

УДК 575.22:595.341.4

Диминуция хроматина регулирует число генов рРНК у веслоногих раков

М. В. Загоскин^{1*}, Т. Л. Маршак², Д. В. Муха¹, А. К. Гришанин^{1#}¹Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3²Учреждение Российской академии наук Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

*E-mail: zagoskin_mv@mail.ru, #andreygrishanin@mail.ru

Поступила в редакцию 20.09.2010 г.

РЕФЕРАТ Методом ПЦР в реальном времени получены данные, показывающие, что в результате 16-кратной редукции генома *Cyclops kolensis* (15.3 пг до и 0.98 пг после диминуции хроматина) число копий генов рРНК в геноме клеток соматической линии уменьшается более чем на два порядка. Предполагается, что диминуцию хроматина можно рассматривать как механизм регулирования числа копий рДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА диминуция хроматина, гены рибосомной РНК, Copepoda, ПЦР в реальном времени, копияемость генов.

ВВЕДЕНИЕ

Диминуция хроматина (ДХ) – это запрограммированный процесс удаления значительной части хроматина из генома клеток-предшественников соматической линии, встречающийся на ранних этапах развития некоторых многоклеточных эукариот, или из соматического ядра (макронуклеуса) в ходе его формирования у простейших. Явление ДХ известно уже более 100 лет, тем не менее, оно обнаружено у весьма ограниченного числа видов (менее 100), принадлежащих столь же небольшому количеству групп организмов: простейшие, нематоды, миксины, веслоногие раки [1, 2]. Насчитывается около 20 видов циклопов, у которых описана ДХ [1].

В геноме большинства видов эукариот гены рРНК представлены большим числом копий и организованы в виде цистрона. Тандемно повторяющиеся копии рДНК формируют один или несколько кластеров, которые могут располагаться на одной или нескольких хромосомах [3]. За последние несколько десятков лет накоплено множество сведений о структурно-функциональной организации генов рРНК [4–6]. Исследования последних лет направлены главным образом на изучение механизмов регуляции транскрипционной активности генов рРНК. Следует заметить, что молекулы рРНК составляют более половины всех синтезируемых в клетке РНК [6], а на гены рРНК приходится порядка 35–60% всей транскрипционной активности, осуществляемой в клетке [7].

Известно, что количество копий генов рРНК в геноме эукариот варьирует в весьма широких преде-

лах – от 39 до 19300 у животных и от 150 до 26048 у растений [8]. Описан ряд случаев, когда изменяется число копий рДНК, в том числе увеличение количества рДНК вследствие амплификации внехромосомных копий генов рРНК в ооцитах *Xenopus laevis* [9–11] или у простейших [12]. Число генов рРНК так же может уменьшаться, как у *Drosophila melanogaster* с мутацией *bobbed* (*bb*), но при этом к третьему-четвертому поколению количество повторов рДНК полностью восстанавливается [13–18]. Изменения копияемости рДНК в геноме хотя и являются скорее исключениями, однако наводят на мысль о существовании механизмов регуляции числа копий генов рРНК и их поддержания на определенном уровне.

Запрограммированное удаление генов в ходе онтогенеза происходит и в результате ДХ. Хотя обнаружено оно пока только у двух видов круглых червей – *Ascaris lumbricoides* и *A. suum*. У *A. lumbricoides* вырезается ген, кодирующий рибосомный белок ALER-1 [19], а у *A. suum* к настоящему времени обнаружены три уникальных гена, элиминируемых при ДХ: *rpS19G*, *fert-1*, *aleg-3* и ретротранспозон *Tas* [20–22], остальная часть элиминируемых последовательностей относится к некодирующим. Неоднократно уже отмечалось, что ДХ может оказаться удобной моделью для изучения проблемы избыточной ДНК и реорганизации генома в ходе онтогенеза. Однако значимость ДХ недооценена в связи с недостаточным количеством данных [23, 24].

Несмотря на то что во время ДХ у *Cyclops kolensis* удаляется 94% ДНК [25], до сих пор в элиминируемой

фракции генома обнаруживали только некодирующие нуклеотидные последовательности, насыщенные повторами, либо сателлитную ДНК [26–28]. Ранее было высказано предположение о возможности удаления части цистронов рибосомных генов из хромосом *C. kolensis* в результате ДХ [29]. Положительную корреляцию между размером генома и числом копий рДНК отмечали Прокопович и соавт. [8].

В настоящей работе были поставлены следующие задачи: установить соотношение между числом копий генов рРНК в додимируционном и последимируционном геноме *C. kolensis* и определить число копий генов рРНК в российской популяции *C. insignis* – вида, у которого не обнаружено ДХ [30]. С этой целью мы использовали метод ПЦР в реальном времени. Наряду с другими методами определения копийности генов, метод ПЦР в реальном времени на сегодняшний день наиболее удобный и точный [31–33].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Циклопов *C. kolensis* Lill. и *C. insignis* Claus отлавливали в пруду на Воробьевых горах (Москва, Россия) в апреле 2009–2010 гг.

Цитофотометрия

В методику [25, 34] приготовления препаратов эмбриональных и соматических клеток взрослых особей *C. kolensis* для последующей их окраски по Фельгену были внесены модификации, предполагающие разрушение оболочек яйцевого мешка и яйца. В качестве эталона для вычисления абсолютного количества ДНК мы использовали спермии и эритроциты вьюна, содержание ДНК в клетках которого составляет $1C = 2.4$ пг [35]. Спермии вьюна содержат $1C = 2.4 \pm 0.2$ (SD) пг ДНК, эритроциты – $2C = 5.1 \pm 0.4$ (SD) пг. Содержание ДНК измеряли в 100 эритроцитах и 127 спермиях вьюна. Для приготовления мазков спермиев кусочки семенника вьюна измельчали в стандартном физиологическом растворе и из образовавшейся взвеси клеток готовили мазки. После высушивания препараты фиксировали в течение 10 мин в 96% этиловом спирте при комнатной температуре. Циклопов предварительно фиксировали в смеси этилового спирта и уксусной кислоты (3 : 1), раздавливали в 45% уксусной кислоте с полным разрушением оболочек яйцевого мешка и самого яйца, а затем окрашивали по Фельгену для измерения количества ДНК. Ядра клеток окрашивали по Фельгену в следующих условиях: гидролиз в 5 н. HCl в течение 11 мин при 37°C; окрашивание в реактиве Шиффа (1 ч при комнатной температуре). Измерения проводили на микроденситометре Виккерс М86 (Англия) (длина волны 540 нм). Все препараты, используемые для измерений, обрабатывали одно-

временно. Было исследовано 59 клеток 2-го направительного тельца на стадии метафазы с додимируционным геномом и 140 клеток соматической линии взрослого циклопа после ДХ на стадии анафазы ($n = 47$) и интерфазы ($n = 93$). Результаты обрабатывали с использованием программы Microsoft Excel 2007 (описательная статистика).

Сбор материала и выделение ДНК

В качестве «додимируционного» материала отбирали яйцевые мешки *C. kolensis* с зародышами на стадии 4–8 клеток. Отбор таких зародышей проводили по ранее описанной методике [25], позволяющей определять *in vivo* стадию дробления зародыша циклопа в световом микроскопе. «Последимируционным» материалом служили антеннулы *C. kolensis*, содержащие только соматические клетки. У каждой особи под бинокляром скальпелем отрезали по две антеннулы, переносили на стекло, расположенное на столике, охлаждаемом жидким азотом. Яйцевые мешки также фиксировали в жидком азоте. Отбирали особей *C. insignis* с яйцевыми мешками, в онтогенезе которого ДХ отсутствует.

Поскольку в нашем распоряжении находилось небольшое количество материала, суммарную ДНК выделяли с помощью набора реактивов «Diatom™ DNA Prep 100» производства ООО «Лаборатория Изоген». Этот набор позволяет минимизировать потери ДНК при выделении, принцип его действия основан на лизисе образца в гуанидинтиоцианате (сильном хаотропном агенте) с последующей сорбцией ДНК на силикагеле. Предварительно материал гомогенизировали в буфере (0.2 М Трис, 50 мМ EDTA, 0.5% SDS, 200 мкг/мл протеиназы К) и лизировали в течение 1 ч при 50°C. Лизат обрабатывали РНКазой (0.1 мг/мл) в течение 5 мин, а затем ДНК выделяли по методике, рекомендованной производителем.

ПЦР в реальном времени с использованием красителя EVA Green

Концентрации суммарной ДНК *C. kolensis* до и после ДХ и *C. insignis* определяли на спектрофотометре Nanodrop 1000. Коэффициент вариации концентрации, вычисленный по результатам трех измерений, составил 1.33% (до ДХ) и 5.91% (после ДХ) у *C. kolensis* и 9.18% у *C. insignis*.

Для проведения ПРЦ в реальном времени нами были сконструированы специфические праймеры: 28real_for – 5'-GGTAGCCAAATGCCTCGTC-3', 28real_rev – 5'-CGCCAAAGATGCTCCGCCAC-3', позволяющие амплифицировать фрагмент длиной 183 п.н. гена 28S рРНК. Нуклеотидные последовательности этого фрагмента гена 28S рРНК у *C. kolensis* и *C. insignis* были одинаковыми.

ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе iCycler iQ4 производства Bio-Rad (США). Расчет данных производили с помощью программного обеспечения iQ5 Optical System Software. Пороговую величину накопления продуктов амплификации определяли в результате визуального анализа кривых накопления ПЦР-продуктов. Эта величина находилась в участке экспоненциального роста кривых и во всех расчетах равнялась 100.

ПЦР в реальном времени проводили с использованием «Реакционной смеси 2.5x для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green и референсного красителя ROX» фирмы «Синтол» (Россия). Реакцию проводили согласно рекомендациям производителя в объеме 25 мкл: 11 мкл воды ПЦР-стандарта, 10 мкл готовой реакционной смеси (включающей дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, ПЦР-буфер, MgCl₂ и Taq-ДНК-полимеразу с антителами, ингибирующими активность фермента), 1 мкл каждого праймера (конечная концентрация 0.4 пмоль/мкл) и 2 мкл ДНК-матрицы. Условия ПЦР в реальном времени были следующими: первичная денатурация в течение 4.5 мин при 95°C, за которой следовали 50 циклов: 95°C – 15 с, 64°C – 15 с, 72°C – 20 с. Флуоресцентный сигнал детектировали на стадии отжига при 64°C. После амплификации строили кривую плавления с градиентом температуры 0.5°C – от 55 до 94.5°C, подтвердившую наличие только одного специфического продукта амплификации во всех образцах.

Получение плазмидной ДНК

ПЦР-продукт гена 28S рРНК *S. kolensis* длиной 2199 п.н. клонировали в векторе рGEM-T Easy (Promega) и получили плазмиду рGEM-20b1. Плазмидную ДНК (пДНК) очищали на колонках с помощью набора «Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System» (Promega, США) согласно инструкциям фирмы, включая обработку РНКазой А. Для приближения к условиям амплификации линейной ДНК, полученную кольцевую пДНК расщепляли рестриктазой PstI по сайту, который входит в состав полилинкера плазмиды и отсутствует во вставке. Плазмиду рGEM-20b1 (2.6 мкг) обрабатывали 2 мкл рестриктазы PstI (Fermentas) в объеме 50 мкл: 23 мкл очищенной воды, 5 мкл 10×Буфера, 20 мкл пДНК. После 3 ч инкубации при 37°C плазмиду очищали фенол-хлороформным методом и растворяли в том же буфере, что и образцы геномной ДНК.

Построение калибровочной кривой для определения числа копий рДНК

В методе абсолютного определения количества копий генов рРНК использовалась калибровочная кривая. Для ее построения использовали серию пятикрат-

ных разведений рGEM-20b1/PstI – от 1 нг до 0.32 пг. Каждое разведение пДНК было представлено в двух повторностях. Исходную концентрацию плазмиды измеряли на спектрофотометре Nanodrop 1000 с четырьмя повторностями, коэффициент вариации составил 2.36%. Калибровочная кривая имела следующие характеристики: коэффициент корреляции (R²) – 0.996, наклон кривой (slope) – -3.760, эффективность (E) – 84.5% (рисунок).

Размер плазмиды со вставкой равен 5216 п.н. Исходя из нуклеотидного состава, в программе OligoII Mass Calculator v.1.0 определили молярную массу плазмиды в двухцепочечной форме (M = 3.23 × 10⁶ г/моль). Количество молекул плазмидной ДНК рассчитывали по формуле (1):

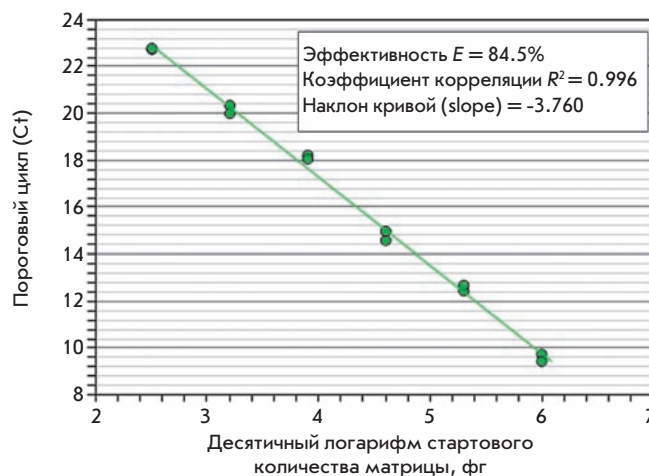
$$N_p (\text{копий}) = \frac{N_A \cdot m}{M} = \frac{6.02 \times 10^{23} (\text{копий} \cdot \text{моль}^{-1}) \times 1 \times 10^{-15} (\text{г})}{3.23 \times 10^6 (\text{г} \cdot \text{моль}^{-1})} = 186.378 \approx 186, (1)$$

где N_p – количество молекул плазмидной ДНК, проходящее на 1 фг пДНК; N_A – число Авогадро; m – количество ДНК, для которого рассчитывается число копий; M – молярная масса плазмиды. Показано, что на 1 фг пДНК приходится около 186 молекул пДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитофотометрия

Ранее было показано, что гаплоидный геном эмбриональных и соматических клеток взрослых особей *S. insignis* содержит 2.1–2.15 пг ДНК [30].



Калибровочная кривая, использованная в методе абсолютного определения количества копий генов рРНК.

На начальных этапах исследования ДХ мы испытывали некоторые методические трудности при приготовлении препаратов *C. kolensis* для цитофотометрии [25, 36]. Поэтому для расчета числа копий генов рРНК в клетках *C. kolensis* до и после ДХ мы повторно измерили количество ДНК в клетках *C. kolensis* методом количественной цитофотометрии. Результаты проведенных измерений свидетельствуют об изменении абсолютного количества ДНК в клетках *C. kolensis* до и после ДХ. Додиминирующий геном содержал $1C = 15.3 \pm 3.1$ (SD) пг ядерной ДНК, а клетки соматической линии после ДХ на стадии анафазы – 0.98 ± 0.13 (SD) пг в пересчете на гаплоидный геном. Относительное количество элиминированной ДНК осталось неизменным и составило 94%, что соответствует данным [25, 34]. Результаты цитофотометрических измерений позволяют оценить число клеток, приходящееся на определенное количество до- и последиминирующей ДНК *C. kolensis* и ДНК *C. insignis*.

Определение относительного числа копий генов рРНК методом $2^{-\Delta C_T}$ [37]

К моменту проведения нашей работы у исследуемых видов не были известны нуклеотидные последовательности каких-либо генов, поэтому провести опыт с внутренним контролем и измерениями относительно одного или нескольких референсных генов не представлялось возможным. В связи с этим проведено внешнее нормирование по количеству ДНК, взятой в реакцию, т.е. сравнили одинаковые количества ДНК *C. kolensis* до и после ДХ и *C. in-*

signis. Реакцию проводили с 500, 400, 300 и 200 пг ДНК. Каждый образец был представлен в трех повторностях. При определении относительных количеств по одному гену, как в нашем случае, для обработки результатов ПЦР используется метод $2^{-\Delta C_T}$. Референсными образцами при расчете ΔC_T служили образцы с последиминирующей ДНК *C. kolensis* (табл. 1). Поскольку в результате ДХ размер генома уменьшается в 15.6 раза, то одно и то же число клеток до и после ДХ содержит разное количество ДНК. Учитывая это, фактическое соотношение числа копий рДНК будет отличаться от полученного значения $2^{-\Delta C_T}$ в 15.6 раза. Это же справедливо и для *C. insignis*, диплоидный геном которого в 2.2 раза превышает последиминирующий геном *C. kolensis* (табл. 1).

Определение абсолютного числа копий генов рРНК с использованием калибровочной кривой

Мы попытались определить абсолютное число копий генов рРНК с использованием калибровочной кривой. Калибровочную кривую строили на основе серии пятикратных разведений пДНК рGEM-20b1/PstI, каждая копия которой содержала по одному фрагменту гена 28S рРНК. Стартовые количества матрицы в образцах определяли относительно 500, 400, 300 и 200 пг пДНК так же, как и при расчете предыдущим методом.

С учетом различий в размере генома образцов на основе результатов ПЦР в реальном времени для каждого количества анализируемой ДНК определяли число копий рДНК, приходящееся на дипло-

Таблица 1. Расчет относительного количества копий генов рРНК методом $2^{-\Delta C_T}$

Параметры расчета	Образцы ДНК	Количество ДНК, взятой в реакцию, пг				Среднее значение	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации, %
		500	400	300	200			
ΔC_T	<i>C. kolensis</i> до ДХ	-5.08	-4.99	-4.93	-4.88	-4.97	±0.09	1.7
	<i>C. insignis</i>	-2.96	-2.72	-2.67	-2.63	-2.75	±0.15	5.4
$2^{-\Delta C_T}$	<i>C. kolensis</i> до ДХ	33.82	31.78	30.48	29.45	31.38	±1.88	6.0
	<i>C. insignis</i>	7.78	6.59	6.36	6.19	6.73	±0.72	10.7
Относительное количество копий (относительно <i>C. kolensis</i> после ДХ)	<i>C. kolensis</i> до ДХ	528.01	496.16	475.86	459.78	489.95	±29.41	6.0
	<i>C. insignis</i>	121.48	102.86	99.36	96.64	105.09	±11.22	10.7

идный геном (табл. 2). Для расчета использовали формулу (2):

$$N_r(\text{копий}) = \frac{N_m(\phi\epsilon) \cdot N_p(\text{копий} \cdot \phi\epsilon^{-1}) \cdot 2C(n\epsilon)}{k(n\epsilon)}, \quad (2)$$

где N_r – количество копий рДНК (28S), $2C$ – размер диплоидного генома, N_m – исходное количество матрицы гена 28S рРНК, определенное в ходе опыта, N_p – количество молекул пДНК, приходящееся на 1 фг пДНК (см. формулу 1), k – количество анализируемой ДНК, взятой в реакцию.

Таким образом, средние значения соотношения между количеством генов рРНК при расчете с использованием калибровочной кривой в до- и последиминуционном геноме *C. kolensis* составляют 329.94 ± 19.09 (табл. 2), а между геномом *C. insignis* и последиминуционным геномом *C. kolensis* – 11.73 ± 1.16 .

ОБСУЖДЕНИЕ

Использованные методы расчета числа копий генов требуют ряда допущений. Основное допущение в случае метода $2^{-\Delta\text{CT}}$ – предположение о 100% эффективности реакции, что на практике мало достижимо. При использовании калибровочной кривой, построенной на основе пДНК, допускается, что пДНК в ходе ПЦР амплифицируется с той же эффективностью, что и исследуемые образцы. Таким образом, наблюдаемые различия в соотношениях числа копий рДНК происходят непосредственно из особенностей методов расчета.

В результате проведенной работы было установлено, что в ходе ДХ из генома пресоматических клеток *C. kolensis* удаляется значительная часть генов рРНК, т.е. наряду с уменьшением генома почти в 16 раз происходит уменьшение числа копий генов рРНК. Отметим, что это первое описание удаления генов у циклопов посредством ДХ. Более того, никаких свидетельств удаления рДНК у многоклеточных организмов в результате ДХ ранее не было описано.

Возможно, что удаление генов рРНК обусловлено необходимостью привести число генов рРНК в соответствие с размером генома. Положительную корреляцию между размером генома и числом копий генов рРНК наблюдали также Прокопович и соавт. [8]. Недавно в результате элегантного эксперимента с дрожжами было показано, что большое количество повторов генов рРНК важно для поддержания стабильности генома в целом [38]. В частности, установлено, что избыточные копии рДНК облегчают ассоциацию сестринских хроматид, что важно для эффективной рекомбинационной репарации. Заметим, что удаление копий рДНК происходит далеко не пропорционально уменьшению генома в результате ДХ. Этот факт не вызывает удивления, так как гены рРНК обычно локализованы в ядрышковых организаторах определенных хромосом и образуют, как правило, один или несколько кластеров [3], а не распределены равномерно по геному. Следовательно, должны существовать точные механизмы, позволяющие безошибочно вырезать ту часть генов рРНК, потеря которой не приведет к функциональной недостаточности этих генов в клетках сомати-

Таблица 2. Расчет абсолютного и относительного количества копий генов рРНК с использованием калибровочной кривой

Параметры расчета	Образцы ДНК	Количество ДНК, взятой в реакцию, пг			
		500	400	300	200
Среднее значение стартового количества матрицы (фг) со стандартным отклонением	<i>C. kolensis</i> до ДХ	135±23.2	102±21.3	71.7±18.1	50.3±1.89
	<i>C. kolensis</i> после ДХ	5.99±0.953	4.73±0.553	3.45±0.579	2.56±0.447
	<i>C. insignis</i>	37±8.11	25.3±6.13	17.8±3.36	12.7±1.2
Количество копий рДНК на диплоидный геном, N_r	<i>C. kolensis</i> до ДХ	1539.86	1454.31	1363.06	1434.35
	<i>C. kolensis</i> после ДХ	4.38	4.32	4.20	4.68
	<i>C. insignis</i>	58.62	50.10	47.00	50.30
Соотношение числа копий рДНК $N_r(\text{до})/ N_r(\text{после})$		351.86	336.67	324.46	306.76
Соотношение числа копий рДНК $N_r(C. insignis)/ N_r(\text{после})$		13.39	11.60	11.19	10.76

ческой линии. Кроме того, не все копии генов рРНК могут быть активными, а число активных копий может изменяться в ходе онтогенеза. Различают три состояния рДНК – в одном идет активная транскрипция генов рРНК, в другом гены не транскрибируются, но подготовлены к началу транскрипции и имеют, как и в первом случае, эухроматиновую структуру. Выделяют также плотноупакованную нетранскрибируемую рДНК, которая имеет гетерохроматиновую структуру [6]. Возможно, в ходе ДХ одна из этих фракций, вероятнее всего гетерохроматиновая, удаляется из генома. Нельзя исключать и возможности равномерного удаления копий рДНК из всех трех фракций рДНК.

Логично было бы предположить, что при ДХ сохраняются преимущественно функциональные копии рДНК. Известно, что значительная часть копий рДНК дрозофилы и других организмов [39, 40] поражена специфическими мобильными элементами (R1, R2), встраивание которых приводит к инактивации копий рДНК. Возможно, именно такие копии и удаляются в ходе ДХ у *C. kolensis*.

Транскрипция рибосомных генов является ключевым звеном в регуляции общего уровня синтеза белка в клетке [41, 42]. Как показано в нашей работе, геном *C. insignis*, у которого отсутствует ДХ, по числу копий рДНК в большей степени сходен с последиминуционным геномом *C. kolensis*, чем с додимиционным.

Активная экспрессия генов рРНК и наработка большого числа рибосом вполне оправдана на ранних стадиях развития, однако ДХ происходит на стадии 4-го деления дробления, когда активная экспрессия каких-либо генов еще не началась, и развитие идет за счет запасенных молекул. Следовательно, избыток генов в додимиционных бластомерах не должен

сказываться на количестве рибосом в клетках зародыша. Возможно, элиминируемые копии участвуют в созревании половых клеток, где может требоваться большее число рибосом.

Ранее высказывалось предположение, что ДХ у *C. kolensis* представляет собой этап развития, в ходе которого совершается переход с цитоплазматической регуляции экспрессии генов во время первых делений дробления, определяемой детерминантами, уже присутствующими в цитоплазме неоплодотворенного яйца, на ядерную регуляцию [1, 29]. Следовательно, исходно высокое содержание генов рРНК на додимиционном этапе развития зародыша *C. kolensis* реализоваться, по-видимому, не может, но число генов рРНК в развивающемся ооците в сотни раз превышает число генов в последиминуционном геноме соматических клеток и вполне может определять более высокий уровень экспрессии генов рРНК в оогенезе, когда происходит накопление рРНК, необходимых для первых делений дробления.

В завершение хотелось бы отметить, что изучение внутригеномной изменчивости количества рДНК у *C. kolensis* в результате ДХ имеет непосредственное отношение к пониманию механизмов регуляции и поддержания числа копий рДНК в геноме эукариот. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 10-04-01376, Программы фундаментальных исследований РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов» и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы» (ГК 16.740.11.0238). Мы хотели бы выразить глубокую благодарность нашему бессменному помощнику и другу Т.А. Кетовой за ее неоценимую помощь при сборе материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гришанин А.К., Шеховцов А.К., Бойкова Т.В., Акифьев А.П., Жимулев И.Ф. // Цитология. 2006. Т. 48. № 5. С. 379–397.
2. Tobler H. // Germ line-soma differentiation; results and problems in cell differentiation / Ed. Hennig W. Berlin: Springer, 1986. V. 13. P. 1–69.
3. Gerbi S.A. // Mol. Evol. Genet. N.Y.: Plenum Press, 1985. P. 419–517.
4. Derenzini M., Pasquinelli G., O'Donohue M.F., Ploton D., Thiry M. // J. Histochem. Cytochem. 2006. V. 54. № 2. P. 131–145.
5. Hernandez-Verdun D. // Histochem. Cell Biol. 2006. V. 126. № 2. P. 135–148.
6. Huang S., Rothblum L.I., Chen D. // Biochem. Cell Biol. 2006. V. 84(4). P. 444–449.
7. Santoro R. // Cell. Mol. Life Sci. 2005. V. 62. P. 2067–2079.
8. Prokopowich C.D., Gregory T.R., Crease T.J. // Genome. 2003. V. 46. № 1. P. 48–50.
9. Bakken A.H. // J. Histochem. Cytochem. 1975. V. 23. №7. P. 463–474.
10. Gall J.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1968. V. 60. P. 553–559.
11. Gall J.G. // Genetics. 1969. V. 61. P. 121–131.
12. Engberg J. // Europ. J. Cell Biol. 1985. V. 36. P. 133–151.
13. Atwood K.C. // Genetics. 1969. V. 61. P. 319–324.
14. Boncinelli E., Graziani F., Polito L., Malva C. // Cell Diff. 1972. V. 1. P. 133–139.
15. Locker D. // Mol. Gen. Genet. 1976. V. 143. P. 261–272.
16. Ritossa F.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1968. V. 60. P. 509–519.
17. Ritossa F. // The genetics and biology of Drosophila. V. 1b /Eds Ashburner M., Novitski E. London–New York–San Francisco, 1976. P. 801–812.

18. Ritossa F. M., Scala G. // *Genetics*. 1969. V. 61. P. 305–314.
19. Tobler H., Etter A., Müller F. // *Trends Genet*. 1992. V. 8. P. 427–432.
20. Etter A., Aboutanos M., Tobler H., Müller F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 1593–1596.
21. Etter A., Bernard V., Kenzelmann M., Tobler H., Müller F. // *Science*. 1994. V. 265. P. 954–956.
22. Spicher A., Etter A., Bernard V., Tobler H., Müller F. // *Dev Biol*. 1994. V. 164. P. 72–86.
23. Шестаков С.В. // *Палеонтологический журн*. 2003. № 6. С. 50–57.
24. Petrov D.A. // *Trends Genetics*. 2001. V. 17. P. 23–28.
25. Гришанин А.К., Худолий Г.А., Шайхаев З.Г.О., Бродский В.Я., Макаров В.Б., Акифьев А.П. // *Генетика*. 1996. Т. 32. С. 492–499.
26. Загоскин М.В., Гришанин А.К., Королев А.Л., Паленко М.В., Муха Д.В. // *ДАН*. 2008. Т. 423. № 4. С. 551–555.
27. Degtyarev S., Boykova T., Grishanin A., Belyakin S., Rubtsov N., Karamysheva T., Makarevich G., Akifyev A., Zhimulev I. // *Genome Res*. 2004. V. 14. № 11. P. 2287–2294.
28. Drouin G. // *Genome*. 2006. V. 49. P. 657–665.
29. Гришанин А.К. // *Онтогенез*. 1995. Т. 26. С. 188–195.
30. Grishanin A.K., Dams H.-U., Akifiev A.P. // *Zool. Stud*. 2004. V. 43. P. 8–19.
31. Lee Ch., Lee S., Shin S.G., Hwang S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2008. V. 78. № 2. P. 371–376.
32. Li Z., Hansen J.L., Liu Y., Zemetra R.S., Berger P.H. // *Plant Mol. Biol. Rep*. 2004. V. 22. P. 179–188
33. Yuan J.S., Burris J., Stewart N.R., Mentewab A., Stewart C.N., Jr. // *VMC Bioinformatics* 2007. 8(Suppl 7):S6
34. Гришанин А.К., Бойкова Т.В., Маршак Т.Л., Акифьев А.П., Жимулев И.Ф. // *ДАН*. 2006. Т. 408. № 5. С. 684–687.
35. Кафиани К.А., Тимофеева М.Я. // *Докл. АН СССР*. 1964. Т. 154. С. 721–724.
36. Гришанин А.К., Бродский В.Я., Акифьев А.П. // *ДАН*. 1994. Т. 338. С. 708–710.
37. Livak K.J., Schmittgen T.D. // *Methods*. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408.
38. Ide S., Miyazaki T., Maki H., Kobayashi T. // *Science*. 2010. V. 327. № 5966. P. 693–696.
39. Каграманова А.С., Капелинская Т.В., Королёв А.Л., Муха Д.В. // *Молекуляр. биология*. 2007. Т. 41. № 4. С. 546–553.
40. Jakubczak J., Zenni M.K., Woodruff R.C., Eickbush T.H. // *Genetics*. 1992. V. 131. P. 129–142.
41. Larson D.E., Zahradka P., Sells B.H. // *Biochem. Cell. Biol*. 1991. V. 69. P. 5–22.
42. Moss T., Stefanovsky V.Y. // *Nucl. Acids Res. Mol. Biol*. 1995. V. 50. P. 25–66.