

Б. М. МЕДНИКОВ, Е. А. ШУБИНА

РОЛЬ ПРОМОТОРНЫХ УЧАСТКОВ ТРАНСКРИПТОНОВ В МИКРОЭВОЛЮЦИОННЫХ ПРОЦЕССАХ

(Представлено академиком А. А. Спириным 27 IV 1976)

Функции ДНК со средним числом повторов (10^3 – 10^2 копий, C_0t 1–100) до сих пор неясны, за исключением цистронов рибосомной и транспортной РНК. Между тем, эта фракция представляет большой интерес. В ней обнаружены (¹, ²) последовательности, ренатурирующие с весьма высокой точностью (температура плавления реассоциатов порядка 80–85°, причем реассоциаты устойчивы к нуклеазе S_1). Для нее свойственны чрезвычайно высокие темпы дивергенции. При гибридизации ДНК этой фракции даже у близких видов $T_{пл}$ гибридных дуплексов заметно снижается, что свидетельствует о накоплении нуклеотидных замен со скоростью, несравненно более высокой, чем для суммарной ДНК.

На этом основании Райс (¹) называет данную фракцию «видоспецифичной», что не совсем правильно. В нашей лаборатории эта ДНК выделена по иной методике (гибридизации ДНК – ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах с последующей термоэлюцией в стандартном солевом растворе 0,3 М NaCl, 0,03 М Na-цитрат) (³), причем установлено, что образуются термостабильные ($T_{пл} > 80^\circ$) гибридные комплексы ДНК представителей одного семейства. Доля «термостабильной» фракции значительно варьирует у разных внутривидовых форм.

В дальнейших сериях опытов «термостабильную» ДНК выделяли в препаративных количествах фракционированием фрагментированной суммарной ДНК. Для этого фрагменты ДНК денатурировали в 0,12 М фосфатном буфере (рН 6,8) 10 мин. при 100° и затем ренатурировали до значения $C_0t=100$, после чего наносили на термостатированную колонку с гидроксипатитом. Фракцию, элюирующуюся с колонки в интервале 75–90° («термостабильная» фракция) метили прямым обменом трития.

Меченые фрагменты гибридизовали с суммарной высокополимерной ДНК, сорбированной на нитроцеллюлозных фильтрах марки VUFS (Чехословакия). Гибридизацию проводили в 1 мл стандартного солевого раствора 20 час. при 60°, отношение меченой ДНК к немеченой 1 : 100. Отмытые от неприсоединившихся фрагментов фильтры последовательно инкубировали в том же растворе при повышающейся температуре. Отщепляющиеся при денатурации гибридных комплексов меченые фрагменты переходили в раствор; активность элюатов измерялась на жидкостном сцинтилляционном счетчике в диоксановом сцинтилляторе (5 г ППО, 150 мл метилнафталина, 200 мл 96% C_2H_5OH в 850 мл сцинтилляционного диоксана) или же осаждением равным объемом 10% трихлоруксусной кислоты с альбумином на фильтры и последующим измерением в толуольном сцинтилляторе (4 г ППО, 0,05 г ПОПОП в 1 л толуола).

Так были исследованы ДНК китов *Balaenoptera physalis*, *Balaenoptera borealis* и *Physeter catodon*. Результаты опытов в согласии с прежними (³) и литературными данными (¹, ²) позволяют прийти к следующему (рис. 1, кривые термоэлюции изображены в одном масштабе, в процентах от общей активности, связываемой фильтром). Несмотря на то что данную фракцию нельзя назвать видоспецифичной, анализируя процент связывания метки,

$T_{пл}$ гибридных комплексов и форму кривых термоэлюции, можно дискриминировать близкие виды и внутривидовые формы. Это объясняется чрезвычайно быстрой дивергенцией нуклеотидных последовательностей в исследованной группе повторов. В случае близких видов разница в средней температуре плавления наиболее термостабильной фракции порядка 2° (рис. 1, 1, 2) и достигает 10° у достаточно удаленных видов из разных родов (рис. 1, 6, 7).

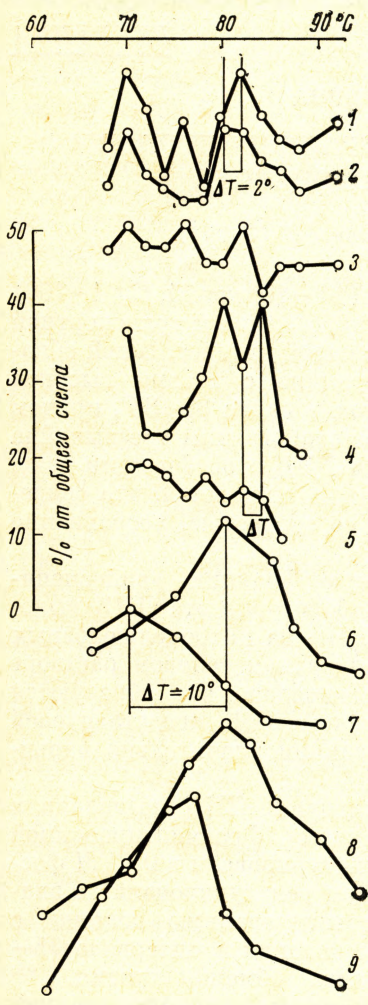


Рис. 1. Профили термоэлюции гибридных комплексов. 1 — гомологичная реакция ДНК сейвал $\times$ сейвал; 2 — гетерологичная реакция сейвал $\times$ финвал; 3 — сейвал $\times$ кашалот; 4 — стальноголовый лосось $\times$ кумжа; 5 — стальноголовый лосось $\times$ семга (по ⁽³⁾); 6 — гомологичная реакция ДНК мышь $\times$ мышь; 7 — гетерологичная реакция ДНК мышь $\times$ крыса (по ⁽²⁾); 8 — ДНК голубя $\times$ повторяющийся участок пре-мРНК эритроцитов голубя; 9 — ДНК голубя $\times$ структурный участок пре-мРНК эритроцитов голубя (по ⁽⁷⁾)

форм видообразование) в первую очередь дивергируют промоторные и акцепторные зоны транскриптов. Лишь при более значительных периодах дивергенции накапливаются заметные различия в генах, кодирующих аминокислотные последовательности.

«Видоспецифичную» фракцию Райс (термостабильную по нашей терминологии) можно отождествить с матрицей для синтеза 5'-конца гигантских предшественников мРНК. Показано ^(4, 5), что ядерные пре-мРНК помимо копии структурного гена содержат протяженный участок среднеповторяющейся РНК, образующий шпильки и элиминирующийся по выходе мРНК из ядра в цитоплазму. Согласно ⁽⁶⁾, это промоторные и операторные участки единицы транскрипции — транскриптона. Гибридные комплексы этих участков пре-мРНК с ДНК по ⁽⁷⁾ характеризуются высокой $T_{пл}$ (рис. 1, 8), в отличие от гибридов структурной части, реплицировавшихся с уникальных последовательностей (рис. 1, 9).

По нашим данным, доля ДНК, образующей термостабильные комплексы ($T_{пл} > 75^\circ$) в геноме позвоночных животных, порядка 20–25% от среднеповторяющейся фракции. Иными словами, не менее $1/4$ – $1/5$ части фракции средних повторов (1–100 C_0t) выполняет функцию промоторных и операторных участков транскриптонов. Не исключена возможность, что вся среднеповторяющаяся ДНК, за исключением цистронов рРНК и тРНК, выполняет ту же функцию. Так как фрагментирование ДНК происходит по случайным точкам последовательностей, неизбежно образование фрагментов, содержащих как акцепторные, так и структурные участки. Эти фрагменты должны гибридизоваться со скоростью средних повторов, но иметь более низкую $T_{пл}$ ($< 75^\circ$).

Второй любопытный вывод можно сделать, исходя из факта более быстрой дивергенции повторов, образующих термостабильные комплексы, по сравнению со структурными генами. Подавляющее большинство структурных генов унаследовано от предковых видов. При микроэволюционных процессах (образование новых

Быстрая дивергенция зон управления генов может быть одним из важнейших механизмов возникновения генетической несовместимости. Близкие виды становятся полностью генетически изолированными, когда регуляторные белки яйцеклетки перестают «узнавать» соответствующие последовательности в ДНК, вносимой в зиготу спермием.

Поэтому изучение среднеповторяющейся фракции ДНК, образующей гибридные комплексы с высокой температурой плавления, представляется чрезвычайно важным для анализа микроэволюционных процессов.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
10 IV 1976

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ N. R. Rice. In: Evolution of Genetic Systems, N. Y., 1972. ² N. R. Rice. Carnegie Inst. Year Book, v. 74, 159 (1975). ³ Б. М. Медников, А.-Д. Г. Ахундов, ДАН, т. 222, 744 (1975). ⁴ A. P. Ryskov, V. R. Farashyan, G. P. Georgiev, Biochim. et biophys. acta, v. 262, 568 (1972). ⁵ W. Jelinek, J. E. Darnell, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 69, 2537 (1972). ⁶ G. P. Georgiev, J. Theoret. Biol., v. 25, 473 (1969). ⁷ К. Г. Газарян, В. З. Тарантул и др., Молек. биол., т. 8, 372 (1974).