

УДК 575.22:595.341.4

## Диминуция хроматина регулирует число генов рРНК у веслоногих раков

М. В. Загоскин<sup>1\*</sup>, Т. Л. Маршак<sup>2</sup>, Д. В. Муха<sup>1</sup>, А. К. Гришанин<sup>1#</sup><sup>1</sup>Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3<sup>2</sup>Учреждение 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 биноклем 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, MgCl<sub>2</sub> 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 (R<sup>2</sup>) – 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 × 10<sup>6</sup> г/моль). Количество молекул плазмидной ДНК рассчитывали по формуле (1):

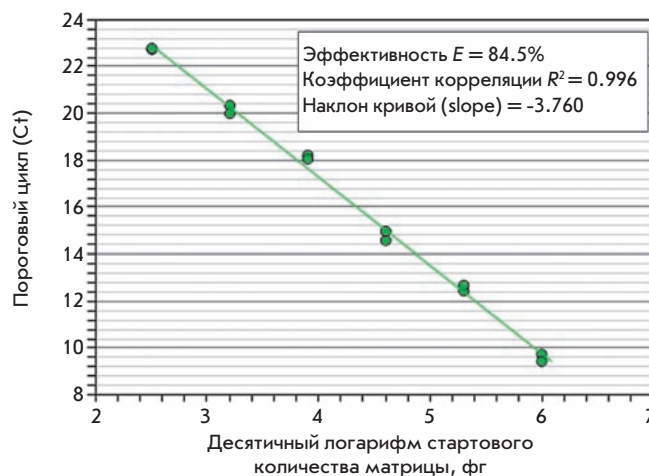
$$N_p (\text{копий}) = \frac{N_A \cdot m}{M} = \frac{6.02 \times 10^{23} (\text{копий} \cdot \text{моль}^{-1}) \times 1 \times 10^{-15} (\text{г})}{3.23 \times 10^6 (\text{г} \cdot \text{моль}^{-1})} = 186.378 \approx 186, (1)$$

где N<sub>p</sub> – количество молекул плазмидной ДНК, проходящее на 1 фг пДНК; N<sub>A</sub> – 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 –  $0.98 \pm 0.13$  (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  $\Delta C'_T$  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			
$\Delta C'_T$	<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  $329.94 \pm 19.09$  (табл. 2), а между геномом *C. insignis* и последиминуционным геномом *C. kolensis* –  $11.73 \pm 1.16$ .

### 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.