

ПРОБЛЕМА ДИМИНУЦИИ ХРОМАТИНА НА РУБЕЖЕ XX И XXI ВЕКОВ

© А. К. Гришанин,¹ А. К. Шеховцов,² Т. В. Бойкова,³
А. П. Акифьев,¹ И. Ф. Жимулев²

¹ Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва, и ² Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск; электронный адрес: grishanin@vigg.ru

В обзоре дано описание диминуций хроматин (ДХ) у аскарид, миксин, двукрылых насекомых и циклопов, а также процессов реорганизации генома при созревании макронуклеусов у гипотрихид. Кратко рассмотрено также близкое, вероятно, к ДХ явление полиплоидного сброса. Показано, что феномен ДХ может быть использован для анализа проблемы избыточной ДНК у эукариот, поскольку в ряде случаев однозначно свидетельствует о том, что поиски функций избыточной (для соматических клеток) ДНК следует вести в линии зародышевых клеток. Анализ молекулярной структуры ДНК, элиминируемой в ходе ДХ, обнаружил высокую упорядоченность ее организации, в частности наличие консервативных некодирующих последовательностей значительной протяженности. Мы полагаем, что в этой упорядоченности как раз и хранится ключ к пониманию функций избыточной ДНК, которые могут оказаться неординарными.

Ключевые слова: диминуция хроматина, элиминация хромосом, реорганизация генома, избыточная ДНК.

Принятые сокращения: ДХ — диминуция хроматина, РХР — районы хромосомных разрывов, Ма — макронуклеус, Ми — микронуклеус, ВЭП — внутренние элиминируемые последовательности, ССМ — сохраняемые сегменты макронуклеуса, эДНК — элиминируемая ДНК, МКМ — минимальная критическая масса хромосом, К-хромосомы — хромосомы зародышевой линии, S-хромосомы — хромосомы соматической линии, LTR — Long Terminal Repeats.

Диминуция хроматина (ДХ) — общее название клеточных генетических процессов, в ходе которых у многоклеточных животных (в основном беспозвоночных), а также у гипотрихид родов *Stylonychia*, *Euplotes* и *Oxytricha* соматические клетки или ядра (Ma) теряют большую или меньшую часть генетического материала, присутствующего в клетках зародышевой линии (germ line). Явление ДХ было открыто и впервые детально изучено цитологическими методами у аскарид в конце 80-х годов XIX в. выдающимся немецким биологом Т. Бовери (Boveri, 1887). К этому времени митоз был известен всего 5—10 лет, а термин «хромосомы» был введен Вальдейером через 1 год после первой публикации Бовери о ДХ. В эти же годы был открыт мейоз.

Значительно позднее были описаны такие клеточные генетические процессы, как рекомбинация, репликация, репарация ДНК, а также транскрипция и обратная транскрипция.

Все эти процессы сегодня изучены методами молекулярной биологии, т. е. самыми современными методами, несравненно более детально, чем ДХ (исключение представляет сопровождающая ДХ реорганизация генома при созревании Ma у инфузорий).

Причин такого отставания в исследовании ДХ, по-видимому, несколько. На первое место сейчас с позиций исторической перспективы мы бы поставили ошибочную гипотезу Вейсмана (Weismann, 1892; см. также: Tobler, 1986), согласно которой явление ДХ определяет

направление дифференцировки клеток. По мнению Вейсмана, из разных бластомеров аскарид в процессе ДХ удаляются разные гены, и таким образом ДХ формирует генетический портрет тканевых клеток. Из одних бластомеров удаляются гены (детерминанты, по терминологии Вейсмана), кодирующие, допустим, гемоглобин, а из других — все гены, связанные с мышечным сокращением, и т. д. Полный набор генов сохраняется только в клетках зародышевой линии (зародышевой плазмы), которая представляет собой связующее генетическое звено между поколениями организмов, притом с соматическим окружением данной особи информационно фактически не связанным. Все тело особи (сома) в этом случае представляет собой лишь вместилище «зародышевой плазмы». Возможно, что сегодня такая трактовка выглядит несколько упрощенной, но она достаточно точно отражает суть гипотезы Вейсмана.

Слишком большие надежды возлагались на эту гипотезу биологами, поэтому так очевидно было их разочарование в самой общебиологической роли ДХ. У абсолютного большинства видов ДХ отсутствует, и размеры геномов соматических клеток и клеток зародышевой линии совпадают в пределах точности измерений. Поэтому ДХ стала представляться скорее маргинальным явлением в эволюции, тем более что до сих пор никто не мог дать общеприемлемого ответа на вопрос о том, зачем вообще нужна ДХ и почему у одних видов аскарид или циклопов она присутствует в онтогенезе, тогда как у

других, порой почти неотличимых морфологических видов, ДХ нет (Shapiro, 1992).

Интерес к ДХ как к необычному генетическому феномену стал возрождаться во второй половине XX в. благодаря блестящим цитологическим работам Берманн (Германия) (Beer mann, 1959, 1966, 1977, 1984; Beer mann, Meyer, 1980) на циклопах и изучению ДХ у аскарид, проводимых школой Тоблера и Мюллера в Швейцарии (Müller et al., 1982, 1986, 1991; Tobler et al., 1985, 1992; Tobler, 1986; Magnenat et al., 1999; Müller, Tobler, 2000).

Подлинной сенсацией стало открытие явления глубокой реорганизации генетического аппарата Ма инфузорий (Nudotriches) Прескоттом и сотрудниками в США (Prescott, 1992), в ходе которой теряется 96—98 % генома Ма — аналога germ line у многоклеточных животных. Позднее у представителя веслоногих рачков *Cyclops kolensis* была обнаружена элиминация 94 % ДНК из соматических клеток — рекордное количество для многоклеточных животных, сравнимое с потерей ДНК при созревании Ма (Гришанин и др., 1996). В последние годы были начаты молекулярно-биологические исследования структуры генома до и после ДХ у *C. kolensis* (Degtyarev et al., 2004).

В настоящее время, хотя и малыми силами (всего 5—6 лабораторий в мире), темп изучения ДХ заметно возрастает. Постепенно осознается, что наряду с междисциплинарными интересами ДХ имеет ключевое значение для понимания наиболее интригующей проблемы современной молекулярной генетики (и эволюционной биологии в целом) — парадокса размеров и молекулярной структуры генома эукариот, иначе — загадки избыточной ДНК (Vinogradov, 2005). С позиций общих представлений о роли объектов в истории биологии, и генетики в особенности, эта ситуация неудивительна. Именно подходящие объекты, которые, как правило, составляют ничтожную долю биоты, дают возможность открыть новые пути, а иногда даже новые направления исследований (Gregory, Herbert, 1999; Gregory, 2001; Hedges, 2002). Для генетиков это утверждение ассоциируется с такими организмами, как горох, кузнечики, дрозофила, дрожжи, *E. coli*, вирусы, а в последнее время это арабидопсис, нематода, рыба *Fugu rubripis*, мышь, человек.

Исключительный и также многоплановый интерес представляет изучение различных феноменов диминуции, так как последние могут быть живой моделью протекающих «на глазах» исследователей процессов преобразования эукариотических геномов в эволюции (Акифьев, Гришанин, 1993).

Обсудить все аспекты проблемы ДХ в рамках одной статьи не представляется возможным. Поэтому мы ограничили свою задачу кратким описанием основных типов ДХ, подчеркнув то, что имеет наибольший интерес для понимания роли ДХ в связи с организацией клеточного ядра и эволюцией генома эукариот, в первую очередь парадокса размеров генома.

Диминуция хроматина у нематод

В ходе ДХ у нематод происходит необратимая дифференцировка клеток соматической и зародышевой линий, заключающаяся во фрагментации хромосом клеток соматической линии, элиминации предположительно гетерохроматиновых сегментов хромосом и распределении гомологичных эухроматиновых сегментов (хромо-

сом клеток соматической линии) между дочерними клетками. Воссоединения эухроматиновых сегментов, подобно тому как это происходит во время ДХ у *Cyclopoida* (см. ниже), не происходит. В результате ДХ клетки зародышевой и соматической линий нематод различаются по диплоидному числу хромосом, количеству и структуре ядерной ДНК. ДХ наблюдается у 12 видов нематод, ведущих паразитический образ жизни, и не обнаружена у свободноживущих нематод. У вида *Strongyloides papillosus*, ведущего как паразитический, так и свободноживущий образ жизни, ДХ определяет механизм половой дифференциации, но не дифференцировку клеток соматической и зародышевой линий (Albertson et al., 1979).

Наиболее подробно ДХ изучена у *Parascaris univalens* и *Ascaris suum*. ДХ у *P. univalens* происходит последовательно в клетках соматической линии со 2-го по 6-е деление дробления. Цитологический анализ голоцентрических хромосом *P. univalens* и *P. equorum* при помощи современных методов окраски показал, что в анафазе диминуционного деления к полюсам веретена деления мигрируют лишь эухроматиновые сегменты хромосом, тогда как теломерные блоки гетерохроматина остаются в экваториальной зоне и в дальнейшем перемещаются в цитоплазму, где вскоре деградируют (Goday, Pimpinelli, 1984, 1986; Pimpinelli, Goday, 1989). Диплоидное число хромосом в этих клетках увеличивается с 2 до 60 (Müller, Tobler, 2000). С помощью электронной микроскопии показано, что хромосомы клеток зародышевого пути взрослой особи *P. univalens* обладают непрерывным кинетохором, перекрывающим эухроматиновые и гетерохроматиновые участки хромосом, что характерно для голоцентрических хромосом (Goday et al., 1992). У зародыша *P. univalens* во время преддиминуционных делений дробления непрерывная кинетохорная пластинка покрывает только эухроматиновые сегменты хромосом, к которым крепятся микротрубочки веретена, в то время как гетерохроматиновые терминальные районы не формируют кинетохорной пластинки и кинетической активности не проявляют (Goday et al., 1985, 1992). После фрагментации хромосом во время диминуционных делений микротрубочки веретена прикрепляются к голоцентрическим эухроматиновым хромосомам, которые обладают кинетохором, имеющим необычную структуру. Он собран из отдельных субъединиц, образовавшихся в результате конденсации хроматина после диминуции (Goday et al., 1992). В мейотических клетках кинетическая активность хромосом осуществляется посредством прикрепления микротрубочек веретена только к гетерохроматиновым концам хромосом *P. univalens* (Goday, Pimpinelli, 1989). Таким образом, кинетохор у *Parascaris* имеет различную структуру, локализацию и размеры в митотических и мейотических клетках зародышевого пути и в пресоматических эмбриональных клетках *P. univalens* и *P. equorum*. Недавно у *P. univalens* был обнаружен белок, обозначенный PUMA-1, с мол. массой 227 кДа (Esteban et al., 1998). В митотических клетках PUMA-1 локализуется в центромерных районах голоцентрических хромосом. Предполагается, что PUMA-1 не является структурным компонентом кинетохоров, но его существование необходимо для взаимодействия микротрубочек и кинетохора.

Процесс ДХ у *Ascaris suum* отличается от такового у *P. univalens* графиком (timing) диминуционного процесса (ДХ проходит с 3-го по 5-е деление дробления) и эли-

минацией не только теломерного, но и интеркалярного гетерохроматина. В результате реорганизации генома в ходе ДХ в клетках соматической линии изменяется диплоидное число хромосом: до ДХ — $2n = 38A + 5X$ у самцов и $2n = 38A + 10X$ у самок, после ДХ — $2n = 58A + 12X$ у самок и $2n = 58A + 6X$ у самцов (Niedermayer, Moritz, 2000).

По различным подсчетам, у *P. univalens* удаляется около 80—90 % тотальной ДНК, а у *A. suum* — 25—56 %, хотя в последние годы оценка количества элиминируемой ДНК (эДНК) в 25 % у этого вида признается более достоверной (Moritz, Roth, 1976; Tobler, 1986; Müller, Tobler, 2000). Элиминируются в основном высокоповторенные АТ-богатые последовательности, хотя уникальные последовательности также присутствуют в эДНК (Moritz, Roth, 1976; Roth, Moritz, 1981; Müller et al., 1982, 1986; Tobler et al., 1985; Landolt, Tobler, 1988). Показано (Roth, Moritz, 1981), что при ДХ у *A. suum* удаляется более 99.5 % сателлитной ДНК (стДНК). У *A. suum* стДНК состоит из повторов длиной 123 п. н., у *P. univalens* — из пентануклеотидных повторов TTGCA и декануклеотидных повторов TTTGTGCGTS (Teschke et al., 1991; Niedermeier, Moritz, 2000).

Элиминируемая фракция генома *A. suum* содержит кроме стДНК также среднесповторенные и уникальные последовательности (Roth, Moritz, 1981; Etter et al., 1991). Анализ геномного распределения ретротранспозона TAS у *A. suum* показывает, что приблизительно 50 копий этой повторенной единицы распределяются в 20 различных участках гаплоидного генома (Aeby et al., 1986; Felder et al., 1994). Его длина составляет 7627 п. н., он содержит LTR и гены *gag*, *pol* и *env*. Имеются два варианта этого транспозона — Tas-1 и Tas-2 в соотношении 2 : 1. Tas-2 отличается наличием двух дополнительных сайтов рестрикции EcoRI. При ДХ элиминируется примерно 25 % копий Tas-1 и все копии Tas-2, причем элиминируются они вместе с прилегающей стДНК. Отметим, что этот факт, так же как и аналогичные данные по инфузориям (см. ниже), весьма убедительно свидетельствует о жестком генотипическом контроле по отношению к так называемым эгоистическим или паразитическим последовательностям. Во время ДХ у нематод кроме среднесповторенных последовательностей удаляются и уникальные. К настоящему времени обнаружены 3 уникальных гена, элиминируемых при ДХ у *A. suum*: *rpS19G*, *fert-1* и *aleg-3*. Ген *rpS19G* кодирует белок, гомологичный белку малой рибосомной субъединицы S19 эукариот (Etter et al., 1991, 1994; Spisher et al., 1994). У *A. suum* существует и неэлиминируемый ген *rpS19S*, который отличается от *rpS19G* по аминокислотной последовательности на 16 %. В клетках зародышевого пути присутствует одинаковое количество мРНК обоих генов, однако *rpS19G* в 10 раз больше, чем *rpS19S*, что предполагает регуляцию их количества на посттранскрипционном уровне.

Ген *fert-1* также элиминируется при ДХ у *A. suum* и *P. univalens*, однако его стабильные транскрипты присутствуют до первой личиночной стадии (Spicher et al., 1994). Функция его неизвестна, однако отсутствие открытой рамки считывания в большинстве его транскриптов позволяет предполагать, что он кодирует функциональную РНК, а не белок. Ген *aleg-3* с неизвестной функцией также элиминируется при ДХ у *A. suum* (Huang et al., 1996). Весьма интересные данные получены в лаборатории Тоблера и Мюллера о том, что вновь сформиро-

ванные теломеры у *A. suum* не оказывают теломерного эффекта положения на соседние гены. Не было обнаружено (Müller et al., 1991; Tobler et al., 1992; Jentsch et al., 2002) консенсусной последовательности, по которой происходит вырезание эДНК у аскарид. Последовательность, внутри которой происходит разрезание (PXP), имеет длину примерно 6600 п. н. (Jentsch et al., 2002). После фрагментации происходит добавление 4000—6000 п. н. теломерных повторов (TTAGGC)_n к соматическим хромосомам, вероятно за счет действия теломеразы. В пользу этого предположения говорит тот факт, что экстракт клеток *A. suum* проявляет теломеразную активность (Magnenat et al., 1999). В позициях, по которым добавляются теломеры, присутствует до 6 нуклеотидов, совпадающих с повторами TTAGGC, что также говорит в пользу теломеразной гипотезы. Добавление теломерных повторов происходит в течение нескольких делений (Niedermeier, Moritz, 2000). Позиции, по которым происходят разрезание и добавление теломер, не совпадают, что может говорить о действии экзонуклеаз (Jentsch et al., 2002).

Между различными районами хромосомных разрывов (PXP) у *A. suum* не было найдено гомологии (Bachmann-Waldmann et al., 2004). Кроме того, сравнение PXP у *A. suum* и *P. univalens* показало, что степень гомологии между ними составляет 50—80 % и примерно равна степени гомологии между интронами этих видов, в то время как гомология между экзонами генов составляет более 90 %. Предполагается, что сайты разрезания хромосом у *A. suum* определяются не первичной последовательностью PXP, а участком ДНК, расположенным вне последовательностей PXP (Müller, Tobler, 2000).

Механизм ДХ у нематод мало исследован. На основании своих экспериментов по центрифугированию еще Бовери (см.: Tobler, 1986) заключил, что специфический, хотя и неизвестный фактор, дифференциально распределенный в цитоплазме яйца аскариды, в результате асимметричных делений контролирует на ранних стадиях эмбриогенеза развитие зародыша, в том числе прохождение ДХ в клетках соматической линии. Однако до сих пор о регуляции диминуционного процесса известно очень мало. Сравнительно недавно были проведены экспериментальные исследования регуляции ДХ лишь на *Ascaridae* (Esteban et al., 1995). Показано, что экспозиция развивающихся эмбрионов *P. univalens* в хлористом литии приводит к инициации диминуционных процессов во всех бластомерах у части зародышей, изменяя поведение бластомеров зародышевой линии и вызывая у них сходство с соматическими бластомерами в том, что касается схемы деления, ориентации митотического веретена деления и синхронизации клеточных делений (Esteban et al., 1995). Высказано предположение о том, что экспозиция в хлористом литии зародышей *P. univalens* инактивирует цитоплазматические факторы, которые предотвращают ДХ в бластомерах, дающих в конечном итоге линию клеток зародышевого пути (Esteban et al., 1995). Интересна также закономерность, которую наблюдали эти же авторы: хлористый литий индуцировал ДХ в клетках зародышевой линии с 1-го по 4-е деление дробления, но не после 4-го деления. В этом случае инициировать диминуционные процессы в клетках зародышевой линии не удается. Эта особенность поведения клеток зародышевой линии после 4-го деления дробления строго детерминирована и показывает, что развитие клеток зародышевого пути начиная с этого этапа не может быть

изменено на направление, сходное с развитием соматических бластомеров. Аналогичным действием на зародыши *P. univalens* (подобно хлористому литию) обладает цитохалазин-В. Эмбрионы, обработанные цитохалазином-В, осуществляют только симметричные, похожие на соматические деления, и все бластомеры дробящегося яйца подвергаются ДХ (Esteban et al., 1995). Вероятно, данные по влиянию цитохалазина-В на эмбриогенез *P. univalens* указывают на то, что распределение цитоплазматических факторов, определяющих ход ДХ, зависит от целостности микрофиламентов (Esteban et al., 1995). Исследование не обработанных какими-либо агентами эмбрионов *P. univalens* при использовании антител к миозину II обнаружило различное распределение миозина между пресоматическими бластомерами и бластомерами-родоначальниками зародышевого пути (Esteban et al., 1995). Учитывая тот факт, что актин и миозин участвуют в переносе некоторого количества РНК, а также данные, согласно которым белки цитоскелета, особенно актин, отвечают за закрепление локализованной мРНК, была высказана гипотеза, из которой следует, что микрофиламенты, связанные с мРНК, транспортируют и(или) закрепляют определенные цитоплазматические факторы, вызывающие ДХ в течение раннего развития эмбрионов *Parascaris* (Esteban et al., 1995).

Противоположное действие по отношению к хлористому литию и цитохалазину-В оказывает NaSCN (Esteban et al., 1995). У эмбрионов, выдержанных в растворе этой соли со стадии зиготы до 4-клеточной стадии, появляются многоядерные эмбрионы, в которых не происходят диминуционные деления, а анализ веретена деления обнаруживает множественные полюса и очевидный недостаток микротрубочек. Высказывается предположение о том, что NaSCN вызывает денатурацию белков, но специфического влияния на ДХ эта соль не оказывает (Esteban et al., 1995). Эти факты свидетельствуют о том, что последствия воздействий химическими соединениями скорее связаны с общими нарушениями физико-химических свойств дробящегося яйца, чем со специфическим влиянием на механизм ДХ. Факторы, которые могут оказывать такое влияние, видимо, еще предстоит открыть.

Очень мало известно о белках, вовлеченных в процесс ДХ. Был выделен ядерный белок CDAF1, связывающийся с поврежденной ультрафиолетом двухцепочечной ДНК (Seidl, Moritz, 1998). Так как максимальную активность CDAF1 проявляет у зародышей *A. suum* на стадии 4—8 клеток и обнаруживает очень слабую активность в одноклеточных зародышах, он не рассматривается как постоянный компонент гетерохроматина клеток зародышевого пути. Активности белка CDAF1 не обнаружено в цитоплазме в течение всех делений дробления *A. suum*, что доказывает его локализацию в ядре. Предполагается, что CDAF1 действует как вспомогательный фактор в ходе эксцизионной репарации в эмбриональных клетках *A. suum*. Отсутствуют доказательства того, что CDAF1 активируется путем модификации профактора, сохраненного в яйце. Поэтому предполагается, что CDAF1 синтезируется de novo с постоянной скоростью в развивающемся зародыше. Высказывается предположение о том, что CDAF1 выступает в качестве вспомогательного фактора, определяющего местоположение эксцизионной «машин» в сайтах разрезания ДНК во время диминуционного процесса (Seidl, Moritz, 1998).

Обнаружение в элиминируемой фракции генома *A. lumbricoides* гена, кодирующего рибосомный белок

ALEP-1, по мнению Тоблера и соавторов (Tobler et al., 1992), дает достаточное основание, чтобы рассматривать ДХ как альтернативную форму регуляции генной активности. Некоторые исследователи полагают, что удаление из хромосом пресоматических клеток блоков гетерохроматина в результате ДХ может влиять на регуляцию генной активности (Tobler et al., 1992; Goday, Pimpinelli, 1993). В осторожной форме было высказано предположение о том, что количество эДНК должно прямо зависеть от размера исходного генома, т. е. генома germ line (Tobler, 1986). Еще одна гипотеза относительно биологической роли ДХ у нематод связывает элиминацию хроматина в пресоматических клетках с увеличением плоидности отдельных соматических клеток взрослого организма и рассматривает ДХ как механизм для регуляции экспрессии генов и регуляции количества хроматина (дозы генов) в ходе онтогенеза (Goday, Pimpinelli, 1993). Эволюционное значение ДХ, по предположению авторов этой статьи, можно рассматривать как отражение работы общего механизма, регулирующего количественные изменения генного продукта в онтогенезе.

Диминуция хроматина у миксин

Диминуция хроматина у миксин, заключающаяся в элиминации целых хромосом и их фрагментов в раннем эмбриогенезе, была обнаружена у следующих видов: *Eptatretus burgeri*, *E. atami*, *E. okinoceanus*, *E. cirrhatius*, *Myxine glutinosa*, *M. garmani*, *Paramyxine sheni* и *P. atami* (Kohno et al., 1986; Nakai et al., 1991). Стадия, на которой происходит элиминация хромосом и их фрагментов, и подробности этого процесса точно определены не были, но установлено количество эДНК и число хромосом в соматических и половых клетках (Nakai et al., 1991, 1995). С-окрашивание показало, что хромосомы соматических клеток не содержат С-положительного хроматина, за исключением хромосом *M. garmani*, в то время как часть хромосом клеток полового пути С-положительны. Кроме того, у *E. burgeri* часть соматических хромосом в половых клетках содержит теломерные блоки гетерохроматина, что позволяет говорить о наличии ДХ (Nakai et al., 1991).

Обнаружен значительный полиморфизм по длине хромосом в клетках полового пути. Количество их также варьирует как между особями, так и в клетках одной особи (Kubota et al., 1992). Было выдвинуто предположение (Kubota et al., 1992) о том, что дополнительные хромосомы являются В-хромосомами, которые также ограничены половым путем, однако возможность того, что дополнительные хромосомы являлись копиями хромосом полового пути, опровергнута не была. Кроме того, эти два типа хромосом не различаются по морфологии.

Было показано, что большую часть эДНК (88.6 % у *E. burgeri*) составляют тандемные повторы (Kubota et al., 1993, 1997, 2001; Goro et al., 1998; Nabeyama et al., 2000). Было выделено и секвенировано 8 таких повторов из разных видов. Они имеют длину от 54 до 172 п. н. и не содержат открытых рамок считывания. Некоторые из этих повторенных элементов видоспецифичны, другие присутствуют у нескольких видов. Это позволяет предположить, что такие последовательности быстро распространились в хромосомах полового пути в ходе видообразования (Nabeyama et al., 2000).

Реорганизация генома при созревании вегетативных ядер (макронуклеусов) у инфузорий

Это сложное явление подробно описано в ряде обзоров (Prescott, 2000), в том числе и на русском языке (Райков, 1978; Лукашенко, Рыбакова, 1991). Поэтому мы рассмотрим его в довольно краткой форме, касающейся диминуции хроматина. О том, что ДХ в действительности имеет место при созревании Ма, свидетельствует тот факт, что геном Ма брюхоносных инфузорий — гипотрихид родов *Stylonychia*, *Oxytricha* и *Euplotes* содержит лишь 2—4 % нуклеотидных последовательностей генома Ми — генеративного ядра, аналога зародышевой линии (germ line) многоклеточных. Следовательно, 96—98 % последовательностей генома Ми теряются при созревании Ма. Процесс диминуции характерен для всех представителей родов *Tertahymena*, *Paramecium* (класс Oligohymenophorea), *Stylonychia*, *Euplotes* и *Oxytricha* (класс Spirotrichea). При вегетативном размножении Ми делится обычным митозом, а Ма — амитозом, при котором происходит расщепление ядра приблизительно пополам, в результате чего дочерним клеткам достается неравное количество последовательностей. Специалисты по кариологии простейших избегают прямо называть деление Ма амитозом, предпочитая говорить, что оно «похоже на амитоз», так как это деление, по-видимому, сопровождается дифференциальной репликацией отдельных Ма-«хромосом», восстанавливающей баланс их численности (Райков, 1978).

Половой процесс у инфузорий обычно индуцируется голоданием. У разных видов он может значительно различаться; в упрощенном виде он выглядит так: происходит спаривание двух клеток, Ми проходит мейоз, клетки обмениваются получившимися гаплоидными продуктами, и гаплоидные ядра разных клеток сливаются и образуют зиготическое ядро. Зиготические ядра в каждой клетке проходят цикл репликации и митотическое деление. В результате образуются два идентичных диплоидных ядра, одно из которых становится Ми, а другое — Ма. Клетки расходятся, старый Ма и неиспользованные продукты мейоза разрушаются. В процессе преобразования генома Ми в геном Ма происходят сложные изменения, детали которых значительно различаются у разных групп.

В настоящем сообщении мы ограничимся кратким изложением основных событий в ходе реорганизации ядра у гипотрихид, поскольку именно у этих инфузорий происходят, безусловно, наиболее кардинальные процессы перестройки ядерного материала в онтогенезе, которые на сегодняшний день известны у эукариот. В самом начале развития Ма у некоторых гипотрихид из рода *Stylonychia* проходит первый этап ДХ, во время которого элиминируется около 60 % хромосом (Ammermann, 1985). У представителей рода *Oxytricha* подобной редукции числа хромосом не наблюдается (Spear, Lauth, 1976). Оставшиеся хромосомы политенизируются. В это время содержание ДНК в Ма увеличивается по сравнению с количеством ДНК в диплоидном Ми в 15 раз у *Stylonychia mytilis* (Ammermann, 1971), в 30 раз у *Oxytricha fallax* (Prescott, Murti, 1973) и почти в 53 раза у *Euplotes aediculatus* (Ammermann, 1971). Причины появления политечных хромосом в зачатке Ма неизвестны. После завершения циклов репликации политечные хромосомы у инфузорий (в отличие от таковых у двукрылых насекомых)

(Zhimulev, 1998) немедленно подвергаются распаду. Можно предположить, что многие копии генных последовательностей нужны как таковые для последующих событий; не будь их, единичные копии отдельных генов могли бы быть безвозвратно утеряны. По мере развития политении в хромосомах гипотрихид появляется диск—междисковая структура (Ammermann, 1971; Ammermann et al., 1974; Spear, Lauth, 1976). Степень репликации различных локусов хромосом неодинакова; так, например, отмечается «сверхрепликация» отдельных гетерохроматиновых дисков во время политенизации хромосом зачатка Ма *E. aediculatus* (Ammermann, 1971) и *Chilodonella cucullulus* (Radzikowski, 1979).

Прежде Ми рассматривали как полностью инертное в течение вегетативного роста инфузорий ядро (Лукашенко, Рыбакова, 1991), однако некоторые гены, весьма немногочисленные, все же транскрибируются в Ми; другие же, как будет отмечено ниже, имеют структуру, фактически запрещающую транскрипцию с них «осмысленной» РНК. Таким образом, фенотип организма практически целиком определяется геномом Ма.

Геномы этих двух типов ядер резко отличаются друг от друга по структуре последовательностей ДНК. Если геном Ми представлен обычными эукариотическими хромосомами размером в мегабазы, то в Ма таких хромосом нет. Как же происходит подобная реорганизация генома Ма и каков ее конечный результат? События эти столь необычны, что они не могли быть предсказаны на основе постулатов, которыми располагала генетика в начале 1970-х годов. И поэтому открытие явления реорганизации генома Ми у простейших Прескоттом и Мурти в 1973 г. (Prescott, Murti, 1973) было встречено с явным недоверием, которое, однако, быстро рассеялось. Сформированные политечные хромосомы фрагментируются на отдельные сегменты, окруженные мембраной толщиной 100 Å (Kloetzel, 1970; Murti, 1976), образуя в зачатке Ма большое количество пузырьков. У *Stylonychia* число пузырьков приблизительно равно числу дисков (Ammermann, 1971; Ammermann et al., 1974). У *Oxytricha* часть дисков сливается перед фрагментацией, в результате чего количество дисков в политечных хромосомах уменьшается в 4 раза (Spear, Lauth, 1976). Затем происходит второй этап ДХ, во время которого из фрагментов ДНК, заключенных в пузырьках, вырезаются межгенные участки ДНК и так называемые внутренние элиминируемые последовательности. Завершается формирование фрагментов ДНК путем наращивания на их концах теломерных повторов CA/GT, длина которых видоспецифична (Roth, Prescott, 1985; Klobutcher, 1987, 1999; Greslin et al., 1989). Кодированному району гена предшествует лидерная последовательность размером от 50 до 50 п. н., а за геном следует трейлерная последовательность из 500 пар оснований (Prescott, 1992). Лидерная и трейлерная последовательности, вероятно, необходимы для инициации и терминации транскрипции. Гены, изученные до сих пор в микронуклеарном геноме у *Oxytricha nova* и *Euplotes crassus*, содержат внутренние элиминируемые последовательности (ВЭП), некоторые в большом количестве. Геном Ми может содержать около 50 000 ВЭП, при этом все они удаляются и разрушаются во время развития Ма. ВЭП представляют собой копии АТ-богатых последовательностей размером от 14 до 548 п. н., рассеянных по геному (Prescott, 1992; Jahn, Klobutcher, 2002). Все ВЭП имеют 2—19 п. н. прямых повторов, возможно определяющих сайты, по которым происходят разреза-

ние ДНК и сплайсинг участков генов (Prescott, 1992). Часть ВЭП, по крайней мере длинные единицы, удаляются в кольцевой форме на стадии политенных хромосом (Prescott, 1992). Это весьма существенный факт, который мог бы косвенно указывать на взаимодействие удаленных друг от друга гомологичных повторов. Однако, к сожалению, неизвестно, является ли ДНК в этих кольцевых структурах ковалентно замкнутой. На стадии распада политенных хромосом из ДНК *Ma E. crassus* выделяются два родственных семейства транспозоноподобных элементов, называемых ТЕС-1 (Baird et al., 1989; Jahn et al., 1989) и ТЕС-2 (Jahn et al., 1988), каждый около 5300 п. н. длиной и представленных 30 000 копий. *Oxytricha fallax* содержит около 1900 копий транспозоноподобных элементов длиной около 4000 п. н., называемых ТВЕ-1 (Herrick et al., 1985). По меньшей мере у некоторых видов *Hypotraches* транспозоноподобные последовательности в Ми могут составлять до 50 % (Jaraczewski, Lahn, 1993). По мнению Прескотта, ВЭП можно рассматривать как мобильные элементы (Prescott, 1998). ВЭП разделяют в микронуклеарном геноме сегменты генов, называемые сохраняемыми сегментами макронуклеуса (ССМ), которые после эксцизии ВЭП-элементов соединяются и образуют функционально активные гены Ма. С нашей точки зрения, наиболее значительным событием при реорганизации генома Ми в геном Ма является следующее. Характер распределения элементов ССМ и ВЭП может быть неодинаковым в разных генах. Так, например, ген актина-1 имеет инвертированные ВЭП-элементы, а у гена *αTBP* элементы ССМ распределены кластерами: группа нечетных элементов и группа четных элементов ССМ, которые после эксцизии ВЭП сшиваются в порядке нумерации (Prescott, 1992). Это означает, что последовательности, составляющие функционально активные гены в Ма, в Ми могут присутствовать и передаваться из поколения в поколение в виде своего рода «молекулярной свалки». Например, если в Ма работающий ген состоит из последовательностей, которые можно обозначить, как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9, то в Ми расположение этих же последовательностей может быть совершенно другим: 3, 7, 1, 5, 4, 6, 8, 2 и 9. Отсюда следует, что для «приведения в порядок» данного гена в Ма требуется весьма сложный рекомбинационный процесс (Prescott, 1998). Как возникли подобные «свалки» последовательностей, как они сохраняются и каким образом в действительности преобразуются в упорядоченную структуру Ма, остается загадкой. Однако совершенно очевидно, что подобные признаки геномов Ми и Ма не могут возникнуть под действием мутаций и естественного отбора. После ДХ видоизмененные гены многократно реплицируются, так что каждый ген представлен 1000 и более копий (Steinbruck, 1986). Таким образом, ДНК Ма у инфузорий отряда *Hypotrichida* и некоторых других таксонов представлена фрагментами, содержащими один ген без интронов, экипированный небольшими регуляторными последовательностями, что соответствует 400—2000 п. н., или 0.1—0.6 мкм (Steinbruck, 1986). Каждая такая молекула ДНК или гены в кусочке (genes in pieces) относительно автономны, способны к репликации и транскрипции, имеют типичные теломерные повторы, но не имеют центромера. Митоз при такой организации ядра, как у Ма гипотрихид, становится невозможным. Он заменяется амитозом. При амитозе гены «в кусочках» перераспределяются в дочерние Ма случайным образом. Однако поскольку таких последова-

тельностей много, вероятность того, что при амитозе оба дочерних Ма не получат хотя бы несколько копий каждого гена, ничтожна мала. В заключение необходимо отметить, что ДХ среди простейших наблюдается у видов с высоким содержанием ДНК в Ми (Ammermann, 1985).

Какую же позицию в филогенетическом аспекте занимают Ма гипотрихид? Они почти точно соответствуют гипотетическим представлениям начала 1960-х годов (Gabriel, 1960; Оленов, 1961), поддержанными и в некоторой степени детализированным позднее одним из авторов настоящей работы (Акифьев, 1974), о первичной полиплоидии, когда древняя протоклетка еще не была ни прокариотом, ни эукариотом. Она весьма напоминала Ма инфузорий (структура последних тогда еще не была известна). В последующем в эволюции благодаря развитию рекомбинационных систем произошла олигомеризация — объединение генов в хромосомные структуры. На базе этих структур возник митоз, который обеспечивал скрупулезно точное распределение генов между дочерними клетками. В этом случае появление генома Ма у гипотрихид следует рассматривать как своего рода рекапитуляцию на клеточном уровне. Справедливости ради надо констатировать, что подобные рассуждения, как и ряд других гипотез о происхождении эукариотических клеток (см.: Албертс и др., 1994), сегодня можно оценивать лишь как более или менее красивые фантазии. Но главное не в этом: реорганизация генома в Ма инфузорий хотя и должна рассматриваться как «шаг в сторону» по отношению к эволюционному процессу, тем не менее является живым свидетельством практически безграничных потенциальных возможностей преобразования генома эукариотических клеток в онтогенезе. Если оценивать этот феномен с точки зрения природной геномной инженерии, то это, безусловно, мировой рекорд, который будет побит геномными инженерами в лабораториях еще очень не скоро, а может быть, и никогда.

Исключительный интерес представляют районы хромосомных разрывов и последовательности, их формирующие. У *T. thermophila* были обнаружены РХР-последовательности, по которым происходит фрагментация хромосом (Coyne, Yao, 1996). РХР имеют длину 15 п. н. и являются высоконсервативными, хотя замена 1 нуклеотида в некоторых позициях не сказывается на функции (Fan, Yao, 2000). После разрезания происходят дегградация концов фрагментов экзонуклеазами и добавление теломера (Fan, Yao, 1996). Недавно при исследовании *Stylopychia lemnae* были получены доказательства того, что теломеры мини-хромосом макронуклеарного генома прикрепляются к ядерному матриксу посредством взаимодействия с теломерсвязанным белком ТеВР (Jonsson et al., 2002).

У *E. crassus* существует консервативная последовательность в 10 п. н. (Klobutcher et al., 1998). Некий фермент узнает эту последовательность и производит двухцепочный разрыв с образованием выступающего одноцепочного конца в 6 п. н. на расстоянии 17 п. н. от последовательности 5'-ТТАГА-3' либо (в 30 % случаев) на расстоянии 11 п. н. с 3'-конца от этой последовательности, а затем происходит заполнение одноцепочного конца и добавление теломерных последовательностей (Klobutcher, 1999). Однако вопрос с РХР еще не решен, так как эта последовательность была обнаружена в некоторых местах внутри генов Ма, но разрезание по ней при формировании Ма не производится.

У других инфузорий не было обнаружено подобных консервативных последовательностей вблизи места разрезания ДНК (Coyne et al., 1996). Кроме того, места добавления теломер могут варьировать от нескольких десятков п. н. у *Stylonychia* и *Oxytricha* до нескольких сотен у видов *Paramecium*. Для *Stylonychia lemnae* было, однако, показано, что фланкирующие участки хромосом Ма не являются необходимыми, однако последовательности, находящиеся на расстоянии около 300 п. н. от концов хромосом, необходимы, причем в этих районах находятся последовательности, гомологичные РХР (Jonsson et al., 1999, 2001). Исследования прителомерных районов у *Oxytricha* выявило значительную асимметрию в количестве пуринов и пиримидинов (~60 : 40 %). Предполагается, что РХР у *Oxytricha* определяются не АТ-составом или даже вообще первичной последовательностью ДНК, а структурой хроматина (Prescott, 2000).

Элиминация хромосом у двукрылых

Элиминация хромосом — один из феноменов ДХ, хотя при этом, возможно, и не происходит значительной молекулярной реорганизации самой структуры хромосомной ДНК. Рассмотрим элиминацию хромосом на примере двукрылых насекомых.

Элиминация хромосом происходит у трех групп отряда *Diptera*: сем. *Sciaridae*, сем. *Cecidomyiidae* и подсем. *Orthocladinae*. Элиминируемые хромосомы ограничены клетками полового пути и обозначаются у сем. *Sciaridae* — L-хромосомы, у сем. *Cecidomyiidae* — E-хромосомы, у подсем. *Orthocladinae* — K-хромосомы. Хромосомы основного набора называются S-хромосомами.

У представителей подсем. *Orthocladinae* элиминация K-хромосом происходит в раннем эмбриональном развитии в ходе 4—7 делений дробления. Элиминация начинается в соматических ядрах асинхронно (Staiber, 2000), в анафазе K-хромосомы остаются на экваторе веретена. Количество S-хромосом у разных видов равно 2 или 3, количество K-хромосом может варьировать от 1 до 26 (Bauer, Veermann, 1952). Элиминация части K-хромосом в клетках полового пути происходит в гонадах личинки первого возраста. Примерно половина K-хромосом остается на экваторе во время первого митоза. Таким образом, клетки полового пути содержат диплоидный набор S-хромосом и гаплоидный набор K-хромосом. Удвоение числа K-хромосом происходит в дифференцирующем митозе, при котором K-хромосомы собираются у одного из полюсов веретена деления, в результате чего восстанавливается число K-хромосом. Клетка, оставшаяся без K-хромосом, образует у самок питающую клетку ооцита, у самцов — дегенерирующий сперматоцит.

Эксперименты по рентгеновскому облучению самцов *Acricotopus lucidus* (Staiber, Thudium, 1986; Staiber, 1991a) и самок *Smittia parthenogenetica* (Bauer, 1970; Hägele, 1980) с последующим изучением транслокаций участков K-хромосом на S-хромосомы на политенных хромосомах слюнных желез личинок показали, что транслоцируются либо гетерохроматиновые блоки, либо эухроматиновые секции, гомологичные участкам S-хромосом. Кроме того, были обнаружены две линии *A. lucidus*, в которых присутствовали дополнительные мини-хромосомы, произошедшие, по всей видимости, от K-хромосом, которые также были гомологичны участ-

кам S-хромосом (Staiber, 1987). Это дало основания полагать, что K-хромосомы произошли от S-хромосом в результате эндополиплоидизации и(или) транслокаций.

Наиболее полные результаты получены на *A. lucidus*, у которого число K-хромосом может варьировать от 4 до 19 у разных особей (Staiber, 1987). G-окрашивание показало, что у *A. lucidus* имеется 9 типов K-хромосом, причем ни одна из них не является необходимой, т. е. в клетках полового пути может отсутствовать любая из них без видимого влияния на фенотип (Staiber, 1988). Формирование мультивалентов в мейозе у самцов говорит о частичной гомологии K-хромосом (Staiber, 1989). У всех K-хромосом, за исключением K9, присутствуют два прицентромерных C-бэнда, в то время как у K9 и S-хромосом наблюдается только один (Staiber, 1991b). Возможно, это играет роль при элиминации K-хромосом.

У *A. lucidus* были выделены 4 семейства тандемно повторенных элементов (Staiber et al., 1997; Staiber, 2002). Семейство повторов AlSo состоит из мономеров длиной 174—177 п. н. Эти повторы присутствуют в S-хромосомах и в K9. Семейства повторов AlKeRe1, AlKeRe2 и AlKeRe3 имеют длину 183—184, 175—178 и 164 п. н. соответственно, они присутствуют в большом количестве в прицентромерных районах K-хромосомах, кроме K9, а AlKeRe3 — и в прителомерных районах K1 и K2. Семейства повторов AlKeRe имеют гомологию между собой и не имеют гомологии с AlSo. Хромосома K19, по-видимому, эволюционно моложе остальных K-хромосом, так как характеризуется помимо присутствия AlSo, отсутствия AlKeRe и одного прицентромерного C-бэнда еще и замедленной миграцией к полюсам веретена, образованием бивалента со своим гомологом в мейозе, что нехарактерно для остальных K-хромосом, и в редких случаях — равным распределением между дочерними ядрами в дифференцирующем митозе (Staiber et al., 1997).

Эксперименты по созданию хромосомных библиотек методом микродиссекции (Staiber, Schiffkowsky, 2000) показали, что все K-хромосомы, кроме одной, окрашивались какой-либо одной из S-проб. Только плечи хромосомы K2 окрашивались пробами SI и SII. Это подтверждает гипотезу о том, что K-хромосомы произошли от S-хромосом.

Элиминация E-хромосом у галлиц (сем. *Cecidomyiidae*) может происходить в ходе 3—8 делений дробления (Geyer-Duszynska, 1959; Nicklas, 1959, 1960; Stuart, Hatchett, 1988) и имеет существенные отличия от элиминации хромосом у *Orthocladinae* (Stuart, Hatchett, 1988): 1) у самцов во время первого деления мейоза к одному из полюсов веретена отходит материнский набор S-хромосом, к другому — отцовский набор S-хромосом и E-хромосомы; только клетки с материнским набором S-хромосом образуют гамету; 2) у самок во время второго деления мейоза элиминируется часть S-хромосом; гаметы могут содержать как отцовский, так и материнский набор хромосом; 3) у самцов *Mayetiola destructor* на ранних делениях дробления вместе с E-хромосомами элиминируются и две половые хромосомы.

Предполагается (Camenzind, 1974; Kunz, Eckhardt, 1974; Bregman, 1975; Panelius, 1968, 1971), что E-хромосомы произошли от S-хромосом в результате полиплоидизации. Детальный цитологический анализ у *Miasitor* sp., однако, показал, что часть E-хромосом не имеет морфологического сходства с S-хромосомами (Nicklas, 1959). Эксперименты по центрифугированию, перетяжке

и облучению ультрафиолетом эмбрионов на ранних этапах развития показали, что в отсутствие клеток с половым набором хромосом гаметы формируются из соматических клеток, что не влияет на развитие и жизнеспособность организма, однако приводит к его стерильности (Geyer-Duszynska, 1959, 1961; Vantock, 1961, 1970). Это дало возможность предположить, что Е-хромосомы содержат гены, необходимые для нормального оогенеза (Painter, 1966). В пользу этого говорит и тот факт, что ДНК Е-хромосом обладает транскрипционной активностью во время оогенеза (Kunz et al., 1970).

У представителей сем *Sciaridae* еще более сложный цикл развития (Rieffel, Crouse, 1966; Gerbi, 1986; Goday, Esteban, 2001). В соматических клетках *S. coprophila* L-хромосомы элиминируются в ходе 5—6 делений дробления. У самцов две отцовские Х-хромосомы элиминируются в ходе 7, 8 или 9-го деления дробления, а у самок элиминируется одна отцовская L-хромосома, как правило, в ходе 9-го деления дробления. У самцов и самок в интерфазе 8-го или 9-го деления половых клеток, которая длится до начала второго личиночного возраста, элиминируются путем выталкивания в цитоплазму 1 отцовская Х-хромосома и 0—3 L-хромосом. В первом делении мейоза у самцов гомологичные хромосомы не образуют бивалентов в профазе и не образуют метафазной пластинки. Образуется только один полюс веретена, к которому сразу после профазы отходят L-хромосомы и материнский хромосомный набор, а отцовский набор дегенерирует. Во втором делении мейоза обе Х-хромосомы отходят к одному из полюсов, хромосомный набор без Х-хромосом дегенерирует, а образовавшиеся гаметы содержат гаплоидный набор аутосом, две Х-хромосомы и две L-хромосомы (количество L-хромосом может варьировать от 0 до 4, вероятно из-за нерасхождения). У самок мейоз проходит нормально, ооцит содержит гаплоидный набор аутосом, одну Х-хромосому и одну L-хромосому.

У *S. ocellaris* L-хромосомы отсутствуют, но элиминация Х-хромосом в цикле развития проходит сходным образом.

Элиминация хромосом описана и у других беспозвоночных и позвоночных животных: у кокцид — подотряд *Coccoidae* (Brown, Chandra, 1977), у клеща *Metaseiulus occidentalis* (Nelson-Rees et al., 1980), у блохи *Ctenocephalides orientis* (Thomas, Prasad, 1980), у полевок *Microtus oregoni* и некоторых видов различных семейств отряда сумчатых (Hayman, Martin, 1965; Hayman et al., 1969; Murtagh et al., 1979). Явления, сходные с ДХ, обнаружены у химеры *Hydrolagus collei* (Stanley et al., 1984). В целом эти феномены свидетельствуют о широких возможностях преобразования генома в онтогенезе. Однако они ничего не говорят о том, как происходила эволюция молекулярной структуры генома у эукариот. На эти вопросы, по нашему мнению, лучше всего отвечают исследования ДХ у Cyclopoidea.

Диминуция хроматина у циклопов

В данном разделе статьи мы попытаемся показать, что феномен ДХ у представителей Cyclopoidea (Copepoda, Crustacea) является, с одной стороны, наиболее классической формой тотальной редукции генома в онтогенезе, а с другой — моделью для аналогичных преобразований генома эукариот в эволюции. Именно ДХ у Cyclopoidea

дает ключ к загадочной проблеме смены типов молекулярной структуры ДНК (интерперсии уникальных и повторяющихся некодирующих последовательностей в процессе эволюции). Существенная методическая особенность ДХ у циклопов состоит в том, что она представляет собой весьма привлекательный материал для цитологических исследований (Акифьев, Гришанин, 1993).

Современный этап исследования ДХ у копепоид начался с работ Берман, которая провела тщательное морфологическое и цитофотометрическое изучение ДХ у 3 видов Cyclopoidea (Beer mann, 1977). В настоящее время ДХ обнаружена у 22 видов Cyclopoidea. Геном изученных видов циклопов варьирует в размерах от 0.25 пг (1С) у *Dioithona culvata* до 3.1 пг (1С) у *Cyclops divulsus* (Beer mann, 1977; Wyngaard, Rasch, 2000). ДХ наблюдается у видов с малыми геномами — нами был найден вид *Paracyclops affinis* Sars. с величиной генома до ДХ 1С = 0.7 и после ДХ 1С = 0.4 (Grishanin et al., 2004), но ее может не быть и у видов с большими геномами. Яркий пример тому — два вида циклопов, описанных Гришаниным и соавторами (1996), *Cyclops kolensis* и *C. insignis*, обитающих в одном и том же московском пруду. Репродуктивный период у этих видов частично совпадает, он приходится на весенний период во время таяния льда. Размер исходного генома *C. insignis* — 2.15 пг (1С), *C. kolensis* — 2.3 пг (1С). Как видно, это довольно большие геномы, приблизительно равные 2/3 генома человека. У *C. insignis* ДХ отсутствует, и количество ДНК в клетках зародышевой и соматической линиях (на уровне точности метода цитофотометрии фельгеновской реакции) одинаковое. С другой стороны, у *C. kolensis* во время ДХ из хромосом вырезается 94—95 % ДНК, так что в соматических клетках остается лишь около 5—6 % ДНК зародышевой линии. На сегодняшний день это максимальная доля генома, теряемая соматическими клетками многоклеточных животных во время ДХ. Больше ДНК теряется лишь при созревании макронуклеусов у брюхоночных инфузорий, но ненамного по сравнению с *C. kolensis*.

Представляет интерес тот факт, что редукция генома клеток соматической линии в ходе ДХ у видов как с малыми геномами, так и с большими не приводит к уменьшению последиминуционных хромосом за пределы их видимости в световом микроскопе. В первом случае ДХ, особенно таких масштабов, как у *C. kolensis*, могла бы настолько уменьшить размеры хромосом, что часть из них или даже все оказались бы за пределами разрешающей способности светового микроскопа. Этого, однако, не происходит. Установлено, что диплоидное число хромосом у *C. kolensis*, равное 22, остается после ДХ прежним (Гришанин и др., 1996). Такая же картина наблюдается у *C. strenuus strenuus*, у которого ДХ совершается в два этапа — в 5-м и 6-м делениях дробления, причем количество ДНК у этого вида в соматических клетках уменьшается с 0.72 пг (1С) до 0.18 пг (1С) на геном, т. е. на 75 % (Гришанин и др., 1996).

Во втором случае, как у *C. insignis*, совершенно непонятно, почему соматические клетки сохраняют столь крупный геном. Можно полагать, что по числу структурных генов *C. insignis* и *C. kolensis* различаются незначительно. Интересно отметить также, что у *C. kolensis* (как и у *C. strenuus strenuus*) в тканях взрослого организма содержится до 80 полиплоидных клеток, а у *C. strenuus strenuus* — 50 (Гришанин и др., 1996). Общее количество

соматических клеток у взрослого *C. kolensis* — около 20 000, причем полиплоидные клетки содержат 1700 С, если относить ее к постдиминуционному геному. По нашим данным у *C. insignis* насчитывается 17—20 высокополиплоидных клеток. Но надо отметить, что если амплификации у *C. kolensis* подвергается небольшая часть от тех 5—6 % генома, которые остаются после ДХ, т. е. в основном структурные гены и минимально необходимые регуляторные последовательности, то у российской популяции *C. insignis* амплифицируется геном, который в 15 раз превышает постдиминуционный геном *C. kolensis*. Можно высказать предположение о том, что если наличие у взрослых циклопов небольшого числа полиплоидных клеток имеет какое-либо адаптивное значение, то увеличение постдиминуционного генома *C. kolensis* намного эффективнее, чем амплификация генома *C. insignis*.

Время, точнее, деление дробления, когда происходит ДХ у циклопов (timing), так же как и у аскарид, видоспецифично. У циклопов ДХ может приходиться на 4—7-е деление дробления. Но ДХ может захватить и два следующих друг за другом деления (Beermann, 1977; Гришанин и др., 1996).

Уникальный пример календаря ДХ описан Гришаниным и соавторами (Гришанин, Акифьев, 1993; Гришанин и др., 1996) у *C. kolensis*. ДХ у этого вида имеет место в 4-м делении дробления в 7 клетках из 8 (последняя образует линию зародышевых клеток). Однако синхронно ДХ протекает лишь в 6 из 7 клеток, тогда как в 7-й она следует хотя и с небольшой, но отчетливой задержкой. Принято считать, что ДХ у *Sorocera*, как и у аскарид, представляет собой наиболее четкий сигнал разделения зародышевых клеток на соматические, которые в будущем дадут все типы тканевых клеток, и зародышевые, предназначенные исключительно для связи поколений.

Еще одна особенность календаря ДХ касается продолжительности преддиминуционной интерфазы, впервые отмеченная Берман, а затем подтвержденная другими авторами (Beermann, 1977; Leech, Wyngaard, 1996). Так, у *C. kolensis*, по нашим наблюдениям, преддиминуционная интерфаза увеличивается с 70—90 мин в интервалах между 1-м и 2-м и 2-м и 3-м делениями до 480—540 мин перед 4-м диминуционным делением. После ДХ интервал между делениями резко падает до 50—60 мин. Однако очевидно, что это сокращение интервала, т. е. по существу продолжительности интерфазы, непропорционально уменьшению количества ДНК в презумптивных соматических клетках (Гришанин, Акифьев, 1993; Гришанин и др., 1996). Если последнее уменьшается в 16 раз, то интервал между делениями — всего в 10 раз. По сути дела интервалы между до- и последиминуционными делениями гораздо более сходны по продолжительности, чем преддиминуционная интерфаза, тогда как разница в количестве ДНК между теми и другими клетками огромна. Таким образом, удлинение интерфазы у циклопов ограничено лишь одним (или двумя, как у *C. strenuus strenuus*) ядерными циклами. Отсюда прямо следует, что варибельность интерфазы зависит не столько от размеров генома, сколько от неизвестных пока процессов, протекающих у циклопов в связи с подготовкой диминуционного деления. Как следует из данных, полученных с помощью цитофотометрии, ДХ предшествует репликации ДНК у *C. kolensis* (Гришанин и др., 1996).

ДХ служит примером драматического преобразования структуры ядерного материала. Особенно удобно изучать ДХ у *C. kolensis*, поскольку, как уже отмечалось, у этого вида элиминируется максимальное количество ДНК, причем фактически в один прием, в 4-м делении дробления. В конце преддиминуционной интерфазы в ядрах презумптивных соматических клеток появляются мелкие плотные фелъген-положительные гранулы. Аналогичные образования отмечены и на электронно-микроскопических препаратах. Ядра приобретают характерный пятнистый вид, который никогда не наблюдается ни до, ни после ДХ, а также у *C. insignis*, у которого ДХ отсутствует. При определении числа хроматиновых гранул с помощью светового микроскопа их можно насчитать до 600 и более. Мы предположили, что эти гранулы являются фокусами ДХ. Интересно отметить, что в случае ДХ, как во многих других случаях, когда необходимо исключить функцию какой-либо части генетического материала, используется механизм его компактизации (Жимулев, 1993).

Нельзя не упомянуть об удивительном изменении структуры хромосом в преддиминуционных митозах у *C. kolensis* (Гришанин, Акифьев, 1993). Они без какой-либо специальной предфиксационной обработки при окраске ацетоорсеином приобретают поперечную исчерченность, напоминающую G-окраску в митотических хромосомах человека и других видов. Некоторые авторы, работавшие с циклопами (Beermann, 1977), убеждены в том, что при ДХ элиминации подвергаются гетерохроматиновые участки хромосом, причем при спонтанном дифференциальном окрашивании хромосом, о котором идет речь, они соответствуют темноокрашенным дискам. Однако Стэндифорд (Standiford, 1989) показал, что у *Acanthocyclops vernalis* спонтанные диски и выявляемые с помощью С-окраски гетерохроматиновые блоки совпадают лишь частично. Основываясь на данных указанного автора, высказано предположение о том, что при ДХ могут элиминироваться наряду с гетерохроматином и некоторые генетически активные последовательности (Wyngaard, Gregory, 2001).

Забегая вперед, отметим, что в том небольшом количестве эДНК *C. kolensis*, которое нам удалось клонировать и секвенировать, типичных сателлитных последовательностей обнаружено не было (Дегтярев и др., 2002). Это, разумеется, не означает, что они не вырезаются из хромосом во время ДХ; скорее всего, праймеры, использованные нами для ПЦР, не имели гомологичных последовательностей в гетерохроматине данного вида. С другой же стороны, этот факт ясно показывает, что в эДНК входит далеко не только гетерохроматин, но и другие участки генома, что косвенно подтверждает цитированную выше мысль (Wyngaard, Gregory, 2001) о том, что при ДХ из хромосом могут исключаться последовательности, функционально активные в зародышевой линии.

Проведенная в одной из наших работ гибридизация *in situ* эДНК, извлеченной из гранул (см. ниже), с преддиминуционными хромосомами *C. kolensis* показала, что вырезаемые последовательности локализованы в самых различных районах хромосом.

В ходе профазы мелкие хроматиновые гранулы сливаются, образуются крупные гранулы, наполненные эДНК. Они окружены плотной, лишенной пор мембраной, впервые описанной Гришаниным и Акифьевым (Акифьев, Гришанин, 1993; Гришанин, 1995, 1996а).

Присутствие такой мембраны предотвращает проникновение внутрь гранул факторов декомпактизации в телофазе. Этот факт, как и другие, ясно указывает на высокую упорядоченность процессов, протекающих при ДХ у циклопов. Мы высказали предположение о том, что если бы гранулы эДНК были упакованы в обычную ядерную мембрану, то они превратились бы в микроядра, подобные тем, что возникают при действии на хромосомы различных мутагенных факторов (Акифьев, Гришанин, 1993). Транскрипция некодирующих последовательностей, локализованных в эДНК, в таком случае могла бы привести к хаосу в клетке и полному нарушению генетической регуляции, точность которой особенно важна в раннем развитии.

В одной из наших работ было измерено количество ДНК, содержащееся в гранулах, локализованных в одной клетке (Гришанин, 1996б). Оно оказалось равным примерно 90 % генома преддимируционных клеток. Этот факт строго согласуется с данными по определению количества ДНК в до- и последимируционных клетках, в то же время показывая, что по крайней мере в метафазе и ранней анафазе тотальной деградации эДНК в гранулах еще не происходит.

По окончании 6-го деления дробления гранулы с эДНК быстро исчезают. Казалось бы, что огромное количество деградировавшей ДНК может быть реутилизировано в последующих циклах репликации. Следствием такого избытка предшественников ДНК должно быть резкое ускорение S-фазы и всей интерфазы в постдимируционных клетках. Этого, однако, не наблюдается (см. выше).

Данные гибридизации *in situ* (Degtyarev et al., 2004) свидетельствуют о том, что эДНК (та, которую нам удалось амплифицировать) локализуется практически во всех додимируционных хромосомах, в некоторых ее очень много. Однако, несмотря на то что вся эта ДНК вырезается из хромосом соматических клеток, число их остается точно таким же, как и в клетках зародышевой линии. Иными словами, даже потеряв около 90 % ДНК, хромосомы *C. kolensis* остаются четко видимыми в световом микроскопе.

Данные, полученные Стэндифордом и Греггом (Standiford, 1988; Standiford, Gregg, 1989), позволяют предположить, что часть ДНК, удаляемой из клеток соматической линии в ходе димируции хроматина, представляет собой цистроны рибосомной ДНК, которые формируют большое ядрышко (25—35 мкм) в оогенезе у *A. vernalis*. Большое ядрышко появляется в ходе мейоза у *A. vernalis* на стадии диплотены и не выявляется в раннем эмбриогенезе. Предполагается, что последовательности рДНК, формирующие это ядрышко, функциональны только в оогенезе (Standiford, 1988).

Димируция хроматина у циклопов и концепция критической массы хромосомы эукариот

В начале 1990-х годов, пытаясь разрешить проблему С-парадокса, Акифьев (1993) обратил внимание на известный всем факт, который никогда до этого не обсуждался в связи с наличием в геномах эукариот некодирующей ДНК. Речь идет о том, что нет таких высших эукариот, которые в кариотипе содержали бы хромосомы, не видимые под световым микроскопом. Другими словами, число групп сцепления у высших эукариот всегда совпада-

ло с гаплоидным числом хромосом, выявляемых при световой микроскопии. Это не означает, что хромосомы самых различных размеров не могут быть сконструированы методами генной инженерии (Hennig et al., 1987). В-хромосомы, известные у многих групп растений и животных, по своему генетическому содержанию и поведению в мейозе, по влиянию на развитие организма не сравнимы по значению с основными А-хромосомами. Но и В-хромосомы видны в световом микроскопе. В этом отношении интересны виды, у которых имеются точечные хромосомы, сравнимые по размерам с 4-й хромосомой *Drosophila melanogaster*. Несмотря на свои размеры, 4-я хромосома *D. melanogaster* ничем не отличается от других хромосом этого вида. В период быстрого накопления информации о группах сцепления дрозофилы (20—30-е годы XX в.) генетики пытались найти и 5-ю, «невидимую», группу сцепления, однако все вновь открываемые гены оказывались принадлежащими к уже известным четырем группам, соответствующим гаплоидному набору *D. melanogaster* (Н. П. Дубинин, личное сообщение).

В результате сегодня можно констатировать, что две группы эукариот — дрожжи и ультрамалые водоросли (Kuroiawa et al., 1994) — имеют невидимые хромосомы, средний размер которых около 1 млн п. н., или 1 МБ. В то же время 4-я точечная хромосома *D. melanogaster* по размерам упакованной в ней ДНК все же в 2.5 раза превосходит самые крупные хромосомы дрожжей (Lock, McDermid, 1993). Но у низших эукариот нет и видимых хромосом. Таким образом, предложенная концепция минимальной критической массы (МКМ) хромосомы может быть сформулирована следующим образом: нет таких видов высших эукариот, хромосомный комплекс которых включал бы в себя одновременно видимые и не видимые под световым микроскопом в митозе и мейозе хромосомы. Разрешающая способность светового микроскопа указывает на приблизительный размер МКМ. Проведенные нами расчеты показывают, что эта величина составляет около 2 МБ. Вполне вероятно, что если бы Сэттон (Sutton, 1903) работал не с кузнечиками, у которых большие, хорошо видимые в простом световом микроскопе хромосомы, а, допустим, с дрожжами, хромосомная теория наследственности, объединившая менделевизм и данные цитологии, появилась бы значительно позднее, чем в первом десятилетии XX в.

Сопоставление идеи минимальной критической массы хромосомы с данными секвенирования генома человека, как нам представляется, позволяет пролить некоторый свет на роль избыточной ДНК. Особый интерес представляет Y-хромосома, в которой очень мало генов: в 5.7 раза меньше, чем в хромосоме 22, практически сходной с ней по размерам, и даже в 2.5 раза меньше, чем в самой маленькой из хромосом человека — 21-й. Тем не менее размер ДНК Y-хромосомы в 25 раз превосходит МКМ. Известно, что Y-хромосома содержит много повторяющихся последовательностей, что и не позволяет ей выйти за пределы МКМ. У *C. kolensis* не такого разброса размеров хромосом, как у человека (больше чем в 5 раз). Согласно нашим данным (Гришанин, 1995), абсолютная длина анафазных хромосом в додимируционных клетках *C. kolensis* варьирует от 11 до 22 мкм, диаметр их равен 0.8—1.0 мкм. После ДХ длина хромосом в соматических клетках уменьшается до 2.6—7.0 мкм, а диаметр — до 0.2—0.3 мкм. Все хромосомы этого циклопа находятся в пределах размеров групп А и

С хромосом человека, т. е. около 200 МБ. Если разделить размер гаплоидного генома *germ line C. kolensis* (2300 млн п. н.) на гаплоидное число хромосом (11), то получится, что средняя хромосома этого вида должна содержать около 210 млн п. н., т. е. по величине она будет близка к 3-й (214 млн п. н.) и 4-й (203 млн п. н.) хромосомам человека.

Допустим, что эДНК распределена в хромосомах циклопа равномерно, тогда в среднем каждая из них сохраняет 5—6 % своей длины, суммарно это около 138 млн п. н. На одну постдиминуционную хромосому будет приходиться 12.5 млн п. н. Другими словами, размеры постдиминуционных хромосом не опускаются ниже значения МКМ. Подобные расчеты показывают, что у *C. insignis* — вида, у которого отсутствует ДХ, при геноме в 2100 млн п. н. на одну хромосому как в клетках зародышевой линии, так и в соматических клетках приходится около 190 млн п. н.

Итак, постдиминуционный геном *C. kolensis* представлен $14 \cdot 10^7$ п. н. Это ненамного меньше, чем геном *D. melanogaster*, размер которого $16 \cdot 10^7$ — $18 \cdot 10^7$ п. н., и больше почти в 2 раза, чем геном такого популярного объекта современной генетики развития, как круглый червь *Caenorhabditis elegans* ($96 \cdot 10^6$ п. н.). К сожалению, каких-либо данных о числе генов у *Cyclopoidea* в литературе нет. Но все же ориентировочную оценку генетической структуры до- и постдиминуционных клеток *C. kolensis* можно провести, ориентируясь на то, что число генов у беспозвоночных животных приблизительно равно 15—20 тыс. Разумеется, нельзя забывать о бедных генами гетерохроматиновых районах (Жимулев, 1993), доля которых у *Cyclopoidea* также неизвестна. При ДХ если и происходит потеря структурных генов, то доля этих генов пренебрежимо мала, чтобы сказаться на различиях в числе их в клетках зародышевой и соматической линий. Примем, что у *C. kolensis* число структурных генов около 18 тыс. Расчеты показывают, что в таком случае на 1 ген в хромосомах клеток зародышевой линии будет приходиться до 130 тыс. п. н., тогда как в хромосомах соматических клеток — всего лишь 7.6 тыс. п. н. Аналогичные расчеты, которые можно провести на основе имеющихся данных по *D. melanogaster*, показывают, что на 1 ген у этого вида приходится около 9 тыс. п. н.

Резкое уменьшение количества п. н., приходящихся на 1 ген в соматических клетках *C. kolensis*, первопричиной имеет, безусловно, «сужение» (shrinkage) межгенных областей. Поскольку некоторые регуляторные последовательности, как это установлено на других объектах, могут располагаться на больших расстояниях от самого структурного гена, можно предположить, что система генетической регуляции в соматических клетках после ДХ становится иной по сравнению с клетками *germ line* в результате изменения пространственных взаимоотношений генетических элементов внутри ядра.

Сходство предполагаемых размеров генов у *C. kolensis* и генов *D. melanogaster*, многие из которых секвенированы, позволяет сделать и другое предположение в отношении постдиминуционного генома *C. kolensis*: во время ДХ происходит частичная или полная потеря либо уменьшение размеров интронов. У другого описанного нами вида *Cyclops strenuus strenuus* после двухэтапной (в 5-м и 6-м делениях) ДХ исходный геном в 720 млн п. н. уменьшается до размера генома *D. melanogaster* — 180 млн п. н. и, таким образом, препятствует увеличе-

нию числа структурных генов и генных продуктов. Но не исключено и другое: если геном постдиминуционных клеток *C. kolensis* так близок к геному дрозофилы, а число генов у этих организмов сильно не различается, то тогда соматические клетки могут сохранить и часть, пусть даже небольшую, гетерохроматина, и интерсперсию некодирующих последовательностей, о которой говорилось выше. Однако тип интерсперсии может существенно измениться в зависимости от того, какие последовательности были элиминированы и какие сохранились после ДХ.

Не исключен и иной путь сохранения МКМ хромосом. Допустим, что упомянутая выше разница в размерах додиминуционных анафазных хромосом (в 2 раза) отражает не только степень компактизации различных хромосом, но и реальное содержание ДНК в каждой из них. Отсюда следует, что у *C. kolensis* могут быть такие хромосомы, которые при потере около 95 % ДНК перейдут порог МКМ. Тем не менее этого не происходит. Это означает лишь то, что более точное предположение состоит в том, что большие хромосомы теряют больше ДНК, чем хромосомы меньшей исходной длины. Таким образом, поддержание МКМ осуществляется специальным клеточным механизмом, оперирующим на уровне индивидуальных хромосом.

Тут становится особенно значимой молекулярно-генетическая структура хромосомы, в частности ее насыщенность генами и наличие гетерохроматина. По этим показателям, как установлено в результате частичного выполнения проектов по геному человека и других высших эукариот, отдельные хромосомы могут сильно различаться. Поэтому после удаления, например, почти всего гетерохроматина из больших додиминуционных хромосом в соматических клетках они могут оказаться уже на другом месте, если выстраивать хромосомы по размерам: скажем, имеющая большие гетерохроматиновые блоки хромосома 1 *C. kolensis*, потеряв их, может переместиться на 4-е или даже 5-е место, уступив свою позицию хромосомам, которые понесли меньшие потери.

Мозаичная структура ДНК, элиминируемой в процессе ДХ у *C. kolensis*

эДНК справедливо рассматривать в качестве части генома, ограниченной у видов, имеющих ДХ, линией зародышевых клеток и предназначенной для поддержания вида в ряду поколений. Очевидно, что путь традиционного анализа функций этой ДНК — поиск структурных генов и обслуживающих их регуляторных последовательностей — может дать весьма скромные результаты. В том случае, если гены, контролируемые мейоз и созревание половых клеток, вырезаются из хромосом в процессе ДХ, они должны присутствовать в эДНК и в клетках зародышевой линии. Доля их, особенно у видов, имеющих масштабную ДХ, будет весьма мала, если не сказать незначительна. Остальная эДНК, ограниченная зародышевой линией, представляет собой классический, создаваемый самой клеткой образец «избыточной» ДНК. Таким образом, ДХ у циклопов предоставляет исследователям возможность впервые изучить ту ДНК, которая является избыточной для соматических клеток, но существует в клетках зародышевой линии, пока живет вид.

В условиях, когда мы ничего не знаем о ее функциях, но полагаем, что они все же есть, мы выбрали единственным возможным путем исследования — анализ нуклеотидных последовательностей, входящих в состав эДНК. Эта часть работы выполнена сотрудниками Института общей генетики РАН (Москва) совместно с учеными Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск) во главе с И. Ф. Жимулевым и Н. Б. Рубцовым (Дягтярев и др., 2002; Degtyarev et al., 2004). У *Cyclopoida* для этого имеется уникальная возможность, поскольку эДНК у них заключена в упомянутые выше гранулы, ограниченные плотной мембраной. Именно из этих гранул с помощью микроманипулятора и была извлечена эДНК, клонирована, секвенирована и подвергнута компьютерному анализу. Были изучены фрагменты эДНК из 52 клонов, общая длина их составила 19 400 п. н.; средний размер фрагментов был равен 373 п. н. Размеры клонированных фрагментов отражают расстояния между праймерной последовательностью и ее инвертом в хромосомной ДНК клеток зародышевой линии. В итоге мы имели дело с весьма ограниченным числом последовательностей, которые тем не менее, как свидетельствуют результаты гибридизации *in situ*, представлены, видимо, во всех хромосомах зародышевой линии. В эДНК заметно преобладают АТ-пар над ГЦ-парами (60%: 40%).

Последовательность нуклеотидов каждого фрагмента была переведена в аминокислотную последовательность во всех шести рамках считывания. Сравнение их с банками данных существенной гомологии не выявило. Это означает, что в той минорной части эДНК, которую мы изучали, структурных генов, по-видимому, нет.

Тестирование каждого фрагмента на присутствие в нем гомологичных повторов показало, что многие фрагменты буквально насыщены короткими повторами от 7 до 34 п. н., причем многие члены семейств сохраняют высокую, нередко 100%-ную гомологию по отношению к консенсусной последовательности. Промежутки между повторами могут достигать более 100 п. н. При таком анализе поиск повторяющихся последовательностей ограничен размерами индивидуального фрагмента, и компьютер «не знает», присутствуют ли повторы данного фрагмента или их части в других фрагментах.

На следующем этапе работы поиск повторяющихся последовательностей был проведен для всех 52 фрагментов. В этом случае сфера поиска гомологичных последовательностей, если они присутствуют в нескольких фрагментах, значительно расширяется. Данный тест выявил наибольшие по длине и наиболее точные, т. е. высокогомологичные, повторы, те, которые практически не могут возникнуть случайно. Были обнаружены резкие различия в характере гомологий внутри и между фрагментами. Вместо коротких повторов, столь характерных для внутренней структуры фрагментов, появились протяженные области гомологии между клонированными последовательностями. Этот факт означает, что сами по себе короткие повторы одного фрагмента могут быть частями более длинных повторов. Другими словами, повторы должны рассматриваться как мозаики субповторов. Последние могут как входить в качестве составных частей в другие повторы, так и занимать «независимое» положение в разных частях генома.

Было показано также, что в случае расположения повторов в одном и том же порядке в разных фрагментах эДНК спейсеры между ними могут иметь разную длину и, что особенно примечательно, резко различаться по

степени гомологии в двух сходных по расположению фрагментах. Например, спейсеры между двумя фрагментами, имеющие длину 35 п. н., гомологичны всего лишь на 63%, тогда как гомология в пределах соседних повторов равна 98%. Таким образом, спейсеры играют важную роль в определении уникальности общей структуры тех областей генома, в которых имеется одинаковое расположение повторов.

Но спейсеры, которые разделяют повторы, могут оказаться в других участках генома либо частью какого-либо повтора, либо даже присутствовать во многих фрагментах, т. е. по отношению к геному в целом такой спейсер должен оцениваться как повторяющаяся последовательность.

Полученные факты ясно показывают, что повторяющиеся последовательности в клетках зародышевой линии *C. kolensis* есть, доля их велика и многие из них имеют мозаичную структуру. Но нашей выборки явно недостаточно, для того чтобы определить наличие в этом же геноме истинно уникальных последовательностей и оценить их долю и характер взаимного расположения по отношению к повторам.

Поэтому главным заключением из проведенной работы являются два факта: а) мозаичная структура многих повторов в клетках зародышевой линии, б) высокая степень гомологии внутри отдельных семейств повторов.

Второй факт может быть рассмотрен в тесной связи с первым. Отметим, что гомология участков эукариотических геномов — явление широко распространенное. Его обозначают термином «концертная» (т. е. согласованная) эволюция. Что касается структурных генов, то их гомология может распространяться даже за пределы царств; иными словами, близкие по структуре гены могут быть как у эукариот, так и у прокариот и даже археев. В этом случае гомология генов связана с общностью функций и поддерживается отбором, уничтожающим носители мутантных генов с нарушениями этих функций.

Прежде чем обсуждать причины и механизмы концертной эволюции некодирующих повторов, отметим один весьма яркий факт, касающийся гена H^4 , участвующего в формировании нуклеосом. Гены гистона H^4 рыб, с одной стороны, и высших растений — с другой — по своей последовательности различаются ничтожно. Это может означать лишь то, что для функционирования гистоновых генов у рыб и растений нужна практически идентичная последовательность аминокислот.

Функции некодирующих повторов у эукариот неизвестны. В то же время если степень их гомологии высока — в одном из описанных нами случаев у *C. kolensis* (Degtyarev et al., 2004) три повтора в 57 п. н., локализованных в разных участках генома, сохраняют 100%-ную идентичность, — то можно предположить, что в этом случае мутации будут вредны для неких гипотетических функций этих повторов.

Правда, можно представить механизм концертной эволюции с позиции недавнего происхождения точных повторов от предковой последовательности и последующего расселения ее копий по геному. Но в этом случае просто не будет эволюционного времени для дивергенции этих копий. По сути дела речь должна идти о геномных реорганизациях, которые за время существования вида могли бы происходить неоднократно.

Однако подобные реорганизации для видов, имеющих ДХ, могут иметь отрицательные последствия. В

процессе инсерций-делеций (indel; Gregory, 2001) может меняться нуклеотидная последовательность РХР. Само наличие РХР в сотни и тысячи раз повышает уязвимость генома к мутациям, тем более к локальным реорганизациям генома. Как уже отмечалось выше, отсутствие процессов диминуции в РХР, скорее всего, будет означать летальное событие, так же как и появление в результате различных мутационных событий РХР в не предназначенном для этого участке генома приведет к хромосомным перестройкам. Это означает, что в действительности геномы клеток зародышевой линии и соматических клеток не разделены «китайской стеной», по крайней мере до прохождения процесса ДХ. Мутационные события в клетках зародышевой линии как во время ДХ, так и после нее должны отразиться на развитии следующих поколений.

Принимая во внимание сказанное выше, обратимся к другому механизму концертной эволюции (Elder, Turner, 1995). Он не отрицает появления в тесной связи с моментом видообразования расселившихся по геному амплифицированных последовательностей. Гомология между ними будет поддерживаться рекомбинационными процессами, в особенности генной конверсией. Однако для подобных процессов необходимы действующие на постоянной основе, т. е. воспроизводящиеся в каждом клеточном цикле до и после оплодотворения, контакты между гомологичными последовательностями. Но в ядре нет свободных взаимодействий повторов, подобно тому что имеет место в пробирке, где протекает реакция ренатурации. Там повтор может образовать дуплекс с любым гомологичным повтором из разных участков генома. В клеточном ядре тот же повтор может взаимодействовать лишь с одним или немногими гомологами, насколько это позволяет достаточно жестко фиксированное взаимное расположение хромосом или участков одной хромосомы, содержащих указанные гомологичные повторяющиеся последовательности.

У организмов, размножающихся половым путем, после оплодотворения возникает возможность смены взаимодействующих повторов, в первую очередь если они относятся к гомологичным хромосомам. Но даже если это внутрихромосомное взаимодействие, вероятность встречи двух гомологичных повторов, имеющих разную историю, т. е. содержащих мутацию и без таковой, тоже достаточно велика. Мутации, если говорить о точечных заменах, АТ и ГЦ и наоборот, — явление весьма редкое, и то, что они могут произойти в одном и том же сайте гомологичных повторов, практически невероятно. В этом случае в контакт будут вступать гетерозиготные повторы. Таким образом, в каждом цикле такой сверки мутация будет уничтожаться с вероятностью 50 %, и вскоре мутантная копия исчезнет. Этот механизм был разработан нами с А. И. Потапенко (Akifyev, 1995) для объяснения открытых Штерном и сотрудниками (Hotta, Stern, 1984) точных повторов, выявленных в пахитене мейоза у нескольких различных видов. Так или иначе, концертная эволюция некодирующих повторяющихся последовательностей, со всей очевидностью обнаруженная в ДНК клеток зародышевой линии *C. kolensis*, может быть объяснена наличием рекомбинационных процессов, связанных с организацией хромосом в ядре.

Как видно, эволюционное становление столь сложных процессов, подобных описанным выше, невозможно представить в рамках как традиционного, так и новейшего адаптациогенеза (Воронцов, 1999).

Феномен полиплоидного сброса

Это интересное явление наблюдается в полиплоидных рядах некоторых высших растений. Наиболее значительные факты получены Раджабли (1966) и Ахундовой (1982), работавшими с шелковицей. У *Morus alba* $2n = 28$, тогда как у высокоплоидной формы *M. nigra* $2n = 308$. Таким образом, количество хромосом у этих видов различается в 11 раз. Однако содержание ДНК в ядрах клеток *M. nigra* всего в 4.5 раза превышает таковое у *M. alba*. У высокоплоидного вида все хромосомы чрезвычайно мелкие. Ахундова (1982), используя метод кинетики ренатурации, обнаружила, что потери ДНК у *M. nigra* обусловлены главным образом исчезновением многих семейств высоко- и среднеповторяющихся последовательностей.

Очевидно сходство между ДХ у *Cyclopoidea* и полиплоидным сбросом: в обоих случаях происходит эксцизия участков хромосом, но сама хромосомная структура при этом не только не исчезает, но даже не выходит за пределы разрешения светового микроскопа, т. е. не теряет критической массы. Полиплоидный сброс имеет место в личиночных тканях пчелы *Apis mellifera*. О. В. Капралова (личное сообщение) показала, что хромосомы клеток с высокой плоидностью имеют значительно меньшие размеры хромосом, чем таковые в диплоидных клетках. Исследование структуры ДНК клеток различных стаз пчелы, проведенное Г. А. Худолием и В. В. Батраевым в лаборатории А. П. Акифьева (личное сообщение), выявило значительные геномные реорганизации в полиплоидных клетках, в частности потерю некоторых классов повторяющихся последовательностей.

Все эти факты свидетельствуют о том, что механизм исключения части генома в скрытой форме присутствует у многих видов эукариот. Заметим, что проблема полиплоидного сброса пока еще мало изучена, она ждет своих волонтеров. Возможен и экспериментальный анализ полиплоидного сброса, поскольку создание искусственных полиплоидных систем не представляет большого труда. В этой связи отметим, что классический объект для получения полиплоидных клеток с помощью колхицина — виды рода *Crepis* — были в числе первых, у которых был обнаружен естественный полиплоидный сброс.

Заключение

На протяжении многих лет после открытия парадокса размера генома эукариот феномен ДХ не привлекался (за редчайшими исключениями — Акифьев, Макаров, 1972) к его обсуждению. Статья Прескотта (Prescott, 1992), поскольку она была посвящена реорганизации генома при созревании макронуклеусов гипотрихид, казалось, описывала сугубо маргинальное явление, не имеющее общего значения для эволюции эукариот. Начиная с 1993 г. А. П. Акифьев и А. К. Гришанин (Акифьев, Гришанин, 1993; Акифьев и др., 1998, 2002) стали рассматривать ДХ как явление, при котором клеточный механизм «освобождает» геномы соматических клеток от избытка генетического материала. Представители *Cyclopoidea*, выбранные для изучения ДХ этими авторами, оказались удобным материалом, позволяющим делать достаточно конкретные выводы. Главной особенностью, определившей перспективность *Cyclopoidea*, является эли-

минация огромной доли генома клеток зародышевой линии (пока это 94—95 % у *C. kolensis*) при сохранении исходного числа хромосом. Кроме того, упаковка эДНК в специфические гранулы (Гришанин, 1995, 1996а) позволила экстрагировать наиболее чистые, созданные самой природой образцы эДНК и приступить к изучению их оставшейся до сих пор таинственной молекулярной структуры.

Наиболее важное заключение, которое можно сделать на основании исследования ДХ у всех тех объектов, у которых она известна, начиная от простейших и кончая ракообразными, состоит в том, что избыточный ДНК как таковой в «чистом виде» нет. Элиминируемая ДНК избыточной может считаться только для соматических клеток, поскольку потеря около 95 % ее у *C. kolensis* почти не отражается на процессах развития, дифференцировки и онтогенеза. В то же время ДХ отсутствует у *C. insignis*, обитающего в том же водоеме и обладающего геномом, практически равным по величине геному *C. kolensis* (Гришанин и др., 1996; Grishanin et al., 2004).

Мы не можем в настоящее время полностью отрицать возможные физиологические влияния размеров генома, однако изучая два вида *Cyclopoidea* (*C. insignis* и *C. kolensis*), обитающих в одинаковых экологических условиях и имеющих практически равные по величине геномы клеток зародышевой линии, мы обнаружили, что у *C. kolensis* во время 4-го деления дробления происходит глубокая реорганизация генома (ДХ), во время которой клетки соматической линии теряют около 95 % ДНК при сохранении диплоидного числа хромосом, в то время как у *C. insignis*, обитающего в этом пруду, ДХ не наблюдается. К этим фактам следует добавить и очевидную идентичность размеров геномов соматических и зародышевых клеток московского и байкальского *C. kolensis*, а также наличие ДХ у *C. insignis*, обитающего на территории Германии (Einsle, 1993), что не позволяет рассматривать количество ДНК в ядре, по крайней мере в ядрах соматических клеток, в качестве адаптивного признака.

Для дальнейшего анализа роли «избыточной» ДНК важнейшим фактом является ее сохранение в полном объеме в клетках зародышевой линии в череде поколений, сравнимых, а вероятнее всего, равных числу поколений, в течение которых существует данный вид. Следовательно, для клеток зародышевой линии элиминируемая при ДХ ДНК не является избыточной, не говоря уже о том, что сейчас просто наивно рассматривать 95 % генома *C. kolensis* как набор неких «эгоистических», «паразитических» или «мусорных» последовательностей. Подобная точка зрения лишь свидетельствует о бессилии ее сторонников предложить конструктивные пути изучения биологической роли этой части генома эукариот.

Какие же функции может выполнять ДНК, избыточная для соматических клеток, но неизменно сохраняющаяся в клетках зародышевой линии? Ранее нами (Akifyev et al., 1998) было выдвинуто предположение о том, что эта ДНК создает уникальный молекулярный портрет генома вида и таким образом служит фактором генетической изоляции, препятствуя синапсису гомеологичных хромосом в первом поколении межвидовых гибридов (если таковые могут возникнуть). Сравнение московской и байкальской популяций *C. kolensis*, недавно проведенное нами совместно с сотрудниками Лимнологического института СО РАН (Иркутск), свидетельствует в пользу данной гипотезы. В первую очередь речь идет о консер-

ватизме размеров тотального и постдиминуционного геномов тех и других циклопов. Тут будет уместно коснуться вопроса о роли РХР в поддержании структуры генома видов, у которых имеется ДХ. Как видно из приведенных выше данных, структура РХР может быть различной, например, у аскарид и простейших. Однако, каков бы ни был механизм опознания РХР ферментами ДХ, они не могут разрезать и сшивать хромосому, где угодно, поэтому в основе РХР должны лежать нуклеотидные последовательности, может быть, и не гомологичные, но обладающие двумя свойствами — стабильностью локализации и способностью образовывать структуры, выполняющие в определенный момент развития организма роль сигналов для ферментов ДХ (Van Noort, 2003). В противном случае ДХ либо не состоится в предназначенном сайте, либо переместится в другой район, нарушив структурные и(или) регуляторные участки генов, работающих в соматических клетках. В такой ситуации появление в РХР инсерций-делетий (indel) с высокой вероятностью может исказить процесс ДХ. В целом можно заключить, что наличие РХР и самого процесса ДХ резко, вероятно в тысячи, а может быть, и более раз, делает геномы видов, имеющих ДХ, сопровождающуюся реорганизацией генома, более уязвимыми для мутационных событий, в частности для возникновения хромосомных мутаций.

Два факта, обнаруженных в наших работах (Гришанин и др., 2002; Гришанин, Акифьев, 2005), возможно интерпретировать как указание на наличие систем антимутагенной защиты у *C. kolensis*. Во-первых, это крайне низкий уровень спонтанного мутирования хромосом. В то же время в преддиминуционных клетках при облучении образуется необычно много хромосомных aberrаций. Складывается впечатление, что внесенные радиацией непрограммированные дефекты ДНК становятся «добычей» готовых к работе ферментов диминуции, уже имеющихся в это время в клетках. Отсюда следует, что операции с этими дефектами производятся не так, как с РХР, и, следовательно, последние имеют принципиальные отличия от радиационно индуцированных дефектов. Весьма вероятно также, что в отличие от РХР, имеющих в конечном счете однообразную структуру, радиация вызывает достаточно широкий спектр повреждений.

Крайне низкий уровень спонтанных мутаций на ранних стадиях развития циклопа может быть объяснен отчасти также и тем, что структура яиц и яйцевых мешков надежно блокирует проникновение в клетки основных мутагенов — химических веществ из окружающей среды. Так или иначе, эта система антимиутагенной защиты препятствует образованию по крайней мере структурных мутаций, наличие которых, особенно вне зон РХР, могло бы сильно исказить точность и результаты самого процесса ДХ.

В наших работах (Degtyarev et al., 2004), а также в некоторых других, непосредственно не связанных с ДХ (Gaffney, Keightley, 2004), обнаружены некодирующие последовательности, отличающиеся высокой степенью гомологии. Причин отсутствия дивергенции между гомологичными повторами, находящимися в разных участках генома, может быть две. Во-первых, их недавнее происхождение от какой-либо предковой последовательности. В таком случае эти повторы просто не имели достаточного времени для дивергенции.

Вторая точка зрения подразумевает наличие регуляторных рекомбинационных процессов между некоторы-

ми гомологичными последовательностями (Elder, Turner, 1995; Nabeyama et al., 2000). Анализ последовательностей эДНК у *C. kolensis*, проведенный нами недавно (Degtyarev et al., 2004), позволил обнаружить повторы и субповторы с весьма высоким уровнем гомологии, достигающим иногда до 100 %. Подобная гомология характерна для экзонов, которые находятся под контролем естественного отбора, поскольку они непосредственно участвуют в формировании признаков взрослого организма. Интересную пищу для размышления в этом отношении представляет анализ последовательности СКД-55 (Гришанин и др., 2006), выделенной первоначально из эДНК московского *C. kolensis* (Degtyarev et al., 2004). Оказалось, что эта последовательность присутствует как в до-, так и в последиминуционных геномах и московского, и байкальского *C. kolensis*. В то же время очевидно, что часть этих последовательностей элиминируются из клеток зародышевой линии во время ДХ. Степень дивергенции описываемой последовательности весьма невелика. Это означает, что, несмотря на огромное число поколений, прошедших между разделением *C. kolensis* на московскую и байкальскую популяции (не менее 25 млн поколений), указанная последовательность успешно противостояла факторам естественного мутационного процесса. Мы полагаем, что подобная консервация обусловлена рекомбинационными процессами между отдельными членами данного семейства повторов. В свою очередь это становится возможным лишь в том случае, если в ядрах клеток зародышевой линии существует жесткая упаковка хроматина, в результате которой контакт между данными повторами возобновляется в каждом митотическом цикле, а также после оплодотворения в зиготе. В участках контактов могут возникать временные дуплексные структуры (Akifyev, 1995), в которых происходит сверка взаимодействующих последовательностей, одна из которых в данном сайте может содержать мутацию. Последовательные свертки в конце концов быстро приведут к исчезновению мутации (Akifyev, 1995). Наличие последовательности СКД-55 в постдиминуционных клетках *C. kolensis*, а также у *C. insignis* указывает на то, что обнаруженная последовательность служит важным элементом поддержания структурной организации клеточного ядра данных видов. Поэтому даже при резком уменьшении количества ДНК в соматических клетках *C. kolensis* последовательность СКД-55 не может быть полностью элиминирована в процессе ДХ.

В заключение мы должны отметить, что такой сложный многоэтапный процесс, как ДХ, в частности у аскарид, циклопов и простейших, не мог возникнуть путем постепенного накопления микромутаций. ДХ как таковая должна была возникнуть сразу и в законченном виде. В этом отношении ДХ сравнима с такими эволюционными событиями, как «вылет» первой птицы из яйца рептилий, возникновение глаза позвоночных, сложное поведение жука-бомбардира, и с другими бесчисленными событиями, составлявшими эволюцию (*evolutio* — разрывание плана) на Земле, но ни в коем случае с популяционными процессами. Поэтому ДХ представляет собой инвариантный, мономорфный, по терминологии Ю. П. Алтухова (Алтухов, Абрамова, 2000), признак. Следовательно, ДХ может быть использована для идентификации видов, при которой, в частности, у представителей копепод, приходится сталкиваться, как правило, с серьезными трудностями (Wyngaard, Chinnappa, 1982).

Итак, даже краткое знакомство с фактами, полученными в последнее время исследователями ДХ, позволяет заключить, что сама эта проблема на рубеже XX—XXI вв. переживает ренессанс, поскольку, с одной стороны, она является уникальным инструментом анализа самой главной загадки генома эукариот (проблемы избыточной ДНК), а с другой — развивает нетрадиционные подходы (молекулярно-цитогенетические) к организации генетического аппарата ядра эукариот и ее контроль.

Авторы выражают искреннюю признательность М. А. Грачеву за большой интерес и полезные замечания, сделанные им при обсуждении настоящей работы, а также помощь в организации экспедиции на оз. Байкал и сотрудникам Лимнологического института СО РАН Н. Г. Мельник, Е. Ю. Наумовой и А. Л. Новицкому за помощь при проведении исследований. Мы также сердечно благодарим Т. А. Кетову за большую техническую помощь на всех этапах настоящей работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 03-04-48133а) и программы РАН «Генетические аспекты эволюции биосферы».

Список литературы

- Акифьев А. П. 1974. «Молчащая» ДНК и ее роль в эволюции. Природа. 9 : 49—54.
- Акифьев А. П. 1993. Концепция базигенома и критической массы хромосом эукариот. Докл. РАН. 332 : 96—98.
- Акифьев А. П., Гришанин А. К. 1993. Некоторые биологические аспекты диминуции хроматина. Журн. общей биол. 54 : 5—15.
- Акифьев А. П., Гришанин А. К., Дегтярев С. В. 1998. Диминуция хроматина, сопровождающиеся реорганизацией молекулярной структуры генома: эволюционные аспекты. Генетика. 34 : 709—718.
- Акифьев А. П., Гришанин А. К., Дегтярев С. В. 2002. Диминуция хроматина — ключевой процесс для объяснения парадокса размера генома эукариот и некоторых механизмов генетической изоляции. Генетика. 38 : 595—606.
- Акифьев А. П., Макаров В. Б. 1972. Генетическая и функциональная организация хромосом высших растений и животных. Успехи соврем. биол. 74 : 401—419.
- Албертс Б., Брэй Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. 1994. Эволюция клетки. В кн.: Молекулярная биология клетки. М.: Мир. 1 : 25—27.
- Алтухов Ю. П., Абрамова А. Б. 2000. Мономорфная видо-специфичная ДНК, выявляемая в полимеразной цепной реакции со случайными праймерами. Генетика. 36 : 1677—1681.
- Ахундова Э. М. 1982. Полиплоидия и ДНК. Баку: Элм. 107 с.
- Воронцов Н. Н. 1999. Развитие эволюционных идей в биологии. М.: Издат. отдел УНЦ ДО МГУ МГХ Прогресс-традиция, АБФ. 640 с.
- Гришанин А. К. 1995. Сравнительное электронно-микроскопическое изучение хромосом и интерфазных ядер в клетках зародыша *Cyclops kolensis* (Copepoda, Crustacea) до и после диминуции хроматина. Онтогенез. 26 : 188—195.
- Гришанин А. К. 1996а. Влияние элиминируемого хроматина в клетках зародыша циклопа *Cyclops kolensis* с помощью сканирующей электронной микроскопии. Цитология. 38 (10) : 1115—1117.
- Гришанин А. К. 1996б. Особенности диминуции хроматина у *Cyclops kolensis* и *Cyclops strenuus strenuus* (Crustacea, Copepoda): Автореф. канд. дис. М. 24 с.

- Гришанин А. К., Акифьев А. П. 1993. Диминуция хроматина и организация хромосом у *Cyclops strenuus strenuus*. Генетика. 7 : 1099—1107.
- Гришанин А. К., Акифьев А. П. 2005. Особенности радиационного мутагенеза у *Cyclops kolensis* и *Cyclops insignis* (Crustacea, Copepoda). Радиобиология. Радиоэкология. 45 : 294—298.
- Гришанин А. К., Бойкова Т. В., Маршак Т. Л., Акифьев А. П., Жимулев И. Ф. 2006. Сравнительный анализ размера генома и особенностей диминуции хроматина у байкальской и московской популяций *Cyclops kolensis*. Докл. РАН. (В печати).
- Гришанин А. К., Бродский В. Я., Акифьев А. П. 1994. Соматические клетки *Cyclops strenuus* (Copepoda, Crustacea) теряют при диминуции хроматина более 90 % генома. Докл. РАН. 338 : 708—710.
- Гришанин А. К., Дегтярев С. В., Акифьев А. П. 2002. Радиочувствительность хромосом в связи с диминуцией хромосом у циклопов (Crustacea, Copepoda). Генетика. 38 : 468—472.
- Гришанин А. К., Худолый Г. А., Шайхаев З. Г. О., Бродский В. Я., Макаров В. Б., Акифьев А. П. 1996. Диминуция хроматина у *Cyclops kolensis* и *Cyclops strenuus strenuus* (Copepoda, Crustacea) — уникальный пример геномной инженерии в природе. Генетика. 32 : 492—499.
- Дегтярев С. В., Гришанин А. К., Белякин С. Н., Рубцов Н. Б., Жимулев И. Ф., Акифьев А. П. 2002. Нуклеотидные последовательности ДНК, элиминируемые в процессе диминуции хроматина их хромосом соматических клеток *C. kolensis*. Докл. РАН. 384 : 255—258.
- Жимулев И. Ф. 1993. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск: Наука. 491 с.
- Лукашенко Н. П., Рыбакова З. И. 1991. Структура и функция геномов простейших. М.: Наука. 127 с.
- Раджабли С. И. 1966. Цитологическое исследование шелковицы. Сравнительное изучение селекционных сортов шелковицы. В кн.: Экспериментальная полиплоидия в селекции растений. Новосибирск: Наука. 216—234.
- Райков И. Б. 1978. Ядро простейших. Морфология и эволюция. Л.: Наука. 328 с.
- Оленов Ю. М. 1961. Некоторые проблемы эволюционной генетики и дарвинизма. М.; Л., Изд-во АН СССР. 186 с.
- Aeby P., Spicher A., de Chastonay Y., Müller F., Tobler H. 1986. Structure and genomic organization of proretrovirus-like elements partially eliminated from the somatic genome of *Ascaris lumbricoides*. EMBO J. 5 : 3353—3360.
- Akifyev A. P. 1995. Mechanisms of the production of chromosomal aberration in eucaryotic cells. Physiol. General. Biol. Rev. 10 : 1—56.
- Albertson D. G., Nwaorgu O. C., Sulston J. E. 1979. Chromatin diminution and a chromosomal mechanism of sexual differentiation in *Strongyloides papillosus*. Chromosoma. 75 : 75—87.
- Ammermann D. 1971. Morphology and development of the macronuclei of the ciliates *Stylonychia mytilus* and *Euplotes aediculatus*. Chromosoma. 33 : 209—238.
- Ammermann D., Steinbruck G., von Berger L., Hennig W. 1974. The development of the macronucleus in the ciliated protozoan *Stylonychia mytilus*. Chromosoma. 45 : 401—429.
- Bachmann-Waldmann C., Jentsch S., Tobler H., Müller F. 2004. Chromatin diminution leads to rapid evolutionary changes in the organization of the germ line genomes of the parasitic nematodes. *A. suum* and *P. univalens*. Mol. Biochem. Parasitol. 134 : 53—64.
- Baird S. E., Fino G. M., Tausta S. L., Klobutcher L. A. 1989. Micronuclear genome organization in *Euplotes crassus*: a transposon-like element is removed during macronuclear development. Mol. Cell. Biol. 9 : 3793—3807.
- Bantock C. R. 1961. Chromosome elimination in Cnidomyidae. Nature. 190 : 466—467.
- Bantock C. R. 1970. Experiments in the chromosome elimination in the gall midge, *Mayetiola destructor*. J. Embryol. Exp. Morphol. 24 : 257—286.
- Bauer H. 1970. Rearrangements between germ-line limited and somatic chromosomes in *Smittia parthenogenetica* (Chironomidae, Diptera). Chromosoma. 32 : 1—10.
- Bauer H., Beermann W. 1952. Der Chromosomencyclus der Orthocladiiinen (Nematocera, Diptera). Z. Naturforsch. 76 : 557—563.
- Beermann S. 1959. Chromatin diminution bei Copepoden. Chromosoma. 10 : 504 : 514.
- Beermann S. 1966. A quantitative study of chromatin diminution in embryonic mitosis of *Cyclops furcifer*. Genetics. 54 : 567—576.
- Beermann S. 1977. The diminution of heterochromatic chromosomal segments in *Cyclops* (Crustacea, Copepoda). Chromosoma. 60 : 297—344.
- Beermann S. 1984. Circular and linear structures in chromatin diminution of *Cyclops*. Chromosoma. 89 : 321—328.
- Beermann S., Meyer G. F. 1980. Chromatin rings as products of chromatin diminution in *Cyclops furcifer*. Chromosoma. 77 : 277—284.
- Boveri T. 1887. Ueber Differenzierung der Zellkerne während der Furchung des Eies von *Ascaris megaloccephala*. Anat. Anz. 2 : 688—693.
- Bregman A. A. 1975. Q-, C- and G-banding patterns in the germ-line and somatic chromosomes of *Miastor* sp. (Diptera: Cecidomyiidae). Chromosoma. 53 : 119—130.
- Brown S. W., Chandra H. S. 1977. Chromosome imprinting and the differential regulation of homologous chromosomes. In: Cell biology: a comprehensive treatise. Genetic mechanisms of cells. New York: Acad. Press. 1 : 109—189.
- Camenzind R. 1974. Chromosome elimination in *Heteropeza pygmaea*. I. *In vitro* observations. Chromosoma. 49 : 87—98.
- Coyne R. S., Chalker D. L., Yao M.-C. 1996. Genome downsizing during ciliate development: nuclear division of labor through chromosome restructuring. Ann. Rev. Genet. 30 : 57—78.
- Coyne R. S., Yao M.-C. 1996. Evolutionary conservation of sequences directing chromosome breakage and rDNA palindrome formation in Tetrahymenine ciliates. Genetics. 144 : 1479—1487.
- Degtyarev S., Boykova T., Grishanin A., Belyakin S., Rubtsov N., Karamysheva T., Makarevich G., Akifyev A., Zhimulev I. 2004. The molecular structure of the DNA fragments eliminated during chromatin diminution in *Cyclops kolensis*. Genome Res. 14 : 2287—2294.
- Einsle U. 1993. Crustacea: Copepoda: Calanoida und Cyclopoidea. Subwasserfauna on Mitteleuropa Bd.8/Heft 4/Teil. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. 1 : 1—209.
- Elder J. F., Turner B. J. 1995. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eucaryotes. Q. Rev. Biol. 70 : 297—320.
- Esteban M. R., Giovinazzo G., Goday C. 1995. Chromatin diminution is strictly correlated to somatic behavior in early development of the nematode *Parascaris univalens*. J. Cell Sci. 108 : 2393—2404.
- Esteban M. R., Giovinazzo G., de la Hera A., Goday C. 1998. PUMA1: a novel protein that associates with the centrosomes, spindle and centromeres in the nematode *Parascaris*. J. Cell Sci. 111 : 723—735.
- Etter A., Aboutanos M., Tobler H., Müller F. 1991. Eliminated chromatin of *Ascaris* contains a gene that encodes a putative ribosomal protein. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 88 : 1593—1596.
- Etter A., Bernard V., Kenzelmann M., Tobler H., Müller F. 1994. Ribosomal heterogeneity from chromatin diminution in *Ascaris lumbricoides*. Science. 265 : 954—956.
- Fan Q., Yao M.-C. 1996. New-telomere formation coupled with site-specific chromosome breakage in *Tetrahymena thermophila*. Mol. Cell. Biol. 16 : 1267—1274.
- Fan Q., Yao M.-C. 2000. A long stringent sequence for programmed chromosome breakage in *Tetrahymena thermophila*. Nucl. Acids Res. 28 : 895—900.
- Felder H., Herzceg A., de Chastonay Y., Aeby P., Tobler H., Müller F. 1994. Tas, a retrotransposon from the parasitic nematode *Ascaris lumbricoides*. Gene. 149 : 219—225.
- Gabriel M. 1960. Primitive genetic mechanism and the origin of chromosome. Amer. Naturalist. 54 : 257—269.
- Gaffney D. J., Keightley P. D. 2004. Unexpected conserved non-coding DNA block in mammals. Trends Genet. 20 : 332—337.

- Gerbi S. A. 1986. Unusual chromosome movements in sciarid flies. In: Germ line-soma differentiation. Results and problems in cell differentiation. New York: Springer Verlag. 13 : 71—104.
- Geyer-Duszynska I. 1959. Experimental research on chromosome elimination in Cecidomyiidae (Diptera). J. Exp. Zool. 141 : 391—441.
- Geyer-Duszynska I. 1961. Spindle disappearance and chromosome behavior after partial embryo irradiation in Cecidomyiidae. Chromosoma. 12 : 233—247.
- Goday C., Ciofi-Luzzatto A., Pimpinelli S. 1985. Centromere ultrastructure in germ-line chromosomes of *Parascaris*. Chromosoma. 91 : 121—125.
- Goday C., Esteban M. R. 2001. Chromosome elimination in sciarid flies. BioEssays. 23 : 242—250.
- Goday C., Gonzales-Garcia J. M., Esteban M. R., Giovinezza G., Pimpinelli S. 1992. Kinetochores and chromatin diminution in early embryos of *Parascaris univalens*. J. Cell Biol. 118 : 23—32.
- Goday C., Pimpinelli S. 1984. Chromosome organization and heterochromatin elimination in *Parascaris*. Science. 224 : 411—413.
- Goday C., Pimpinelli S. 1986. Cytological analysis of chromosomes in the two species *Parascaris univalens* and *P. equorum*. Chromosoma. 94 : 1—10.
- Goday C., Pimpinelli S. 1989. Centromere organization in meiotic chromosomes of *Parascaris univalens*. Chromosoma. 98 : 160—166.
- Goday C., Pimpinelli S. 1993. The occurrence, role and evolution of chromatin diminution in nematodes. Parasitol. Today. 9 : 319—322.
- Goto Y., Kubota S., Kohno S. 1998. Highly repetitive DNA sequences that are restricted to the germ line in the hagfish *Eptatretus cirrhatus*: a mosaic of eliminated elements. Chromosoma. 107 : 17—32.
- Gregory T. R. 2001. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. Biol. Rev. 76 : 65—101.
- Gregory T. R., Hebert P. D. N. 1999. The modulation of DNA content: proximate causes and ultimate consequences. Genome Res. 9 : 317—324.
- Greslin A. F., Prescott D. M., Oka Y., Loukin S. H., Chappel J. C. 1989. Reordering of nine exons is necessary to form a functional actin gene in *Oxytricha nova*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 86 : 6264—6268.
- Grishanin A. K., Dams H.-U., Akifiev A. P. 2004. Nuclear DNA and remarks on chromatin diminution in cyclopoid copepods. Zool. Stud. 43 : 8—19.
- Hägele K. I. 1980. Studies on polytene chromosomes of *Smittia parthenogenetica* (Chironomidae, Diptera). Characterization of a chromosome insertion from a germ-line limited chromosome. Chromosoma. 76 : 47—55.
- Hayman D. L., Martin P. G. 1965. Sex chromosome mosaicism in the marsupial genera *Isoodon* and *Perameles*. Genetics. 52 : 1201—1206.
- Hayman D. L., Martin P. G., Waller P. F. 1969. Parallel mosaicism of supernumerary chromosomes and sex chromosomes in *Echymipera kalabu* (Marsupialia). Chromosoma. 27 : 371—380.
- Hedges S. B. 2002. The origin and evolution of model organisms. Nature Rev. Genet. 3 : 838—848.
- Hennig W., Brand R. C., Hackstein J., Huijser P., Kirchoff C., Kremer H., Lankenau D. H., Vogt P. 1987. Structure and function of Y-chromosomal genes in *Drosophila*. Chromosomes Today. 9 : 48—58.
- Hotta Y., Stern H. 1984. The organization of DNA segments undergoing repair synthesis during pachytene. Chromosoma. 89 : 127—137.
- Huang Y. J., Stoffel R., Tobler H., Müller F. 1996. A newly formed telomere in *Ascaris suum* does not exert a telomere position effect on a nearby gene. Mol. Cell. Biol. 16 : 130—134.
- Jahn C. L. 1988. Bal 31 sensitivity of micronuclear sequences homologous to C4A4/G4T4 repeats in *Oxytricha nova*. Exp. Cell Res. 177 : 162—175.
- Jahn C. L., Krikau M. F., Shyman S. 1989. Developmentally coordinated en masse excision of a highly repetitive element in *E. crassus*. Cell. 59 : 1009—1018.
- Jaraeczewski J. W., Jahn C. L. 1993. Elimination of Tec elements involves a novel excision process. Genes Develop. 7 : 95—105.
- Jentsch S., Tobler H., Müller F. 2002. New telomere formation during the process of chromatin diminution in *Ascaris suum*. Int. J. Develop. Biol. 46 : 143—148.
- Johnston P. G., Watson C. M., Adams M., Paull D. J. 2002. Sex chromosome elimination, X chromosome inactivation and reactivation in the southern brown bandicoot *Isoodon obesulus* (Marsupialia: Peramelidae). Cytogenet. Genome Res. 99 : 119—124.
- Jonsson F., Postberg C., Scaffitzel H. J. 2002. Organization of the macronuclear gene-sized pieces of stichotrichous ciliated into a higher order structure via telomere-matrix interactions. Chromosome Res. 10 : 445—453.
- Jonsson F., Steinbruck G., Lipps H. J. 2001. Both subtelomeric regions are required and sufficient for specific DNA fragmentation during macronuclear development in *Stylonychia lemnae*. Genome Biol. Res. 2005 : 1—11.
- Jonsson F., Wem J. P., Fetzer C. P., Lipps H. J. 1999. A subtelomeric DNA sequence is required for correct processing of the macronuclear DNA sequences during macronuclear development in the hypotrichous ciliate *Stylonychia lemnae*. Nucl. Acids Res. 27 : 2832—2841.
- Klobutcher L. A. 1987. Micronuclear organization of macronuclear genes in the hypotrichous ciliate *Oxytricha nova*. J. Protozool. 34 : 424—428.
- Klobutcher L. A. 1999. Characterization of *in vivo* developmental chromosome fragmentation intermediates in *Euplotes crassus*. Mol. Cell. 4 : 695—704.
- Klobutcher L. A., Gygas S. E., Podoloff J. D., Vermeesch J. R., Price C. M., Tebeau C. M., Jahn C. L. 1998. Conserved DNA sequences adjacent to chromosome fragmentation sites in *Euplotes crassus*. Nucl. Acids Res. 26 : 4230—4240.
- Kloetzel I. A. 1970. Compartmentalization of the developing macronucleus following conjugation in *Stylonychia* and *Euplotes*. J. Cell Biol. 47 : 395—407.
- Kohno S., Nakai Y., Satoh S., Yoshida M., Kobayashi H. 1986. Chromosome elimination in Japanese hagfish, *Eptatretus burgeri* (Agnatha, Cyclostomata). Cytogenet. Cell Genet. 41 : 209—214.
- Kubota S., Ishibashi T., Kohno S. 1997. A germline restricted, highly repetitive DNA sequence in *Paramyxine atami*: an interspecifically conserved, but somatically eliminated, element. Mol. Gen. Genet. 256 : 252—256.
- Kubota S., Kuro-o M., Mizuno S., Kohno S. 1993. Germ line-restricted, highly repeated DNA sequences and their chromosomal localization in a Japanese hagfish (*Eptatretus okinoseanus*). Chromosoma. 102 : 163—173.
- Kubota S., Nakai Y., Kuro-o M., Kohno S. 1992. Germ-line restricted supernumerary (B) chromosomes in *Eptatretus okinoseanus*. Cytogenet. Cell Genet. 60 : 224—228.
- Kubota S., Takano J.-I., Tsuneishi R., Kobayakawa S., Fujikawa N., Nabeyama M., Kohno S. I. 2001. Highly repetitive DNA families restricted to germ cells in a Japanese hagfish (*Eptatretus burgeri*): a hierarchical and mosaic structure in eliminated chromosomes. Genetica. 111 : 319—328.
- Kunz W., Eckhardt R. A. 1974. The chromosomal distribution of satellite DNA in the germ-line and somatic tissues of the gall midge, *Heteropeza pygmaea*. Chromosoma. 47 : 1—19.
- Kunz W., Trepte H.-H., Bier K. 1970. On the function of the germ line chromosomes of *Wachtliella persicariae* (Cecidomyiidae). Chromosoma. 30 : 180—192.
- Kuroiawa T., Kawazu T., Fakanashi H., Suzuki K., Ohta N., Kuroiawa H. 1994. Comparison of ultrastructures between the ultra-small eucaryote *Cyanidioschyzon merole* and *Cyanidium caldarium*. Caryologia. 59 : 149—158.
- Landolt P., Tobler H. 1988. Organization of DNA sequences in the genome of the nematode *Ascaris lumbricoides* before and after diminution. Mol. Cell. Biol. 7 : 33—42.

- Leech D. M., Wyngaard G. A. 1996. Timing of chromatin diminution in the free-living fresh-water Cyclopidae (Copepoda). *J. Crust. Biol.* 16 : 496—500.
- Locke J., McDermid H. E. 1993. Analysis of Drosophila chromosome 4 using pulsed field gel electrophoresis. *Chromosoma*. 102 : 718—723.
- Magenat L., Tobler H., Müller F. 1999. Developmentally regulated telomerase activity is correlated with chromosomal healing during chromatin diminution in *Ascaris suum*. *Mol. Cell. Biol.* 19 : 3457—3465.
- Moritz K. B., Roth G. E. 1976. Complexity of germline and somatic DNA in *Ascaris*. *Nature*. 259 : 55—57.
- Müller F., Aeby P., Schaller D., Tobler H. 1986. Qualitative differences between germ line and somatic DNA sequences in *Ascaris lumbricoides*. *Experientia*. 42 : 691.
- Müller F., Tobler H. 2000. Chromatin diminution in the parasitic nematodes *Ascaris suum* and *Parascaris univalens*. *Int. J. Parasitol.* 30 : 391—399.
- Müller F., Walker P., Aeby P. et al. 1982. Nucleotide sequence of satellite DNA contained in the eliminated genome of *Ascaris lumbricoides*. *Nucl. Acids Res.* 10 : 7493—7510.
- Müller F., Wicky C., Spicher A., Tobler H. 1991. New telomere formation after developmentally regulated chromosomal breakage during the process of chromatin diminution in *Ascaris lumbricoides*. *Cell*. 67 : 815—822.
- Murray J. D., McKay G. M., Sharman G. B. 1979. Studies on metatherian sex chromosomes. IX. Sex chromosomes of the greater glider (Marsupialia: Petauridae). *Austral. J. Biol. Sci.* 32 : 375—386.
- Murti K. G. 1976. Organization of genetic material in the macronucleus of hypotrichous ciliates. New York: Plenum Press. 5 : 113—137.
- Nabeyama M., Kubota S., Kohno S. 2000. Concerted evolution of a highly repetitive DNA family in Eptatretidae (Cyclostomata, Agnatha) implies specifically differential homogenization and amplification events in their germ cells. *J. Mol. Evol.* 50 : 154—169.
- Nakai Y., Kubota S., Goto Y., Ishibashi T., Davison W., Kohno S. 1995. Chromosome elimination in three Baltic, south Pacific and north-east Pacific hagfish species. *Chromosome Res.* 3 : 321—330.
- Nakai Y., Kubota S., Kohno S. 1991. Chromatin diminution and chromosome elimination in four Japanese hagfish species. *Cytogenet. Cell Genet.* 56 : 196—198.
- Nelson-Rees W. A., Hoy M. A., Roush R. T. 1980. Heterochromatinization, chromatin elimination and haploidization in the parahaploid mite *Metaseilus occidentalis* (Nesbitt) (Acarina: Phytoseiidae). *Chromosoma*. 77 : 263—276.
- Nicklas R. B. 1959. An experimental and descriptive study of chromosome elimination in *Miastor* spec. (Cecidomyiidae; Diptera). *Chromosoma*. 10 : 301—336.
- Nicklas R. B. 1960. The chromosome cycle of a primitive cecidomyiid — *Mycophila speyeri*. *Chromosoma*. 11 : 402—418.
- Niedermaier J., Moritz K. B. 2000. Organization and dynamics of satellite and telomere DNAs in *Ascaris*: implications for formation and programmed breakdown of compound chromosomes. *Chromosoma*. 109 : 439—452.
- Painter T. S. 1966. The role of the E-chromosomes in Cecidomyiidae. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 56 : 853—855.
- Panelius S. 1968. Germ line and oogenesis during paedogenetic reproduction in *Heteropeza pygmaea* Winnertz (Diptera: Cecidomyiidae). *Chromosoma*. 23 : 333—345.
- Panelius S. 1971. Male germ line, spermatogenesis and karyotypes of *Heteropeza pygmaea* Winnertz (Diptera: Cecidomyiidae). *Chromosoma*. 32 : 295—331.
- Pimpinelli S., Goday C. 1989. Unusual kinetochores and chromatin diminution in *Parascaris*. *Trends Genet.* 5 : 310—315.
- Prescott D. M. 1992. The unusual organization and processing of genomic DNA in hypotrichous ciliates. *Trends Genet.* 8 : 439—445.
- Prescott D. M. 1998. Invention and mystery in Hypotrich DNA. *J. Euk. Microbiol.* 45 : 575—581.
- Prescott D. M. 2000. Genome gymnastics: unique modes of DNA evolution and processing in ciliates. *Nat. Rev. Genet.* 1 : 191—198.
- Radzikowski S. 1979. Asynchronous replication of polytene chromosome segments of the new macronucleus anlage in *Chilodoneilla cucullulus* O. F. Muller. *Protistologica*. 4 : 521—526.
- Rieffel S. M., Crouse H. V. 1966. The elimination and differentiation of chromosomes in the germ line of *Sciara*. *Chromosoma*. 19 : 231—276.
- Roth G. E., Moritz K. B. 1981. Restriction enzyme analysis of the germ line limited DNA of *Ascaris suum*. *Chromosoma*. 83 : 169—190.
- Roth M., Prescott D. M. 1985. DNA intermediates and telomere addition during genome reorganization in *Euplotes crassus*. *Cell*. 41 : 411—417.
- Seidl C., Moritz K. B. 1998. A novel UV-damaged DNA binding protein emerges during the chromatin-eliminating cleavage period in *Ascaris suum*. *Nucl. Acids Res.* 26 : 768—777.
- Shapiro J. 1992. Natural genetic engineering in evolution. *Genetica (the Hague)*. 86 : 99—111.
- Spear B. B., Lauth M. R. 1976. Polytene chromosomes of Oxytricha: biochemical changes during macronuclear development in a ciliated protozoan. *Chromosoma*. 54 : 1—13.
- Spicher A., Etter A., Bernard V., Tobler H., Müller F. 1994. Extremely stable transcripts may compensate for the elimination of the gene fert-1 from all *Ascaris lumbricoides* somatic cells. *Development*. 164 : 72—86.
- Staiber W. 1987. Unusual germ line limited chromosomes in *Acricotopus lucidus* (Diptera, Chironomidae). *Genome*. 29 : 702—705.
- Staiber W. 1988. G-banding of germ line limited chromosomes in *Acricotopus lucidus* (Diptera, Chironomidae). *Chromosoma*. 97 : 231—234.
- Staiber W. 1989. Multivalent formation and pairing behavior of germ line limited chromosomes in male meiosis of *Acricotopus lucidus* (Diptera, Chironomidae). *Genome*. 32 : 941—945.
- Staiber W. 1991a. Structural homologies between germ line limited and soma chromosomes in *Acricotopus lucidus* (Diptera, Chironomidae). *J. Hered.* 82 : 247—249.
- Staiber W. 1991b. Preferential pairing in the germ line limited chromosomes of *Acricotopus lucidus* (Diptera, Chironomidae). *Heredity*. 66 : 197—201.
- Staiber W. 2000. Immunocytological and FISH analysis of pole cell formation and soma elimination of germ line-limited chromosomes in the chironomid *Acricotopus lucidus*. *Cell Tissue Res.* 302 : 189—197.
- Staiber W. 2002. Isolation of a new germ line-specific repetitive DNA family in *Acricotopus* by microdissection of polytenized germ line-limited chromosome sections from a permanent larval salivary gland preparation. *Cytogenet. Genome Res.* 98 : 210—215.
- Staiber W., Schiffkowsky C. 2000. Structural evolution of the germ line-limited chromosomes in *Acricotopus*. *Chromosoma*. 09 : 343—349.
- Staiber W., Thudium D. 1986. X-ray induced rearrangements between germ-line limited and soma chromosomes of *Acricotopus lucidus* (Diptera, Chironomidae). *Genetica*. 69 : 149—156.
- Staiber M., Wahl S. 2002. Painting analysis of meiotic metaphase I configurations of the germ line-limited chromosomes in *Acricotopus*. *Chromosome Res.* 10 : 101—108.
- Staiber W., Wech I., Preiss A. 1997. Isolation and localization of a germ line-specific highly repetitive DNA family in *Acricotopus lucidus* (Diptera, Chironomidae). *Chromosoma*. 106 : 267—275.
- Standiford D. M. 1988. The development of a large nucleolus during oogenesis in *Acanthocyclops vernalis* (Crustacea, Copepoda) and its possible relationship to chromatin diminution. *Biol. Cell*. 63 : 35—40.
- Standiford D. M. 1989. The effect of chromatin diminution on the pattern of C-banding in the chromosomes of *Acanthocyclops vernalis* Fischer (Copepoda: Crustacea). *Genetika*. 79 : 207—214.
- Standiford D. M., Gregg T. G. 1989. Development of the large nucleolus in the oocytes of the copepod *Acanthocyclops vernalis*: an electron microscope study. *Biol. Cell*. 65 : 127—132.

Stanley H. P., Kasinsky H. E., Bols N. C. 1984. Meiotic chromatin diminution in a vertebrate, the holocephalan fish *Hydrolagus collei* (Chondrichthyes, Holocephali). *Tissue and Cell*. 16 : 203—215.

Steinbrück G. 1986. Molecular reorganization during nuclear differentiation in ciliates. In: Hennig W. (Ed.). *Germ line-soma differentiation; results and problems in cell differentiation*. Berlin: Springer. 13 : 105—174.

Stuart J. J., Hatchett J. H. 1988. *Cytogenetics of the Hessian fly *Mayetiola destructor**. II. Inheritance and behavior of somatic and germ-line-limited chromosomes. *J. Hered.* 79 : 190—199.

Sutton W. S. 1903. The chromosomes in heredity. *Biol. Bull.* 4 : 231—251.

Sutton W. S. 1959. Partial reproduction. In: *Classic papers in genetics*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs. 27—41.

Teschke C., Solleder G., Moritz K. B. 1991. The highly variable pentameric repeats of the AT-rich germline limited DNA in *Parascaris univalens* are the telomeric repeats of somatic chromosomes. *Nucl. Acids Res.* 19 : 2677—2684.

Thomas C., Prasad R. S. 1980. Chromosome elimination in *Ctenocephalides orientis* (Siphonaptera). *Cytobios.* 29 : 109—114.

Tobler H. 1986. The differentiation of germ and somatic cell lines in nematodes. In: *Germ line-soma differentiation; results and problems in cell differentiation*. Berlin: Springer. 13 : 1—69.

Tobler H., Etter A., Müller F. 1992. Chromatin diminution in nematode development. *Trends Genet.* 8 : 427—432.

Tobler H., Müller F., Back E., Aeby P. 1985. Germ line-soma differentiation in *Ascaris*: a molecular approach. *Experientia.* 41 : 1311—1319.

Van Noort V., Worning P., Ussery D. W., Rosche N. A., Sindén R. R. 2003. Strand misalignments lead to quasipalindrome correction. *Trends Genet.* 19 : 365—368.

Vinogradov A. 2005. Noncoding DNA, isochores and gene expression: nucleosome formation potential. *Nucl. Acids Res.* 33 : 559—563.

Weismann A. 1892. *Das Keimplasma. Eine Theorie der Vererbung*. Jena: Gustav Fischer. 628 p.

Wyngaard G. A., Chinnappa C. C. 1982. General biology and cytology of cyclopoids. In: *Developmental biology of freshwater invertebrates*. New York: Alan R. Liss. 1 : 485—533.

Wyngaard G. A., Gregory T. R. 2001. Temporal control of DNA replication and the adaptive value of chromatin diminution in Copepods. *J. Exp. Zool. (Mol. Develop. Evol.)*. 291 : 310—316.

Wyngaard G. A., Rasch E. M. 2000. Patterns of genome size in the copepoda. *Hydrobiologia.* 417 : 43—56.

Zhimulev I. F. 1998. Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect variegation. *Adv. Genet.* 37 : 1—566.

Поступила 4 V 2005

THE PROBLEM OF CHROMATIN DIMINUTION AT THE BORDER OF THE XX AND XXI CENTURIES

A. K. Grishanin,¹ S. V. Shekhovtsov,² T. V. Boykova,² A. P. Akifyev,¹ I. F. Zhimulev²

¹ N. I. Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, and ² Institute of Cytology and Genetics RAS, Novosibirsk; e-mail: grishanin@vigg.ru

The size of genomes in eukaryotic organisms is one of the greatest mysteries of biology. As known from the middle of the XX century, the level of organization of a particular organism, does not depend on its genome size, i. e. on DNA amount in the nucleus. We believe that an actual function of non-coding DNA stands behind the phenomenon of chromatin diminution, known already for 100 years. Diminution of chromatin normally takes place in cells involved in body building and never occurs in developmental precursors of germ cells. Apparently, the former are cells, in which non-coding DNA is functionally significant. We cloned a fraction of DNA eliminated during chromatin diminution of *Cyclops kolensis* (Cyclopoida, Crustascea) and sequenced 90 clones totally making 32 kb. Taken together, the provided evidence has demonstrated a high organization ordering of DNA sequences restricted to the germ line. Chromatin diminution never takes place in human cells and in cells of the majority of animals. These cells may isolate non-coding DNA in other ways, making it unreactable for most enzymes and thus functionally cut off. Thus, a certain part of genome with a particular size and structure may serve for genetic isolation of species as shellfish or junk DNA are vital components rather than pieces of garbage.