

УДК 576.316.2:57.08

ВКЛАД Е.В. АНАНЬЕВА В ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕНТРОМЕРЫ И КОНСТРУИРОВАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ХРОМОСОМЫ РАСТЕНИЙ

© 2010 г. О. Н. Данилевская

Pioneer Hi-Bred International, A DuPont Company Johnston, IA 50131, USA;

e-mail: olga.danilevskaya@pioneer.com

Поступила в редакцию 28.01.2010 г.

Описан принцип организации растительной центромеры из блоков повторяющихся последовательностей ДНК и проведена первая успешная самосборка искусственной хромосомы растений из отдельных клонированных элементов. Рассмотрен вклад Е.В. Ананьева в решение этой проблемы

Центромеры необходимы для правильного распределения родительских хромосом между дочерними клетками при митозе и мейозе. Они представляют собой сложные комплексы многократно повторяющихся последовательностей ДНК, связанных со специфическими белками. Поэтому исследование их структуры с помощью молекулярных методов и идентификация их функционально важных элементов представляет собой чрезвычайно сложную задачу. Относительно просто устроены центромеры низших эукариот, пекарских (*Saccharomyces cerevisiae*) и пивных (*Schizosaccharomyces pombe*) дрожжей. Они были клонированы и использованы для сборки искусственных хромосом еще в 80-х годах прошлого века [1]. В 90-х годах было показано, что центромеры человека состоят из многократно повторенных коротких повторов альфоидной сателлитной ДНК, и первая искусственная хромосома человека была получена в культуре клеток в 1997 г. [2]. Однако относительно структурной организации центромер растительных хромосом до 1996 г. не было никаких молекулярных данных.

Перспективным объектом для выделения центромерных последовательностей растений были хромосом-дополненные линии овса (*Avena sativa*), содержащие одну из десяти хромосом кукурузы (*Zea mays*) [3]. Эти уникальные хромосомные гибриды позволяют выделять клоны ДНК, происходящие из индивидуальных хромосом кукурузы. Для этого были необходимы молекулярные зонды, с помощью которых можно скринировать геномные библиотеки, построенные из хромосом-дополненных линий. На первом этапе работы в качестве зондов были использованы мобильные элементы кукурузы, которые обладают высокой видовой специфичностью; они оказались эффективными маркерами генетического материала кукурузы в геномных библиотеках хромосом-до-

полненных линий овса [3]. При клонировании гетерохроматических узелков (“knobs”) кукурузы в качестве зонда был использован выделенный ранее 180-нуклеотидный повтор. При анализе последовательностей, выделенных из гетерохроматических районов, был обнаружен новый тип тандемных повторов и показано, что гетерохроматические узелки являются горячими точками интеграции мобильных элементов [4]. Более того, варьирующая локализация гетерохроматических узелков в разных линиях кукурузы, подобно мобильным элементам дрозофилы (МДГ) [5], давала основания предположить, что они обладают свойствами “мегатранспозонов” [6].

Для того чтобы приступить к решению более сложной задачи выделения центромерных последовательностей, необходимо было иметь молекулярный зонд. Е.В. Ананьев провел целенаправленный поиск статей, содержащих какое-либо упоминание о центромерных последовательностях растений. В конце 1996 г. он обнаружил только что опубликованную работу по клонированию ДНК-последовательности из генома пшеницы, которая гибридизовалась с центромерами злаков [7]. Используя эту последовательность, Ананьев разработал молекулярный зонд, с помощью которого удалось выделить шесть клонов из центромеры 9-й хромосомы кукурузы. Тщательный анализ нуклеотидных последовательностей этих клонов показал, что исходная последовательность ДНК пшеницы является частью концевой фрагмента (LTR) ретротранспозона, который был назван *CentA*. В составе центромерного фрагмента был также обнаружен новый сателлит-подобный повтор размером 156 нуклеотидных пар, названный *CentC*. Оба этих элемента гибридизовались *in situ* только с центромерами кукурузы. Результатом этой работы стала молекулярная карта центромерного сегмента ДНК 9-й хромосомы куку-

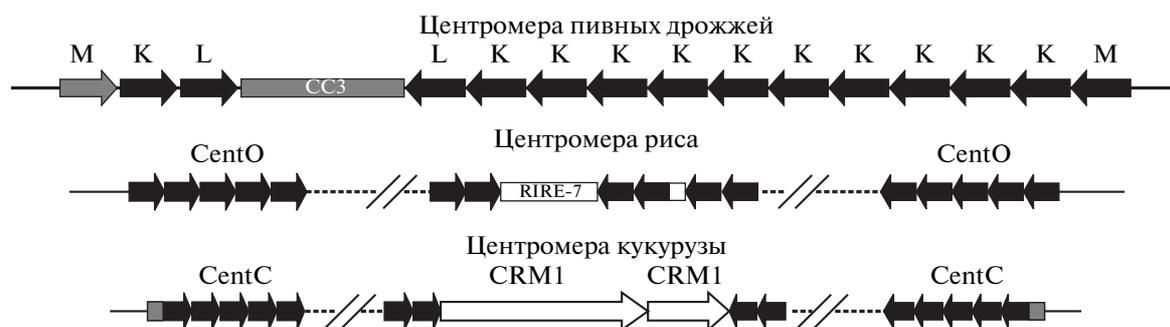


Рис. 1. Модель структурной организации центromеры. Сателлит-подобные повторы обозначены М, К, L – дрожжи, *CentO* – рис, *CentC* – кукуруза. RIRE-7, CRM1 – ретротранспозоны.

рузы, согласно которой центromеры состоят из протяженных тандемных блоков центromер-специфического сателлита *CentC*, перемежающихся с центromер-специфическими ретротранспозонами типа *CentA*, а также другими неспецифическими для центromер мобильными элементами [8]. Эта работа была первой успешной реконструкцией молекулярной организации индивидуальной центromеры, что явилось прорывом в понимании структуры центromер растений и заложило основы для исследования других растительных центromер.

На основании полученных результатов и литературных данных Е.В. Ананьев предложил модель структурно-функциональной организации центromеры высших эукариот. Согласно этой модели, элементарной единицей центromеры является короткий сателлит-подобный повтор ДНК. В случае кукурузы это – *CentC*. У риса (*Oryza sativa*) аналогичный повтор был назван *CentO*. Тандемные блоки повторов составляют ядро функциональной центromеры, которое необходимо для создания кинетохора в процессе расхождения хромосом при клеточном делении. В области первичной перетяжки блоки находятся в инвертированной ориентации и отделены друг от друга мобильными элементами, определяя таким образом

демаркационную линию между плечами хромосом (рис. 1).

Подтверждением предложенной теории и завершающим этапом исследования организации растительных центromер стало создание искусственной хромосомы кукурузы из отдельных клонированных элементов. Хромосома содержит три обязательных компонента: теломеры, участки начала репликации и центromеры. Эти компоненты и стали “строительными блоками” для конструирования искусственной хромосомы. Теломеры и участки начала репликации были известны и доступны в виде клонированных фрагментов. Ключевой проблемой было получение функциональной центromеры.

Согласно описанной выше модели, функциональная кукурузная центromера должна содержать *CentC* и центromер-специфические ретротранспозоны типа *CentA*. Из геномной библиотеки кукурузы в бактериальном векторе (ВАС) было отобрано около 85 клонов, соответствующих критерию “функциональной центromеры”. Из этих клонов были созданы *in vitro* линейные молекулы ДНК с теломерами, участками начала репликации и дополнительными селективными маркерами. Такие собранные *in vitro* линейные молекулы ДНК были введены в эмбрионы кукурузы одновременно с двумя генами, стимулирующими деление клеток и увеличивающими эффективность трансформации. Трансформированные эмбрионы поддерживались на питательных средах и сформировали каллусные линии, которые можно было цитологически проверить на наличие дополнительных мини-хромосом. Среди 450 трансформированных линий было найдено семь линий, несущих такие мини-хромосомы, которые специфически гибридизовались с селективными маркерами (рис. 2). Мини-хромосомы сохранялись и в растениях, регенерированных из каллусных линий. Собранные из элементарных “строительных блоков” искусственные хромосомы имели размер 15–50 Мб и стабильно наследовались при митотическом делении клеток [9].

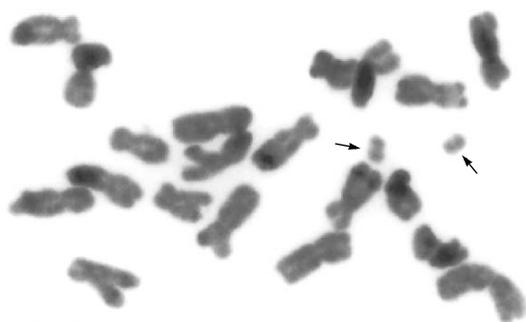


Рис. 2. Хромосомы кукурузы в стадии метафазы, содержащие дополнительную пару мини-хромосом (указаны стрелками).

С момента создания первой искусственной хромосомы дрожжей [10] до создания искусственной хромосомы растений прошло более четверти века, что свидетельствует о том, насколько сложной была эта задача. Особенно важно, что собранные из отдельных элементов искусственные хромосомы сохраняются в целых регенерированных растениях, чего не удавалось достичь в случае искусственных хромосом животных [11]. Искусственные хромосомы являются векторами большой генетической емкости и открывают новые возможности для биотехнологии сельскохозяйственных растений.

Дополнительные сведения о научной карьере Е.В. Ананьева см. [12, 13].

О. Данилевская приносит глубокую благодарность А.М. Колчинскому за редактирование рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clarke L., Carbon J. The structure and function of yeast centromeres // *Annu. Rev. Genet.* 1985. V. 19. P. 29–55.
2. Harrington J.J., Van Bokkelen G., Mays R.W. et al. Formation of *de novo* centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes // *Nat. Genet.* 1997. V. 15. P. 345–355.
3. Ananiev E.V., Riera-Lizarazu O., Rines H.W., Phillips R.L. Oat-maize chromosome addition lines: a new system for mapping the maize genome // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 3524–3529.
4. Ananiev E.V., Phillips R.L., Rines H.W. Complex structure of knob DNA on maize chromosome 9. Retrotransposon invasion into heterochromatin // *Genetics.* 1998. V. 149. P. 2025–2037.
5. Ananiev E.V., Gvozdev V.A., Ilyin Yu.V. et al. Reiterated genes with varying location in intercalary heterochromatin regions of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes // *Chromosoma.* 1978. V. 70. P. 1–17.
6. Ananiev E.V., Phillips R.L., Rines H.W. A knob-associated tandem repeat in maize capable of forming fold-back DNA segments: are chromosome knobs megatransposons? // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 10785–10790.
7. Aragon-Alcaide L., Miller T., Schwarzacher T. et al. A cereal centromeric sequence // *Chromosoma.* 1996. V. 105. P. 261–268.
8. Ananiev E.V., Phillips R.L., Rines H.W. Chromosome-specific molecular organization of maize (*Zea mays* L.) centromeric regions // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 13073–13078.
9. Ananiev E.V., Wu C., Chamberlin M.A. et al. Artificial chromosome formation in maize (*Zea mays* L.) // *Chromosoma.* 2009. V. 118. P. 157–177.
10. Clarke L., Carbon J. Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes // *Nature.* 1980. V. 287. P. 504–509.
11. Oshimura M., Katoh M. Transfer of human artificial chromosome vectors into stem cells // *Reprod Biomed Online.* 2008. V. 16. P. 57–69.
12. Mirkin S.M. A tribute to Evgenii V. Ananiev, 1947–2008. *PLoS Genet.* 2008. V. 4. P. e1000122.
13. Rafalski A. In memoriam—Evgueni Ananiev // *Chromosoma.* 2009. V. 118.

ВКЛАД Е.В. АНАНЬЕВА В ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕНТРОМЕРЫ И КОНСТРУИРОВАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ХРОМОСОМЫ РАСТЕНИЙ

© 2010 г. О. Н. Данилевская

Pioneer Hi-Bred International, A DuPont Company Johnston, IA 50131, USA;

e-mail: olga.danilevskaya@pioneer.com

Поступила в редакцию 28.01.2010 г.

Описан принцип организации растительной центromеры из блоков повторяющихся последовательностей ДНК и проведена первая успешная самосборка искусственной хромосомы растений из отдельных клонированных элементов. Рассмотрен вклад Е.В. Ананьева в решение этой проблемы