.: Мир, 1962.
23. Жимулев И. Ф. Общая и молекулярная генетика: учеб. пособие. — 2 изд., исп. и доп. — Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2003. — 479 с.
24. Игнатова С. А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. — Одесса: Астропринт, 2011. — 224 с.
25. Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции: учебник для студентов выс-

ших учебных заведений. — СПб.: Изд-во Н-Л, 2010. — 720 с.

26. Карпова І. С., Малюта С. С. Мутагенна дія нуклеїнових кислот і еволюційний процес // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. — 2011. — 9, № 1. — С. 134–146.

27. Каушин А. С. Гаметофитный апомиксис как неустойчивая система семенного размножения у цветковых. — Саратов: Научная книга, 2006. — 310 с.

28. Козерецкая И. А. Мобильные генетические элементы *Drosophila melanogaster*. Популяционно-генетический аспект // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. — 2010. — 8, № 1. — С. 81–90.

29. Колотова Т. Ю., Стегний Б. Т., Кучма И. Ю. и др. Механизмы и контроль перестроек генома эукариот. — Харьков: Коллегиум, 2004. — 264 с.

30. Кордюм В. А. Эволюция и биосфера. — К.: Наук. думка, 1982. — 326 с.

31. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений и факторы, регулирующие этот процесс // Цитология и генетика. — 1980. — 14, № 1. — С. 73–81.

32. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 1. Изменчивость в онтогенезе // Биополимеры и клетка (Biopolym. Cell). — 1994. — 10, № 6. — С. 5–35.

33. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 2. Изменчивость в природе // Биополимеры и клетка (Biopolym. Cell). — 1995. — 11, № 6. — С. 5–40.

34. Кунах В. А. Биотехнология лікарських рослин. Генетичні і фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 730 с.

35. Кунах В. А. Додаткові або В-хромосоми рослин. Походження і біологічне значення // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. — 2010. — 8, № 1. — С. 99–139.

36. Кунах В. А. Пластичность генома соматических клеток и адаптивность растений // Молекулярная и прикладная генетика. — Минск. — 2011. — 12. — С. 7–14.

37. Кунах В. А. Онтогенетическая пластичность генома как основа адаптивности растений // Жебраковские чтения. III. Преобразование геномов. — Минск: Право и экономика, 2011а. — 56 с.

38. Лутова Л. А., Ежова Т. А., Додуева И. Е., Осипова М. А. Генетика развития растений: для биологических специальностей университетов / Ред. С. Г. Инге-Вечтомов. — 2-е изд., перераб. и доп. — СПб.: Изд-во Н-Л, 2010. — 432 с.

39. Лутова Л. А., Проворов Н. А., Тиходеев О. Н. и др. Генетика развития растений. — СПб.: Наука, 2000. — 536 с.

40. Марков А. Рождение сложности. Эволюционная биология сегодня: неожиданные открытия и новые вопросы. — М.: Астрель: CORPUS, 2010. — 527 с.

41. Нефедова Л. Н., Ким А. И. Молекулярная эволюция мобильных элементов группы *gypsy*: гомолог гена *gag* у *Drosophila* // Генетика. — 2009. — 45, № 1. — С. 30–37.

42. Новикова О. С., Блинов А. Г. Возникновение, эволюция и распространение различных групп non-LTR-ретротранспозонов среди эукариотических организмов // Генетика. — 2009. — 45, № 2. — С. 149–159.

43. Овчаренко О. О., Комарницький І. К., Череп М. М. та ін. Отримання міжтрибних соматичних гібридів дигеномного (*Orychophragmus violaceus* + *Arabidopsis thaliana*) та тетрагеномного (*Orychophragmus violaceus* + *Brassica juncea* + *Arabidopsis thaliana*) походження та їх використання для вивчення поведінки гетерологічної системи транспозонів *Spm/dSpm* // Біополімери та клітина (Biopolym. Cell). — 2005. — 21, № 1. — С. 35–41.

44. Овчаренко О. О., Комарницький І. К., Череп М. М. та ін. Отримання і аналіз соматичних гібридів *Brassica napus* + *Arabidopsis thaliana*, що містять гетерологічну систему транспозонів *Spm/dSpm* // Цитология и генетика. — 2005а. — 9, № 3. — С. 50–56.

45. Овчаренко О. О., Рудас В. А., Кучук М. В. Мобільні генетичні елементи рослин та їх використання в генетиці та біотехнології // Цитология и генетика. — 2006. — 40, № 4. — С. 68–81.

46. Оно С. Генетические механизмы прогрессивной эволюции. — М.: Мир, 1973. — 228 с.

47. Патрушев Л. И., Минкевич И. Г. Проблема размера геномов эукариот // Успехи биологической химии. — 2007. — 47. — С. 293–370.

48. Підпала О. В., Яцишина А. П., Лукаш Л. Л. Мобільні генетичні елементи геному людини:

- структура, розподіл і функціональна роль // Цитология и генетика. — 2008. — **42**, № 6. — С. 69–81.
49. *Попадьин К. Ю.* Эволюция полового размножения: роль вредных мутаций и мобильных элементов // Журнал общей биологии. — 2003. — **64**, № 6. — С. 463–478.
50. *Ратнер В. А., Васильева Л. А.* Мобильные генетические элементы (МГЕ): «эгоистическая ДНК» или функциональная часть генома? // Современные концепции эволюционной генетики. — Новосибирск. — 2000. — С. 128–150.
51. *Рутц Р. И.* Научные основы и практические результаты селекции яровой мягкой пшеницы и озимых мятликовых культур в Западной Сибири. — Новосибирск: ИПЦ Юпитер, 2005. — 624 с.
52. *Сергеева Е. М., Салина Е. А.* Мобильные элементы и эволюция генома растений // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2011. — **15**, № 2. — С. 382–397.
53. *Сиволап Ю. М., Кожухова Н. Э., Календарь Р. Н.* Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений. — Одесса: Астропринт, 2011. — 336 с.
54. Словник української біологічної термінології. — К.: КММ, 2012. — 744 с.
55. *Смышляев Г. А., Блинов А. Г.* Эволюция и разнообразие *L1*-ретротранспозонов в геномах покрытосеменных растений // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2011. — **15**, № 3. — С. 563–571.
56. *Созинов А. А.* Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. — М.: Наука, 1985. — 279 с.
57. *Соловьева А. Е., Артемьева А. М., Чесноков Ю. В.* Идентификация последовательностей элементов *Ac*, *MuDR*, *Fag 1* и *CASTA* в геномах видов рода *Brassica* // V съезд ВОГиС. — М., 21–28 июня 2009. — Ч. 1. — С. 329.
58. *Сормачева И. Д., Блинов А. Г.* LTR-ретротранспозоны растений // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2011. — **15**, № 2. — С. 351–381.
59. *Стент Г., Кэлиндар Р.* Молекулярная генетика. — М.: Мир, 1981. — 646 с.
60. *Степочкин П. И., Артемова Г. В.* О факторах, влияющих на возникновение яровых растений в популяциях озимой пшеницы, ржи и тритикале // Информ. вестник ВОГиС. — 2008. — **12**, № 4. — С. 710–716.
61. *Тимофеев-Рессовский Н. В., Воронцов Н. Н., Яблоков А. В.* Краткий очерк теории эволюции. — М.: Наука, 1969. — 408 с.
62. *Хесин Р. Б.* Непостоянство генома. — М.: Наука, 1984. — 472 с.
63. *Чересиз С. В., Юрченко Н. Н., Иванников А. В., Захаров И. К.* Мобильные элементы и стресс // Информ. вестник ВОГиС. — 2008. — **12**, № 1/2. — С. 216–241.
64. *Черепенко Е. И.* Молекулярные защитные механизмы клетки и фармакотерапия. — К.: Наук. думка, 2012. — 262 с.
65. *Шестаков С. В.* Горизонтальный перенос генов у эукариот // Информ. вестник ВОГиС. — 2009. — **13**, № 2. — С. 345–354.
66. *Шнырева А. В.* Транспозоны как факторы различных перестроек и модификаций в геномах грибов // Генетика. — 2003. — **39**, № 5. — С. 621–636.
67. *Шпильчин В. В., Терновська Т. К.* Мобільні генетичні елементи рослин // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. — 2010. — **8**, № 1. — С. 154–164.
68. *Эльконин Л. А., Геращенко Г. А., Цветова М. И., Рожнова Н. А.* Генетическая изменчивость в линии сорго с множественной генетической нестабильностью, индуцированной бромистым этидием в культуре *in vitro* // Генетика. — 2010. — **46**, № 7. — С. 911–922.
69. *Юрченко Н. Н., Коваленко Л. В., Захаров И. К.* Мобильные генетические элементы: нестабильность генов и геномов // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2011. — **15**, № 2. — С. 261–270.
70. *Яблонка Е., Лэмб М.* Эпигеном в эволюции: за пределами современного синтеза // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. — 2008. — **6**, № 2. — С. 337–355.
71. *Aarts M. G. M., Corzaan P., Stiekema W. J., Pereira A.* A two-element Enhancer-Inhibitor transposon system in *Arabidopsis thaliana* // Mol. Gen. Genet. — 1995. — **247**, N 5. — P. 555–564.
72. *Adams K. L., Wendel J. F.* Polyploidy and genome evolution in plants // Curr. Opin. Plant Biol. — 2005. — **8**. — P. 135–141.
73. *Adamson C. S., Jones I. M.* The molecular basis of HIV capsid assembly — five years of

progress // Rev. Med. Virol.— 2004.— **14**.— P. 107–121.

74. Akhunov E. D., Akhunova A. R., Dvorak J. Mechanisms and rates of birth and death of dispersed duplicated genes during the evolution of a multigene family in diploid and tetraploid wheats // Mol. Biol. Evol.— 2007.— **24**, N 2.— P. 539–550.

75. Akiyama Y., Conner J. A., Goel S. et al. High-resolution physical mapping in *Pennisetum squamulatum* reveals extensive chromosomal heteromorphism of the genomic region associated with apomixis // Plant Physiol.— 2004.— **134**.— P. 1733–1741.

76. Alisch R. S., Carcia-Perez J. I., Muotri A. R., Gage F. H. et al. Unconventional translation of mammalian LINE-1 retrotransposons // Genes. Dev.— 2006.— **20**.— P. 210–224.

77. Alix K., Joets J., Ryder C. D. et al. The CACTA transposon *Bot 1* played a major role in *Brassica* genome divergence and gene proliferation // Plant J.— 2008.— **56**, N 6.— P. 1030–1044.

78. Alleman M., Freeling M. The Mu-transposable regulation of maize — evidence for transposition and copy number regulation during development // Genetics.— 1986.— **112**.— P. 107–119.

79. Allen E., Xie Z., Gustafson A., Sung G-H. et al. Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana* // Nature Genetics.— 2004.— **36**.— P. 1282–1290.

80. Almeida R., Allshire R. C. RNA silencing and genome regulation // Trends Cell Biol.— 2005.— **15**.— P. 251–258.

81. Altinkut A., Kotseruba V., Kirzhner V. M. et al. *Ac*-like transposons in population of wild diploid Triticeae species: comparative analysis of chromosomal distribution // Chromosome Research.— 2006.— **14**, N 3.— P. 307–317.

82. Altinkut A., Raskina O., Nevo E., Beilyayev A. *En/Spm*-like transposons in Poaceae species: transposase sequences variability and chromosomal distribution // Cell Mol. Biol. Let.— 2006.— **11**.— P. 214–229.

83. Amasino R. Vernalization, competence, and the epigenetic memory of winter // The Plant Cell.— 2004.— **16**.— P. 2553–2559.

84. Antonius-Klemola K., Kalendar R., Schulman A. H. TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports // Theor. Appl. Genet.— 2006.— **112**.— P. 999–1008.

85. Anzai T., Osanai M., Hamada M., Fujiwara H. Functional roles of 3'-terminal structures of template RNA during *in vivo* retrotransposition of non-LTR retrotransposon, R1Bm // Nucleic Acids Res.— 2005.— **33**.— P. 1993–2002.

86. Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* // Nature.— 2000.— **408**, N 6814.— P. 796–815.

87. Aravin A. A., Hannon G. J., Brennecke J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race // Science.— 2007.— **318**.— P. 761–764.

88. Aravin A. A., Sachidanandam R., Fejes-Toth K., Hannon G. J. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control // Science.— 2007.— **316**.— P. 744–747.

89. Arkhipova I. R., Meselson M. Transposable elements in sexual and ancient asexual taxa // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2000.— **97**.— P. 14473–14477.

90. Arkhipova I. R., Morrison H. G. Three retrotransposon families in the genome of *Giardia lamblia*: two telomeric, one dead // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2001.— **98**.— P. 14497–14502.

91. Arnaud P., Yukawa Y., Lavie L. et al. Analysis of the SINE S1 pol III promoter from *Brassica*; impact of methylation and influence of external sequences // Plant J.— 2001.— **26**.— P. 295–305.

92. Arnold-Schmitt B. Stress-induced cell reprogramming. A role for global regulation // Plant Physiol.— 2004.— **136**.— P. 2579–2586.

93. Ast G. How did alternative splicing evolve? // Nat. Rev. Genet.— 2004.— **5**.— P. 773–782.

94. Ayliffe M. A., Pallotta M., Langridge P., Pryor A. J. A barley activation tagging system // Plant Mol. Biol.— 2007.— **64**, N 3.— P. 329–347.

95. Baker B., Schell J., Lorz H., Fedoroff N. Transposition of the maize controlling element «Activator» in tobacco // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1986.— **83**, N 13.— P. 4844–4848.

96. Balagopal V., Parker R. Polysomes, P bodies stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 2009. — **21**. — P. 403–408.
97. Bao W., Kapitonov V.V., Jurka J. Ginger DNA transposons in eukaryotes and their evolutionary relationships with long terminal repeat retrotransposons // *Mob. DNA*. — 1:3.
98. Barkman T.J., McNeal J.R., Lim S-H. et al. Mitochondrial DNA suggests at least 11 origins of parasitism in angiosperms and reveals genomic chimerism in parasitic plants // *BMC Evol. Biol.* — 2007. — **7**. — P. 248.
99. Bartels D., Salamini F. Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level // *Plant Physiol.* — 2001. — **127**. — P. 1346–1353.
100. Bastow R., Mylne J., Lister C. et al. Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation // *Nature*. — 2004. — **427**. — P. 164–167.
101. Baumel A., Ainonche M., Kalendar R., Schulman A.H. Retrotransposons and genomic stability in population of the young allopolyploid species *Spartina anglica* C.E. Hubard (Poaceae) // *Mol. Biol. Evol.* — 2002. — **19**, N 8. — P. 1218–1227.
102. Becker J.D., Feijo J.A. How many genes are needed to make a pollen tube? Lessons from transcriptomic // *Ann. Bot. (Lond.)* — 2007. — **100**. — P. 1117–1123.
103. Beguiristain T., Grandbastien M.A., Puigdomenech P., Casacuberta J.M. Three *Tnt1* subfamilies show different stress-associated patterns of expression in tobacco. Consequences for retrotransposon control and evolution in plants // *Plant Physiol.* — 2001. — **127**. — P. 212–221.
104. Belyayev A., Kalendar R., Brodsky L. et al. Transposable elements in a marginal plant population: temporal fluctuations provide new insights to genome evolution of wild diploid wheat // *Mobile DNA*. — 2010. — **1**, N 6. — P. 1–16.
105. Belyayev A., Raskina O. Heterochromatin discrimination in *Aegilops speltoides* by simultaneous genomic *in situ* hybridization // *Chromosome Res.* — 1998. — **6**. — P. 559–665.
106. Belyayev A., Raskina O., Nevo E. Chromosomal distribution of reverse transcriptase-containing retroelements in two Triticeae species // *Chromosome Res.* — 2001. — **9**. — P. 129–136.
107. Belyayev A., Raskina O., Nevo E. Evolutionary dynamics and chromosomal distribution of repetitive sequences on chromosomes of *Aegilops speltoides* revealed by genomic *in situ* hybridization // *Heredity*. — 2001. — **86**. — P. 738–742.
108. Belyayev A., Raskina O., Nevo E. Variability of Ty3-gypsy retrotransposons chromosomal distribution in population of two wild Triticeae species // *Cytogenet. Gen. Res.* — 2005. — **109**. — P. 43–49.
109. Bennet M.D., Leith I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms // *Ann. Bot. (Lond.)*. — 1995. — **76**. — P. 113–176.
110. Bennetzen J.L. Mechanisms and rates of genome expansion and contraction in flowering plants // *Genetica*. — 2000. — **115**. — P. 29–36.
111. Bennetzen J.L. Transposable element contribution to plant gene and genome evolution // *Plant Mol. Biol.* — 2000. — **42**, N 1. — P. 251–269.
112. Bennetzen J.L. Mechanisms and rates of genome expansion and contraction in flowering plants // *Genetica*. — 2002. — **115**. — P. 29–36.
113. Bennetzen J.L. Opening the door to comparative plant biology // *Science*. — 2002. — **296**. — P. 60–63.
114. Bennetzen J.L. Transposable elements, gene creation and genome rearrangement in flowering plants // *Current Opin. Genet. Dev.* — 2005. — **15**. — P. 621–627.
115. Bennetzen J.L. Patterns in grass genome evolution // *Curr. Opin. Plant Biol.* — 2007. — **10**. — P. 176–181.
116. Bennetzen J.L., Ma J., Devos K.M. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants // *Ann. Bot.* — 2005. — **95**, N 1. — P. 127–132.
117. Bennetzen J.L., Sanmiguel P., Chen M. et al. Grass genomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1998. — **95**. — P. 1975–1978.
118. Bennetzen J.L., Springer P.S. The generation of Mutator transposable element subfamilies in maize // *Theor. Appl. Genet.* — 1994. — **87**. — P. 657–667.
119. Bergthorsson U., Richardson A.O., Young G.J. et al. Massive horizontal transfer of mitochondrial genes from diverse land plant donors to the basal

- angiosperm *Amborella* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2004.— **101**.— P. 17747–17752.
120. Bernet G. P., Asins M. J. Identification and genomic distribution of gypsy like retrotransposons in *Citrus* and *Poncirus* // Theor. Appl. Genet.— 2003.— **108**.— P. 121–130.
121. Biemont C. Within-species variation in genome size // Heredity.— 2008.— **101**.— P. 297–298.
122. Biemont C. Are transposable elements simply silenced or are they under house arrest? // Trends Genet.— 2009.— **25**.— P. 333–334.
123. Biemont C., Viera C. Junk DNA as an evolutionary force // Nature.— 2006.— **443**.— P. 521–524.
124. Block K., Ising G. Minichromosomes in *Drosophila melanogaster* derived from transposing element TE1 // Chromosoma.— 1990.— **99**.— P. 336–343.
125. Boivin K., Acarkan A., Mbulu R. S. et al. The *Arabidopsis* genome sequence as a tool for genome analysis in *Brassicaceae*. A comparison of the *Arabidopsis* and *Capsella rubella* genomes // Plant Physiol.— 2004.— **135**.— P. 735–744.
126. Boutabout M., Wilhelm M., Wilhelm F. X. DNA synthesis fidelity by the reverse transcriptase of the yeast retrotransposon *Ty1* // Nucl. Acids Res.— 2001.— **29**.— P. 2217–2222.
127. Boyko E., Kalendar R., Korzun V. et al. Combined mapping of *Aegilops tauschii* by retrotransposon, microsatellite, and gene markers // Plant Mol. Biol.— 2002.— **48**.— P. 767–790.
128. Böhmendorfer G., Hofacker I. L., Garber K. et al. Unorthodox mRNA start site to extend the highly structured leader of retrotransposon Tto1 mRNA increases transposition rate // RNA.— 2005.— **11**.— P. 1181–1191.
129. Böhmendorfer G., Tramontano A., Luxa K., Bachmair A. A synthetic biology approach allows inducible retrotransposition in whole plants // Syst. Synth. Biol.— 2010.— **4**.— P. 133–138.
130. Brakke M. K. Mutations, the aberrant ratio phenomenon, and virus infection of maize // Annu. Rev. Phytopathol. V, 22. Palo Alto, Calif.,— 1984.— P. 77–94.
131. Brandes A., Heslop-Harrison J. S., Kamm A. et al. Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of *Ty1-copia*-like retrotransposon in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms // Plant Mol. Biol.— 1997.— **33**.— P. 11–21.
132. Bregliano J.-C., Laurenson A., Degroote F. Evidence for an inducible repair-recombination system in the female germ line of *Drosophila melanogaster*. I. Induction by inhibitors of nucleotide synthesis and by gamma rays // Genetics.— 1995.— **141**.— P. 571–578.
133. Brennecke J., Malone C. D., Aravin A. A. et al. An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing // Science.— 2008.— **322**.— P. 1387–1392.
134. Breto M. P., Ruiz C., Pina J. A., Asins M. J. The diversification of *Citrus clementina* Hort. Ex Tan., a vegetatively propagated crop species // Mol. Phytoenet Evol.— 2001.— **21**.— P. 285–293.
135. Britten R. J. The majority of human genes have regions repeated in other human genes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2005.— **102**.— P. 5466–5470.
136. Briza J., Niedermeierova H., Pavingerova D. et al. Transposition patterns of unlinked transposed *Ds* element from two T-DNA loci on tomato chromosomes 7 and 8 // Mol. Genet. Genom.— 2002.— **266**.— P. 882–890.
137. Brower-Toland B., Findley S. D., Jiang L. et al. *Drosophila* PIWI associates with chromatin and interacts directly with HP1a // Genes Dev.— 2007.— **21**.— P. 2300–2311.
138. Bruggman R., Bharti A. K., Gundlach H. et al. Uneven chromosome contraction and expansion in the maize genome // Genome Res.— 2006.— **16**.— P. 1241–1251.
139. Brunner S., Fengler K., Morgante M. et al. Evolution of DNA sequence non-homologies among maize inbreds // Plant Cell.— 2005.— **17**.— P. 343–360.
140. Brunner S., Pea G., Rafalski A. Origin, genetic organization and transcription of a family of non-autonomous helitron elements in maize // The Plant Journal.— 2005a.— **43**.— P. 799–810.
141. Bureau T. E., Ronald P. C., Wessler S. R. A computer-based systematic survey reveals the predominance of small inverted-repeat elements in wild-type rice genes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1996.— **93**.— P. 8524–8529.
142. Bureau T. E., Wessler S. R. Stowaway: a new family of inverted-repeat elements associated with genes of both monocotyledonous and di-

- cotyledonous plants // *Plant Cell*. — 1994. — **6**. — P. 907–916.
143. *Bureau T.E., White S.* Transduction of a cellular gene by a plant retroelement // *Cell*. — 1994. — **77**. — P. 479–480.
144. *Burr B., Burr F.A.* Activation of silent transposable elements // *Plant Transposable Elements*. Plenum Press, N.Y. — 1988. — P. 311–323.
145. *Burt A., Trivers R.* Genes in conflict. The biology of selfish genetic elements // The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, London, England. — 2006. — 602 p.
146. *Cai X., Xu S.S.* Meiosis-driven genome variation in plants // *Current Genomics*. — 2007. — **8**. — P. 151–161.
147. *Camacho J.P.M., Sharbel T.F., Beukeboom L.W.* B-chromosome evolution // *Phil. Trans. R. Soc. Lond., B*. — 2000. — **355**. — P. 163–178.
148. *Cantrell M.A., Filanoski B.J., Ingemann A.R. et al.* An ancient retrovirus-like element contains hot spots for SINE insertion // *Genetics*. — 2001. — **158**. — P. 769–777.
149. *Capy P., Gaspery G., Biemont C., Bazin C.* Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? // *Heredity*. — 2000. — **85**. — P. 101–106.
150. *Carchilan M., Kumke K., Mikolajewski S., Houben A.* Rye B chromosomes are weakly transcribed and might alter the transcriptional activity of A chromosome sequences // *Chromosoma*. — 2009. — **118**. — P. 607–616.
151. *Carmell M.A., Girard A., van de Kant, H.J. et al.* MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline // *Dev. Cell*. — 2007. — **12**. — P. 503–514.
152. *Casacuberta J.M., Santiago N.* Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes // *Gene*. — 2003. — **311**. — P. 1–11.
153. *Chandler V.L., Walbot V.* DNA modification of a maize transposable element correlates with loss of activity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1986. — **83**. — P. 1767–1771.
154. *Chang R.Y., O'Donoghue L.S., Bureau T.E.* Inter-MITE polymorphism (IMP): a high throughput transposon-based genome mapping and fingerprinting approach // *Theor. Appl. Genet.* — 2001. — **102**. — P. 773–781.
155. *Chao L. et al.* Transposable elements as mutator genes in evolution // *Nature*. — 1983. — **303**. — P. 633–635.
156. *Charles M., Belcram H., Just J. et al.* Dynamics and differential proliferation of transposable elements during the evolution of the B and A genomes of wheat // *Genetics*. — 2008. — **180**. — P. 1071–1086.
157. *Charlesworth D.* Plant sex determination and sex chromosomes // *Heredity*. — 2002. — **88**. — P. 94–101.
158. *Chang Y.-Ch., Pfitzner A.J.P., Pfitzner U.M. et al.* Construction of an inducible transposon, *INAc*, to develop a gene tagging system in higher plants // *Mol. Breed.* — 2000. — **6**. — P. 353–367.
159. *Checkley M.A., Nagashima K., Lokett S.J., Nyswaner K.M. et al.* P-body components are required for *Ty1* retrotransposition during assembly of retrotransposition competent virus-like particles // *Mol. Cell. Biol.* — 2010. — **30**. — P. 382–398.
160. *Cheng C., Daigen M., Hirochika H.* Epigenetic regulation of the rice retrotransposon Tos17 // *Mol. Gen. Genom.* — 2006. — **276**. — P. 378–390.
161. *Cheng C., Motohashi R., Tsuchimoto S. et al.* Polyphyletic origin of cultivated rice: based on the interspersal pattern of SINEs // *Mol. Biol. Evol.* — 2003. — **20**. — P. 67–75.
162. *Cheng C., Tsuchimoto S., Ohtsubo H., Ohtsubo E.* Evolutionary relationships among rice species with AA genome based on SINE insertion analysis // *Gen. Genetic Systems*. — 2002. — **77**. — P. 323–334.
163. *Cheng X., Lin B.-Y.* Molecular organization of large fragments in the maize B chromosome: indication of a novel repeat // *Genetics*. — 2004. — **16**, N 6. — P. 1947–1961.
164. *Cheng X., Zhang D., Cheng Z. et al.* A new family of *Ty1-copia*-like retrotransposons originated in the tomato genome by a recent horizontal transfer event // *Genetics*. — 2009. — **181**. — P. 1183–1193.
165. *Choulet F., Wicker T., Rustenholz C. et al.* Megabase level sequencing reveals contrasted organization and evolution patterns of the wheat gene and transposable element space // *Plant Cell*. — 2010. — P. 1686–1701.

166. Collier L. S., Largaespada D. A. Transposable elements and the dynamic somatic genome // *Genome Biology*.— 2007.— 8 (suppl I), Article S5 (doi 10.1186/gb-2007-8-S1-S5).
167. Cook J. M., Martin J., Lewin A. et al. Systematic screening of *Anopheles mosquito* genomes yields evidence for major clade of Pao-like retrotransposons // *Insect Mol. Biol.*— 2000.— 9.— P. 109–117.
168. Copenhaver G. P., Nickel K., Kuromori T. et al. Genetic definition and sequence analysis of *Arabidopsis* centromeres // *Science*.— 1999.— 286.— P. 2468–2474.
169. Craig N. L., Craigie R., Gellert M., Lambowitz A. M. Mobile DNA II // Amer. Soc. Microbiol. Press, Washington, DC, 2002.
170. Cresse A. D., Hulbert S. H., Brown W. E. et al. *Mul*-related transposable elements of maize preferentially insert into low copy number DNA // *Genetics*.— 1995.— 140, N 1.— P. 315–324.
171. Cridland J., Thronton K. Validation of rearrangement breakpoints identified by paired-end sequencing in natural populations of *Drosophila melanogaster* // *Genome Biol. Evol.*— 2010.— 2.— P. 83–101.
172. Dai J., Xie W., Brady T. L. et al. Phosphorylation regulates integration of the yeast *Ty5* retrotransposon into heterochromatin // *Mol. Cell*.— 2007.— 27.— P. 289–299.
173. Dallot S. et al. Evidence that the proliferation stage of micropropagation procedure is detrimental in the expression of *Banana streak virus* integrated into the genome of FHIA 21 hybrid (*Musa* AAAB) // *Arch. Virol.*— 2001.— 146.— P. 2179–2190.
174. Dash S., Peterson P. A. Frequent loss of the *En* transposable element after excision and its relation to chromosome replication in maize (*Zea mays* L.) // *Genetics*.— 1994.— 136, N 2.— P. 653–671.
175. Davis C. C., Wurdack K. J. Host-to-parasite gene transfer in flowering plants: phylogenetic evidences from *Malpighiales* // *Science*.— 2004.— 305.— P. 676–678.
176. Dawe R. K. RNA interference, transposons, and the centromere // *Plant Cell*.— 2003.— 15.— P. 297–301.
177. de Almeida L. M., Carareto C. M. Multiple events of horizontal transfer of the *Minos* transposable element between *Drosophila* species // *Mol. Phylogenet. Evol.*— 2005.— 35.— P. 583–594.
178. Dean C., Sjodin K., Page T. et al. Behavior of the maize transposable element *Ac* in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.*— 1992.— 2, N 1.— P. 69–81.
179. De la Chaux, Tsuchimatsu T. et al. The predominantly selfing plant *Arabidopsis thaliana* experienced a recent reduction in transposable element abundance compared to its outcrossing relative *Arabidopsis lyrata* // *Mobile DNA*.— 2012.— 3:2 doi:10.1186/1759-8753-3-2.
180. Der J. P., Barker M. S., Wickett N. J. et al. *De novo* characterization of the gametophyte transcriptome in bracken fern, *Pteridium aquilinum* // *BMC Genomics*.— 2011.— 12.— P. 99.
181. Deragon J. M., Casacuberta J. M., Panaud O. Plant transposable elements // *Plant Genomes. Genom Dyn* / Eds Volff J.-N. Basel: Karger, 2008.— 4.— P. 69–82.
182. Deragon J. M., Zhang X. Short interspersed elements (SINEs) in plant: origin, classification, and use as phylogenetic markers // *Syst. Biol.*— 2006.— 55, N 6.— P. 949–956.
183. d'Erfurth I., Cosson V., Eschstruth A. et al. Rapid inactivation of the maize transposable element *En/Spm* in *Medicago truncatula* // *Mol. Gen. Genom.*— 2003.— 269.— P. 732–745.
184. Devos K. M., Brown J. K. M., Bennetzen J. L. Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in *Arabidopsis* // *Genome Res.*— 2002.— 12.— P. 1075–1079.
185. De Vries H. Species and varieties: their origin by mutation (Lectures delivered at the University of California / Ed. by D. T. McDougal). Chicago: Open Court Publ., 1906.
186. Diao X., Freeling M., Lisch D. Horizontal transfer of a plant transposon // *PLoS Biol.*— 2006.— 4, N 1.— P. 119–128.
187. Dmitriev S. E., Andreev D. E., Terenin I. M. et al. Efficient translation initiation directed by the 900-nucleotide-long and GC-rich 5' untranslated region of the human retrotransposon LINE-1 mRNA is strictly cap dependent rather than internal ribosome entry site mediated // *Mol. Cell Biol.*— 2007.— 27.— P. 4685–4697.
188. Docking T. R., Saader F. E., Elliott M. C., Schoen D. J. Retrotransposon sequence variation

in four asexual plant species // *J. Mol. Evol.* — 2006. — **62**. — P. 375–387.

189. Doolittle W.F., Sapienza C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution // *Nature*. — 1980. — **284**. — P. 601–603.

190. Dooner H.K., He L.M. Maize genome structure variation: Interplay between retrotransposon polymorphisms and genic recombination // *Plant Cell*. — 2008. — **20**. — P. 249–258.

191. Döring H.P., Nelsen-Salz B., Garber R., Tillmann E. Double *Ds* elements are involved in specific chromosome break-age // *Mol. Gen. Genom.* — 1989. — **219**. — P. 299–305.

192. Du C. et al. The polychromatic *Helitron* landscape of the maize genome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2009. — **106**. — P. 19916–19921.

193. Du J., Tian Z., Bowen N.J. et al. Bifurcation and enhancement of autonomous-nonautonomous retrotransposon partnership through LTR Swapping in soybean // *Plant Cell*. — 2010. — **22**. — P. 48–61.

194. Dunoyer P., Himber C., Voinet O. DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal // *Nat. Genet.* — 2005. — **37**. — P. 1356–1360.

195. Ebinuma H., Sugita K., Matsunaga E., Yamacado M. Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1997. — **94**. — P. 2117–2121.

196. Eickbush T.H., Jamburuthugoda V.K. The diversity of retrotransposons and the properties of their reverse transcriptases // *Virus Res.* — 2008. — **134**. — P. 221–234.

197. Eilam T., Anikster Y., Miliet E. et al. Genome size and genome evolution in diploid *Triticeae* species // *Genome*. — 2007. — **50**. — P. 1029–1037.

198. Emerson R.A. Genetical studies on variegated pericarp in maize // *Genetics*. — 1917. — **2**. — P. 1–35.

199. Enckwort L.J.G., van Bergervoet J.E.M., Stickema W.J. et al. Selection of independent *Ds* transposon in somatic tissue of potato by protoplast regeneration // *Theor. Appl. Genet.* — 2000. — **101**, N 4. — P. 503–510.

200. Engels W. Extrachromosomal control mutability in *Drosophila melanogaster* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1979. — **76**. — P. 4011–4015.

201. English J., Harrison K., Jones J.D. A genetic analysis of DNA sequence requirements for Dissociation state I activity in tobacco // *Plant Cell*. — 1993. — **5**. — P. 501–514.

202. English J., Harrison K., Jones J.D.G. Aberrant transposition of maize double *Ds*-like elements usually involved *Ds* ends on sister chromatids // *Plant Cell*. — 1995. — **7**. — P. 1235–1247.

203. Esnault C., Maestre J., Heidmann T. Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes // *Nat. Genet.* — 2000. — **24**. — P. 363–367.

204. Estoup A., Cornuet J.M. Microsatellite evolution: inferences from population data // In: *Microsatellites* (ed. Goldstein DBaSC). — Oxford University Press, New York. — 1999. — P. 49–65.

205. Ewing A.D., Ballinger T.J., Earl D. Retrotransposition of gene transcripts leads to structural variation in mammalian genomes // *Genome Biology*. — 2013. — **14**: R22. Режим доступу: <http://genomebiology.com/2013/14/3/R22>.

206. Farkash E., Prak E. DNA damage *L1* retrotransposition // *J. Biomed. Biotechnol.* — 2006. — **26**. — P. 1–8.

207. Fedoroff N.V. Maize transposable elements // In *Mobile DNA* / Ed. D.E. Berg, M.M. Howe. — 1989. — Amer. Soc. Microbiol., Washington, DC. — P. 375–411.

208. Fedoroff N.V. Transposons and genome evolution in plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2000. — **97**, N 13. — P. 7002–7007.

209. Fedoroff N.V. Transposable elements, epigenetics, and genome evolution // *Science*. — 2012. — **338**. — P. 758–767.

210. Fedoroff N.V. McClintock's challenge in the 21st century // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2012. — **109**, N 50. — P. 20200–20203.

211. Fedoroff N.V., Furtek D., Nelson O. Cloning of the *Bronze* locus in maize by simple and generalizable procedure using the transposable controlling element *Ac* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1984. — **81**. — P. 3825–3839.

212. Fedoroff N.V., Wessler S., Shure M. Isolation of the transposable maize controlling elements *Ac* and *Ds* // *Cell*. — 1983. — **35**. — P. 235–242.

213. Feng Q., Zhang Y., Hao P. et al. Sequence and analysis of rice chromosome 4 // *Nature*. — 2002. — **420**. — P. 316–320.

214. Feschotte C. Opinion — Transposable elements and the evolution of regulatory networks // *Nat. Rev. Genet.* — 2008. — **9**. — P. 397–405.
215. Feschotte C., Pritham E.J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes // *Ann. Rev. Genet.* — 2007. — **41**. — P. 331–368.
216. Feschotte C., Wessler S.R. Treasures in the attic: rolling circle transposons discovered in eukaryotic genomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2001. — **98**. — P. 8923–8924.
217. Finnegan E., Sheldon C., Jardinaud F. et al. A cluster of *Arabidopsis* genes with a coordinate response to environmental stimulus // *Current Biology.* — 2004. — **14**. — P. 911–916.
218. Flavell A.J., Bolshakov V.N., Booth A. et al. A microarray-based high throughput molecular marker genotyping method; the tagged microarray marker (TAM) approach // *Nucleic Acids Res.* — 2003. — **31**: e115.
219. Flavell A.J., Knox M.R., Peacock S.R., Ellis T.H. Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput markers analysis // *Plant J.* — 1998. — **16**. — P. 643–650.
220. Floyd S.K., Bowman J.L. Gene regulation: ancient microRNA target sequences in plants // *Nature.* — 2004. — **428**. — P. 485–486.
221. Fontdevila A. Hybrid genome evolution by transposition // *Cytogenet. Genome Res.* — 2005. — **110**. — P. 49–55.
222. Fortune P.M., Roulin A., Panaud O. Horizontal transfer of transposable elements in plants // *Commun Integr. Biol.* — 2008. — **1**. — P. 74–77.
223. Friedman W.E. Expression of the cell cycle in sperm of *Arabidopsis*: implication for understanding patterns of gametogenesis and fertilization in plants and other eukaryotes // *Development.* — 1999. — **126**. — P. 1065–1075.
224. Fu H., Dooner H.K. Intracellular violation of genetic colinearity and its implications in maize // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2002. — **99**. — P. 9573–9578.
225. Gallois-Montbrun S., Kramer B., Swanson C.M. et al. Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules // *J. Virol.* — 2007. — **81**. — P. 2165–2178.
226. Gaut B.S. et al. Opinion — Recombination: an underappreciated factor in the evolution of plant genomes // *Nat. Rev. Genet.* — 2007. — **8**. — P. 77–84.
227. Geering A.D.W. et al. Banana contains a diverse array of endogenous badnaviruses // *J. Gen. Virol.* — 2005. — **86**. — P. 511–520.
228. Gibbons R., Dugaiczuk L.I., Girke T. et al. Distinguishing humans from great apes with AluYb8 repeats // *J. Mol. Biol.* — 2004. — **339**. — P. 721–729.
229. Gilbert W. Why genes in pieces? // *Nature.* — 1978. — **271**. — P. 501.
230. Gilbert W. The exon theory of genes // *Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol.* — 1987. — **52**. — P. 901–905.
231. Gifford R., Tristem M. The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses // *Virus Genes.* — 2003. — **26**. — P. 291–315.
232. Goddard M.R., Greig D., Burt A. Outcrossed sex allows a selfish gene to invade yeast population // *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* — 2001. — **268**. — P. 2537–2542.
233. Goff S.A., Ricke D., Lan T.H. et al. A draft of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*) // *Science.* — 2002. — **296**. — P. 92–100.
234. Golubovsky M.D. The unity of the whole and freedom of parts: facultativeness principle in the hereditary system // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* — 2011. — **15**, № 2. — С. 423–431.
235. Gomes E., Schulman A.H., Martinez-Izquierdo J.A., Vicient C.M. Integrase diversity and transcription of the maize retrotransposon Grande // *Genome.* — 2006. — **49**. — P. 558–562.
236. Goodier J.L., Zhang L., Vetter M.R., Kazazian H.H. LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex // *Mol. Cell Biol.* — 2007. — **27**. — 6469–6483.
237. Grandbastien M.A. Activation of plant retrotransposons under stress conditions // *Trend Plant Sci.* — 1998. — **3**. — P. 181–187.
238. Grandbastien M.A. Retrotransposons of Plants // *Encyclopedia of virology*. 3rd ed. Elsevier. Oxford (UK). — 2008. — **5**. — P. 428–436.
239. Grandbastien M.A., Audeon C., Bonniard E. et al. Stress activation and genomic impact of *Tnt1* retrotransposons in Solanaceae // *Cytogenet. Genome Res.* — 2005. — **110**. — P. 229–241.

240. Grandbastien M.A., Lucas H., Morel J.B. *et al.* The expression of the tobacco *Tnt1* retrotransposon is linked to plant defense responses // *Genetica*. — 1997. — **100**. — P. 241–252.
241. Grandbastien M.A., Spielman A., Caboche M. *Tnt1*, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics // *Nature*. — 1989. — **337**. — P. 376–380.
242. Grant-Downton R.T., Dickinson H.G. Epigenetics and its implications for plant biology. 1. The epigenetic network in plants // *Ann. Bot.* — 2005. — **96**. — P. 1143–1164.
243. Grant-Downton R.T., Dickinson H.G. The «epigenetic epiphany»: epigenetics, evolution and beyond // *Ann. Bot.* — 2006. — **97**. — P. 11–27.
244. Gray Y.H.M. It takes two transposons to tango transposable-element-mediated chromosomal rearrangements // *Trends in Genetics*. — 2000. — **16**. — P. 461–468.
245. Greco R., Ouwerkerk P.B.F., Taal A.J.C. *et al.* Early and multiple *Ac* transposon in rice suitable for efficient insertional mutagenesis // *Plant Mol. Biol.* — 2001. — **46**. — P. 215–227.
246. Greco R., Ouwerkerk P.B.F., Taal A.J.C. *et al.* Transcription and somatic transposition of the maize *En/Spm* transposon system in rice // *Mol. Gen. Genom.* — 2004. — **270**. — P. 514–523.
247. Green M.M. The genetics of mutable gene at the white locus // *Genetics*. — 1967. — N 5. — P. 429–441.
248. Green M.M. Controlling element, mediated transposition of the white gene in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. — 1969. — **61**. — P. 429–441.
249. Green M.M. Genetic instability in *Drosophila melanogaster*: de novo induction of putative insertion mutations // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1977. — **74**. — P. 3490–3493.
250. Green M.M. Annals of mobile DNA elements in *Drosophila*: the impact and influence of Barbara McClintock // *The Dynamic Genome*. New York: Cold Spr. Harbor Lab. Press. — 1992. — P. 117–122.
251. Gregor W. *et al.* A distinct endogenous pararetrovirus family in *Nicotiana tomentosiformis*, a diploid progenitor of polyploid tobacco // *Plant Physiol.* — 2004. — **134**. — P. 1191–1199.
252. Gregory T.R. The C-value enigma in plants and animals: a review of parallels and an appeal for partnership // *Ann. Bot.* — 2005. — **95**. — P. 133–146.
253. Grewal S.I., Elgin S.C. Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin // *Nature*. — 2007. — **44**. — P. 399–406.
254. Gupta S., Gallavotti A., Stryker G.A. *et al.* A novel class of *helitron*-related transposable elements in maize contain portions of multiple pseudogenes // *Plant Mol. Biol.* — 2005. — **57**. — P. 115–127.
255. Haberer G., Young S., Bharti A.K. *et al.* Structure and Architecture of the Maize Genome // *Plant Physiol.* — 2005. — **139**. — P. 1612–1624.
256. Hall R., Collis C. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination // *Mol. Microbiol.* — 1995. — **15**. — P. 593–600.
257. Hamilton A., Voinnet O., Chapell L., Baulcombe D. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing // *EMBO J.* — 2002. — **21**. — P. 4671–4679.
258. Han J.S. Non-long terminal repeat (non-LTR) retrotransposons: mechanisms, recent developments, and unanswered questions // *Mobile DNA*. — 2010. — **1**. — P. 15. Режим доступу: <http://www.Mobilednajournal.com/content/1/1/15>.
259. Han B., Xue Y. Genome-wide intraspecific DNA-sequence variation in rice // *Curr. Opin. Plant Biol.* — 2003. — **6**. — P. 134–138.
260. Han J.S., Boeke J.D. A highly active synthetic mammalian retrotransposon // *Nature*. — 2004. — **429**. — P. 314–318.
261. Hanada K. *et al.* The functional role of Pack-MULEs in rice inferred from purifying selection and expression profile // *Plant Cell*. — 2009. — **21**. — P. 25–38.
262. Hannon G.J. RNA interference // *Nature*. — 2002. — **418**. — P. 244–251.
263. Hansen C.N., Heslop-Harrison J.S. Sequences and phylogenies of plant pararetroviruses, viruses and transposable elements // *Adv. Bot. Res.* — 2004. — **41**. — P. 165–193.
264. Harper G. *et al.* Viral sequences integrated into plant genomes // *Annu. Rev. Phytopathol.* — 2002. — **40**. — P. 119–136.
265. Hartl D.L., Lohe A.R., Lozovskaya E.R. Modern thoughts on an ancient mariner: Function, evolution, regulation // *Annu. Rev. Genet.* — 1997. — **31**. — P. 337–358.

266. Hashida SnN., Kitamura K., Mikami T., Kishima Y. Temperature shift coordinately changes the activity and the methylation state of transposon *Tam3* in *Antirrhinum majus* // Plant Physiol.— 2003.— **132**.— P. 1207–1216.
267. Havecker E. R., Gao X., Voytas D. F. The diversity of LTR retrotransposons // Genome Biol.— 2004.— **5**.— P. 225.
268. Havecker E. R., Gao X., Voytas D. F. The Sireviruses, a plant-specific lineage of the *Ty1/copia* retrotransposons, interact with a family of proteins related to dynein light chain 8 // Plant Physiol.— 2005.— **139**.— P. 857–868.
269. Hawkins J. S., Kim H., Nason J. D. et al. Differential line-age-specific amplification of transposable elements is responsible for genome size variation in *Gossypium* // Genome Res.— 2006.— **16**.— P. 1252–1261.
270. Hawkins J. S. et al. Rapid DNA loss as a counterbalance to genome expansion through retrotransposon proliferation in plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2009.— **106**.— P. 17811–17816.
271. He P., Ma Y., Zhao G. et al. *FARE1*: a transcriptionally active *Ty1-copia* retrotransposon in strawberry // J. Plant Res.— 2010.— **123**.— P. 707–714.
272. Heitkam T., Schmidt T. *BNR* — a *LINE* family from *Beta vulgaris* — contains a RRM domain in open reading frame 1 and defines a *L1* subclade present in diverse plant genomes // Plant J.— 2009.— **59**.— P. 872–882.
273. Henderson I. R., Jacobsen S. E. Epigenetic inheritance in plants // Nature.— 2007.— **447**.— P. 418–424.
274. Heslop-Harrison J. S., Brandes A., Take-ta S. et al. The chromosomal distributions of *Ty1-copia* group retrotransposable elements in higher plants and their implications for genome evolution // Genetica.— 1997.— **100**.— P. 197–204.
275. Hickey D. Selfish DNA: a sexually-transmitted nuclear parasite // Genetics.— 1982.— **101**, N 3–4.— P. 519–531.
276. Himber C., Dunoyer P., Moissiard G. et al. Transitivity-dependent and independent cell-to-cell movement of RNA silencing // EMBO J.— 2003.— **22**.— P. 4523–4533.
277. Hirochika H. Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture // EMBO J.— 1993.— **12**.— P. 2521–2528.
278. Hirochika H., Okamoto H., Kakutani T. Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the *ddm1* mutation // Plant Cell.— 2000.— **12**.— P. 357–369.
279. Hirochika H., Sugimoto K., Otsuki Y. et al. Retrotransposons of rice involved in mutation induced by tissue culture // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1996.— **93**.— P. 7783–7788.
280. Hollister J. D., Gaut B. S. Epigenetic silencing of transposable elements: a trade-off between reduced transposition and deleterious effects on neighboring gene expression // Genome Res.— 2009.— **19**.— P. 1419–1428.
281. Hou Y., Rajagopal J., Irvin P. A., Voytas D. F. Retrotransposon vectors for gene delivery in plants // Mobile DNA.— 2010.— **1**.— P. 19.
282. Hu W. S., Bowman E. H., Delviks K. A., Pathak V. K. Homologous recombination occurs in a distinct retroviral subpopulation and exhibits high negative interference // J. Virol.— 1997.— **71**.— P. 6028–2036.
283. Hudakova S., Michalek W., Presting G. G. et al. Sequence organization of barley centromeres // Nucl. Acids Res.— 2001.— **29**.— P. 5029–5035.
284. Hudson M. E., Lisch D. R., Quail P. H. The *FHY3* and *FAR1* genes encode transposase-related proteins involved in regulation of gene expression by the phytochrome A-signaling pathway // Plant J.— 2003.— **34**.— P. 453–471.
285. Hull R., Harper G., Lockhart B. Viral sequences integrated into plant genomes // Trends Plant Sci.— 2000.— **5**.— P. 362–365.
286. Huo N., Vogel J. P., Lazo G. R. et al. Structural characterization of *Brachypodium* genome and its syntenic relationship with rice and wheat // Plant Mol. Biol.— 2009.— **70**, N 1/2.— P. 47–61.
287. Husband B. C. Chromosomal variation in plant evolution // Am. J. Bot.— 2004.— **91**.— P. 621–625.
288. Hutchison C. A., Hardies S. C., Loeb D. D. et al. *LINE* and related retrotransposons: long interspersed repetitive sequences in the eukaryotic genome // Mobile DNA/Eds Berg D. E., Howe M. M. Washington: ASM Press.— 1989.— P. 599–617.
289. Hutvagner G., Simard M. J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing // Nat. Rev. Mol. Cell Biol.— 2008.— **9**.— P. 22–32.
290. Ichihyanagi K., Nakajima R., Kajikawa M., Okada N. Novel retrotransposon analysis reveals

multiple mobility pathways dictated by hosts // *Genome Res.* — 2007. — **17**. — P. 33–41.

291. Ilic K., SanMiguel P.J., Bennetzen J.L. A complex history of rearrangement in an orthologous region of the maize, sorghum and rice genomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — **100**. — P. 12265–12270.

292. Ingouff M., Hamamura Y., Gourgues M. et al. Distinct of HISTONE3 variants between the two fertilization product in plants // *Curr. Biol.* — 2007. — **17**. — P. 1032–1037.

293. Ishizaki K., Shimizu-Ueda Yu., Okada S. et al. Multicopy genes uniquely amplified in the Y chromosome-specific repeats of the liverwort *Marchantia polymorpha* // *Nucl. Acids Res.* — 2002. — **30**. — P. 4675–4681.

294. Ivics Z., Hackett P.B., Izsvak Z. Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cell // *Cell.* — 1997. — **91**. — P. 501–510.

295. Ivics Z., Izsvak Z. The expanding universe of transposon technologies for gene and cell engineering // *Mobile DNA.* — 2010. — **1**. — P. 25.

296. Iwamoto M., Higo K. Tourist C transposable elements are closely associated with genes expressed in flowers of rice (*Oryza sativa*) // *Mol. Gen. Genom.* — 2003. — **268**, N 6. — P. 771–778.

297. Iwamoto M., Nagashima H., Nagamine T. et al. p-SINE1-like intron of the *CatA* catalase homologs and phylogenetic relationships among AA-genome *Oryza* and related species // *Theor. Appl. Genet.* — 1999. — **98**. — P. 853–861.

298. Jakowitsch J. et al. Integrated pararetroviral sequences define a unique class of dispersed repetitive DNA in plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1999. — **96**. — P. 13241–13264.

299. Jamilena M., Mariotti B., Manzano S. Plant sex chromosomes: molecular structure and function // *Cytogenet. Genome Res.* — 2008. — **120**. — P. 255–264.

300. Jiang N., Zhang X. An active DNA transposon family in rice // *Nature.* — 2003. — **421**. — P. 163–167.

301. Jiang N., Bao Z., Zhang X., Eddi S. Pack-MULE transposable elements mediate gene evolution in plants // *Nature.* — 2004. — **431**. — P. 569–573.

302. Jin Y.K., Bennetzen J.L. Integration and nonrandom mutation of a plasma membrane proton

ATPase gene fragment within the *BsI* retroelement of maize // *Plant Cell.* — 1994. — **6**. — P. 1177–1186.

303. Jin W., Melo J., Nagaki K. et al. Maize centromeres: organization and functional adaptation in the genetic background of oat // *Plant Cell.* — 2004. — **16**. — P. 571–581.

304. Jing R.C., Knox M.R., Lee J.M. et al. Insertional polymorphism and antiquity of PDR1 retrotransposon insertions in *Pisum* species // *Genetics.* — 2005. — **171**. — P. 741–752.

305. Johns M.A., Mottinger J., Freeling M. A low copy number, copia-like transposon in maize // *EMBO J.* — 1985. — **4**. — P. 1093–1102.

306. Josefsson C., Dilkes B., Comai L. Parent-dependent loss of gene silencing during interspecies hybridization // *Curr Biol.* — 2006. — **16**. — P. 1322–1328.

307. Joseph J.L., SENTRY J.W., Smyth D.R. Interspecies distribution of abundant DNA sequences in *Lilium* // *J. Mol. Evol.* — 1990. — **30**. — P. 146–154.

308. Jullien P.E., Mosquana A., Ingouff M. et al. Retinoblastoma and its binding partner MSI1 control imprinting in *Arabidopsis* // *PloS Biol.* — 2008. — **6**. — P. 194.

309. Jurka J., Kapitonov V.V., Pavlicek A. et al. Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements // *Cytogenet. Genome Res.* — 2005. — **110**. — P. 462–467.

310. Kalendar R., Schulman A.H. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting // *Nature Protocols.* — 2006. — **1**, N 5. — P. 2478–2484.

311. Kalendar R., Grob T., Regina M. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques // *Theor. Appl. Genet.* — 1999. — **98**. — P. 704–711.

312. Kalendar R., Tanskanen J., Immonen S. et al. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by *BARE-1* retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2000. — **97**, N 12. — P. 6603–6607.

313. Kalendar R., Vicient C.M., Peleg O. et al. Large retrotransposon derivatives: abundant, conserved but non-autonomous retroelements of barley and related genomes // *Genetics.* — 2004. — **166**. — P. 1437–1450.

314. Kamm A., Doudrick R.L., Heslop-Harrison J.S., Schmidt T. The genomic and physical organization of *Ty1-copia*-like sequences as a component of large genomes in *Pinus elliotii* var. *elliotii* and other gymnosperms // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1996. — **93**. — P. 2708–2713.
315. Kanazawa A., Akimoto M., Marishima H., Shimamoto Y. Inter- and intra-specific distribution of *Stowaway* transposable elements in AA-genome species of wild rice // Theor. Appl. Genet. — 2000. — **101**, N 3. — P. 327–335.
316. Kapitonov V.V., Jurka J. Rolling circle transposons in eukaryotes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2001. — **98**. — P. 8714–8719.
317. Kapitonov V.V., Jurka J. A universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase // Nat. Rev. Genet. — 2008. — **9**. — P. 411–412.
318. Kashkush K., Feldman M., Levy A.A. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid // Genetics. — 2002. — **160**. — P. 1651–1659.
319. Kashkush K., Feldman M., Levy A.A. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat // Nat. Genet. — 2003. — **33**. — P. 102–106.
320. Kashkush K., Khasdan V. Large-scale survey of cytosine methylation of retrotransposons and the impact of readout transcription from long terminal repeats on expression of adjacent rice genes // Genetics. — 2007. — **177**. — P. 1975–1985.
321. Kasschau K.D., Fahlgren N., Chapman E.J. et al. Genome-wide profiling and analysis of *Arabidopsis* siRNAs // PloS Biol. — 2007. — **5**. — P. 57.
322. Kato M., Takachima K., Kakutani T. Epigenetic control of *CACTA* transposon mobility in *Arabidopsis thaliana* // Genetics. — 2004. — **168**. — P. 961–969.
323. Kawakami T., Strakosh S.C., Zhen Y., Ungerer M.C. Different scales of *Ty1/copia*-like retrotransposon proliferation in the genomes of three diploid hybrid sunflower species // Heredity. — 2010. — **104**. — P. 341–350.
324. Kazazian H.H. Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution // Science. — 2004. — **303**, N 5664. — P. 1626–1632.
325. Keeling P.J., Palmer J.D. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution // Nature Rev. Genet. — 2008. — **9**. — P. 605–618.
326. Kejnovsky E., Hobza R., Cermak T. et al. The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants // Heredity. — 2009. — **102**. — P. 1–7.
327. Kelley R.D., Rinn J.L. Transposable elements reveal a stem cell specific class of long noncoding RNAs // Genome Biology. — 2012. — **13**:107. Doi: 10.1186/gb-2012-13-11-r107.
328. Kellis M., Patterson N., Endrizzi M. et al. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements // Nature. — 2003. — **423**. — P. 241–254.
329. Kendal W.S., Suomela B.P. Large-scale genomic correlation in *Arabidopsis thaliana* to chromosomal structure // BMC Genomic. — 2005. — **6**. — P. 82. Doi: 10.1186/1471-2164-6-82.
330. Khadka D.K., Nejdat A., Golan-Goldhirsh M.T.A. Molecular characterization of a gender-linked DNA marker and a related gene in *Mercurialis annua* L. // Planta. — 2005. — DOI 10.1007/s00425-005-0046-6.
331. Khazina E., Weichenrieder O. Non-LTR retrotransposons encode noncanonical RRM domains in their first open reading frame // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2009. — **106**. — P. 731–736.
332. Kidwell M.G., Lisch D. Transposable elements as sources of variation in animals and plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — **94**, N 15. — P. 7704–7711.
333. Kidwell M.G., Lisch D.R. Hybrid genetics. Transposons unbound // Nature. — 1998. — **393**. — P. 22–23.
334. Kidwell M.G., Lisch D.R. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution // Evolution Int. J. Org. Evolution. — 2001. — **55**. — P. 1–24.
335. Kikuchi K., Terauchi K., Wada M., Hirano H.Y. The plant MITE *mPing* is mobilized in anther culture // Nature. — 2003. — **421**, N 6919. — P. 167–170.
336. Kimura Y., Tosa Y., Shimada S. et al. *OARE1* a *Ty1-copia* retrotransposon in oat activated by abiotic and biotic stress // Plant Cell Physiol. — 2001. — **42**. — 1345–1354.
337. Kinoshita T., Miura A., Choi Y. et al. One-way control of PWA imprinting in *Arabidopsis*

- endosperm by DNA methylation // Science.— 2004.— **303**.— P. 521–523.
338. Kirik A., Salomon S., Puchta H. Species-specific double-strand break repair and genome evolution in plants // EMBO J.— 2000.— **19**.— P. 5562–5566.
339. Kirilyuk A., Tolstonog G. V., Damert A. et al. Functional endogenous LINE-1 retrotransposons are expressed and mobilized in rat chloroleukemia cells // Nucleic Acids Res.— 2008.— **36**.— P. 648–665.
340. Kitamura K., Hashida Sh., Mikami T., Kishima Y. Position effect of the excision frequency of the *Antirrhinum* transposon Tam3: implications for the degree of position-dependent methylation in the ends of the element // Plant Mol. Biol.— 2001.— **47**.— P. 475–490.
341. Kloc A., Zaratiegui M., Nora E., Martienssen R. RNA interference guides histone modification during the S phase of chromosomal replication // Curr. Biol.— 2008.— **18**.— P. 490–495.
342. Knight C. A., Molinari N. A., Petrov D. A. The large genome constraint hypothesis: evolution, ecology and phenotype // Ann. Bot.— 2005.— **95**.— P. 177–190.
343. Kobayashi S., Goto-Yamamoto N., Hirochika H. Retrotransposon-induced mutation in grape skin color // Science.— 2004.— **304**.— P. 982.
344. Kohli A., Prynee M. Q., Miro B. et al. De-differentiation-mediated changes in transposition behavior make the *Activator* transposon an ideal tool for functional genomics in rice // Mol. Breed.— 2004.— **13**.— P. 177–191.
345. Kojima K. K., Fujiwara H. An extraordinary retrotransposon family encoding dual endonucleases // Genome Res.— 2005.— **15**.— P. 1106–1117.
346. Komatsu M., Shimamoto K., Kyojuka J. Two-step regulation and continuous retrotransposition of the rice LINE-type retrotransposon Karma // Plant Cell.— 2003.— **15**.— P. 1934–1944.
347. Kondo N., Nikoh N., Ljichi N. et al. Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2002.— **99**.— P. 4280–4285.
348. Kovalchuk A., Senam S., Mauersberger S., Barth G. *Ty16*, a novel *Ty3/gypsy*-like retrotransposon in the genome of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica* // Yeast.— 2005.— **22**.— P. 979–991.
349. Kronmiller B. A., Wise R. P. TEest: automated chronological annotation and visualization of nested plant transposable elements // Plant Physiol.— 2008.— **146**.— P. 45–59.
350. Kubo S., Selem M. C., Soifer H. S. et al. L1 retrotransposition in nondividing and primary human somatic cell // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2006.— **103**.— P. 8036–8041.
351. Kumar A., Bennetzen J. L. Plant retrotransposons // Annu. Rev. Genet.— 1999.— **33**.— P. 479–532.
352. Kumar A., Hirochika H. Application of retrotransposons as genetic tools in plant biology // Trends Plant Sci.— 2001.— **6**.— P. 127–134.
353. Kunii M. et al. Reconstruction of putative DNA virus from endogens rice tungro bacilliform virus-like sequences in the rice genome: implication for integration and evolution // BMC Genomics 5, 80 DOI: 10.1186/1471-2164-5-80 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/5/80>).
354. Kuramochi-Miyagawa S., Watanabe T., Gorton K. et al. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes // Genes Dev.— 2008.— **22**.— P. 908–917.
355. Kurzynska-Kokorniak A., Jamburuthugova V. K., Bibillo A., Eickbush T. H. DNA-directed DNA polymerase and strand displacement activity of the reverse transcriptase encoded by R2 retrotransposon // J. Mol. Biol.— 2007.— **374**.— P. 322–333.
356. Lai J., Li Y., Messing J., Dooner H. K. Gene movement by *Helitron* transposons contributes to the haplotype variability of maize // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2005.— **102**.— P. 9068–9073.
357. Lai J., Ma J., Swigonova Z. et al. Gene loss and movement of the maize genome // Genome Res.— 2004.— **14**.— P. 1924–1931.
358. Lakhota S. C. Noncoding DNA: Junk, or a necessity for origin and evolution of biological complexity? // MyScience.— 2006.— **1**(1).— P. 1–6.
359. Lal S. K., Giroux M. J., Brendel V. et al. The maize genome contains a *Helitron* insertion // Plant Cell.— 2003.— **15**.— P. 381–391.

360. Lamb C., Riddle N., Ya-Ming Cheng et al. Localization and transcription of retrotransposon-derived element on the maize B chromosome // Chromosome Research.— 2007.— **15**, N 3.— P. 383–398.
361. Langdon T., Jenkins G., Hasterok R. et al. A high-copy-number CACTA family transposon in temperate grasses and cereals // Genetics.— 2003.— **163**.— P. 1097–1108.
362. Langley C. H. et al. On the role of unequal exchange in the containment of transposable element copy number // Genet. Res.— 1988.— **52**.— P. 223–235.
363. Laten H. M., Majumdar A., Gaucher E. A. SIRE-1, a copia/Ty1-like retroelement from soybean, encodes a retroviral envelope-like protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1998.— **95**.— P. 6897–6902.
364. Le Q. H., Melayah D., Bonnivard E. et al. Distribution dynamics on the Tnt1 retrotransposon in tobacco // Mol. Gen. Genom.— 2007.— **278**.— P. 639–651.
365. Leeton P. R. J., Smyth D. R. An abundant LINE-like element amplified in the genome of *Lilium speciosum* // Mol. Gen. Genom.— 1993.— **237**.— P. 97–104.
366. Leitch I. J., Bennett M. D. Genome downsizing in polyploid plants // Biol. J. Linnean Soc.— 2004.— **82**.— P. 651–663.
367. Lenoir A., Pelissier T., Bousquet-Antonelli C., Degaron J. M. Comparative evolution history of SINEs in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea*: Evidence for a high rate of SINE loss // Cytogenet. Genome Res.— 2005.— **110**.— P. 441–447.
368. Le Rouzic A., Deceliere G. Models of the population genetics of transposable elements // Genet. Res.— 2005.— **85**.— P. 171–181.
369. Le Rouzic A. et al. Long-term evolution of transposable elements // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2007.— **104**.— P. 19375–19380.
370. Lheureux F. et al. Identification of genetic markers linked to banana streak disease expression in inter-specific *Musa* hybrids // Theor. Appl. Genet.— 2003.— **106**.— P. 594–598.
371. Li Z., Chen S. Y., Zheng X. W., Zhu L. H. Identification and chromosomal localization of a transcriptionally active retrotransposon of Ty3-gypsy type in rice // Genome.— 2000.— **43**.— P. 404–408.
372. Libuda D. E., Winston F. Amplifications of histone genes by circular chromosome formation in *Sacharomyces cerevisiae* // Nature.— 2006.— **443**, N 7114.— P. 1003–1007. Doi: 10.1038/nature05205.
373. Lim K. Y., Kovarik A., Matyasek R. et al. Sequence of events leading to near-complete genome turnover in allopolyploid *Nicotiana* within five million years // New Phytol.— 2007.— **175**, N 4.— P. 756–763.
374. Lin R., Ding L., Casola C. et al. Transposase-derived transcription factors regulate light signaling in *Arabidopsis* // Science.— 2007.— **318**.— P. 1302–1305.
375. Lippman Z., Gendrel A.-V., Black M. et al. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control // Nature.— 2004.— **430**.— P. 471–476.
376. Lippman Z., Martienssen R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing // Nature.— 2004.— **431**.— P. 364–370.
377. Lisch D. Epigenetic regulation of transposable elements in plants // Annu. Rev. Plant Biol.— 2009.— **60**.— P. 43–66.
378. Lisch D. R., Freeling M., Langham R. J., Choy M. Y. Mutator transposable is widespread in the grasses // Plant Physiol.— 2001.— **125**.— P. 1293–1303.
379. Lister R., O'Malley R. C., Tonti-Filippini J. et al. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis* // Cell.— 2008.— **133**.— P. 523–536.
380. Liu Z. L., Han F. P., Tan M. et al. Activation of a rice endogenous retrotransposon *Tos17* in tissue culture is accompanied by cytosine demethylation and causes heritable alteration in methylation pattern of flanking genomic regions // Theor. Appl. Genet.— 2004.— **109**, N 1.— P. 200–209.
381. Llorens C., Futami R., Covelli L. et al. The Gypsy Datalase (Gydb) of Mobile Genetic Elements: Release 2.0 // Nucl. Acids Res. (NARESE). — 2011.— 39 (suppl 1): D70–D74 doi: 10.1093/nar/gkg1061 (<http://gydb.org/index.php/Ty3/Gypsy#CRM>).
382. Llorens C., Mucoz-Pomer A., Bernard L. et al. Network dynamic of eukaryotic retroelements beyond phylogenetic trees // Biol. Direct.— 2009.— **4**.— P. 41.
383. Lockhart B. E. et al. Characterization and genomic analysis of Tobacco vein clearing virus, a

plant pararetrovirus that is transmitted vertically and related to sequences integrated in the host genome // *J. Gen. Virol.* — 2000. — **81**. — P. 1579–1585.

384. Lockton S. et al. Demography and weak selection drive patterns of transposable element diversity in natural populations of *Arabidopsis lyrata* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2008. — **105**. — P. 13965–13970.

385. Lockton S., Gaut B.S. The contribution of transposable elements to expressed coding sequence in *Arabidopsis thaliana* // *J. Mol. Evol.* — 2009. — **68**. — P. 80–89.

386. Lockton S., Gaut B.S. The evolution of transposable elements in natural population of self-fertilizing *Arabidopsis thaliana* and its outcrossing relative *Arabidopsis lyrata* // *BMC Evolutionary Biology.* — 2010. — **10**. — P. 10.

387. Lohe A.R., Moriyama E.N., Lidholm D.A., Hartl D.L. Horizontal transmission, vertical inactivation, and stochastic loss of mariner-like transposable elements // *Mol. Biol. Evol.* — 1995. — **12**. — P. 62–72.

388. Long M., de Souza S.J., Gilbert W. Evolution of the intron-exon structure of eukaryotic genes // *Curr. Opin. Genet. Dev.* — 1995. — **5**. — P. 774–778.

389. Lonngren W.-E., Saedler H. Plant transposons: contributors to evolution? // *Gene.* — 1997. — **205**, N 1/2. — P. 245–253.

390. Lucas H., Feuerbach E., Kunert K. et al. RNA mediated transposition of the tobacco retrotransposon *Tnt1* in *Arabidopsis thaliana* // *EMBO J.* — 1995. — **14**. — P. 2364–2373.

391. Lukens L., Zhan S. The plant genome's methylation status and response to stress: implications for plant improvement // *Gen. Opin. in Plant Biol.* — 2007. — **10**. — P. 317–322.

392. Luo D., Coen E.S., Doyle S., Carpenter R. Pigmentation mutants produced by transposon mutagenesis in *Antirrhinum majus* // *Plant J.* — 1991. — **1**. — P. 59–69.

393. Lynch M., Conery J.S. The origins of genome complexity // *Science.* — 2003. — **302**. — P. 1401–1404.

394. Ma J., Bennetzen J.L. Rapid recent growth and divergence of rice nuclear genomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — **101**. — P. 12404–12410.

395. Ma J., Bennetzen J.L. Recombination, rearrangement, reshuffling, and divergence in a

centromeric region of rice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2006. — **103**. — P. 383–388.

396. Ma J., Devos K.M., Bennetzen J.L. Analyses of LTR-retrotransposon structures reveal recent and rapid genomic DNA loss in rice // *Genomic Res.* — 2004. — **14**. — P. 860–869.

397. Madlung A., Comai L. The effect of stress on genome regulation and structure // *Ann. Bot. (Lond.)* — 2004. — **94**. — P. 481–495.

398. Madlung A., Masuelli R.W., Watson B. et al. Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis* allotetraploids // *Plant Physiol.* — 2002. — **129**. — P. 733–746.

399. Madlung A. et al. Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids // *Plant J.* — 2005. — **41**. — P. 221–230.

400. Madsen L.H., Fukai E., Radutoiu S. et al. *LORE1*, an active low-copy-number *Ty3-gypsy* retrotransposon family in the model legume *Lotus japonicus* // *Plant J.* — 2005. — **44**. — P. 372–381.

401. Mahillon J., Chandler M. Insertion sequences // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 1998. — **62**. — P. 725–774.

402. Makalowski W. Genomics. Not junk after all // *Science.* — 2003. — **300**, N 5623. — P. 1246–1247.

403. Malik H.S. Ribonuclease H evolution in retrotransposable elements // *Cytogenet. Genome Res.* — 2005. — **110**. — P. 392–401.

404. Malik H.S., Burke W.D., Eickbush T.H. The age and evolution of non-LTR retrotransposable elements // *Mol. Biol. Evol.* — 1999. — **16**. — P. 793–805.

405. Malik H.S., Eickbush T.H. The RTE class of non-LTR retrotransposons is widely distributed in animals and is the origin of many SINEs // *Mol. Biol. Evol.* — 1998. — **15**. — P. 1123–1134.

406. Malik H.S., Henikoff S., Eickbush T.H. Poised for contagion: evolutionary origins of the infectious of invertebrate retroviruses // *Genome Res.* — 2000. — **10**. — P. 1307–1318.

407. Maloel L., Rossignol J.L. Suppression of crossing-over by DNA methylation in *Ascometula* // *Genes and Development.* — 2006. — **12**. — P. 1381–1389.

408. Manninen O., Kalendar R., Robinson J., Schulman A.H. Application of BAR/M retrotransposon markers to the mapping of a major resistance

- gene for net blotch in barley // *Mol. Gen. Genom.* — 2000. — **264**. — P. 325–334.
409. Manninen O., Schulman A.H. *BARE-1*, a copia-like retroelement in barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Plant Mol. Biol.* — 1993. — **22**. — P. 829–846.
410. Mao L. et al. Rice transposable elements: A survey of 73000 sequence-tagged-connectors // *Genome Res.* — 2000. — **10**. — P. 982–990.
411. Marfil C.F., Masuelli R.W., Davison J., Comai L. Genomic instability in *Solanum tuberosum* × *Solanum kurtzianum* interspecific hybrids // *Genome*. — 2006. — **49**. — P. 104–113.
412. Mariotti B., Navajas-Pérez R., Lozano R. et al. Cloning and characterization of dispersed repetitive DNA derived from microdissected sex chromosomes of *Rumex acetosa* // *Genome*. — 2006. — **49**. — P. 114–121.
413. Martin A., Troadec C., Boualem A. et al. A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon // *Nature*. — 2009. — **461**. — P. 1135–1139.
414. Martinez L., Reategui E.P., Fonseca L.R. et al. Superimposing polymorphism: the case a point mutation within a polymorphic Alu insertion // *Human Heredity*. — 2005. — **59**. — P. 109–117.
415. Matsui T., Tanaka T., Endoh H. et al. The RNA recognition mechanism of human immunodeficiency virus (HIV) type 2 NCp8 is different from that of HIV-1 NCp7 // *Biochemistry*. — 2009. — **48**. — P. 4314–4323.
416. Matsumoto T., Takahashi H., Fujiwara H. Targeted nuclear import of open reading frame 1 protein is required for *in vivo* retrotransposition of a telomere specific non-long terminal repeat retrotransposon, SART1 // *Mol. Cell Biol.* — 2004. — **24**. — P. 105–122.
417. Matsunaga S. Sex chromosome-linked genes in plants // *Gen. Genet. Syst.* — 2006. — **81**. — P. 219–226.
418. Matsunaga S. Junk DNA promotes sex chromosome evolution // *Heredity*. — 2009. — **102**. — P. 525–526.
419. Matsunaga S., Yagisawa F., Yamamoto M. et al. LTR retrotransposons in the dioecious plant *Silene latifolia* // *Genome*. — 2002. — **45**. — P. 745–751.
420. Matzk F., Hammer K., Schubert I. Coevolution of apomixis and genome size within the genus *Hypericum* // *Sex Plant Reprod.* — 2003. — **16**. — P. 51–58.
421. Matzke M. et al. Endogenous pararetroviruses of allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its diploid progenitors, *N. sylvestris* and *N. tomentosiformis* // *Biol. J. Linnean Soc.* — 2004. — **82**. — P. 627–638.
422. Matzke M.A., Birchler J.A. RNAi-mediated pathways in the nucleus // *Nat. Rev. Genet.* — 2005. — **6**. — P. 24–34.
423. McClintock B. Mutable loci in maize // *Carnegie Institute of Washington. Year Book*. — 1948. — **47**. — P. 155–169.
424. McClintock B. Mutable loci in maize // *Carnegie Institute of Washington. Year Book*. — 1949. — **48**. — P. 142–154.
425. McClintock B. Chromosome organization and genic expression // *Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* — 1951. — **16**. — P. 13–47.
426. McClintock B. Controlling elements and the gene // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* — 1956. — **21**. — P. 197–216.
427. McClintock B. Some parallels between gene control systems in maize and in bacteria // *Amer. Natur.* — 1961. — **95**. — P. 265–277.
428. McClintock B. The control of gene action in maize // *Brookhaven Symp. Biol.* — 1965. — **18**. — P. 162–184.
429. McClintock B. Mechanisms that rapidly reorganize the genome // *Stadler Symp.* — 1978. — **10**. — P. 1–47.
430. McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge // *Science*. — 1984. — **226**. — P. 792–801.
431. McCormick S. Male gametophyte development // *Plant Cell*. — 1993. — **5**. — P. 1265–1275.
432. McCormick S. Control of male development // *Plant Cell Suppl.* — 2004. — **16**. — P. 142–153.
433. McCouch S.R., Chen X., Panaud O. et al. Microsatellite marker development, mapping and application in rice genetics and breeding // *Plant Mol. Biol.* — 1997. — **35**. — P. 89–99.
434. McKenzie N., Dale P.J. Mapping of transposable element *Dissociation inserts* in *Brassica oleracea* following plant regeneration from streptomycin selection of callus // *Theor. Appl. Genet.* — 2004. — **109**. — P. 333–341.

435. McKenzie N., Wen L.-Y., Dale P.J. Tissue-culture enhanced transposition of the maize transposable element *Dissociation* in *Brassica oleracea* var. *italica* // Theor. Appl. Genet.— 2002.— **105**.— P. 23–33.
436. McMullen M.D. et al. Genetic properties of the maize nested association mapping population // Science.— 2009.— **325**.— P. 737–740.
437. Meins F. et al. RNA silencing systems and their relevance to plant development // Annu. Rev. Cell Biol.— 2005.— **21**.— P. 297–318.
438. Menzel G., Dechyeva D., Keller H. et al. Mobilization and evolutionary history of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in *Beta vulgaris* L. // Chromosome Research.— 2006.— **14**, N 8.— P. 831–844.
439. Messing J., Bharti A.K., Karlowski W.M. et al. Sequence composition and genome organization of maize // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2004.— **101**.— P. 14349–14353.
440. Mette M.F., der Winden J., Matzke M., Matzke A.J.M. Short RNAs can identify new candidate transposable element families in *Arabidopsis* // Plant Physiol.— 2002.— **130**.— P. 6–9.
441. Mette M.F. et al. Endogenous viral sequences and their potential contribution to heritable virus resistance in plants // EMBO J.— 2002a.— **21**.— P. 461–469.
442. Meyer P. In Annual Plant Reviews: Plant Epigenetics. Edited by Meyer P. Oxford Blackwell Publishing.— 2005.— **19**.— 304 p.
443. Meyers B.C., Tingey S.V., Morgante M. Abundance, distribution and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome // Genome Res.— 2001.— **11**.— P. 1660–1676.
444. Meyers B.C., Scalabrin S., Morgante M. Mapping and sequencing complex genomes: let's get physical! // Nat. Rev. Genet.— 2004.— **5**.— P. 578–588.
445. Mhiri C., Morel J.B., Vernhettes S. et al. The promoter of the tobacco *Tnt1* transposon is induced by wounding and by abiotic stress // Plant Mol. Biol.— 1997.— **33**.— P. 257–266.
446. Michalak P. Epigenetic, transposon and small RNA determinants of hybrid dysfunctions // Heredity.— 2009.— **102**.— P. 45–50; doi: 10.1038/hdy.2008.48.
447. Michalak P. Plant hybridization and transposable elements. An eruption of mobile elements in genomes of hybrid sunflowers // Heredity.— 2010.— **104**.— P. 329–330.
448. Miller A.D. Development and applications of retroviral vectors // Retroviruses Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press Coffin J., Hughes S.H., Varmus H.E.— 1997.— P. 437–474.
449. Ming R., Wang J., Moore P.H., Paterson A.H. Sex chromosomes in flowering plants // Amer. J. Botany.— 2007.— **94**.— P. 141–150.
450. Mittler R., Kim Y., Song L. et al. Gain- and loss-of-function mutation in *Zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress // FEBS Letters.— 2006.— **580**.— P. 6537–6542.
451. Miura A., Yonebayashi S., Watanabe K. et al. Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis* // Nature.— 2001.— **411**.— P. 212–214.
452. Moran J.V., DeBerardinis R.J., Kazazian H.H. Exon shuffling by L1 retrotransposition // Science.— 1999.— **283**.— P. 1530–1534.
453. Moran J.V., Holmes S.E., Naas T.P. et al. High frequency retrotransposition in cultured mammalian cell // Cell.— 1996.— **87**.— P. 917–927.
454. Morgan M.T. Transposable element number in mixed mating population // Genet. Res.— 2001.— **77**.— P. 261–275.
455. Morgante M., Brunner S., Rea G. et al. Gene duplication and exon shuffling by helitron like transposons generate intraspecies diversity in maize // Nat. Genet.— 2005.— **37**, N 9.— P. 997–1002.
456. Morgante M., Olivieri A.M. PCR-amplified microsatellites as marker in plant genetics // The Plant J.— 1993.— **3**.— P. 175–182.
457. Moritz C. Uses of molecular phylogenies for conservation // In: New Uses for New Phylogenies (eds Harvey P.H., Leigh Brown A.J., Smith J.M., Nee S.).— Oxford University Press. New York.— 1996.— P. 203–214.
458. Morrish T.A., Garcia-Perez J.L., Stamatou T.D. et al. Endonuclease-independent *LINE-1* retrotransposition at mammalian telomeres // Nature.— 2007.— **446**.— P. 208–212.
459. Motohashi R., Mochizuki K., Ohtsubo H., Ohtsubo E. Structures and distribution of p-SINE1 members in rice genomes // Theor. Appl. Genet.— 1997.— **95**.— P. 359–368.

460. Mougeot J. L., Richardson-Milazi S., Brooks B. R. Whole-genome association studies of sporadic amyotrophic lateral sclerosis: are retroelements involved? // Trends Mol. Med. — 2009. — **15**. — P. 148–158.
461. Mower J. P., Stefanovic S., Young G. J., Palmer J. D. Gene transfer from parasitic to host plants // Nature. — 2004. — **432**. — P. 165–166.
462. Murata S., Takasaki N., Okazaki T. et al. Molecular evidence from shot interspersed elements (SINEs) that *Onchorhynchus mason* (cherry salmon) is monophyletic // Canad. J. Fisher. Aquatic Science. — 1998. — **55**. — P. 1864–1870.
463. Muthukumar B., Bennetzen J. L. Isolation and characterization of genomic and transcribed retrotransposon sequences from sorghum // Mol. Genet. Genom. — 2004. — **271**. — P. 308–316.
464. Naito K. et al. Dramatic amplification of rice transposable element during recent domestication // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2006. — **103**. — P. 17620–17625.
465. Naito K., Zhang F., Tsukiyama T. et al. Unexpected consequences of a sudden and massive transposon amplification on rice gene expression // Nature. — 2009. — **461**, N 7267. — P. 1130–1134.
466. Nakamura T. M., Morin G. B., Chapman K. B. et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human // Science. — 1997. — **277**. — P. 955–959.
467. Ndowora T. et al. Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences // Virology. — 1999. — **255**. — P. 214–220.
468. Negruțiu I., Vyskot B., Barbacar N. et al. Dioecious plants. A key to the early events of sex chromosome evolution // Plant Physiol. — 2001. — **127**. — P. 1418–1424.
469. Neumann P., Navrátilová A., Kobližková A. et al. Plant centromeric retrotransposons: a structural and cytogenetic perspective // Mobile DNA. — 2011. — **2**:4. <http://www.mobilednajournal.com/content/2/1/4>.
470. Nevers P., Shepherd N., Saedler H. Plant transposable elements // Adv. Bot. Res. — 1986. — **12**. — P. 103–203.
471. Nielen S., de Assis C., Fonseca F. et al. Isolation and characterization of retrotransposons in wild and cultivated peanut species. In: Shu QY (ed) Induced plant mutations in the genomics era. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. — 2009. — P. 499–502.
472. Nishihara H., Saita Y., Nikaido M. et al. Retroposon analysis of Afrotherian Phylogeny // Mol. Biol. Evol. — 2005. — **22**. — P. 1823–1833.
473. Nordborg M. Linkage disequilibrium, gene trees and selfing: an ancestral recombination graph with partial self-fertilization // Genetics. — 2000. — **154**. — P. 923–929.
474. Novikova O. S., Fet V., Blinov A. G. Horizontal transfer of non-LTR retrotransposons // Вестник ВОГиС. — 2009. — **13**, № 1. — С. 76–83.
475. Novikova O. S., Fet V., Blinov A. G. Non-LTR retrotransposon in fungi // Funct. Integr. Genomics. — 2008. Doi: 10.1007/s10142-008-0093-8.
476. Novikova O. S., Smyshlyaev G., Blinov A. G. Evolutionary genomics revealed interkingdom distribution of *Tcn1*-like chromodomain-containing Gypsy LTR retrotransposons among fungi and plants // BMC genomics. — 2010. — **11**. — P. 231.
477. Nuzhdin S. V., Petrov D. A. Transposable elements in clonal lineages: lethal hangover from sex // Biol. J. Linn. Soc. — 2003. — **79**. — P. 33–41.
478. Nyswaner K. M., Checkley M. A., Yi M. et al. Chromatin-associated genes protect the yeast genome from *Ty1* insertional mutagenesis // Genetics. — 2008. — **178**. — P. 197–214.
479. Obara M., Matsunaga S., Nakao S., Kawano S. A plant Y chromosome-STS marker encoding a degenerate retrotransposon // Genes Genet. Syst. — 2002. — **77**. — P. 393–398.
480. Ochman H., Gerber A. S., Hartl D. L. Genetic application of an inverse polymerase chain reaction // Genetics. — 1988. — **120**. — P. 621–623.
481. Ogiwara I., Miya M., Ohshima K., Okada N. Retropositional parasitism of SINEs on LINEs: identification of SINEs and LINEs in elasmobranchs // Mol. Biol. Evol. — 1999. — **16**. — P. 1238–1250.
482. Ohta T. Near-neutrality in evolution of genes and gene regulation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — **99**. — P. 16134–16137.
483. Ohtsubo H., Cheng I., Ohsawa S. et al. Rice retroposon p-SINE1 and origin of cultivated rice // Breed. Sci. — 2004. — **54**. — P. 1–11.

484. Okada N., Shedlock A. M., Nikaido M. Retroposon mapping in molecular systematics // In: Mobile Genetic Elements: Protocols and Genomic Application. Humana Press, Totowa, NJ. — 2004. — P. 189–226.
485. Okada T., Singh M. B., Bhallaa P. L. Histone H3 variants in male gametic cells of lily and H3 methylation in mature pollen // Plant Mol. Biol. — 2006. — **62**. — P. 503–512.
486. Ono R., Kobayashi S., Wagatsuma H. et al. A retrotransposon-derived gene, PEG10, is a novel imprinted gene located on human chromosome 7q21 // Genomics. — 2001. — **73**. — P. 232–237.
487. Orgel L. E., Crick F. H. C. Selfish DNA: the ultimate parasite // Nature. — 1980. — **284**. — P. 604–607.
488. Ozias-Akins P., Akiyama Y., Hanna W. W. Molecular characterization of the genomic region linked with apomixis in *Pennisetum/Cenchrus* // Funct. Integr. Genomics. — 2003. — **3**. — P. 94–104.
489. Ozkan H., Levy A. A., Feldman M. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group // The Plant Cell. — 2001. — **13**. — P. 1735–1747.
490. Paillart J. C., Shehu-Xhilaga M., Marquet R., Mak J. Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair // Nat. Rev. Microbiol. — 2004. — **2**. — P. 461–472.
491. Pajunen M. I., Rasila T. S., Happonen L. J. et al. Universal platform for quantitative analysis of DNA transposition // Mobile DNA. — 2010. — **1**. — P. 24.
492. Palmgren M. Capturing of host DNA by a plant retroelement: Bs1 encodes plasma membrane H⁺-ATPase domains // Plant Mol. Biol. — 1994. — **25**. — P. 137–140.
493. Pardue M. L., Rashkova S., Casacuberta E. et al. Two retrotransposons maintain telomeres in *Drosophila* // Chromosome Res. — 2005. — **13**. — P. 443–453.
494. Parisod C. et al. Impact of transposable elements on the organization and function of allopolyploid genomes // New Phytol. — 2009. — **186**. — P. 37–45.
495. Parisod C. et al. Rapid structural and epigenetic reorganization near transposable elements in hybrid and allopolyploid genomes in *Spartina* // New Phytol. — 2009a. — **184**. — P. 1003–1015.
496. Paux E., Faure S., Choulet F. et al. Insertion site-based polymorphism markers open new perspectives for genome saturation and marker-assisted selection in wheat // Plant Biotechnol. J. — 2010. — **8**, N 2. — P. 196–210.
497. Paux E., Roger D., Badaeva E. et al. Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B // Plant J. — 2006. — **48**, N 3. — P. 463–474.
498. Pelissier T., Bousquet-Antonelli C., Lavie L., Degaron M. Synthesis and processing of RNA-related SINE transcripts in *Arabidopsis thaliana* // Nucleic Acids Res. — 2004. — **32**. — P. 3957–3966.
499. Peragine A., Yoshikawa M., Wu G. et al. SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNA in *Arabidopsis* // Genes and Development. — 2004. — **18**. — P. 2368–2379.
500. Pereira V. et al. The effect of transposable element insertions on gene expression evolution in rodents // PloS One. — 2009. — **4**. — P. 4321.
501. Perez-Alegre M., Dubus A., Fernandez E. REMI, a new type of long terminal repeat retrotransposon in *Chlamydomonas reinhardtii* // Mol. Cell. Biol. — 2005. — **25**. — P. 10628–10638.
502. Peschke V. M., Phillips R. L. Activation of the maize transposable element *Suppressor-mutator* (*Spm*) in tissue culture // Theor. Appl. Genet. — 1991. — **81**. — P. 90–97.
503. Peschke V. M., Phillips R. L., Gengenbach B. G. Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture derived maize plants // Science. — 1987. — **238**. — P. 804–807.
504. Picard G. Non mendelian sterility in *Drosophila melanogaster*: hereditary transmission of I factor // Genetics. — 1976. — **83**. — P. 107–123.
505. Picault N., Chaparro C., Piegu B. et al. Identification of an active LTR retrotransposon in rice // Plant J. — 2009. — **58**. — P. 754–765.
506. Pichot C., Maâtaoui M., Raddi S., Raddi P. Surrogate mother for endangered *Cupressus* // Nature. — 2001. — **412**. — P. 39.
507. Picot S., Wallau G. L., Loreto E. L. et al. The mariner transposable element in natural po-

pulation of *Drosophila simulans* // Heredity.— 2008.— **101**.— P. 53–59.

508. *Piegu B., Guyot R., Picault N. et al.* Doubling genome size without polyploidization: dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice // Genome Res.— 2006.— **16**.— P. 1262–1269.

509. *Pina C., Pinto F., Feijo J.A., Becker J.D.* Gene family analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome reveals biological implication for cell growth, division control, and gene expression regulation // Plant Physiol.— 2005.— **138**.— P. 744–756.

510. *Piskurek O., Okada N.* Poxviruses as possible vectors for horizontal transfer of retrotransposons from reptile to mammals // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2007.— **104**.— P. 12046–12051.

511. *Plant Transposons and Genome Dynamics in Evolution*. Ed. *Nina V. Fedoroff*. 2013, Wiley-Blackwell.— 232 p.

512. *Plasterk R.H.A.* RNA silencing: the genome's immune system // Science.— 2002.— **296**.— P. 1263–1265.

513. *Pollard J.W.* The moveable genome. Weismann's doctrine and new models for speciation // Biol. Forum (ex: «Riv. Biol.»).— 1987.— **80**, N 1.— P. 11–54.

514. *Poulter R.T., Goodwin T.J., Butler M.I.* Vertebrate helitrons and other novel *Helitrons* // Gene.— 2003.— **313**.— P. 201–212.

515. *Price Z., Schulman A.H., Mayes S.* Development of new marker methods — an example from oil palm // Plant Genet. Resources.— 2003.— **1**.— P. 103–113.

516. *Prieto J.L., Poutilly N., Jenczewski E. et al.* Development of crop-specific transposable element (SINE) markers for studying gene flow from oilseed rape to wild radish // Theor. Appl. Genet.— 2005.— **111**.— P. 446–455.

517. *Pritham E.J., Zhang Y.H., Feschotte C., Kesseli R.V.* An Ac-like transposable element family with transcriptionally active Y-linked copies the White Campion, *Silene latifolia* // Genetics.— 2003.— **165**.— P. 799–807.

518. *Puchta H.* Towards the ideal GMP: Homologous recombination and marker gene excision // J. Plant Physiol.— 2003.— **160**.— P. 743–754.

519. *Qu S., Desai A., Wing R., Sundaresan V.* A versatile transposon-based activation tag vector system for functional genomics in cereals and other monocot plants // Plant Physiol.— 2008.— **146**, N 1.— P. 189–199.

520. *Rabinowicz P.D., Citek R., Budiman M.A. et al.* Differential methylation of genes and repeats in land plants // Genome Res.— 2005.— **15**.— P. 1431–1440.

521. *Rajput M.K., Upadhyaya K.C.* Characterization of heterogeneity in *Ty1-copia* group retrotransposons in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) // Молекулярная биология.— 2010.— **44**, № 4.— С. 601–607.

522. *Ramakrishna W., Dubcovsky J., Park Y.J. et al.* Different types and rates of genome evolution detected by comparative sequence analysis of orthologous segments from four cereal genomes // Genetics.— 2002.— **162**.— P. 1389–1400.

523. *Ramallo E., Kalendar R., Schulman A.H. et al.* *Reme 1*, a *Copia* retrotransposon in melon, is transcriptionally induced by UV light // Plant Mol. Biol.— 2008.— **66**.— P. 137–150.

524. *Rangwala S.H., Elumalai R., Vanier C. et al.* Meiotically stable natural epialleles of *Sadhu*, a novel *Arabidopsis* retrotransposon // PLoS Genet.— 2006.— **2**.— P. 271–281.

525. *Raskina O., Barber J.C., Nevo E., Belyayev A.* Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes // Cytogenet. Gen. Res.— 2008.— **120**.— P. 351–357.

526. *Raskina O., Belyayev A., Nevo E.* Activity of the *En/Spm*-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch // Chromosome Res.— 2004a.— **12**.— P. 153–161.

527. *Raskina O., Belyayev A., Nevo E.* Quantum speciation in *Aegilops*: molecular cytogenetic evidence from rDNA cluster variability in natural population // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2004b.— **101**.— P. 14818–14823.

528. *Ray D.A.* *SINEs* of progress: mobile element applications to molecular ecology // Mol. Ecology.— 2007.— **16**.— P. 19–33.

529. *Ray D.A., Feschotte C., Pagan F.J. et al.* Multiple waves of recent DNA transposon activity in the bat, *Myotis lucifugus* // Genome Res.— 2008.— **18**.— P. 717–728.

530. Ray D.A., Hedges D.J., Hall M.A. et al. Alu Insertion Polymorphisms and Platyrrhine Primate Phylogenetic relationships // Mol. Phylogenet. Evol. — 2005a. — **35**. — P. 117–126.
531. Ray D.A., Hedges D.J., Herke S.W. et al. Chompy: An infestation of MITE-like repetitive elements in the crocodilian genome // Gene. — 2005b. — **362**. — P. 1–10.
532. Rebollo R., Farivar S., Mager D.L. C-GATE — catalogue of genes affected by transposable elements // Mobile DNA. — 2012. — **3**, N 9. — Doi: 10.1186/1759-8753-3-9.
533. Rensing S.A., Fritzensky D., Lang D., Reski R. Protein encoding genes in an ancient plant: analysis of codon usage, retained genes and splice sites in a moss, *Physcomitrella patens* // BMC Genomics. — 2005. — **6**. — P. 43.
534. Reski R., Frank W. Moss (*Physcomitrella patens*) functional genomics — Gene discovery and tool development, with implications for crop plants and human health // Genom. Proteomic. — 2005. — **4**. — P. 48–57.
535. Richardson A.O., Palmer J.D. Horizontal gene transfer in plants // J. Exptl. Bot. — 2007. — **58**. — P. 1–9.
536. Richert-Pöggeler K.R. et al. Induction of infectious *Petunia vein clearing* (pararetro) virus from endogenous provirus in petunia // Embo J. — 2003. — **22**. — P. 4836–4845.
537. Rico-Cabanas L., Martinez-Izquierdo J.A. CIREI, a novel transcriptionally active *Ty1-copia* retrotransposon from *Citrus sinensis* // Mol. Genet. Genomics. — 2007. — **277**. — P. 365–377.
538. Rieseberg L.H. Homoploid reticulate evolution in *Helianthus* (Asteraceae): evidence from ribosomal genes // Am. J. Bot. — 1991. — **78**. — P. 1218–1237.
539. Risler J.K., Kenny A.E., Palumbo R. et al. Host co-factors of the retrovirus-like transposon Ty1 // Mobile DNA. — 2012. — **3**, 12. — Doi: 10.1186/1759-8753-3-12.
540. Rocheta M., Cordeiro J., Oliveira M., Miguel C. PpRTI: the first complete gypsy-like retrotransposon isolated in *Pinus pinaster* // Planta. — 2007. — **225**. — P. 551–562.
541. Ross-Ibarra J. et al. Patterns of polymorphism and demographic history in natural population of *Arabidopsis lyrata* // PLoS One 3. — 2008. — P. 2411.
542. Roulin A., Piégu B., Panaud O. Evidence of multiple horizontal transfer of the long terminal repeat retrotransposon *RIRE1* within the genus *Oryza* // Plant J. — 2008. — **53**. — P. 950–959.
543. Rubin G.M., Brorin J.R., Dunsmuir P. et al. Copia-like transposable elements in the *Drosophila* genome // Cold. Spr. Harbor Symp. Quant. Biol. — 1981. — **45**. — P. 619–628.
544. Rubin B.M., Kidwell M.G., Bingham P.M. The molecular basis of P-M hybrid disgenesis: the nature of induced mutations // Cell. — 1982. — **29**. — P. 987–994.
545. Sabot F., Guyot R., Wicker T. et al. Updating transposable element annotation from large wheat genomic sequences reveals diverse activities and gene association of elements // Mol. Genet. Genomic. — 2005a. — **274**. — P. 119–130.
546. Sabot F., Schulman A.H. Parasitism and the retrotransposon life cycle in plants: a hitchhiker's guide to the genome // Heredity. — 2006. — **97**. — P. 381–388.
547. Sabot F., Schulman A.H. Template switching can create complex LTR retrotransposon insertions in Triticeae genomes // BMC Genomic. — 2007. — **8**. — P. 247.
548. Sabot F., Sourdille P., Bernard M. Advent of new retrotransposon structure: the long form of the *Veju* elements // Genetica. — 2005b. — **125**. — P. 325–332.
549. Sabot F., Sourdille P., Chantret N., Bernard M. Morgane, a new LTR retrotransposon group, and its subfamilies in wheats // Genetica. — 2006a. — DOI: 10.1007/S10709-006-0016-3.
550. Saedler H., Starlinger P. Twenty-five years of transposable elements research in Köln // The dynamic Genome: Barbara MacClintock's ideas in the century of genetics. — 1992. — P. 243–263.
551. Sakamoto K., Ohmida N., Fukui K. et al. Site-specific accumulation of the a LINE-like retrotransposon in a sex chromosome of the dioecious plant *Cannabis sativa* // Plant Mol. Biol. — 2000. — **44**. — P. 723–732.
552. Salem A.H., Ray D.A., Batzer M.A. Identity by descent and DNA sequence variation of human SINE elements // Cytogenet. Genom. Research. — 2005. — **108**. — P. 63–72.
553. Salem A.H., Ray D.A., Xing I. et al. Alu elements and hominid phylogenetics // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2003. — **100**. — P. 12787–12791.

554. Salina E. A., Sergeeva E. M., Adonina I. G. *et al.* Isolation and sequence analysis of the wheat B genome subtelomeric DNA // Genomics. — 2009. — **10**. — P. 414.
555. Salina E. A., Sergeeva E. M., Adonina I. G. *et al.* The Ty3-gypsy group LTR retrotransposon *Fatima*: the impact on B-genome specificity of polyploid wheats // BMC Plant Biol. — 2011. — **11**. — P. 99.
556. SanMiguel P., Gaut B. S., Tikhonov A. *et al.* The paleontology of intergene retrotransposons of maize // Nat. Genet. — 1998. — **20**. — P. 43–45.
557. Sasaki T., Takahashi K., Nikaido M. *et al.* First application of the SINE (short interspersed repetitive element) method to infer phylogenetic relationships in reptiles: an example from the turtle superfamily Testudinoidea // Mol. Biol. Evol. — 2004. — **21**. — P. 705–715.
558. Saze H., Kakutani T. Heritable epigenetic mutation of transposon-flanked *Arabidopsis* gene due to lack of the chromatin-remodeling factor DDM1 // EMBO J. — 2007. — **26**. — P. 3641–3652.
559. Scherrer B., Isidore E., Klein P. *et al.* Large intraspecific haplotype variability at the rph 7 locus results from rapid and recent divergence in the barley genome // Plant Cell. — 2005. — **17**. — P. 361–374.
560. Schmid K. J., Aquadro C. F. Evolutionary analysis of «orphans» from the *Drosophila* genome identifies rapidly diverging and incorrectly annotated genes // Genetics. — 2001. — **159**. — P. 589–598.
561. Schmid M., Davison T. S., Henz S. R. *et al.* A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development // Nat. Genet. — 2005. — **37**. — P. 501–506.
562. Schmidt T. LINES, SINEs and repetitive DNA: non-LTR retrotransposons in plant genomes // Plant Mol. Biol. — 1999. — **40**. — P. 903–910.
563. Schnable P. S. *et al.* The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics // Science. — 2009. — **326**. — P. 1112–1115.
564. Schramke V., Allshire R. Hairpin RNAs and retrotransposon LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing // Science. — 2003. — **301**. — P. 1069–1074.
565. Schulman A. H., Flavel A. J., Ellis T. H. The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plant // Methods Mol. Biol. — 2004. — **260**. — P. 145–173.
566. Schulman A. H., Kalendar R. A movable feast: diverse retrotransposons and their contribution to barley genome dynamics // Cytogenet. Genom. Research. — 2005. — **110**. — P. 598–605.
567. Sergeeva E. M., Salina E. A., Adonina I. G., Chalhoub B. Evolutionary analysis of the *CACTA* DNA-transposon *Caspar* across wheat species using sequence comparison and *in situ* hybridization // Mol. Genet. Genom. — 2010. — **284**. — P. 11–23.
568. Shaked H., Kashkush K., Ozkan H. *et al.* Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat // Plant Cell. — 2001. — **13**. — P. 1749–1759.
569. Shapiro J. Mutations caused by insertion of genetic material in into the galactose operon *Escherichia coli* // J. Mol. Biol. — 1969. — **40**. — P. 93–102.
570. Shapiro J. Natural genetic engineering in evolution // Genetica. — 1992. — **86**. — P. 99–111.
571. Shapiro A. J. Transposable elements as the key to a 21st century view of evolution // Genetica. — 1999. — **107**. — P. 171–179.
572. Shapiro A. J. Mobile DNA and evolution in the 21st century // Mobile DNA. — 2010. — **1**. — P. 4.
573. Shapiro J. Evolution. A view from 21st century. — FT Press Science, 2011.
574. Shen J. A., Denton M., Mutti N. *et al.* Polygalacturonase from Sitophilus oryzae: possible horizontal transfer of a pectinase gene from fungi to weevils // J. Insect Sci. — 2003. — **3**. — P. 24.
575. Shibata F., Hizume M., Kuroki Y. Differentiation and the polymorphic nature of the Y-chromosomes revealed by repetitive sequences in the dioecious plant, *Rumex acetosa* // Chromosome Res. — 2000. — **8**. — P. 229–236.
576. Shirasu K., Schulman A. H., Lahaye T., Schulze-Lefert P. A contiguous 66-kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion // Genome Res. — 2000. — **10**. — P. 908–915.
577. Silva J. C., Kidwell M. G. Horizontal transfer and selection in the evolution of *P* elements // Mol. Biol. Evol. — 2000. — **17**. — P. 1542–1557.

578. Silva J. C., Kidwell M. G. Evolution of P elements in natural populations of *Drosophila willistoni* and *D. sturtevantii* // Genetics.— 2004.— **168**. — P. 1323–1335.
579. Singer T., Yordan C., Martienssen R. A. Robertson's *Mutator* transposons in *A. thaliana* are regulated by the chromatin-remodeling gene *Decrease in DNA Methylation (DDM1)* // Genes Dev.— 2001.— **15**. — P. 591–602.
580. Sinzelle L., Izsvak Z., Ivics Z. Molecular domestication of transposable elements: From detrimental parasites to useful host genes // Cell. Mol. Life Sci.— 2009.— **66**. — P. 1073–1093.
581. Skalická K. et al. Preferential elimination of repeated DNA sequence from the paternal, *Nicotiana tomentosiformis* genome donor of a synthetic, allotetraploid tobacco // New Phytol.— 2005.— **166**. — P. 291–303.
582. Skibbe D. S., Fernandes J. F., Walbot V. Mu killer-mediated and spontaneous silencing of *Zea mays* mutator family transposable elements define distinctive paths of epigenetic inactivation // Front. Plant Sci.— 2012.— **3**:212; doi: 10.3389/fpls.2012.00212.
583. Slotkin R. K., Martienssen R. A. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome // Nat. Rev. Genet.— 2007.— **8**. — P. 272–285.
584. Slotkin R. K., Vaughn M., Borges F. et al. Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen // Cell.— 2009.— **136**. — P. 461–472.
585. Smith A. M., Hansey C. N., Kaeppler S. M. TCUP: a novel *hAT* transposon active in maize tissue culture // Front. Plant Sci.— 2012.— **3**. — P. 6. — Doi: 10.3389/fpls.2012.00006.
586. Smykal P. Development of an efficient retrotransposon-based fingerprinting method for rapid pea variety identification // J. Appl. Genet.— 2006.— **47**, N 3. — P. 221–230.
587. Song R., Messing J. Gene expression of a gene family in maize based on noncollinear haplotypes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2003.— **100**. — P. 9055–9060.
588. Soper S. F., Heijden G. W., van der Hardman T. C. et al. Mouse maelstrom, a component of nuage, is essential for spermatogenesis and transposon repression in meiosis // Dev. Cell.— 2008.— **15**. — P. 285–297.
589. Soppe W. J. J., Jacobsen S. J., Alonso-Blanco C. et al. The late flowering phenotype of *fwa* mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a home-odomain gene // Molecular Cell.— 2000.— **6**. — P. 791–802.
590. Springer N. M., Stupar R. M. Allelic variation and heterosis in maize: How do two halves make more than a whole? // Genome Res.— **17**. — P. 264–275.
591. Staginnus C., Richert-Pöggeler K. R. Endogenous pararetroviruses: two faced travelers in the plant genome // Trends in Plant Science.— 2006.— **11**, N 10. — P. 485–491.
592. Starlinger P., Saedler H. Insertion mutations in microorganisms // Biochem.— 1972.— **54**. — P. 177–185.
593. Starlinger P., Saedler H. IS elements in microorganisms // Current Topics Microbiol. Immunology.— 1976.— **75**. — P. 11–152.
594. Stenoien H. K. Compact genes are highly expressed in the moss *Physcomitrella patens* // J. Evol. Biol.— 2007.— **20**. — P. 1223–1229.
595. Steward N., Ito M., Yamaguchi Y. et al. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress // J. Biol. Chem.— 2002.— **277**, N 40. — P. 37741–37746.
596. Stokes T. L., Richards E. J. Induced instability of two *Arabidopsis* constitutive pathogen-response alleles // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2002.— **99**. — P. 7792–7796.
597. Stokes T. L., Kundel B., Richards E. J. Epigenetic variation in *Arabidopsis* disease resistance // Genes and Development.— 2002.— **16**. — P. 171–182.
598. Stuart-Rogers C., Flavel A. J. The evolution of *Ty1-copia* group retrotransposons in gymnosperms // Mol. Biol. Evol.— 2001.— **18**. — P. 155–163.
599. Stuurman J., Nijkamp H. J., vanHaaren M. J. J. Molecular insertion site-selectivity of *Ds* in tomato // Plant J.— 1998.— **14**, N 2. — P. 215–223.
600. Sugimoto K., Takeda S., Hirochika H. MYB-related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of the tobacco retrotransposon *Tto1* and defense-related genes // Plant Cell.— 2000.— **12**. — P. 2511–2528.
601. Sundaresan V. Horizontal spread of transposon mutagenesis: new uses for old elements // Trends Plant Sci.— 1996.— **1**, N 6. — P. 184–190.

602. Sung S., Amasino R. M. Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3 // *Nature*.— 2004.— **427**.— P. 159–164.
603. Suoniemi A., Schmidt D., Schulman A. H. BARE-1 insertion site preferences and evolutionary conservation of RNA and cDNA processing sites // *Genetica*.— 1997.— **100**.— P. 219–230.
604. Szmulewicz M. N., Andino L. M., Reategui E. P. et al. An Alu insertion polymorphism in a baboon hybrid zone // *Amer. J. Physical Anthropology*.— 1999.— **109**.— P. 1–8.
605. Takahashi K., Terai Y., Nishida M., Okada N. Phylogenetic relationships and ancient incomplete lineage sorting among cichlid fishes in Lake Tanganyika as revealed by analysis of the insertion of retrotransposons // *Mol. Biol. Evol.*— 2001.— **18**.— P. 2057–2066.
606. Takeda S., Sugimoto K., Otsuki H., Hirochika H. Transcriptional activation of the tobacco retrotransposon *Tto1* by wounding and methyl jasmonate // *Plant Mol. Biol.*— 1998.— **36**, N 3.— P. 365–376.
607. Takeda S., Sugimoto K., Otsuki H., Hirochika H. A 13-bp *cis*-regulatory element in the LTR promoter of the tobacco retrotransposon *Tto1* is involved in retransposon activity to tissue culture, wounding, methyljasmonate and fungal elicitors // *Plant J.*— 1999.— **18**.— P. 383–393.
608. Talbert P. B., Chandler V. L. Characterization of a highly conserved sequence related to mutator transposable elements in maize // *Mol. Biol. Evol.*— 1988.— **5**.— P. 519–529.
609. Talbert P. B., Masuelli R., Tyagi A. P. et al. Centromeric localization and adaptive evolution of an *Arabidopsis* histone H3 variant // *Plant Cell*.— **14**.— P. 1053–1066.
610. Tanurdzic M., Vaughn M. W., Jiang H. et al. Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture // *PLoS Biol.*— 2008.— **6**.— P. 302.
611. Tatout C., Warwick S., Deragon J. M. SINE insertions as clade markers for wild crucifer species // *Mol. Biol. Evol.*— 1999.— **16**.— P. 1614–1621.
612. Tchurikov N. A., Ylyin Y. V., Skryabin K. G. et al. General properties of mobile dispersed genetic elements in *Drosophila melanogaster* // *Cold. Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.*— 1981.— **45**.— P. 665.
613. Teixeira F. K. et al. A role for RNA in the selective correction of DNA methylation defects // *Science*.— 2009.— **323**.— P. 1600–1604.
614. Tenailon M. I., Hollister J. D., Gaut B. S. A triptych of the evolution of plant transposable elements // *Trends Plant Science*.— 2010.— **15**, N 8.— P. 471–478.
615. Terai Y., Takahashi K., Nishida M. et al. Using SINEs to probe ancient explosive speciation: «Hidden» radiation of African cichlids? // *Mol. Biol. Evol.*— 2003.— **20**.— P. 924–930.
616. Thimmapuram J., Duan H., Liu L., Schuler M. A. Bicistronic and fused monocistronic transcript are derived from adjacent loci in the *Arabidopsis* genome // *RNA*.— 2005.— **11**.— P. 128–138.
617. Tian Z., Rizzon C., Du J. et al. Do genetic recombination and gene density shape the pattern of DNA elimination in rice long terminal repeat retrotransposons? // *Genome Research*.— 2009.— **19**.— P. 2221–2230.
618. Tikhonov A. P., SanMiguel P. J., Nakajima Y. et al. Colinearity and its exception in orthologous *adh* regions of maize and sorghum // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.— 1999.— **96**.— P. 7409–7414.
619. Timmis J. N., Ayliffe M. A., Huang C. Y., Martin W. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes // *Nature Rev. Genet.*— 2004.— **5**.— P. 123–135.
620. Todorovska E. Retrotransposons and their role in plant-genome evolution // *Biotechnology. EQ*. 21/2007/3.
621. Tomita M., Kuramochi M., Iwata S. *Superior*: a novel repetitive DNA element dispersed in the rye genome // *Cytogenet. Genome Res.*— 2009.— **125**.— P. 306–320.
622. Tomita M., Shinohara K., Morimoto M. Revolver is a new class of transposon-like gene composing the Triticeae genome // *DNA Res.*— 2008.— **15**.— P. 49–62.
623. Tran R., Henikoff J., Zilberman D. et al. DNA methylation profiling identifies CG methylation clusters in *Arabidopsis* genes // *Current Biology*.— 2005.— **15**.— P. 154–159.
624. Transposable Elements / Ed. by H. Saedler, A. Gierl.— Springer, 1996.
625. Tsuchisaka A., Theologis A. Heterodimeric interactions among the 1-amino-cyclopropane-1

carboxylate synthase polypeptides encoded by the *Arabidopsis* gene family // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2004.— **101**.— P. 2275–2280.

626. Turcotte K., Srinivasav S., Bureau T. Survey of transposable elements from rice genomic sequences // Plant J.— 2001.— **25**.— P. 169–179.

627. Ueda K., Tanaka I. The appearance of male gamete-specific histones gH2B and gH3 during pollen development in *Lilium longiflorum* // Dev. Biol.— 1995.— **169**.— P. 210–217.

628. Umeda M., Ohtsubo H., Ohtsubo E. Diversification of the rice Waxy gene by insertion of mobile DNA elements into introns // Jpn. J. Genet.— 1991.— **66**.— P. 569–586.

629. Ungerer M. C. et al. Genome expansion in three hybrid sunflower species is associated with retrotransposon proliferation // Curr. Biol.— 2006.— **16**.— P. R872–R873.

630. Varagona M. J., Purugganan M., Wesler S. R. Alternative splicing induced by insertion of retrotransposons into the maize waxy gene // Plant Cell.— 1992.— **4**.— P. 811–820.

631. Vazquez F., Vaucheret H., Rajagopalan R. et al. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs // Molecular Cell.— 2004.— **16**.— P. 69–79.

632. Venturi S., Dondini L., Donini P., Sansavini S. Retrotransposon characterization and fingerprinting of apple clones by S-SAP markers // Theor. Appl. Genet.— 2006.— **112**.— P. 440–444.

633. Vernhettes S., Grandbastien M. A., Casacuberta J. M. In vivo characterization of transcriptional regulatory sequences involved in the defence-associated expression of the tobacco retrotransposon *Tnt1* // Plant. Mol. Biol.— 1997.— **35**.— P. 673–679.

634. Vernhettes S., Grandbastien M. A., Casacuberta J. M. The evolutionary analysis of the *Tnt1* retrotransposon in *Nicotiana* species reveals the high variability of its regulatory sequences // Mol. Biol. Evol.— 1998.— **15**.— P. 827–836.

635. Vershinin A. V., Allnutt T. R., Knox M. R. et al. Transposable elements reveal the impact of introgression, rather than transposition, in *Pisum* diversity, evolution, and domestication // Mol. Biol. Evol.— 2003.— **20**.— P. 2067–2075.

636. Vicient C. M. Transcriptional activity of transposable elements in maize // BMC Genomics.— 2010.— **11**.— P. 601.

637. Vicient C. M., Jaaskelainen M. J., Kalendar R., Schulman A. H. Active retrotransposons are a common feature of grass genomes // Plant Physiol.— 2001.— **125**.— P. 1283–1292.

638. Vicient C. M., Kalendar R., Ananthawat-Jynsson K., Schulman A. H. Structure, functionality, and evolution of the *BARE-1* retrotransposon of barley // Genetica.— 1999.— **107**.— P. 53–63.

639. Vicient C. M., Kalendar R., Schulman A. H. Envelope-class retrovirus-like elements are widespread, transcribed, and insertionally polymorphic in plants // Genome Res.— 2001a.— **11**, N 12.— P. 2041–2049.

640. Vicient C. M., Kalendar R., Schulman A. H. Variability, recombination and mosaic evolution of the barley *BARE-1* retrotransposon // J. Mol. Evol.— 2005.— **61**.— P. 275–291.

641. Vicient C. M., Suoniemi A., Ananthawat-Jonsson K. et al. Retrotransposon *BARE-1* and its role in genome evolution in the genus *Hordeum* // Plant Cell.— 1999a.— **11**.— P. 1769–1784.

642. Vielle-Calzada J. P., de la Vega O. M. The Palomero genome suggests metal effects on domestication // Science.— 2009.— **326**.— P. 1078.

643. Vignols F., Rigau J., Torres M. A. et al. The brown midrib3 (*bm3*) mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid O-methyltransferase // Plant Cell.— 1995.— **7**.— P. 407–416.

644. Vitte C., Bennetzen J. L. Analysis of retrotransposon structural diversity uncovers properties and propensities in angiosperm genome evolution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2006.— **103**, N 47.— P. 17638–17643.

645. Vitte C., Ishii T., Lamy F., Brar D., Panaud O. Genomic paleontology provides evidence for two distinct origins of Asian rice (*Oryza sativa* L.) // Mol. Genet. Genom.— 2004.— **272**.— P. 504–511.

646. Vitte C., Panaud O. LTR retrotransposons and flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model // Cytogenet. Genome Res.— 2005.— **110**.— P. 91–107.

647. Voinnet O. Shaping small RNAs in plants by gene duplication // Nature Genetics.— 2004.— **36**.— P. 1245–1246.

648. Volff J.-N. Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes // BioEssays.— 2006.— **28**, N 9.— P. 913–922.

649. Vos P., Hordos R., Bleeker M. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // *Nucleic Acids Res.* — 1995. — **23**. — P. 4407–4417.
650. Vyskot B., Hobza R. Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog // *Trends Genet.* — 2004. — **20**. — P. 432–438.
651. Walbot V. Saturation mutagenesis using maize transposons // *Curr. Opin. Plant Biol.* — 2000. — **3**. — P. 103–107.
652. Walker J.A., Hughes D.A., Anders B.A. et al. Quantitative intra-short interspersed element PCR for specific DNA identification // *Analytical Biochemistry*. — 2003a. — **316**. — P. 259–269.
653. Walker J.A., Kilroy G.E., Xing I. et al. Human DNA quantitation using *Alu* element based polymerase chain reaction // *Analytical Biochemistry*. — 2003b. — **315**. — P. 123–128.
654. Walker J.A., Hughes D.A., Hedges D.J. et al. Quantitative PCR for DNA identification based on genome-specific interspersed repetitive elements // *Genomics*. — 2004. — **83**. — P. 518–527.
655. Wang L., Kunze R. Transposase binding site methylation in the epigenetically inactivated *Ac* derivative *Ds-cy* // *Plant J.* — 1998. — **13**. — P. 577–582.
656. Wang Q., Dooner H. Remarkable variation in maize genome structure inferred from haplotype diversity at the *bz* locus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2006. — **103**. — P. 17644–17649.
657. Wang W. et al. High rate of chimeric gene origination by retroposition in plant genomes // *Plant Cell*. — 2006. — **18**. — P. 1791–1802.
658. Watanabe M., Nikaido M., Tsuda T.T. et al. The rice and fall of the CR1 subfamily in the lineage leading to penguins // *Gene*. — 2006. — **365**. — P. 57–66.
659. Weber B., Schmidt T. Nested *Ty-gypsy* retrotransposons of a single *Beta procumbens* centromere contain a putative chromodomain // *Chromosome Res.* — 2009. — **17**. — P. 379–396.
660. Wei F.S. et al. Detailed analysis of a contiguous 22-Mb region of the maize genome // *PLoS Genet.* — 2009. — **5**. — P. 1000715.
661. Weising K., Nybom H., Wolf K., Kahl G. eds. DNA fingerprinting in plants: Principles, methods and applications, 2nd edn. CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, USA. — 2005.
662. Wendel J.F. Genome evolution in polyploids // *Plant Mol. Biol.* — 2000. — **42**. — P. 225–249.
663. Wenke T., Döbel T., Sørensen T. et al. Targeted identification of short interspersed nuclear element families shows their widespread existence and extreme heterogeneity in plant genomes // *Plant Cell*. — 2011. — **23**, N 9. — P. 3117–3128.
664. Wessler S. Plant retrotransposons: Turned on by stress // *Curr. Biol.* — 1996. — **6**. — P. 959–961.
665. Wessler S. Plant transposable elements. A hard act to follow // *Plant Physiol.* — 2001. — **125**. — P. 149–151.
666. Wessler S. Eukaryotic transposable elements: Teaching old genomes new tricks // *The Implicit Genome* / Eds. Caporale L. Oxford Univ. Press, USA. — 2006. — P. 138–165.
667. Wicker T., Guyot R., Yahiaoui N., Keller B. *CACTA* transposons in Triticeae. A diverse family of high-copy repetitive elements // *Plant Physiol.* — 2003. — **132**. — P. 52–63.
668. Wicker T., Sabot E., Hua-Van A. et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements // *Nat. Rev. Genet.* — 2007. — **8**, N 12. — P. 973–982.
669. Wicker T., Stein N., Albar L. et al. Analysis of a contiguous 211 kb sequence in diploid wheat (*Triticum monococcum*) reveals multiple mechanisms of genome evolution // *Plant J.* — 2001. — **26**. — P. 307–316.
670. Wicker T., Taudien S., Houben A. et al. A whole-genome snapshot of 454 sequences exposes the composition of the barley genome and provides evidence for parallel evolution of genome size in wheat and barley // *Plant J.* — 2009. — **59**, N 5. — P. 712–722.
671. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J. et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucleic Acid Res.* — 1990. — **18**. — P. 6531–6535.
672. Witte C.P., Le Q.H., Bureau T.E., Kumar A. Terminal repeat retrotransposons in miniature (TRIM) are involved in restructuring plant genome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2001. — **98**. — P. 13778–13783.
673. Won H., Renner S.S. Horizontal gene transfer from flowering plants of Gnetum // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2003. — **100**. — P. 10824–10829.
674. Wright S.I., Agrawal N., Bureau T.E. Effects of recombination rate and gene density on

- transposable element distributions in *Arabidopsis thaliana* // Genome Res.— 2003.— **13**.— P. 1897–1903.
675. Wright D.A., Voytas D.F. *Athila4* of *Arabidopsis* and *Calypso* of soybean define a lineage of endogenous plant retroviruses // Genome Res.— 2002.— **12**.— P. 122–131.
676. Wright S.I. et al. Population dynamics of an Ac-like transposable element in self- and cross-pollinating *Arabidopsis* // Genetics.— 2001.— **158**.— P. 1279–1288.
677. Xiong Y., Eickbush T.N. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences // EMBO J.— 1990.— **9**.— P. 3353–3362.
678. Xu H., Boeke J.D. Localization of sequences required in cis for yeast Ty1 element transposition near the long terminal repeats: analysis of mini-Ty1 elements // Mol. Cell. Biol.— 1990.— **10**.— P. 2695–2702.
679. Xu J.H., Kurata N., Akimoto M. et al. Identification and characterization of Australian wild rice strains of *Oryza meridionalis* and *Oryza rufipogon* by SINE insertion polymorphism // Genes Genet. Syst.— 2005.— **80**.— P. 129–134.
680. Xu J., Messing J. Maize haplotype with a *helitron*-amplified cytidine deaminase gene copy // BMC Genet.— 2006.— **7**.— P. 52–64.
681. Xu J.H., Osawa I., Tsuchimoto S. et al. Two new SINE elements, p-SINE2 and p-SINE3, from rice // Genes Genet. Syst.— 2005a.— **80**.— P. 161–171.
682. Yang C.H., Ellis J.G., Michelmore R.W. Infrequent transposition of *Ac* in lettuce, *Lactuca sativa* // Plant Mol. Biol.— 1993.— **22**.— P. 793–805.
683. Yang G.J. et al. Tuned for transposition: Molecular determinants underlying the hyperactivity of a stowaway MITE // Science.— 2009.— **325**.— P. 1391–1394.
684. Yang L., Bennetzen J.L. Structure-based discovery and description of plant and animal *Helitrons* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2009.— **106**.— P. 12832–12837.
685. Yasui Y., Nasuda S., Matsuoka Y., Kawahara T. The *Au* family, a novel short interspersed element (SINE) from *Aegilops umbellulata* // Theor. Appl. Genet.— 2001.— **102**.— P. 463–470.
686. Yin H., Lin H. An epigenetic activation role of Piwi and a Piwi-associated piRNA in *Drosophila melanogaster* // Nature.— 2007.— **450**.— P. 304–308.
687. Yoshida S., Maruyama S., Nozaki H., Shirasu K. Horizontal gene transfer by the parasitic plant *Striga hermonthica* // Science.— 2010.— **328**.— P. 1128.
688. Yu S., Hu S., Zhu C. Ultrastructure of sperm cell of the male germ unit in pollen tubes of *Nicotiana tabacum* // Protoplasma.— 1989.— **152**.— P. 29–36.
689. Yu Z., Wright S.I., Bureau T.E. Mutator-like elements in *Arabidopsis thaliana*: structure, diversity and evolution // Genetics.— 2000.— **156**.— P. 2019–2031.
690. Zhang J., Peterson T. Genome rearrangements by nonlinear transposons in *Maize* // Genetics.— 1999.— **153**.— P. 1403–1410.
691. Zhang Q., Arbuckle J., Wessler S.R. Recent, extensive and preferential insertion of members of the miniature inverted-repeat transposable element family *Heartbreaker* (*Hbr*) into genic regions of maize // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2000.— **97**.— P. 1160–1165.
692. Zhang S., Gu Y.K., Sing J. et al. New insights into *Oryza* genome evolution: high gene colinearity and differential retrotransposon amplification // Plant Mol. Biol.— 2007.— **64**, N 5.— P. 589–600.
693. Zhang X.Y. Perspective — The epigenetic landscape of plants // Science.— 2008.— **320**.— P. 489–492.
694. Zhang X., Wessler S.R. Genome-wide comparative analysis of the transposable elements in the related species *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2004.— **101**.— P. 5589–5594.
695. Zhang X., Wessler S.R. BoS: A large and diverse family of short interspersed elements (SINEs) in *Brassica oleracea* // J. Mol. Evol.— 2005.— **60**.— P. 677–687.
696. Zhao X.P., Si Y., Hanson R.E. et al. Dispersed repetitive DNA has spread to new genomes since polyploidy formation in cotton // Genome Res.— 1998.— **8**, N 5.— P. 479–492.
697. Zheng X., Pontes O., Zhu J. et al. ROS3 is an RNA-binding protein required for DNA de-

methylation in *Arabidopsis* // Nature.— 2008.— **455**.— P. 1259–1262.

698. Ziegler C. G., Lamatsch D. K., Stemlein C. et al. The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence // Chromosome Res.— 2003.— **11**.— P. 23–35.

699. Zietkiewtz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics.— 1989.— **20**.— P. 173–176.

700. Zietkiewtz E., Richer C., Labuda D. Phylogenetic affinities of tarsier in the context of primate Alu repeats // Mol. Phylogenet. Evolution.— 1999.— **11**.— P. 77–83.

701. Zilberman D., Gehring M., Tran R. K. et al. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence

between methylation and transcription // Nat. Genet.— 2007.— **39**.— P. 61–69.

702. Zingler N., Willhoeft U., Brose H. P. et al. Analysis of 5'-junctions of human LINE-1 and Alu retrotransposons suggests an alternative model for 5'-end attachment requiring microhomology-mediated end-joining // Genome Res.— 2005.— **15**.— P. 780–789.

703. Zuccolo A., Bowers J., Estill J. et al. A physical map for the *Amborella trichopoda* genome sheds light on the evolution of angiosperm genome structure // Genome Biol.— 2011.— **12**.— R48. Doi: 10.1186/gb-2011-12-5-r48.

704. Zuker C., Capello J., Lodish H. et al. *Dictyostelium* transposable element *DIRS-1* has 350-base-pair inverted terminal repeats that contain a heat shock promoter // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1984.— **81**.— P. 2660–2664.

СЛОВНИК

У цьому словнику наведено основні та найпоширеніші терміни, що часто вживаються не лише в генетиці, а й в інших напрямках біологічної науки, в яких застосовують методи генетичного і молекулярно-генетичного аналізу, зокрема в молекулярній екології і екогенетиці рослин, і є найуживанішими у цій книзі.

Аберация — структурна перебудова хромосоми або хроматиди. Також відхилення від норми в будові та функції молекул, окремих структур клітин, тканин; крайній морфологічний варіант, що зустрічається у всьому ареалі даної форми і представляє в більшості випадків неспадкову модифікацію.

Автополіплоїд — організм із мультиплікованим основним геномом, що приводить до наявності у нього понад двох гомологічних копій кожної хромосоми. *Автополіплоїдія* — одна з форм еволюції рослин, рідше — тварин.

Автополіплоїдія — помноження (як правило, спонтанне) ідентичних наборів хромосом того самого виду. Також виникнення поліплоїдного організму внаслідок геномної мутації типу поліплоїдії у предкового диплоїдного організму аналогічного виду. **А.** є одним із найпоширеніших шляхів симпатричного видоутворення.

Аглютинація хроматину — склеювання хромосом у метафазі чи анафазі, коли вони містяться на одному полюсі, або сестринських хроматид в анафазі (ефект злипання), результат аглютинації матриксу. Поділяють на: 1) *спонтанну А.х.*, що виникає самочинно у меристемі рослин з порушеним генним балансом; 2) *функціональну А.х.*, що викликається гормональними змінами у процесі розвитку і призводить до *ендополіплоїдії*, *міксополіплоїдії* (полісоматії), структурних змін хромосом; 3) *індуковану А.х.*, що викликається експериментально різними чинниками (температурою, радіацією, ультразвуком, хімічними речовинами, певними порушеннями дії генів, віковими явищами тощо). Може викликати генні і хромосомні мутації і утворення псевдомостів у анафазі.

Адаптаціогенез — процес виникнення адаптації. Розглядається як еволюція, тобто безперервний і глобальний процес виникнення все нових і нових форм адаптації до умов середовища, що постійно змінюється.

Адаптація — пристосування будови, функцій, поведінки клітин, організмів, популяцій, видів до певних умов існування. Також комплекс

морфологічних, поведінкових, генотипних й інформаційно-біоценотичних особливостей особини (організму), популяції, виду чи угруповання, що забезпечує успіх у конкуренції з іншими особинами, популяціями, видами й угрупованнями, стійкість до впливу чинників абіотичного середовища. Розрізняють генотипну (спадково детерміновану) та фенотипну (фізіологічну) **А.**

Адаптер — одно- або дволанцюгові олігонуклеотиди, призначені для об'єднання молекул ДНК з несумісними кінцями. У дуплексів кінці є різними: один кінець рівний, а інший — ступінчатий, або ж обидва кінці ступінчаті. **А.** застосовують, коли кінці векторних і клонованих молекул утворені різними рестриктазами, а також коли в клонованих фрагментах ДНК є сайти рестриктаз, що використовуються. Одноланцюгові **А.** застосовують для об'єднання молекул ДНК з 5'- і 3'-кінцями, що виступають. Дволанцюгові **А.** отримують комбінацією двох одноланцюгових **А.**, двох *лінкерів* або **А.** і лінкера. Дволанцюгові **А.** з різними кінцями, що виступають, здатні змінювати кінці ДНК, що виступають. Такі **А.** називають конверсійними.

Адаптивна норма — стан (властивість) пристосованості організмів, що характеризуються даним фенотипом, до існування в певних умовах зовнішнього середовища. Також генетична структура конкретної популяції в даних умовах, що забезпечує її конкурентоздатність в цих умовах існування; сукупність ознак (властивостей) організму, що забезпечує його виживання в конкретних умовах середовища.

Адитивний ефект, адитивна дія генів — сумарна дія генів на виявлення певної ознаки або сумарне проявлення полімерних генів в одній ознаці. Також кумулятивна дія всіх локусів, які контролюють домінування даної кількісної ознаки.

«Адресована» ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція) — метод, за якого використовується як праймер відома послідовність, гомологічна до заданих специфічних ділянок геному або до будь-якого високоповтореного фрагмента ДНК. При цьому природа фрагмента, поліморфізм якого ви-

вчається, відома, тобто немає тієї невизначеності, яка є характерною для фрагментів, що виявляються *RAPD*- і *AFLP*-методами, чи для випадкових проб *ПДРФ*. Один із варіантів цього методу — використання *ISSR*-маркерів, що широко застосовується у дослідженнях генофондів різних видів організмів.

Акліматизація — пристосування організмів до нових умов існування після територіального, штучного чи природного перенесення з утворенням стабільних відтворюваних груп організмів (популяцій). Одна з форм інтродукції рослин, коли пристосування популяції до нових умов існування відбувається шляхом генетичного зсуву на основі жорсткого природного і штучного доборів спонтанних мутантів, які більше, ніж вихідна форма, пристосовані до нових умов зростання. Також пристосування організму до нових умов середовища за межами свого ареалу, будь-яке пристосування організму до комплексу змінюваних чинників середовища.

Активация в гібридних клітинах — прояв генів, не виражених у вихідних батьківських клітинах.

Активация гена — процес індукції (включення експресії) гена, що супроводжується транскрипцією і трансляцією синтезованої мРНК.

Алелі — різні (альтернативні) структурні форми (стани) того самого гена, кожна з яких характеризується унікальною послідовністю нуклеотидів. Виникають одна з однієї внаслідок мутації, розпізнаються за порівняння їхніх нуклеотидних послідовностей, а інколи — й фенотипово. Також **алель** — конкретна форма існування гена, що визначає можливість розвитку конкретної ознаки. У диплоїдних організмів потенційна кількість алелей для кожного гена може бути представлена лише двома алелями, що локалізовані на гомологічних ділянках гомологічних хромосом.

Алопатричні популяції — популяції одного виду, що заселяють різні географічні райони і не стикаються одна з одною (наявність повної географічної ізоляції).

Алопатричне видоутворення, алопатрія — виникнення нового виду з однієї чи кількох суміжних популяцій, що розташовані на межі ареалу вихідного виду. Також процес видоутворення, що ґрунтується на просторовій ізоляції популяцій.

Алоплоїд — див. *поліганплоїд*.

Алополіплоїд, алоплоїд — поліплоїдний організм, клітина, ядро, утворені внаслідок об'єднання та помноження двох або кількох цілих геномів,

що належать до різних видів або родів. Також гібридна поліплоїдія, яка полягає в кратному збільшенні числа наборів хромосом при міжвидових та міжродових схрещуваннях.

Алополіплоїд геномний — алополіплоїдна форма, батьківські геноми якої були настільки віддалені, що у диплоїдних гібридів вони кон'югують дуже рідко або зовсім не кон'югують (міжвидові та міжродові гібриди). В алотетраплоїдів (амфідиплоїдів) у мейозі утворюються тільки біваленти.

Алополіплоїд сегментний — алополіплоїдна форма, батьківські геноми якої мають значну кількість гомологічних хромосомних сегментів і стерильність якої у диплоїдному стані невелика. В алотетраплоїдних форм у мейозі утворюється, залежно від спорідненості батьківських геномів, більша або менша кількість мультивалентів.

Алополіплоїдія (алоплоїдія, гібридна поліплоїдія) — об'єднання та помноження двох або кількох геномів, що належать до різних видів або родів (наприклад, ААВВСС, де А, В, С — геноми різних видів або родів). **А.** — один із шляхів *симпатричного видоутворення*.

Альтернативний сплайсинг — тканино- і ембріоспецифічні відмінності за характером вирізання *інтронів* за *процесингу* РНК, що транскрибується з одного і того самого гена.

Амітоз — прямий поділ ядра, що здійснюється перешнуванням ядра, утворенням ядерної перегородки, фрагментацією, пупкуванням тощо; при цьому оболонка ядра і ядерця не руйнуються, веретено поділу не утворюється, хромосоми залишаються деспіралізовані, поділ клітин відбувається не завжди. Може відбуватися як у період синтезу ДНК, так і в постсинтетичний.

Ампліконт — будь-яка послідовність ДНК, що ампліфікується у процесі додаткових циклів реплікації. Може вміщувати до 1 т.п.н. ДНК і містити коротку послідовність, що функціонує як *оріджин* ампліфікації, тобто як елемент, що контролює ампліфікацію.

Ампліфікація — процес утворення додаткових копій ділянок хромосомної ДНК (екстракопій), що містять певні гени або сегменти структурного гетерохроматину; у рослин особливо характерна для генів рибосомної РНК. Також накопичення копій певної нуклеотидної послідовності під час *полімеразної ланцюгової реакції*.

Амфіганплоїд — гібридний організм, який містить повні *ганплоїдні* набори хромосом, що походять від різних видів; виникає за віддаленої гіб-

ридизації або внаслідок гаплоїдизації *амфідиплоїдного* організму.

Амфідиплоїд (алотетраплоїд) — гібридний тетраплоїдний організм, який містить диплоїдні набори хромосом, що походять від двох різних видів. Поширене у рослин явище: культурна слива містить подвійний набір хромосом аличі та подвійний набір хромосом терену; тритикале — подібний гібрид пшениці та жита тощо.

Амфіміксис, амфігамія, еугамія — форма статевого розмноження за участі гамет двох батьків. Звичайний тип статевого розмноження, що є характерним для більшості тварин і рослин.

Амфіплоїдія — загальний термін для всіх типів гібридної поліплоїдії, яка виникає внаслідок схрещування двох чи більшої кількості диплоїдних видів, первісно ізольованих один від одного стерильністю гібридів. Включає поняття сегментної *алоплоїдії*, істинної, або геномної, *алополіплоїдії*, а також *анеуплоїдії*, що виникає внаслідок схрещування видів, які належать до серії анеуплоїдів.

Анеуплоїд — ядро, клітина, організм з кількістю хромосом, що відхиляється від чисел, кратних n ; містить зменшену (гіпоанеуплоїд) або збільшену (гіперанеуплоїд) кількість хромосом однієї або кількох гомологічних пар.

Антикодон — ділянка тРНК, що складається з трьох послідовно розташованих нуклеотидів, комплементарних до кодону в молекулі мРНК. Завдяки цьому амінокислота займає правильне положення в поліпептидному ланцюгу білка в процесі його синтезу в рибосомі.

Апоміксис — спосіб розмноження, не пов'язаний із злиттям статевих клітин або ядер. При апоміксисі зародок може утворюватись із незаплідненої яйцеклітини (*партеногенез*), з клітин зародкового мішка — синергид, антипод (апогамія), з соматичних клітин насінного зачатка — нуцелуса, інтегументів (адвентивна ембріонія), з незрілого пилку (андрогенез). Андрогенез та партеногенез використовують у біотехнології для отримання гаплоїдних форм рослин.

Апоптоз — процес запрограмованої загибелі клітин у процесі диференціювання і перетворення тканин; регулюється гормонами, може бути індукований штучно.

Апстрім — послідовності у лінійній молекулі ДНК чи білка, що займають певний сайт у напрямку, протилежному напрямку транскрипції ДНК чи синтезу білка відповідно (наприклад, на 5'-кінці будь-якого сайту в ДНК чи РНК).

Ареал — частина земної (водної) поверхні, у межах якої поширений і де відбувається повний цикл розвитку даного таксона (вид, рід, родина тощо) або будь-якого угруповання. Простір, на якому відбувається становлення виду, називають первинним ареалом.

АРП (англ. — ARS) — послідовність або фрагмент, що автономно реплікується.

Аутосоми — всі хромосоми в клітинах роздільностатевих організмів, крім статевих хромосом.

А-хромосоми — звичайні, властиві даному виду аутосоми, на відміну від *В-хромосом* (додаткових або надкомплектних хромосом).

Базальна клітина — одна з двох клітин, що утворилися внаслідок першого поділу зиготи покритонасінних рослин, яка розташована ближче до мікропіле; формує суспензор (підвісок).

Банк генів, геномна бібліотека — набір генів певного організму, отриманих у складі рекомбінантних ДНК; набір клонованих фрагментів ДНК, які представляють індивідуальний геном; сукупність клітинних клонів, до складу якої входять усі фрагменти чужинної ДНК.

Білки хроматину — складаються з гістонів і негістонових білків. Гістони — багаті основними амінокислотами (лізином і аргініном) білки хроматину — виконують важливу роль у його структурній організації. Негістонові білки хроматину — кислі та нейтральні білки, до яких належать ферменти реплікації ДНК, ферменти транскрипції і регуляторні білки.

Біоценоз — взаємопов'язана сукупність усіх живих організмів (тварин, рослин, грибів, мікроорганізмів), що сумісно заселяють ділянку суші чи водойми, взаємопов'язані у харчовому ланцюгу і впливають один на одного.

Блот-гібридизація — метод, який полягає в отриманні рестриктазних фрагментів досліджуваної ДНК, їх електрофоретичному розділенні, денатурації фрагментів (переведенні їх в одноланцюговий стан), перенесенні на фільтр (нітроцелюлозний, капроновий тощо) за допомогою фільтрувального паперу і проведенні реакції гібридизації зі специфічним полінуклеотидним зондом.

В-хромосоми — необов'язкові надкомплектні хромосоми, що не рекомбінують з *А-хромосомами* й еволюціонують незалежно. Їх кількість може варіювати як у різних організмів одного виду, так і у різних клітинах одного й того самого організму, наприклад, у жита, кукурудзи чи у цибулі-різуна — від 0 до 20–30 у різних клітинах. Успадковуються

нерегулярно і не за правилами Менделя. Механізми їх виникнення і біологічне значення до кінця не вивчені. Складаються переважно з гетерохроматину, проте можуть містити і структурні гени, зокрема рДНК. Частіше зустрічаються (як у рослин, так і у тварин) у несприятливих умовах довкілля, відіграють згодом певну роль у процесах адаптації і еволюції.

Варіації — 1. Поява фенотипних відмінностей у структурах клітини або між особинами. 2. Мутації у факультативних елементах геному. 3. Модифікаційні або генотипні відмінності між одиницями, що складають певну сукупність.

Вегетативне розмноження — тип нестатевого розмноження, за якого з частини материнського організму утворюються ідентичні йому за своїми спадковими ознаками нові особини.

Вектор — автономна молекула ДНК, отримана з плазмиди або бактеріофага і в яку може бути вставлено та клоновано фрагменти іншої ДНК. Містить один або кілька унікальних сайтів рестрикції для вбудовування чужинної ДНК. Здатен переносити включений ген (гени, клоновані фрагменти ДНК) від організму-донора в організм-реципієнт, де ці вектори можуть реплікуватись автономно або в інтегрованому з геномом стані, забезпечувати інші етапи реалізації генетичної інформації.

Величина (розмір) геному — кількість пар основ ДНК (нуклеотидів) у перерахунку на гаплоїдний геном.

Взаємодія генів — будь-яка взаємодія неалельних генів у межах геному (генотипу), що відображається на фенотипі і, зокрема, приводить до успадкування ознак з порушенням законів Менделя. Розрізняють різні форми взаємодії генів — комплементарність, епістаз, міжгенну супресію, дію генів-модифікаторів тощо. Повний комплекс взаємодії генів визначає баланс генів.

Взаємодія «генотип-середовище» — зміна ознак генотипу (фенів) за вирощування в різних умовах (у рослин — в різних ґрунтово-кліматичних умовах).

Вибіркова реплікація — побічна (додаткова) реплікація, що приводить до появи великої кількості копій будь-якої послідовності нуклеїнової кислоти.

Вибухова еволюція — різке збільшення кількості видів у будь-якій групі організмів, пов'язане з її адаптивною радіацією. **В.е.** зазвичай пов'язана з ранніми етапами еволюції таксона. Інколи су-

проводжується переходом у нову, адаптивну зону і формуванням нового таксона високого рангу.

Видоутворення — процес утворення одного чи декількох видів із видів, що існували раніше. Розрізняють такі способи **В.**: *алопатричне* або *географічне* (коли нові види виникають в умовах просторової ізоляції популяцій, тобто з популяцій, що займають різні географічні ареали); *симпатричне* (вид, що формується, перебуває у межах ареалу з материнським видом); *парапатричне* (процес поступового видоутворення, за якого новий вид утворюється з популяцій, що зберігають контакт протягом усього цього процесу внаслідок вузької смуги перекривання зон існування); інколи виділяють ще такі способи **В.**, як *алопарапатричне* та *стасипатричне* або *хромосомне*.

Виду критерії — ознаки виду, за допомогою яких один вид можливо відрізнити від іншого. Найчастіше застосовують сім загальних критеріїв виду: *морфологічний* (ґрунтується на зовнішній і внутрішній подібності особин одного виду); *фізіологічний* (подібність життєвих процесів, у першу чергу у можливості схрещування між особинами одного виду з утворенням плодючого потомства); *географічний* (географічна визначеність виду, яка ґрунтується на тому, що кожен вид займає певну територію чи акваторію); *екологічний* (ґрунтується на тому, що кожен вид може існувати лише у певних умовах, виконуючи функціональну роль у певному біогеоценозі, тобто кожен вид займає певну екологічну нішу); *генетичний* (ґрунтується на відмінностях видів за каріотипом, тобто за числом і морфологією хромосом); *біохімічний* (дозволяє розрізняти види за складом і структурою певних білків, нуклеїнових кислот та інших речовин); *молекулярно-генетичний* або *ДНК-критерій* (послідовність нуклеотидів у гомологічних ділянках ДНК). Жоден із критеріїв окремо не може слугувати для визначення виду, крім (з певними застереженнями) молекулярно-генетичного. Охарактеризувати вид можливо лише за сукупністю всіх критеріїв.

Високоповторювана ДНК — нуклеотидні послідовності, що містяться у геномі у кількості сотень тисяч чи мільйонів повторів і першими реасоціюють під час ренатурації тотальної ДНК; входить до складу *гетерохроматину* і *сателітної ДНК*. Одиниця (мотив) **В. ДНК** складається з невеликої кількості нуклеотидів.

Віріон — повністю сформована вірусна часточка, що складається з нуклеїнової кислоти і біл-

кової оболонки (капсиду). Зберігає і переносить генетичний матеріал вірусу від однієї клітини до іншої. Термін «**В.**» застосовують, як правило, для позначення вірусу, що перебуває у стані спокою (тобто поза межами клітини-хазяїна).

Вірус — інфікувальний комплекс, що складається з РНК (РНК-вмісні віруси: бромовіруси, ретровіруси тощо) або ДНК (ДНК-вмісні віруси: аденовіруси, бакуловіруси, гемінівіруси та ін.) і білкової оболонки (капсиди). **В.** не містять рибосом чи клітинних органел (напр., мітохондрій), тому вони використовують для реплікації метаболізм клітини хазяїна.

Внутрішній супресор — будь-яка мутація, що пригнічує фенотиповий прояв іншої мутації у тому самому гені.

Внутрішня петля — петлеподібна структура, що утворюється за вбудови в один із ланцюгів дволанцюгової молекули нуклеїнової кислоти одного або більше некомплементарних нуклеотидів антипаралельного ланцюга.

Вставка, інсерт — фрагмент чужинної ДНК, який вбудовується у векторну молекулу; також включення в будь-яке місце хромосоми невеликого фрагменту іншої негомологічної хромосоми з її генами.

Гаплоїд — ядро, клітина, організм, що містить одинарний набір хромосом, який утворюється внаслідок редукційного поділу або мейозу і властивий для гамет даного виду (позначається символом *n*). Гаплоїдне ядро в пресинтетичному періоді інтерфази містить кількість ДНК, яку позначають як 1С, а в постсинтетичному — 2С.

Гаплоїд подвоєний — диплоїдний організм, отриманий внаслідок подвоєння кількості хромосом у клітинах гаплоїда. У рослин **Г.п.** найчастіше отримують в культурі *in vitro*.

Гаплоїдний набір — кількість хромосом, що відповідає числу хромосом у гаметах (*n*).

Гаряча точка — ділянка хромосоми, в якій частіше, ніж в інших ділянках, відбуваються різні молекулярно-генетичні і цитогенетичні процеси (мутації, рекомбінації тощо).

Ген — елементарна, функціонально неподільна одиниця спадковості, за допомогою якої відбуваються запис, збереження і передача генетичної інформації в поколіннях; це фрагмент ДНК (у деяких вірусів — РНК), що кодує функціонально значущий продукт: поліпептид, рРНК, тРНК або контролює певний біохімічний процес під час формування фенотипу особини, клітини.

Ген(и) домашнього господарства — гени, продукти яких є необхідними для забезпечення життєдіяльності будь-яких клітин організму, на відміну від генів розкоші, експресія яких є тканинспецифічною.

Ген маркерний — ген відомих локалізації і ефекту, який надає можливість локалізувати інші гени.

Ген-модифікатор, ген-підсилювач — ген, який підсилює експресію неалельного йому гена і який не має іншого вияву у фенотипі (див. *енхансер*).

Ген-оператор — ділянка молекули ДНК, що несе функції включення і виключення структурних генів, які входять до складу певного оперона. Локалізується на початку оперона і перебуває у включеному стані (структурні гени оперона працюють), поки до нього не приєднається молекула *репресора*.

Ген-регулятор — ділянка молекули ДНК, що кодує синтез молекули *репресора*, функцією якого є контроль транскрипції *оперона*. Репресор, з'єднавшись з геном-оператором, виключає його, припиняючи роботу структурного гена. Робота **Г.-р.** визначається концентрацією відповідних метаболітів у цитоплазмі і зовнішніми умовами. Мутації у **Г.-р.**, які інактивують репресор, приводять до конститутивної (тобто незалежної від присутності ефектора) транскрипції оперона і, відповідно, до конститутивного синтезу ферментів, що кодуються опероном. Такі мутації, як правило, є рецесивними на відміну від аналогічних мутацій оперона. Також **Г.-р.** — це ген, продукт якого бере участь у регуляції експресії іншого гена; ген, який постійно кодує синтез регуляторних білків (активних і неактивних). Завдяки явищам індукції та репресії регулюється синтез білків-ферментів і структурних білків.

Ген репортерний, маркерний — неіндуцибельний клонований ген, білковий продукт якого легко визначається експериментально; застосовується при створенні трансгенних організмів.

Ген-сайленсинг — транскрипційна (див. *TGS*) і посттранскрипційна (див. *PTGS*) регуляція експресії генів за допомогою олігонуклеотидів, які викликають сиквенс-специфічну деградацію матричної РНК (мРНК). Такі олігонуклеотиди отримали назву «антисмислові», їх похідні застосовують для блокування синтезу цільового білка, спрямованого мутагенезу, інактивації певних мРНК, як засоби терапії та інструменти молекулярно-генетичних

досліджень і технологій, залучаються до гетерохроматинового сайленсингу.

Ген структурний — будь-який ген, який кодує поліпептидний ланцюг чи молекулу РНК; включаючи регуляторні гени, що кодують продукти, які визначають експресію **Г.с.**

Ген тканинспецифічний — ген, що експресується на певних стадіях онтогенезу у певних тканинах.

Ген-трансген — штучно внесений у клітину чужинний ген.

Ген химерний — ген, сконструйований із фрагментів ДНК, різних за походженням.

Генетична відстань (генетична дистанція) — міра генних (геномних) відмінностей між видами чи популяціями, що вимірюється будь-яким кількісним методом. Найчастіше — кількісна характеристика порівнюваних об'єктів (популяції, види тощо), що визначає середнє число замін нуклеотидів у кожному локусі, які відбулися під час нарізної еволюції двох груп організмів; нині найширше застосовують метод розрахунку **Г.в.** за Nei (Nei).

Генетична диференціація — збільшення відмінностей між повністю або частково ізольованими популяціями за частотою алелей багатьох генів внаслідок дії таких факторів еволюції, як добір, дрейф генів, потік (міграція) генів тощо.

Генетична ерозія — будь-який процес, зумовлений природними явищами або діяльністю людини, який з часом призводить до втрати генетичного різноманіття в популяції, або звуження генетичної основи виду, або втрати виду.

Генетична (генна) інженерія — цілеспрямоване конструювання нових, не існуючих у природі сполучень генів, тобто нових геномів. **Г.і.** включає синтез генів поза організмом, виділення з клітин окремих генів, копіювання і розмноження виділених (синтезованих) генів, сполучення різних геномів в одній клітині тощо.

Генетична інформація — сукупність відомостей про розвиток, будову й властивості організмів, що передається у спадок за допомогою генів. Зберігається в молекулах нуклеїнових кислот, де записана послідовністю нуклеотидів.

Генетична карта — схема взаємного розташування структурних генів на хромосомі (групі зчеплення) та їх розподілу по різних хромосомах, що містить, як правило, дані про відносну віддаленість генів один від одного (генетичні відстані). Будується на підставі даних рекомбінаційного аналізу (див. *рекомбінація*).

Генетична модифікація — процес зміни генетичної структури популяції, організму, клітини; виникає внаслідок генетичної рекомбінації, злиття протопластів, гібридизації, обробки мутагенами тощо. Може виникати також внаслідок перерозподілу рухомих (мобільних) генетичних елементів.

Генетична нестабільність — зміна з високою частотою положення, локалізації, структури, числа копій генів або їх частин у геномі протягом життя організму. Найчастіше пов'язана з активністю *мобільних генетичних елементів* (МГЕ).

Генетична рухливість — генетично детермінована здатність організму змінювати своє місце проживання, включаючи здатність до поширення свого потомства (насіння у рослин тощо), а також певна форма і будова цих організмів, що сприяє їх поширенню на значну відстань.

Генетичне картування — визначення положення генів на генетичній карті, що базується на емпіричній оцінці частоти рекомбінацій між ними, а також маркерними генами. Також це складання схем, на яких гени розташовані у лінійному порядку із зазначенням відносних відстаней між ними.

Генетичний код — система запису генетичної інформації у вигляді нуклеотидних триплетів (кодонів) ДНК і РНК, яка визначає послідовність амінокислот у білку. Кожний кодон, за винятком трьох «стоп-сигналів», відповідає одній із двадцяти амінокислот.

Генетичний поліморфізм — тривале за часом існування в популяції двох та більше генотипів, частота яких достовірно перевищує вірогідність виникнення відповідних повторних мутацій.

Гени гомеотичні — гени, дія яких проявляється в тому, що частина ембріона розвивається в орган, що виникає звичайно в іншому місці.

Гени розвитку — гени, що визначають розвиток, зокрема, гени для сенсорів гормонів і факторів зовнішнього середовища, регуляторні гени, які керують змінами росту і диференціювання клітин у просторі і часі; як правило, утворюють функціонально значущі кластери.

Генів моделі — гени і їхні структури, прогнозовані «геншукаючими» комп'ютерними програмами; іноді підтверджуються даними секвенсу кДНК чи пептидів.

Генів потік — обмін генами між різними популяціями одного і того самого виду за рахунок мігрантів, що приводить до тимчасової зміни частоти генів багатьох локусів у загальному пулі генів популяції-реципієнта.

Генна конверсія — процес, у результаті якого алель у цілій хромосомі втрачається і замінюється іншою алеллю з гомологічної хромосоми. Також **Г.к.** — це трансформація ДНК, за якої два гени взаємодіють так, що частина нуклеотидної послідовності одного з них вбудовується у послідовність іншого. Обидва гени при цьому зберігають свою цілісність і місцезонашування, проте у структурі одного з них відбувається зміна. По суті, **Г.к.** — це модифікація однієї алелі іншою, у результаті чого гетерозигота Аа, наприклад, стає гомозиготою АА. Вінклер припускав «фізіологічну взаємодію» алелей. Зараз вважається, що такий процес пов'язаний із рекомбінацією, можливо атиповою, коли після розриву репарація відбувається на матриці гомологічної хромосоми, у результаті чого спостерігають відхилення від звичайної сегрегації. Поширена і в соматичних тканинах, особливо у рослин.

Генне співвідношення — співвідношення частот алелей одного гена в популяції.

Генні гормони — гормони, які контролюються генами, як ланки в ланцюгу реакцій від гена до ознаки.

Генні кластери — групи тісно зчеплених генів, що відповідають за споріднені функції або які доповнюють один одного функціонально. Складають, як правило, родину мультигенів.

Генні мережі — функціональні мережі генів, що програмують, переважно, ранній розвиток організмів, а також генів, що кодують білки з численними збереженими (консервативними) доменами, які слугують для перехресного зв'язування таких мереж. Наприклад, набір генів, що містять домени А, і набір генів, що містять домени Б, зчеплені генами, що містять обидва ці домени. Припускають, що збережені домени слугують сайтами, в яких білки зв'язуються з особливими (певними) ділянками хромосоми для регуляції сусідніх генів.

Геногеографія — розділ генетики, що вивчає просторову спрямованість, причини і механізми географічного поширення певного гена в ареалі даного виду і який встановлює його походження і склад генофонду. Також це напрям у дослідженні географічного поширення алелей і їх частот, що визначають основні ознаки і властивості у межах усього чи частини ареалу виду, що вивчається.

Генокопії — однакові зміни фенотипу (утворення однакових фенів), зумовлені алелями різних генів, розташованих у різних локусах хромосоми або в різних хромосомах; є наслідком різних генних взаємодій або порушень на різних етапах од-

ного біохімічного процесу, що призводить до зупинки синтезу кінцевого продукту. Такі зміни фіксуються, як правило, на молекулярному рівні, але на рівні ознак (фенів) не відрізняються.

Геном — гаплоїдний набір хромосом з локалізованими в них генами. Нині терміном «Г.» позначають усю ДНК у гаплоїдному наборі хромосом даного виду, тобто сукупність ядерних елементів генетичної конституції особини, клітини певного виду. Має три рівні організації — нуклеосомний, хромосомний і ядерний.

Геноміка — розділ генетики, що вивчає геном, індивідуальні гени на молекулярному рівні, структуру (сиквенс) гена, його експресію і механізми регуляції активності, а також клонування гена і використання його у генно-інженерних цілях. Г. вивчає і порівнює також внутрішньовидовий і внутрішньопопуляційний поліморфізм геномів. Виділяють: **Г. структурну**, яка оцінює, зокрема, геномне різноманіття; **Г. функціональну** — вивчає профілі експресії різних генів; **Г. популяційну** — об'єднує традиційні популяційно-генетичні підходи з молекулярно-генетичним рівнем дослідження одночасно великої кількості окремих організмів, розшифровує фенотипові ефекти індивідуальних алелей та ідентифікує патерни адаптивної мінливості на рівні популяцій. Можливо, на нашу думку, виділити новий напрям — **Г. клітинну**, яка вивчає і порівнює геноми клітин різних тканин на різних стадіях розвитку організму, вивчає структурно-функціональні зміни геному в процесі онтогенезу й адаптації організму до змінних умов існування, а також зміни, що відбуваються у циклі диференціювання-дидиференціювання-редиференціювання.

Геносистематика — розділ систематики, в основі якого лежать результати дослідження і зіставлення генотипів на молекулярному рівні, найчастіше — це результати порівняльного вивчення ДНК. Вивчає все різноманіття генотипів організмів, всі і кожне взаємовідношення між ними. Об'єктом досліджень Г. є молекулярно-генетичні системи управління онтогенезом організмів, організовані з білків, РНК і ДНК.

Геносфера — коеволюційно взаємопов'язана генетична система біосфери, що забезпечує її існування, відтворення та історичний розвиток як цілісного утворення.

Генотип, ідіотип — сукупність усіх спадкових факторів організму чи клітини. Складається з геному, плазмону та пластому.

Генотипи «забуферені» — комбінації генів, що виникли внаслідок природного добору і які надають організму стійкість до впливу середовища і здатність до компенсації цього впливу. Різні аспекти цієї здатності генотипу до саморегуляції у період розвитку і репродукції називаються різними авторами пластичністю, каналізованим розвитком, екзистенціальною адаптацією, стабільністю, фенотиповою пластичністю (див. *пластичність генетична, пластичність геному*).

Генотрофи — рослини зі спрямованими (каналізованими) змінами генотипу, як правило, адаптивними, що виникли під впливом умов зовнішнього середовища.

Генофонд — сукупність генів (алелей) групи особин, популяції, групи популяцій чи виду, у межах яких вони характеризуються певною частотою зустрічання.

Гетерозигота — клітина або організм, що містить дві різні алелі в даному локусі гомологічних хромосом.

Гетерокаріон — клітина, в якій присутні два або більше ядер різної генетичної природи.

Гетерохроматин — частина хромосомного матеріалу — хроматину, яка протягом інтерфазу, на відміну від еухроматину, максимально сконденсована в ядрі; складається з повторюваних послідовностей і транскрипційно не реплікується; кількість і розподіл по хромосомах видоспецифічні і визначаються методами диференціального забарвлення хромосом. Розрізняють *гетерохроматин структурний* (конститутивний, постійно не активний) та факультативний, який зворотно конденсований.

Гетерохроматин структурний — гетерохроматин, що присутній в обох гомологічних хромосомах і який передається потомству у складі хроматину в цілому; локалізується в центромерах і вторинних перетяжках, рідше поблизу центромер і інтерстиціально. Кількість і локалізація **Г.с.** є видоспецифічними і можуть бути проаналізовані методами диференційного забарвлення хромосом.

Гібридизація інтрогресивна — привнесення до геному чужинного генетичного матеріалу шляхом схрещувань.

Гібридизація (ренатурація) ДНК — взаємодія комплементарних ланцюгів ДНК з утворенням дволанцюгової спіралі; утворення дволанцюгової структури ДНК шляхом виникнення водневих зв'язків між комплементарними нуклеотидами одноланцюгових молекул ДНК за правилом А-Т, Г-Ц.

Гібридна ДНК — молекула ДНК, утворена ланцюгами різного походження (від двох різних молекул ДНК) внаслідок послідовних процесів *денатурації* та *ренатурації*.

Голокінетична (голоцентрична) хромосома — хромосома, що має дифузну центромеру, при цьому нитки веретена поділу прикріплюються по всій довжині **Г.х.** або до багатьох її ділянок, що приводить до рівномірного переміщення всіх частин **Г.х.** в анафазі.

Гомеостаз — підтримання відносної постійності внутрішнього середовища організму або стійкої рівноваги в популяції чи екосистемі. Стабільність генетичних і фізіологічних функцій організмів у змінних умовах середовища.

Гомеостаз генетичний (популяційний) — здатність популяції підтримувати динамічну рівновагу генетичного складу, стабільність і цілісність генетичної структури в мінливих умовах довкілля.

Гомозигота — клітина або організм, що містить дві однакові алелі в даному локусі гомологічних хромосом; у статевому потомстві не дає розщеплення.

Гомоплазія — 1. Незалежне виникнення і фіксація одних і тих самих хромосомних мутацій у різних філетичних лініях. 2. Паралельна чи конвергентна еволюція, спадково не пов'язана з предками, внаслідок якої організми набувають структурної подібності.

Горизонтальне перенесення генів — еволюційний механізм, що полягає у передачі генів між організмами, що одночасно існують, на відміну від вертикального перенесення — від батьків до нащадків. Вважається, що **Г.п.г.** відбувається між представниками всіх царств живого.

Даунстрим — послідовність у лінійній ДНК, РНК або білка справа, нижче від тієї, що розглядається, у напрямку експресії гена чи синтезу білка у позиції 3' нижче (порівн. *апстрим*).

Дводомність — одночасна присутність на одній рослині і жіночих, і чоловічих квіток чи інших репродуктивних органів.

Дедиференціювання — втрата ознак, власних диференційованим клітинам; перехід спеціалізованих клітин, що не діляться, до проліферації, яка призводить до втрати більшості ознак спеціалізації.

Дем (дим) — локальна, географічно ізольована і невелика за чисельністю (від кількох одиниць до кількох десятків організмів) популяція, яка існує всередині виду впродовж життя одного-двох

поколінь, а потім об'єднується з іншими подібними популяціями; зазвичай, це «велика сім'я», тобто група споріднених організмів.

Денатурація (плавлення) ДНК — перехід ДНК із дволанцюгової в одноланцюгову за розривання водневих зв'язків між комплементарними парами основ внаслідок дії високих температур або за зміни концентрації солей у буфері. Плавлення відбувається у вузькому діапазоні температур, середня точка цього переходу молекул із одного стану в інший зветься точкою плавлення.

Детермінація — виникнення якісних відмінностей між частинами організму, що розвивається, які передують диференціюванню органів і тканин. Також **Д.** — це генетично визначений тип розвитку окремої клітини, органа чи цілісного організму за певним типом. **Д.** залежить від дії генів у часовому вимірі і від довкілля, в якому відбувається онтогенетичний розвиток організму. У процесі **Д.** настає момент, що визначає, який із багатьох можливих типів розвитку буде реалізовано в дійсності. Цей момент залежить від активації тих чи інших генів у певний час.

Дефішенсі, нехватка — хромосомна аберація (перебудова), за якої відбувається втрата кінцевої ділянки хромосоми (хроматиди); поняття **Д.** часто вживається як синонім терміна «делеція».

Дивергенція — розходження ознак у межах популяції, виду, що виникає за дії природного добору. За молекулярних досліджень **Д.** — це відсоток відмінностей у нуклеотидних послідовностях двох споріднених ділянок ДНК або між послідовностями амінокислот двох споріднених поліпептидних ланцюгів.

Дивергенція екогеографічна — розділення у процесі еволюції одного предкового (вихідного) виду на два і більше видів внаслідок їх географічного відокремлення і адаптації до локальних особливостей місцепроживання (зростання).

Дигамблід — гамблід тетрагамблідного за походженням організму (*дигеномного виду*). **Д.** містить два гамблідних набори хромосом, по одному від кожного зі складових полігамблідного геному. Прикладами є **Д.** картоплі *S. tuberosum*, твердої пшениці *T. durum*, тютюну *N. tabacum* тощо (див. *полігамблід*).

Дигеномний вид — алополігамблідний вид, що включає два геноми, різні за походженням, і який утворюється внаслідок гібридизації.

Дикий тип — 1. Фенотип чи алель, що переважає у природній популяції. 2. Ознака, детер-

мінована «нормальними» (не мутантними) алелями. 3. Генетична конституція організму перед початком експериментів з генетичної модифікації. 4. Довільне позначення генотипу, який слугує для порівняння з експериментальними типами.

Димінуція хроматину — зникнення (елімінація) надлишкового хроматину (переважно гетерохроматину та інактивованого еухроматину) внаслідок «недореплікації». За **Д. х.** може еліминуватися до третини всієї ДНК, представленій переважно високоповторюваними послідовностями. Може мати місце у процесах дедиференціювання клітин евкаріотів, зокрема за калусоутворення у рослин.

Димінуція хромосом — втрата окремих хромосом клітинами, що диференціюються і є попередниками певних тканин. Відбувається також за дедиференціювання високоспеціалізованих, як правило полігамблідних, клітин, зокрема у рослин. Є крайнім випадком *димінуції хроматину*.

Динаміка популяцій — 1. Зміна чисельності, статевого і вікового складу популяції, що визначається внутрішньопопуляційними процесами і взаємодією популяцій різних видів. 2. Науковий напрям у біології, що вивчає внутрішньо- і міжпопуляційні процеси з використанням апарата математичного моделювання.

Диплоїд — ядро, клітина, організм, що характеризуються подвійним набором гомологічних хромосом, представлених кількістю, характерною для даного виду (символ $2n$). У пресинтетичному періоді інтерфази диплоїдне ядро містить кількість ДНК, яка позначається як $2C$, а в постсинтетичному — $4C$.

Дистальний (кінець) — у хромосом — кінець або ділянка, що розташована найдалше від центромери.

Диференціальне помноження (мультиплікація) хромосом — нерівномірне збільшення кількості окремих хромосом в ендомітозі, наприклад у живильних клітинах дрозофіли за рівня плідності 512 кількість копій Y-хромосоми складає лише 4.

Диференціювання — процес виникнення відмінностей між частинами організму (клітинами) та їх спеціалізації під час розвитку. Також процес розвитку, у ході якого відносно неспеціалізована клітина перетворюється у більш спеціалізовану, що призводить до відмінностей між дочірніми клітинами, а також материнськими і дочірніми клітинами. Проявляється морфологічними, структурни-

ми, фізіологічними, біохімічними змінами клітин, в основі яких лежить зміна активності генів, які відповідають за синтез відповідних білків, що зумовлюють **Д.** Вихідним моментом цього процесу є *детермінація*.

Дицентрик — хромосома або хроматида, що має дві центромери і яка утворюється внаслідок взаємної (реципрокної) *транслокації*.

ДНК-вектор — реплікон у вигляді невеликої плазмиди або бактеріофага, що використовується в експериментах молекулярного клонування для перенесення чужинних нуклеїнових кислот в організм хазяїна, де ці кислоти можуть бути розмножені.

ДНК високоповторювана — нуклеотидні послідовності, які містяться в геномі у вигляді сотень тисяч повторів коротких послідовностей (5–100 п. н.) і першими реасоціюють під час *ренатурації* тотальної ДНК; входить до складу *гетерохроматину* та *сателітної ДНК*.

ДНК-зонд — відносно невеликий фрагмент одноланцюгової ДНК, який використовують для пошуку комплементарних послідовностей у молекулі більшого розміру або серед різних молекул ДНК.

ДНК комплементарна (кДНК) — одноланцюгова ДНК, що отримана внаслідок *зворотної транскрипції* молекул мРНК.

ДНК некодувальна — ДНК, яка не кодує ні поліпептиди, ні РНК. **ДНК. н.** є складовою частиною більшості еукаріотних геномів і включає в себе *інтрони*, *спейсери*, *псевдогени*, *центромери* і більшу частину *повторюваної ДНК*.

ДНК сателітна — див. *сателітна ДНК*.

ДНК-сиквенування — визначення послідовності азотистих основ у молекулі ДНК. Існує кілька методів сиквенування — автоматичне, хімічне, пряме тощо.

Добір — процес диференційного відтворення та збереження генотипів і популяції, що є конструктивним чинником еволюції, зумовлений генотипною мінливістю.

Добір дестабілізуючий — одна з форм *добору рушійного*, проявляється за стресових умов існування, зумовлює підвищення мінливості, в еволюції є важливим чинником її прискорення. Явище **Д.д.** відкрито й експериментально підтверджене у хутровому тваринництві (Д. К. Беляєв), а також у популяціях культивованих клітин (В. А. Кунах). Концепцію **Д.д.** розробив Д. К. Беляєв.

Добір дизруптивний — форма *добору природного*, що сприяє двом або більше напрямам мін-

ливості й елімінує проміжні фенотипи; не сприяє проміжному станові ознаки. Інколи розглядається як окремий випадок *добору рушійного*.

Добір каналізуючий — елімінація (видалення) з популяції генотипів, що надають організмам, які розвиваються, чутливість до мінливих чинників довкілля. Форма *добору стабілізуючого*, що являє собою добір організмів з генами, здатними знизити чутливість онтогенезу до зовнішніх і внутрішніх перешкод (див. *каналізація*).

Добір клітинний (внутрішньосоматичний) — добір клітин в інтактних організмах за їх розмноження (переважно — мітотичного), а також елімінація (видалення) окремих клітин, які є носіями змін, що знижують їх адаптивність у даних конкретних умовах існування.

Добір природний — процес диференційного виживання і відтворення найприспособіших до мінливих умов довкілля організмів і вимирання у ході еволюції непристосованих. Цей процес відбувається в генетичній структурі серед особин на рівні популяцій, видів та надвидових таксономічних одиниць, унаслідок чого популяції поступово набувають нових ознак, спричинює утворення нових видів. Існує кілька форм **Д.п.** — *рушійний*, *дизруптивний*, *стабілізуючий*.

Добір рушійний — форма добору, що приводить до зміни фенотипу і зміщення *норми реакції* в одному певному напрямку. Під контролем **Д.р.** генофонд популяції змінюється як єдине ціле, тобто не відбувається дивергенції дочірніх форм (див. *еволюція філетична*).

Добір спрямований — форма добору, що забезпечує еволюцію вслід за змінюваними умовами довкілля; при цьому добір нових мутацій змінює *норму реакції* і адаптивну цінність порівняно з вихідною популяцією. **Д.с.** може фіксувати популяції, які в умовах існування предкової популяції були шкідливими; класичний приклад дії **Д.с.** — *індустріальний меланізм*.

Добір стабілізуючий — 1. Форма добору, за якого середнє значення ознаки у популяції не змінюється, а мінливість зменшується. Відбувається завдяки селекційній перевазі «нормального» фенотипу над формами, що ухиляються; зменшує мінливість і підвищує адаптаційну здатність організмів. 2. Теорія І.І. Шмальгаузена (1946), що включає: а) форму природного добору, внаслідок якої виникають генотипи з нормою реакції, яка дозволяє організмам в умовах різних змін довкілля

виживати й утворювати модифікації, пристосовані і до звичайних умов довкілля. **Д.с.** відбувається на основі селекційної переваги нормального (дикого), оптимального для даних умов середовища фенотипу перед формами, що негативно ухиляються. Він знижує мінливість і підвищує регуляторну здатність організму, включаючи регуляцію мутаційного процесу; б) елімінацію фенотипів, недоліки яких є наслідком відносної нестабільності їхніх епігенетичних систем. **Д.с.** відбувається за стабільних умов довкілля, при цьому фенотипова однорідність популяції може існувати на фоні різнорідних генотипів.

Довгі кінцеві повтори, ДКП (англ. LTRs — long terminal repeats) — прямі повторювані послідовності на кінцях ДНК-копії РНК-геному ретровірусів, що утворилася в результаті зворотної транскрипції. Кожний **ДКП** складається з трьох елементів — U3-R-U5. 3'-кінець елемента U5 сам містить короткий інвертований повтор, гомологічний послідовності на 5'-кінці елемента U3, тобто сама послідовність **ДКП** фланкована короткими інвертованими повторами. **ДКП** беруть участь в інтеграції ДНК-копії геному ретровірусу (ретроелемента) у геном клітини-хазяїна. Ділянка U3 кожного **ДКП** несе промотор, при чому промотор лівого **ДКП** бере участь у транскрипції ДНК провірусу, а промотор правого — послідовності ДНК клітини-хазяїна поблизу сайту інтеграції ретровірусу. **ДКП** фланкують складні ретроелементи і беруть участь у їх транспозиції. У провірусів **ДКП**, розташований *апстрим*, функціонує як *промотор* або *енхансер*, а **ДКП**, розташований *даунстрим*, — як полі(А)додатковий сигнал. **ДКП** може бути застосований як елемент інтеграційного вектора і виконувати функції, що є основними для експресії евкаріотних генів (напр., переміщення, ініціація, поліаденилювання транскриптів тощо).

Довкілля — всі умови живої і неживої природи, за яких існує організм і які прямо чи опосередковано впливають на стан, розвиток і розмноження як окремих організмів, так і популяцій. Розрізняють біотичні чинники **Д.**, зокрема тваринний і рослинний світ у тій чи іншій місцевості, та абіотичні (неорганічний світ — особливості рельєфу, ґрунту і водного середовища, умови освітлення, вологість повітря, температурний і кисневий режими тощо).

Доза гена — 1. Кількість копій даного гена у розрахунку на ядро клітини. 2. Кількість алелей даного гена, присутніх у генотипі організму.

Домен — 1. Дискретна ділянка хромосоми. 2. Ділянка поліпептидного ланцюга білка, що виконує яку-небудь його функцію (цитоплазматичну, мембранну та ін.), кодується ділянкою гена, розташованою між двома *інтронами*, тобто одним *екзоном*.

Домен білка — складна комбінація білкових вторинних структур, яка має специфічні функції і містить активний сайт.

Домінантність — форма взаємодії алельних генів, за якої один з них (домінантний) пригнічує в гетерозиготі дію іншого (рецесивного) і таким чином визначає фенотип гетерозиготи.

Дот-блот-гібридизація (дот-блотинг) — метод визначення концентрації тестованої ДНК або наявності в ній певних послідовностей нуклеотидів; ґрунтується на модифікації методу *дот-гібридизації*, який полягає в перенесенні на нітроцелюлозний фільтр різних кількостей аналізованої ДНК у вигляді плям з наступною її гібридизацією з міченими олігонуклеотидними зондами.

Дот-гібридизація — гібридизація нуклеїнових кислот в плямі на твердому пласкому носії; метод кількісного визначення ДНК або РНК.

Дрейф генів, дрейф генетичний — зміни концентрації алелей у популяції (зміна генетичної структури) під дією випадкових (стохастичних) чинників, що призводять до зниження спадкової мінливості популяції. **Д.г.** обмежує дію закону Харді – Вайнберга у порівняно невеликих популяціях, де завжди знаходяться випадкові фактори, що порушують стабільність частот алелей, які передаються з покоління у покоління. Величина цих порушень перебуває у зворотній залежності від розміру популяції, тобто чим менша популяція, тим сильніше проявляються **Д.г.** у вигляді великих відхилень фактичних частот генів від очікуваних за законом Харді – Вайнберга. Інша назва **Д.г.** — генетико-автоматичні процеси (переважно у російській літературі).

Дуплекс ДНК — структура молекул ДНК, що описана в моделі Уотсона – Крика, згідно з якою два полінуклеотидні ланцюги полярно зв'язані один з одним у позиції 3'–5' і є ренатурованими (перебувають у стані гібридизації).

Дуплікація — 1. Різновид хромосомних перестроєнь, хромосомна мутація, за якої відбувається подвоєння будь-якої ділянки хромосоми у гаплоїдному наборі. 2. Подвоєння сегмента ДНК розміром від одного нуклеотида до субхромосомного фрагмента, що включає кілька генів. **Д.** може лежати

в основі виникнення кластерів генів і мультигенних сімейств; розрізняють інвертовані і прямі Д.

Дуплікація тандемна — дуплікація, за якої повторені сегменти хромосом (ДНК) розташовані безпосередньо один за одним.

Дуплікація хромосом — окремий випадок хромосомної перебудови типу *дуплікації*, за якого відбувається подвоєння цілої хромосоми. Д.х. слід відрізняти від *трисомії*, що ґрунтується на нерозходженні хромосом в анафазі.

Евкаріоти — організми, клітини яких містять диференційоване, обмежене мембраною сформоване ядро та інші обмежені мембранами органоїди (мітохондрії, пластиди).

Еволюція — природно спрямований процес історичного розвитку живої природи як єдиного цілого, що супроводжується виникненням, зміною і вимиранням видів, перетворенням екосистем (біогеоценозів) і біосфери у цілому. Необоротний процес розвитку живої природи на основі мінливості, спадковості і природного добору шляхом перетворення одних органічних форм на якісно інші в результаті їх адаптації до умов існування, що безперервно змінюються.

Еволюція конвергентна — поява однакових, паралельних спеціалізацій у незалежних одна від одної ліній. В одних випадках це відбувається на основі спорідненості, тобто за наявності гомологічних хромосом і генів, в інших — на основі чистої конвергенції — явища, яке пояснюється тим, що деякі фундаментальні структури змінюються лише в обмежених напрямках. У подібних випадках конвергенція може бути випадковою, що виникає під впливом добору в однакових умовах середовища або внаслідок паралельної втрати функції.

Еволюція паралельна — незалежне накопичення у споріднених групах організмів односпрямованих змін (напр., ряди гомологічної мінливості М.І. Вавилова). Якщо групи не споріднені, то це — *еволюція конвергентна*.

Еволюція спряжена — тип еволюції угруповання, що полягає у взаємному доборі залежних один від одного автотрофів і гетеротрофів, які екологічно є тісно взаємозалежними.

Еволюція спрямована — еволюційна зміна потомства однієї лінії, що продовжується протягом тривалого часу у тій самій якості і напрямку.

Еволюція філетична — тип еволюції, для якого є характерним повільний прогресивний зсув профілюючих ознак групи організмів як ре-

акція на зміну адаптивної зони, у результаті чого вихідний таксон поступово змінюється в інший таксон. Відбувається за дії *добору рушійного*, коли генофонд популяції змінюється як єдине ціле, тобто не відбувається дивергенція дочірніх форм. У результаті **Е.ф.** виникає єдина, без відгалужень філетична лінія у вигляді безперервного ряду послідовних у часі груп (популяцій, видів), кожна з яких є потомком попередньої групи і нащадком майбутньої.

Екзон — кодувальна послідовність структурного гена евкаріотів, яка зберігається протягом *процесингу* (видалення *інтронів* із пре-мРНК) і входить до складу зрілої матричної (інформаційної) РНК.

Екзонуклеаза — фермент, який гідролізує кінцеві фосфодіефірні зв'язки (на 3'- чи 5'-кінці) полінуклеотиду.

Екогенетика, екологічна генетика — розділ генетики, що досліджує процеси взаємодії генетичних факторів і факторів довкілля (екологічних чинників), тобто роль зовнішніх умов у формуванні фенотипу даним генотипом, фено- і генотипні відмінності між спорідненими групами організмів у різних екологічних умовах.

Екосистема, екологічна система — біологічна система, що являє собою функціональну єдність угруповання організмів і навколишнього середовища. Основними властивостями **Е.** є їх цілісність і відносна стійкість, що виявляється у здатності до саморегуляції і самопоновлення.

Екотип, екологічний тип — група особин будь-якого виду, що пристосована до існування в певному місці оселення та відрізняється від інших груп особин того самого виду спадково закріпленими особливостями.

Екофенотип — генетично не детермінований фенотип організму (виду), змінений за дії зовнішніх (екологічних) чинників середовища, а не мутації.

Експресивність — ступінь фенотипового вияву однієї і тієї ж алелі певного гена у різних особин.

Експресія гена — реалізація генетичної інформації, закодованої у ДНК шляхом її транскрибування у мРНК (іРНК).

Ектопічна кон'югація — неспецифічна кон'югація візуально еухроматинових ділянок хромосом у мейозі з *проксимальними* (прицентроммерними) гетерохроматиновими ділянками інших хромосом, тобто «еухроматин» цих ділянок хромо-

сом має властивості гетерохроматину; у зоні **Е.к.** зазвичай часто відбуваються розриви хромосом.

Ектопічна рекомбінація — один із наслідків транспозон-індукованої мінливості; відбувається між гомологічними елементами негомологічних хромосом за мейозу, приводячи до хромосомних перебудов і, можливо, утворення «макротранспозонів», здатних зсувати навіть відносно великі послідовності, захоплені ДНК хазяїна, до нових ділянок геному.

Елементарна еволюційна подія (явище) — внутрішньопопуляційна диференціація, зміна генофонду популяції, зміна генних частот у популяції.

Еліситори, провокатори — біотичні або абіотичні чинники, які індукують захисні реакції рослин. Найчастіше — це низькомолекулярні речовини, які виділяються з клітинних оболонок патогенів (наприклад, грибів) або зі стінок рослинних клітин під час їх руйнування. Здатні індукувати активність генів, які кодуєть ферменти фенілпропаноїдного шляху. Дія цих ферментів приводить до акумуляції фітоалексинів (антимікробних речовин) та фенольних сполук із фунгіцидними властивостями.

Ендемік — місцевий вид або інша систематична категорія (рід, родина, клас тощо), що мешкають виключно у даному регіоні.

Ендомітоз — подвоєння кількості хромосом усередині ядерної оболонки без руйнування ядерця і без утворення веретена поділу. Виділяють окремо **дисперсійний ендомітоз**, коли відбувається спіралізація хромосом (неповна) і можна виділити окремі стадії, подібні до стадій нормального мітозу, — ендпрофаза, ендметафаза, енданафаза та ендотелофаза.

Ендонуклеаза — фермент, який каталізує розрив внутрішніх фосфодіефірних зв'язків (гідроліз) у полінуклеотиді (одно- або дволанцюговій ДНК чи РНК).

Ендополіплоїдія — кратне збільшення числа хромосом у ядрі в результаті одного чи кількох *ендомітозів*.

Ендоредуплікація — форма *ендомітозу*, яка характеризується помноженням (частіше подвоєнням) деспіралізованих хромосом, внаслідок чого ознаки мітозу відсутні і тому її ще називають прихованим ендомітозом. Лежить в основі політенізації хромосом. У профазі наступного мітозу ендоредупліковані хромосоми проявляються у вигляді багатонитчатих структур, в яких кожна центромера утримує по 4, 8 і т. д. хроматид. Дипло- та

квадрихромосоми в пізній метафазі можуть розпадатися відповідно на 2 та 4 хромосоми.

Енхансер, підсилювач — специфічна *цис-*діюча послідовність ДНК розміром 50–100 п. н., яка впливає на ефективність транскрипції генів; впливає на експресію генів незалежно від їх орієнтації та розташування в ДНК. Також *ген-модифікатор*, який посилює фенотиповий прояв іншого гена.

Епіген — часточка функціональної спадкової пам'яті, у якій частина спадкової інформації зберігається, кодується та передається потомству поза первинною структурою молекул ДНК геному.

Епігенетика — науковий напрям, що вивчає потенційно стабільні і теоретично спадкові зміни генної експресії чи клітинного фенотипу, які відбуваються без змін Уотсон – Криківського спарювання нуклеотидів ДНК. **Е.** вивчає молекулярні шляхи упаковки генів у хромосоми і їх експресії, надгенетичні механізми регуляції функціонування геному.

Епігенетичні варіації — фенотипове вираження диференційної активності генів, що успадковується в поколіннях клітин. Від мутацій відрізняються тим, що не зберігаються за мейозу (у статевих поколіннях), оскільки є зміною фенотипу особини (клітини) без зміни послідовності її геномної ДНК.

Епігенетичні елементи геному — елементи, які визначають стабільно успадковувані зміни рівня експресії генів без зміни послідовності геномної ДНК.

Епігеном — сукупність усіх *епігенетичних елементів геному*, що спричиняють експресію гена в клітині.

Епігенотип — фенотип як продукт взаємодії даного генотипу із зовнішнім середовищем при формуванні кожної ознаки в межах його норми реакції.

Епісома — 1. Позахромосомний елемент спадковості. 2. Генетичний елемент, здатний самостійно розмножуватися в цитоплазмі. **Е.** може вбудовуватися в хромосому шляхом реципрокного кросинговеру (сайт-специфічної рекомбінації) (див. також *плазміда*).

Еуплоїд — ядро, клітина, організм з кількістю хромосом, кратною гаплоїдному (*n*) або основному (*x*) числу хромосом. Якщо основне число хромосом збільшене в кратну кількість разів (4*x*, 6*x*, 8*x*), euploїди зуться *алополіплоїдами*, якщо в некратну (3*x*, 5*x*, 7*x*, 9*x*) — анортоплоїдами.

Еухроматин — частина хромосомного матеріалу — хроматину, яка характеризується нор-

мальним рівнем конденсації протягом мітозу та деконденсації в період інтерфази; реплікується в ранній S-фазі мітотичного циклу і складається, в основному, з транскрипційно-активної ДНК, тобто представляє собою активний хроматин; здатен зворотно перетворюватись у факультативний гетерохроматин.

Ефект «вузької шийки» пляшки — флуктуація частот генів у період проходження великою популяцією через стадію стиснення, тобто різкого зменшення чисельності. Потім ця популяція знову збільшує свій розмір зі зміненим генним пулом і, зазвичай, зі зменшеною мінливістю внаслідок *дрейфу генів*.

Ефект засновника — перенесення групою особин (особин-«засновників») великої популяції лише частини генетичного різноманіття цієї популяції при заселенні нової території. **Е.з.** — це *дрейф генів*, зумовлений тим, що вихідна популяція складається з невеликої кількості особин.

Життєвий цикл — повна послідовність фаз росту і розвитку організму від зиготи до утворення гамет (див. також *онтогенез*).

Закон гомологічних рядів спадкової мінливості, закон Вавилова — генетично близькі види і роди характеризуються подібними рядами спадкової мінливості з такою правильністю, що, знаючи низку форм у межах одного виду, можливо передбачити знаходження паралельних форм у інших видів і родів. Сучасне трактування **Закону** — споріднені види, роди, родини тощо володіють гомологічними генами і порядками генів у хромосомах, подібність яких тим повніша, чим еволюційно ближчі порівнювані таксони. Гомологія генів у споріднених видів проявляється у подібності їх спадкової мінливості.

Закрита рамка зчитування — рамка зчитування, яка містить стоп-кодони, що не дозволяє мРНК, яка відповідає цій послідовності, транлюватися у функціонально-активний білок внаслідок передчасної термінації трансляції.

Зародковий мішок — жіночий гаметофіт покритонасінних рослин, який міститься у центральній частині насінного зачатка (нуцелусі) і в якому відбувається подвійне запліднення, в результаті чого із заплідненої яйцеклітини (зиготи) розвивається *зародок*, а з центральної клітини — ендосперм.

Зародок — зачаток нової особини папоротеподібних та насінних рослин. У насінних рослин розвивається в насінному зачатку, в зрілому насін-

ні диференційований на сім'ядолі, підсім'ядольне коліно (гіпокотиль), бруньку із зачатками листків і стебла, зачаток кореня. Може розвиватись із зиготи (заплідненої яйцеклітини), незаплідненої яйцеклітини або інших клітин зародкового мішка чи насінного зачатка.

Зворотна транскриптаза — РНК-залежна ДНК-полімераза, ревертаза. Фермент класу трансфераз, що здійснює утворення ДНК-копії у РНК-геномних вірусів. Здійснює ДНК-залежний синтез ДНК і синтез ДНК на матриці РНК (*зворотна транскрипція*).

Зворотна транскрипція — синтез ДНК на матриці РНК, що здійснюється за участі *зворотної транскриптази*.

Зчеплення — виключна або переважна передача нащадкам даної пари алелей одного з батьків; ступінь зв'язку алелей двох генів у мейозі чи за генетичного схрещування. **З.** зумовлене локалізацією генів у одній хромосомі (групі зчеплення). Гени однієї групи **З.** успадковуються незалежно від генів, що належать до інших груп. Число груп **З.** відповідає гаплоїдному числу хромосом.

Зчеплення генів — зв'язок між генами, що виключає можливість їх незалежного успадкування, вільної комбінації і який визначається їх локалізацією в одній хромосомі. **З.г.** може бути повним, за якого виключається вільна комбінація генів, і частковим. Неповне (часткове) **З.г.** — це результат кросинговеру між зчепленими генами, тому повне **З.г.** можливе лише в організмів, у клітинах яких кросинговер у нормі не відбувається.

Ідіограма, каріограма — графічне зображення каріотипу або окремих хромосом з усіма структурними характеристиками, такими як положення центромери, супутників, хромомер і гетерохроматину, абсолютна довжина плечей.

Ідіотип — сукупність спадкових факторів організму і її специфічна структура. Складається з геному, мітохондріому, плазмону, а у зелених рослин — ще й із пластоми.

Ізоферменти — множинні форми одного ферменту, які каталізують одну й ту ж реакцію, але відрізняються первинною послідовністю, фізико-хімічними властивостями та регуляцією; набір ізоферментів у даної особини генетично детермінований.

Ізохромосома — хромосома з двома плечами, що є ідентичними за розміром і генетичним вмістом, тобто які являють дзеркальне відображення одне одного. Утворюється після «неправильного» (поперечного, а не повздовжнього) розриву цен-

тромери у внутрішній її ділянці і наступного розміщення сестринських хроматид одного типу по обидва боки нової центромери.

Імобілізація — фізичний або хімічний процес фіксації ферментів, клітин або клітинних органел та твердому носії.

Інверсія — тип хромосомної перебудови, що характеризується поворотом ділянки хромосоми на 180°. Розрізняють два типи **I.** — перичентрична, коли повернута ділянка включає у себе центромеру, і парацентрична, коли така ділянка не має центромери. Парацентричні **I.** виявляються у природі частіше, ніж перичентричні.

Індели — змінені послідовності ДНК, про які не відомо, викликані вони вставкою в один хромосомний сегмент, чи делецією в іншій ортологічній хромосомній ділянці.

Індивід — особина, організм, що існує самостійно. Для клональних і тих, що розмножуються вегетативно, а також для деяких паразитичних і симбіотичних організмів поняття відносне.

Індукований ген — звичайно зарепресований ген (перебуває під негативним генетичним контролем), але може бути індукований фізичними (світло, УФ-промені) або хімічними чинниками.

Індуктор — невелика молекула, що зв'язується з *репресором* і переводить його у негативну форму, не здатну зв'язуватися з *оператором*, внаслідок чого відбувається дерепресія генів, що здійснюють синтез адаптивних ферментів.

Індустріальний меланізм — переважання у популяції деяких видів особин з темним забарвленням (меланістів) внаслідок їх природного добору в забруднених кіптявою районах проживання. **I.м.** поширений у деяких комах — п'ядака березового, «божих корівок» тощо.

Ініціація — у молекулярній біології це перший етап трансляції, що контролюється ініціувальним кодоном.

Інсерційний мутагенез — вибух мутаційних подій у геномі внаслідок інтеграції — вставок послідовностей нуклеотидів, зокрема мобільних генетичних елементів, а також внаслідок трансфекції чи мікроін'єкції ДНК. Внаслідок **I.м.** може відбуватися часткова або повна інактивація генів.

Інсерція — вставка фрагмента ДНК розміром від одного нуклеотида до субхромосомного фрагмента, що містить кілька генів. Також мутація внаслідок введення одного або кількох надлишкових нуклеотидів у молекулу ДНК чи РНК. **I.** одиничних нуклеотидів можуть викликатися деякими

хімічними речовинами (наприклад, акридиновими барвниками), довші — переміщенням мобільних генетичних елементів.

Інсулятор, інсуляторна послідовність — послідовність ДНК, яка обмежує *цис*-взаємодію між регуляторними ділянками, які розташовані по обидва боки від неї.

Інтактний організм (клітина, ядро тощо) — організм (клітина, ядро тощо), що не мав контакту з досліджуваними чинниками; використовують як контроль в експерименті.

Інтеграза — фермент, який бере участь у процесі інтеграції і вилучення послідовності *ретротранспозонів*, а також бактеріофагів. Каталізує сайт-специфічну рекомбінацію, коли ретротранспозон чи бактеріофаг упродовжується у хромосому чи вирізається з неї. Разом з *транспозазою* відповідає за вбудовування *транспозонів*. Володіє топоізомеразною активністю.

Інтерстиціальна (проміжна) ділянка (сегмент тощо) — проміжна (некінцева) ділянка хромосоми (хроматиди), тобто та ділянка, що розташована між кінцевою частиною хромосоми чи хроматиди і центромерою.

Інтрогресія — набуття організмами одного виду генів від іншого за міжвидової гібридизації.

Інтрон — ділянка гена, що транскрибується, яка, як правило, не містить інформацію про первинну структуру білка і видаляється з молекули пре-мРНК за її *процесингу*. Інтрони розділяють кодувальні частини генів — *екзони*.

Калюс — тканина, що виникла внаслідок диференціювання та неорганізованої проліферації клітин на поверхні рани. В культурі *in vitro* до першого пасажу (субкультивування) називається первинним калюсом.

Каналізація — у біології — тенденція у досягненні певного, генетично зумовленого кінцевого стану незалежно від деякої мінливості на початку розвитку й умов довкілля. Сувора **К.** є характерною для диких форм на відміну від мутантів, які більш чутливі до агентів, що викликають мінливість (див. *добір каналізуючий*).

Каріограма — див. *ідіограма*.

Каріосистематика — розділ систематики, що вивчає структури клітинного ядра у різних груп організмів і використовує дані каріології (найчастіше — параметри *каріотипів*) як таксономічні ознаки. Таксономічне значення мають не лише число і морфологія хромосом, а й кількість ДНК в ядрі, нуклеотидний склад ДНК, характер розподілу еу- і

гетерохроматину, специфічний характер зчере-ності хромосом за диференційного забарвлення, розподіл ядерцеутворювальних ділянок тощо (див. також *геносистематика*).

Каріотип — соматичний набір хромосом (їх кількість та морфологія), характерний для даного виду, особини чи клітини. Слугує таксономічною ознакою (див. *каріосистематика*).

Карта (мапа) фізична — генетична карта, одиниці відстані на якій виражаються у парах нуклеотидів (основ).

Картування генів — визначення положення гена на будь-якій хромосомі відносно інших генів.

кДНК, комплементарна ДНК — ДНК, синтезована *зворотною транскриптазою* (ревертазою) на матриці РНК.

Кінці липкі — комплементарні один одному, виступаючі одноланцюгові ділянки одного чи різних фрагментів ДНК; можуть утворюватися за дії деяких рестриктаз. По **К.л.** фрагменти можуть з'єднуватися один з одним з утворенням гібридних молекул ДНК.

Клад — у класифікації будь-яка група організмів, що має ознаки, характерні виключно для всіх її членів і які виділяють їх серед інших особин популяції, виду.

Кластер — група тандемно розташованих ідентичних елементів геному, що локалізуються у певній ділянці ДНК.

Клін, кліна, географічна кліна — градієнт у вираженні фенотипової ознаки та/або у розподілі частот алелей генів у межах території існування конкретної популяції, що зумовлені відповідним градієнтом будь-яких умов довкілля.

Клінальна мінливість — відмінності за частотою трапляння алельних варіантів у популяціях одного і того самого виду. **К.м.** — це результат нерівномірної, градієнтної дії будь-якого чинника добору або ж клін може бути результатом повторного об'єднання популяцій, що розійшлися і які накопичили відмінності (внаслідок селективних чи стохастичних процесів) під час своєї незалежної еволюції.

Клітинна лінія — культура, що утворилася зі *штаму* шляхом селекції або клонування клітин і має маркерні ознаки.

Клітинна популяція — сукупність культивованих клітин одного штаму або клітинної лінії. Також група однорідних за будь-якою ознакою клітин у тканині; в цьому випадку склад клітинної популяції залежить від обраного критерію, тому під **К.п.** розуміють як вузько спеціалізовані клітини

одного типу, так і здатні до диференціювання та розмноження, наприклад клітини меристеми.

Клітинна селекція — метод виділення мутантних клітин і соматоклональних варіацій за селективних умов.

Клітинний (мітотичний) цикл — сукупність процесів у клітині, що відбуваються під час підготовки до поділу та протягом мітозу. Складається з інтерфази, яка має три періоди: пресинтетичний, синтетичний і постсинтетичний, та власне мітозу, що триває недовго.

Клон — популяція клітин, особин, що виникла з однієї клітини або нестатевим шляхом від одного спільного предка. Клітини **К.** містять спочатку однаковий генетичний матеріал, проте з часом генетична одноманітність зникає внаслідок спонтанного мутаційного процесу.

К-мітоз — форма мітозу, загальмованого частковою або повною інактивацією ядерного веретена на стадії метафази. Викликається впливом на ядро, що ділиться, колхіцину та низки інших К-мітотичних агентів. Хромосоми не розташовуються в екваторіальну пластинку, а поділ центромери запізнюється. Після розходження хроматид у більшості випадків утворюється тетраплоїдне реституційне ядро.

Ковалентний зв'язок — хімічний зв'язок між атомами в молекулі. Зв'язування відбувається внаслідок усупільнення електронів, що належать одному чи кільком атомам. **К.з.** — дуже сильний.

Кодомінантність — виявлення у диплоїдних гетерозигот ознак, що кодуються обома алелями; спільна участь обох алелей у визначенні ознаки у гетерозиготи. Приклади **К.** — у садових ротиків колір квітки у гомозигот або білий, або червоний, а у гетерозигот — рожевий; також поліморфізм біохімічних і ДНК маркерів.

Кодон — дискретна одиниця генетичного коду, група з трьох суміжних нуклеотидів у молекулі мРНК, що кодує одну з амінокислот або позначає кінець синтезу білка.

Колінеарність — лінійна відповідність між послідовностями амінокислотних залишків у поліпептидному ланцюгу і послідовностями кодонів у кодуювальній нуклеотидній послідовності молекули ДНК.

Колінеарність хромосом — подібність порядку розташування молекулярних маркерів на хромосомах (ДНК-маркерів). Стосується, як правило, гомологічних хромосом (див. *синтенія*).

Комплементарні гени — неалельні гени, що доповнюють один одного, наприклад, у випадку

рецесивності даної ознаки для її вираження потрібна наявність обох **К.г.** у гомозиготному стані.

Комплементарність — просторова взаємодоповнюваність поверхонь молекул чи їхніх частин, які взаємодіють, що приводить до утворення вторинних (Ван-дер-Ваальсових, водневих, йонних) зв'язків між ними.

Комплементация — відновлення фенотипу дикого типу (або близького до нього фенотипу) за об'єднання в одній клітині двох різних мутацій, що перебувають у транс-конфігурації на різних хромосомах і які детермінують дифундуючі продукти, які й зумовлюють появу дикого фенотипу. Алельні мутації, як правило, не виявляють **К.**

Конверсія гена — процес, унаслідок якого алель у цілій хромосомі втрачається і замінюється іншою алеллю з гомологічної хромосоми.

Конкатемерна ДНК — структура з кількох повторюваних одна за іншою одиниць гена. Мультимери ДНК, що складаються з окремих молекул, сполучених у стик однаковим чином, наприклад голова до хвоста.

Консенсус — послідовність, відновлена за вирівняним набором фрагментів ДНК, кожна позиція **К.** містить основу, що найчастіше трапляється у ній по всьому набору фрагментів.

Консенсусна послідовність — певна послідовність нуклеотидів, що регулярно трапляється (з невеликими варіаціями за окремими нуклеотидами) у даному генетичному елементі, наприклад у *промоторі*. Зазвичай такі послідовності є характерними для генів, що кодують один і той самий білок у різних організмів.

Конспецифічний — той, що належить до одного і того ж виду.

Конститутивний гетерохроматин — конденсований (генетично неактивний) стан хроматину, що містить послідовності, які не експресуються, звичайно *сателітну ДНК*. Локалізується, як правило, у центромерах і вторинних перетяжках, рідше — поблизу теломер та інтерстиціально. Кількість і локалізація **К.г.** видо- і навіть сортоспецифічні і можуть бути проаналізовані методами диференційного забарвлення.

Корова часточка — мінімальна *нуклеосома*; одиниця упаковки ДНК, що стабільно існує під час формування нуклеосомної структури і включає 146 п. н. і октамер корових гістонів. **К.ч.** у певних умовах стійкі до розщеплення нуклеазами.

Корончаті гали — пухлинні нарости, які утворюються на стеблах та листках багатьох дво-

дольних рослин внаслідок їх інфікування агробактерією *A. tumefaciens*, яка містить *Ti*-плазмиду. Приклад природної генетичної трансформації рослинних клітин.

Кросинговер, перехрест — 1. Взаємний обмін ділянками гомологічних хромосом, що відбувається внаслідок розриву і возз'єднання ділянок хроматид. 2. Взаємний обмін гомологічними ділянками гомологічних хромосом за їх кон'югації, що відбувається у профазі I *мейозу*.

Лайонизация — процес гетерохроматинізації і виключення з функцій однієї з X-хромосом у ссавців, що є механізмом компенсації дози генів, зчеплених з X-хромосою.

Липкий кінець — див. *кінці липкі*.

Лігування — метод, за допомогою якого чужинна ДНК вбудовується між двома кінцями плазмідної ДНК за допомогою ферменту лігази. Також процес з'єднання двох лінійних молекул нуклеїнових кислот за допомогою фосфодіефірних зв'язків за участю лігази.

Лінія — група споріднених особин, для яких характерні певні стійкі спадкові ознаки, постійно відтворювані в ряді поколінь.

Лінія рослин — зовні однорідна, репродукована статевим шляхом популяція, яку розмножують тільки насінням.

Лінія чиста — генетично однорідне потомство однієї гомозиготної особини, що постійно самозапіднюється (самозапилюється). Особини чистих ліній одержують від однієї рослини шляхом самозапилення, а також подвоєнням кількості хромосом у гаплоїдних організмів (отриманням *гаплоїдів подвоєних*).

Лінкер, лінкерна ДНК — 1. Синтетичний олігонуклеотид певної послідовності, що містить один або декілька сайтів розпізнавання для рестрикційних ендонуклеаз. 2. Ділянка ДНК різної довжини, що зв'язує дві суміжні нуклеосоми в еухроматині еукаріотів.

Локус — 1. Ділянка хромосоми, в якій локалізується певний ген. 2. Місцерозташування даної мутації чи гена на генетичній карті.

Макроеlementи — неорганічні хімічні елементи, потрібні у великих кількостях для росту рослин, наприклад азот, калій, кальцій, фосфор, магній, сірка.

Материнське успадкування — передача ознак, що кодуються цитоплазматичними (позаядерними) факторами: мітохондріальним чи хлоропластним геномами або мРНК, що довго живуть;

тобто ознак, що попадають до потомків лише від материнського організму (матері).

Мезофіл — основна тканина (паренхіма) листка між шарами епідерми, її клітини звичайно містять хлоропласти.

Мейоз — два послідовних поділи клітини (I і II мейотичні поділи), яким передують лише один цикл реплікації хромосом, внаслідок чого вихідне число хромосом $2n$ зменшується (редукується) до $1n$ у кожній з чотирьох утворених клітин. Ці клітини дозрівають і перетворюються в гамети.

Меристема — твірні, недиференційовані клітини, що здатні до активного поділу і з яких утворюються всі постійні тканини організму. У рослин виділяють кілька типів меристем — апікальні (недетерміновані), детерміновані та інтеркалярні (розміщені між ділянками постійних тканин, наприклад при основі міжвузля у злаків).

Мета — частина складних слів (термінів), що вказує на проміжність, перехід до чогось іншого, зміну стану, перетворення одного в інше, розташування або слідування (проходження) за чимось.

Метастабільний — нестабільний стан (наприклад, *алель* гена) або речовина, що легко переходить в інший, більш або менш стабільний стан.

Міграція генів — у популяційній генетиці включення у дану популяцію генотипів з інших популяцій, що приводить до потоку генів (див. *генів потік*). **М.г.** може привести до появи у популяції алелей, раніше у ній відсутніх, або до швидкої зміни частоти наявних алелей. Тому поряд з добром, мутабільністю і випадковими змінами частот генів (див. *дрейф генів*) **М.г.** представляє собою один із генетично дійових чинників, які можуть змінювати генотипну структуру популяцій.

Мікроелементи — неорганічні хімічні елементи, потрібні рослинам у невеликих або залишкових кількостях, наприклад залізо, хлор, мідь, марганець, цинк, молібден, бор.

Мікроклональне розмноження — одержання *in vitro*, нестатевим шляхом (найчастіше з апікальної меристеми) рослин, генетично ідентичних вихідній рослині.

Мікросателіти, короткі тандемні повтори — дуже короткі (1–9 п. н.) середньоповторювані, тандемно організовані («голова до хвоста»), високоваріабельні послідовності ДНК (див. *повтори мікросателітні*).

Мікроспора — звичайно дрібна гаплоїдна клітина гетероспорових вищих рослин, що утворюється у результаті мейозу з мікроспороцита і яка

започатковує чоловічий гаметофіт (пилкове зерно у насінних рослин). Мейоз кожного мікроспороцита дає тетраду **М.**

Міксплоїд — організм, що має змішані клітини (тканини) з різною кількістю хромосом. Окремий випадок мозаїк.

Міксплоїдія, полісоматія — форма клітинного мозаїцизму — одночасна наявність диплоїдних, поліплоїдних, анеуплоїдних та інших клітин з різною кількістю хромосом у однієї особини, в одній тканині (за винятком «співіснування» в одному організмі соматичних і гаплоїдних генеративних клітин).

Мінісателіти — тандемні («голова до хвоста») повтори з повторюваним мотивом розміром 10–64 нуклеотиди, одна з форм сателітної ДНК (див. *повтори мінісателітні*).

Мінливість — здатність організмів змінювати свої ознаки і властивості, набувати нові чи втрачати вихідні ознаки. Розрізняють спадкову (генетичну), неспадкову (модифікаційну) й онтогенетичну **М.** Виділяють також епігеномну мінливість, що ґрунтується на успадкуванні функціональних станів (генної активності) у поколіннях (у тому числі за статевого розмноження) і яка відбувається без зміни послідовності ДНК (див. *епігенетика, епігенетичні варіації*).

Мітоз, непрямий поділ, каріокінез — поділ ядра, що забезпечує тотожний розподіл генетичного матеріалу між дочірніми клітинами і спадковість хромосом у клітинних поколіннях: мітоз приводить до утворення двох дочірніх ядер, кожне з яких містить такий же набір хромосом, який був у батьківському ядрі. Після поділу ядра звичайно відбувається поділ клітини, тому часто терміном «мітоз» позначають цілковитий поділ клітини; мітоз — основний спосіб ділення еукаріотних клітин.

Множинні алелі — наявність у особин даного виду більше ніж двох алелей для певного локусу, серія алелей одного гена. Виникають внаслідок мутацій в одному і тому самому локусі хромосоми і впливають на фенотипові вираження ознаки.

Мобільний (рухомий) генетичний елемент, МГЕ — нуклеотидна послідовність (ділянка ДНК), здатна змінювати положення у геномі. Елементи геному, топографія і кількість яких може варіювати у різних організмів одного виду (див. також *ретротранспозон, транспозон*).

Модифікатор — 1. Ген, що модулює фенотипний прояв інших одного чи більше генів. 2. Послідовність у ДНК, локалізована у позиції 5' вище

промотора (*апстрим*), яка або посилює, або зменшує експресію гена, що розташований нижче (*даунстрим*).

Модифікація — неспадкова зміна ознак організму (фенотипу), що виникає під впливом умов середовища; ступінь прояву модифікації пропорційний силі та тривалості діючого чинника. **М.** виникають у межах *норми реакції* організму, тобто можливого розмаху фенотипних змін при даному генотипові внаслідок змін середовища, та обмежені спадковими задатками.

Модифікація тривала — модифікація, що викликається факторами довкілля і здатна зберігатися впродовж низки поколінь; через певний проміжок часу організм повертається до вихідного стану. **М.т.** зумовлена, як правило, змінами цитоплазми, що відтворюються у низці клітинних поколінь, що зближує її з материнським ефектом, і виникає, як правило, за вегетативного або партеногенетичного розмноження (див. *материнське успадкування*).

Мозаїки — організми, що містять суміш (групи) клітин, що мають різний генотип і фенотипний прояв, суміш нормальних та генетично змінених клітин.

Моноплоїд — ядро, клітина, організм, що характеризуються основним числом хромосом — найнижчим гаплоїдним числом у поліплоїдній серії (символ x).

Моносомік — *анеуплоїдна* клітина, тканина чи організм, у хромосомному наборі якого одна з хромосом представлена в єдиному екземплярі ($2n-1$).

Морфогенез — процес формотворення, виникнення і розвитку спеціалізованих клітин (цитогенез), тканин (гістогенез), органів (*органогенез*), а також соматичних ембріонів — ембріодів (ембріодогенез), що супроводжується диференціюванням клітин і тканин, появою чітких відмінностей між ними.

Мутагенез спрямований, мутагенез сайт-специфічний — штучне введення у геном сайт-специфічних модифікацій шляхом інсерції екзогенної ДНК у гомологічний *сайт* геномної ДНК без будь-якого порушення нуклеотидної послідовності у місці вбудовування.

Мутаційна мінливість — генотипна мінливість, за якої генотип змінюється внаслідок мутацій. Зміни, що при цьому виникають, можуть зачіпати послідовність нуклеотидів у молекулі ДНК (мутація гена), приводити до збільшення чи зменшення кількості хромосом (*мутація геномна*),

викликати перебудови хромосом (*мутація хромосомна*).

Мутація — спадкова зміна генетичного матеріалу, що призводить до зміни тієї чи іншої ознаки, зміна структури ДНК (послідовності нуклеотидів) ядер і органел.

Мутація геномна — зміна числа хромосом у клітині, організмі (див. *автополіплоїдія*, *алополіплоїд*, *анеуплоїд*, *поліплоїд*).

Мутація нестабільна — мутація, що характеризується високою частотою реверсії у *дикий тип*.

Мутація супресорна — мутація, що скасовує ефект мутації, яка виникла раніше, тобто приводить до реверсії.

Мутація умовна — клас мутацій, що проявляються лише за певних генетичних умов. **М.у.** проявляється в одному генотипі, але не проявляється в інших. Має властивість давати потворних (з морфозами) нащадків.

Мутація хромосомна — див. *аберація*.

Мутація цитоплазматична — мутації, що відбуваються у різних органоїдах цитоплазми, які мають власний генетичний матеріал (мітохондрії, пластиди) і які змінюють їх морфологічні ознаки і біохімічну діяльність. **М.ц.** успадковуються за материнською лінією.

Нативний, природний — 1. Вид у межах його природного ареалу. 2. Природний, незмінний, той об'єкт, що не підлягав будь-якому впливу. Стосовно організмів у таких випадках застосовують термін «інтактний» (див. *інтактний організм*).

Нативна ДНК — дволанцюгова ДНК, виділена з живого організму, яка зберегла водневі зв'язки між ланцюгами і перебуває у біологічно активній формі.

Неменделівське успадкування — відхилення від очікуваного, згідно з законом Менделя, співвідношення частот фенотипів, що утворюються у результаті схрещувань, або поява незвичайних фенотипів як наслідок різних взаємодій генів, зчеплення спадкових факторів (генів) і детермінація фенотипів, що ухиляються, цитоплазматичними генами (пластомом).

Непермісивні умови — умови довкілля, за яких гинуть особини, що несуть умовно-летальні мутації, тобто мутації, контрольовані (визначаються) середовищем.

Нонсенс-кодон — кодон, що не кодує амінокислоту. Виконує функцію термінації синтезу білка (термінатор трансляції).

Нонсенс-мутація — точкова мутація, яка веде до утворення *нонсенс-кодону* і, відповідно, до передчасної зупинки трансляції з утворенням аномального поліпептида. Внаслідок такої мутації кодований білок буде або вкороченим (передчасна термінація), або надто довгим, що порушує нормальне функціонування білка.

Нонсенс-супресор — мутантний ген тРНК, що кодує молекулу зі зміненим антикодоном, у результаті чого мутантна тРНК починає розпізнавати *нонсенс-кодон*, що попереджує термінацію трансляції мРНК.

Норма реакції — у генетиці — діапазон (межі) модифікаційної мінливості організму, клітини (див. *модифікація*). Властивість конкретного генотипу забезпечувати у певних межах змінюваність онтогенезу залежно від умов середовища. Спадково закріплені межі модифікаційної мінливості організму, клітини, що виявляються за коливання умов довкілля, низка всіх можливих фенотипів, які можуть сформуватися на основі даного генотипу в різних умовах середовища. Залежить від умов середовища, в яких відбувається реалізація генетичної інформації, закладеної в генотипі; від цих умов залежить поява, зникнення або ступінь виявлення (експресії) ознаки.

Нуклеаза — фермент, який гідролізує фосфодієфірний зв'язок у молекулі нуклеїнової кислоти. Розрізняють *екзонуклеази*, які гідролізують нуклеотиди з кінця молекули, та *ендонуклеази*, які розщеплюють полінуклеотидний ланцюг по внутрішніх сайтах.

Нуклеоплазма, каріоплазма — основна речовина ядра; неструктурований вміст клітинного ядра, відмежований від цитоплазми ядерною оболонкою.

Нуклеосома — дископодібна структура діаметром близько 10 нм, що є елементарною одиницею упаковки хромосомної ДНК у хроматині; складається з білкового ядра (включає октамер гістонів H2, H3, H4), обмотаного 7/4 обороту подвійної спіралі ДНК (140 п. н.). Сумарна молекулярна маса **Н.** оцінюється у 262 кД (108 кД припадає на гістони, 130 кД на ДНК, 24 кД на невеликі негістонові білки). Нуклеосомна структура є універсальною для еукаріотів, **Н.** виявлені також у деяких вірусів, що ушкоджують еукаріотів.

Нулісомік — *анеуплоїдна* клітина або організм, у диплоїдному наборі яких відсутня пара гомологічних хромосом ($2n-2$).

Обернені повтори, інвертовані повтори — складаються з двох тотожних копій довжиною близько 300 п. н., розташованих назустріч одна одній на одному ланцюгу ДНК на відстані від нуля до 10 000 п. н. одна від одної (у середньому 1,6 т. п. н.). Близько 1/3 **О.п.** є *паліндромами*.

Ознака — 1. У генетиці одиниця морфологічної, фізіологічної, біохімічної, молекулярної, імунологічної та будь-якої іншої дискретності організмів (клітин), тобто окрема якість або властивість, за якою вони відрізняються один від одного. 2. Будь-яка властивість організму, що проявляється у фенотипі.

Олігомер — молекула, що складається з невеликої кількості (5–20) мономерів.

Олігонуклеотид — олігомерна форма нуклеїнової кислоти, що містить відносно невелику кількість нуклеотидів (до 20).

Олігосахариди — полімерні вуглеводи, які містять від 2 до 10 залишків моносахаридів, зв'язаних глікозидними зв'язками. Вуглеводи, що містять більше 10 моносахаридів, відносять до *полісахаридів*.

Онтогенез — індивідуальний розвиток особини (організму) з моменту зародження до природної смерті або до припинення існування одноклітинного організму в результаті поділу. Представляє собою процес розгортання і реалізації спадкової інформації, закладеної у зародкових клітинах. **О.** у рослин у цілому більше залежить від умов довкілля, ніж у тварин.

Онтогенетична пам'ять — виникає внаслідок впливу на процеси кросинговеру, ранні етапи розвитку ембріонів різних чинників, «запам'ятовування» організмами факторів довкілля, що впливають на інтенсивність біохімічних процесів, частоту рекомбінаційних подій. Сформульована А. А. Жученком, концепція **О.п.** постулює пригнічення кросинговеру у більше пристосованих і посилення його у менше пристосованих особин до конкретних умов середовища.

Оператор — ділянка ДНК розміром кілька десятків нуклеотидів, що розпізнається специфічними білками-репресорами і негативно регулює транскрипцію структурних генів. **О.** містить *сайт* розпізнавання для специфічного репресорного білка, прилягає до регульованого структурного гена (*цистрона*) і контролює його експресію.

Оперон, транскриптон — одиниця транскрипції, що включає в себе декілька генів, які перебувають під спільним контролем *оператора* і

репресора; сукупність генів, що становлять функціональну одиницю, яка забезпечує послідовні етапи синтезу речовини. Кожен ген оперона визначає синтез одного з комплексу потрібних ферментів. Складається зі структурних генів і гена-оператора, фланкований специфічними регуляторними послідовностями — *промотором* і *термінатором* транскрипції.

Організм — 1. Біологічна одиниця, що має характерні анатомічні і фізіологічні ознаки. **О.** може складатись із єдиної клітини (одноклітинний організм), із великої кількості однакових клітин (колоніальний організм) або з різних за функціями клітин (багатоклітинний організм). Усі **О.** поділяють на еукаріоти і прокаріоти. 2. **О.** — це будь-яка біологічна система, що складається із взаємопов'язаних і супідрядних елементів, взаємовідношення яких і особливості будови детерміновані їх функціонуванням як єдиного цілого: *особини* (індивіди), колонії (організми колоніальні), сім'ї (у суспільних комах), *популяції*, *біоценози* тощо.

Органогенез — 1. Утворення у багатоклітинних організмів зачатків органів і їх диференціювання у ході онтогенезу. У рослин під **О.** розуміють формування органів із меристемної тканини. 2. Процес виникнення *de novo* у масі калюсних клітин, що ростуть неорганізовано, зачатків органів (коренів — ризогенез, пагонів — пагоневиї органогенез, бруньок — гомогенез). Термін **О.** часто застосовують як синонім поняття «*морфогенез*».

Ориджен — локус, в якому розпочинається реплікація ДНК або її перенесення.

Ортологи, ортологічні гени — гени, що дивергували в процесі еволюції, тобто гомологічні гени, що походять від предкового гена, який входить у геном виду, від якого походять порівнювані види. У певному сенсі — один і той самий ген у різних геномах. Походження **О.** не пов'язане, на відміну від *паралогів*, з дуплікаціями.

Основа — гетероциклічна азотовмісна молекула, що входить до складу ДНК і РНК. Найпоширенішими є 5 основ: пуринові — аденін (А), гуанін (G), піримідинові — цитозин (C), тимін (Т) і урацил (U). Тимін є специфічним для ДНК, а урацил — для РНК.

Основне число хромосом — найменше гаплоїдне число хромосом у поліплоїдній серії організмів (як правило, у рослин). Моноплоїдне число хромосом, що позначається символом *x*, у особин певного виду чи спорідненої групи (див. *моноплоїд*).

Особина, індивідуум, індивід — 1. Окремий, неподільний *організм*, найменша одиниця даного біологічного виду, що підлягає дії факторів еволюції. 2. Організм, що розвивається з однієї зиготи, гамети, спори, бруньки.

Палеополіплоїди — 1. Природні види рослин, каріотиби яких у метафазі мітозу і мейозу виглядають як диплоїдні і які в процесах мейотичних поділів ведуть себе як диплоїди, але в дійсності представляють собою *поліплоїди*, зазвичай поліплоїди сегментні (див. *алополіплоїд сегментний*). 2. Поліплоїд, що виник у стародавні часи, зазвичай багато мільйонів років тому, і який більше не має хромосомного спарювання і сегрегаційних властивостей, характерних для поліплоїдів, але має цілогеномну дуплікацію хромосомних сегментів, часто сильно перебудованих. По суті, це «диплоїдизований поліплоїд». З урахуванням палеополіплоїдів предки не менше 90% видів сучасних квіткових рослин пройшли один чи кілька раундів поліплоїдизації.

Паліндром — послідовність ДНК, яка залишається незмінною, якщо на одному ланцюгу ДНК її читати зліва направо, а на іншому — справа наліво. Складається з прилеглих один до одного інвертованих повторів. **П.** — це обернені повтори, не розділені проміжними послідовностями, складають близько 1/3 всіх інвертованих повторів, є *сайтом*-мішенню для різних ДНК-зв'язувальних білків, наприклад рестрикційних *ендонуклеаз*, РНК-полімераза, факторів транскрипції тощо, і трапляються в багатьох *промоторах*, *ориджинах* реплікації і в послідовностях, які термінують (припиняють) транскрипцію.

Панміксія — вільне схрещування двостатевих особин у межах *популяції*, засноване на випадковому однаково вірогідному поєднанні гамет усіх типів.

Паралоги, паралогічні гени — гомологічні гени, утворені в результаті дуплікації предкового гена з наступною дивергенцією (розходженням) і здатні еволюціонувати паралельно у межах одного виду (на відміну від *ортологів*).

Парамутація — тип взаємодії між специфічними алелями, за якої одна алель викликає спадкову зміну в експресії іншої гомологічної алелі того самого локусу, в якому ці алелі скомбіновані у гетерозиготі. Перша алель зветься парамутагенною, а інша — парамутабельною. Парамутабельна алель у присутності парамутагенної поводить себе, як нестабільна поліморфна алель. Схрещу-

вання рослини, що несе парамутагенну алель, із рослиною з парамутабельною алеллю призводить до зменшення генної експресії чутливої алелі. В окремих випадках раніше парамутабельна алель стає парамутагенною і може *сайленсувати* інші парамутабельні алелі — це явище вторинної парамутації.

Паратип — сукупність зовнішніх чинників, що впливають на виявлення генетичної ознаки.

Паратипова мінливість (неспадкова, модифікаційна) — мінливість ознак, що зумовлена дією чинників зовнішнього середовища і яка не закріплюється жорстко в генотипі.

Партеогенез — одностатеве відтворення, дівоче розмноження. Одна з форм апоміксису; спосіб статевого розмноження організмів, за якого яйцеклітини розвиваються без запліднення. У біотехнології використовують для отримання гаплоїдних форм рослин шляхом культивування *in vitro* зародкових мішків.

Педігрі — родовід; генеалогічне дерево; діаграма родовідних ліній, що йдуть від чотирьох вихідних прабатьків; генеалогічний реєстр.

Пенетрантність — частота або вірогідність прояву гена (алелі) у групі споріднених організмів за відповідних умов довкілля; здатність гена проявлятися у фенотипі організму. Визначається у відсотках особин популяції від усіх особин, що несуть даний ген, у яких він фенотипово проявився.

Плавлення (ДНК або РНК) — дисоціація комплементарних ланцюгів дволанцюгових ДНК або РНК, а також ДНК-РНК гетеродуплексних молекул і формування одиночних ланцюгів.

Плазмід — позахромосомний генетичний елемент, здатний до тривалого автономного існування та редуплікації у клітині; є кільцевою (рідше лінійною) дволанцюговою молекулою ДНК розміром від 1 до 200 тис. пар нуклеотидів (т. п. н.).

Плазмодесми — цитоплазматичні тяжі, що з'єднують *протопласти* прилеглих одна до одної рослинних клітин у єдине ціле — *симпласт*. Мають вигляд вузьких каналців з діаметром 18–70 нм, що пронизують клітинні оболонки. По **П.** здійснюються передача подразнень, дифузія іонів і переміщення з клітини в клітину поживних та ін. речовин (див. *цитоміксис*).

Плазмон (плазмотип) — сукупність усіх цитоплазматичних (позахромосомних) носіїв спадковості клітини.

Пластичність — ступінь зміни вираження генотипу за впливу різних умов середовища.

Пластичність відносна — відносний рівень *модифікаційної мінливості*, що дозволяє організму як носію конкретного генотипу пристосовуватися до змін довкілля. **П. в.** — кількісне вираження *норми реакції*.

Пластичність генетична — здатність генетичної структури популяцій змінюватися у поколіннях, генетично пристосовуватися до умов довкілля (популяційно-генетична адаптаційна здатність) і внаслідок цього виживати. Передумовою **П. г.** є прихована, або потенціальна генетична, мінливість. На **П. г.** сильно впливає добір.

Пластичність геному — генетично запрограмована здатність геному змінюватися в онтогенезі, пристосовуючись до змінних умов довкілля. Приклади — онтогенетична поліплоїдія, полісоматія, диференційна ампліфікація певних послідовностей, здатність формувати генотрофи тощо. Є результатом взаємодії генотипу й умов довкілля на рівні структури геному різних клітин організму (див. *генотипи «забуферені»*).

Пластичність розвитку — здатність організму зворотно пристосовуватися до місцевих умов існування. Розрізняють два типи **П. р.**: 1. Генотип організму зумовлює появу різних фенотипів у різних умовах середовища, і найпристосованішим до даних умов буде фенотип, що виник за даних умов. 2. Генотип збалансовано так, що зміни середовища не виявляють різкого впливу на розвиток і в різних умовах середовища формується фенотип, однаково пристосований до всіх цих умов; така форма **П. р.** особливо ефективна в різноманітних за умовами ареалах. Перший тип позначають як «адаптивна пластичність», а другий — як «каналізація розвитку».

Пластичність фенотипова — здатність організму в нових умовах зберігати свої життєві функції за рахунок фенотипових змін.

Пластом — сукупність генів, що входять до геному пластид.

Плейотропізм — множинна дія гена, причина якої полягає у взаємопов'язаній дії різних генів, а також в тому, що кодований продукт може брати участь в кількох біохімічних реакціях в організмі.

Плоїдність — число, яке показує, скільки разів є повторенням у ядрі клітини набір хромосом, характерний для гамет організмів даного виду.

Побічний синтез ДНК — будь-який синтез ДНК в евкаріотній клітині, що відбувається поза S-фазою.

Повтор — дуплікація частини хромосоми, за якої дупліковані ділянки прилягають одна до одної у прямій чи оберненій орієнтації.

Повтори ДНК — розсіяні повтори ДНК довжиною близько 300–7000 п. н., що багаторазово зустрічаються у геномі, орієнтовані у різних напрямках і розташовані один від одного на відстані від нуля до десятка тисяч п. н. (у середньому — 1,6 т. п. н.), складають близько 5 % геному.

Повтори мікросателітні — тандемні повтори з розміром одиниці повтору 1–9 нуклеотидів, дисперсно розподілені по всьому геному, характеризуються, як правило, високим рівнем популяційної мінливості за числом корових одиниць повтору у кластері. До них відносять, наприклад, варіативні за числом тандемні ди-, три-, тетра- і пентануклеотидні повтори (див. *мікросателіти*).

Повтори мінісателітні — тандемні повтори розміром 9–64 п. н., дисперсно розподілені по всьому геному (див. *мінісателіти*).

Повторювана ДНК — нуклеотидна послідовність, що представлена у геномі великою множиною копій. Повторювані послідовності часто трапляються у вигляді кластерів в окремих ділянках хромосом. **П. ДНК** поділяють на кілька класів: високоповторювана фракція, що містить короткі послідовності (5–100 п. н.), які повторюються до мільйона разів; середньоповторювана розміром у 100–500 п. н., яка повторюється 100–10 000 разів (наприклад, гени рРНК, тРНК), і унікальна фракція.

Подвоєні гаплоїди — диплоїди, що утворились внаслідок подвоєння кількості хромосом у гаплоїдів; теоретично представляють собою повністю гомозиготні організми.

Полігаплоїд, алоплоїд — клітина або організм, що містить кілька диференційованих *гаплоїдних* наборів хромосом; утворюється внаслідок гібридизації. Наприклад, гаплоїд м'якої пшениці *Triticum aestivum*, гексаплоїдної за походженням (геном ААССДД), є тригаплоїдом (геном АСД), позначається: $n = 3x$ (див. *дигаплоїд*).

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР, англ. — PCR) — специфічна ампліфікація ДНК — процес ампліфікації *in vitro*, при якому фрагмент ДНК розміром до 15 т. п. н. може бути розмножений (ампліфікований) до 10^8 разів.

Полімеразна ланцюгова реакція з довільними праймерами (англ. — AP-PCR) — модифікація стандартного методу ПЛР, що дозволяє здійснювати ампліфікацію цільових послідовностей

ДНК на основі попереднього знання нуклеотидних послідовностей даного геному. Метод дозволяє виявляти поліморфізм між різними сортами рослин, штамми бактерій і грибів тощо.

Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскриптазою (англ. — RT-PCR) — варіант методу ПЛР, який модифіковано для аналізу молекул РНК. На першому етапі методу на матриці тестованої молекули мРНК з використанням ферменту зворотної транскриптази отримують одностандартний кДНК, яку потім ампліфікують стандартним ПЛР-методом.

Поліморфізм — існування двох чи більше генетично відмінних форм у популяції у стані тривалої рівноваги у таких співвідношеннях, що частоту навіть найрідкіснішої форми неможливо пояснити лише повторними мутаціями. Також одночасна наявність у популяції двох і більше алелів в одному локусі хромосоми. Збалансований поліморфізм є одним із можливих механізмів *генетичного гомеостазу*, що зберігає популяцію як єдину генетичну систему.

Поліморфізм ДНК — явище гетерогенності чи варіабельності нуклеотидного складу гомологічних послідовностей ДНК. Виникає внаслідок точкових мутацій, вставок, делецій чи інверсій, як правило, у некодувальних послідовностях.

Поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів, ПДРФ — варіювання за довжиною фрагментів ДНК, утворених специфічними рестрикційними ендонуклеазами із геномної ДНК двох чи більше видів або організмів.

Поліплоїд — ядро, клітина, організм, що мають більше ніж два гаплоїдних набори хромосом ($3n$, $4n$ і т. д.). Розрізняють *автополіплоїди*, які містять помножену кількість власних геномів, та *алополіплоїди*, що містять геноми різних видів чи родів.

Поліплоїдні ряди — групи споріднених видів, у яких набори хромосом утворюють ряд зі зростаючим кратним збільшенням основного числа хромосом. **П. р.** з парними числами хромосомних наборів ($2x$, $4x$, $6x$ і т. д.) називають збалансованими, а з непарними ($3x$, $5x$, $7x$) — незбалансованими.

Полісоматія — див. *міксоплоїдія*.

Полісомія — збільшення кількості гомологічних хромосом за рахунок появи надлишкових хромосом (трисомія $2n+1$, подвійний трисомія $2n+1+1$, тетрасомія $2n+2$ тощо). Виникають, як правило, внаслідок нерозходження хромосом в анафазі клітинних поділів.

Політенія — багатонитчатий стан хромосом, властивий для деяких соматичних клітин у багатоклітинних і деяких одноклітинних організмів завдяки багатократній *ендоредуплікації* ДНК з утворенням багатьох паралельно розташованих хроматид.

Популяційно-генетичні параметри — показники, що характеризують генетичну структуру популяції.

Популяція — сукупність одного виду рослин, тварин або організмів, які протягом тривалого часу (великої кількості поколінь) населяють певну ділянку навколишнього середовища і так чи інакше ізольовані від особин інших сукупностей (популяцій) того самого виду. Поняття «П.» відповідає сукупності статевих і безстатевих організмів одного виду, організмів, що самоzapліднюються, а також сукупності однотипних клітин багатоклітинних організмів і клітин, що вирощуються в умовах *in vitro*. Для П. статевих організмів необхідною умовою є можливість вільного схрещування і наявність спільного генетичного фонду. П. є елементарною еволюційною одиницею.

Популяція маргінальна — популяція, що перебуває у периферійній (пограничній) частині ареалу.

Порушення екологічної рівноваги — зміна у процесах взаємодії і складі екологічних компонентів і елементів екосистеми, що призводить в кінці-кінців до заміни її іншою *екосистемою* на тривалий термін.

Послідовність — порядок розташування нуклеотидів у нитках нуклеїнових кислот і амінокислот у поліпептидному ланцюгу.

Послідовності — фракції нуклеотидних послідовностей, які поділяють на: *унікальні П.* — ділянки ДНК, що мають своєрідну структуру і трапляються у геномі в одиничному числі; *повторювані П.* — ділянки ДНК зі своєрідною структурою, трапляються у геномі два рази і більше; *сателітна ДНК* — короткі, часто повторювані ділянки молекули ДНК, що можуть бути представлені у геномі навіть мільйонами копій (див. *повторювана ДНК*).

Потік генів — обмін генами (одно- і двосторонній) між популяціями.

Праймери — невеликі одноланцюгові молекули ДНК (коротка послідовність нуклеотидів), комплементарні до 3'-кінців ділянки на смислового та антисмислового ланцюгу ДНК, що ампліфікується. Застосовуються в полімеразній ланцю-

говій реакції (ПЛР), а також для синтезу кДНК, сиквенування тощо.

Преадаптація — властивість організму, що має пристосовувальну цінність для ще не здійснених форм взаємодії його з середовищем.

Превалентність — показник поширеності носіїв (джерел збудників інфекції), зокрема копій транспозонів чи транспозицій.

Провірус — дволанцюгова послідовність ДНК, вбудована у хромосому еукаріотів і яка відповідає геномній РНК ретровірусу.

Прогулянка по хромосомі, прогулянка по геному — метод виділення для сиквенування клонів із геномної бібліотеки, яка містить фрагменти рестрикції з послідовностями, що перекриваються. Застосовується для виділення та аналізу нуклеотидних послідовностей (нових генів), що фланкують відомі гени, для яких є олігонуклеотидні зонди; після виділення гена з його фланкуючими послідовностями ці послідовності використовують як зонди для виділення нових послідовностей, що до них прилягають, і т. д. За допомогою послідовностей, що перекриваються, досліджують невідомі ділянки геному, які прилягають одна до одної, виконують скринінг алельних локусів гена, картується ДНК.

Проксимальний — розташований ближче до серединної площини тіла або іншої важливої точки відліку. У генетиці — ближче розташування до центромери певної ділянки (сайта) хромосоми у порівнянні з іншими ділянками цього самого плеча.

Проліферація — розмноження клітин, новоутворення клітин і тканин шляхом розмноження.

Промотор — послідовність нуклеотидів у молекулі ДНК довжиною 80–120 пар нуклеотидів (п. н.), що розташована на початку *транскрипту*, перед сайтом ініціації гена. З цією послідовністю зв'язується РНК-полімераза й ініціює транскрипцію.

Протопласт, ізольований протопласт — рослинна клітина, позбавлена клітинної стінки за допомогою ферментативної руйнації або механічним шляхом.

Процесинг — сукупність реакцій, що ведуть до перетворення первинних продуктів транскрипції і трансляції у функціонуальні молекули. П. підлягають функціонально неактивні молекули — попередники різних рибонуклеїнових кислот (тРНК, рРНК, мРНК) — і багато білків. За П. РНК-попередників у найпростіших випадках ви-

даються надлишкові нуклеїнові послідовності з обох кінців цих молекул. Для клітин еукаріотів характерним є особливий тип **П.** — *сплайсинг*.

Псевдоген, мовчазний ген — ген, експресія якого порушена внаслідок перебудов або мутацій. Неактивні, але стабільні елементи геному, що виникли внаслідок мутацій у гені, що раніше працював. Деякі псевдогени транскрибуються, але не транлюються. Припускається, що псевдогени представляють ДНКові копії мРНК тому, що вони звичайно містять полі(*dA*)послідовності на 3'-кінці.

Псевдодиплоїд — ядро, клітина, організм, що характеризуються кількістю хромосом, яка відповідає диплоїдному числу, але які відрізняються від диплоїда за морфологією хромосом, тобто є аберантними.

Пульверизація — комплексна структурна хромосомна аберация, яка є граничним випадком фрагментації, за якого відбувається «розпилення» цілих (чи взагалі всіх) хромосом клітини на множини дрібних фрагментів.

Рамка читування — нуклеотидна послідовність, що складається з кодувальних триплетів, починається зі стартового кодону і закінчується стоп-кодоном (нонсенс-кодоном).

Рамка читування відкрита — послідовність триплетів мРНК, що не містить термінувальних кодонів; потенційно може бути трансльованою у поліпептидний ланцюг. Також протяжний фрагмент ДНК, що розпочинається зі стартового кодону і містить ціле число кодонів без стоп-кодону.

Реасоціація ДНК — взаємодія комплементарних ланцюгів ДНК з утворенням подвійної (дволанцюгової) спіралі (див. також *ренатурація*).

Ревертаза — див. *зворотна транскриптаза*.

Ревертант — мутантний організм, у якого в результаті зворотної чи супресорної мутації повністю або частково відновлюються ознаки вихідного (дикого) організму.

Регенерація — утворення окремих тканин, органів або цілих організмів внаслідок морфогенезу у культурі ізолюваних тканин або клітин. Також відновлення втрачених або пошкоджених органів, тканин, цілого організму з його частини.

Регулятор — див. *ген-регулятор*.

Редиференціювання — перехід спеціалізованих клітин з одного стану диференціювання в інший з попередніми поділами або безпосередньо; також процес морфогенезу і регенерації рослин із дедиференційованих калюсних клітин.

Редукційний поділ — поділ клітини, внаслідок якого відбувається зменшення кількості хромосом в дочірніх клітинах у два рази; є необхідною частиною мейозу, який приводить до формування гамет.

Рекомбінантна ДНК, рекДНК — нова послідовність ДНК, утворена *in vitro* шляхом лігування двох або більше негомологічних молекул ДНК (фрагментів ДНК, що раніше ніколи разом не існували).

Рекомбінантний білок — білок, отриманий за допомогою рекомбінантної ДНК, яка містить відповідний структурний ген.

Рекомбінація — перерозподіл генетичного матеріалу батьків, що лежить в основі спадкової комбінативної мінливості. У широкому сенсі під **Р.** розуміють створення нової комбінації генів за сполучення гамет батьків, більш вузько **Р.** — це обмін генетичним матеріалом (ділянками хроматид і хромосом) у процесі клітинного поділу. Природний процес рекомбінації використовують для клонування ДНК, внаслідок чого отримують рекомбінантні (гібридні) ДНК та окремі гени.

Рекурентія — повторна поява у процесі еволюції схожих форм; еволюційне повернення.

Ренатурація, гібридизація нуклеїнових кислот — процес, за якого два одноланцюгових полінуклеотиди формують дволанцюгову молекулу у результаті утворення водневих зв'язків між комплементарними нуклеотидами двох ланцюгів. Може відбуватися або між комплементарними ланцюгами ДНК (або РНК) з утворенням дволанцюгової молекули, або між ланцюгом ДНК і ланцюгом РНК з утворенням гібридної молекули РНК-ДНК.

Репарація — відновлення нативної структури ДНК, що мала пошкодження, які виникли спонтанно в процесі реплікації, рекомбінації або були викликані штучно дією фізичних або хімічних чинників.

Реплікація, редуплікація — процес точного самовідтворення молекул нуклеїнових кислот, який супроводжує передачу точних копій генетичної інформації в поколіннях.

Репресія — пригнічення активності гена (транскрипції або трансляції) шляхом зв'язування білка-репресора, який кодується *геном-регулятором*, з *геном-оператором* у ДНК зі специфічною ділянкою мРНК. Механізм регуляції дії генів, протилежний індукції.

Репресор — тетрамерний білок, що зв'язується з певною ділянкою ДНК *оператора*.

Реституційне ядро — ядро з подвоєною порівняно з вихідною кількістю хромосом, яке утворюється внаслідок відхилень від нормального перебігу мітозу (порушення процесів утворення або функціонування веретена поділу та ін.); в мейозі — ядро з диплоїдним або поліплоїдним числом хромосом, яке утворюється внаслідок порушення мейотичних поділів.

Реституція — возз'єднання вільних, що виникають внаслідок розривів, частин хромосом, хроматид і напівхроматид, у ході якого відновлюється їхня порушена структура.

Рестриктази — ферменти рестрикції (ендонуклеази), які розрізають ДНК у *сайтах рестрикції* — ділянках, що мають специфічні для кожного виду рестриктаз послідовності переважно із 4–7, рідше 8–12, пар нуклеотидів. Відомо понад 500 різних типів бактеріальних рестриктаз.

Рестрикційний аналіз — 1. Порівняльна оцінка електрофоретичних профілів продуктів рестрикції ДНК, що досліджується, отриманих за рестрикційного картування з використанням різних рестриктаз. 2. Аналіз структури ДНК шляхом установлення місць розщеплення ДНК рестриктазами і вивчення довжин рестриктів.

Ретровіруси — родина складних РНК-вмісних вірусів, що утворюють за допомогою зворотної транскриптази ДНК-копію геному, яка, інтегруючи з геномом хазяїна, викликає інтегральну інфекцію.

Ретрорегуляція — здатність *даунстрим*-послідовності ДНК регулювати трансляцію мРНК.

Ретротранспозон — *мобільний (рухомий) генетичний елемент* еукаріотів, що має гени, цикл реплікації й механізм інтеграції, подібні до *ретровірусних*, тобто кодує *зворотну транскриптазу*, протеазу, РНКазу і ділянки, що кодують *інтегразу*. Р. облямовані (фланковані) довгими кінцевими повторами (*ДКП*), включно з кінцевими TG... СА-повторами, *промотором* і сигналами термінації (зупинки) транскрипції. Р. рухаються (переміщуються) шляхом утворення РНК-копії, перетворення якої в ДНК-копію відбувається за допомогою зворотної транскриптази, а потім ДНК-копія вбудовується в новий *сайт мішені*.

Рецесивність — відсутність фенотипного вияву однієї алелі у гетерозиготній особині, тобто особині, що має дві різні алелі одного гена.

Реципієнт — клітина або організм, який отримує нову генетичну інформацію у формі чужинної ДНК чи РНК, або будь-який біологічний матеріал від іншого організму-донора.

РНК-інтерференція, РНКі — опосередкований клітинними білками природний механізм вибіркового руйнування певних (цільових) РНК за допомогою комплементарних їм коротких дволанцюгових РНК-олігонуклеотидів. Забезпечує захист клітин еукаріотів від екзогенних чужинних РНК, наприклад РНК вірусів, відіграє важливу роль у регуляції експресії власних генів клітини (див. *ген-сайленсинг*).

Розвиток — незворотний, закономірно спрямований процес тісно взаємопов'язаних кількісних (ріст, збільшення кількості клітин тощо) і якісних (диференціювання, дозрівання, старіння тощо) змін *особини* з моменту народження і до смерті.

Розрив — спонтанна чи індукована поперечна поломка хромосом, що зачіпає всю хромосому до моменту її повздовжнього розділення (хромосомний Р.) чи тільки одну хроматиду (хроматидний Р.).

Ростовий цикл — ріст популяції клітин *in vitro* протягом пасажу в циклі періодичного вищущування, характеризується S-подібною кривою. Фази ростового циклу: латентна, експоненційна (логарифмічна), лінійна, уповільнення росту, стаціонарна, деградація.

Сайленсер — послідовність ДНК у промоторах еукаріотних генів розміром 20–200 п. н., яка знижує (глушить) експресію генів. Діє лише у *цис*-положенні. Може бути місцем зв'язування особливих *транс*-діючих факторів (білків).

Сайленсинг — див. *ген-сайленсинг*.

Сайт — невелика ділянка нуклеотидної послідовності, молекули білка тощо.

Сайт мішені — ділянка геному (ДНК), в яку здатен вбудовуватися *мобільний генетичний елемент*. Розмір *С. м.* для одного й того самого *транспозона* є постійною величиною, а нуклеотидна послідовність варіює у широких межах.

Сайт рестрикції — послідовність переважно із 4–7 пар нуклеотидів, у місці розташування якої певна рестрикційна нуклеаза розрізає (розщеплює) ДНК.

Сальтація — 1. Раптове одноступінчате виникнення нових популяційних типів і таксономічних одиниць різного рангу з генетично видозмінених особин внаслідок однієї чи кількох мутацій з крупними фенотипними ефектами (макромутації), яке приводить до утворення нового виду. 2. Варіації або мутації, що виникають спонтанно (самочинно).

Сателітна ДНК — особливий тип тандемних повторів простих послідовностей (10–200 п.н.) у геномній ДНК еукаріотів. Відрізняються від основної маси хромосомної ДНК за співвідношення А-Т і Г-Ц пар. За фракціонування у градієнті густини (напр., градієнті хлориду цезію) утворює «легші» або «важчі» додаткові зони, від цього й отримала свою назву. Локалізується у центромерах, а також у теломерах хромосом і входить до складу *гетерохроматину*. Такі класи **С. ДНК**, як *мікро-* та *мінісателіти*, широко застосовують для вивчення геному.

Середовище — сукупність зовнішніх умов, що діють на організм, популяцію чи складніші біотичні угруповання і викликають відповідну реакцію у них шляхом змін прямих чи непрямих взаємовідношень. Усі елементи **С.** поділяють на фактори (чинники) біотичні й абіотичні.

Середовище біотичне — сукупність живих організмів, які своєю життєдіяльністю виявляють вплив на інші організми. На відміну від чинників середовища абіотичного, дія факторів **С.б.** виявляється у взаємному впливі організмів різних видів у різних формах.

Середовище генетичне (генотипне) — сукупність усіх генів, що входять до складу даного геному і складають внутрішнє (генетичне) середовище для дії кожного конкретного гена та впливають на формування *фенотипу*.

Сиквент ДНК — див. *ДНК-сиквенування*.

Симпатричне видоутворення — одна з форм видоутворення, коли від територіально єдиної популяції відбувається репродуктивне відділення поліморфних угруповань. **С.в.** відбувається двома шляхами: 1) шляхом *автополіплоїдії*, коли новий вид виникає внаслідок зміни числа хромосом (напр., є види тююну, що мають 24, 48 і 72 хромосоми проти 12 у вихідного виду); 2) шляхом гібридизації з наступним подвоєнням числа хромосом — *алополіплоїдії* (напр., культурна слива, у якої 48 хромосом, виникла шляхом природної гібридизації терену, що має 32 хромосоми, і аличі, яка має 16 хромосом) (див. *поліплоїд, видоутворення*).

Симпатрія — існування у межах будь-якої території систематично близьких видів, відмінності між якими звичайно посилюються для кращого диференціювання екологічних ніш і відокремленості видів. Також одна з форм видоутворення, за якої нові види виникають із популяцій, ареали яких сильно перетинаються чи збігаються; мож-

лива лише для форм, які не можуть схрещуватися між собою.

Симпласт — континуальність (сукупність, безперервність, єдина цілісність) клітинних *протопластів* рослин, що забезпечується завдяки наявності *плазмодесм*.

Синапоморфія молекулярна — виникнення у сімействі певних генів нової групи генів шляхом дуплікації (і подальшої дивергенції).

Синтенія — явище гомології ділянок хромосом у віддалених видів (див. *колінеарність хромосом*).

Синтенні гени — ідентичні гени. Розташовані в гомологічних ділянках (локусах) хромосом різних видів.

Синцитій — протоплазма, що містить багато (множину) ядер, не розділених мембранами. У рослин, по суті, це великі багатоядерні клітини, які трапляються, зокрема, як за диференціювання спеціалізованих тканин у процесі розвитку організму, так і за дедиференціювання клітин у процесі калусоутворення, у тому числі *in vitro*.

Систематика — розділ біології, завданням якого є класифікація, тобто групування за ознаками подібності і спорідненості, сучасних і викопних організмів.

Слід транспозиції (англ. — footprint) — дві видозмінені копії вихідного *сайта мішені*, які лишаються у хромосомній ДНК після ексцизиї ДНК-транспозона. Зумовлений тим, що точна ексцизія мобільного елемента у рослин відбувається дуже рідко. Один і той самий мобільний генетичний елемент під час незалежних актів транспозиції може залишати кілька типів слідів різного розміру строго визначеної структури.

Соло-ДКП (англ. — solo-LTR) — одиничний довгий кінцевий повтор, який залишається в одиничному LTR-вмісному *ретротранспозоні* після нерівної внутрішньоланцюгової рекомбінації між двома ДКП (LTRs). Іншим продуктом цієї нерівної рекомбінації є LTR-ретротранспозонне кільце, що містить лише один ДКП і зазвичай деградує чи «розбавляється» наступними мітозами (тобто втрачається геномом) (див. *довгі кінцеві повтори, ДКП*).

Сомаклональна мінливість, соматоклональна варіабельність — різноманіття серед клітинних ліній та рослин-регенерантів, що виникає при проходженні стадії неорганізованого росту, як правило, в культурі клітин та тканин *in vitro*.

Соматоклональні варіації і варіанти — фенотипний прояв мінливості ядерного і позаядерного

(органельного) геномів рослинних клітин. Від генних мутацій відрізняються більшою частотою виникнення і комплексністю змін (зміна в структурі та функціонуванні генів, хромосом, геномів). Виникають під впливом умов культивування *in vitro*.

Соматична (парасексуальна, вегетативна) гібридизація — генетична рекомбінація хромосом і генів ядра та органел поза сексуальним циклом, наприклад методом злиття ізольованих протопластів. Приводить до появи гібридних клітинних ліній і соматичних гібридів рослин. Можлива також за щеплення рослин.

Соматичний гібрид — клітина, отримана шляхом злиття двох або кількох соматичних клітин в одну; рослина, отримана з такої гібридної клітини.

Соматичний ембріогенез, ембріодогенез — процес утворення зародкоподібних структур (ембріодів) у культурі тканин і клітин шляхом, що нагадує нормальний зиготичний ембріогенез.

Спадковість — властивість клітин або організмів матеріально та функціонально забезпечувати повторюваність у поколіннях ознак і характерних рис їх становлення в онтогенезі. Також передача генетичної інформації одним поколінням іншому. Розрізняють такі типи **С.**: **ядерна**, за якої зв'язок поколінь контролюється генами, локалізованими у хромосомах ядра, і яка є мейотично-кон'югативною за статевого розмноження і мітотичною за вегетативного; **позаядерна**, за якої контроль успадкування відбувається не ядром, а елементами цитоплазми (**С.** пластидна, **С.** мітохондрійна, **С.** плазмідна); **без'ядерна** або **акаріотна** — **С.** у без'ядерних форм (віруси, бактерії).

Спейсер, спейсерна ДНК — 1. Повторювана послідовність, яка облямовує функціональні гени, сама у переважній більшості випадків не транскрибується. Розмір звичайного **С.** — 5–10 п.н. 2. Послідовності ДНК у проміжках між адресними сайтами (боксами) для білків, що зв'язують ДНК в промоторах евкаріотів.

Сплайсинг — форма *процесингу* попередників мРНК в евкаріотів, у результаті якого відбуваються видалення з молекули-попередника послідовностей інтронів і ковалентне з'єднання послідовностей екзонів з утворенням зрілих молекул мРНК.

Сплайсинг альтернативний — форма *сплайсингу*, що забезпечує кодування одним геном поліпептидів, що структурно і зазвичай функціонально відрізняються. **С.а.** супроводжується з'єднанням

екзонів гена у різних комбінаціях з утворенням різних зрілих молекул мРНК.

Стохастичний процес — те саме, що й випадковий, імовірнісний процес. Процес здійснення випадкової величини або випадкової події на основі ймовірності.

Стрес — неспецифічна реакція організму на дію подразників. При сильних подразненнях ця реакція проявляється низкою змін в організмі, що є однаковими незалежно від фізичних, хімічних, біологічних та ін. характеристик подразників, тобто неспецифічними для того чи іншого подразника. Сукупність цих реакцій є проявом т. зв. загального адаптаційного синдрому. Організм спочатку пристосовується до дії будь-якого подразника «взагалі», а на фоні загальної стресорної реакції виникають специфічні, притаманні лише для даного подразника зміни, що можуть проявлятися пізніше, ніж неспецифічні. Наслідок **С.** — сукупність усіх неспецифічних змін, що виникають за дії сильного впливу чинників середовища, що супроводжуються перебудовою захисних систем організму.

Сукцесія — послідовна зміна на певній ділянці середовища одних угруповань організмів іншими, внаслідок чого формуються *біоценози*, що найбільше відповідають умовам даного середовища. Розрізняють **С. первинні** (наприклад, формування біоценозів на скелях, штучних пісках тощо) і **С. вторинні**, що виникають на місцях порушених угруповань, де ґрунт і деякі організми збереглися (напр., на пожарищах).

Супресія — відновлення втраченої або порушеної аберантної функції. Основний механізм супресії — пригнічення фенотипового прояву однієї мутації під впливом іншої (супресивної). Розрізняють внутрішньогенну і міжгенну **С.**

Т-ДНК — частина *Ti*-плазмиди вірулентної агробактерії *Agrobacterium tumefaciens* або *Ri*-плазмиди *A. rhizogenes*, яка переноситься з бактерії в ядерний геном рослинних клітин. Там вона стабільно інтегрує в геном та експресується, індуючи проліферацію клітин хазяїна в пухлину — корончато-галові пухлини або хворобу «бородатий корінь».

Термінатор — послідовність нуклеотидів у молекулі ДНК, що викликає припинення транскрипції.

Тотипотентність, омпотентність — властивість соматичних диференційованих клітин за створення відповідних умов відновлювати цілий організм або його частину. Також здатність клітин

диференціюватися в будь-яку з клітин дорослого організму, тобто фенотипово повною мірою реалізувати генетичну інформацію.

Транзиція — мутація, за якої відбувається заміна однієї пуринової основи на іншу або однієї піримідинової основи на іншу піримідинову.

Трансверсія — мутація, за якої відбувається заміна пуринової основи на піримідинову або навпаки.

Трансгеноз — перенесення будь-яким способом чужинних генів у клітини рослин. На відміну від *трансформації*, використовується гетерологічна ДНК.

Трансгенний (генетично модифікований) організм — організм, що містить у своєму геномі чужинний *рекомбінантний* ген (гени).

Трансдукція — перенесення генетичного матеріалу з однієї клітини в іншу за допомогою вірусного вектора.

Транскриптон — одиниця транскрипції, яка представляє собою групу послідовно розташованих генів, що транскрибуються одночасно; звичайно це гени білків або нуклеїнових кислот, зв'язаних між собою функціонально.

Транскрипційні фактори, ТФ (англ. — TF) — представники класу ядерних ДНК-зв'язувальних білків, які взаємодіють з послідовностями пізнавання (сайт зв'язування) і полегшують ініціацію транскрипції ДНК-залежною РНК-полімеразою в еукаріотів. **Т.ф.** можуть зв'язуватися з *антстрим* (попереду) розташованими регуляторними послідовностями з ТАТА-боксом, а також з послідовностями всередині ділянки кодування.

Транскрипція — перший етап синтезу білка, коли генетична інформація «перепишується» з ДНК на матричну РНК (мРНК).

Транслокація — структурна зміна хромосом, за якої ділянка хромосоми переміщується в інше місце тієї ж хромосоми чи переноситься в іншу хромосому або відбувається обмін двома ділянками між гомологічними чи негомологічними хромосомами.

Транспозаза — фермент, який кодується транспозонами і каталізує вирізання, перенесення та інсерцію (вбудовування) транспозонного (мобільного, рухомого) елемента.

Транспозиційний вибух — різке зростання частоти переміщення одного або багатьох мобільних генетичних елементів (транспозонів); часто зумовлює різке зростання частоти хромосомних перебудов.

Транспозиція — переміщення будь-якої послідовності нуклеотидів у новий локус за допомогою будь-якого механізму, наприклад за участі бактеріофагів. Також процес вирізання транспозона з його вихідного сайту, перенесення й інтеграція в інший сайт реципієнтної ДНК.

Транспозони — один із класів мобільних елементів геному; послідовності ДНК, здатні переміщуватися в інше місце геному (змінювати локалізацію в межах геному); зустрічаються в ДНК усіх організмів.

Транс-положення — 1. Локалізація двох даних алелей (генів) на різних гомологічних хромосомах. 2. Розташування двох, тісно зчеплених, домінантного і рецесивного генів в одній, а відповідних їм алелей — в іншій гомологічній хромосомі (Ав-ав-транс-положення, АВ-ав-цис-положення).

Трансформація, генетична трансформація — спрямована модифікація геному клітини за допомогою очищеної або рекомбінантної ДНК із клітини іншого генотипу, яка інтегрує в геном модифікованої клітини.

Трисомік — анеуплоїд, у якого в диплоїдному наборі наявні три хромосоми замість пари гомологів. Розрізняють прості ($2n+1$), подвійні ($2n+1+1$) та потрійні трисоміки ($2n+1+1+1$) тощо.

Універсальний праймер — синтетичний олігонуклеотид, що комплементарний до послідовностей, які є консервативними. Може використовуватися у полімеразній ланцюговій реакції як *праймер* генів для ампліфікації певних фрагментів ядерних або органельних генів майже всіх представників основних таксономічних груп (рослини, гриби).

Успадковуваність — частина генотипово зумовленої мінливості в загальній фенотиповій різноманітності популяції. Вимірюється як відношення генотипної мінливості до фенотипної, виражається у відсотках або частках одиниці (коефіцієнт h^2 від англ. heritability — успадковуваність). Суто статистичне поняття на відміну від таких понять, як спадковість і *успадкування*.

Успадкування — передача генетичної інформації від одного покоління іншому. В основі **У.** лежать процеси подвоєння, рекомбінації і розподілу генетичного матеріалу, тому закономірності **У.** в різних організмів залежать від особливостей перебігу цих процесів.

Фактор, чинник — причина, рушійна сила будь-якого процесу (зокрема, генетичного), що визначає його як у цілому, так і окремі риси. Поняття «**Ф.**» застосовують як синонім терміна «*ген*».

Фен — елементарна ознака, яка кодується одним геном; дискретна варіація ознаки, зумовлена генотипово. Також альтернативні ознаки, нероздільні в разі схрещування та розщеплення. Приклад — ознаки гороху, з якими працював Г. Мендель.

Фенетика — розділ біології, що вивчає появу, розподіл та механізми генетичного контролю формування фенів — дискретних, спадково зумовлених конкретних ознак організмів (маркерів).

Фенокопія — неспадкова зміна фенотипу, що виникає в онтогенезі під впливом чинників зовнішнього середовища, своїм виявом подібна до спадкових змін — мутацій.

Фенотип — сукупність усіх зовнішніх і внутрішніх структур і функцій (ознак) організму; формується внаслідок взаємодії генотипу та умов середовища, в якому відбувається розвиток організму, є одним із варіантів *норми реакції* організму на вплив довкілля і характеризується мінливістю.

Філогенез — історичний (еволюційний) розвиток живих організмів у цілому або окремої таксономічної групи. Аналіз **Ф.** (його реконструкція) лежить в основі побудови природної системи організмів і виявлення шляхів їх еволюції.

Філогенетичне дерево — умовне графічне зображення спорідненості, що припускається між різними викопними і сучасними групами організмів.

Фінгерпринтинг ДНК — метод генетичних «відбитків пальців»; полягає в порівняльному аналізі та ідентифікації геномів за допомогою гелелектрофорезу чи хроматографії ДНК після часткового гідролізу.

Фітогормони, гормони рослин — фізіологічно активні речовини, що утворюються в рослинах у дуже малих кількостях (10^{-5} – 10^{-8} моль) і регулюють ріст і розвиток рослин. До фітогормонів відносять ауксини, цитокініни, гібереліни, абсцизову кислоту, етилен, а останнім часом також брасиностероїди (брасини) та жасмонову кислоту.

Фланкуюча ділянка — послідовність від 500 пар нуклеотидів на 5'- або 3'-кінці гена. Також будь-яка послідовність, розташована поряд (на «фланзі») з іншою послідовністю як на 3'-, так і на 5'-кінці полінуклеотидного ланцюга.

Фолдинг — процес згортання поліпептидного ланцюга у правильну просторову структуру.

Химера — організм, що складається з клітин або клітинних систем, які відрізняються одна від

одної за генотипом (*ідіотипом*); **Х.** бувають *периклінальні* (гапло-, ди-, трихламідні), *мериклінальні* та *секторіальні*.

Химера гаплохламідна — *периклінальна химера*, у якій чужинні або генетично змінені поверхневі клітини розташовані в один шар.

Химера мериклінальна — *периклінальна химера*, у якій чужинні або генетично змінені поверхневі клітини покривають лише частину організму.

Химера периклінальна — організм, у якого гістогенні шари є генетично відмінними, вони бувають *гапло-*, *ди-*, *трихламідними* або *мериклінальними*.

Хондріом — сукупність генів, розташованих у ДНК мітохондрій клітини; ці гени володіють власним апаратом зчитування генетичної інформації, що зумовлює відносно автономний характер існування мітохондрій.

Хроматида — фізіологічна і структурна одиниця *хромосоми*, що формується в метафазній клітині внаслідок подвоєння хромосом (одна з двох копій хромосоми, що реплікувалася, «напівхромосома»). Складається, переважно, з однієї молекули ДНК.

Хроматин — комплекс ДНК з гістонами, негістоновими білками і РНК, т. зв. нуклеопротейдний комплекс в ядрах клітин еукаріотів; слугує для упаковки відносно великої кількості ДНК у порівняно невеликому об'ємі ядра; утворює хромосоми, добре фарбується.

Хромосома — самовідтворювана органела клітинного ядра в еукаріотів, що є носієм генетичної інформації — генів, розташованих у ній у лінійному порядку. Основу **Х.** складає безперервна дволанцюгова спіральна складена (конденсована) молекула ДНК, що зв'язана з гістонами та негістоновими білками (див. *хроматин*).

Хромосомний поліморфізм — існування в популяції в поколіннях груп особин (у клітинних популяціях — клітин) з різними каріотипами, що з'явилися внаслідок хромосомних або геномних мутацій.

Центр походження — район земної кулі, який є місцем походження даного таксону. Це, як правило, територія наймасовішого існування та/або найбільшого різноманіття внутрішньотаксономічних форм.

Центромера — консервативна ділянка хромосоми еукаріотів, механічний центр (кінетохор),

до якої прикріплюються нитки веретена поділу в мета-анафазі мітозу і мейозу.

Центромерний індекс — відношення довжини короткого плеча до довжини всієї хромосоми, помножене на 100. **Ц.і.** = 46–50 мають метацентричні хромосоми, **Ц.і.** = 26–46 мають субметацентричні хромосоми, для акроцентриків **Ц.і.** = 3–25.

Циркадні ритми, добові ритми — регулярні ритми мітотичної активності клітин, росту, біохімічної активності з періодом близько 24 годин.

Цис-активація — активація гена активатором, що міститься на тій самій хромосомі (*in cis*), на відміну від активації гена активатором, що міститься на іншій хромосомі, — *транс-активація* (*in trans*).

Цис-положення — локалізація двох алелей, що аналізуються, на одній з двох гомологічних хромосом. У молекулярній біології — послідовність ДНК (гена), яка локалізується на тій самій хромосомі, що й аналізована послідовність (напр., енхансерна послідовність), і міститься вище від точки ініціації гена та позитивно впливає на його експресію і є цис-діючою послідовністю (див. *транс-положення*).

Цистрон — функціональна одиниця молекули ДНК, що відповідає класичному гену і містить інформацію для синтезу поліпептидного ланцюга.

Цитологічні карти хромосом — схематичне зображення хромосом із зазначенням місця розташування на них генів, яке одержують цитологічними методами. На відміну від *генетичних карт* хромосом, зроблених на підставі даних рекомбінаційного аналізу, локалізацію генів на цитологічних картах хромосом встановлюють за допомогою дрібних хромосомних перебудов (спонтанних або індукованих).

Цитоміксис — процес переміщення ядерного матеріалу, цитоплазми, органел із однієї клітини в іншу по цитоміктичних каналах — цитоплазматичних тяжках різного діаметра, які виникають при цьому (див. *плазмодесми*). **Ц.** трапляється у рослин як у вегетативних, так і в генеративних клітинах, частіше за все виявляється у материнських клітинах пилку.

Цитотипи — хромосомні раси одного виду (див. *поліплоїдні ряди*).

Час подвоєння клітинної популяції — інтервал часу, за який кількість клітин у популяції

збільшується вдвічі; суттєво перевищує вік покоління, тому що не всі клітини в популяції можуть стабільно ділитися, може відбуватись їх вихід з мітотичного циклу, лізис тощо.

Шаперони — білки, які допомагають нековалентному згортанню/розгортанню або збірці/розбиранню інших молекулярних структур, але не взаємодіють з цими структурами, коли останні виконують свої нормальні біологічні функції. **Ш.** взаємодіють як з білками, так і з іншими молекулами, зазвичай комплексами білків з нуклеїновими кислотами. Значну частину **Ш.** складають білки теплового шоку.

«Шпилька» — дволанцюгова ділянка одностанцюгової молекули ДНК або РНК, яка утворилась у результаті комплементарних взаємодій між сусідніми інвертованими послідовностями нуклеотидів.

Штам — культура клітин (тканин), що утворилась після першої пересадки на свіже живильне середовище (після субкультивування). Складається, як правило, з багатьох *клітинних ліній*, що виникли з клітин первинної культури (первинного *калюсу*).

Щиток — частина зародка між брунькою й ендоспермом, видозмінена сім'ядоля; пристосована для поглинання поживних речовин з ендосперму.

Ювенільність — стан організмів від народження до статевої зрілості (у тварин), період від появи проростка до початку цвітіння (у рослин). Тривалість стану **Ю.** рослин може регулюватися пристосувальними реакціями у відповідь на яровизацію чи зміну режиму освітлення.

Ядерце — округле щільне утворення, не обмежена мембраною ділянка клітинного ядра розміром від одного до кількох мкм, що виявляється в інтерфазних клітинах еукаріотів; асоційоване з ядерцевим організатором, є місцем синтезу РНК, утворення рибонуклеопroteїнів (попередників рибосом) і самозбирання рибосом. У клітині міститься 1–2 ядерця, інколи більше.

Ядерцеве домінування — явище, коли у віддалених гібридів на стадії інтерфази утворюється ядерце лише однієї із батьківських форм. Зумовлене вибірковою пригніченням транскрипції кластерів рДНК шляхом інтенсивного метилювання рДНК одного з геномів гібриду.

Ядро — клітинна органела, що включає *хромосоми*, *ядерце*, ядерний сік і ядерну оболонку.

Є центром управління всіма процесами життєдіяльності клітини.

AFLP (amplified fragments length polymorphism) — поліморфізм довжин ампліфікованих фрагментів. ПЛР-метод виявлення поліморфізму ДНК, зумовленого змінами у сайтах рестрикції або у сусідніх з ними ділянках. Представляє собою поєднання технологій ПДРФ і ПЛР, ґрунтуючись на селективній ПЛР-ампліфікації рестрикційних фрагментів ДНК: ДНК розщеплюється двома різними ферментами рестрикції, один із ферментів густо ріже ДНК (сайт розпізнавання з чотирма основами, наприклад MSE1), а інший — рідко (ділянка розпізнавання з шістьма основами, наприклад EcoRI). Олігонуклеотидні адаптери приєднуються до кінців фрагментів ДНК.

Antirrhinum-тип — одна з чотирьох градацій у цитогенетиці рослин — об'єднує таксони, що характеризуються високою стабільністю диплоїдного числа $2n$ за варіювання у межах $2n-2/2n+2$ (Antirrhinum — ротики садові); також виділяють тип **Carex** (Carex — осока) — таксони зі значним варіюванням чисел хромосом $2n$ без зв'язку з поліплоїдією; тип **Chrysanthemum** (Chrysanthemum — хризантема) — таксони, що об'єднують види, які перебувають у стосунках поліплоїдії; тип **Pinus** (Pinus — сосна) — об'єднує таксони, представники яких характеризуються незмінним числом хромосом.

AP-PCR (arbitrarily primed polymerase chain reaction) — довільно праймована полімеразна ланцюгова реакція (див. *полімеразна ланцюгова реакція з довільними праймерами*).

ARS — див. АРП.

ASP (amplified sequence polymorphism) — поліморфізм ампліфікованих послідовностей; пов'язаний з праймерами, що фланкують гени, для яких визначено нуклеотидну послідовність, звичайно застосовують для вивчення поліморфізму відомих локусів.

BAC (bacterial artificial chromosomes) — штучно сконструйовані хромосоми бактерій.

Bootleneck effect — ефект «вузької шийки пляшки», флуктуація частот генів у період проходження багаточисельної популяції через стадію «стиснення», тобто різкого зменшення чисельності. Потім ця популяція знову збільшується за розміром зі зміненим генним пулом і, як правило, зі зменшеною мінливістю внаслідок *дрейфу генів*.

C-розміру парадокс — значне варіювання розміру геномів за відсутності очевидної варіації числа

генів. Вважається, що це результат різної представленості багаточисельних повторів, серед яких велику питому вагу складають ретротранспозони.

CCSs (conserved centromeric sequences) — консервативні центромерні послідовності хромосом.

DAF (DNA amplification fingerprinting) — *фінгерпринтинг* ампліфікованої ДНК.

Downstream — див. *даунстрім*.

EST (expressed sequence tag) — послідовності, що експресуються; часткова послідовність κДНК гена, послідовності містять до 5% помилок. База даних ESTs: <http://ncbi/nim/nih/gov/ESTs>.

Ex planta — «поза рослиною», характеризує конкретний біологічний процес або форму біологічного аналізу в органі, частині організму, клітині, вицелюваних із рослини.

FISH (fluorescence in situ hybridization) — флуоресцентна гібридизація *in situ*.

GISH (genome in situ hybridization) — геномна гібридизація *in situ* (див. *in situ гібридизація*).

GSS (genome survey sequence) — просиквеновані послідовності геному.

iPBS (inter primer binding site) — метод ПЛР, за якого використовують консервативні ділянки PBS-послідовностей *ретротранспозонів* для вивчення поліморфізму транскрипційних профілів, для клонування ділянок ДКП.

In planta — «всередині цілісної рослини», характеризує конкретний біологічний процес або форму біологічного аналізу в цілісній рослині.

In situ — «у місці локалізації (утворення)», характеризує конкретний біологічний процес або форму біологічного аналізу в місці їх природної локалізації.

In situ гібридизація (цитологічна) — метод ідентифікації специфічних послідовностей ДНК в інтактних хромосомах міченням за допомогою комплементарного зонда; як зонд часто використовують синтетичні олігонуклеотиди.

In vitro — вирощування живого матеріалу (клітин, тканин, органів, організмів) «у склі», на штучних живильних середовищах, в асептичних умовах. Також біологічні процеси, змодельовані поза організмом (*in vitro* транскрипція, *in vitro* трансляція тощо).

In vivo — «всередині живого організму», характеризує конкретний біологічний процес або форму біологічного аналізу в цілісному (*інтактному*) живому організмі.

IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism) — поліморфізм ампліфікованих діля-

нок ДНК між двома сусідніми *ретротранспозонами*; метод *ПЛР*, що застосовує *праймери* на основі послідовностей *ДКП* ретротранспозонів.

ISSR (inter-simple sequence repeat) — послідовності ДНК між простими *мікросателітними* повторами.

LINE (long interspersed elements) — довгі дисперговані повтори.

LTR (long terminal repeat) — довгий кінцевий повтор (див. *ДКП*).

MAB (marker assisted breeding) — селекція за допомогою молекулярних маркерів. Термін застосовують, як правило, в сучасній селекції при створенні нових форм організмів.

MAS (marker assisted selection) — добір за допомогою молекулярних маркерів. Іноді термін використовують як синонім *MAB*, частіше — в молекулярно-генетичних дослідженнях, в ДНК-технологіях, є складовою частиною терміна «*MAB*».

MITE (miniature inverted-repeat transposable elements) — мобільні елементи з невеликими інвертованими повторами.

NBS (nucleotide binding site) — сайт зв'язування нуклеотидів.

ORF (open reading frame) — відкрита *рамка зчитування*.

PBS (primer binding site) — праймер-зв'язувальний сайт, що міститься на 5'-кінці *ДКП* (LTR) LTR-вмісних ретротранспозонів. Слугує сайтом затравки для зворотної транскрипції.

PCR (polymerase chain reaction) — *полімеразна ланцюгова реакція*.

PPT (polypurine tract) — поліпуринова ділянка, що міститься на 3'-кінці *ДКП* (LTR) LTR-вмісних ретротранспозонів. Слугує праймером синтезу плюс-ланцюга ДНК.

PTD (putative targeting domen) — цільовий домен, що міститься на С-кінці інтегрази ретротранспозона.

PTGS (post-transcriptional gene silencing) — посттранскрипційний *генний сайленсинг*.

QTL (quantitative trait loci) — локуси кількісних ознак.

RAPD (random amplified polymorphic DNA) — довільно ампліфікована поліморфна ДНК, мультиплексний метод *полімеразної ланцюгової реакції*. Полягає в ампліфікації випадкових повторюваних сайтів геному із застосуванням коротких праймерів (8–12 нт). Дозволяє досліджувати поліморфізм анонімних послідовностей, різних за кількістю копій, розсіяних по всьому геному.

RBIP (retrotransposons-based insertion polymorphism) — ретротранспозон-обумовлений інсерційний поліморфізм; метод, за допомогою якого реєструють наявність чи відсутність окремих інсерцій на основі специфічної ампліфікації ділянок між фланкуючими послідовностями.

REMAP (retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism) — поліморфізм ампліфікованих інсерційних сайтів, що містяться між ретротранспозонами і мікросателітами (*SSR*); метод *ПЛР*, за якого застосовують пару *праймерів*, один з яких гомологічний до мікросателітного повтору, а інший — до ділянки *довгого кінцевого повтору* (*ДКП* або LTR) LTR-вмісного ретротранспозона.

RFLP (restriction fragments length polymorphism) — поліморфізм довжин фрагментів рестрикції, *ПДРФ*.

RRM (RNA recognition motif) — РНК-зв'язувальний *домен*, складова частина *ретротранспозонів*.

RT (reverse transcriptase) — див. *зворотна транскриптаза*.

RT-PCR (reverse transcription — polymerase chain reaction) — *ПЛР* зі *зворотною транскриптазою*; варіант методу *ПЛР*, модифікованого для аналізу молекул РНК.

siRNA (short interfering RNA) — малі інтерферуючі РНК.

SNP (single nucleotide polymorphism) — онуклеотидний поліморфізм.

Solo-LTR — див. *соло-ДКП*.

S-SAP (sequence-specific amplified polymorphism) — поліморфізм ампліфікованих специфічних повторів ДНК.

ssDNA (single-stranded DNA) — односпіральна ДНК.

SSPR (simple sequence repeats polymorphism) — поліморфізм простих повторюваних послідовностей.

SSR (simple sequence repeats) — повтори простих послідовностей ДНК.

STR (short tandem repeats) — короткі тандемні повтори.

STS (sequence tagget sites) — короткі послідовності, унікальні для даного геному; унікальна для даного локусу олігонуклеотидна послідовність, яку використовують для його ідентифікації методом *полімеразної ланцюгової реакції*.

TAM (tagget microarray marker) — мічені мікро-ерей маркери. Метод реєструє наявність чи відсутність окремих інсерцій на основі специфіч-

ної ампліфікації ділянок між фланкуючими послідовностями (див. *RBIP*).

TGS (transcriptional gene silencing) — транскрипційний *генний сайленсинг*.

TIR (terminal inverted repeats) — інвертовані кінцеві повтори ДНК-транспозона, необхідні для рухливості окремої копії мобільного генетичного елемента.

TPRT (target primed reverse transcription) — мішене-спрямована зворотна транскрипція.

TSD (target-site duplication) — дуплікація *сайта-мішені*.

Upstream — див. *анстрим*.

UTR (untranslated region) — нетрансльовані (незчитувані) ділянки, що фланкують LTR-невмісні *ретротранспозони*.

VLP (virus-like particles) — вірусоподібні часточки, ВПЧ.

НАУКОВЕ ВИДАННЯ

Кунах Віктор Анатолійович

**МОБІЛЬНІ
ГЕНЕТИЧНІ ЕЛЕМЕНТИ
І ПЛАСТИЧНІСТЬ
ГЕНОМУ РОСЛИН**

Технічний редактор *Чабан М. С.*

Коректор *Руденко Г. М.*

Комп'ютерна верстка *Шмушковича І. В.*

Художнє оформлення обкладинки *Семенова В. В.*

Підписано до друку 25.11.2013. Формат 60×84 ¹/₈. Папір офс. Гарнітура «Times».
Ум. др. арк. 34,9. Обл.-вид. арк. 35,8. Наклад 300 прим. Зам. 805.

Видавництво «ЛОГОС»

Свідоцтво ДК № 201 від 27.09.2000 р.

01030, Київ-30, вул. Богдана Хмельницького, 10, тел. 235-60-03



КУНАХ Віктор Анатолійович

доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент Національної академії наук України, завідувач відділу генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, професор Київського національного університету імені Тараса Шевченка, президент Українського товариства генетиків і селекціонерів імені М. І. Вавилова. Автор понад 400 наукових праць у галузі генетики, клітинної та молекулярної біології, фізіології і біотехнології рослин, у тому числі двох підручників для вищих навчальних закладів і восьми моно-

графій, зокрема шести монографій видавництва Шпрінгер. Має 39 авторських свідоцтв та патентів на винаходи у галузі клітинної селекції та біотехнології рослин. Лауреат Державної премії України в галузі науки і техніки, премії ім. В. Я. Юр'єва НАН України та премії ім. М. Г. Холодного НАН України, відмінник освіти України. Підготував чотирьох докторів та 22 кандидати біологічних наук у галузі генетики, молекулярної генетики, молекулярної біології, клітинної біології, фізіології рослин, біотехнології.



ISBN: 9789661717212



9 789661 717212