

О.В. ЧЕРЕВАТОВ, Р.А. ВОЛКОВ

Чернівецький національний університет ім. Юрія Федьковича
E-mail: ra.volkov@gmail.com

ОРГАНІЗАЦІЯ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК *MELITAEA TRIVIA*



В геномі східноєвропейського метелика *Melitaea trivialis* виявлено два різних варіанти повторюваної одиниці 5S рДНК. Обидва варіанти повторів містять ділянку довжиною 120 п.н., що кодує 5S рРНК, проте характеризуються різною довжиною міжгенних спейсерів – 78 та 125 п.н. відповідно. Рівень подібності між двома варіантами 5S рДНК становить 43,9–45,5 % для послідовності міжгенних спейсерів, тоді як кодуючі послідовності є більш консервативними. У складі міжгенних спейсерів були виявлені мікросателітні послідовності, які імовірно зазнавали ампліфікації впродовж еволюції 5S рДНК.

Вступ. Однією із популярних моделей, що використовуються при вивченні закономірностей молекулярної еволюції у еукаріот, є гени, які кодують 5S рРНК (5S рДНК). 5S рДНК належить до класу помірно повторюваних послідовностей, що розташовуються у вигляді тандемно організованих кластерів в одному або декількох хромосомних локусах. Кожна повторювана одиниця 5S рДНК складається із кодуючої ділянки та міжгенного спейсера (МГС). Організація 5S рДНК добре вивчена у рослин [1–3], де ця ділянка геному широко застосовується для цілей молекулярної таксономії. Проте у безхребетних тварин, зокрема у комах, 5S рДНК все ще залишається майже недослідженою. Серед лускокрилих (Lepidoptera) організація 5S рДНК була описана раніше лише для одного модельного виду – шовкопряду (*Bombyx mori*) [4]. Попередні дослідження нашої лабораторії виявили істотну мінливість 5S рДНК у представників різних родин Lepidoptera [5], що вказує на необхідність більш детального вивчення організації та еволюції цієї ділянки геному у лускокрилих.

Родина *Nymphalidae*, до якої входять декілька тисяч видів, є однією із найбільших родин серед булавовусих лускокрилих. Рід *Melitaea* охоплює близько 12 видів у Східній Європі. Для видів цього роду характерна висока фенотипова мінливість, що робить їх цікавим об'єктом для вивчення процесів мікроеволюції. В останні десятиліття представники роду піддаються інтенсивним дослідженням, зокрема на молекулярному рівні [6–8]. Також рід може бути використаний як модель для вивчення закономірностей молекулярної еволюції окремих генів і мультигенних родин, а також визначення філогенетичних зв'язків між видами. У представлений роботі наведено результати аналізу молекулярної організації 5S рДНК шашечниці степової (*Melitaea trivialis* Den. & Schiff.) та обговорюються можливі механізми молекулярної еволюції 5S рДНК лускокрилих.

Матеріали і методи. Матеріалом для дослідження були метелики виду *M. trivialis*, відловлені на території с. Тимків (Новоушицький р-н Хмельницької обл.). Загальну ДНК екстрагували з тіла метелика згідно із стандартним протоколом; як детергент використовували додецилсульфат натрію [9, 10].

Для ампліфікації повторюваної ділянки 5S рДНК методом полімеразної ланцюгової реак-

ції (ПЛР) використовували пару праймерів RV0803 (5'-catagcggcccgctggctcagctacttgatgggtga-3') та RV0804 (5'-cattgcggccgcttgctgacttcggtgatcgga-3'), які були розроблені нами раніше [5]. Ці праймери є комплементарними до ділянки, що кодує 5S рРНК у декількох видів членистоногих, та містять на 5'-кінці додатковий сайт впізнавання рестриктази *NotI*, який використовували для подальшого клонування ПЛР-продуктів. Місце посадки праймерів було обрано так, щоб досягти ампліфікації повного МГС та фрагментів кодуєчих ділянок, що межують із ним, за виключенням частини кодуєчої ділянки між 5'-кінцями використаних праймерів (рисунок). Згідно з розрахунками розмір фрагменту, який має залишатись неампліфікованим, становить лише 8 п.н.

Кількість ДНК для проведення ПЛР становила 50 нг на реакцію. Ампліфікацію ДНК проводили в середовищі такого складу: 1 × буфер для ПЛР (PCR-buфер, «Qiagen», США), MgCl₂ – 2 мМ, суміш dNTP – 0,2 мМ кожного, праймери – 1 мМ кожного, ДНК-полімераза (HotStart-Taq, «Qiagen», США) – 1 од. активності на реакцію. Загальний об'єм реакційної суміші складав 20 мкл. ПЛР здійснювали з використанням приладу MiniCycler («MJ Research Inc.», США) за такою програмою: 1) початкова активація ДНК-полімерази – 95 °С, 15 хв; 2) денатурація ДНК – 94 °С, 45 с; 3) гібридизація праймерів – 55 °С, 1 хв; 4) синтез ДНК – 72 °С, 2 хв; 5) закінчення ампліфікації – 72 °С, 8 хв; 6) припинення реакції – 4 °С. Загальна кількість циклів ампліфікації – 32. Для аналізу результатів ПЛР використовували електрофорез у 2%-ному агарозному гелі.

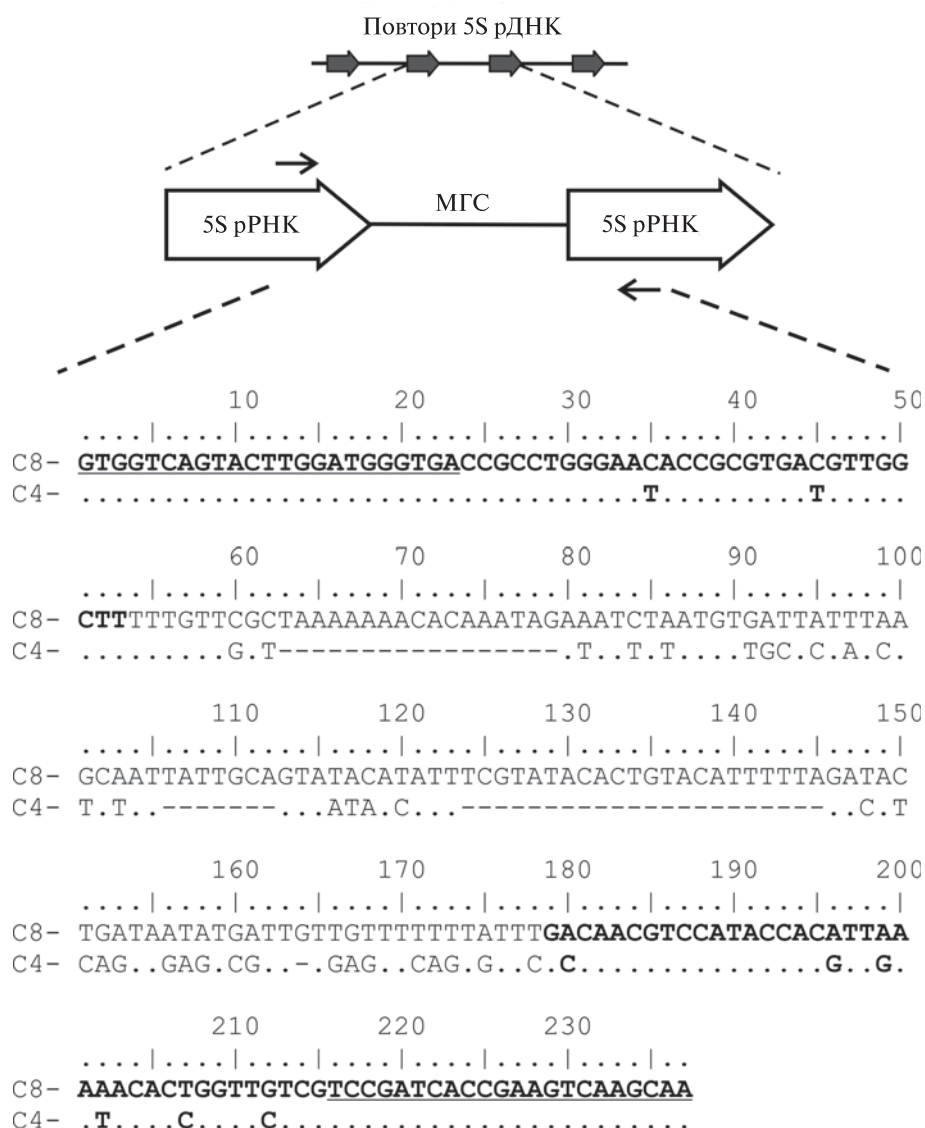
Отримані ПЛР-продукти обробляли рестриктазою *NotI* та лігували по комплементарних липких кінцях у сайт *Eco52* плазміди рLitmus 38 з використанням T4 ДНК-лігази («Fermentas», Литва). Трансформацію компетентних клітин лінії *Escherichia coli* XL-blue проводили методом електропорації з використанням приладу *E. coli* Pulser («BioRad», США). Присутність вставки у складі рекомбінантних плазмід перевіряли методом *blue-white colony selection* та підтверджували рестриктазним картуванням. Плазміди виділяли методом лужного лізису [9]. Ферментативні реакції проводили згідно з рекомендаціями фірми-постачальника.

Вставки 5S рДНК відібраних клонів секвенували з використанням Big Due Terminator Cycle Sequencing Kit на секвенаторі ABI Prism 310 («PE Applied Biosystems», США). Первинну обробку та аналіз отриманої первинної нуклеотидної послідовності проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакету програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR [11]. Пошук послідовностей у Genbank здійснювали за допомогою програми BLAST [12].

Результати досліджень та їх обговорення. Електрофоретичне розділення отриманих продуктів ПЛР показало, що ампліфікація повторюваної ділянки 5S рДНК *M. trivia* призводить до утворення трьох фрагментів ДНК: основного – довжиною близько 230 п.н. та двох міnorних – близько 1000 п.н. та менше 100 п.н. Отриману суміш ПЛР-продуктів було клоновано у бактеріальний вектор без попередньої селекції за розміром.

За результатами скринінгу ідентифіковано 12 колоній трансформантів білого кольору, з яких було виділено плазміди для подальшого картування. Обробка цих плазмід рестриктазою *Eco52* призводила до утворення двох фрагментів ДНК. Фрагмент більшої довжини в усіх плазмід мав розмір приблизно 2800–2900 п.н., що відповідає розміру векторної плазміди рLitmus 38, тоді як фрагмент меншої довжини, що відповідає вставці, мав різний розмір у різних клонів. Загалом було ідентифіковано 8 плазмід, що містили вставку довжиною близько 250 або 200 п.н., та 4 плазміди довжиною менше 100 п.н., що відповідає довжинам ПЛР-продуктів, які використовували при клонуванні. Для подальшого секвенування було відібрано три рекомбінантні плазміди (рMetr-C8, -C9, -C12), що містили вставку розміром близько 250 п.н., одну (рMetr-C4) – 200 п.н. та дві (рMetr-C5, -C7) – менше 100 п.н.

Аналіз отриманих результатів показав, що вставки всіх досліджених плазмід містять на обох кінцях послідовності праймерів, використаних при проведенні ПЛР. Порівняння отриманих послідовностей виявило різницю між цими клонами за нуклеотидною послідовністю. Три клони – рMetr-C8, -C9 та -C12 – містили вставку довжиною 237 п.н., клон рMetr-C4 – 190 п.н., а клони рMetr-C5 та -C7 – лише 46 п.н., яка складається тільки з послідовності двох праймерів.



Порівняння первинної нуклеотидної послідовності клонів рМetr-C4 та -C8, що містять послідовності короткого та довгого варіантів 5S рДНК *M. trivialis*. Жирним шрифтом виділено ділянку, що кодує 5S рРНК. Підкреслено послідовність праймерів, використаних для ПЛР

За результатами вирівнювання послідовностей було розраховано, що рівень подібності клонів рМetr-C8, -C9 та -C12 між собою становить 99,2–99,6 %. При цьому послідовність клону рМetr-C8 виявилась ідентичною із консенсусною послідовністю, а клони рМetr-C9 та -C12 відрізнялись від неї лише однією транзицією кожен. Ці результати свідчать про високий рівень гомогенізації індивідуальних повторів 5S рДНК у геномі *M. trivialis*. На противагу цьому

клон рМetr-C4 показав значно нижчий рівень подібності по відношенню до клонів рМetr-C8, -C9 та -C12 – 74,6–75,1 %.

Для визначення границь між кодуючою ділянкою та МГС отримані послідовності порівняли із послідовністю 5S рДНК шовкопряда *B. mori* (єдиного виду метеликів, для якого на сьогодні у базі даних Genbank наявна послідовність повного повтору 5S рДНК – реєстраційний номер L00335 [4]) та із послідов-

ностями 5S рРНК *Philosamia cynthia* (K02354, X13039 [13, 14]) і *Antheraea pernyi* (X13035, X13036 [14]). Було встановлено, що вставки всіх чотирьох секвенованих нами клонів містять по краях фрагменти кодуєчої ділянки розміром 53 п.н. (враховуючи послідовність праймера RV0803) та 59 п.н. (враховуючи послідовність праймера RV0804) (рисунок). Зважаючи на те, що центральна частина кодуєчої ділянки розміром 8 п.н. залишається неампліфікованою із застосуванням використаних нами праймерів, можна підрахувати, що загальний розмір ділянки, яка кодує 5S рРНК у *M. trivia*, становить 120 п.н., що збігається із довжиною цієї ділянки у багатьох інших тварин [15–17].

Для оцінки ступеня мінливості кодуєчої ділянки 5S рРНК було підраховано кількість замін нуклеотидів, що відрізняють отримані нами клони *M. trivia* як між собою, так і від 5S рРНК інших видів метеликів. При цьому до уваги приймали лише фрагменти кодуєчої ділянки (67 п.н. назагал), які знаходились за межами послідовностей праймерів, використаних для ПЛР. Виявилось, що в межах цієї ділянки клони рМетр-С8 та -С9 є ідентичними між собою, а клон рМетр-С12 відрізняється від них лише транзицією С→Т. На відміну від цього у клоні рМетр-С4 в межах кодуєчої ділянки виявлено 8 замін нуклеотидів (5 транзицій та 3 трансверсії), які відрізняють його від клонів рМетр-С8, -С9 і -С12. Отже, наявні результати вказують на присутність у геномі *M. trivia* як мінімум двох варіантів повторів 5S рДНК. Для порівняння вкажемо, що послідовності 5S рРНК *B. mori* відрізняються між собою на 3–4 точкові заміни нуклеотидів. В цілому складається враження, що для метеликів є притаманним внутрішньогеномний поліморфізм за послідовністю кодуєчої ділянки 5S рРНК.

Порівняння кодуєчої ділянки 5S рРНК *M. trivia* та видів, що належать до різних родин Lepidoptera (табл. 1), показало, що обидва варіанти 5S рДНК *M. trivia* в однаковій мірі відрізняються від 5S рРНК *Antheraea pernyi* та *Philosamia cynthia*, проте клон рМетр-С4 виявився більш подібним до 5S рРНК *B. mori*, ніж клон рМетр-С8.

Добре відомо, що у еукаріот, крім функціонально повноцінних повторів 5S рДНК, можуть існувати так звані нефункціональні псевдогени,

Таблиця 1
Кількість мутацій у ділянці, що кодує 5S рРНК у різних видів метеликів

<i>Melitaea trivia</i>	<i>Antheraea pernyi</i>	<i>Philosamia cynthia</i>	<i>Bombyx mori</i>
Клон рМетр-С4	4	5	3–4
Клон рМетр-С8	3	6	8–10

Примітка. Наведено кількість нуклеотидних замін у двох фрагментах кодуєчої ділянки загальним розміром 67 п.н. Для розрахунків було використано послідовності клонів рМетр-С4 та -С8. Для *B. mori* при порівнянні було використано шість послідовностей кодуєчої ділянки, які наявні у Генбанку.

які часто знаходяться в іншому місці на хромосомах. Псевдогени як правило еволюціонують із більшою швидкістю, тобто демонструють підвищений темп накопичення нуклеотидних замін та делецій. Зокрема характерним є втрата фрагментів ділянки, що кодує 5S рРНК [15, 18, 19]. Разом з тим як у тварин, так і у рослин описано випадки наявності у геномі декількох функціонально активних класів 5S рДНК (*Xenopus*, *Arabidopsis*), які є транскрипційно активними на різних етапах онтогенезу [20–22]. Оскільки в усіх чотирьох секвенованих нами клонах не виявлено делецій у межах кодуєчої ділянки, можна припустити, що в геномі *M. trivia* присутні два функціонально активних варіанти повторів 5S рДНК – довгий (клони рМетр-С8, -С9, -С12) та короткий (клон рМетр-4), хоча для остаточного з'ясування цього питання необхідні додаткові експерименти.

Визначення границь кодуєчої ділянки дозволило встановити, що довжина МГС становить 125 п.н. для клонів рМетр-С8, -С9, -С12. Це відповідає загальній довжині повторюваної одиниці 5S рДНК у 245 п.н., що є близьким до довжини повтору 5S рДНК деяких інших видів безхребетних тварин, яка знаходиться в межах 303–469 п.н. [17, 23]. Довжина МГС у клоні рМетр-С4 становить лише 78 п.н., що викликає декількома делеціями (рисунок).

Застосування для вирівнювання послідовностей методу J. Hein (Gap penalty = 11; gap length penalty = 3 [11]) дозволило встановити, що в межах МГС рівень подібності між клонами рМетр-С8, -С9 та -С12 становить 99,2–100 %, а між цими трьома клонами та клоном

Таблиця 2
Розповсюдженість тринуклеотидних мотивів у МГС метеликів

Тринуклеотидний мотив	<i>M. trivia</i>		<i>B. mori</i>
	довгий варіант МГС (клон рМetr-C8)	короткий варіант МГС (клон рМetr-C4)	
ATT	7	1	8
ATA	7	2	5
ATC	1	3	5
ATG	1	2	1
AAT	—	—	3
ACT	1	—	—
AGT	1	3	1
CTT	—	—	3
GTT	3	4	2
TTT	3	2	3

рМetr-C4 – 43,9–45,5 %. Рівень подібності між чотирма секвенованими нами клонами та МГС *B. mori* лежить в межах від 48,8 (C9) до 70,1 % (C4). В цілому ці результати підтримують уявлення про високу швидкість молекулярної еволюції МГС.

Добре відомо, що основну роль у транскрипції 5S рДНК у еукаріот відіграє внутрішній контрольний регіон (internal control region, ICR), який знаходиться в межах кодуючої ділянки. Найбільш детально досліджений ICR у 5S рДНК *Xenopus* складається з трьох елементів – так званих боксів А і С та проміжного елемента, що знаходиться між ними [24, 25]. ICR є мішенню для зв'язування транскрипційних факторів ТFIIIA, ТFIIIV та ТFIIIC, приєднання яких до 5S рДНК є передумовою для подальшого зв'язування РНК-полімерази III [26–28]. Послідовності, що знаходяться у МГС *Xenopus* у позиції від –26 до –11 п.н. від початку кодуючої ділянки, не є необхідними для ініціації транскрипції, але вони приймають участь у модуляції транскрипції, що пов'язано із приєднанням до цієї ділянки як мінімум двох білкових факторів [29]. У ссавців ефективна транскрипція 5S рДНК залежить від 12-нуклеотидного мотиву GGCTCTT-GGGGC, який зазвичай розташований у МГС на відстані у 30 п.н. перед кодуючою ділянкою [30].

В 5S рДНК *B. mori* на відміну від *Xenopus* фрагмент МГС на відстані від –30 до –17 п.н. від початку кодуючої ділянки є абсолютно необхідним для ініціації транскрипції [4]. Зокрема регуляторну функцію пов'язують з мотивом ТАТАТА, який присутній у цій зоні. Детальне вивчення транскрипції 5S рДНК у *Drosophila melanogaster* довело існування п'яти ICR, чотири з яких знаходяться у кодуючій ділянці, а один – у МГС в позиції від –39 до –26 п.н. Подібно до *B. mori* у цій ділянці знайдено мотив ТАТАА [31].

Аналіз секвенованих нами клонів показує, що обидва варіанти 5S рДНК *M. trivia* помітно відрізняються за послідовністю МГС як від *B. mori*, так і між собою. Довгий варіант містять у МГС ТАТА-подібну послідовність ТААТАТ у положенні від –25 до –20, тоді як у короткого варіанту 5S рДНК у цій позиції знаходиться мотив TAGAGT. Отже, отримані результати наводять на думку, що регуляторні сигнали, які знаходяться у МГС, можуть істотно відрізнятися як у різних видів метеликів, так і між різними варіантами рДНК в межах одного геному.

На границі між ділянкою, що кодує 5S рРНК та МГС у *M. trivia*, знаходиться послідовність ТТТТТГТТ, а у *B. mori* – ТТТТТТТТ. Імовірно, ці послідовності є сигналом термінації для РНК-полімерази III, оскільки відомо, що кластери залишків Т мають таку функцію у 5S рДНК інших еукаріот [22].

В наших попередніх дослідженнях 5S рДНК *Satyryus dryas* було встановлено, що у МГС цього метелика присутні ділянки (так звані інсерційні елементи), які подібні до диспергованих послідовностей з геномів різних видів лускокрилих [5]. Для перевірки, чи послідовність МГС *M. trivia* також містить інсерційні елементи, ми провели її зіставлення із послідовностями, депонованими у Генбанку, проте на відміну від *Satyryus dryas* статистично достовірної подібності виявлено не було.

Аналіз отриманих нами послідовностей показує, що МГС як довгого, так і короткого варіантів 5S рДНК *M. trivia* містять численні тринуклеотидні мотиви АТТ та мотиви, які відрізняються від вказаного лише на одну нуклеотидну заміну (табл. 2). Такі ж мотиви присутні і в МГС *B. mori*, незважаючи на порівняно низький рівень подібності цієї ділянки з МГС

M. trivia. Раніше було встановлено [32], що серед мікросателітних послідовностей у геномі *B. mori* найбільш розповсюдженими є АТ-багаті мікросателіти, особливо послідовності АТТ, які також найчастіше зустрічаються у досліджених нами МГС 5S рДНК. Крім того відомо, що мікросателітні послідовності частіше зустрічаються у спейсерних, ніж у кодуючих ділянках [33]. Отже, складається враження, що значна частина МГС у *M. trivia* збудована з мікросателітних повторів. Раніше серед безхребетних тварин мікросателітні послідовності було знайдено у МГС молюсків роду *Crassostrea* [34].

Вважається, що першим кроком у появі нового мікросателіта є випадкова дуплікація короткого (1–6 п.н.) мотиву [35]. Наступна ампліфікація такої дуплікованої ділянки відбувається шляхом «прослизання нитки» під час реплікації (slippage of replication), що призводить до виникнення набору з декількох копій тандемно організованих повторів. В подальшому у такій мікросателітній ділянці відбуваються мутації (вставки/делеції та заміни нуклеотидів). У МГС *M. trivia* тринуклеотидні мотиви (наприклад, АТТ) зустрічаються не частіше, ніж дві копії підряд, проте наявні послідовності, що виникли, імовірно, внаслідок інсерції декількох нуклеотидів у набір мікросателітних повторів, наприклад (АТТ)₂ТААГСА (АТТ)₂. У МГС *B. mori* присутні більш досконалі мікросателітні ділянки, наприклад послідовність (АТС)₄АТТ. Відповідно, більша довжина МГС *B. mori* (155 п.н.) може бути пов'язана з більшою інтенсивністю процесів ампліфікації мікросателітних повторів впродовж еволюції цього виду. Секвенування 5S рДНК представників інших таксономічних груп метеликів дозволить у майбутньому детальніше описати молекулярну еволюцію цієї ділянки геному.

O.V. Cherevatov, R.A. Volkov

ORGANIZATION OF 5S RIBOSOMAL DNA OF *MELITAEA TRIVIA*

Two length variants of 5S rDNA repeated units were detected in the genome of East European butterfly *Melitaea trivia*. Both repeat variants contain the 5S rRNA coding region of the same length of 120 bp, but possess the intergenic spacer region (IGS) of different size, 78 and 125 bp, respectively. The level of sequence similarity between the two 5S rDNA variants amounts to 43,9–

45,5 % in the IGS, whereas the coding region appears to be more conservative. In the IGS, microsatellite sequence motives were found; amplification of these motives could be involved in the evolution of the 5S rDNA.

O.V. Cherevatov, R.A. Volkov

ОРГАНИЗАЦИЯ 5S РИБОСОМНОЙ ДНК *MELITAEA TRIVIA*

В геноме восточноевропейской бабочки *Melitaea trivia* обнаружены два варианта повторяющегося участка 5S рДНК. Оба варианта повторов содержат участки длиной 120 п.н., кодирующие 5S рРНК, при этом они отличаются длиной межгенных спейсеров – 78 и 125 п.н. соответственно. Уровень сходства двух вариантов 5S рДНК составляет 43,9–45,5 % для последовательностей межгенных спейсеров, тогда как кодирующие участки являются более консервативными. В последовательности межгенных спейсеров были обнаружены микросателлитные последовательности, которые, по-видимому, подвергались амплификации на протяжении эволюции 5S рДНК.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Volkov R.A., Zanke C., Panchuk I.I., Hemleben V. Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. *Petota*): application for molecular phylogeny and breeding // Theor. Appl. Genet. – 2001. – **103**. – P. 1273–1282.
2. Singh D., Ahuja P.S. 5S rDNA gene diversity in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) and its use for variety identification // Genome. – 2006. – **49**. – P. 91–96.
3. Grimm G.W., Denk T. The reticulate origin of modern plane trees (*Platanus*, Platanaceae): A nuclear marker puzzle // Taxon. – 2010. – **59**, № 1. – P. 134–147.
4. Morton G., Sprague K. In vitro transcription of a silkworm 5S RNA gene requires an upstream signal // Genetics. – 1984. – **81**. – P. 5519–5522.
5. Cherevatov O.V., Volkov R.A. Поліморфізм 5S рДНК комах ряду Lepidoptera // Біол. системи. – 2009. – **1**. – С. 7–10.
6. Sun S., Asling B., Faye I. Organization and expression of the immunoresponsive lysozyme gene in the giant silk moth, *Hyalophora cecropia* // J. Biol. Chem. – 1991. – **266**, № 10. – P. 6644–6649.
7. Zimmerman M., Wahlberg N., Descimon H. Phylogeny of euphidrias checkerspot butterflies (Lepidoptera: *Nymphalidae*) based on mitochondrial DNA sequence data // Ann. Entomol. Soc. Amer. – 2000. – **93**, № 3. – P. 347–355.
8. Lukhtanov V.A., Vila R., Kandul N.P. Rearrangement of the *Agrodiaetus dolus* species group (Lepidoptera, *Lycaenidae*) using a new cytological approach and molecular data // Insect. Syst. Evol. – 2006. – **37**. – P. 325–334.

9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. — М.: Мир, 1984. — 479 с.
10. Панчук И.И., Волков Р.А. Практикум з молекулярної генетики. — Чернівці : Рута, 2007. — 120 с.
11. DNASTAR, 1998. MegAlign 3.18 edit. Software distributed by DNASTAR Inc., Madison, WI, USA.
12. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs // Nucl. Acids Res. — 1997. — **25**. — P. 3389–3402.
13. Xian-Rong G., Nicoghosian K., Cedergren R.J. 5S RNA sequence from the *Philosamia* silkworm: evidence for variable evolutionary rates in insect 5S RNA // Nucl. Acids Res. — 1982. — **10**. — P. 5711–5716.
14. Qi G.R., Cao G.J., Jiang P., Feng X.L., Gu X.R. Studies on the sites expressing evolutionary changes in the structure of eukaryotic 5S ribosomal RNA // J. Mol. Evol. — 1988. — **27**. — P. 336–340.
15. Suzuki H., Moriwaki K., Sakura S. Sequences and evolutionary analysis of mouse 5S rDNAs // Mol. Biol. Evol. — 1994. — **11**. — P. 704–710.
16. Robles F., Herrán R., Ludwig A., Rejon C.R., Rejon M.R., Garrido-Ramos M.A. Genomic organization and evolution of the 5S ribosomal DNA in the ancient fish sturgeon // Genome. — 2005. — **48**. — P. 18–28.
17. Vierna J., Gonzalez-Tizon A.M., Martinez-Lage A. Long-term evolution of 5S ribosomal DNA seems to be driven by birth-and-death processes and selection in *Ensis* razor shells (Mollusca: *Bivalvia*) // Biochem. Genet. — 2009. — **47**. — P. 635–644.
18. Little R.D., Braaten D.C. Genomic organization of human 5S rDNA and sequence of one tandem repeat // Genomics. — 1989. — **4**. — P. 376–383.
19. Drouin G. Expressed retrotransposed 5S rRNA genes in the mouse and rat genomes // Genome. — 2000. — **43**. — P. 213–215.
20. Ford S.A. Different sequences for 5S RNA in kidney cells and ovaries of *Xenopus laevis* // Nature. New Biol. — 1973. — **241**. — P. 7–12.
21. Peterson R.C., Doering J.L., Brown D.D. Characterization of two *Xenopus* somatic 5S DNAs and one minor oocyte-specific 5S DNA // Cell. — 1980. — **20**. — P. 131–141.
22. Douet J., Tourmente S. Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis* // Heredity. — 2007. — **99**. — P. 5–13.
23. Keller I., Chintauan-Marquier I.C., Veltsos P., Nichols R.A. Ribosomal DNA in the grasshopper *Podisma pedestris*: escape from concerted evolution // Genetics — 2006. — **174**. — P. 863–874.
24. McConkey G.A., Bogenhagen D.F. Transition mutations within the *Xenopus borealis* somatic 5S RNA gene can have independent effects on transcription and TFIIIA binding // Mol Cell Biol. — 1987. — **7**. — P. 486–494.
25. Pieler T., Hamm J., Roeder R.G. The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing // Cell. — 1987. — **48**. — P. 91–100.
26. Lassar A.B., Martin P.L., Roeder R.G. Transcription of class III genes: formation of preinitiation complexes // Science. — 1983. — **222**. — P. 760–768.
27. Bieker J.J., Martin P.L., Roeder R.G. Formation of a rate-limiting intermediate in 5S RNA gene transcription // Cell. — 1985. — **40**. — P. 119–127.
28. Setzer D., Brown D. Formation and stability of the 5S RNA transcription complex // J. Biol. Chem. — 1985. — **260**, № 4. — P. 2483–2492.
29. Oei S., Pieler T. Transcription stimulatory factor binds to the upstream region of *Xenopus* 5S RNA and tRNA genes // J. Biol. Chem. — 1990. — **265**. — P. 7485–7491.
30. Nielsen J.N., Hallenberg C., Frederiksen S., Sørensen P.D., Lomholt B. Transcription of human 5S rRNA genes is influenced by an upstream DNA sequence // Nucl. Acids Res. — 1993. — **21**. — P. 3631–3636.
31. Sharp S., Garcia A. Transcription of the *Drosophila melanogaster* 5S RNA gene requires an upstream promoter and four intragenic sequence elements // Mol. Cell. Biol. — 1988. — **8**. — P. 1266–1274.
32. Prasad D., Muthulakshmi M., Madhu M. Archak S., Mita K., Nagaraju J. Survey and analysis of microsatellites in the silkworm, *Bombyx mori*: frequency, distribution, mutations, marker potential and their conservation in heterologous species // Genetics. — 2005. — **169**. — P. 197–214.
33. Toth G., Gaspari Z., Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis // Gen. Res. — 2000. — **10**. — P. 967–981.
34. Cross I., Rebordinos L. 5S rDNA and U2 snRNA are linked in the genome of *Crassostrea angulata* and *Crassostrea gigas* oysters: does the (CT)_n(GA)_n microsatellite stabilize this novel linkage of large tandem arrays? // Genome. — 2005. — **48**. — P. 1116–1119.
35. Zhu Y., Strassmann E., Queller D. Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites // Gen. Res. — 2000. — **76**. — P. 227–236.

Надійшла 31.08.10