

# Мутагенез при интеграционных процессах и эволюция ядерного генома

Л. Л. Лукаш

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

imbig@serge.relc.com

---

*Рассмотрены вопросы мутационной изменчивости, вызываемой крупными структурными перестройками генетического материала, такими как транспозиции мобильных генетических элементов, интеграция или дезинтеграция экзогенных нуклеотидных последовательностей вирусной и невирусной природы, изменения хромосомного набора или отдельных хромосом, диминуция хроматина, и роль такой изменчивости в эволюции ядерного генома.*

*Ключевые слова: мутагенез, эволюция, ядерный геном, гетерохроматин, мобильные генетические элементы, хромосома, диминуция хроматина.*

---

Вопросы мутагенеза выходят сегодня на передний план научных исследований в связи с тем, что антропогенное загрязнение окружающей среды привело к неконтролируемому естественным отбором накоплению мутаций в геноме человека. По некоторым прогнозам, это может привести к значительному повышению частоты наследственных и соматических болезней, уменьшению длительности жизни и вероятности оставления потомства. Генетическая нестабильность, индуцированная факторами различной природы, рассматривается как основной механизм в сложном многоэтапном процессе злокачественного перерождения соматических клеток человека [1].

Использование генетически модифицированных продуктов питания в повседневной жизни, а также рекомбинантных ДНК на основе вирусных векторов в качестве новых фармакологических препаратов в генной терапии [2] высветило проблему

генетических последствий введения в организм человека чужеродных биологических факторов.

**Мутации – наследуемые изменения генетического материала.** Способность изменять генетический материал или мутировать – универсальное свойство живого от вирусов и микроорганизмов до высших растений, животных и человека. Мутационная изменчивость – это генетическая изменчивость, при которой генотип меняется в результате мутаций. Возникающие при этом нарушения могут затрагивать последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК, вызывать перестройки в хромосомах, приводить к увеличению или уменьшению числа отдельных хромосом или их наборов. Наиболее общее определение мутаций дано в книге Жимулева: «мутационная изменчивость – наследуемые изменения генетического материала» [3].

Известно много принципов классификации мутаций. Обычно мутации принято классифицировать не по их фенотипическим проявлениям, а по характеру изменения генетического аппарата.

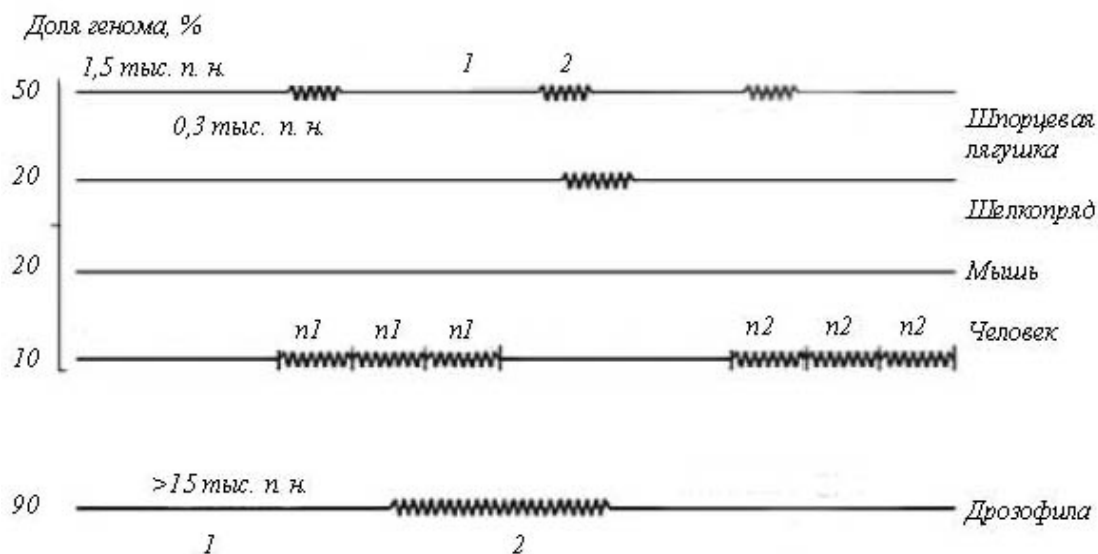


Рис. 1. Схема двух типов чередования нуклеотидных последовательностей разной степени повторяемости [13]

Инге-Вечтомов выделил три типа мутаций: 1) генные мутации или точечные; 2) изменения структуры хромосом или хромосомные перестройки; 3) изменения числа наборов хромосом [4]. В монографии Гершензона мутации разделены на такие основные типы: 1) изменения числа наборов хромосом (или иначе – геномные мутации; 2) изменения числа отдельных хромосом (иначе – анеуплоидия); 3) перестройки хромосом (иначе – хромосомные aberrации); 4) генные (иначе – точечные мутации) [5, 6]. Многие авторы придерживаются этих классификаций, хотя они уже давно нуждаются в дополнениях из-за обогащения наших представлений новыми данными [3].

Определенный уровень генетической стабильности и изменчивости «закодирован» в структуре самого клеточного генома и зависит от координированной работы генов-мутаторов и антимутаторов, различных регуляторных генетических элементов, ответственных за протекание основных матричных процессов – репликации, рекомбинации, репарации, модификации и рестрикции [7–10]. Как правило, спонтанное мутирование у про- и эукариотных организмов характеризуется низкой частотой ( $10^{-5}$ – $10^{-8}$ ) благодаря эффективной работе ферментов с корректорскими и репаративными функциями и является наследственно закрепленным признаком. В работе Жестяникова прямо ска-

зано о том, что величина, обратная частоте спонтанных мутаций, по-видимому, характеризует уровень генетической стабильности биосистемы [7].

Поскольку мутации являются источником генетического разнообразия популяций как необходимого условия их развития и адаптации, эволюционно закрепился относительно постоянный темп спонтанного мутирования, присущий данному виду или типу клеток [11]. Этот генетически закрепленный признак поддерживается защитными системами на определенном уровне. Например, при формировании антителобразующих клеток генетическая нестабильность поддерживается в течение всей жизни организма, но она строго ограничена определенными районами соответствующих генов.

С помощью природных геномов (например, онковирусов) и созданных генно-инженерным способом ДНК-конструкций можно направленно влиять на мутационный темп в клеточных популяциях [12]. Все представленные факты позволяют говорить о возможности регуляции мутационной изменчивости на клеточном и организменном уровне организации живого.

Главная особенность генетического материала эукариотов в сравнении с прокариотами – наличие избыточной ДНК и последовательностей нуклеотидов различной степени повторяемости в гетерохроматиновых районах [13]. Гетерохроматиновые ра-

йоны обладают рядом свойств, отличающих их от эухроматина. Среди основных характеристик гетерохроматина – относительное постоянство компактизации, способность к конъюгации. Широко известны представления о значительной роли гетерохроматиновых районов в эволюции кариотипа [3].

На рис. 1 показана схема двух типов чередования нуклеотидных последовательностей разной степени повторяемости. Парадоксы эукариотных геномов состоят в 1) несоответствии размеров геномов и положению видов на эволюционной лестнице, 2) большом различии геномов по величине и содержанию избыточной ДНК у близких видов, обитающих в одинаковых условиях. Последнее свидетельствует о том, что размер генома не оставался постоянным в ходе эволюции близких по происхождению видов. Каким образом их геномы могли быстро увеличиваться и/или уменьшаться?

О биологической роли избыточной ДНК высказано много различных гипотез. Сопоставление фактов привело к заключению, что она не выполняет ни кодирующих, ни регуляторных функций. Избыточную повторяющуюся ДНК стали называть «эгоистической», «паразитической» и даже «мусорной», пока не стала проясняться ее возможная роль в эволюции геномов. Это предположение было высказано Акифьевым более 30 лет тому назад [14].

Наиболее верным, на взгляд автора, выглядит представление об избыточной ДНК как об «эволюционном котле», в котором созревают новые структурные гены и регуляторные последовательности, как предположил шведский биолог Эдстрем. Некоторые соображения по этому поводу высказывал еще в 20-е годы прошлого столетия русский генетик Серебровский [14]. Вряд ли новый ген мог бы образоваться за счет мутационной перестройки старого, если тот присутствует в единственном числе. Если же существует избыток генетического материала в виде удвоенных (дуплицированных) генов, то один из них может и не функционировать. Но в этом «молчащем» гене со временем накапливаются генные мутации, изменив его до такой степени, что он образует новый структурный или регуляторный ген. При изменении условий такой ген может начать функционировать, образуя новый белковый

продукт и соответственно новый признак. Но это очень медленный процесс, который не может объяснить быстрое изменение генома в эволюции.

Поэтому, нисколько не умаляя роли генных мутаций и хромосомных aberrаций, в представленной работе решено было сконцентрировать внимание на мутациях, возникающих при крупных структурных реорганизациях генома, так как они могут иметь особое значение для ускоренной эволюции. Это прежде всего:

а) инсерции и делеции нуклеотидных последовательностей при интеграции мобильных генетических элементов (МГЭ), вирусов, трансформирующей ДНК;

б) макромутации – изменение числа хромосомных наборов, появление и элиминация отдельных хромосом, хромосомные перестройки, диминуция хроматина (потеря генетического материала при формировании соматических клеток из зародышевой клеточной линии).

Таким образом, в данной публикации обсуждаются мутационная изменчивость, возникающая при крупных структурных перестройках генетического материала, таких как транспозиции МГЭ, интеграция и дезинтеграция экзогенных нуклеотидных последовательностей вирусной и невирусной природы, изменения на уровне всего хромосомного аппарата и отдельных хромосом, диминуция хроматина, и роль такой изменчивости в эволюции ядерного генома. Так, будут приведены некоторые конкретные примеры эволюции клеточного генома, связанные со встраиванием аденовирусной ДНК, экзогенной трансформирующей ДНК, изменением основных и добавочных хромосом набора у отдельных видов животных и потерей генетического материала, присутствующего в клетках зародышевой линии (germ line).

**Системы МГЭ как факторы эволюции и эволюционирующие объекты.** Представляется обособленным сравнение фрагментов экзогенных ДНК, введенных в клетки тем или иным методом, с МГЭ, открытыми Мак-Клинтон в 1956 году и интенсивно исследуемыми с тех пор до настоящего времени [3]. Хесин считал, что практически любая нуклеотидная последовательность, окруженная ДНК-повторами, может стать мобильным элементом [8]. При

этом следует учитывать, что различные типы МГЭ могут привноситься экзогенной ДНК в клеточную систему, а также активироваться в клеточном геноме в результате трансфекции и геномного стресса [15–17].

Среди биологических факторов, дестабилизирующих клеточный геном, особо выделяются МГЭ и онкогенные вирусы. Перемещения МГЭ, по-видимому, играют существенную роль как в процессах нормального развития и дифференцировки стволовых клеток в специализированные, так и в злокачественном перерождении тканей [15]. Онковирусы недаром называют «молекулярными роботами», способными дестабилизировать клеточный геном и осуществить полное перепрограммирование клеточного генома в сторону злокачественной трансформации.

Следует отметить, что к биологическим факторам, оказывающим регуляторное влияние на мутационный процесс, относятся также нуклеиновые кислоты, гормоны, белки с регуляторными и ферментативными функциями, витамины и различные клеточные метаболиты [18]. Как вирусы, так и МГЭ могут влиять на мутационный процесс через экспрессию их собственных и активированных клеточных генов [19]. Но в данной статье уделено внимание другому аспекту влияния на мутационный процесс и эволюцию, а именно – последствиям интеграции экзогенных нуклеотидных последовательностей с клеточной ДНК.

Инсерции МГЭ в кодирующие зоны генов приводят к нарушению или резкому изменению их функций. Это связано с прямым повреждением кодирующей нуклеотидной последовательности генов и с влиянием знаков пунктуации (промоторов, терминаторов, энхансеров) на процессы считывания. Доля таких мутаций особенно велика у прокариотов, имеющих высокую плотность кодирующих последовательностей в геноме [16, 17].

В геноме высших эукариотов, где кодирующие последовательности – лишь «островки в океане» (3–5 % генома), МГЭ чаще всего встраиваются в нуклеотидные последовательности избыточной ДНК [15–17]. Инсерции МГЭ в некодирующие области (спейсеры, интроны, фланговые участки и др.) приводят к более «мягким» последствиям: уси-

лению или ослаблению активности близлежащих генов, изменению их регуляции. Однако появление дополнительного энхансера, принадлежащего МГЭ, возле функционального клеточного гена способно резко активизировать этот ген. Энхансеры могут в десятки и сотни раз усиливать транскрипцию соседних генов на расстоянии до 5000 п. н.

Рисунок локализации МГЭ в каждом случае относительно стабилен и сайты, доступные для инсерции, вероятно, отмечены на длительный срок «молекулярной памятью» [17]. Возможно, это является существенной компонентой механизма детерминации количественных признаков. В общем случае эти системы содержат: 1) олигогены (гены главного эффекта), необходимые для формирования признака; 2) полигены, каждый из которых не является необходимым для формирования признака, но в совокупности они могут изменить его экспрессию; 3) МГЭ, модифицирующие и усиливающие действие олигогенов и полигенов, вблизи которых они локализованы.

Критические, стрессовые условия существования часто сопряжены с прохождением популяций через стадию «бутылочного горлышка», что может приводить либо к массовому вымиранию, либо к освоению новых экологических ниш по «принципу основателя» [16, 17]. МГЭ рассматриваются как своеобразные рецепторы стрессовых сигналов из внешней или внутренней среды, запускающие системные вспышки наследуемой изменчивости вплоть до становления нового генетического гомеостаза в критические периоды эволюции популяций. В этих условиях новые формы, индуцированные вспышками транспозиций, могут стать основателями новых популяций с резко измененным фенотипом по лимитирующим количественным или качественным признакам. Не исключено, что изменение системы рисунков локализации МГЭ является одним из механизмов видообразования.

Гены и функциональные сайты самих ретропозонов подвержены особо сильному мутагенезу, потому что их собственный генетический материал при репликации проходит РНК-стадию, имеющую вероятность мутирования  $10^{-3}$ – $10^{-4}$ , что на несколько порядков выше, чем вероятность мутирования генов в эукариотной ДНК.

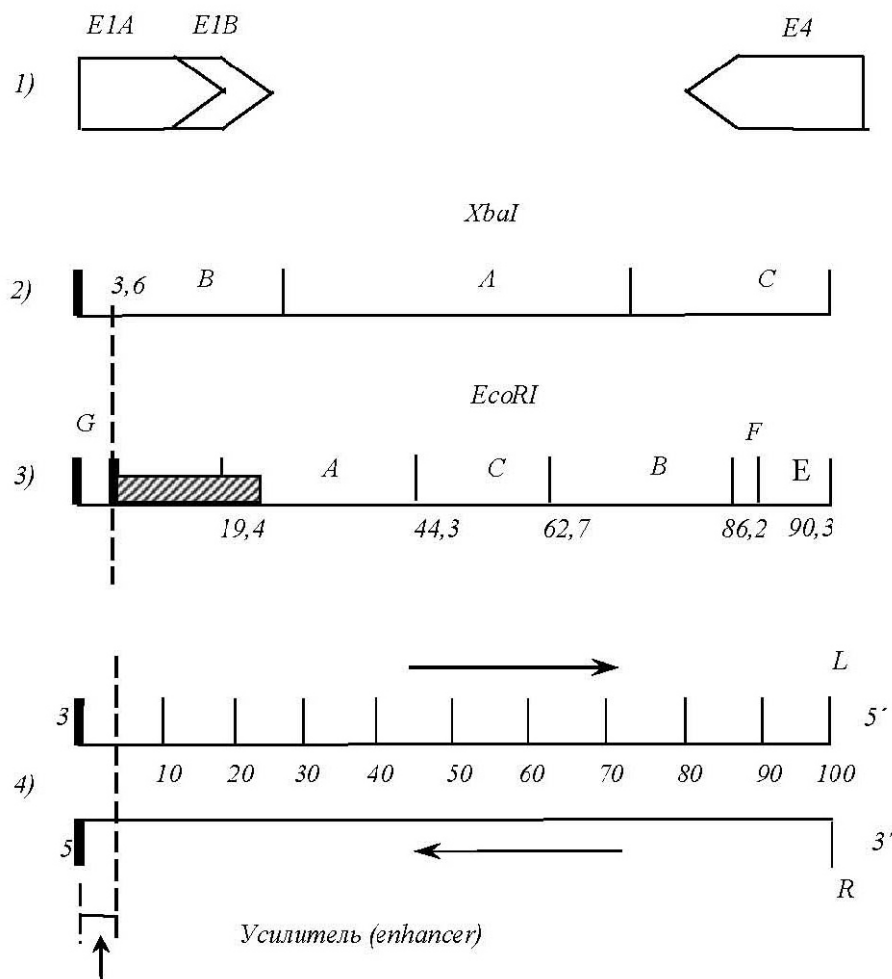


Рис. 2. Рестрикционная карта генома BAV3

Системы МГЭ эукариотного генома обладают следующими общими функциями [13]:

- являются источником инсерционной изменчивости генов;

- влияют на проявление количественных и качественных признаков;

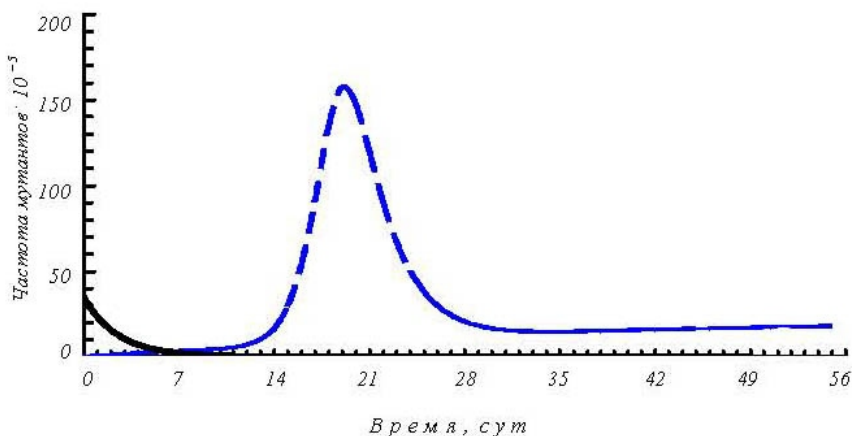
- откликаются на внешние стрессорные воздействия, в частности температурные, всплываями транспозиционной изменчивости;

- при отборе по некоторым признакам отвечают изменением рисунков локализации многих МГЭ одновременно.

Таковыми свойствами в разной степени обладают МГЭ различных объектов – дрожжей, дрозофилы, растений, млекопитающих. В нестабильных клеточных системах под влиянием ферментов, обеспечивающих транспозицию, мутации могут возникать

не только в сайтах встраивания МГЭ, но и во многих других локусах [8].

**Эволюция клеточного генетического материала при интеграции вирусов и трансформирующих ДНК.** По сравнению с МГЭ геномы онковирусов, особенно ДНК-содержащих, устроены гораздо сложнее. На рис. 2 представлена рестрикционная карта генома типичного аденовируса (бычий аденовирус типа 3). Геном аденовируса представляет собой линейную молекулу ДНК с длинными прямыми повторами на концах. На левом конце генома локализуются ранние опероны E1A и E1B, составляющие трансформирующую область, ответственную за злокачественную трансформацию клеток, а на правом – ранняя область E4, контролирующая сам процесс трансформации. При изучении интеграции этого и других ДНК-содержа-



### СТАДИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ:



#### 1) Временной экспрессии



#### 2) Становления интегрированного состояния



#### 3) Стабильной трансформации

Рис. 3. Моделирование проявлений мутагенеза и злокачественной трансформации при введении в клетки трансформирующей области аденовируса E1(E1A+E1B)

щих вирусов в хромосомную ДНК выявлено несколько этапов становления интегрированного состояния и злокачественной трансформации клеток [20–24]. Основные этапы можно сформулировать следующим образом.

Временная экспрессия ранних вирусных генов и образование высокомолекулярных интеграционных комплексов из tandemно расположенных вирусных геномов;

Становление интегрированного состояния и проявление структурной нестабильности;

Стабильная трансформация, продолжающаяся в течение десятков и сотен клеточных генераций;

Инактивация вирусных нуклеотидных последовательностей в результате метилирования и последующая их элиминация.

Математическое моделирование проявления мутационного процесса в системе аденовирус–клетка показало, что наблюдаются два всплеска повышения частоты мутаций: первый пик, выра-

женный слабее, совпадает с периодом временной экспрессии, а второй – с периодом структурной нестабильности при становлении интегрированного состояния (рис. 3) [25]. На рис. 4 показана последовательность исследуемых событий в системе аденовирус–клетка во времени.

Результирующий мутагенный эффект экзогенного мутагена определяется как силой его воздействия, так и возможностями защитных механизмов клетки, особенностями внутриклеточной среды, метаболизма. Очевидно, постепенное снижение частоты индуцированных мутантов в клеточных популяциях со временем (рис. 3) отражает динамику выведения из клеток мутагена и действие репаративных и других защитных механизмов.

Свободные вирусные ДНК фрагментируются и разрушаются довольно быстро [21], что, по-видимому, определяет краткосрочность раннего мутагенного эффекта. Функциональная инактивация (вследствие метилирования) и выведение встроен-

ных молекул экзогенных ДНК происходят медленнее и во многом определяются их структурно-функциональными особенностями и репаративными возможностями клеточных систем [22]. Снижение уровня индуцированных мутантов в отдаленные сроки после трансфекции (4–7 недель), по-видимому, отражает динамику инактивации и выведения вирусных нуклеотидных последовательностей и гибель мутабельных клеток, «перегруженных» мутациями по различным генам (рис. 3). Известно, что со временем в клетках остается все меньше и меньше вирусных нуклеотидных последовательностей: вначале элиминируются фрагменты поздней, а затем и ранней областей генома онковирусов [23]. В результате в некоторых злокачественно трансформированных клетках полностью отсутствуют вирусные нуклеотидные последовательности [24]. Аналогичные эффекты наблюдаются и в случае трансгенных животных [26–29].

Возможность индукции мутаций при встраивании чужеродных нуклеотидных последовательностей в клеточный геном была подтверждена в экспериментах как на дрозофиле, так и на мышах *in vivo* [26–29]. В цикле работ Газаряна и соавт. на трансгенных мышах с рекомбинантной конструкцией *pBR322*, содержащей встроенный провирус саркомы Рауса, показана интеграция в нескольких случаях плазмидной нуклеотидной последовательности в геном мыши [26–28]. Но не всегда выявлялась прямая связь инсерции с мутацией. Иногда полная потеря вирусных нуклеотидных последовательностей не приводила к изменению мутантного фенотипа. Авторы пришли к выводу, что трансфекция является причиной индукции транспозиций клеточных МГЭ, приводящих к локуспецифическим мутациям.

В потомстве опухолевых и трансформированных клеток, полученных под действием онковирусов, выявлены перестройки, возникающие в результате последовательных рекомбинационных актов при становлении интегрированного состояния [20]. В месте стыковки вирусного и клеточного геномов происходит реаранжировка, включающая делеции, инсерции и тандемные дубликации интегрированного фрагмента. Хромосомная ДНК, фланкирующая сайт интеграции, содержит области, гомоло-

гичные вирусной ДНК, которые могут участвовать в рекомбинационных актах, приводящих к установлению стабильного состояния. В процессе рекомбинаций возникают иногда довольно большие делеции фрагментов клеточного генома (до 3 тыс. н.).

При изучении механизмов интеграции ДНК-содержащих вирусов показано, что их геномы встраиваются в обе нити клеточной ДНК – как во вновь синтезированную, так и в матричную [20]. Этот процесс может происходить по типу гомологичной рекомбинации с разрезанием нитей клеточной ДНК и последующей инсерцией экзогенной нуклеотидной последовательности. В случае аденовирусов интеграция осуществляется с помощью коротких участков гомологии между вирусными и клеточными последовательностями по типу сайт-специфической рекомбинации [21–24], однако детали этого процесса остались неизученными. Встраивание может происходить и с помощью негомологичной рекомбинации, обеспечивающей интеграцию МГЭ (для ретровирусов это основной механизм) [8].

Итак, инсерционный мутагенез, вызываемый встраиванием вирусных геномов в клеточную ДНК, в основном связан с этапом структурной нестабильности при становлении интегрированного состояния. Несмотря на отсутствие выраженной специфичности встраивания ДНК-содержащих онковирусов, области умеренных повторов наиболее предпочтительны для реализации интеграционного процесса. Участок интеграции обычно находится рядом с местом перехода уникальной структуры клеточного генома в повторяющиеся последовательности [20, 22–24]. Показано преимущественное встраивание онковирусов в *Alu*-богатые районы. Т-антиген SV40 и ранние белки аденовирусов, вероятно, «узнают» точку начала репликации *Alu*-последовательности так же хорошо, как и соответствующий элемент вирусной ДНК.

Встраивание в уникальную хромосомную ДНК происходит с гораздо меньшей вероятностью. Поэтому индуцированный вирусами мутагенез в уникальных клеточных генах может определяться интеграционными событиями в меньшей степени, чем мутагенез в области гетерохроматина. Именно в гетерохроматине индуцируются и хромосомные перестройки [30].



Рис. 4. Последовательность интеграционных и мутационных событий в системе аденовирус–клетка

Кроме инсерционно-делеционного мутагенеза в районе интеграции под влиянием ранних регуляторных белков онковирусов индуцируются точечные мутации в широком спектре локусов [18]. Система ранних вирусных генов аденовируса интересна тем, что дает пример управления процессами как злокачественной трансформации, так и мутагенеза. Трансформирующая область (опероны E1A и E1B) стимулируют транскрипцию многих клеточных мишеней, отвечающих за репликацию ДНК и стимуляцию пролиферации клеток, а ранняя область E4 подавляет накопление клеточных мРНК (рис. 5). И эта же область E4 при совместном введении в клетки с трансформирующей областью E1 или опероном E1B блокирует проявление второго яркого пика индуцированного мутагенеза (рис. 3, 6).

Подводя итоги, можно выделить три основных фактора дестабилизации в системе онковирус–клетка [12]. Первичным фактором дестабилизации является экспрессия ранних регуляторных генов, ответственных за стимуляцию репликации

ДНК и злокачественную трансформацию клеток. Вторичным фактором дестабилизации является перепрограммирование клеточного генома (изменение активности и мутации клеточных генов и регуляторных элементов, транспозиции МГЭ) под влиянием экспрессии вирусных генов и интеграции их с клеточной ДНК. Дополнительным фактором, повышающим вероятность появления мутаций, служит переключение репаративных и других ДНК-связывающих ферментов на взаимодействие с молекулами генетической матрицы экзогенного происхождения.

Многочисленными работами по переносу чужеродных генов показано, что интегрировать с клеточным геномом может практически любая ДНК [31–37]. Соматические клетки млекопитающих способны поглощать огромное количество молекул экзогенной трансформирующей ДНК. Важно, однако, в каком микроокружении и с какими регуляторными элементами вводится в клетки трансген. Если молекулы экзогенной ДНК инактивированы





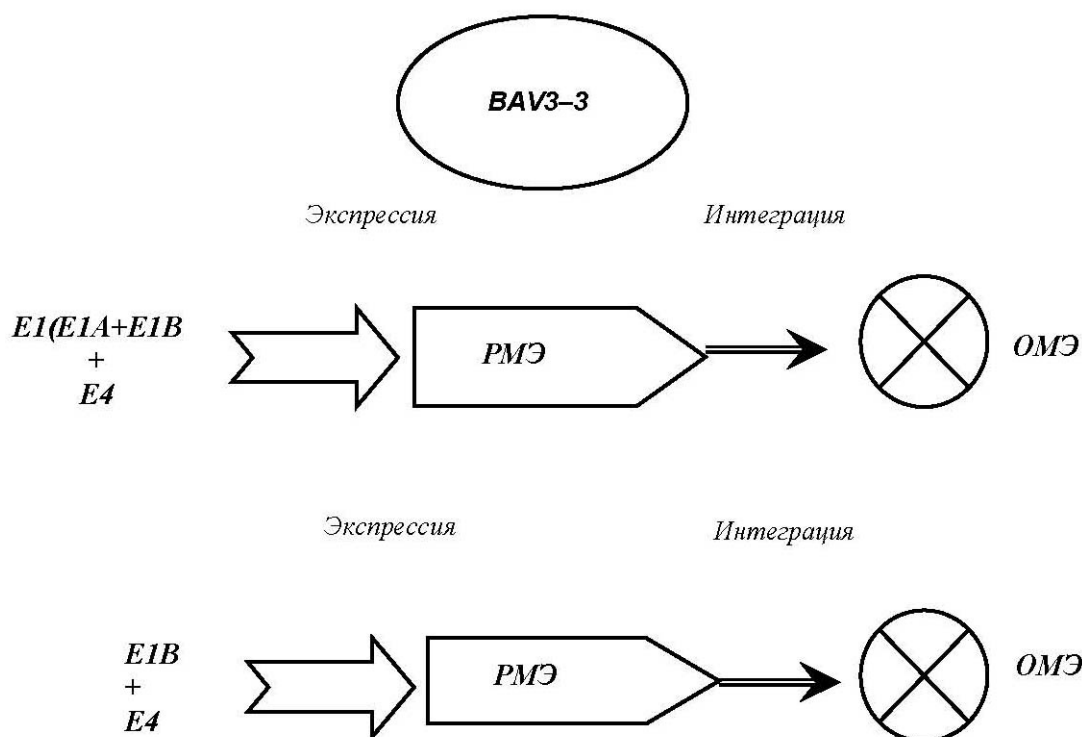


Рис. 6. Регуляция мутагенеза системой ранних оперонов аденовируса

Инсерционные мутации на сингенных животных составляют примерно 8 %, что достаточно близко по значению к результатам, полученным для ретровирусов в соматических клетках млекопитающих [26–29].

Накапливается все больше данных об инсерционном мутагенезе при интеграции трансгена, вызывающего нарушения в генах, работающих в эмбриогенезе и при клеточной дифференцировке [33]. В некоторых случаях удалось установить ген, нарушение которого в ходе интеграции провируса вызывало мутацию. Так, встраивание ретровируса в ген коллагена приводило к эмбриональной гибели на 6-й и 12-й дни развития [34]. Другая инсерционная мутация, по-видимому, была вызвана внедрением трансгена в область гена, отвечающего за морфогенез конечностей у мыши [35].

Отличие экзогенной ДНК как «живого» мутагена от физических и химических мутагенов состоит в удивительной способности «приживляться», что значительно увеличивает время ее присутствия в клетке. Процесс своеобразного «изучения и выбраковки» чужеродного генетического материала завершается конструированием новых высокомолекулярных генетических структур, пекеласом, всту-

пающих в рекомбинационные акты с хромосомной ДНК [31–37]. При захвате пекеласомой центromеры на ее основе может сформироваться новая минихромосома. Иногда вновь образованные минихромосомы интегрируются с хозяйскими хромосомами и становятся частью клеточного генома. В некоторых случаях чужеродная ДНК остается автономно реплицирующейся структурой.

Как и в экспериментах с вирусами, установлено наличие областей на хромосомах (места сосредоточения *Alu*-повторов), чувствительных к действию трансформирующей ДНК. Анализ всей совокупности данных указывает на то, что именно *Alu*-элементы могут выступать в качестве «горячих точек» рекомбинационных и мутационных событий, а также медиаторов гомологичных и негомологичных рекомбинаций [38, 39].

**Эволюция хромосомного аппарата.** Сравнительные цитогенетические исследования показали, что существенную роль в видообразовании у растений играет полиплоидизация. Но у животных полиплоидия приводила к нарушению хромосомного механизма определения пола, поэтому этот процесс не имел столь важного значения в их эволюции; почти все немногочисленные полиплоидные виды

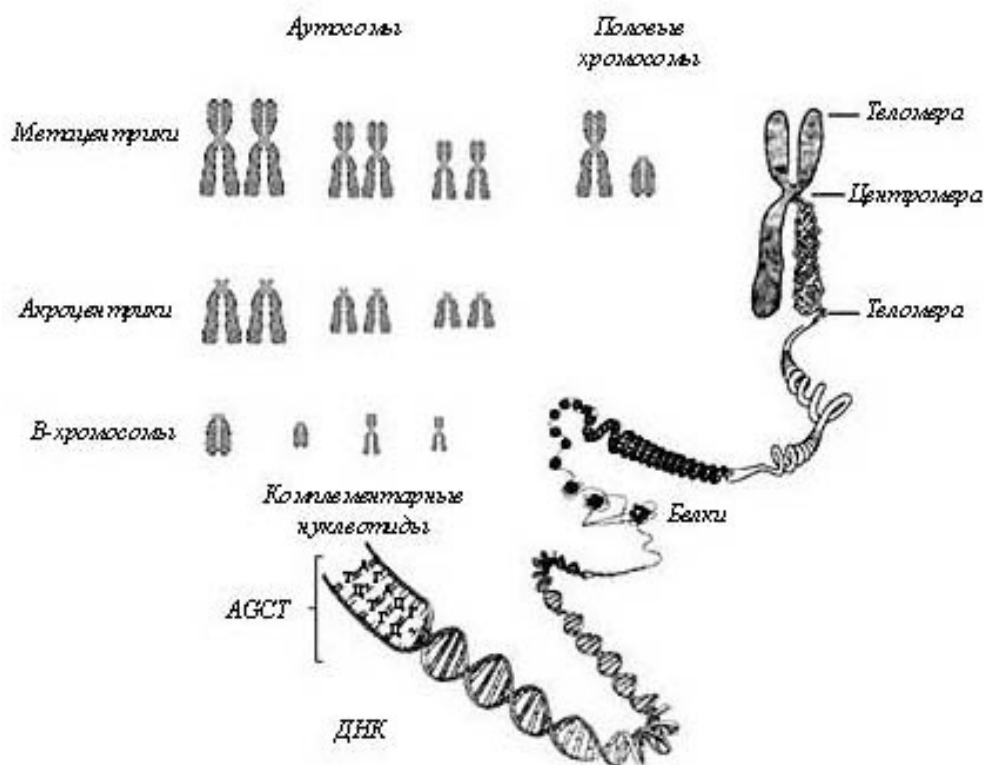


Рис. 7. Организация основных и добавочных хромосом млекопитающих [41]

размножаются партеногенетически. Продемонстрировано также эволюционное значение различных хромосомных перестроек: дупликаций, инверсий, транслокаций [5]. При этом отмечена особая роль дупликаций, которые представляют собой основной способ увеличения числа и разнообразия генов в ходе эволюционного развития организмов.

Набор хромосом, или кариотип, – надежная характеристика видовой принадлежности животных и растений. Это верно для большинства видов, но не для всех. У многих животных и растений наряду с хромосомами основного набора (А-хромосомы) обнаруживаются добавочные, так называемые В-хромосомы (рис. 7). Их форма и размер могут быть разными у представителей одного и того же вида. Например, у азиатской лесной мыши кариотип состоит из 23 пар аутосом, половых хромосом и девяти В-хромосом [40].

Применение методов молекулярной генетики позволило установить, что В-хромосомы полностью состоят из избыточной ДНК, причем все В-хромосомы имеют общие повторы ДНК. Затем было обнаружено их родство по некоторым ДНК-повторам с А-хромосомами.

Оказалось, что в прицентромерных районах В-хромосом имеются повторы, родственные последовательностям, находящимся в прицентромерных районах аутосом и в плотных блоках половых хромосом. При более тщательном исследовании с различными ДНК-зондами определено, что этим родство между А- и В-хромосомами не ограничивается. Когда на препараты А-хромосом наносили меченые пробы В-хромосом, оказалось, что метка обнаруживается не только в центромерных районах, но и на плечах аутосом, но окрашивались они во много раз слабее.

Использование меченых зондов позволило выявить еще одну интересную особенность строения В-хромосом, а именно – они являются изохромосомами. Такие хромосомы с совершенно идентичными плечами иногда возникают в результате перестроек в раковых клетках, а также в клетках, культивируемых *in vitro*, но почти никогда не встречаются в норме. Что касается В-хромосом лесной мыши, то почти все они – изохромосомы. Результаты окрашивания хромосом лесной мыши с использованием В-хромосомных зондов показали, что в геноме этого вида присутствуют по крайней

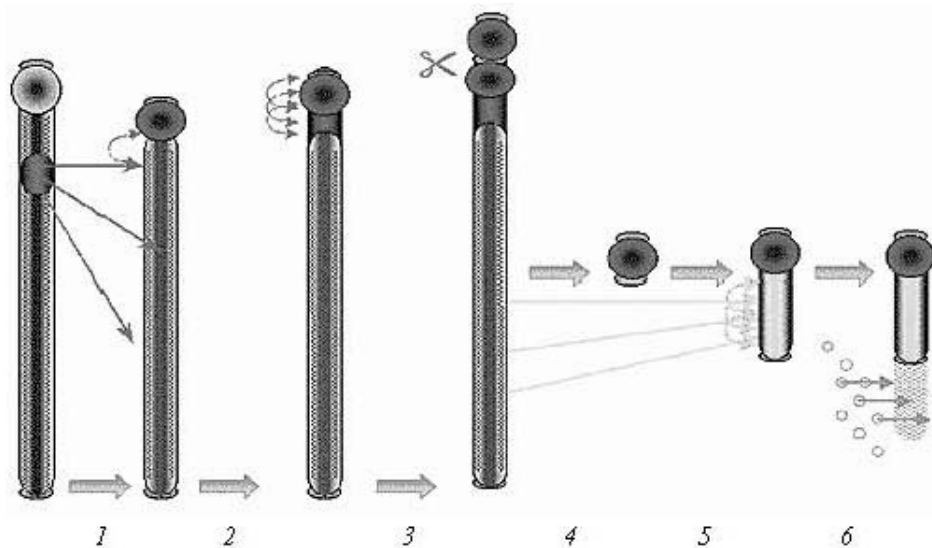


Рис. 8. Происхождение и эволюция добавочных В-хромосом лесной мыши [41].

мере три класса повторов: 1) локализованные в прицентромерных районах аутосом и В-хромосом, а также в двух районах половых хромосом; 2) составляющие основную массу плеч В-хромосом и присутствующие в А-хромосомах в значительно меньших количествах; 3) обнаруживающиеся только на концах некоторых В-хромосом.

Анализ хромосомных наборов у близких видов позволил предложить гипотетическую картину возникновения и эволюции В-хромосом (рис. 8). Вначале некие МГЭ проникли в прицентромерные последовательности аутосом и в ходе своего размножения, захватив центромерные и теломерные последовательности хозяйской ДНК, сами стали хромосомами. Наличие центромеры позволяет наравне с основными хромосомами участвовать в клеточном делении, а теломеры защищают концы вновь образовавшихся хромосом от разрушения. Как только В-хромосомы возникли, к ним устремились другие МГЭ, имеющиеся в клетке. Последними в В-хромосомы интегрировали концевые повторы; их неспособность плотно упаковываться в момент деления свидетельствует об их экстрахромосомном происхождении. Оказалось, что некоторые В-хромосомы содержат гены, отвечающие за синтез рибосомной РНК. И, возможно, со временем, захватив другие полезные гены, они превратятся в А-хромосомы? Поскольку не все виды лесной мыши имеют В-хромосомы, предполагают, что они унаследовали от общего предка не сами В-хромосомы, а способность создавать их *de novo*.

Рассмотренная схема позволяет объяснить, как происходит появление новых хромосом и соответственно увеличиваются размеры генома. Но остается открытым вопрос, а каким образом может происходить быстрое уменьшение размеров генома?

Ответить на этот вопрос позволяют данные, полученные при изучении диминуции хроматина. Само явление диминуции хроматина открыто Бовери еще в 1887 г. у аскарид [3]. Как оказалось, явления дифференцировки клеток зародышевого пути и сомы, связанные с потерей части генетического материала в раннем эмбриональном развитии (диминуция хроматина, элиминация хромосом), довольно широко распространены в природе [3, 13, 41–43]. Диминуция хроматина в той или иной степени известна у некоторых видов аскарид, циклопов, инфузорий, клещей, жуков, бабочек, мух и рыб. У человека потерю эритроцитами ядра в процессе дифференцировки также можно рассматривать как крайний случай проявления диминуции.

На уровне хромосомного фенотипа диминуция хроматина соответствует представлению о макромутациях [3]. Диминуция хроматина у перечисленных организмов является, с одной стороны, классической формой тотальной редукции генома в онтогенезе при дифференцировке клеток и, с другой, – возможной моделью для аналогичных преобразований генома эукариотов в эволюции. Именно это обстоятельство и заставило рассмотреть данное явление в представленном обзоре.

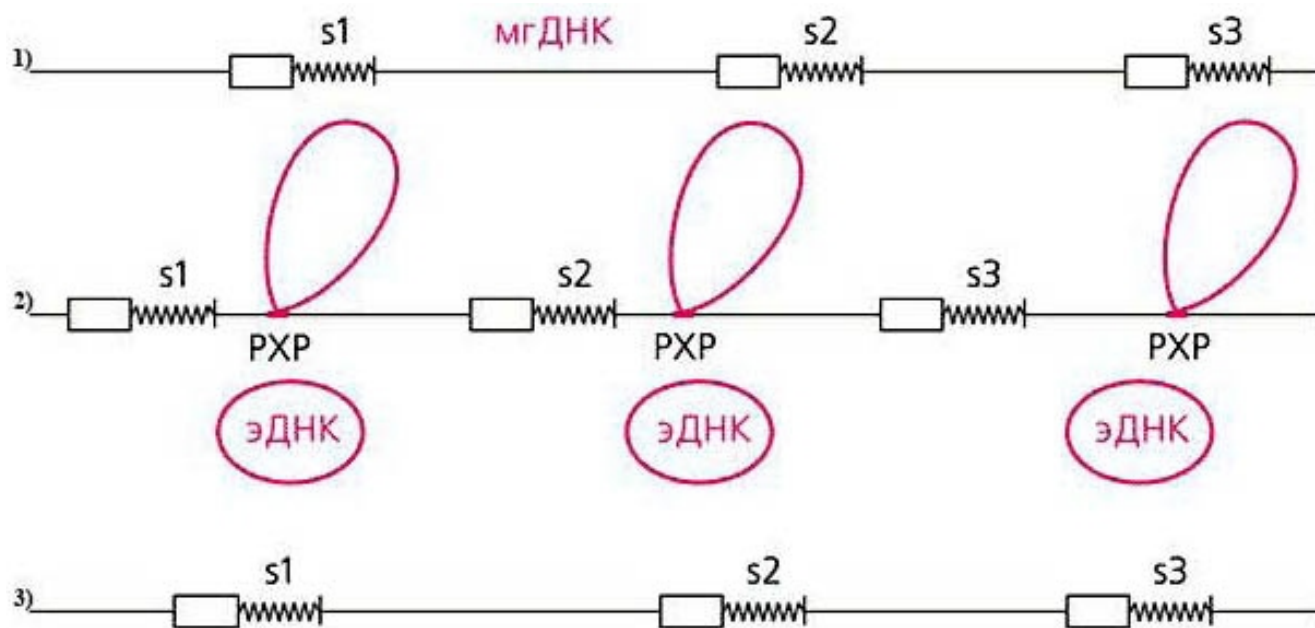


Рис. 9. Схема диминуции хроматина у циклопов [13]

Как показано на примере двукрылых, элиминация определенных хромосом – один из феноменов диминуции, хотя при этом, вероятно, и не происходит значительной молекулярной реорганизации самой структуры хромосомной ДНК [43].

У рачка *Cyclops kolensis* в процессе диминуции из соматических клеток зародыша элиминируется рекордное для многоклеточных количество ДНК – 94 % [13]. Это ненамного меньше, чем у абсолютных рекорсменов, – брюхожесничных бактерий. Однако потеря огромной части ДНК не сказывается на числе хромосом; оно остается постоянным и равным 22 (столько же, сколько в клетках зародышевого пути). Какие же выводы относительно роли избыточной ДНК можно сделать из исследований диминуции хроматина у циклопов?

Во-первых, для дифференцировки, гистогенеза и построения тела у *C. kolensis* достаточно всего лишь 6 % хромосомной ДНК. Отсюда следует, что 94 % их ДНК не содержит ни генов, ни регуляторных последовательностей, необходимых для индивидуального развития данного вида.

Во-вторых, диминуция хроматина количественно строго повторяется во время каждого цикла репродукции рачка (10 лет наблюдений), что возможно лишь в том случае, если ДНК клеток зародышевого

пути, не затронутая диминуцией, сохраняется столько времени, сколько существует вид.

Таким образом, ДНК, выводимая из хромосом во время диминуции, не может считаться «мусорной». Более того, даже избыточна она только для соматических клеток, но не для клеток зародышевого пути. Сам процесс диминуции – яркий пример природной генной инженерии. Главное следствие, следующее из феномена диминуции, состоит в том, что гены, участвующие в индивидуальном развитии, не должны быть ни потеряны, ни даже повреждены, т. е. стабильность генетического материала поддерживается на высоком уровне.

Разрезают и сшивают хромосомную ДНК ферменты диминуции. Они безошибочно осуществляют свои функции, поскольку сайты разрывов точно определены (рис. 9). По точности манипуляций, которые производят клеточные ферменты, подобные генно-инженерные работы пока недоступны исследователям. Если мутации в гене возникнут, эмбриональное развитие остановится тогда, когда наступит время функционирования этого гена.

Другой вариант ошибочного разрезания – хромосомные перестройки, которые также летальны. Однако число спонтанных хромосомных перестроек в раннем развитии циклопов поразительно мало,

примерно в 100 раз меньше, чем у такого классического объекта для тестирования хромосомных мутаций, как лимфоциты человека. Этот факт свидетельствует о наличии мощной регуляторной защитной системы против мутаций, действующей по крайней мере в то время, когда в клетке высока активность ферментов диминуции. Последние должны «атаковать» только предназначенные для этого районы ДНК. Если бы в результате мутаций появились новые участки, чувствительные к этим ферментам, они были бы вырезаны и удалены из генома. А если бы диминуция подверглась одна единственная клетка, которая является родоначальной для развития не соматической, а зародышевой линии, тогда опасность таилась бы не для особи, а для вида, поскольку это почти неизбежно приводило бы к стерильности индивидуума, у которого произошла незапрограммированная потеря генетического материала.

Участки вырезанной ДНК собираются в гранулы, окруженные плотной мембраной. Молекулярно-генетический анализ показал, что эта ДНК содержит повторяющиеся нуклеотидные последовательности с высокой степенью гомологии. Их образование относят на счет концертной эволюции и рассматривают при этом две причины. Первая – недавнее происхождение повторов от общей предковой последовательности. Вторая причина – рекомбинационные события. Если гомологичные участки расположены в ядре клетки так, что между ними возможна рекомбинация, вновь возникающие мутации будут уничтожаться в результате рекомбинационных актов, а гомологи сохранятся [41, 42].

Каково назначение избыточной ДНК, которая удаляется при диминуции? По мнению Акифьева и соавт., единственное непротиворечивое объяснение возможной роли избыточной ДНК в клетках зародышевого пути состоит в том, что она создает уникальный портрет вида и является фактором его генетической изоляции [13, 41]. Если бы такой портрет не сохранялся в ряду поколений, синапсис гомологичных хромосом в мейозе нарушался бы, а потомство становилось анеуплоидным (т. е. с некратным гаплоидному числом хромосом) без каких-либо шансов на выживание.

Одной из наиболее изученных составляющих избыточной ДНК является гетерохроматин, функции которого в клетках различных организмов важны и разнообразны [3]. В рассмотренных случаях диминуции хроматина у ряда организмов убедительно показано, что функции значительной части гетерохроматина могут ограничиваться клетками зародышевого пути. Чем больше разница в молекулярной структуре некодирующих участков, тем с большей вероятностью произойдет нарушение конъюгации гомологов со всеми вытекающими последствиями. Именно это предотвращает гибридизацию особей близких видов (наряду с другими изолирующими механизмами).

Проведенные исследования показывают, что для осуществления диминуции хроматина требуется скоординированная работа батареи десятков генов, т. е. этот процесс находится под жестким генетическим контролем. По существу, диминуция хроматина на уровне хромосомного аппарата соответствует представлению о регулируемых макромутациях [3]. Возможно, смена программ генной экспрессии часто сопровождается запуском регулируемых процессов мутационной и рекомбинационной изменчивости [10].

Несмотря на то, что явление диминуции хроматина возникло и закрепилось только у некоторых видов, оно может служить моделью аналогичных преобразований генома эукариотов в эволюции. Именно этот пример позволяет прикоснуться к проблеме, связанной с резким уменьшением размеров генома в эволюции близких видов. Так, если в процессе диминуции хроматина изъятию подвергается ДНК клетки – родоначальницы зародышевого пути и процесс не сопровождается летальным событием, поскольку затрагивает лишь некодирующую ДНК, то все гаметы данного организма окажутся обладательницами нового редуцированного генома. Его получают сразу многие десятки особей, что может быстро создать изолированную группу. Именно таким образом, вероятно, происходила эволюция видов, у которых закрепился механизм диминуции хроматина. И само явление диминуции используют в систематике циклопов, поскольку различия в морфологии между близкими по происхождению видами являются ничтожно малыми.

У других видов существуют иные способы инактивировать, т. е. в конечном счете заставить «замолчать» избыточную ДНК. Известно, что у человека около 50 % генома вообще не участвует в экспрессии. Целые районы генома оказываются недоступными для транскрипции чаще всего из-за сверхкомпактной укладки участков хромосом. Здесь способ изменения генетического материала другой, но результат тот же – изоляция каких-то участков генома [13].

Итак, в заключение можно сделать следующие выводы.

Системы МГЭ эукариотных геномов являются источником и механизмом инсерционной изменчивости в клетке, влияют на экспрессию количественных и качественных признаков, изменяют рисунки локализации МГЭ в ответ на внешний отбор по признакам и на стрессорное воздействие. МГЭ выполняют роль своего рода рецепторов стрессорных сигналов, инициирующих вспышки транспозиционной изменчивости в критические периоды эволюции популяций, что приводит к преобразованию гомеостатической видовой нормы.

Используя экзогенную ДНК различной природы, клетки, вероятно, сами могут создавать новые макромолекулярные комплексы, состоящие из ДНК-повторов, которые встраиваются в подавляющем большинстве случаев в нестабильные районы гетерохроматина (*Alu*-повторы в геноме человека).

Автономные макромолекулярные комплексы (пекеласомы) могут захватить центромеры и превратиться в минихромосомы, эволюционирующие в дальнейшем как самостоятельные генетические структуры.

Макромутации при взаимодействии основных клеточных и новых добавочных хромосом (как, например, в случае А- и В-хромосом лесной мыши) служат источником дальнейшей эволюции генома. Делеции повторяющихся нуклеотидных последовательностей из гетерохроматиновых районов могут приводить к быстрому уменьшению размеров генома (как это происходило, например, при эволюции некоторых видов, у которых закрепился механизм диминуции хроматина).

Крупные реорганизации генома при интеграционных процессах, вероятно, всегда сопровождаются

увеличением темпа точечных мутаций в широком спектре локусов под влиянием активации ферментных систем, обеспечивающих основные матричные процессы: репликацию, рекомбинацию, репарацию, модификацию, рестрикцию.

*L. L. Lukash*

Mutagenesis induced by integration processes and evolution of nuclear genome

Summary

*Mutational variability induced by large-scale reorganizations of genetic material such as MGE transpositions, integration or disintegration of exogenous nucleotide sequences of viral and non-viral origin, changes in chromosome set or individual chromosomes, chromatin diminution and its role in the evolution of nuclear genome are discussed.*

*Keywords: mutagenesis, chromosome, chromatin diminution.*

*Л. Л. Лукаш*

Мутагенез при інтеграційних процесах і еволюція ядерного геному

Резюме

*Розглянуто питання мутаційної мінливості, спричиненої великими структурними перебудовами генетичного матеріалу, такими як транспозиції мобільних генетичних елементів, інтеграція або дезінтеграція екзогенних нуклеотидних послідовностей вірусної та невірусної природи, зміни хромосомного набору або окремих хромосом, димінуція хроматину, і роль такої мінливості в еволюції ядерного геному.*

*Ключові слова: мутагенез, еволюція, ядерний геном, гетерохроматин, мобільні генетичні елементи, хромосома, димінуція хроматину.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кордюм В. А. Опухоль – как она видится сегодня с позиций молекулярной генетики // Биополимеры и клетка.–2001.–17, № 2.–С. 109–139.
2. Глазко В. И. Генетически модифицированные организмы: от бактерий до человека.–Киев: Мин-во образования и науки Украины, 2002.–210 с.
3. Жимулев И. Ф. Общая и молекулярная генетика.–Новосибирск: Сиб. университетское изд-во, 2003.–480 с.
4. Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции.–М.: Высш. шк., 1989.–С. 290–369.
5. Гершензон С. М. Основы современной генетики.–Киев: Наук. думка, 1983.–240 с.
6. Гершензон С. М. Мутации.–Киев: Наук. думка, 1991.–111 с.
7. Жестяников В. Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение.–Ленинград: Наука, 1979.–286 с.
8. Хесин Р. Б. Непостоянство генома.– М.: Наука, 1984.–472 с.
9. Алекперов У. К. Антимутагенез.–М.: Наука, 1984.–100 с.
10. Cervantes R. B., Stringer J. R., Shao C., Tischfield G. A., Stambrook P. G. Embryonic stem cells and somatic cells

- differ in mutation frequency and type // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.–2002.–**99**.–P. 3586–3590.
11. Шапиро Н. И., Варшавер Н. Б. О темпе спонтанного мутационного процесса в соматических клетках млекопитающих и о некоторых вопросах, с ним связанных // Генетика.–1976.–**12**, № 7.–С. 132–149.
  12. Лукаш Л. Л. Регуляция изменчивости генома соматических клеток млекопитающих под влиянием экзогенных биологических факторов // Биополимеры и клетка.–2004.–**20**, № 1–2.–С. 93–105.
  13. Акифьев А. П. Избыточная ДНК – генетическая квадрататура круга? // [http://vivovoco.rsl.ru/VV/JOURNAL/NATURE/10\\_04/EXCESS.HTM](http://vivovoco.rsl.ru/VV/JOURNAL/NATURE/10_04/EXCESS.HTM) – А. П. Акифьев // Природа.–2004.–№ 10.
  14. Акифьев А. П. Молчащая ДНК и ее роль в эволюции // Природа.–1974.–№ 9.–С. 49–54.
  15. Гвоздев В. А. Подвижная ДНК эукариот. 2. Роль в регуляции активности генов и эволюции генома // Соросовский образоват. журн.–1998.–№ 8.–С. 15–21.
  16. Ратнер В. А., Васильева Л. А. Индукция транспозиций мобильных генетических элементов стрессовыми воздействиями // Соросовский образоват. журн.–2000.–№ 6.–С. 14–20.
  17. Ратнер В. А., Васильева Л. А. Мобильные генетические элементы (МГЭ) и эволюция геномов // <http://masgoevolution.narod.ru/ratner1.htm> – мобильные генетические элементы.
  18. Лукаш Л. Л. Дестабилизация клеточного генома под влиянием экспрессии ранних регуляторных генов онковирусов // Цитология и генетика.–2002.–**36**, № 2.–С. 68–80.
  19. Лукаш Л. Л. Биологические мутагены: их влияние на стабильность эукариотических клеточных систем // Вісн. українського тов-ва генетиків та селекціонерів.–2003.–№ 1.–С. 62–81.
  20. Агеенко А. И. Онкогены и канцерогенез.–М.: Медицина, 1986.–Т. 256.–152 с.
  21. Попов Л. С., Горбунова Л. В., Варшавер Н. Б. Интеграция ДНК ОВ40 в геном клеток и вирусный мутагенез // Генетика.–1986.–**22**, № 9.–С. 2213–2219.
  22. Doerfler W. Uptake, fixation and expression of foreign DNA in mammalian cells: the organization of integrated adenovirus DNA sequences // Curr. Top. Microbiol. Immunol.–1982.–**101**.–P. 128–188.
  23. Kuhlmann J., Doerfler W. Loss of viral genomes from hamster tumor cells and nonrandom alterations in patterns of methylation of integrated adenovirus type 12 DNA // J. Virol.–1983.–**147**.–P. 631–636.
  24. Schultz H. M., Doerfler W. Detection of cellular DNA at site of viral DNA insertion in the adenovirus type 12-induced mouse tumor CBA-12-1-T // Nucl. Acids Res.–1984.–**12**.–P. 4959–4976.
  25. Лукаш Л. Л., Лукаш С. И., Задорожный В. Ф. Математическая модель динамики мутагенеза, индуцированного фрагментом ДНК аденовируса, в клетках млекопитающих // Биополимеры и клетка.–1996.–**12**, № 3.–С. 7–16.
  26. Газарян К. Г. Микроинъекции генов в зиготы и эмбрионы: интеграция в геном и генетические эффекты // Успехи соврем. генетики.–1985.–№ 13.–С. 75–88.
  27. Тарантул В. З., Кузнецова Е. Д., Газарян К. Г. Характеристика участков генома трансгенных животных, прилегающих к интегрированным последовательностям чужеродной ДНК // Молекуляр. биология.–1989.–**23**, № 4.–С. 1036–1040.
  28. Набировкин С. Д., Габитова А. Б., Бегетова Т. С., Газарян К. Г. Индукция нестабильных мутаций у *Drosophila melanogaster* микроинъекцией ДНК онкогенных вирусов в полярную плазму эмбрионов. Малигнизующий эффект онковирусных ДНК // Молекуляр. биология.–1991.–**24**, № 5.–С. 783–789.
  29. Gordon J. W. A foreign dihydrofolate reductase gene in transgenic mice acts as dominant mutation // Mol. Cell. Biol.–1986.–**6**.–P. 2158–2167.
  30. Akif'ev A. P. Mechanisms of the production of chromosomal aberrations in eukaryotic cells // Physiol., General. Biol. Rev.–1995.–**10**.–P. 1–56.
  31. Томили Н. В. Генетическая стабильность клетки.–Ленинград: Наука, 1983.–196 с.
  32. Palmiter R. D., Brinster R. L., Hammer R. E. Dramatic growth of mice develop from eggs microinjected with methallothionein-growth hormone fusion genes // Nature.–1982.–**300**.–P. 611–615.
  33. Wilkie T. M., Palmiter R. D. Analysis of the integrant in Myk-103 transgenic mice in which males fail to transmit the integrant // Mol. Cell. Biol.–1987.–**7**.–P. 1646–1655.
  34. Harbers K., Kuehn M., Delins H., Jaenish R. Insertion of gene leads to embryonic lethal mutation in mice // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.–1984.–**81**.–P. 1504–1508.
  35. Hanahan D. Heritable formation of pancreatic B-cell tumors in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes // Nature.–1985.–**315**.–P. 115–122.
  36. Бобрышева И. В., Барон Е. М., Варшавер Н. Б. Плазмида *pSVc-тус-1* индуцирует генные мутации и хромосомные aberrации в культивируемых клетках китайского хомячка // Цитология и генетика.–1993.–**27**, № 4.–С. 51–56.
  37. Бобрышева И. В., Варшавер Н. Б. Характеристика мутантов, индуцированных онкогеном *c-Ha-ras1*, и природа мутагенного действия онкогена // Генетика.–1995.–**31**, № 12.–С. 1598–1604.
  38. Шахмурадов И. А., Капитонов В. В., Колчанов Н. А., Омелянчук Л. В. Эволюция повторов Alu: динамика распространения в геноме // Генетика.–1989.–**25**, № 9.–С. 1682–1689.
  39. Лукаш Л. Л., Швачко Л. П., Костецкая Е. В. Мобильные генетические элементы в процессах мутагенеза, рекомбинации и злокачественной трансформации клеток человека // Биополимеры и клетка.–1996.–**12**, № 2.–С. 7–19.
  40. Рубцов Н. Б., Бородин П. М. Эволюция хромосом: от А до В и обратно // [http://vivovoco.rsl.ru/VV/JOURNAL/NATURE/03\\_02/NATI.HTM](http://vivovoco.rsl.ru/VV/JOURNAL/NATURE/03_02/NATI.HTM). – Н. Б. Рубцов // Природа.–2002.–№ 3.
  41. Акифьев А. П., Худой Г. А. Мутагенез и генетический гомеостаз у высших организмов // Вестн. РАМН.–1993.–№ 1.–С. 3–9.
  42. Акифьев А. П., Гришанин А. К., Дегтярев С. В. Диминуция хроматина – ключевой процесс для объяснения парадокса размера генома эукариот и некоторых механизмов генетической изоляции // Генетика.–2002.–**38**.–С. 595–606.
  43. Гришанин А. К., Шеховцов А. К., Бойкова Т. В., Акифьев А. П., Жимулев И. Ф. Проблема диминуции хроматина на рубеже XX и XXI веков // Цитология.–2006.–**48**, № 5.–С. 379–397.