

Нестабильность генов и мобильные элементы: к истории изучения и открытия

М.Д. ГОЛУБОВСКИЙ

Университет Калифорнии, Беркли, США;
mdgolub@gmail.com

Генезис открытия мобильных генетических элементов (МГЭ), изменивших лик современной генетики, необычайно поучителен с точки зрения судьбы научных идей и истории науки. Здесь как нельзя лучше видна справедливость глубокого замечания А.А. Любищева, что прошлое науки — это не кладбище гипотез, а собрание недостроенных архитектурных ансамблей, прерванных по дерзости замысла или недостатку средств. С другой стороны, история этого открытия показывает, что многие идеи и факты существуют десятилетиями, будучи на периферии доминирующей доктрины (парадигмы) и рассматриваясь в ней как курьез или исключение. А когда они приобретают популярность, становится малопонятным, почему на них не обращали внимания. История идей в этой области подтверждает выдвинутое мной положение, что задержка в признании новых идей в 25–30 лет (лаг-период) — это норма, своего рода инварианта в истории науки (Голубовский, 2000).

Ключевые слова: мобильные генетические элементы, история открытия.

Генезис открытия мобильных генетических элементов (МГЭ), изменивших лик современной генетики, необычайно поучителен с точки зрения судьбы научных идей и истории науки. Здесь как нельзя лучше видна справедливость глубокого замечания А.А. Любищева, что прошлое науки — это не кладбище гипотез, а собрание недостроенных архитектурных ансамблей, прерванных по дерзости замысла или недостатку средств. С другой стороны, история этого открытия показывает, что многие идеи и факты существуют десятилетиями, будучи на периферии доминирующей доктрины (парадигмы) и рассматриваясь в ней как курьез или исключение. А когда приобретают популярность, становится малопонятным, почему на них не обращали внимания. История идей в этой области подтверждает выдвинутое мной положение, что задержка в признании новых идей в 25–30 лет (лаг-период) — это норма, своего рода инварианта в истории науки (Голубовский, 2000).

Основные факты и интеллектуальный контур, приведшие к открытию мобильных элементов, были получены в разных областях генетики, которые казались не связанными друг с другом. Лишь в конце 1970-х годов они соединились анастомозами и привели к существенному пересмотру сложившихся положений классической генетики. Этому пересмотру посвящена вышедшая на русском языке фундаментальная сводка «Непостоянство генома» (Хесин, 1984; см. также: Голубовский, 2002). Укажем на другие важные сводки, которые содержат и обсуждение экспериментальных данных в этой области, и историко-научный контекст (Mobile elements, 1983; The Dynamic Genome, 1992; Transposable Elements, 1996; Голубовский, 2000; Shapiro, 1992; 2011).

Можно выделить пять относительно независимых направлений, которые привели к рождению «мобильной» генетики или представлению о динамичном геноме.

1. Цитогенетические исследования нестабильности генов и хромосом у кукурузы, начатые Барбарой МакКлинток в конце 1940-х и обобщенные в 1950-х гг. в виде стройной

концепции мобильных элементов (МЭ), способных регулировать состояние генов и вызывать хромосомные мутации (McClintock, 1951, 1956, 1961, 1965, 1984).

2. Исследование плазмид и эписом у бактерий и открытие А. Львовым способности фага лямбда встраиваться в геном бактерии *E. coli* в состоянии профага (Lwoff, 1953).

3. Открытие в 1968–1976 гг. у бактерий особого класса мутаций, вызванных вставками определенных инсерционных элементов, которые населяют геном бактерий и причастны к горизонтальному межвидовому переносу генов у бактерий.

4. Исследование нестабильных генов и открытие инсерционного мутагенеза в природных популяциях *D. melanogaster*.

5. Выделение и молекулярно-цитогенетический анализ мобильных диспергированных фракций ДНК (МЭ) хромосомах дрозофилы (Rubin et al., 1981; Tchurikov et al., 1981).

В рамках этого ландшафта представляется уместным дать краткое хронологическое описание критических исследований и эволюции идей, приведших к разгадке явлений генной и генетической нестабильности и к открытию и осознанию роли МЭ в наследственной изменчивости, структуре и функции генома. Более подробно я останавливаюсь на описании собственных и выполненных под моим руководством исследований в конце 1970-х гг., которые привели к открытию инсерционного мутагенеза в природных популяциях. Результаты этих исследований, которые вводили инсерционный мутагенез в популяционную, эволюционную генетику, включали все три аспекта, которые способствовали быстрому признанию открытия (Хесин, 1984).

1. Впервые был проведен генетический анализ характера мутирования множества нестабильных аллелей разных генов, выделенных из географически удаленных популяций дрозофил.

2. На основе этого анализа было обосновано предположение, что поведение изученных нестабильных аллелей у дрозофилы соответствует концепции МакКлинток о связи нестабильности с инсерциями разных контролирующих мобильных элементов.

3. Это предсказание вскоре получило прямое подтверждение как в собственных совместных с коллегами работах, так и во многих других популяционных, генетико-молекулярных и цитогенетических исследованиях, начиная с 1978–1982 гг.

Основные принципиальные публикации были сделаны в период 1977–1980 гг., включая совместную статью в “Proceedings Natural Academy Science USA” (Golubovsky, Ivanov, Green, 1977), серии статей в журнале «Генетика» (Голубовский, 1977 а, б; Голубовский, Ерохина, 1977; Голубовский, Захаров, 1979; Захаров, Голубовский, 1980). Эти результаты были доложены на симпозиальном докладе на XIV Международном конгрессе по генетике (Москва, 1978) и опубликованы в отдельном томе симпозиума по эволюционной и популяционной генетике (Golubovsky, 1980).

1. Открытие мобильных элементов у растений

1.1. Первые попытки анализа нестабильных генов (1914–1941)

Представление о существовании особого нестабильного состояния наследственных факторов было введено в науку создателем теории мутаций Гуго де Фризом в 1901 г. Ещё ранее он начал изучать проявление нестабильности у разных растений, в том числе у львиного зева *Antirrhinum majus*, где нередко мозаичность в окраске цветка. Летом 1904 г. де Фриз прочел лекции в университете Калифорнии, Беркли, изданные

затем отдельной книгой в 1906 г. (de Vries, 1906). Одна из глав называется “Ever-spotting varieties” и формулирует поразительную особенность проявления факторов нестабильности у высших организмов: «*Here the variability is a thing of absolute constancy, while the constancy consists of a eternal change!*» Или в переводе: «Мозаицизм проявляется устойчиво и постоянно, в то же время это постоянство включает вечное варьирование проявления!» (de Vries, 1906, p. 311). Спустя 80 лет у львиного зева был выделен мобильный элемент *Tam*, отвечающий за подобный мозаицизм окраски цветка (Saedler, Starlinger, 1992). При этом выяснилось, что мобильный (инсерционный) элемент контролирует работу локуса-хозяина на уровне транскрипции и эта регуляция очень чувствительна к колебаниям внешних условий и генетической среды, включая тканевую и органоспецифичность.

Начиная с 1920-х гг. ведущим модельным объектом в генетике растений стала кукуруза. Интерес к мозаицизму у кукурузы во многом связан с чувством красоты у индейцев. Им нравилась мозаичная окраска зерна, и они специально выращивали (селектировали) такие растения. Генетический анализ окраски мозаичности растений и зерен, несущих ген пурпурной окраски перикарпа *P*, начал замечательный исследователь Ролин Адамс Эмерсон (Emerson, 1873–1947). Среди его немногих учеников двое стали нобелевскими лауреатами: Дж. Бидл, автор концепции «один ген — один фермент» и Барбара МакКлинток, открывшая мобильные элементы.

Эмерсон окончил университет штата Небраска в 1897 г., в 1899–1913 гг. вёл исследования в сельскохозяйственном колледже и опытной станции того же штата. В перерыве, в 1910–1911 гг., работал в Гарвардском университете совместно с генетиком Эдвардом Истом (1879–1938), соавтором концепции гетерозиса. С 1914 по 1942 г. Эмерсон руководил отделом селекции растений в Корнельском университете (Итака, штат Нью-Йорк). Вспоминая о своем учителе, Дж. Бидл (Beadle G. M., 1950) писал: «Вклад Эмерсона в генетику был многосторонен. Он начал работать ещё в то время, когда эта наука была слаба и вызвала много сомнений... Его статьи по генетике окраски алейрона и растений у кукурузы — выдающийся образец экспериментального исследования, глубоко обоснованные и ясные по написанию. Они служат вдохновляющим примером для будущих поколений исследователей... Его работы по мозаицизму в окраске перикарпа привели к концепции нестабильных генов и представляют собой главу в истории генетики».

Бидл впечатляюще характеризует научный стиль и личность своего учителя Эмерсона: «Велики были его упорство и объективность. Он никогда не публиковал данные до тех пор, пока не получал их подтверждения не один раз, и многими путями... Столь же важной, как и его научные труды, была личность Эмерсона, которая запоминалась всеми, кто его знал. Это был физически сильный, хорошо сложенный высокий человек. Он был приветлив и сердечен в общении. Заразительный энтузиазм и дар проявлялся не только в научной, но и во всех видах деятельности. Он гордился тем, что во время полевого сезона первым приходил на участок и последним покидал его. Этот пример несомненно способствовал продуктивности всех работавших с ним студентов и исследователей... Щедрость Эмерсона была легендарна. Эта щедрость сыграла большую роль в том, что кукуруза стала самым изученным с точки зрения генетики растением... Эмерсон испытывал такое же удовольствие от хорошей работы своего ученика или коллеги, как и от своей собственной. Этот дух альтруизма в сочетании с энтузиазмом, простотой в общении и высокими способностями естественным образом сделали его интеллектуальным и духовным лидером среди всех генетиков кукурузы» (Beadle, 1950).

Отсюда, видимо, идут и чистота и изящество опытов Б. МакКлинток, её упорство в многолетнем одиноком поиске. Эмерсон в 1914 г. первый провел генетический анализ мозаичного, нестабильного проявления гена «*P*», который контролирует окраску оболочки зерна (перикарпа) у кукурузы. На светлом фоне появлялись красные пятна на

зернах, вызванные, как мы теперь знаем, вырезанием мобильного элемента, ингибирующего проявление локуса. Эмерсон пришел к выводу, что существует некий фактор мозаицизма, «разновидность временного рецессивного ингибитора, который на раннем или позднем этапе онтогенеза теряет свою способность ингибировать». Далее следует честное заключение, что «причины такого изменения фактора лежат сейчас вне рамок мыслимого обсуждения» (Emerson, 1917).

К такому же неутешительному выводу пришёл и другой замечательный исследователь — Милислав Демерец (1895–1966). Югослав по происхождению, он окончил в 1916 г. агрономический колледж во Франции. Затем переехал в США и в 1920-е гг. работал в Корнельском университете (под эгидой Р. Эмерсона), а с 1923 по 1960 г. — в Институте Карнеги (Вашингтон), в отделе генетики института, в Колд Спринг Харборе (с 1941 г. — директором). М. Демерецу принадлежат классические работы в области генной нестабильности, эффекта положения у дрозофилы и генетики микроорганизмов. Но начал он с анализа соматической нестабильности у *Anthrinum majus* (львиного зева). Изучив свойства двух нестабильных мутаций, влияющих на окраску цветка, Демерец догадался, что размер мозаичного пятна на растении зависит от стадии онтогенеза, на которой мутирует нестабильный ген. Один из изученных им генов мутировал равномерно на всех стадиях развития, а другой — лишь в поздней эмбриональной стадии.

1.2. Гипотеза МакКлинток и отношение к ней

Решительный прорыв в исследовании нестабильности был сделан в исследованиях ученицы Эмерсона Барбары МакКлинток (1902–1992). Она высказала гипотезу о существовании особого класса генетических элементов, способных перемещаться по геному, внедряться в разные локусы, вырезаться оттуда и таким образом регулировать темп мутирования гена и его мутационное состояние. По существу, все основные генетические свойства мобильных элементов, найденные спустя 25–30 лет у разных видов и исследованные на уровне ДНК, были уже установлены МакКлинток. Особенность её работы состояла в полном слиянии генетического и цитогенетического подхода, позволившего непосредственно видеть в микроскопе то, что предсказывалось на основе данных генетического анализа.

В одной из линий кукурузы в мейозе МакКлинток наблюдала регулярные разрывы и воссоединения хромосом в области короткого плеча хромосомы 9. На дистальном конце этой хромосомы был расположен узелок гетерохроматина, недалеко от него по направлению к центромере локализовались рецессивные мутации генов. Обычно разрыв хромосомы происходил в определённом месте, обозначенном как *Ds* (*Ds*, *Dissociation* — разрыв), между геном *Ds* и центромерой. Однако МакКлинток обнаружила в некоторых линиях перемещение точки разрыва, и в этом же месте возникали нестабильные мутации.

Когда из нестабильного гена фактор *Ds* перемещался в другой район, ген снова становился относительно стабильным. Частота разрывов, вызванных фактором *Ds*, резко возросла под влиянием доминантного фактора *Ac* (Активатор). Таким образом, в системе *Ac–Ds* фактор *Ds* является контролирующим, а *Ac* — регуляторным элементом. Контролирующий элемент *Ds*, если суммировать полученные МакКлинток данные, имел следующие свойства: а) контроль активности гена-хозяина, так что при внедрении *Ds* ген может либо частично, либо полностью инактивироваться; б) способность к транспозициям; в) способность вызывать разрывы в сайтах внедрения; г) способность менять своё состояние. Однако все эти свойства проявлялись лишь в присутствии *Ac*.

В начале 1980-х гг., когда началась эра молекулярных исследований на растениях, вывод МакКлинток блестяще подтвердился. Действительно, нестабильные мутации, вызванные факторами *Ds–Ac*, содержали вставку. Полноразмерный мобильный *Ac*-элемент имел длину около 4,5 тыс. п. н., а *Ds* оказался дефектным вариантом *Ac*, который, будучи встроен в данный локус, сам по себе не способен перемещаться, но активируется в присутствии в геноме полной копии *Ac*, содержащего транспозазу — фермент транспозиции. Активация приводит к вырезанию *Ds* и появлению окрашенных пятен.

Три основные новые идеи в генетике связаны с работами МакКлинток:

1) мутантное событие, приуроченное к определённому локусу или гену, может быть связано не с изменением самого гена, а с неким контролирующим элементом;

2) этот контролирующий элемент является мобильным, он способен встраиваться в разные локусы, причем этот мобильный контролирующий элемент не один, а есть группа независимых элементов;

3) мобильный элемент может регулировать характер выражения гена в зависимости от времени онтогенеза и тканевой (органной) специфичности; поэтому МакКлинток назвала эти элементы не только *мобильными*, но и *контролирующими* генную активность. Этот вывод был сделан в 1950-е гг., когда ничего не знали о транскрипции и трансляции и о генах регуляторах, открытых Жакобом и Моно.

Хотя сообщение о первой серии исследований Б. МакКлинток было напечатано в трудах Американской академии наук (McClintock, 1950), а затем в более подробном виде представлено на одном из самых авторитетных форумов генетиков в Колд Спринг Харборе (McClintock, 1951), её выводы казались слишком парадоксальными, чем-то неправдоподобным. Она вспоминает, что доклад 1951 г. был непонят, а гипотеза — встречена с враждебностью (McClintock, 1992). Согласно канонической теории Моргана, гены должны иметь строгую локализацию, а существование целого класса МЭ элементов нарушало все каноны. Генетики воспринимали это примерно так же, как если бы в 1951 г. в период господства сталинизма жители Советского Союза узнали, что прописка, мнение парткома и КГБ необязательны и можно свободно переезжать из одного города в другой и за пределы страны «железного занавеса». По словам одного из членов Нобелевского комитета, в 1951 г. «оценить эту гипотезу могли не более пяти генетиков во всем мире, а сама Б. МакКлинток призналась, что “меня считали сумасшедшей”» (Уоллис К., 1984).

2. Концепция профага и её значение; эписомы и плазмиды

По удивительному совпадению практически одновременно в 1953 г. были сделаны два открытия, определившие лицо современной молекулярной и общей генетики: открытие двойной спирали ДНК Дж. Уотсоном и Ф. Криком и исследование Андре Львовым лизогении у бактерий и предложенная им концепция профага. Для эволюционной генетики новации Андре Львова, на мой взгляд, имеют не меньшее значение, чем открытие двойной спирали ДНК. Андре Львов установил, что в ходе взаимодействия фаг лямбда — бактерия фаг способен встраиваться в хромосому бактерии и передаваться в ряду поколений как ее генетический элемент. Бактерию, включившую в свой геном, А. Львов назвал лизогенной, а встроенный фаг — профагом. Фаги, способные переходить в латентное интегрированное в геном бактерии состояние, называются умеренными. Встроив фаг в свой геном, бактерия приобретает иммунитет к заражению.

В некоторых случаях состояние лизогении влечет за собой приобретение клеточных признаков вполне посторонних, к инфекции, например, изменение вида колоний или изменение поверхностных антигенов бактериальной клетки (конверсия штаммов).

Небольшой исторический экскурс показывает, сколь революционным было открытие Львова. Уже с начала 1920-х гг. были известны штаммы, способные нести фаги в скрытом состоянии и вызывать лизис у чувствительных штаммов. Однако открыватель бактериофагов Феликс Д'Эррель (1873–1949) смотрел на фаг или вирус как облигатно летальный для клетки агент. Он считал, что культуры лизогенных бактерий просто загрязнены фагом и от него можно избавиться путем очистки.

Взгляд на лизогению как «артефакт» разделяли и исследователи школы классика генетики Макса Дельбрюка, основателя группы по генетике фагов в Калифорнийском Технологическом институте (Пасадена, Калифорния). Исследователи в этой группе работали с так называемыми Т-фагами, которые не способны встраиваться в бактерию и вызывать лизогенное состояние. В силу авторитета школы Дельбрюка лизогенией долго детально никто не занимался. Львов после войны возобновил в Пастеровском институте исследования лизогенного штамма бактерии. Он следил под микроскопом за судьбой отдельных клеток, тогда как в школе Дельбрюка ведущим был статистический подход, на уровне колоний бактерий. В 1953 г. Львов опубликовал стройную теорию лизогении, полностью сохранившую свое значение до настоящего времени (Lwoff, 1953; Жакоб, Вольман, 1962; Стент, Кэлинджер, 1981).

Трансформацию, трансдукцию и лизогению можно рассматривать как три разных способа «паранаследственного» приобретения новых признаков (Жакоб, Вольман, 1962, с. 48). Термин «паранаследственные» был предложен ещё в 1925 г. Эжени Вольманом (Egenie Wollman) для обозначения явлений приобретения признаков путём заражения (Эжени Вольман в начале XX в. эмигрировал из Минска во Францию, где окончил университет и стал работать в Пастеровском институте под руководством И. Мечникова). Ещё в 1920-е гг. он установил, что слияние летального фага и бактерии-хозяина в конечном счёте может давать клоны бактерий, которые содержат фаг, но не погибают, переходя в лизогенное состояние (название предложено им и продолжившим эти работы А. Львовым). В 1928 г. Эжен Вольман пришел к выводу, что «оба понятия — наследственность и инфекция, казалось бы, столь различные и в каком-то смысле даже несовместимые... при некоторых условиях почти совпадают». Исследования Эжени Вольмана (учёный погиб в концлагере во время нацистской оккупации Парижа) продолжил его сын Илья Вольман (Elie Wollman 1917–2008), которому удалось спастись. Он обнаружил, что внехромосомный фактор F ответствен за конъюгацию (пол) бактерий. Этот фактор был назван эписомой (Жакоб, Вольман, 1962).

Илья Вольман и Ф. Жакоб установили, что мужской половой тип бактерии определяется внехромосомным фактором F, который может внедряться в хромосому бактерии и в 1000 раз усиливать способность к хромосомной рекомбинации этой бактерии с другими бактериями. Поведение фага лямбда во многом напоминало поведение полового фактора бактерий. В 1958 г. Жакоб и Илья Вольман ввели термин «эписома» для обозначения генетических элементов, которые могут существовать в клетках в двух взаимно исключающих друг друга состояниях — автономном и интегрированном. К эписомам они отнесли: умеренные бактериофаги, половой фактор бактерий и факторы колициногенности, с помощью которых одни штаммы бактерий убивают другие.

Расширение концептуального поля в этой области связано с работами Джошуа Ледерберга, который в 1952 г. ввел понятие «плазида». Ледерберг предложил обозначать

все внеядерные генетические элементы, способные к автономной репликации, термином «плаزمида». Взгляд на плазмиды как на симбионты и альтернативный взгляд на них как на составную часть генотипа, согласно Ледербергу, зависит от того, насколько широко исследователь трактует границы генотипа и наследственной системы организма.

Термин «эписома», стремительно ворвавшись в генетику в конце 1950-х гг., постепенно стал уходить в тень под напором более размытого, но зато более общего термина «плазмида» (Стент, Кэлинджер, 1981). Жакоб и Илья Вольман вначале полагали, что состояния интеграции и автономное взаимно исключают друг друга. Но это оказалось справедливым лишь для узкого класса элементов. Спектр взаимопревращений и переходов факультативных элементов широк. Так, некоторые гены, входящие в состав плазмид у одних видов бактерий, у других видов обнаруживаются в интегрированном состоянии (Хесин, 1984). Впоследствии было найдено, что МЭ элементы семейства *mdt4* у дрозофилы в одно и то же время могут существовать в виде встроенных в хромосому последовательностей, в виде их кольцевых аналогов в цитоплазме и, наконец, переходить в ранг инфекционных ретровирусов (Kim, et al., 1994).

Панорама возможных взаимопревращений и взаимопереходов генетических элементов была прозорливо представлена в книге Жакоба и Ильи Вольмана (1962, с. 418): «Мы приходим к заключению, что в результате определенных генетических событий могут возникать все промежуточные категории между вирусами (структуры экзогенные, инфекционные и внеядерные, т. е. принадлежащие к классу плазмид) и нормальными генетическими детерминантами клетки (структуры эндогенные, неинфекционные и интегрированные). Эписомы, следовательно, перекидывают своеобразный мост между наследственностью и инфекцией, между клеточной патологией и физиологией клетки, между ядерной и цитоплазматической наследственностью» (выделено мною. — М.Г.).

«Эписомные элементы могут либо присутствовать в клетке, либо отсутствовать, находиться в хромосоме, либо в цитоплазме, быть эндогенными или экзогенными, патогенными или безвредными. Таким образом, по своим свойствам эписомы составляют категорию генетических элементов, приближающихся одновременно к нормальным структурам клетки и к внутриклеточным паразитам, к хромосомным компонентам и к цитоплазматическим элементам».

Авторы предвидели открытие эписомоподобных элементов у эукариот, прозорливо указывая в качестве их аналога на «контролирующие элементы», открытые МакКлинток. Жакоб и Вольман, обсуждая взаимодействия эписом с геномом клеток хозяина, приходят к сходному с Дарлингтоном выводу, что наследственность и инфекция перестают быть несовместимыми.

Этот вывод подтверждается установленными в дальнейших исследованиях воплощениями или инкарнациями фага лямбда в системе фаг — бактерия (Фаг-лямбда, 1975).

1. Состояние вирулентности, инфекционности — фаг проникает в клетку и приводит её к гибели, лизису, так что из одной бактерии образуется 100—200 фаговых частиц.

2. Состояние профага — когда фаг интегрирован в хромосому, часть его генов активна и блокирует собственное размножение.

3. Облигатно-вирулентное состояние или утрата лизогенного состояния при повреждении или делеции в локусе «*cI*» у фага.

4. Облигатно-интегрированное в хромосому хозяина состояние при делеции локуса, контролирующего вырезание фага из ДНК хозяина.

5. Состояние плазмиды — при некоторых делециях фаг утрачивает способность образовывать белки оболочки, но сохраняет свойство репликации.

В рамках генно-инженерных работ на основе участия генома фага лямбда создано множество других удивительных конструкций.

6. Космиды — концевые фрагменты фага (cos-сайты), обеспечивающие упаковку в головку фага всей молекулы со встроенным посередине фрагментом чужеродной ДНК и участком репликации, взятым из бактериальной плазмиды. Такая космида при наличии целого фага-помощника способна проникать в клетку и реплицироваться в ней. В космиды упакован теперь весь разрезанный на фрагменты геном дрозофилы, а также многие части генома человека.

7. Химерный инфекционный агент, активный в отношении про- и эукариот, ДНК вируса полиомы введена в ДНК фага лямбда — возник вирус-химера, способный вызывать лизис бактерий и рак у мышей.

Если К. Дарлингтон в середине 1940-х гг. высказал мысль о трудности строгого выбора между плазмагеном и вирусом, то исследования, выполненные в последующие два десятилетия, утвердили эту мысль. Как уже было сказано, свойство мужских штаммов бактерий передавать часть своей ДНК и своих генов женским реципиентным штаммам зависит от факультативной F-плазмиды. Она способна к самовоспроизведению либо в автономном состоянии, либо будучи интегрированной в хромосому бактерии. Топография плазмиды в клетке-хозяине резко меняет свойство плодовитости последней и состав переносимых при конъюгации генов.

Когда F-плазида встроена в геном бактерии, то способность клетки-хозяина передавать свою ДНК женским донорам возрастает в десятки раз, а сама рекомбинация происходит совершенно особым образом. F-плазида способна включаться в хромосому клетки-хозяина в самых разных её участках и разной ориентации. При этом возникает большой набор штаммов с разными начальной точкой и направлениями переноса. Исключение фактора F из бактериальной хромосомы приводит к образованию различных автономных производных плазмид, несущих разные по длине фрагменты хромосомы клетки-хозяина, которые соседствовали с местом интеграции этой плазмиды. Некоторые производные варианты F-плазмиды несли в своем составе около четверти всего генома бактерии! (Стент, Кэлинджэр, 1981).

Фаг лямбда оказался подобным плазмиде в смысле способности существовать и автономно, и во встроенном в геном состоянии. Но возможны и другие сценарии симбиоза. Фаг P1 не интегрируется в хромосому бактерии, но стабильно сосуществует в клетках в виде низкокопийной плазмиды. Стабильность передачи в ряду поколений фага P1 зависит от упорядоченной сегрегации по дочерним клеткам при делении бактерии. Фаг P1 напоминает широкий класс автономных R-плазмид или плазмид резистентности, которые воспроизводятся автономно и несут в составе своей ДНК гены устойчивости к самым разным антибиотикам.

Как справедливо пишут Стент и Кэлинджэр (1981), с эволюционной точки зрения бактериофаги можно рассматривать «как особый класс плазмид, накопивших наследственную информацию, необходимую для синтеза белковой сомы — головки фага, в которую включается генетический материал. Таким образом, эволюция фаговой ДНК привела к образованию инфекционных плазмид, которые в одеянии фаговых частиц способны переходить вне цитоплазмы от одного хозяина к другому».

3. Открытие инсерционных элементов у прокариот

Мутации, вызванные появлением мобильных элементов, были найдены у микроорганизмов случайно. Обычно для большинства спонтанных мутаций удается найти

мутацию в другом гене (супрессор), подавляющую первую, так что восстанавливается нормальный фенотип. Но были обнаружены такие спонтанные мутации в галактозном опероне, которые выключают, инактивируют все гены, входящие в оперон, и в то же время не способны супрессироваться, хотя сами по себе дают реверсии к дикому типу. Когда затем методами молекулярной гибридизации и электронной микроскопии сопоставлялись мутантные и нормальные опероны, то у мутантов был обнаружен инсерционный сегмент ИС (Shapiro, 1969; Starlinger, Seadler, 1972, 1976).

Довольно быстро выяснилось, что существует целая серия инсерционных элементов. Все ИС-элементы имеют общие черты организации и свойства: их концы обрамлены повторенными последовательностями, в местах внедрения в хромосому образуются короткие дубликации. Размер элементов ИС2 и ИС3 равен 1300–1400 п. н., а мини-элементы ИС8 и ИС7 имели длину 108 и 54 п. н. ИС элементы способны включаться в разные локусы в любой ориентации, частично или полностью инактивируя работу гена-хозяина. Сами ИС не кодируют в своей ДНК никаких генов, кроме одного или нескольких, необходимых для собственного передвижения. Но зато они включают знаки генетической пунктуации, промоторы и терминаторы.

Некоторые из ИС, подобно фактору *Ds* у кукурузы, регулярно индуцируют разрывы хромосом и делеции вблизи локуса внедрения. Последовательности ИС элементов, выделенные из разных локусов, были почти идентичны. Более того, одни и те же ИС были обнаружены у разных видов бактерий. Их число в геноме может варьировать от нескольких штук до нескольких сотен. Например, у дизентерийной бактерии *Shigella dysenteriae* по геному разбросано около 200 копий ИС подобных элементов.

Стало очевидно, что ИС-элементы — не пришельцы неведомо откуда, а вполне обычные элементы генома, и что существует целая иерархия мобильных элементов. Сами ИС-элементы очень часто входят в состав мобильных элементов следующего класса — транспозонов. Транспозоны на концах обрамлены повторами или ИС-сегментами, а в середине несут разные гены, не связанные непосредственно с транспозициями, например гены устойчивости к антибиотикам. Следующий шаг в иерархии мобильных элементов — плазмиды. Это, по существу, транспозоны, которые приобретают фактор собственной репликации и поэтому способны размножаться в клетке относительно независимо от хромосомы хозяина. И наконец, последнее звено в этой иерархии — бактериофаги, которые уже включают в свой состав гены, необходимые для белковой оболочки.

В начале 1970-х гг. мало кто из молекулярных генетиков понимал, что открытие ИС-элементов и транспозонов — это молекулярное подтверждение идей Б. МакКлинток. Питер Штарлингер, один из открывателей мобильных элементов бактерий, констатирует, что еще в 1972 г. его первый обзор по инсерционным мутациям привлек мало внимания. Но уже в 1976 г. на второй опубликованный обзор пришла масса запросов. А спустя ещё год, на симпозиуме в Колд Спринг Харборе, созданном по инициативе Дж Шапиро в мае 1977 г., на доклады по подвижным элементам было трудно попасть в зал! (Starlinger, 1992).

Сам П. Штарлингер и его коллега Г. Сэдлер (H. Saedler) очень быстро поняли, что они, по существу, открыли то, что было четверть века назад предсказано Б. МакКлинток. Неудивительно, что они практически оставили работу по микроорганизмам и переключились на молекулярно-генетический анализ нестабильных мутаций у кукурузы и других растений. Их целенаправленные поиски сразу же увенчались успехом (Saedler, Starlinger, 1992).

4. Инсерционный мутагенез и вспышки мутаций у дрозофилы

4.1. Первые исследования нестабильных мутаций

В 1919 г. М. Демерец, (югослав по происхождению) приехал в США и затем стал работать в Корнельском университете как генетик кукурузы под руководством Эмерсона. Его заинтересовали высокомутабильные гены у растений и дрозофилы. Вскоре он обнаружил нестабильные мутации гена *yellow* (аллель *reddish-alpha*) «маленькие крылья» (*miniature*) у дрозофилы вида *D. virilis*. Частота реверсий к норме от высокомутабильных аллелей достигала у одного из аллелей 25 %. Ревертанты были стабильны. Демерецу удалось выделить от исходного нестабильного аллеля *miniature* мутантные производные, которые ревертировали к норме и в половых и соматических клетках, или только в соматических, либо становились стабильными. Изучив всё, что можно было «выжать» из генетических методов, М. Демерец, как он сам пишет, вынужден был заняться другими проблемами, не высказав какой-либо способной быть проверенной гипотезы. Он доложил о своих исследованиях в 1927 г. на 5-м Международном генетическом конгрессе в 1927 г. (Demerec, 1927) и затем подытожил все данные о нестабильных генах у дрозофилы (Demerec, 1941). Став в 1941 г. во главе знаменитого ныне Отдела генетики Института Карнеги (Вашингтон) в Колд Спринг Харборе, Демерец сразу пригласил в этот отдел Барбару МакКлинток, которая проработала там с 1942 г. до конца жизни. Сам же Демерец переключился на исследования по генетике микроорганизмов. В 1950 г. он пригласил в отдел бактериолога Альфреда Херши (A. Hershey), чтобы работать в этом направлении. Через два года Херши выполнил свои знаменитые опыты по доказательству, что именно ДНК летальных для бактерии фагов, а не входящие в их состав белки, ответственны за инфекционные свойства. (Поразителен выбор Демереца — и МакКлинток, и Херши стали лауреатами Нобелевской премии.)

К сожалению, нестабильные мутанты Демереца были утрачены и вновь независимо, в других локусах, найдены у этого вида лишь спустя 50 лет в лаборатории М.Б. Евгеньева. Нестабильность у *D. virilis* возникала в межлинейных скрещиваниях в ситуации гибридного дисгенеза и оказалась связанной с активацией и инсерциями разных подвижных генетических элементов (Евгеньев и др., 1982).

Исследования нестабильных генов у дрозофилы после работы Демереца не проводились в течение 30 лет и возобновились лишь в конце 1960-х гг. в работах американского генетика Мелвина Грина (Green, 1967). Это поразительно, поскольку, начиная с 1980-х гг., литература по генетике дрозофилы полна сообщений о таких явлениях. Дело, видимо, в том, что к этому времени исследователи стали подготовленными к такому поведению генов. В конце 1960-х гг. М. Грин обнаружил высокомутабильный аллель гена *white*, который с частотой 1×10^{-3} давал реверсии к норме, а также мутировал к промежуточным по фенотипу (цвет глаз) аллелям. Кроме того, этот аллель обладал способностью к транспозициям в другие хромосомы. М. Грину удалось локализовать места транспозиций, и он опубликовал статью в самом авторитетном американском генетическом журнале “Genetics”, ожидая большого резонанса (Green, 1969).

Но никакого особого отклика (судя по запросам на статью) не было. Мелвин Грин вспоминает спустя 15 лет (Green, 1992): «Это расстроило и удивило меня, поскольку я думал, что явление спонтанной транспозиции гена заинтересует генетиков. Ведь феномен транспозиции имеет очевидные генетические и эволюционные следствия. Транспозиции w^c дополняли явление транспозиции контролирующих элементов МакКлинток. Транспозиции делали понятным, как ген, локализованный в одной хромосоме одного вида дрозофил, локализуется в негомологичных хромосомах у других

видов. Спустя несколько месяцев после публикации работы я посетил Б. МакКлинток в её лаборатории в Колд Спринг Харборе. Когда я посетовал ей на невнимание к статье о транспозиции, она мягко успокоила меня таким замечанием: «Не волнуйтесь, нет ничего необычного с вашей статьей о транспозиции; люди просто к этому не готовы. Я прекратила публиковать мои результаты в генетических журналах в 1964 г., поскольку никто не читал, что я писала!»».

Неподготовленность, естественный консерватизм, нежелание отказаться от надёжного постулата о стабильной локализации генов имели следствием защитную реакцию следующего свойства. Может быть, в опытах Б. МакКлинток всё абсолютно правильно, но мало ли чего не бывает в некоторых линиях и в некоторых группах организмов. Иногда, например, целые наборы хромосом могут элиминироваться, нельзя же это считать правилом.

4.2. Популяционно-генетические исследования

Данные в пользу того, что генетическая нестабильность у дрозофилы не курьез, пришли из исследований по генетике популяций, а именно — работ по гибриднему дисгенезу. Этим термином определили дестабилизацию потомства от скрещиваний самок лабораторных линий с дикими самцами из природных популяций. Самки первого поколения оказывались стерильными или полустерильными, а в потомстве гибридных самцов наблюдались мутации во многих локусах и хромосомные перестройки. Иными словами, цитоплазма лабораторных линий оказывалась несовместимой с хромосомами самцов диких линий. При этом путем серий насыщающих скрещиваний удавалось изменить генетическую конституцию цитоплазмы. В принципе подобный тип ядерно-цитоплазматической несовместимости был известен в генетике, например при отдаленной гибридизации. Необычным было широкое распространение этого феномена в природе при обычных скрещиваниях внутри вида и тот факт, что факторы, вызывающие дисгенез, разбросаны по разным хромосомам (Picard, 1976; Kidwell M, Kidwell J., Sved, 1977). Это обнаружили и французские, и американские исследователи. Причем Пикард (Picard, 1976) прозорливо заметил в обсуждении своей подробной статьи, что данный феномен имеет определенное сходство с «транспозициями контролирующих элементов, описанными на кукурузе МакКлинток».

Из природных популяций разными авторами были выделены также хромосомы с факторами-мутаторами (MR factors), которые в определённых типах скрещиваний вызывали у гибридных самцов рекомбинацию и, что особенно интересно, появление нестабильных мутаций предположительно инсерционной природы (Green, 1977). Однако в целом, вплоть до самого конца 1970-х гг., как ретроспективно заметил известный популяционный генетик Дж. Кроу, ситуация с выяснением причин высокой мутабельности отдельных генов и линий у дрозофил оставалась неясной. «Попытки картировать факторы мутабельности обычно оказывались неубедительны, а само свойство часто утрачивалось спустя несколько поколений» (Crow, 1988). Важный сдвиг был сделан в работах У. Энгельса (W. Engels), генетика (Висконсинский университет). В результате четкого генетического анализа он сформулировал вывод, что свойство гибридного дисгенеза зависит от элементов, которые содержатся в хромосомах отцовских Р-линий и взаимодействуют с материнским цитотипом (свойствами цитоплазмы) М-линий. После этого Энгельс решил проверить, как будет вести себя в ситуации гибридного дисгенеза (потомство от скрещиваний: самки «М цитотипа Х самцы с Р-факторами») нестабильная мутация в локусе *singed* (*sn*) — опаленные щетинки). Его выбор, несомненно, определялся опубликованной в 1977 г. статьей о серии нестабильных, предположительно инсерционных, *singed*-аллелей из природы (Golubovsky, Ivanov, Green 1977), а также сведениями Р.Л. Берг о вспышке мутабельности

этого гена (Р.Л. Берг к тому времени стала работать в Висконсинском университете в той же лаборатории). Результат оказался впечатляющим. У гибридов первого поколения в случае передачи от самцов хромосом с Р-факторами нестабильный *sn*-аллель мутировал в десятки раз чаще, чем в потомстве реципрокного скрещивания (Engles, 1979).

Вскоре, в 1982 г., было получено прямое молекулярно-генетическое доказательство, что хромосомы с мутаторными Р-факторами содержат Р-транспозоны, которых нет в линии с М-цитотипом (Rubin, Kidwell, Bingham, 1982). Мистика гибридного дисгенеза сразу прояснилась. Цитоплазма М-линий не передавала гибридам супрессор транспозиции МЭ в хромосомах Р-линий. Поэтому в потомстве скрещиваний «самки М х самцы Р» в первом поколении происходила активация Р-элементов и множественные инсерционные мутации. Они сопровождалась летальными и видимыми нестабильными мутациями, нарушая зародышевые клетки самок. Р-элемент, по образному выражению Хесина, оказался «чемпионом по прыжкам», обладая в случае активации сверхвысокой способностью к транспозиции. С инсерциями Р-элементов оказались связаны более 50 % возникающих спонтанно в природных популяциях нестабильных аллелей гена *singed* (Голубовский, Беляева, 1985; Hawley et al., 1982).

4.3. Наблюдения вспышек мутаций в природных популяциях дрозофил

В 1930-е гг., выполняя исследовательскую программу Четверикова, биологи в России начали разносторонние исследования по генетике природных популяций дрозофил. Что касается спонтанного мутационного процесса, то наиболее важные новации были обнаружены в ходе многолетних исследований Р.Л. Берг (обобщающие работы: Berg 1982; 1993): 1) различие природных популяций по общему темпу мутирования; 2) колебание темпа мутирования в одной и той же популяции во времени; 3) относительно синхронные вспышки мутабельности определенных локусов в географически удалённых регионах — «мода на мутации»; 4) со временем «мода» на мутации меняется и повышается мутабельность других генов. Так, Р. Л. Берг обнаружила сначала резкую вспышку мутабельности (в сотни раз выше нормы) гена «желтое тело» в конце 1930-х гг., а затем в конце 1940-х — возврат уровня мутирования к норме. Эти данные можно считать подтверждением идеи Гуго де Фриза о колебаниях темпа мутирования. Необходимо было быть готовым, что произойдут новые вспышки в других локусах.

Действительно, регулярные, из года в год наблюдения за изменением генофондов природных популяций дрозофил позволили Берг зафиксировать в 1968 г. резкий всплеск мутабельности и популяционной концентрации мутаций типа “*abnormal abdomen*” (нарушение сегментации брюшка). В 1973 г. Берг обнаружила вспышку мутаций локуса сцепленного с полом гена *singed* “опаленные щетинки” в двух географически удалённых популяциях (Berg, 1974, 1982). В период 1974—1975 гг. было проведено изучение обнаруженной вспышки гена *singed* на большом ареале, от Украины — Средней Азии, до популяций Дальнего Востока. Частота возникновения мутаций в этом локусе возросла в эти годы до уровня $0.3-0.9 \times 10^{-3}$, то есть в сотни раз выше обычной (Golubovsky, 1980).

Большинство выделенных из разных популяций аллелей гена *singed* оказались нестабильными. Они отличались по фенотипу, частотам и направлениям мутирования в генеративных и соматических клетках. С частотой в сотни и тысячи раз выше обычной они мутировали к норме. При этом неожиданно оказалось, что нормальные по фенотипу ревертанты в потомстве либо вновь давали исходных мутантов, либо наряду с ними целый другие мутантные производных. Это был первый случай в популяционной генетике, когда в природных условиях наблюдалась вспышка целой серии нестабильных аллелей.

Стала очевидной необходимость детального генетического анализа этого удивительного феномена.

4.4. Некоторые итоги генетического анализа нестабильных природных аллелей

Отмечу основные особенности и результаты проведенного нами генетического анализа.

Особенность анализа. Памятуя о том, что нестабильные линии, которые изучал Демерец, вскоре утратили свойство нестабильности и были утрачены, мы применили простой и, как оказалось, надёжный метод поддержания линий с определённым нестабильным *sn*-аллелем в X-хромосоме. Для каждого последующего поколения закладывалось 10–15 индивидуальных отводок (сублиний) и отбиралась для последующего разведения та сублиния, где проявлялось само свойство нестабильности, то есть возникали новые мутантные производные. Таким образом удалось просто и надёжно поддерживать само свойство повышенной мутабельности, которое в главных чертах сохранялось на протяжении десятков поколений. К примеру, в 1998 г. молекулярно-генетическими методами изучались нестабильные аллели, выделенные в 1973 г., то есть спустя 25 лет поддержания или около 300 «мушинных» поколений (O'Hare et al., 1998).

Аллелспецифичность нестабильных аллелей. Аллели локуса *sn* из природы различались по степени мутантного выражения, частоте и направлению мутирования в генеративных и соматических клетках. Так, из одной популяции были выделены два разных по фенотипу мутантных аллеля *sn77* — сильное мутантное проявление и *sn63* — умеренное мутантное проявление. Оба аллеля продуцировали в потомстве нестабильные нормальные по фенотипу производные, которые в следующих поколениях вновь часто мутировали. Однако нормальный по фенотипу аллель *sn(+77)* при этом ревертировал к исходным мутантам с сильным проявлением, а аллель *sn(+63)* — к исходным мутантам со слабым проявлением. Иными словами, каждая аллельная пара сохраняла как бы память об определённом направлении мутирования в прямую и обратную сторону. Такое поведение послужило одним из важных косвенных доводов в пользу принятия инсерционной гипотезы МакКлинток, согласно которой специфичность мутирования определяется спецификой структуры самого МЭ и местом его внедрения в локус-хозяин.

Вся феноменология данных генетического анализа поведения нестабильных аллелей из природных аллелей дрозофилы оказалась в главных чертах поразительно сходна с поведением нестабильных генов у кукурузы, изученных Б. МакКлинток. До проведённого нами исследования ещё можно было думать, что нестабильные мутации встречаются лишь в некоторых лабораторных линиях или как-то связаны с перестройками хромосом (как долго объясняли данные де Фриза по колебаниям темпа мутаций в транслокационных гибридах энотеры). По иронии истории, именно подобное возражение «неестественности» делалось по отношению к обычным мутациям до концептуальной работы С.С. Четверикова и прямых популяционно-генетических исследований его учеников! Обнаружение всплесков мутаций во множестве популяций и их нестабильность, связанная с инсерциями МЭ, снимало основные возражения скептиков о маргинальности инсерционного мутагенеза. Оставалось ждать прямого молекулярного подтверждения: что же представляют собой на уровне ДНК инсерционные элементы в нестабильных генах дрозофилы? В конце 1970-х гг. подобные исследования стали вестись независимо друг от друга в разных лабораториях. В лаборатории Дж. Рубина были выделены разные МЭ типа *coria* и затем Р-транспозон, ответственный за феномен гибридного дисгенеза (Rubin et al., 1981; Rubin, Bingham, Kidwell, 1982).

То, как это произошло в молекулярно-цитогенетических исследованиях Е. Ананьева, проводимых в лабораториях Г. Георгиева и В. Гвоздева, рассказано в статье О.Н. Данилевской¹ (2011). На молекулярном уровне МЭ дрозофилы были открыты случайно в ходе выделения клонов активно транскрибируемых генов (см.: Tchurikov, Puyn, Skryabin et al., 1981). Выделяемая ДНК дрозофилы «нарезалась» рестриктазами на отдельные фрагменты, они клонировались с помощью методов генной инженерии, и затем определяли, какие из фрагментов образуют гибриды с мРНК культивируемых клеток дрозофилы. Затем Е. Ананьев визуализировал клоны на политенных хромосомах разных линий. Было найдено, что ряд клонов встречается среди повторенных последовательностей, а гибридизация меченной ДНК на политенных хромосомах показывала их дисперсную локализацию. Вначале эти клоны были названы «мобильные диспергированные гены» (МДГ), потом утвердилось более нейтральное название — мобильные элементы. Ананьев впервые установил межлинейное и внутрилинейное варьирование локализации одних и тех МЭ. Это свидетельствовало об их транспозициях. К началу 1990-х гг. у разных видов дрозофил было выделено свыше 30 семейств подвижных генов. Доля МЭ в геноме дрозофилы вида *D. melanogaster* составляет около 15 %. Около 70 % спонтанных мутаций, включая перестройки хромосом, связано с внедрением МЭ. Инсерционный мутагенез оказался ведущим фактором в генерации наследственных изменений геномов и их эволюции.

Природная генетическая инженерия. Исключительно интересным с точки зрения теории эволюционной генетики оказался найденный нами в природной популяции Дальнего Востока случай «природной генетической инженерии» (термин Дж. Шапиро — (Shapiro), 1992, 2011) мутант *singed-49*. Два разных гена — один из них вызывает при мутациях аномалии щетинок (*singed*), а другой — аномалии крыла (*club wings*) — стали совместно проявляться и мутировать. Этот двойной мутант давал в потомстве нормальные производные, часть из них оказывалась нестабильной и вновь изменялась в сторону исходного двойного мутанта!

Проведенный нами подробный генетический анализ привёл к выводу, что лишь инсерционная гипотеза дает удовлетворительное истолкование основным сценариям поведения этой природной генетической конструкции (Голубовский, Захаров, 1979; Захаров, Голубовский, 1980). Было предположено, что оба гена попали под контроль одного мобильного элемента и стали совместно проявляться и мутировать. Последующий молекулярно-генетический анализ международного коллектива авторов полностью подтвердил исходную инсерционную гипотезу (O'Hare et al., 1998). Оказалось, что в первый интрон гена *sn* внедрился транспозон *hobo* и что за пределами локуса расположены другие *hobo* копии, между которыми с большой частотой происходят рекомбинации. Она затрагивает функциональные части локуса и приводит к циклам — инверсия—реинверсия—инверсия, что на уровне фенотипа выглядит как переходы мутант—норма—мутант (Hawley et al., 1988).

Сходным образом получил истолкование механизм локальный вспышки мутации *yellow*, который был обнаружен нами в одной популяции Украины в 1981 г. В регуляторный район гена внедрился МЭ *hobo*, и эта вставка привела к мутантному состоянию гена. Но за пределами гена в той же X-хромосоме оказался ещё один одноименный элемент и регулярная рекомбинация приводила к переходам мутант—норма—мутант и т. д.

¹ Публикуется в этом же номере. См. с. 79—89.

Возникновение стабильных производных в большинстве случаев было вызвано вырезанием МЭ из данного локуса (Грачева, Захаров, Волошина и др., 1998).

Таблица. Основные вехи в изучении и открытии нестабильности генов, инсерционного мутагенеза и мобильных элементов

Годы	Исследователи	Факты и гипотезы
1901	Hugo de Vries	Теория мутаций. Гипотеза о колебании темпа мутаций и о нестабильном состоянии наследственных факторов.
1914–1917	P. Emerson	Анализ соматической и генеративной нестабильности гена окраски перикарпа у кукурузы; феноменология без гипотезы.
1926–1941	M. Demerec	Открытие и анализ нестабильных генов у дрозофилы. Автономный характер и аллелеспецифичность мутирования в половых и соматических клетках. Идея о сходстве нестабильности и эффекта положения.
1937–1961	Р. Л. Берг, С.М. Гершензон	Колебание общего темпа мутирования и резкие флуктуации мутабельности отдельных генов в природных популяциях дрозофил. Подтверждение идеи де Фриза.
1950–1965	B. McClintock	Цитогенетика нестабильных мутаций у кукурузы. Открытие МЭ, способных контролировать характер экспрессии гена-хозяина и вызывать хромосомные мутации.
1953–1961	A. Lwoff, E. Wollman, F. Jacob	Концепция профага и открытие роли эписом в регуляции пола бактерий и генетической рекомбинации.
1967–1969	M.M. Green	Возобновление генетики нестабильности у дрозофилы. Обнаружение транспозиции высокомутабельного гена.
1969–1976	P. Starlinger, H. Saedler, J. Shapiro	Открытие у бактерий инсерционных элементов и их молекулярной структуры. Подтверждение гипотезы МакКлинток на уровне ДНК.
1977–1979	М.Д. Голубовский	Генанализ серии нестабильных аллелей из природных популяций дрозофил. Гипотеза об инсерционной природе этих аллелей и о связи вспышек мутаций с инсерциями.
1977–1978	G. Rubin, E. Ананьев, В.А. Гвоздев, Г.П. Георгиев	Открытие семейств МЭ у дрозофилы и изучение их структуры и транспозиций.
1981	M. Kidweli, G. Rubin, P. Bingham, W. Engels	Открытие мобильного Р-элемента, ответственного за Р-М-систему гибридного дисгенеза
1982	G. Rubin, A. Spradling, W. Engels	Создание контролируемой системы горизонтального переноса генов у дрозофилы на основе плазмид с Р-элементом. Регуляция мутабельности при трансгенезе.

Основные ссылки см. в сводках: Хесин, 1984; Crow, 1988; Голубовский, 2000.

Таким образом, в период 1977–1982 гг. провидческая гипотеза Б. МакКлинток о связи нестабильности с внедрением МЭ была полностью подтверждена в исследованиях на дрозофиле, как на генетическом, так и на молекулярном уровнях. Основные этапы этой длинной истории в раскрытии загадки нестабильности представлены в таблице.

Заключение

Мобильные элементы к настоящему времени найдены во всех случаях, где сколько-нибудь детально вёлся их поиск: от плоских червей до млекопитающих, включая человека. Самые первые найденные у дрозофилы мобильные элементы типа МДГ или *copia* оказались сходными по организации с РНК-содержащими онкогенными ретровирусами, куда относится и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ).

У прокариот можно выстроить эволюционный ряд: инсерционные сегменты — транспозоны — плазмиды — бактериофаги. Точно так же можно выстроить аналогичный ряд у эукариот. Эндогенные ретровирусы имеют на концах длинные концевые повторы, ДКП или LTR, их длина 5–7 тыс. нуклеотидных пар, они несут всего три гена. Архетип их структуры таков:

$5' - LTR - gag - pol - env - LTR - 3'$

ген *gag* — кодирует внутренние структурные белки вируса;

ген *pol* — кодирует обратную транскриптазу (ревертазу);

ген *env* — белки оболочки;

ДКП несут знаки генетической пунктуации, их размер составляет 250–500 п. н.

МГЭ эукариот делятся на два основных класса. К первому классу относятся элементы, которые перемещаются, используя обратную транскрипцию — *ретротранспозоны*. Они несут ген, кодирующий ревертазу, и, чтобы начать встраиваться, по матрице РНК строят ДНК-копию, которая и внедряется в разные места хромосомы. В свою очередь, ретротранспозоны распадаются на две группы: а) ретровирусоподобные элементы, несущие на концах длинные концевые повторы, и б) невирусные элементы, не имеющие на концах ДКП, но кодирующие ген ревертазы. В группу ретровирусоподобных входят элементы из геномов дрожжей, насекомых, млекопитающих и растений.

Второй класс МГЭ образуют собственно *транспозоны*, имеющие на концах короткие обращенные повторы и в середине — ген, кодирующий транспозазу. Сюда попадают: знаменитые контролирующие элементы кукурузы семейства *Ac-Ds*, мобильные элементы *P* и *Hobo* у дрозофилы; удивительный элемент *mariner*, найденный впервые у одного эндемичного вида дрозофил с острова Маврикий и оказавшийся распространённым от нематод до человека.

Возникает вопрос о происхождении разных семейств мобильных элементов. Чем объяснить резкие различия наборов МГЭ у близких видов и отсутствие упорядоченности в их встречаемости, факультативность. Виды одного рода зачастую не имеют одинаковых МГЭ в геномах, как, например, *D. melanogaster* и *D. virilis*. Подобные факты служат веским доводом об экзогенном, вирусном происхождении мобильных элементов. Можно думать, что такие виды заразились разными вирусами уже после дивергенции. Данные факты также говорят о сравнительной независимости эволюции МГЭ от эволюции других генетических компонентов.

Для понимания действующих в природе процессов реорганизации генома очень важны данные, полученные шведским генетиком Гуннаром Изингом. Он провел систематические наблюдения за передвижением по геному в разных линиях большого транспозона, имеющего в своем составе ген *white* и расположенный поблизости ген «грубые глаза». Этот гигантский транспозон длиной в десятки тысяч нуклеотидных пар, возник спонтанно. Благодаря большой протяженности он оказался виден в участках своего внедрения на политенных хромосомах слюнных желез в виде избыточных дисков. В результате целенаправленных поисков Г. Изинг идентифицировал более 200 различных транспозиций. Перемещаясь по геному, этот супертранспозон прихватывал фрагменты соседних локусов. Г. Изингу удалось обнаружить явление похожее на чудо. Транспозон встроился в район центromеры, захватил сегмент центromерной ДНК и превратился в минихромосому! (Block, Ising, 1990). Так могут возникать новые хромосомы и новые генные конструкции.

Эти факты дали нам основание сделать концептуальное обобщение о целесообразности разделения генома на облигатный и факультативный компоненты. К последнему относятся генетические элементы, число и топография которых варьирует от вида к виду, от популяции к популяции, вплоть до межтканевых различий внутри индивида. Сюда входят и МЭ. Благодаря этому факультативные элементы у высших организмов могут иметь важную роль в реорганизации генома, в регуляции действия генов и другого рода эволюционно значимых наследственных изменений (Голубовский, 1985; 2000; Golubovsky, 2011).

Литература

- Георгиев Г.П. Гены высших организмов и их экспрессия. М.: Наука, 1989.
- Голубовский М.Д. Нестабильность локуса *singed* у *Drosophila melanogaster*: фенотипически утантные и нормальные аллели локуса *singed*, мутирующие по принципу всё или ничего // Генетика. 1977а. Т. 13. С. 847–861.
- Голубовский М.Д. Нестабильные аллели локуса *singed* и их производные у *Drosophila melanogaster*, мутирующие в разных направлениях // Генетика. 1977б. Т. 13. С. 1030–1040.
- Голубовский М.Д. Организация генома и формы наследственной изменчивости эукариот // Успехи современной биологии. 1985. Т. 100. Вып. 6. С. 323–329.
- Голубовский М.Д. Век генетики: эволюция идей и понятий. СПб.: Борей, 2000. 262 с.
- Голубовский М. Книга «Непостоянство генома» Р.Б. Хесина в аспекте концептуальной истории генетики // Молекулярная биология. 2002. Т. 36. С. 338–347.
- Голубовский М.Д., Ерохина И.Д. Мутационный процесс в линиях с супермутабильными аллелями локуса *singed* у *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1977. Т. 13. С. 1210–1219.
- Голубовский М.Д., Захаров И.К. Совместные реверсии двух нестабильных генов в X-хромосоме *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1979. Т. 15. С. 1599–1609.
- Грачева Е.М., Захаров И.К., Волошина М.А., Георгиев Г.П., Голубовский М.Д. Вспышки мутаций гена *yellow* в природной популяции *Drosophila melanogaster* связаны с inserцией транспозона *hobo* // Генетика. 1998. Т. 34. С. 364–370.
- Данилевская О.В. Мобильные генетические элементы дрозофилы: история открытия и судьба первооткрывателей // Вавиловский журнал генетической селекции. 2011. Т. 15. С. 215–225.
- Евгеньев М.Б., Ениколопов Е.Н., Пеунова Н.И. Транспозиции мобильных диспергированных элементов у дрозофилы // Доклады АН СССР. 1982. Т. 64. Вып. 6. С. 145–147.
- Захаров И.К., Голубовский М.Д. Эффект температуры и Y-хромосомы на экспрессию и частоту совместных изменений двух нестабильных мутаций у *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1980. Т. 16. С. 1603–1612.
- Жакоб Ф., Вольман Э. Пол и генетика бактерий. М.: Мир, 1962.

- Стент Г., Кэлинджер. Молекулярная генетика. М.: Мир, 1981.
- Уоллис К. Дань современному Менделю // Америка. 1984. № 331. С. 43.
- Фэг лямбда / пер. с англ.; ред. Б.Н. Ильяшенко. М.: Мир, 1975. 422 с.
- Хесин Р.Б. Непостоянство генома. М.: Наука, 1984. 472 с.
- Berg R.L. A simultaneous mutability raise at the *singed* locus in two out three *Drosophila melanogaster* populations studied in 1973 // *Drosophila Information Service*. 1974. Vol. 51. P. 100.
- Block K., Ising G. Minichromosomes in *Drosophila melanogaster* derived from transposing element TE1 // *Chromosoma*. 1990. Vol. 99. P. 336–343.
- Beadle G.W. Rollins Adams Emerson // *Genetics*. 1950. Vol. 35. P. 1–3.
- Crow J. The genesis of dysgenesis // *Genetics*. 1988. Vol. 10. P. 315–318.
- DNA insertions elements, plasmids and episomes / ed. by A.I. Bukhari, J.A. Shapiro, S. Adhya. New York: Cold. Spr. Harbor, 1977.
- Demerec M. Unstable genes in *Drosophila* // *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.* 1941. Vol. 2. P. 141–151.
- De Vries Hugo. Species and varieties: their origin by mutation (Lectures delivered at the University of California / ed. by D.T. McDougal). Chicago: Open Court Publ., 1906.
- Dynamic Genome: Barbara McClintock's ideas in the century of genetics / ed. by N. Fedoroff, D. Botstein. New York: Cold Spr. Harbor Lab. Press., 1992.
- Emerson R.A. Genetical studies on variegated pericarp in maize // *Genetics*. 1917. Vol. 2. P. 1–35.
- Engels W. Extrachromosomal control mutability in *Drosophila melanogaster* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979. Vol. 76. P. 4011–4015.
- Golubovsky M.D., Ivanov Yu. N., Green M.M. Genetic instability in *Drosophila melanogaster*: Putative multiple insertion mutants at the *singed* bristle locus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977. Vol. 74. P. 2973–2977.
- Golubovsky M.D. Mutational process and microevolution // *Genetica*. 1980. № 5. P. 52–53.
- Golubovsky M.D. The unity of the whole and freedom of parts: facultativeness principle in the hereditary system // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011. Т. 15. С. 423–431.
- Green M.M. The genetics of mutable gene at the white locus // *Genetics*. 1967. № 5. P. 429–441.
- Green M. Controlling element, mediated transposition of the white gene in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 1969. Vol. 61. P. 429–441.
- Green M.M. Genetic instability in *Drosophila melanogaster*: de novo induction of putative insertion mutations // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977. Vol. 74. P. 3490–3493.
- Green M.M. Annals of mobile DNA elements in *Drosophila*: the impact and influence of Barbara McClintock // *The Dynamic Genome*. New York: Cold Spr. Harbor Lab Press., 1992. P. 117–122.
- Hawley S.R., Steuber R.A., Marcus G.H. et al. Molecular analysis of unstable P element insertions at the *singed* locus of *Drosophila melanogaster*: evidence for intracistronic transposition of a P element // *Genetics*. 1988. Vol. 119. P. 85–94.
- Kidwell M.G., Kidwel J.F., Sved J.A. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: syndrome of aberrant traits including mutation, sterility and male recombination // *Genetics*. 1977. P. 813–833.
- Kim A.L., Terzian P., Santamaria A., Pellison N. et al. Retroviruses in vertebrates: the gypsy retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. Vol. 91. P. 1285–1289.
- McClintock B. Chromosome organization and genie expression // *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* 1951. Vol. 16. P. 13–47.
- McClintock B. Controlling elements and the gene // *Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* 1956. Vol. 21. P. 197–216.
- McClintock B. Some parallels between gene control systems in maize and in bacteria // *Amer. Natur.* 1961. Vol. 95. P. 265–277.
- McClintock B. The control of gene action in maize // *Brookhaven Symp. Biol.* 1965. Vol. 18. P. 162–184.
- McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge // *Science*. 1984. Vol. 226. P. 792–801.

O'Hare K., Tam J.L., Lim J.K., Yurchenko N.N., Zalharov I.K. Rearrangements at a *hobo* element inserted into the first intron of the *singed* gene in the unstable sn49 system of *Drosophila melanogaster* // Mol. Gen. Genet. 1998. Vol. 257. P. 452–460.

Picard G. Non mendelian sterility in *Drosophila melanogaster*: hereditary transmission of I factor // Genetics. 1976. Vol. 83. P. 107–123.

Rubin G.M., Brorein J.R., Dunsmuir P., Flavell A.J., Levis R., Strobel E., Toole J.J., Young E. Copia-like transposable elements in the *Drosophila* genome // Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol. 1981. Vol. 45. P. 619–628.

Rubin B.M. M.G. Kidwell and P.M. Bingham. The molecular basis of P-M hybrid dusgenesis: the nature of induced mutations // Cell. 1982. Vol. 29. P. 987–994.

Saedler H., Starlinger P. Twenty-five years of transposable elements research in Koln // The Dynamic Genome: Barbara MacClintock's ideas in the century of genetics. 1992. P. 243–263.

Shapiro J. Mutations caused by insertion of genetic material in into the galactose operon *Esherichia coli* // J. Mol. Biol. 1969. Vol. 40. P. 93–102.

Shapiro J. Natural genetic engineering in evolution // Genetica. 1992. Vol. 86. P. 99–111.

Shapiro J. Evolution. A view from 21st century. FT Press Science, 2011.

Starlinger P., Saedler H. Insertion mutations in microorganisms // Biochemie. 1972. Vol. 54. P. 177–185.

Starlinger P., Saedler H. IS elements in microorganisms // Current Topics Microbiol. Immunol. 1976. Vol. 75. P. 11–152.

Tchurikov N.A., Ylyin Y.V., Skryabin K.G., Aanaiev E.V., Baev A.A., Krayev A.S., Zerkentzova E.S., Kulguskin V.V., Lubomirskaya N.V., Georgiev G.P. Gereal properties of mobile dispersed genetic elements in *Drosophila melanogaster* // Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol. 1981. Vol. 45. P. 665–665.

Transposable Elements / ed. by H. Saedler, A. Gierl. Springer, 1996.

Gene Instability and Mobile Elements: A History of its Research and Discovery

MIKHAIL D. GOLUBOVSKY

University of California, Berkeley, USA; mdgolub@gmail.com

The main observations, experiments, and intellectual framework leading to the discovery of mobile elements (ME) and to the concept of a dynamic genome are discussed in diverse areas of genetic research. At first, they were thought not to be related to each other, however an unexpected anastomoses occurred leading to the common non-canonical conception. We briefly present the semantics of the relevant experimental facts and ideas in five relevant ares of genetic research: (a) B. McClintock's studies of unstable maize genes and her concept of mobile controlling elements; (b) the discovery of plasmid and episomes in bacteria and the prophage concept; (c) the discovery of insertion mutations and IS elements and transposons in bacteria; (d) studies on high mutability and genetic instability in some *Drosophila* lines and the discovery of the omnipresence of insertion mutations in natural *Drosophila* populations; (e) direct molecular isolation of a series of diverse ME in *Drosophila* and information on their involvement in a spectrum of hereditary changes. We focused on the results of our own (and co-authors) studies between 1977–1979, which lead to the discovery of insertional mutagenesis in nature. We describe the three aspects of research required: 1) experimental genetic analysis of natural unstable alleles in different loci; 2) genetic evidence of the correspondence of behavior of natural unstable mutations to McClintock's concept of ME; 3) direct molecular confirmation of insertions of diverse ME in the unstable loci that were studies, and the importance of ME activation in the occurrence of previously described mutation bursts in geographically distant populations.

Keywords: gene instability, genome, mobile elements, insertional mutagenesis, mutation bursts.