

От мобильных элементов к искусственной хромосоме

О.Н.Данилевская,
кандидат биологических наук
Компания «Пионер»
Де-Мойн (штат Айова, США)

Биографы
Евгений Витальевич Ананьев родился в Москве 13 января 1947 г. Его родители — мать Мария Андреевна Фролова и отец Виталий Дмитриевич Ананьев — принадлежали к тому поколению, чья юность пришлось на годы войны. Не окончив средней школы, они пошли работать на оборонные заводы Москвы. Женины родители были очень молоды, и воспитание мальчика взяла на себя его бабушка Мавра Петровна, женщина полуграмотная, но с сильным характером и твердыми жизненными принципами, передавшая эти черты своему внуку. Она любила повторять, что доведет Женю до четвертого класса, а дальше он должен учиться сам. Женя действительно учился сам, и учился хорошо. Но после 9-го класса перешел в школу рабочей молодежи, а днем работал слесарем, чтобы помогать матери, поскольку к тому времени его родители развелись.

Но Женя хотел быть биологом, а не слесарем. Такое решение пришло к нему в тот момент, когда он впервые услышал биение собственного сердца и осознал, как хрупка человеческая жизнь. Жене было всего 10 лет, и в его детском сознании неожиданно возникла мысль, что, став биологом, он сможет победить смерть. Этот наивный детский порыв не угас с годами, а перерос в серьезное желание найти свой путь в науке. Помог ему отец, Виталий Дмитриевич,

зная о мечте сына стать биологом, обратился однажды к своему лечащему врачу с просьбой помочь сыну найти работу, связанную с биологией. Оказалось, что сестра врача, Ирина Вешнева, работала в Институте радиационной и физико-химической биологии в знаменитой лаборатории А.А.Прокофьевой-Бельговской, выдающегося цитогенетика и блистательной личности. Там в 1964 г. началась научная карьера семнадцатилетнего Жени в должности препаратора.

Эта работа оказалась настоящим подарком судьбы и большой жизненной удачей. Его первыми учителями стали О.Н.Капитонова, которая научила Женю работать с микроскопом и делать препараты хромосом, и В.М.Гидилис, наставник, воспитатель и друг на всю жизнь. Гидилис тогда искал отличительные черты всех 23 пар хромосом человека. Для этой цели Женя готовил цитологические препараты, фотографировал их под микроскопом на стеклянные фотопластинки, печатал снимки на фотобумаге и измерял длину хромосом линейкой. Именно тогда он постиг и полюбил тонкое искусство микроскопии. Позже написал в своем дневнике: «запах кедрового масла навсегда остался любимым». Здесь же у него зародился глубокий научный интерес к структуре хромосомы, который не покидал его на протяжении всей жизни.

Учась в школе рабочей молодежи, Женя не смог получить образование, соответствующее

его замыслам. Однако, проявив поразительную целеустремленность, он с третьей попытки поступил в 1965 г. на вечернее отделение биологического факультета Московского государственного университета, а на третьем курсе перешел на дневное отделение, на кафедру генетики. Я в то время была студенткой на этой же кафедре, где мы и познакомились.

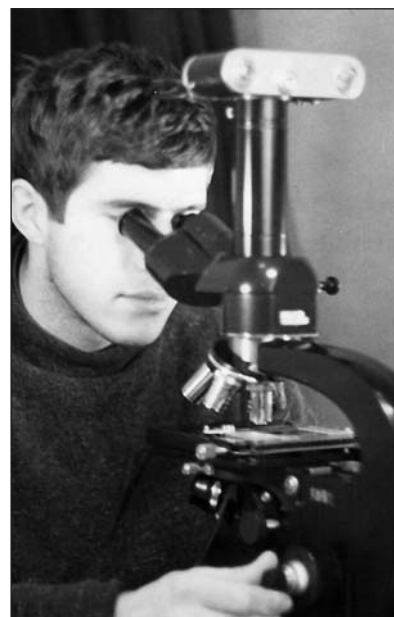
После окончания университета в 1970 г. Женя пришел в лабораторию В.А.Гвоздева в биоло-



Шестилетний Женя в пальтишке, сшитом мамой. Москва. 1953 г.



С отцом, В.Д.Ананьевым. Москва. 1957 г.



За микроскопом в лаборатории А.А.Прокофьевой-Бельговской. Москва. 1964 г.

гический отдел Института атомной энергии на должность старшего лаборанта. Работал сразу над тремя проектами: эффект положения и дозовая компенсация (по предложению Гвоздева) и репликационная организация хромосом дрозофилы в культуре клеток (по собственной инициативе). В 1975 г. блестяще защитил кандидатскую диссертацию. Как позже шутил сам Евгений Витальевич, он сделал три кандидатские диссертации за один аспирантский срок.

Открытие мобильных элементов

Начало 70-х годов занимает особое место в истории молекулярной биологии. Тогда был разработан метод клонирования ДНК. Он заключается в том, что с помощью «молекулярных ножниц» (рестрикционных ферментов) молекулу ДНК разрезают на кусочки и затем сшивают с молекулой ДНК-переносчика (вектора), что дает возможность размножить эти фрагменты в неограниченном количестве в бактериальных клетках

кишечной палочки. Такой метод позволял непосредственно изучать структуру индивидуальных генов практически любого организма. В дальнейшем на его основе развились новые отрасли молекулярной биологии: генная инженерия, биотехнология и геномика.

Одним из энтузиастов этого метода в Советском Союзе стал

Г.П.Георгиев, заведующий лабораторией в Институте молекулярной биологии (бывшем Институте радиационной и физико-химической биологии), где Ананьев начинал свою научную карьеру. Георгиев, будучи одним из немногих «выездных» советских ученых, регулярно участвовал в симпозиумах по молекулярной биологии в лаборатории



Е.В.Ананьев (слева) и В.М.Гиндилис. Москва. 1964 г.

Колд Спринг Харбор (США) — Мекке молекулярных биологов. Там он и узнал о методе клонирования, оценил его мощь и развернул активную деятельность по клонированию генов дрозофилы (затем и мыши) в своей лаборатории. Дрозофила была особенно привлекательным объектом по двум причинам. Во-первых, гигантские политенные хромосомы, получаемые из слюнных желез мушки, позволяли увидеть расположение генов на хромосоме под микроскопом; во-вторых, уникальная культура клеток, ранее полученная в лаборатории Гвоздева, служила идеальным источником для выделения ДНК. Союз двух лабораторий (Георгиева и Гвоздева) оказался исключительно плодотворным.

В те годы Георгиев увлекся идеей повторяющихся элементов ДНК, которые могли бы отвечать за регуляцию множественных генов. Метод клонирования идеально подходил для поиска таких регуляторных зон. В начале 1976 г. аспирант в лаборатории Георгиева Н.А. Чуриков, чьим научным руководителем был Ю.В. Ильин, клонировал и охарактеризовал сотни фрагментов

ДНК дрозофилы, некоторые из которых присутствовали в геноме многими копиями. Один такой фрагмент, Dm225 (от *Drosophila melanogaster*), Ананьев получил для определения его местоположения в геноме дрозофилы с помощью гибридизации *in situ* (т.е. на местах) на политенных хромосомах. Этот метод гибридизации основан на свойстве изолированных фрагментов ДНК узнавать сходные последовательности на хромосомах и образовывать комплексы-гибриды. Обычно изолированный фрагмент ДНК метят радиоактивным изотопом и по этой метке определяют его расположение на политенных хромосомах. У млекопитающих, включая человека, политенных хромосом нет, поэтому прямая локализация фрагментов у них невозможна. В этом состояло большое преимущество дрозофилы для изучения природы клонированных генов.

Евгений Витальевич блестяще справился с поставленной задачей, сделал наблюдение, которое привело к открытию мобильных элементов дрозофилы. Вот поразительное по ясности

и силе описание этого открытия из дневника Ананьева: «К этому времени я уже освоил методику *in situ* гибридизации на политенных хромосомах дрозофилы. На моем первом и единственном препарате я увидел, что, действительно, этот кусочек ДНК (Dm225) гибридизуется примерно с 40 участками на политенных хромосомах. При сравнении одной и той же хромосомы, например X-хромосомы из разных ядер, можно было видеть, что набор гибридизующихся участков и их местоположение в хромосоме были сходны. Одно ядро, однако, привлекло мое внимание. В этом ядре отцовская и материнская хромосомы, составляющие пару гомологичных хромосом, не были тесно сочленены, как обычно наблюдается у политенных хромосом в большинстве ядер, а несколько разошлись друг от друга. Распределение гибридизующихся участков (так называемых сайтов гибридизации) на этих гомологичных хромосомах оказалось полностью различным. Это было что-то совершенно новое! Согласно классической генетике, гомологичные хромосомы содержат идентичный набор генов, расположенных в строго определенном порядке. А в данном случае ген (в то время мы еще не знали настоящую природу этого кусочка ДНК) находился в разных местах гомологичных хромосом, т.е. был способен «перемещаться» по хромосоме.

Это была загадка! Что это? Мобильные элементы, которые недавно были найдены у бактерий, или мистические контролирующие элементы, обнаруженные у кукурузы Барбарой Мак-Клинтон? А может, просто некая особенность генома дрозофилы?

Я подумал, что разгадка может крыться в том, что для проведения эксперимента я использовал особо крупных личинок дрозофилы, которых получал путем скрещивания двух родительских линий этой муш-



Участники конференции по генетике дрозофилы. Слева направо: Е.В. Ананьев, Л.З. Файзулин, В.А. Гвоздев, Т.И. Герасимова, Л.Г. Полукарова, С.А. Гостимский. Ленинград, 1972 г.

ки. Каждая из родительских линий несла мутацию *gt* (от английского *giant* — гигант), приводящую к увеличению размера личинки и, соответственно, увеличению размеров политенных хромосом. Поэтому ассиметричное распределение сайтов гибридизации могло быть связано с изначально существующими различиями в хромосомах родителей. Чтобы подтвердить свою догадку, я сфотографировал все примеры расхождения гомологичных хромосом, и после дополнительного анализа стало очевидно, что закономерность, действительно, есть: например, в одной гомологичной хромосоме было 5 сайтов, а в другой — ни одного. Это было первое указание на то, что картина гибридизации над гомологичными хромосомами воспроизводится. Как только я увидел, что последовательность генов не совпадает, мне пришла в голову мысль, что это «прыгающие» гены. Стало очевидно, что надо повторить точно такую же гибридизацию, но на этот раз — на родительских линиях дрозофилы.

Я поделился своими наблюдениями с Владимиром Алексеевичем Гвоздевым. То, что эти элементы представлены многими копиями и «рассытаны» по геному, вполне укладывалось в гипотезу Г.П.Георгиева, который полагал, что разные гены могут иметь одинаковые регуляторные элементы. Однако то обстоятельство, что эти элементы могли «прыгать», лишило их регуляторной функции. Согласно оценкам Коли Чурикова, число копий этих генов (или элементов) должно было быть в 10 раз больше, чем сайтов гибридизации. В.А.Гвоздев предположил, что эти гены образуют группы или локальные кластеры, которые соответствуют особым районам хромосом дрозофилы, так называемым районам интеркалярного гетерохроматина. Эти районы имеют ряд особенностей, в том числе, некоторые из них перестают реплици-



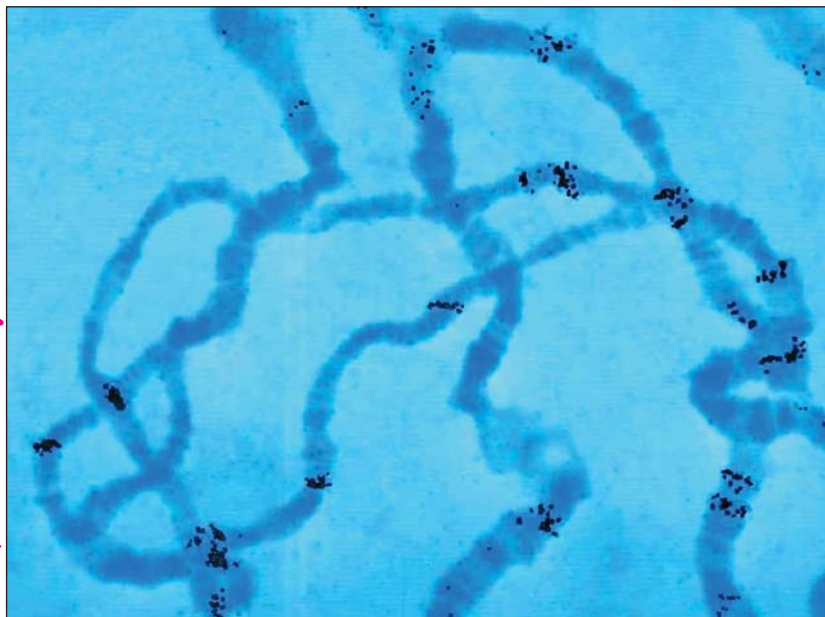
Женя Ананьев. 1976 г.

роваться в процессе формирования политенных хромосом. Владимир Алексеевич предположил, что наблюдаемое различие между гомологичными хромосомами связано как раз с недорепликацией ДНК в этих районах. Более того, он проанализировал имеющиеся данные других авторов и составил список таких районов. Этот список он запечатал в конверт и вручил мне с тем, чтобы я сравнил оба списка, но только после того, как закончу собственный анализ сайтов гибридизации.

Цитогенетическая карта политенных хромосом дрозофилы в то время имела двух видов: рисованная и очень подробная карта Бриджеса 1936 г. и фотографическая карта Лефевра 1976 г. Хромосомы на этих картах были представлены лентами с поперечными полосами, что-то вроде штрих-кода. На рисованной карте число таких полосок приближалось к 5000, а на фотографической было около 2000. Если первая карта была слишком подробной, и ею нельзя было пользоваться, то вторую надо было еще учить. Я в то время умел четко распознавать на цитологических препаратах только X-хромосому, точнее, ее конец, примерно 10% от длины хромо-

сомы. Без знания карты было невозможно ответить на ряд наиболее существенных вопросов: Каковы различия между родительскими линиями дрозофилы? Есть ли различия между родительскими хромосомами одного и того же индивидуума?

Решение этой задачи потребовало от меня мобилизации всех моих сил. Я наготовил препаратов политенных хромосом, сфотографировал большое число ядер с хорошо расправленными политенными хромосомами, напечатал фотографии и засел за их анализ. Постепенно, через две недели, я наконец-то научился распознавать все хромосомы и каждую из их 100 секций. Первое, что я установил, — это существенные различия между родительскими линиями. Две линии дрозофилы, с которыми я работал, имели всего 1 или 2 общих сайта гибридизации. Все остальные сайты, чуть больше 20 в каждой линии, оказались в неродственных участках хромосом. Второе, разные клетки одного и того же организма имели одно и то же расположение сайтов гибридизации. Третье, действительно, часть сайтов гибридизации совпадала с районами интеркалярного гетерохроматина, которые, как оказалось впослед-



Гибридизация мобильного элемента МДГ1 на политенных хромосомах дрозофилы. В месте расхождения родительских хромосом сигнал гибридизации виден в одной и отсутствует в другой хромосоме. 1976 г.

ствии, и были мне даны в запечатанном конверте».

В конце 1976 г. Георгиев с соавторами опубликовали полученные результаты в январском номере журнала «Science» [1], где описывались методы выделения фрагмента Dm225 и результаты гибридизации с политенными хромосомами, включая и нестабильное положение генов, со ссылкой на более подробную статью, которая готовилась к печати.

Но статья с детальным описанием всей цитологической работы Ананьева вышла лишь в сентябре 1978 г., т.е. через полтора года после первой публикации. Это объясняется тем, что в те времена подготовка к печати в зарубежном журнале занимала много времени. В статье подробно описывались результаты гибридизации двух фрагментов ДНК дрозофилы, Dm225 и Dm234В на двух родительских линиях, иллюстрированные великолепными цитологическими фотографиями политенных хромосом [2]. Статью по предложению Гвоздева назвали «Потворяющиеся гены с варьирую-

щей локализацией в районах интеркалярного гетерохроматина на политенных хромосомах *Drosophila melanogaster*». Это привело к тому, что в публикациях по мобильным элементам ее почти не цитировали. В своих воспоминаниях Ананьев писал: «Я довольно сильно настаивал на том, чтобы статью назвать по существу: «мобильные элементы» или «прыгающие гены»». К сожалению, тогда руководители не придали серьезного значения гипотезе о подвижности элементов, высказанной молодым коллегой. Об этом Евгений Витальевич сожалел до конца своей жизни.

Летом 1977 г. на симпозиуме в Колд Спринг Харбор (США) Георгиев представил результаты совместных с Гвоздевым работ, где упоминал гипотезу о «прыгающих генах» как одно из возможных объяснений варьирующего расположение генов между разными родительскими линиями [3]. На той же конференции докладывали свою работу Д.Хогнесс и Дж.Рубин. Американские коллеги, работавшие только на одной линии мушки, весьма ос-

торожно отнеслись к данным советских ученых по генетическим различиям между разными линиями. Однако это не помешало им спустя два года опубликовать на эту тему две статьи в престижном журнале «Cell». Первая — о перемещении по геному изучаемых генетических элементов в культуре клеток [4]. Вторая — о варьирующей локализации этих элементов на политенных хромосомах в четырех линиях дрозофилы, полученных из географически отдаленных мест [5]. На четырех линиях Рубин увидел то же, что и Ананьев на двух — межлинейную вариацию. Но Рубин, в отличие от Ананьева, не привел точной локализации элементов на цитогенетической карте, а только подсчитал общее число участков гибридизации. Чтобы наглядно показать различия по гибридизации между родительскими линиями, он использовал прием Ананьева — скрестил две линии мушек и искал на препаратах участки с разошедшимися хромосомами. Основываясь на полученных результатах, американский генетик смело назвал свои элементы мобильными. Сегодня Рубин — бесспорный мировой лидер в области генетики дрозофилы. В 1999 г. он вместе с К.Вентером возглавил проект «Геном дрозофилы», который был первым успешным шагом в определении последовательности ДНК генома высших организмов [6].

После 1978 г. произошел настоящий взрыв в изучении мобильных элементов генома. Их клонировали и исследовали у многих организмов. Симпозиум 1980 г. в Колд Спринг Харбор уже назывался «Мобильные генетические элементы». Там Георгиев впервые назвал свои элементы МДГ (мобильные диспергированные гены), но в литературе успели прижиться более образные имена, такие как *coria* и *gypsy* («цыган»), предложенные американскими коллегами. В последующие годы лаборатории Георгиева и Гвоздева внесли значительный вклад в изучение

механизмов перемещения МДГ, их структуры и роли в генетических процессах. Возглавляемый ими коллектив авторов, куда входил и Ананьев, в 1983 г. удостоили Государственной премии СССР за цикл работ «Мобильные гены животных». Это было одно из самых важных открытий советской молекулярной биологии. Однако пальма первенства осталась за Хогнессом и Рубиным, и мобильные элементы дрозофилы вошли в учебники с их именами. Тем не менее объективная хронология научного поиска, отраженная в статьях 1977—1979 гг., свидетельствует о том, что первым, кто выполнил принципиальный эксперимент и понял мобильную природу этих элементов, был Ананьев.

В 1983 г. Евгений Витальевич защитил докторскую диссертацию на тему «Молекулярная цитогенетика мобильных генетических элементов дрозофилы». Прокофьева-Бельговская, будучи оппонентом диссертации, высоко оценила работу своего ученика, основным результатом которой стало открытие и молекулярно-цитогенетическая характеристика мобильных элементов. В этой гигантской по объему работе установлено, что распределение 12 семейств мобильных элементов на политенных хромосомах в пяти лабораторных линиях случайно и у мобильных элементов нет предпочтительных мест интеграции. Ряд фундаментальных выводов диссертации сохраняют свое значение и по сей день. Первый — мобильные элементы перемещаются с частотой ниже чем 10^{-4} на сайт на поколение, что типично для многих элементов. Второй — видоспецифичность мобильных элементов. Каждый вид плодовых мушек, исследованный в работе, имел свои специфичные мобильные элементы. Значит, мобильные элементы быстро меняются в ходе эволюции, что опять же оказалось общей закономерностью. Заключительный вывод диссертации гласил: «мобильные генетические элемен-

ты составляют значительную фракцию генома не только дрозофилы, но и других эукариот. Это позволяет говорить об универсальности самого принципа построения генома эукариот, составной частью которого должны быть мобильные генетические элементы». Этот вывод тоже оказался правильным. Кроме того, на электронно-микроскопической карте политенных хромосом, построенной вместе с другом и коллегой В.Е.Барским, с большой точностью были помещены как мобильные элементы, так и многие известные к тому времени гены.

Клонирование мобильных элементов дрозофилы было важнейшим этапом в понимании организации генетического материала высших организмов. Впервые, оно превратило мобильные элементы из генетической абстракции в реальные фрагменты ДНК, которые можно изучать прямыми биохимическими методами. Концепция перемещающихся элементов, впервые предложенная Барбарой Мак-Клинтон в 50-х годах на основании изучения нестабильных мутаций у кукурузы, на протяжении многих лет не находила признания. Мак-Клинтон получила Нобелевскую премию за открытие мобильных элементов только в 1983 г., после того, как мобильные элементы клонировали.

Во-вторых, изучение механизмов перемещения мобильных элементов доказало, что нитевидная молекула ДНК, из которой состоит хромосома, — это динамичная структура, способная вырезать из себя кусочки, копировать их и перемещать в новые места. Классическая хромосомная теория наследственности утверждала, что положение генов на хромосомах строго фиксировано, подобно бусинкам, нанизанным на нитку. Поэтому первичное цитологическое наблюдение, что некоторые кусочки ДНК не имеют фиксированного положения на хромосомах, казалось таким невероятным и воспринималось с трудом.

Продолжая аналогию с бусинками, можно представить, что мобильные элементы заполняют пространство между бусинками (т.е. межгенные пространства) и перемещаются между генами, в большинстве случаев не нарушая их работу. Частота их перемещений достаточно низка, чтобы сохранять целостность генома, но довольно высока, чтобы вызывать мутации, т.е. служить материалом для естественного отбора и селекции.

В третьих, мобильные элементы составляют подавляющую часть генетического материала у многих высших организмов. Гены-бусинки оказались затерянными, как песчинки, в бесконечном океане мобильных элементов. Например, геном человека на 80% состоит из мобильных элементов, и только 1.2% генома приходится на долю единичных генов-бусинок, которых у человека всего около 30 тыс. (остальные 19% занимают другие повторяющиеся последовательности). В геноме кукурузы также 80% составляют мобильные элементы, а межгенные пространства заполнены таким многообразием мобильных элементов, что они практически не совпадают при сравнении разных сортов кукурузы. Возможно, многообразие вариаций и форм кукурузы есть следствие активности мобильных элементов.

Так мобильные элементы, казавшиеся вначале частным наблюдением на политенных хромосомах дрозофилы, оказались универсальным компонентом геномов всех эукариот. Причина их вездесущности и избыточности по-прежнему остается загадкой. Определение последовательности геномов разных организмов, от примитивных древних рыб до человека, позволяет следить за историей мобильных элементов в процессе видообразования. Новые методы сравнения целых геномов начинают прояснять роль мобильных элементов как мощных факторов эволюции [7].

Генетические химеры и искусственные хромосомы

К моменту защиты докторской диссертации Евгений Витальевич осознал необходимость создания собственной лаборатории, чтобы воплощать в жизнь свои идеи. Поиски самостоятельной работы привели его в Институт общей генетики, где директор института А.А.Созинов предложил молодому энергичному ученому возглавить лабораторию молекулярной генетики растений. Так в 1983 г. Ананьев с энтузиазмом взялся за создание лаборатории и разработку научных проектов. Пришлось расстаться с любимым объектом, дрозофилой, и заняться генетикой растений. Несомненно, работа в Институте общей генетики стала одним из самых сложных периодов в его научной деятельности: новый институт, новый научный объект, новый опыт руководства большим коллективом и ответственность за людей.

Это были годы бурного развития геномной инженерии и биотехнологии. Идя в ногу со временем, Евгений Витальевич планировал работу в двух направлениях: применение методов геномной инженерии для изуче-

ния генетики ячменя и поиски мобильных элементов, по его мнению, универсальных компонентов всех геномов. Молодая лаборатория делала первые успехи. Создавались библиотеки генов, велись работы по структуре запасных белков ячменя, организации рибосомных генов, предпринимались попытки разработать метод генетической трансформации ячменя. А поиски мобильных элементов увенчались открытием мобильного элемента ячменя, названного Диалект.

Вскоре началась перестройка, «железный занавес» подняли, но страна оказалась в условиях колоссальных социальных и экономических потрясений. Жить и работать стало очень трудно. Так, летом 1991 г. вся лаборатория Ананьева сажала картошку в подсобном хозяйстве Горки-Ленинские, чтобы пережить следующую зиму. Многие сотрудники лаборатории уезжали работать за границу. В начале 1990-х годов скудное финансирование привело к окончательному развалу советской фундаментальной науки. Мы же, несмотря на возраст, были полны сил и желания продолжать научную работу. Так возникло решение уехать в США. Вначале мы планировали поработать там

два-три года, но уехали навсегда. Я нашла работу в Бостоне и в ноябре 1991 г. уехала с сыном, а в январе 1992 г. к нам присоединился Евгений Витальевич. Отъезд в Америку был шансом продолжить заниматься наукой, реализовать свой интеллектуальный потенциал, но Евгений Витальевич всегда оставался русским гражданином, интересовался событиями на Родине и верил в возрождение науки в России.

В Бостоне, знаменитом в первую очередь своими медицинскими учреждениями, найти работу по растительной тематике было практически невозможно. Евгений Витальевич устроился в лабораторию, где изучали генетику многоклеточной водоросли вольвокс. Занятие это не приносило удовлетворения, и он продолжал поиски интересного научного проекта. В конце 1994 г. в «Science» увидел объявление о проекте на удивительном объекте: гибриде овса с кукурузой. Эту генетическую химеру получил в Университете штата Миннесота замечательный генетик Х.Райнс, опылив колосок овса пылью кукурузы. Редкие жизнеспособные зернышки дали начало растениям, в целом похожим на овес, но содержащим одну кукурузную хромосому. Поскольку у кукурузы 10 хромосом, Райнс получил 10 так называемых хромосом-дополненных линий, каждая из которых несла одну кукурузную.

Оценив возможности этих линий для выделения генов из отдельных кукурузных хромосом, Ананьев сразу подал заявление на работу в этот университет. Получив приглашение, уехал в Миннесоту, где начал свой научный проект с построения библиотек генов из хромосом-дополненных линий овса. Сначала надо было отделить гены кукурузы от генов овса. Для решения этой задачи Евгений Витальевич использовал мобильные элементы, зная по своему опыту работы с дрозофилой, что они специфичны



На конференции по генетике кукурузы. Слева направо: Л.Сидоренко, И.Голубовская, Е.Ананьев, О.Данилевская. США. 2005 г.

для каждого вида. Собрав коллекцию мобильных элементов кукурузы, он показал, что они гибридизуются только с кукурузной ДНК. Используя эти элементы как молекулярные зонды, набрал коллекцию клонов, происходящих из отдельных кукурузных хромосом.

Следующая задача, которую он решал, — характеристика специализированного участка хромосомы, центромеры. Этот важнейший структурный компонент хромосомы необходим для правильного распределения родительских хромосом между дочерними клетками в процессе деления клетки. Механизмы функционирования центромер интересовали Евгения Витальевича еще со времен его первого знакомства с человеческими хромосомами в лаборатории Прокофьевой-Бельговской. Сейчас он имел генетическую систему, позволявшую выделить центромеру из индивидуальной хромосомы кукурузы. Аняеву удалось найти специфический мобильный элемент, который встраивался именно в центромеры. Используя его как зонд, он выделил из геномных библиотек центромерные фрагменты, происходящие из отдельной кукурузной хромосомы. Тщательно исследовав эти фрагменты, он пришел к выводу, что центромера составлена из сотен и тысяч копий короткой (156 нуклеотидных пар) повторяющейся последовательности ДНК, которую назвал *CentC*. Оказалось, что длинные участки таких повторов, перемежаясь с мобильными элементами, составляют основу центромеры.

Миннесотский период жизни был необычайно продуктивным для Евгения Витальевича. Там он впервые за многие годы имел замечательные условия для работы и занимался только наукой, работая по 12 часов в сутки с огромной энергией. За три с половиной года он опубликовал 10 научных статей.

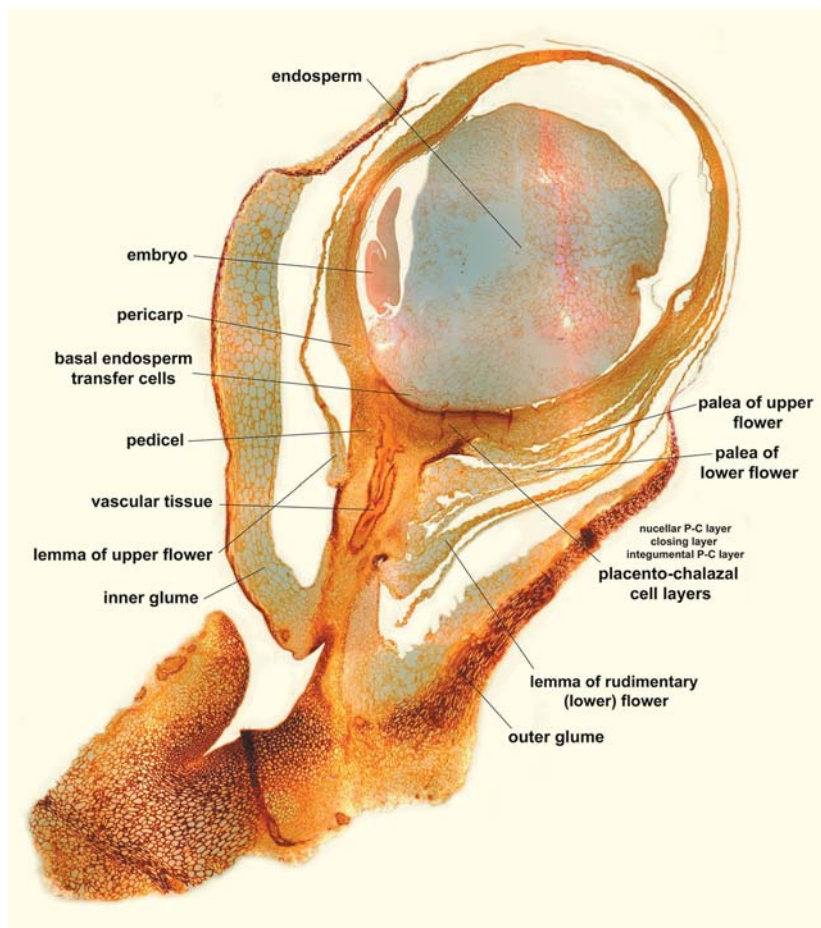
Но работа в Университете Миннесоты была временной. Ев-

гений Витальевич подал заявление в компанию «Пионер» в штате Айова, знаменитом своими кукурузными полями, которые в 1959 г. поразили Н.С.Хрущева. В 1998 г. Евгений Витальевич получил приглашение на должность руководителя группы по разработке методов физического картирования генома кукурузы. Проект был интересный, а возможности для ведения научной работы — огромные. «Пионер» — старейшая селекционная компания в США, которая с 1926 г. поставляет фермерам семена высокоурожайной гибридной кукурузы. Это первоклассно организованное производство с большим научно-исследовательским отделом, имеющим на вооружении все современные методы генетики

и молекулярной биологии. Осенью того же года я тоже получила работу в фирме «Пионер», и наша семья воссоединилась в Айове. Евгений Витальевич с энтузиазмом взялся за разработку методов физического картирования генома кукурузы.

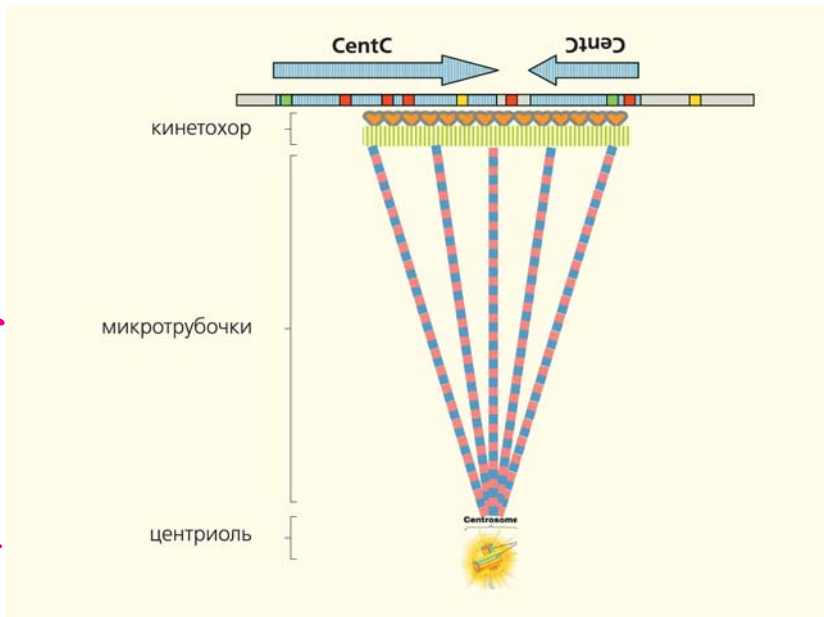
Однако интенсивная работа, видимо, не прошла бесследно для здоровья. В мае 2000 г. случился инфаркт. Успешная операция обещала долгую жизнь. С присущими ему мужеством и упорством Евгений Витальевич стал восстанавливать свое здоровье и в августе уже работал в полную силу.

Шесть лет после инфаркта были самыми плодотворными и счастливыми годами нашей жизни. Я изучала развитие кукурузы, делилась своими мыслями

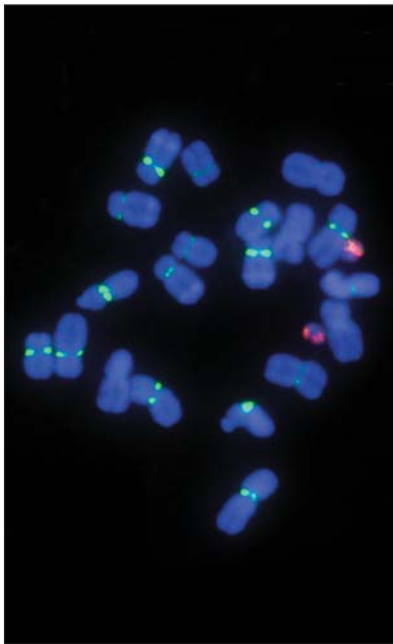


Продольный срез развивающегося зерна кукурузы на 10-й день после опыления. Все ткани подписаны на английском языке.

Фото Е.В.Аняева



Модель центromеры, предложенная Е.В.Ананьевым. Противоположная ориентация повторов CentC задает направление плечам.



Микрофотография первой искусственной минихромосомы кукурузы. 10 пар нормальных хромосом (синий цвет) и дополнительная, 11-я пара минихромосом (красный цвет) в результате гибридизации с селективным маркером. Центromеры окрашены в зеленый цвет в результате гибридизации с CentC-фрагментом. 2006 г.

и наблюдениями с мужем, который серьезно заинтересовался этой проблемой. Он хотел понять, как закладываются и развиваются органы кукурузы, мечтал создать атлас ее развития, для которого начал собирать и фотографировать цитологические образцы. Качество этих фотографий и описание мельчайших деталей строения тканей были превосходны. В этом проявились его черты тонкого наблюдателя-натуралиста и прирожденного художника. Когда профессор Калифорнийского университета С.Хейк увидела фотографию кукурузного зернышка, она тут же попросила ее для публикации в руководстве по генетике кукурузы, которое должно выйти в конце 2008 г.

Однако главным делом Евгения Витальевич оставался проект по созданию искусственной хромосомы кукурузы. Этой сложной, но актуальной проблемой занимались и в университетах, и на биотехнологических фирмах Америки — кто первый сделает и запатентует искусственную хромосому. Этот вектор-носитель больших фрагментов ДНК необходимым для

геномных исследований. Так, искусственные хромосомы бактерий широко применяются для клонирования и секвенирования геномов практически всех организмов. У эукариот искусственные хромосомы созданы только в культуре клеток человека, в перспективе — для генной терапии. У растений же искусственные хромосомы уже сейчас можно использовать для переноса генетического материала между видами, для создания биохимических каскадов и привнесения ценных агрономических свойств в сельскохозяйственные растения. За искусственными хромосомами растений — большое будущее.

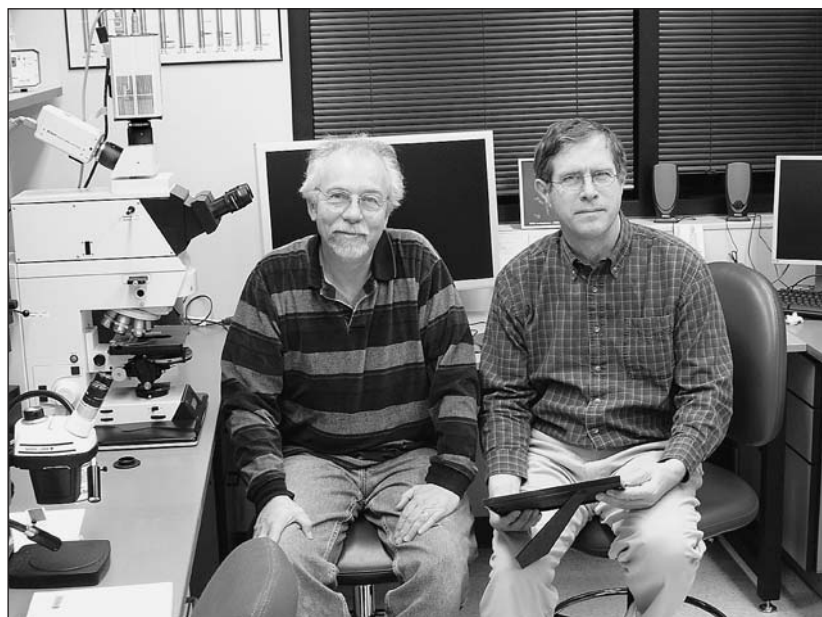
Функциональная хромосома содержит три обязательных компонента: теломеры — защитные «колпачки» на концах хромосом, предохраняющие их от разрушения; участки начала репликации, необходимые для удвоения хромосом перед клеточным делением; центromеры, обеспечивающие равное распределение хромосом между дочерними клетками. Эти компоненты, или «строительные блоки», как их называл Евгений Витальевич, составили основу искусственной хромосомы. Если теломеры и участки начала репликации были известны и доступны, то поиск функциональной центromеры представлял трудную задачу.

Чтобы понять, как устроена функциональная центromера, без которой невозможно построение искусственной хромосомы, сотрудники лаборатории Ананьева проделали сотни экспериментов. «Из геномной библиотеки было выделено около 8 тыс. центromерных клонов. Они были классифицированы согласно составу повторов. In situ гибридизация указывала на то, что сегменты ДНК расположены в центре прикрепления нитей веретена и являются частью кинетохора, т.е. функциональной центromеры. Второе открытие пришло неожиданно. На моем столе в течение

нескольких месяцев лежали статьи по секвенированию хромосом риса. Сами авторы оказались очень добросовестными исследователями и проанализировали и сравнили все последовательности со всем чем только можно. Они указали стрелками, что блоки тандемных центромерных повторов находятся в инвертированной ориентации по отношению к друг другу. Меня как прошибло током! Вот где два хромосомных плеча встречаются друг с другом! Центр кинетохора — это центр центромеры».

Основываясь на своей догадке, Евгений Витальевич предложил элегантную модель центромеры. Классическая митотическая хромосома выглядит как буква «X» с тонкой талией, так называемой первичной перетяжкой, от которой расходятся два хромосомных плеча. В области первичной перетяжки формируется кинетохор, к которому присоединяются нити веретена деления и тянут половинки хромосом в дочерние клетки. Модель центромеры объясняет образование перетяжки расхождением центромерных повторов в противоположных ориентациях, что задает направление левому и правому плечу хромосомы. Пока эта новая модель не подтверждена экспериментально. Хочется надеяться, что она окажется правильной, подобно догадке Евгения Витальевича о мобильных элементах.

Стратегический план Ананьева по поиску активной центромеры и сборке искусственной хромосомы из строительных блоков завершился подлинным триумфом. В феврале 2006 г. его лаборатория, опередив всех



С Марком Немберленом в день обнаружения первого препарата с искусственной хромосомой. США. 9 февраля 2006 г.

конкурентов, получила и запатентовала первую в мире искусственную хромосому растений. В замечательном видеоклипе, сделанном Ананьевым, хромосома возникает как бы из небытия, как звезда из космоса, и приближается к зрителю во всей своей красе. Сопровождаемый музыкой Бетховена, видеоклип создает почти мистическое ощущение, что жизнь воспроизводится человеческими руками.

В своих последних дневниках Евгений Витальевич писал: *«Я рассматриваю проект по мини-хромосоме как вершину моей научной карьеры. Этот проект вызревал много лет и потребовал от меня освоения огромной литературы, а также жертв. Этот проект является конечным продуктом мое-*

го интеллекта и знаний». В своем завещании Евгений просил, чтобы *«мини-хромосомы были изображены на надгробном камне»*.

Научная судьба Евгения Витальевича Ананьева воистину символична. Он начал свою научную деятельность с измерения длины хромосом по фотографиям с помощью обычной линейки, а закончил сборкой искусственной хромосомы из отдельных строительных блоков. Его путь отражает тот колоссальный прогресс, который проделала биология за последние 40 лет: от простых методов выделения ДНК до определения тонкой структуры генов и компьютерного анализа миллиардов единиц генетической информации, кодирующей целые геномы. ■

Литература

1. Georgiev G.P., Ilyin Yu.V., Ryskov A.P. et al. // Science. 1977. V.195. P.394—397.
2. Ananiev E.V., Gvozdev V.A., Ilyin Yu.V. et al. // Chromosoma. 1978. V.70. P.1—17.
3. Ilyin Yu.V., Tchurikov N.A., Ananiev E.V. et al. // Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 1978. V.42. P.959—969.
4. Potter S.S., Brorein W.J., Dunamuir P., Rubin G.M. // Cell. 1979. V.17. P.415—427.
5. Strobel E., Dunamuir P., Rubin G.M. // Cell. 1979. V.17. P.429—439.
6. Venter J.C. A Life Decoded. Penguin Books. 2007.
7. Pennisi E. // Science. 2007. V.317. P.894—895.