

САТЕЛЛИТНЫЕ ДНК

© 2003 г. В. ХЕМЛЕБЕН¹, Т. Г. БЕРИДЗЕ²,
Л. БАХМАН³, Я. КОВАРИК⁴, Р. ТОРРЕС⁵

¹ *Центр молекулярной биологии растений,
Тюбингенский университет, Германия*

² *Институт биохимии и биотехнологии им. С. Дурмишидзе АН Грузии,
Тбилиси, Грузия*

³ *Музей естествознания и ботанический сад университета,
Осло, Норвегия*

⁴ *Институт биофизики Академии Наук, Брно, Чехия*

⁵ *Технический Университет, Мюнхен, Германия*

I. Введение. II. Общее определение сателлитной ДНК. III. Методы выделения сателлитных ДНК. IV. Сателлитные ДНК животных. V. Сателлитные ДНК растений. VI. Метилирование сателлитных ДНК. VII. Изгибы в сателлитных ДНК. VIII. Центромеры и сателлитные ДНК. IX. Заключение – функции сателлитных ДНК.

I. ВВЕДЕНИЕ

Важным атрибутом корректной во времени и пространстве экспрессии генов и, соответственно, функционирования эукариотической клетки является высокоорганизованное и детерминированное расположение ДНК в клеточном ядре. Накапливается все больше данных относительно структурной организации хромосом не только митотических и мейотических клеток, но также и интерфазной стадии [1]. Цитологические исследования с применением улучшенной флуоресцентной *in situ* гибридизационной техники (FISH) [2] позволили довольно детально изучить высокоорганизованную структуру хромосом в интерфазном ядре. Общеизвестно, что количество ДНК в гаплоидном наборе хромосом эукариот значительно превышает количество ДНК, содержащееся в структурных и регуляторных генах. Этот феномен, известный как С-парадокс, объясняется тем, что эукариоты содержат избыточное количество повторяющейся ДНК [3]. Он особенно характерен для растений: голосеменные и некоторые однодольные растения содержат необычно большое количество ДНК, большинство двудольных и некоторые однодольные содержат значи-

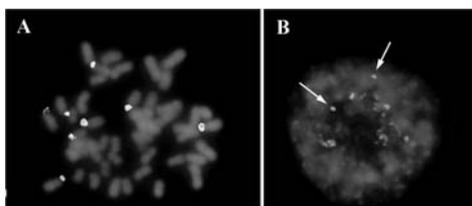


Рис. 1. Картирование рДНК повторов хромосом табака методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH).

Представлены метафаза (А) и интерфаза (В) меристематических кончиков корней *Nicotiana tabacum* L. (var. 095 55) гибридизированных с пробой 45S рДНК, меченной флуоресцеинизотиоцианатом (FITC). Желто-зеленый сигнал гибридизации выявляется в виде широкого пятна на темном фоне. Серый цвет — контур хромосом. Наблюдаются 8 сигналов рДНК, соответствующие 4 участкам хромосом *N. tabacum*. В интерфазе (В) наблюдаются как интралокусная, так и интерлокусные различия в уровне конденсации ДНК.

тельно меньше, хотя и избыточное количество ДНК. Вместе с тем, каждый организм даже с малым геномом (как в модельном растении *Arabidopsis thaliana*) имеет спектр повторяющихся компонентов ДНК [4].

К настоящему времени охарактеризованы хромосомоспецифические многократно повторяющиеся тандемно организованные сателлитные ДНК многих эукариот. Исследования при помощи FISH-техники помогли точно идентифицировать их локализацию в хромосомах (рис. 1). Способность поддерживать индивидуальную структуру хромосом и регулировать размер генома является интересным свойством этих последовательностей. Многократно повторяющаяся сателлитная ДНК участвует в формировании центромер — специализированного хромосомного участка, который необходим для точного распределения гомологичных хромосом в митозе и мейозе. Долгое время, главным образом на основе исследований α -сателлитной ДНК человека и центромерной ДНК дрожжей, считалось, что в центромерном регионе присутствуют только сателлитные ДНК. Однако, недавно проведенные исследования животных и растительных клеток показали, что центромеры формируются различными повторяющимися компонентами ДНК, в числе которых нередко обнаруживаются и ретротранспозоноподобные элементы. По этой причине структурное сходство функционирующих центромер и их ДНК/белковые компоненты, взаимодействующие с кинетохором во время митоза, являются объектом всесторонних исследований.

Концы индивидуальных хромосомных ДНК, рассеянные в интерфазном ядре и сконденсированные в метафазных стадиях, сформированы главным образом теломерной ДНК, состоящей из коротких,

законсервированных и многократно повторяющихся мотивов из 6–7 п.н. [5, 6]. Ввиду того, что теломеры неспособны полностью реплицироваться обычным способом, с помощью ДНК-полимеразы, для поддержания длины хромосомы необходим специфический фермент теломеразы. Присутствие теломеразы и ее регуляция в специфических типах клеток, как и потеря теломерной ДНК в стареющих клетках, становится в настоящее время одной из интересных проблем при исследовании растений [7–9]. Таким образом концы, центральная часть и другие области хромосомной ДНК заполнены повторяющимися элементами ДНК, которые консервативны в теломерах, но весьма вариабельны в центромерах, субтеломерных и других областях хромосом. В данной статье рассматриваются, в основном, вопросы организации, эволюции и функциональных особенностей многократно повторяющихся сателлитных ДНК.

II. ОБЩЕЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ САТЕЛЛИТНОЙ ДНК

Сателлитные ДНК являются характерным компонентом генома всех эукариот [10, 11]. Сначала этим термином обозначали ту часть генома, которая отделялась при градиентном ультрацентрифугировании [12, 13] и, следовательно, по плотности и по содержанию АТ/ГС должна была отличаться от основной массы ДНК. Следует отметить, что этот термин является техническим обозначением физико-химических свойств означенных фракций, а не отражением их биологических свойств. В дальнейшем выяснилось, что гены рибосомной РНК (рДНК), митохондриальные и хлоропластные ДНК могут образовывать отдельные сателлитоподобные пики в градиенте; с другой стороны, «истинные» сателлиты с ГС-составом, идентичным с основной ДНК, невозможно отделить от основной массы ДНК и они обнаруживаются как «скрытые» сателлиты [14]. С течением времени, по мере совершенствования методов исследования, определение сателлитной ДНК претерпело изменения. В настоящее время под этим термином подразумевается характерный компонент эукариотического генома, состоящий из тандемно организованных повторов; сателлитная ДНК не кодирует белки и локализована в конститутивном гетерохроматине хромосом. При этом в родственных геномах часто обнаруживается наличие общих или родственных типов сателлитных ДНК. Типичные сателлиты с характерным сайтом для одной (или многих) эндонуклеаз рестрикции были названы «рестрикционными сателлитными ДНК».

Следует четко разграничить термины сателлитные ДНК и мини- и микросателлитные ДНК. Основное различие между ними заключается в следующем: 1. Мини- и микросателлиты в отличие от сател-

литных ДНК обнаруживаются в эухроматине. 2. Число копий повторов в мини- и микросателлитах намного меньше по сравнению с сателлитными ДНК. Общим для всех трех компонентов является наличие тандемно расположенных повторов, а префиксы мини- и микро- отражают различия в длине повторяющихся единиц. Длина повторяющейся единицы минисателлитных ДНК составляет 10–100 п.н., а микросателлитных – менее 10 п.н. Длина повторов сателлитных ДНК не имеет каких-либо ограничений. Она варьирует от 2 п.н. до нескольких сотен.

Повторяющиеся единицы сателлитных ДНК различны по своей специфичности. Некоторые повторы встречаются в большом количестве во всех видах определенного рода, в то время как другие могут присутствовать в одном или нескольких видах. Обнаружены существенные отличия в степени амплификации повторов между дикими видами и культурными видами высших растений [15, 16]. Выявлена дивергенция последовательности повторяющихся единиц сателлитных ДНК порядка 5–15% даже у отдельных индивидуумов в пределах вида [17].

III. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ САТЕЛЛИТНЫХ ДНК

Сателлитные ДНК обнаруживаются в виде тандемно расположенных многократно повторяющихся последовательностей в гетерохроматиновых областях эукариотических хромосом. Новая номенклатура использует термин «рестрикционные сателлиты», поскольку тандемно организованные относительно гомогенные повторы могут быть расщеплены специфическими эндонуклеазами рестрикции. После блоттинга по Саузерну и гибридизации с меченой тотальной ДНК (или клонированного повтора) лестничноподобная картина гибридизации доказывает наличие сателлитной ДНК. Этим методом удается обнаружить также «скрытые» сателлиты, которые не разделяются в градиенте плотности CsCl.

Ниже приводится краткий перечень новых методов, которые наряду с традиционным методом градиентного ультрацентрифугирования применяются для выделения сателлитных ДНК.

а) МЕТОД ЭНДОНУКЛЕАЗНОЙ РЕСТРИКЦИИ

Тотальная ДНК расщепляется разными, преимущественно 4 п.н.-расщепляющими эндонуклеазами рестрикции (например *HaeIII*, *TagI*, *Sau3a* и др.), переносится по Саузерну и гибридизуется с тотальной ДНК. Мономерные полосы можно вырезать из геля, клонировать и использовать для следующей гибридизации по Сау-

зерну. Обнаружение лестничноподобных рестриционных фрагментов при гель-электрофорезе свидетельствует о наличии сателлитной ДНК. При использовании данного метода следует с осторожностью подойти к расщеплению *Sau3a* или *BamHI*, так как можно получить лестничную структуру не сателлитной, а 5S рДНК (в кодирующем участке 5S рДНК содержится косервативный *BamHI* /*Sau3a* рестриционный сайт).

б) МЕТОД «ОСТАТОЧНОЙ» ДНК

Тотальную ДНК расщепляют рестриционными ферментами, которые не расщепляют сателлитные последовательности и разделяют на агарозном геле. Высокомолекулярную нерасщепленную остаточную ДНК вырезают из геля и для ее расщепления подбираются специфические эндонуклеазы рестрикции. Полученные фрагменты клонируют. Сателлит-содержащие клоны детектируют при помощи меченой «остаточной» ДНК.

в) СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПРАЙМЕРЫ

Если сателлитные ДНК определенного вида уже охарактеризованы, строится праймер для ее повторяющейся единицы и с его помощью проводится амплификация сателлитной ДНК родственных видов (18).

г) ГЕНОМНАЯ САМОАМПЛИФИКАЦИЯ («self-priming»)

Множественно повторяющуюся ДНК можно амплифицировать и без праймеров, если тотальную ДНК фрагментировать ультразвуком или расщепить 4 п.н.-расщепляющими рестриционными ферментами. На первом этапе тотальная ДНК служит матрицей, а фрагментированная ДНК является праймером. Во втором раунде первый продукт ПЦР используется как «новая матрица» [19]. При помощи этого метода происходит существенное обогащение сателлитных ДНК.

д) ГИБРИДИЗАЦИЯ КЛОНИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТОВ

Тотальная ДНК расщепляется при помощи эндонуклеаз рестрикции, клонируется в *E. coli*, а полученные колонии гибридизуются с тотальной меченой ДНК. Клоны, содержащие повторяющуюся ДНК, дают сильный гибридизационный сигнал и в дальнейшем их можно охарактеризовать с помощью секвенирования.

IV. САТЕЛЛИТНЫЕ ДНК ЖИВОТНЫХ

Сателлитным ДНК животных посвящено большое количество публикаций. Ниже приводятся данные, которые позволяют сформулировать общие представления об их происхождении и эволюции.

Общепринято, что сателлитные ДНК эволюционировали по схеме «согласованной эволюции» [20]. Считается, что главными рекомбинационными механизмами, образующими и поддерживающими внутривидовую гомогенность сателлитных ДНК, являются неравный кроссинговер, конверсия генов, репликационное скольжение и обмен сестринскими хроматидами. Ввиду отсутствия модельных систем, которые позволили бы детально исследовать эволюционную динамику сателлитных ДНК *in vivo*, наши знания опираются на данные сравнительного анализа сателлитных ДНК близкородственных видов и компьютерное моделирование [21, 22]. Наличие большого количества видоспецифичных семейств сателлитных ДНК свидетельствует об их быстрых превращениях и характеризует их как нестабильные компоненты генома. В то же время, описаны случаи и относительно медленной эволюции семейств сателлитных ДНК. В качестве примера можно привести сателлитную ДНК рvB370, характерную для разных видов группы *Drosophila virilis* [23]. Различия в консенсусной последовательности рvB370 у этих видов не наблюдаются.

Если суммировать имеющиеся данные, можно обнаружить корреляцию между гомогенностью повторяющейся единицы, числом копий и обменом сателлитных ДНК, т.е. сателлитные ДНК с малым числом копий являются очень гомогенными и эволюционируют медленно. Семейства сателлитных ДНК с большим числом копий являются более гетерогенными и нестабильными. Эту корреляцию хорошо иллюстрируют три семейства сателлитных ДНК сверчка *Dolichopoda schiavazzii* [24, 25]. Изучение сателлитных ДНК некоторых насекомых показывает, что мейотическая рекомбинация является главным механизмом их эволюции. При сравнении бисексуальных и партеногенетически репродуцируемых видов, встречающихся в Сицилии, становится очевидным, что эволюционные превращения сателлитных ДНК являются более быстрыми у сексуально репродуцируемых видов по сравнению с партеногенетическими [26, 27].

В специфических случаях, когда определение морфологических различий затруднено или почти невозможно, видоспецифические сателлитные ДНК позволяют быстро и достоверно идентифицировать тот или иной организм. Это можно проиллюстрировать на двух примерах. Две специфические сателлитные ДНК дают возможность различить бисексуальные и партеногенетические штаммы морских креветок *Artemia* [28]. С помощью сателлитной ДНК удалось четко

идентифицировать личинки *Onchocerca volvulus* [29]. Сателлитные ДНК были также использованы для выяснения филогенетических отношений близкородственных видов *Drosophila* [30]. Однако после разработки метода ПЦР для тех же целей можно использовать другие молекулярные маркеры, такие как например митохондриальная ДНК, требующие меньших технических усилий.

САТЕЛЛИТНЫЕ ДНК И МОБИЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ

Известно, что мобильные элементы часто интегрируются в состав гетерохроматина, где они накапливаются [31] и могут служить источником новых семейств сателлитных ДНК. В ряде случаев наблюдается значительное сходство последовательностей сателлитных ДНК и фрагментов мобильных элементов.

Последовательность рvB370, которая встречается в центромерном гетерохроматине у видов группы *Drosophila virilis*, очень сходна с длинным прямым повтором транспозона рDv [23]. Главный гетерохроматиновый сателлит китообразных содержит длинные LINE-подобные повторы [32]. У животных «CENP-B бокс», т.е. связывающий сайт главного центромероспецифического белка (CENP-B), совпадает с терминальным обращенным повтором транспозона rogo [33]. Принято считать, что CENP-B белок происходит от рого-подобной транспозазы [34], а центромерный участок Y-хромосомы *Drosophila melanogaster* возможно образован путем амплификации внедренного в теломер ретроинвертированного транспозона [35].

SGM-семейство *Drosophila guanche* может служить моделью для понимания более общего пути образования сателлитных ДНК из мобильных элементов [36]. Семейство SMG является мобильным элементом, характеризующимся функциональным и структурным сходством с миниатюрным транспозабельным элементом (MITE). Эти последовательности состоят из разных модулей. Они широко распространены у *Drosophila* и *Sophophora*, в частности у близкородственных видов *D. subobscura*, *D. guanche* и *D. madeirensis*. Но у *D. guanche* наблюдается отсутствующая у двух других видов амплифицированная сателлитная ДНК, составляющая 10% генома. Этот пример свидетельствует в пользу гипотезы, разработанной Салсером [37].

V. САТЕЛЛИТНЫЕ ДНК РАСТЕНИЙ

К настоящему времени изучены сателлитные ДНК большого числа высших растений. Составлена специальная база данных этих молекул («PlantSat». [38]). Высокая скорость эволюции этих последовательностей, приводящая к их значительной вариабельности, дает возможность дифференцировать родственные виды [17, 39–43].

Большая информация накоплена по культурным видам – пшенице, рису, овсу, а также по их диким сородичам (триба *Poaceae*). Детально исследованы также семейства *Brassicaceae*, *Chenopodaceae*, *Cucurbitaceae*, *Solanaceae* [44, 45].

Рестрикционные сателлитные ДНК найдены почти у всех растений. Главным образом, они сконцентрированы в субтеломерных и центромерных областях, однако иногда расположены и в интеркалирующих блоках хромосом [39, 44, 46]. Длина этих повторяющихся ДНК нередко составляет 160–180 или 320–370 п.н. [41]. Однодольные растения часто содержат необычно большое количество сателлитных ДНК, обуславливающее феномен С-парадокса [44].

Использование высокоразрешающей FISH-техники в мейотической профазе хромосом помогло точно локализовать *Lycopersicon*-специфические сателлиты в субтеломерных участках хромосом томатов (*Lycopersicon esculentum*) [47]. Наиболее полные молекулярные и цитологические данные получены для родов *Beta* [43], *Nicotiana* и *Solanum* [16, 48].

Наблюдается корреляция между длиной сателлитной ДНК и длиной нуклеосомной ДНК (кор + линкерная ДНК) (приблизительно 180 п.н. [49, 50]). У однодольных растений более длинные повторы произошли, по-видимому, путем дупликации отдельных последовательностей [45]. Описаны видо-, родо- и семейство-специфические рестрикционные сателлиты, выявлена эволюционная скорость изменения последовательности повторяющегося элемента и предполагаемое время разделения видов внутри семейства. Показано, что сателлитные ДНК являются наиболее вариабельной частью генома с высокой скоростью молекулярной эволюции [51]. Распределение и последовательность сателлитных ДНК дает возможность выявить филогенетическое родство видов внутри семейств [17, 42, 48, 52]. Тот факт, что последовательность и количество повторов варьирует у относительно близких видов, позволяет их использовать для быстрого и простого скрининга гибридов, получаемых путем слияния протопластов.

Arabidopsis

Семейство многократно повторяющейся ДНК *Arabidopsis* (AtCon), состоит из 178 п.н. тандемно расположенных единиц, которые локализованы в центромерах всех пяти хромосомных пар [4]. Анализ многих AtCon показывает консервативность последовательности, равную 95%. Внутри AtCon показано наличие двух боксов, длиной 30 и 24 п.н., которые консервативны на 99%. Последовательность у 3' конца этих боксов обнаруживает сходство с дрожжевой CDE1 и человеческим CENP-B ДНК-белок связывающим мотивом. Когда олигонуклеотиды менее консервативных участков AtCon были гиб-

ридизованы *in situ*, они обнаруживались в специфических хромосомах. При ПЦР-анализе геномной ДНК одиночные праймеры или пары праймеров показывают незначительную амплификацию, что означает расположение повторов по типу голова к хвосту.

Большинство пар праймеров, ориентированных в противоположном направлении, давали четкие полосы. Однако некоторые пары праймеров не давали амплификацию, показывая тем самым, что имеются хромосом-специфические варианты AtCon. Эти результаты очень важны, так как с их помощью можно оценить организацию, характер амплификации, распределение и эволюцию одного из главных семейств повторяющихся ДНК у *Arabidopsis*. Приведенные здесь данные подтверждают, что AtCon, по аналогии с сателлитами человека, может играть определенную роль в организации и функционировании центрoмер.

Cucurbitaceae

Возможность использования сателлитных ДНК для оценки эволюционного родства растений детально исследована на примере разных видов *Cucurbitaceae*, включая культурные виды [17, 53–55]. Изучение этих видов представляет интерес, поскольку в их геноме содержится значительное количество специфических многократно повторяющихся ДНК [17, 53, 56]. Характерные сателлитные элементы рода *Cucumis* описаны у *C. sativus* (типы I–IV [14, 54, 57]), *C. melo* (352 п.н.-ый повтор; [58]) и *C. metuliferus* (346 п.н. [18]). Реликты одного из них присутствуют во многих других видах *Cucumis*, а также в родственных родах в малых количествах, поэтому они обнаруживаются лишь после долгой экспозиции по Саузерну или ПЦР амплификацией. Это указывает на то, что оригинальный древний прародитель данного сателлита содержался уже у общего предка *Cucumis*, который был впоследствии модифицирован и развился в специфические субтипы. Предположительно, видообразование привело к отделению индийского подрода *Cucumis* ($n = 7$) от африканского подрода *Melo* ($n = 12$; [59, 60]). При видообразовании эти субтипы в одних видах были амплифицированы, в то время как в других остались в малых количествах. Самые значительные количества типов I–IV наблюдаются в культивируемой *C. sativus* (огурцы) и *C. hardwickii* (менее культивируемый вид [57, 59]). В культивируемых африканских видах 352 п.н.-ый элемент превалирует у *C. melo*, и 346 п.н.-ый — у *C. metuliferus*. Сходные повторы в виде малых тандемных образований наблюдаются и у других видов. Поэтому отсутствие или наличие того или иного сателлита хотя и указывает на родство этих видов, однако не всегда является надежным филогенетическим маркером для классификации видов.

Указанные элементы *Cucumis* четко отличаются от сателлитов, встречающихся в геномах тех видов *Cucurbita* [14, 17, 61], где найдены два главных типа повторяющихся элемента (170 п.н.-ый и 350 п.н.-ые повторы). У некоторых видов один или оба типа повторов претерпели небольшую модификацию и амплификацию, в то время как в других видах ПЦР амплификацией можно обнаружить лишь один тип.

Для видов *Cucumis* характер распределения сателлитов отражает классификацию, основанную на морфологических, цитологических и других данных [48, 59]. Следует заметить, что у видов *Cucumis* группы *Anguria* [62], которые широко не культивируются, не найдено охарактеризованных выше сателлитов. С другой стороны, тетраплоидные виды *Cucurbita* Нового Света содержат одинаковое количество внутри- и межвидовых гетерогенных 179 п.н.-ых повтора, в то время как количество 350 п.н.-ых сателлитов у разных видов варьирует [17].

Таким образом, при изучении диких и культурных видов *Cucurbitaceae* удалось показать, что некоторые типы повторов, возможно, присутствующие у прародителей данной трибы, претерпели специфические изменения в последовательности и амплифицировались в процессе эволюции с образованием родо- или видо-специфических сателлитов [17, 18, 63].

Ситуацию с видами *Cucurbitaceae* можно сравнить с «сателлитным поведением» родов *Solanum* и *Lycopersicon*, где «характерные для рода» повторы [15, 16] в малых количествах присутствуют даже в геномах других родов [48]. Таким же образом, повторы, присутствующие в геномах разных видов рода *Beta* (*Chenopodiaceae*), в малых количествах обнаруживаются и в других родах [43, 64]. Видо- или родо-специфические сателлитные повторы встречаются в зерновых культурах в виде амплифицированных геномных компонентов, в то время как в родственных диких видах они присутствуют в «молчащем» виде. Механизм различного поведения этих сателлитов при окультуривании неизвестен, однако его знание может представлять некоторый интерес для селекции растений [18].

Citrus

Сателлитные ДНК цитрусовых растений детально охарактеризованы с использованием аналитического ультрацентрифугирования в градиенте плотности CsCl [65–67]. У цитрусовых растений содержание сателлитных ДНК варьирует у разных видов, достигая в некоторых случаях 20% всего генома. GC-содержание этих фракций составляет 60–65%. Детально изучена последовательность и структура сателлитных ДНК *Citrus limon*, *C. sinensis*, *C. ichangensis* и *Poncirus trifoliata* [52, 68, 69]. Длина большинства мономеров составляет 181 п.н. с GC-составом 60–68%, что значительно выше среднего содер-

жания GC в их суммарных геномах. Филогенетическая дендрограмма этих последовательностей показывает, что последовательности *Citrus* отделены от большинства последовательностей *Poncirus*.

Все повторы принадлежат к одному сателлитному семейству, однако претерпели видоспецифические модификации, которые отражают филогенетические отношения между видами. Внутри каждого вида можно наблюдать дифференциацию сателлитного повтора. Четко просматривается, что большинство повторов у двух культурных видов (лимон и апельсин) ближе друг к другу, чем к дикому виду *C. ichangensis*. Однако некоторые повторы одного вида более близки к повторам другого вида. Это может означать, что повторы не полностью гомогенны. Тем самым подтверждается, что дикий прародитель *Citrus limon* и *C. sinensis* были родственны с *C. ichangensis*, однако этот прародитель возможно вымер при окультуривании. Большинство повторов у более отдаленного вида *P. trifoliata* значительно дифференцированы, но все еще сохраняют 70–83% гомологию с другими цитрусовыми сателлитами. Большой набор последовательностей сателлитных ДНК можно использовать как ценный молекулярный маркер при изучении цитрусовых.

VI. МЕТИЛИРОВАНИЕ САТЕЛЛИТНЫХ ДНК

В ядрах всех эукариотических клеток геномная ДНК конденсирована и компактизирована гистонами и негистоновыми белками в динамическую структуру, именуемую хроматином. Активность хроматина регулируется ковалентными модификациями ядерных белков и ДНК. Метилирование цитозинового остатка в пятом положении пиримидинового кольца (m^5C) является наиболее характерной модификацией ДНК у высших эукариот [70, 71]. Наследуемость молекулярных модификаций в ДНК создает основу для эпигенетической памяти. Важность метилирования ДНК в процессе развития убедительно доказана для животных [72] и растений [73].

Распределение метилцитозина в геноме далеко не равномерно. Большинство метилцитозиновых остатков сконцентрировано в гетерохроматиновых областях, сателлитных повторах, в неактивных транспозонах и эндогенных вирусах [74]. С другой стороны, промоторные области некоторых генов, ассоциированных с CpG островками, и внеядерные геномы (ДНК пластид и митохондрий) обычно обходятся без метилирования. У животных метилирование обнаруживается в симметричных CG динуклеотидах [71], в то время как в растениях почти каждый цитозин может быть метилирован, хотя преобладают симметричные m^5CG и m^5CNG мотивы [75]. У нитевидных грибов *Neurospora* и *Ascobolus* большая часть генома свободна

от метилирования за исключением некоторых сильно метилированных повторяющихся последовательностей [76]. ДНК некоторых организмов с малым размером генома, например *S. cerevisia*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, не метилированы и программы их развития осуществляются с использованием других эпигенетических модификаций хроматина. Общий уровень метилирования у растений выше, чем у животных, что возможно отражает наличие большего количества сателлитных последовательностей (и гетерохроматина) в их геномах. Наблюдаются значительные различия в уровне метилирования у разных видов растений. К примеру, в то время как у *Arabidopsis* метилировано 6% цитозина, у большинства других покрытосеменных это цифра достигает 20–30% [77]. Эти различия можно объяснить как количеством повторяющихся последовательностей, так и разным уровнем метилирования CNG последовательностей [78].

ФЕРМЕНТЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В МЕТИЛИРОВАНИИ

Наблюдается рост числа изолированных генов (белков), связанных с процессом метилирования ДНК. Перенос метильной группы на цитозиновый остаток является пострепликативным энзиматическим процессом, катализируемым ДНК-метилтрансферазами. Эукариотические метилтрансферазы по сравнению с прокариотическими ферментами являются большими молекулами, часто размером более 100 кДа, и содержат разные функциональные домены. Хромодомены, обнаруженные недавно в малом семействе хромометилаз (СМТ-семейство), указывают на существование связи между структурой хроматина и метилированием ДНК [79]. Высказано предположение, что хромодомены могут направить фермент к определенному геномному участку. В самом деле, у *Arabidopsis* [79] и кукурузы [80] разрушение хромометилазных генов приводит к специфическому снижению метилирования сателлитных последовательностей, указывая на сродство ферментов этого типа с гетерохроматиновыми участками. Обе мутации влияют больше на CNG, чем на CG метилирование. Механизм узнавания гетерохроматина возможно включает в себя взаимодействие фермента с гетерохроматин-специфическим HP1 белком у *Arabidopsis* [81]. Интересно отметить, что взаимодействие HP1 с нуклеосомами происходит через метилированный гистон H3, связывающий при этом две эпигенетические модификации, основанные на метилировании. Функции CNG метилирования в повторках остаются неясными, так как ни один из хромометилазных мутантов не обнаруживает фенотипических отличий. Обнаружение *ddm1* мутации у *Arabidopsis* в 90-ые годы показало, что метилирование эукариотического генома является сложным процессом, требующим помимо участия метилтрансфераз других факторов [82]. В первых

генерациях *ddm1* мутантных растений наблюдается резкое снижение уровня метилирования сателлитных гетерохроматиновых участков — до 70%, в то время как гипометилирование в уникальных последовательностях обнаруживается лишь после нескольких поколений инбридинга. Оставалось загадкой, почему это происходит, когда у мутантных растений сохраняется нормальный уровень активности ДНК-метилтрансферазы и нормальный уровень кофакторов метилирования. Недавно мутации были увязаны с геном, кодирующим член семейства SNF2/SW12 ДНК-зависимой АТФ-азы, реконструирующим хроматин [83]. Возможно в будущем будут открыты белки (гены), которые либо прямо (путем связывания метилтрансфераз через хромодомены), либо косвенно, например, через факторы, регулирующие доступность к хроматину, участвуют в процессе метилирования.

КЛЕТОЧНЫЕ ФУНКЦИИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

Становится очевидным, что метилирование цитозина может выполнять и плеiotропные функции в зависимости от организма и локализации генома. У высших эукариот метилирование может быть вовлечено в число важных клеточных функций, таких как выключение генов, геномный импринтинг, инактивация транспозонов, тканеспецифическая экспрессия и эпигенетическая инактивация хромосомных доменов. Из этого следует, что обобщенная формулировка общей функции метилирования ДНК у эукариот является неправильной. В этом обзоре мы рассмотрим вопрос о возможной роли метилирования ДНК в сателлитах. Имеется ряд работ, показывающих высокий уровень метилирования цитозина в сателлитных повторах в разных участках генома как у животных, так и у растений. Считается, что сателлиты, как и все повторяющиеся последовательности, являются исключительно хорошими мишенями для метилирования *de novo*. Доказательством этого являются полученные в трансгенных экспериментах данные, показавшие, что многие тандемно расположенные трансгенные копии подвергаются метилированию и отключению их экспрессии в процессе, именуемом умолчанием генов под воздействием повторов [84, 85]. Сигнал метилирования часто включает гомологозависимое взаимодействие между повторяющимися единицами (как тандемно расположенными, так и дисперсными) на уровне ДНК или РНК [86]. Очевидно, что эндогенные сателлиты могут быть естественной мишенью для выключения генов под воздействием повторов и метилирования. Эндогенные вирусы являются хорошим примером того, как одна или несколько копий чужой последовательности, однажды интегрированные в геном, могут расширяться, превратиться в сателлиты и претерпеть

новые эпигенетические модификации. В недавней эволюционной истории *Nicotiana* имела место интеграция растительной вирусной ДНК [84]. В настоящее время ряд видов содержит около сотни копий амплифицированной и высокометилированной вирусной последовательности в геноме (87). Несомненно, не все сателлиты являются равномерно метилированными, к тому же не существует точной корреляции между числом копий и уровнем метилирования. Локусы рДНК являются хорошим примером повторяющейся последовательности, содержащей как гипо-, так и гиперметилированные единицы [88, 89]. Гипометилирование рДНК связывают с транскрипционной активностью и понижением метилирования, вызываемое 5-азациитидином, сопровождается повышенной транскрипцией исходно молчащих единиц у аллополиплоидов *Brassica* [90]. Метилирование может способствовать компартиментализации рДНК на активные и молчащие участки в клеточных ядрах.

Возникает вопрос о роли метилирования цитозина в сателлитах, которые никогда не транскрибируются и образуют конститутивный гетерохроматин.

1. Берд высказал предположение, согласно которому метилирование предотвращает нежелательный транскрипционный «шум» у видов с большим геномом [91]. Частота сайтов, связывающих факторы транскрипции может быть высокой в геноме, значительная часть которого составляет гетерохроматин. В результате этого, следовые транскрипции, инициированные в гетерохроматине, могут достичь чрезвычайно высокого уровня. Метилирование цитозина может непосредственно влиять на транскрипцию путем предотвращения связывания транскрипционных факторов с сайтом узнавания или же непрямым путем — образованием конденсированной структуры хроматина, недоступной для транскрипционных комплексов. Выделены белки с высоким сродством к метилцитозину у животных и показана их высококооперативная связуемость с ДНК [92]. Возможно, некоторые из этих белков способствуют конденсации хроматина.

2. Хотя транспозоны не рассматриваются как классические сателлиты, они могут составлять до 50% повторяющейся ДНК у некоторых видов растений, например кукурузы [3]. У *Arabidopsis* мутации, влияющие на метилирование, могут увеличить активность транспозонов [93]. И наоборот, активные транспозоны часто содержат меньше метилцитозина, чем их неактивные копии [94]. Таким образом, метилирование может контролировать транспозиционную активность.

3. Другая роль метилирования цитозина выяснилась в ходе недавних исследований в разных экспериментальных системах. У *Ascobolus* частота кроссинговера между двумя генетическими маркерами снижалась в сотни раз, в тех случаях, когда взаимодействующие ДНК

были метилированы [95]. Этот результат показывает, что метилирование может влиять на ДНК-ДНК взаимодействие и подавлять генетическую рекомбинацию в организме.

Было показано, что редкий у людей ISN-синдром может быть связан с мутацией в метилтрансферазном гене DDM3 [96]. Классическая сателлитная ДНК обычно сверхметилирована, но при ISN-синдроме почти полностью неметилирована. Цитогенетический анализ ISN-пациентов показал наличие хромосомных aberrаций в центромерном гетерохроматине, в основном его удлинение в метафазе. В интерфазе наблюдалась устойчивая самоассоциация околоцентромерных сателлитов.

Экспериментальное снижение метилирования вызывает абберантную конденсацию и разделение сестринских хроматид в субтеломерном гетерохроматине у пшеницы [97]. У растений с большим геномом сателлитные повторы, состоящие из сотен тысяч единиц, часто обнаруживаются в разных хромосомах. Возможно метилирование способствует предотвращению нежелательных рекомбинаций между гомологичными сателлитами в сдвинутых позициях.

Таким образом, можно предположить, что метилирование сателлитных последовательностей может выполнять различные функции – понижать транскрипционный «шум», инактивировать транспозоны и стабилизировать тандемно расположенные единицы в клеточном ядре. Несмотря на значительные достижения в понимании метилирования цитозина, все еще остается много вопросов. (I) Необходимо ли метилирование для сателлитов? Известно, что сателлиты одноклеточных дрожжей и *Drosophila* выполняют свои функции без модификации цитозина. (II) Каким образом некоторые сателлитные единицы не метилируются, тогда как другие гиперметилированы? (III) Как «машина» метилирования узнает повторы? Определяется это структурными свойствами ДНК, например изгибами, факторами хроматина и/или же другими эпигенетическими модификациями, например метилированием, ацетилированием, и/или фосфорилированием гистонов? (IV) Влияет ли метилирование на мутабельность и эволюцию сателлитов?

VII. ИЗГИБЫ В САТЕЛЛИТНЫХ ДНК

Изгибы в ДНК [98] могут играть существенную роль в образовании конститутивного гетерохроматина в клеточном ядре. Изогнутость в ДНК часто коррелирует с присутствием множественных адениновых блоков как в синтетических [99], так и в природных молекулах ДНК [100].

Известно, что если в молекуле ДНК адениновые блоки повторяются в фазе с шагом спирали, общий изгиб достигает значительной величины и статический изгиб можно детектировать физическими методами [98, 100]. В эукариотах, включая дрожжи [101], животных [102] и растения [68, 103], повторы сателлитных ДНК, образующих конститутивный гетерохроматин, часто содержат изгибы. Изгиб найден в центромерной ДНК всех 16 дрожжевых хромосом [104], подтверждая участие «изогнутой» ДНК в образовании центромерного комплекса. О роли адениновых блоков в изгибе сателлитной ДНК табака свидетельствуют эксперименты по сайт-направленному мутагенезу в элементах изгиба [105]. Повторяющаяся единица сателлитной ДНК цитрусовых длиной около 181 п.н. также содержит характерные блоки адениновых остатков [52]. При переходе к олигомерным формам изгибы, наблюдаемые в мономерах, способствуют образованию закрученной двойной спирали (СДН-форма) [68, 106–109]. Электронномикроскопический анализ показывает наличие в гексамере сателлитных ДНК *Artemia franciscana* и *Citrus ichangensis* колец малого диаметра и толстых стержнеобразных частиц [69, 107].

Структурный консерватизм изгибов в сателлитных ДНК поддерживается сохранением А-блоков в повторах, при этом нуклеотидная последовательность самих повторов варьирует у разных видов [52]. Наличие изгибов поддерживает гетерохроматиновую структуру сателлитных ДНК. Видоспецифические модификации сателлитного консенсуса включают изменения в положении и числе А-блоков. Молекулярная форма сателлитных олигомеров, предсказанная компьютерным моделированием, показывает закрученную структуру тандемных повторов, что хорошо согласуется с дендрограммой сателлитных последовательностей. По-видимому, элементы, способствующие изгибу ДНК, определяют эволюцию сателлитных повторов [52].

КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ САТЕЛЛИТНЫХ ДНК *CITRUS* И *PONCIRUS*

Для выявления локальных изгибов в мономерах была использована программа CURVATURE [110]. На рис. 2 приведены профили изгибов 6 мономеров сателлитных ДНК *Citrus* и *Poncirus*. Компьютерный анализ во всех повторах показал наличие стабильного внутреннего изгиба ДНК. Все клоны сателлитных ДНК цитрусовых, несмотря на высокий GC-состав (около 65 %), содержат несколько блоков адениновых остатков. Два адениновых блока локализованы у 3'-конца мономера и отстоят друг от друга на один виток спирали (10–11 п.н.). Такое расположение типично для большинства изогнутых природных молекул, например, в кинетопластной ДНК *Leishmania tarantolae* [100]. В соответствии с этим наблюдением, программа CURVATURE показала максимальную изогнутость у 3'-конца (около 2,0° на динуклеотидный шаг). Максимальная величина изог-

Профиль изгиба сателлитных мономеров Citrus/Poncirus

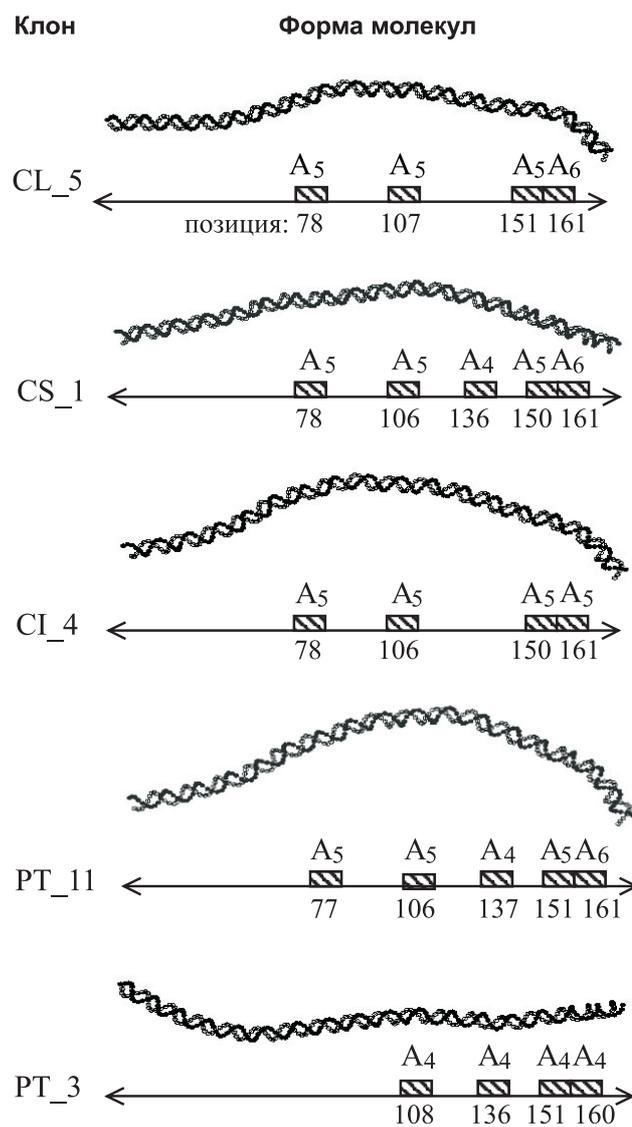


Рис. 2. Изгибы в отдельных клонированных повторах сателлитных ДНК цитрусовых.

В квадратах приводятся позиции адениновых блоков (dA4-6) вдоль цепей повторов [52].

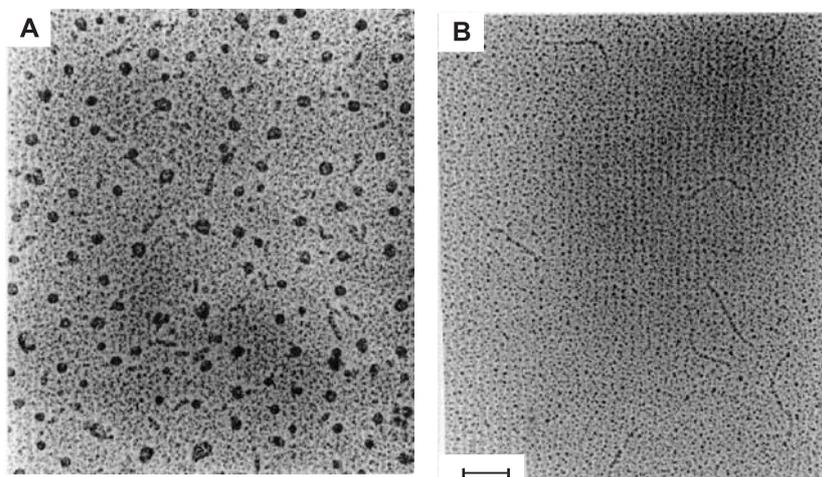


Рис. 3. Электронномикроскопическое изображение гексамера сателлитной ДНК *Citrus ichangensis*.

А – гексамер. В – контрольная ДНК той же длины [69].

нутости мономеров, длина которых 180–181 п.н., наблюдается у CL1, C14 и PT11. Не может быть случайным тот факт, что эти изогнутые последовательности содержат адениновые блоки, состоящие из 5–6 адениновых нуклеотидов (dA5–6; рис. 3). В модельных экспериментах максимальные изгибы получаются в молекулах ДНК В-формы, содержащих 5–6 последовательных адениновых остатков [111]. Изгиб у PT3 относительно мал, так как в этой последовательности имеется более короткий адениновый блок (dA4). Кроме того, эта молекула обладает довольно выпуклым профилем изгиба, что может быть вызвано отсутствием аденинового блока в позиции 78. В целом, изгиб хорошо коррелирует с консервативным dA мотивом во всех молекулах. Большинство мономеров содержат по крайней мере два, а в большинстве случаев три адениновых блока, что соответствует известному групповому расположению адениновых остатков в сателлитных ДНК [102]. Такие же характерные адениновые блоки можно наблюдать и в сателлитных ДНК разных видов рода *Cucumis* [54].

Беридзе и соавт. [69] методом электронной микроскопии показали наличие колец малого диаметра и толстых стержнеобразных частиц в гексамере (рис. 3). Общеизвестно, что изгибы в ДНК ответственны за циркуляризацию олигомеров кинетопластов и синтетических молекул ДНК. Представляло интерес выяснить каким образом изгиб, наблюдаемый в мономере, потенциально может влиять на образование третичной структуры в длинных олигомерных ДНК. При помощи программы CURVATURE были проанализиро-

ваны цепи искусственно лигированных «голова к хвосту» 12 мономеров сателлитных единиц, поскольку такая форма является наиболее часто наблюдаемой геномной организацией сателлитных повторов. Проекция указанных олигомеров показывают, что все тандемные повторы имеют тенденцию к образованию закрученной соленоидной структуры (рис. 4). Периодичность суперспирального повтора, определяемая как длина суперспирального витка (п.н./виток) составляет от 600 п.н./виток для РТ11 до 1000 п.н./виток для РТ3. Более низкое значение периодичности (высокая степень суперспиральности) в 12-мерах РТ11, СL5, СI4 и СS1 коррелирует с характером изгиба в мономерной единице (рис.2). Таким образом можно констатировать, что теоретические предположения о суперспиральной структуре повторов *Citrus* и *Poncirus* хорошо соответствуют электронномикроскопическим наблюдениям. Более того, контуры РТ11, СS, СL и СI тандемов показывают сходную правую суперспиральность, подтверждая их эволюционное родство, в то время как эволюционно дивергированные повторы РТ2 и РТ3 образуют левый соленоид с более длинным суперспиральным витком (рис. 4).

Степень закрученности спирали может явиться важной структурной характеристикой сателлитного повтора. Секвенирование разных членов семейства сателлитных повторов часто обнаруживает значительную степень гетерогенности. Компьютерный анализ может помочь определить какие мутации влияют на третичную структуру ДНК, которая возможно играет важную роль при сворачивании хроматина [112], а какие мутации являются нейтральными и, вследствие этого, простым мутационным шумом. Изгиб в мономере означает, что длинные цепи сателлитной ДНК способны образовать специфическую третичную структуру – закрученную двойную спираль (СДН-форму) [68]. Возможно третичная структура сателлитной ДНК и наличие связывающих их специфических белков тесно взаимосвязаны [50, 113]. Эти белки могут фиксировать разные области сателлитных ДНК, способствуя образованию компактной третичной структуры, что со своей стороны может способствовать образованию компактного состояния конститутивного гетерохроматина.

ИЗГИБЫ ДНК И ЭВОЛЮЦИЯ ПОВТОРОВ

В геномах растений наблюдается строгая тенденция к гомогенности повторов [4, 17]. Одинаковые типы повторов часто встречаются в разных хромосомах. Механизм гомогенности повторов пока еще полностью не ясен. В других организмах, включая животных, такой интенсивной интерлокусной гомогенности, по-видимому, не происходит. В *Poncirus* было обнаружено два типа сателлитов: первый (представленный клоном РТ3), является уникальным для *Poncirus* и

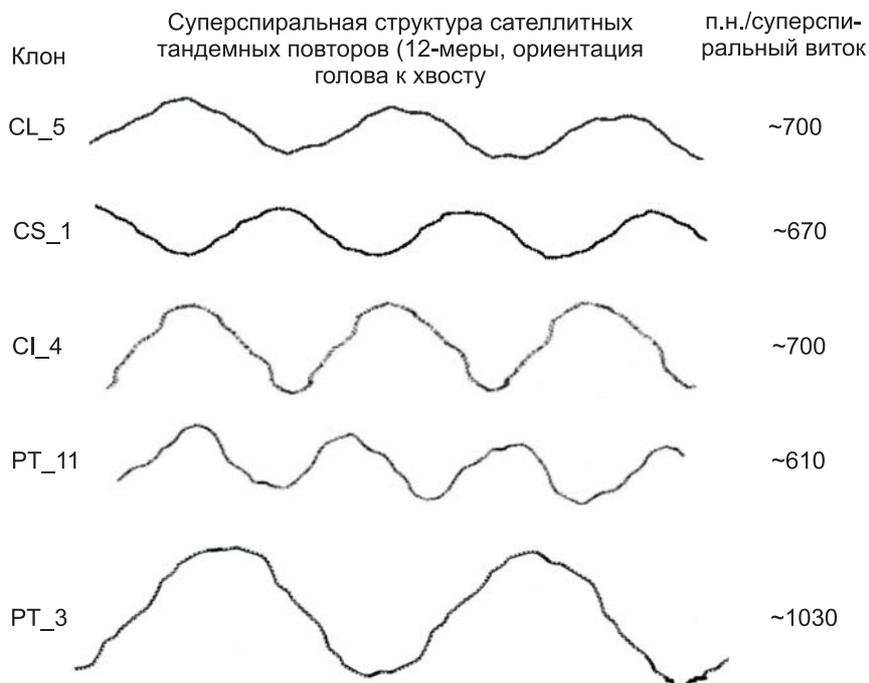


Рис. 4. Профили изгибов олигомеров сателлитных ДНК цитрусовых, содержащих 12 тандемно расположенных повторов [52].

образует четко отделенную ветвь в эволюционном древе (см. рис. 2), второй тип, представленный клоном PT11, не является видоспецифичным. Возможно эти сателлиты избежали процесса, приводящего к гомогенности, хотя и могут представлять разные хромосомные домены. Было показано, что дивергенция последовательности между обеими сателлитными группами сопровождается драматическими изменениями в структурных свойствах сателлитных ДНК, что находит отражение в изгибах ДНК. Поиск центров локальных изгибов показал, что в то время как некоторые А-блоки сохраняют свои позиции, число и расстояние между другими А-мотивами значительно изменяются. Это может свидетельствовать о том, что сравнительно простая перетасовка А-блоков и увеличение/уменьшение их числа может привести к существенным изменениям формы молекул с относительно гомогенной последовательностью, в особенности если они представлены длинными тандемами. Понятно, что изменения в трехмерной структуре хроматина, определяемой углом между индивидуальными нуклеосомами, могут влиять на взаимодействие белков

[112]. Эти новые варианты могут быть или зафиксированы (приводя к образованию видоспецифичных рестрикционных сателлитов) или утрачены в результате рекомбинационных процессов. Таким образом будет сохраняться баланс между разнообразием и гомогенностью гетерохроматина.

VIII. ЦЕНТРОМЕРЫ И САТЕЛЛИТНЫЕ ДНК

Центромеры представляют собой очень сложную специализированную структуру хромосом. Цитологически они обнаруживаются в виде первичной перетяжки в метафазных хромосомах и участвуют в точном распределении хроматид в митозе и мейозе. Центромеры выполняют ряд функций: сцепление сестринских хроматид перед анафазой, предотвращение начала анафазы при отсутствии точного биполярного прикрепления веретена, связывание хромосом с аппаратом веретена и содействие движению хромосом. У большинства многоклеточных эукариот микротрубочки аппарата веретена не взаимодействуют непосредственно с ДНК/хроматином центромерной области, а контактируют с белковой структурой, именуемой кинетохором, который со своей стороны тесно ассоциирован с центромерным хроматином. Иногда термин центромера используется для обозначения ассоциации центромерной ДНК (CEN ДНК) со связывающими ее белками (хроматин) и кинетохором. Интенсивные исследования по выяснению строения и функций этих структур отражены во многих статьях и обзорах [51, 114–127].

СТРУКТУРНАЯ ВАРИАбельНОСТЬ ЦЕНТРОМЕР

К настоящему времени интерес исследователей сфокусирован на хромосомах многоклеточных эукариот с так называемыми локализованными центромерами. Следует однако отметить, что другие организмы показывают значительную вариабельность структуры центромер. К примеру, у некоторых простейших и *S. cerevisiae* микротрубочки не вставлены в сложный аппарат кинетохора [117, 128]. В голоцентричных хромосомах, обнаруживаемых у хорошо изученных *Caenorhabditis elegans* и других организмах (например, некоторых членистоногих), (голо)-кинетохор расположен вдоль всей или значительной части хромосом. Полицентрические хромосомы характеризуются многочисленными кинетохорами, которые распределены вдоль хромосомы, например, у некоторых покрытосеменных (*Luzula*, *Cyperus*) и членистоногих. Организация митотических и мейотических центромер/кинетохор может быть разной даже у одного и того же организма [128, 129]. В отличие от них, локализованные центромеры имеют одну область, которая образует перетяжку (первичная перетяжка) по отношению к хромосомным плечам. Имеется два класса

локализованных центромер — точечные центромеры и региональные. Точечные центромеры упакованы в малые, компактные локусы и обнаруживаются у некоторых одноклеточных эукариот, таких как *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces uvarum*, *Kluveromyces lactii*, *Candida maltosa*, *Candida glabrata* и *Yarrowia lipolytica* [117, 121]. Наиболее хорошо изучена функциональная центромера *S. cerevisiae*, которая охватывает только 125 п.н. и содержит три консервативных элемента ДНК — CDEI, CDII и CDEIII, третий из которых (длиной 25 п.н.) абсолютно необходим для функционирования центромеры. Эти элементы связывают разные белковые факторы, Cbf1p, Cse4p и CBF3, которые, со своей стороны, контактируют с другими белками и микротельцами [121, 130]. Такая простая структура точечных центромер, по-видимому, является результатом эволюции, так как другие грибы содержат большие региональные центромеры [127]. Вместе с тем, обнаруживается эволюционная консервативность на разном уровне. Некоторые белки центромер *S. cerevisiae* проявляют сходство с белками кинетохор других эукариот. Например, Cse4p представляет собой гистон H3-подобную молекулу, которая связывается с CDEII. Анализ человеческого центромерного полипептида CENP-A показывает, что этот белок также произошел от гистона H3. Другой пример — это ограниченная гомология центромерного белка дрожжей Mif2p с человеческим центромерным белком CENP-C и белком HCP-4 *C. elegans* [121, 130, 131].

Региональные центромеры имеют более сложное строение ДНК. Их размер варьирует от 40 т.п.н. до нескольких мегабайтов. Большинство этих ДНК представлено повторяющимися элементами. Центромера *S. pombe* содержит разные повторяющиеся последовательности в виде длинных обращенных повторов, которые фланкируют 4–7 т.п.н. уникальную центральную область [121]. Центромерные последовательности разных хромосом *S. pombe* умеренно консервативны. Центромерные ДНК *S. cerevisiae* и *S. pombe* довольно сильно различаются по строению. Необходимо заметить, что структура центромеры *S. pombe* сходна с центромерами некоторых других эукариот. У *Drosophila* размер минимальной функциональной центромеры составляет 420 т.п.н. Эту центромеру можно идентифицировать в экспериментах с использованием производных минихромосомы Dr1187, полученных облучением. Они содержат участки многократно повторяющихся тандемно расположенных последовательностей, перемешанных со сложной ДНК, состоящей из уникальных и среднеповторяющихся последовательностей [132–134]. Около 350 т.п.н. этого участка состоит из двух простых повторов. В остальной части перемешаны целый транспозон и новая АТ-богатая последовательность. Центромерный транспозон обнаруживает значительную консервативность по сравнению с участками вне центромер

[134]. Центромеры животных расположены около или внутри длинной повторяющейся ДНК, которые охватывают участок длиной от 500 т.п.н. до нескольких мегаоснований [120, 124, 135, 136]. У приматов основная часть этих центромер представлена тандемной АТ-богатой повторяющейся последовательностью длиной 171 п.н., именуемой альфоидной ДНК. Иногда встречаются другие элементы типа Alu или ретротранспозонных элементов L1 (например, центромеры человека; [124, 136]). Бросается в глаза, что за исключением *Drosophila*, длина сателлитного повтора довольно близка у разных организмов, включая растения, и соответствует нуклеосомной длине.

Наши знания относительно центромер многоклеточных эукариот довольно ограничены. Однако некоторые публикации, появившиеся за последние годы, значительно улучшили понимание структуры и функции центромер. Сделано несколько важных наблюдений, касающихся центромер дрожжей, животных и человека. Хотя структурный анализ этих центромер не закончен, имеются значительные сомнения в существовании какой-то еще не обнаруженной «магической последовательности», способной быть «ядром» сворачивания большой области в функциональную центромеру [120, 127]. Этот взгляд поддерживается рядом исследований о наличии нецентромер. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии какой-то определенной последовательности ДНК и подтверждают точку зрения, согласно которой центромеры являются эпигенетической конструкцией ДНК-белкового комплекса, т.е. изменяющейся структурой, которая наследуется без соответствующего изменения последовательности ДНК [120, 124, 126, 127, 137].

Другие интересные исследования касаются состава центромерных последовательностей. Несмотря на дивергенцию последовательностей, региональные центромеры дрожжей и животных имеют сходную «архитектуру». Центральная центромерная область состоит из нескольких однообразных сателлитных мотивов, фланкированных перицентромерными участками более сложной ДНК, включая разные повторяющиеся элементы, которые отличаются от основного сателлитного повтора. Эти фланкирующие участки всегда образуют гетерохроматин. Возможно гетерохроматиновые перицентромеры представляют собой границу, которая отделяет гетерохроматиновый центромерный кор от эукариотических хромосомных плеч.

Ряд исследований подтверждает, что упомянутые структурные домены одновременно являются и функциональными доменами. Не вызывает сомнений тот факт, что внутренняя область центромерного кора является областью связывания кинетохор. Однако эта область недостаточна для образования всей функционирующей центромеры. Возможно перицентромеры имеют важное значение для сцепления

сестринских хроматид или сестринских центромер. Следует заметить, что область перицентромерного гетерохроматина является поздно реплицирующейся. Ее репликации предшествует репликация центромерного кора, которой, в свою очередь, предшествует репликация эухроматиновых областей.

По содержанию белков эти области четко различаются по ассоциации и/или модификации специфических белков. Наиболее заметна разница между эухроматином и центромерным гетерохроматином, которая заключается в наличии варианта гистона H3 (CENP-A) в перицентромерной области, замещающего обычный H3 гистон в нуклеосомах. Обнаруженный поначалу в человеческих клетках [138] гомолог H3 гистона позднее был найден в таких разных организмах, как дрожжи, *C. elegans* и *Drosophila* [127, 129, 131]. Эти центромерные H3 гистоны соответствуют нецентромерному H3 гистону своим C-концевым доменом, однако NH₂-концевые домены у них различны.

В моделях, объясняющих хроматин-зависимое эпигенетическое воспроизводство идентичности центромер, CENP-A и их гомологи играют существенную роль. При образовании новых центромерных нуклеосом «нормальные» H3-содержащие нуклеосомы должны исчезнуть, чтобы избежать постепенную потерю идентичности центромер. Это может быть достигнуто образованием новых центромерных нуклеосом при помощи старых («модель узнавания») [127]. Медиаторами этого процесса могут служить CENP-A гистон и специфические хроматиновые факторы. Альтернативным (или дополнительным) вариантом к этому процессу может быть доступность центромерных гистонов только в ограниченное время и в ограниченном ядерном участке в течение клеточного цикла. Предполагается, что поздно реплицирующийся (пери-) центромерный гетерохроматин осуществляет этот процесс при помощи пространственного исключения нецентромерного H3 гистона из этих доменов с одновременным накоплением центромерного H3 гистона в то же время или в течение поздней репликационной стадии («секвестровая модель») [127, 131]. При помощи этой модели можно объяснить образование нецентромер, что подчеркивает важную роль гетерохроматина для точного функционирования центромер [120, 127, 131, 139].

Рассмотрение накопившихся генетических, цитологических и молекулярных данных подтверждает, что региональные центромеры растений могут иметь сходную с животными центромерами структурную и функциональную организацию [51].

КОМПОНЕНТЫ ДНК ЦЕНТРОМЕР РАСТЕНИЙ

Многokrратно повторяющиеся центромерные последовательности, локализованные в гетерохроматине детально исследованы как

у однодольных, так и двудольных растений [140–153]. Обнаружены последовательности с разной степенью повторяемости в перицентромерах растений. Arabidopsis Genome Initiative [151] приводит последовательности этих участков у *Arabidopsis*. Следует отметить, что перицентромерная ДНК включает в себя некоторые активные гены 5S РНК, митохондриальные последовательности, прямые повторы и повторы, сходные с теломерными [154–163]. Присутствие теломерных последовательностей в центромерах показывает, что центромеры иногда могут образовываться Робертсоновскими слияниями теломер [164–166]. Или же теломерные последовательности могут внедряться в центромерные элементы, как это обсуждалось для *Arabidopsis* [142, 154].

У кукурузы проанализированы центромерные последовательности обеих хромосом – А и В. Хромосома А является нормальной хромосомой, которая содержит генетическую информацию. Хромосома В является добавочной, часто гетерохроматиновой вдобавок к нормальному кариотипу и широко распространена среди растений и животных. Ее отсутствие почти не оказывает влияния на фенотип организма [167]. Хромосома В кукурузы содержит элемент размером 9 млн.п.н., который состоит из тандемов 1,4 т.п.н. последовательностей и включает в себя функциональную центромеру [143, 168]. Повтор хромосомы В кукурузы имеет значительную гомологию с другим повторяющимся элементом – knob-последовательностью кукурузы длиной 185 п.н., являющейся основным элементом knob-гетерохроматина [140, 143]. Повторы В не встречаются в центромере хромосомы А, которая содержит другие повторы общим размером в млн.п.н. Один центрический элемент хромосомы А представляет собой повтор длиной 745 п.н. (Sau3A9 повтор), который обнаруживается и у других однодольных [144, 147].

Центромерный кор и фланкирующие области двудольных, например, томатов, содержат длинные цепи разных повторяющихся элементов [169]. Такая же картина наблюдается и у *Arabidopsis thaliana*, где они состоят из 180 п.н. повторов и родственных производных (pAL1 повторы) [141, 142, 154, 170–172]. С помощью FISH этот элемент был обнаружен во всех пяти центромерах *Arabidopsis* (149, 152, 163, 173). В центромере обнаруживается также один ранее клонированный элемент (106 В), который представляет собой сильно измененную копию ретроэлемента *Athila* [145, 146, 156]. Размер этих центромерных коровых доменов колеблется в пределах 1,1–2,9 млн.п.н. [163, 170]. С использованием той же техники можно показать, что с центромерами *Arabidopsis* ассоциированы многие другие повторяющиеся элементы разной длины, отличающиеся от коровой последовательности. Эти перицентромерные области составляют

около 1 млн.п.н. с обеих сторон центромерного кора и являются гетерохроматиновыми, также как и большая часть самого кора (за исключением кинетохорной области) [152, 163]. Повторяющаяся природа центромеры характерна также для однодольных растений [153, 173, 174]. В связи с этим следует заметить, что центромерная ДНК растений не всегда состоит из длинных тандемов повторяющихся элементов. Тандемные повторы не обнаружены и в центромере *Vicia faba* [177]. Центромерная ДНК *Tradescantia* состоит из дисперсных повторов [176]. Это возможно указывает, что возникновение центромер некоторых растений, подобно центромерам дрожжей, отличается от образования региональных центромер.

Следует отметить, что региональные центромеры дрожжей, *Drosophila* и человека имеют консервативный характер организации [178]. Очевидно, такая же архитектура характерна и для растений [51].

ЭВОЛЮЦИЯ ЦЕНТРОМЕР РАСТЕНИЙ

Центромерные последовательности растений, дрожжей и животных претерпели быстрые эволюционные изменения [124, 179]. Это напоминает быструю эволюцию других повторяющихся элементов растений [41]. Кукуруза представляет собой пример, когда центромеры разных хромосом в пределах одного вида содержат разные повторы. Так, повторы В хромосомы не обнаруживаются в центромерах А хромосом. Тем не менее, кукуруза, наряду с другими однодольными, обнаруживает консерватизм на уровне ДНК. Недавно последовательности центромеры хромосомы А были обнаружены в центромерах хромосомы В и knob-гетерохроматиновых областях [180]. В предыдущей работе было показано, что, по крайней мере, один центрический элемент хромосомы А (Sau3A9 элемент размером 745 п.н.), клонированный из геномной библиотеки сорго, обнаруживает значительный консерватизм среди таких различных злаков, как кукуруза, рис, пшеница, ячмень, рожь и овес. Это доказывалось флуоресцентной *in situ* гибридизацией и гибридизацией по Саузерну [144]. Было также обнаружено наличие гомолога Sau3A9-повтора (элемент CSS1 размером 250 п.н.) у *Brachipodum*. При помощи FISH было показано, что он локализован также (в виде более или менее идентичных копий) в центромерах других однодольных растений [147]. Интересно отметить, что эта последовательность, имеющая сходство с животным консенсусом CENP-В бокса, обнаруживается в 180 п.н. knob-повторе [122]. CENP-В является центромеросвязывающим белком, который содержит домен спираль—виток—спираль [181].

Вместе с тем выявляется, что центромерные повторы растений быстро эволюционируют. 180 п.н.-ый элемент *Arabidopsis thaliana* не консервативен даже у близкородственных видов. Например, центро-

меры *Arabidopsis arenosa* содержат повторы (pAa214) с очень слабой гомологией к рAL1 повтору, в то время, как другие виды *Arabidopsis* (*A. wallichii*, *A. pumila* и *A. griffithiana*) не обнаруживают какой-либо гомологии при проведении FISH-анализа [182, 183]. В результате у *A. sueica*, который, по-видимому, является гибридом *A. thaliana* × *A. arenosa*, оба повтора присутствуют раздельно в соответствующих хромосомах.

Обнаружение существенных изменений в центромерной ДНК нецентромер доказывает, что наличие одной центромерной ДНК не всегда является достаточным и, более того, не всегда необходимым для создания центромеры. Нецентромеры — это локусы, временами выполняющие центромерные функции, хотя они не всегда обнаруживают все свойства нормальных центромер и которые раз возникнув, могут передаваться при клеточных делениях. Они обнаружены у человека, животных, *Drosophila*, а также растений [120, 122, 124, 184–187].

Хорошо изучена нецентромера кукурузы с аномальной хромосомой 10 [140, 187, 188]. У большинства линий кукурузы хромосомы показывают нормальное поведение и в анафазе knob-гетерохроматин расположен за нормальной центромерой. У линии с хромосомой Ab10 knob-гетерохроматин становится нецентромерным и обнаруживается впереди истинного центромера. Вместе тем наблюдается мейотический драйв в отношении knob-гетерохроматина и связанных с ним локусов. Эта система позволила выделить, по крайней мере, один супрессор образования нецентромеры, Smd1, который возможно кодирует главный продукт, участвующий в образовании (нео)центромеры или его сохранении [187, 189].

ЦЕНТРОМЕРНЫЙ ГЕТЕРОХРОМАТИН И КИНЕТОХОП

Большая часть наших знаний о центромерных белках получена на основе исследований систем человека, животных и дрожжей. В последние годы наблюдается значительный прогресс в изучении центромерных белков растений.

Как известно, центромерные области эукариот способствуют образованию гетерохроматина, что обычно сопровождается потерей генной активности и способности к рекомбинации. У *Arabidopsis* в результате этого эффекта левая (пери-) центромера 1 разрезается и обнаруживается на стыке эу- и гетерохроматиновой границы в виде нескольких т.п.н. [163]. Недавние работы показали поразительное сходство растительных и животных центромер на белковом уровне. Так, фосфорилирование гистона H3 (у серина-10) во время митоза имеет место у животных, некоторых растений и *Tetrahymena* [190–192]. Это однако, не исключает некоторых различий в тонких механизмах этого процесса. В частности, у растений фосфорилирование гистона

H3 начинается внутри перицентромерной области, в то время как у животных — в позднепликатирующей центромере [192]. Другое заметное сходство между животными и растениями — это т.н. центромерный гистон H3 [138, 193–196]. Недавно был идентифицирован растительный гомолог (HTR12) и было показано его присутствие в центромерах *Arabidopsis* методом иммулокализации [197]. Следует отметить, что консерватизм этого компонента доказывается его присутствием в точечных центромерах *S. cerevisiae* и голоцентромере *C. elegans*. Было бы интересно узнать, является ли метилирование гистона H3 (в лизине-9 вместо лизина-4) на границе с гетерохроматином таким же характерным признаком для растений, как и наблюдаемое при делении дрожжей [198]. Следует ожидать также наличия у растений неких специфических компонентов. Одним из них является SWITCH1-белок, который поддерживает сцепление сестринских хроматид у *Arabidopsis* и не обнаруживает гомологии ни с одним из известных в настоящее время белков [199]. Другой пример касается белка PH1 кукурузы, который необходим для специфической ассоциации гомологичных центромер. Следует выяснить является ли он лишь специфическим растительным «изобретением» [200].

Кинетохор дрожжей и животных является чрезвычайно сложной центральной центромерной белковой структурой, необходимой для точного разделения, движения и распределения хромосом [123, 130]. Кинетохоры животных клеток триламнарны и состоят из разных слоев, содержащих белки с разными функциями [117, 119, 123, 201]. Самый дальний от центра слой или волокнистая корона содержит, по-видимому, моторные белки. За ним следует внешняя пластинка, которая взаимодействует с микротельцами. Следующий слой или интерзона содержит белки, которым приписывают сигнальные функции клеточного цикла. Лежащий глубоко внутри слой кинетохора — внутренняя пластинка — содержит белок типа CENP-C и центромерную ДНК, входя, таким образом в тесный контакт с центромерным гетерохроматином, который со своей стороны содержит большую часть CEN-ДНК и белки типа CENP-B, INCENP и др.

Кинетохоры растений отличаются по ультраструктуре: они не организованы в виде слоев, а имеют глобулярную структуру, что придает кинетохору форму мяча, вставленного в хроматиновую чашу (модель «мяч и чаша» [128, 202, 203]). Однако эта модель кинетохора растений на основе данных иммунофлуоресцентного анализа была недавно поставлена под сомнение [204, 205].

Консерватизм кинетохорного комплекса животных и растений была отмечена в экспериментах по иммулокализации путем кросс-реакции белков центромер растений с антисывороткой людей, больных CREST (кальциноз, феномен Raynaud, склеродактилия,

телангиэктазия) или с моноклональными антителами, образуемыми против животных белков [203]. CREST является аутоиммунным заболеванием, которое ведет к образованию антикинетохорных антител. Как показано для ряда растений (*Haemanthus*, *Tradescantia*, кукуруза, *Vicia faba*) некоторые сыворотки CREST не вступают в реакцию с компонентами кинетохор растений [122, 202, 203, 207–210]. Эти исследования недавно были расширены за счет исследования антител, выработанных против синтетических пептидов, полученных из гомологов белков кинетохор растений [211]. Кинетохор однодольного растения *Haemanthus katherinae* был детально проанализирован сывороткой ЕК CREST [202, 206]. Кроме доказательства консервативности кинетохор животных и растений удалось показать, что кинетохоры этих организмов, цитологически различных, построены путем соединения сходных функциональных модулей [202]. В этой модели структура CEN–ДНК, состоящая из тандемных повторов, определяет организацию кинетохора. Каждый повтор (или несколько комбинированных повторов) является функциональной единицей, способной к взаимодействию с соответствующими белковыми комплектами. Таким образом, кинетохор собран путем конденсации повторяющихся функционально идентичных субъединиц, расположенных вдоль повторяющейся нити ДНК. По существу, кинетохоры как растений, так и животных состоят из ряда независимых модулей. Минимальный размер модуля – одна нуклеосома (примером может служить почкующийся кинетохор дрожжей) [193].

Некоторые антигены меняют свое положение в процессе клеточного цикла, например антиген С6С меняет позицию от ядерной оболочки в профазе к кинетохору в мета- и анафазе [209]. Известно, что ряд других белков животных также меняют свое местоположение. Это подтверждает гипотезу, согласно которой кинетохоры участвуют в процессе нуклеации микротрубочек и/или захвате уже сформированных микротрубочек [117, 119, 123].

Кроме элементов, которые были обнаружены при помощи кросс-реакций с сывороткой, комбинированными молекулярными, геномными и биоинформативными методами были идентифицированы дискретные компоненты кинетохор растений и ассоциированные с ним белки. Функции некоторых из них (СВФ5, CENP-F, SKP1, мейотический гистон) все еще неясны и находятся в процессе изучения [211–213]. Требуется доказать наличие в кинетохоре *Arabidopsis* гомолога ZW10 белка дрозофилы [214]. Предполагается, что на ZW10 оказывает влияние натяжение клеточного центра и вследствие этого, он может служить показателем перехода от метафазы к анафазе. Этот белок двигается от кинетохора/центромеры в прометафазе к микротрубочкам кинетохора в метафазе и обратно к центромеру/кинетото-

хору в анафазе. Предполагается также, что у кукурузы функцию ориентира веретена выполняют антиген 3F3/2 и белок MAD2 [203–204]. Кинетохор обогащен белком MAD2 до связывания микротрубочек и веретено становится способным к натяжению в процессе созревания. Антиген CENP-E идентифицирован в *Vicia faba* и *Hordeum vulgare* как двигательный белок [211]. В то же время, обнаружение γ -тубулина в кинетохорной области *Vicia faba* свидетельствует о консерватизме и, одновременно, о наличии специфических для растений свойств [208]. С одной стороны, γ -тубулин является вариантом тубулина, обнаруживаемого у животных и образующего ядро зависимых от клеточного цикла микротрубочек, с другой стороны, у животных этот белок обычно является компонентом centrosомных органелл, организующих веретено [216]. Однако у покрытосеменных эти органеллы отсутствуют и вместо них имеются т.н. микротрубочкоорганизующие центры (МТОС). Это означает, что кинетохор представляет собой один такой МТОС. Наконец, один из хорошо изученных кинетохорных белков CENP-C обнаружен у ряда растений [205, 211]. Расположение CENP-C по отношению к MAD2, 3F3/2 антигену, а также к связанным микротрубочкам по данным иммунофлуоресцентного анализа свидетельствует о слоистой организации кинетохора растений [187, 203, 204], обнаруживая тем самым структурное сходство с центромерами животных.

БАЗОВАЯ МОДЕЛЬ РЕГИОНАЛЬНОЙ ЦЕНТРОМЕРЫ

Центромеры животных, дрожжей и растений обнаруживают сходную организацию региональных центромер (рис. 5).

На рис. 5 показано:

Saccharomyces cerevisiae: длина центромерной ДНК 125 п.н. CDE I (I) поддерживает полную функцию центромер. CDE II (II) является АТ-богатой неконсеровативной областью, необходимой для сцепления сестринских хроматид. Первичная структура CDE III (III) является консервативной и необходима для функционирования центромеры.

Saccharomyces pombe: региональная центромера переменной длины хромосомы *S. pombe*. Негомологичный центральный кор фланкирован разными повторами, некоторые из которых организованы в обращенной ориентации.

Drosophila melanogaster: центромера минихромосомы *Dp 1187*. Необходимый для центромеры участок содержит 420 т.п.н. и состоит из двух разных типов сателлитных ДНК, перемежающихся со всеми или частью копий разных транспозонов. Две области еще не охарактеризованы.

Homo sapiens: Центромерный регион состоит из простых повторяющихся элементов. Основной компонент — α -сателлит, являющийся tandemным повтором АТ-богатой 171 п.н. последовательности длиной в несколько мега п.н.

Архитектура региональной центromеры

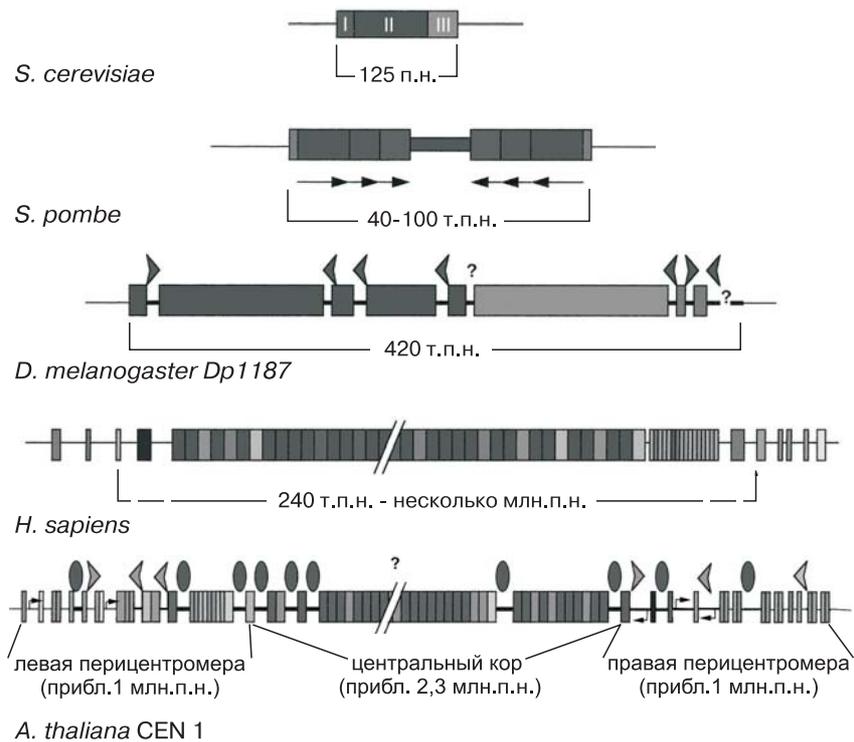


Рис. 5. Схематическая структура центромер разных эукариот.

Хромосома 1 *Arabidopsis thaliana*: центральная область содержит тандемно расположенные повторы длиной 180 п.н., перемежающиеся с копиями ретротранспозонов. Обнаруживается также малое количество другой ДНК (тонкие линии). По направлению к фланкирующим участкам встречаются другие повторяющиеся элементы и более сложная ДНК (толстые линии). С обеих сторон локализованы несколько копий повторяющихся элементов.

Боксы разного оттенка символизируют разные повторяющиеся элементы. Обращенные стрелы обозначают идентичные повторяющиеся элементы в противоположной ориентации (*S. pombe*). Вопросительные знаки обозначают еще несеквенированные или неохарактеризованные области. Транспозоны и ретротранспозоны отмечены соответственно наконечниками и эллипсами (схематическая структура составлена по [114, 120, 121, 134, 163, 171]).

Хотя временами неоцентромеры могут образовываться в хромосомных областях, где отсутствуют блоки повторяющихся ДНК [126], все-таки представляется, что эволюция и эволюционная стабилизация центромер сопровождается накоплением повторяющихся последовательностей. Экспериментально было продемонстрировано, что определенные повторяющиеся ДНК вызывают образование центромер [217]. В естественных центромерах эти блоки могут составлять несколько мегаоснований, однако очевидно, что большая часть этой ДНК не является необходимой для их функционирования [132–134, 218]. С другой стороны, доказано, что наличие минимального размера является необходимым условием точного функционирования центромеры. Перичентромерные и центромерные коровые домены имеют сложный характер расположения разных повторяющихся элементов (рис. 5), которые связаны иногда со специализированными белками, что приводит к образованию гетерохроматина. Эта форма упаковки ДНК все еще остается загадкой, но очевидно, что гетерохроматин не является неактивной формой упаковки белков, по крайней мере, в центромерах. Данное положение подтверждается наличием разных форм гетерохроматина [120, 219]. И ДНК, и гетерохроматин претерпевают такие модификации, что архитектура доменной организации, наблюдаемая на уровне ДНК, замещается хроматиновым уровнем. В результате организация центромерного хроматина консервативна. В качестве примера может служить сравнение центромерного гетерохроматина мухи, человека и растений [220]. Таким образом, перичентромерный гетерохроматин может поддерживать разные функции, такие как сцепление сестринских хроматид и вытеснение нецентромерного гистона H3 из центромерных коровых доменов. Со своей стороны, центромерный кор образует своеобразное «ядро» белков, участвующих в точном распределении хромосом. Как уже отмечалось, центромерные (коровые) последовательности показывают быструю эволюцию и это параллельно коэволюции центромерного гистона H3. Была разработана модель асимметрии женского мейоза, согласно которой хромосомы конкурируют за включение в ядро остающейся в живых яйцеклетки. Эта модель объясняет вышеупомянутую коэволюцию и сдвиг центромер к фланкирующим областям [195].

Быстрая эволюция ДНК, приводящая к образованию неоцентромер вместе с наблюдаемой организацией и структурой гетерохроматина подтверждает, что центромеры растений организованы сходным образом с центромерами животных [120], а их наличие может эпигенетически поддерживаться. Дальнейший анализ центромер растений возможно будет способствовать созданию искусственных растительных хромосом (PLAC) по аналогии с искусственными хромосомами животных (MAC).

IX. ЗАКЛЮЧЕНИЕ – ФУНКЦИИ САТЕЛЛИТНЫХ ДНК

Давно известно и широко обсуждается в литературе то обстоятельство, что количество ДНК в гаплоидном наборе хромосом эукариот значительно превышает количество ДНК, содержащееся в структурных и регуляторных генах [221–223]. Этот парадокс объясняют тем, что эукариоты содержат избыточную ДНК, функциями которой не являются кодирование белков или регуляция экспрессии структурных генов. По мнению этих авторов, избыточная ДНК является ненужной, как бы случайной. Она не влияет на фенотип, и ее единственная функция заключается в выживании внутри генома. В роли этой ДНК, названной «эгоистичной», может выступать ДНК с простой последовательностью, а также умеренно повторяющиеся ДНК. К эгоистичной ДНК относят и часть уникальных ДНК, которые не кодируют какие-либо белки и не участвуют в регуляции экспрессии генетической активности. Эгоистичная ДНК не вносит никакого вклада в определение фенотипа. Она лишь несколько отягощает в энергетическом отношении клетку, в которой она содержится. Появление эгоистичной ДНК в геноме сравнивают с распространением не особенно вредного паразита внутри хозяина. В то же время предполагается, что иногда клетка использует некоторую часть эгоистичной ДНК. Одна из возможных областей применения – это контрольные механизмы генной активности.

По мнению авторов гипотезы, амплификация или делеция эгоистичной ДНК может происходить путем неравного кроссинговера в мейозе или митозе. Процессы образования и элиминации последовательностей эгоистичной ДНК должны быть сбалансированными, хотя ситуация может постоянно меняться. Вышеуказанной гипотезе более двадцати лет, однако до сих пор нельзя четко сказать, является ли сателлитная ДНК действительно ненужной (junk DNA – мусор) или же обладает какими-либо биологическими функциями.

Наличие сателлитных ДНК почти у всех эукариот (если не у всех) может служить аргументом в пользу существования у них какой-либо общей функции, но точных доказательств этому почти нет. В то же время появились работы, которые приписывают сателлитным ДНК ряд функций. Например, считается, что они необходимы для образования центромера. Высказано предположение, что сателлитные ДНК Y-хромосомы обеспечивают хранение белков семенников у *Drosophila* [224]. Обнаружена рибозимная активность сателлитной ДНК рDo500 у сверчка *Dolichopoda* [225]. Недавно Ксинк и Хеникофф предложили более общую модель функционирования сателлитных ДНК [186]. По их наблюдениям, определенные белки в интерфазе связываются с эухроматическими участками, а в метафазе – с сателлитными ДНК. Согласно этой модели сателлитные кластеры ДНК, связываясь с этими белками, обеспечивают стабилизацию митоти-

ческого процесса. Хотя эта модель и кажется привлекательной, мы все еще далеки от понимания биологических функций этих молекул. Более того, все еще нельзя считать доказанным существование таких функций вообще.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Heslop-Harrison, J.S., Bennett, M.D.* (1990) *Trends in Genetics*, **6**, 401–405.
2. *Lichter, P.* (1997) *Trends in Genetics*, **13**, 475–479.
3. *Nagl, W.* The Cell Nucleus, and Cell Cycles (in German). (1976) Ulmer Publ., Stuttgart (Germany).
4. *Schmidt, T., Heslop-Harrison, J.S.* (1998) *Trends Plant Sci.*, **3**, 195–199.
5. *Blackburn, E.H.* (1991) *Nature*, **350**, 569–573.
6. *Biessmann, H., Mason, J.M.* (1994) *Chromosoma*, **103**, 154–161.
7. *Kilian, A., Stiff, C., Kleinhofs, A.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 9555–9559.
8. *Riha, K., Fajkus, J., Siroky, J., Vyskot, B.* (1998) *Plant Cell*, **10**, 1691–1698.
9. *Shippen, D.E., McKnight, T.D.* (1998) *Trends Plant Sci.*, **3**, 126–130.
10. *Beridze, T.* Satellite DNA. (1986) Springer Verlag. Berlin, Heidelberg.
11. *Bostock, C.* (1986) *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B*, **312**, 261–273.
12. *Kit, S.* (1961) *J. Mol. Biol.*, **7**, 711–716.
13. *Sueoka, N., Cheng, T.* (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **48**, 1851–1856.
14. *Ganal M., Hemleben V.* (1988) *Theor. Appl. Genet.*, **75**, 357–361.
15. *Schweizer, G., Ninnemann, H., Hemleben, V.* (1988) *Theor. Appl. Genet.*, **75**, 679–684.
16. *Schweizer, G., Borisjuk, N., Borisjuk, L., Stadler, M., Stelzer, T., Schilderentschler, L., Hemleben, V.* (1993) *Theor. Appl. Genet.*, **85**, 801–808.
17. *King, K., Jobst, J., Hemleben, V.* (1995) *J. Mol. Evol.*, **41**, 996–1005.
18. *Helm, M., Hemleben, V.* (1997) *Euphytica*, **94**, 219–236.
19. *Buntjer, J.B., Lenstra, J.A.* (1998) *Genome*, **41**, 429–434.
20. *Dover, G.A., Tautz, D.* (1996) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **312**, 275–289.
21. *Charlesworth, B., Langley, C.H., Stephan, W.* (1986) *Genetics*, **112**, 947–962.
22. *Stephan, W., Cho, S.* (1994) *Genetics*, **136**, 333–341.
23. *Heikkinen, E., Launonen, V., Müller, E., Bachmann, L.* (1995) *J. Mol. Evol.*, **41**, 604–614.
24. *Bachmann, L., Venanzetti, F., Sbordoni, V.* (1994) *J. Mol. Evol.*, **39**, 274–281.
25. *Bachmann, L., Venanzetti, F., Sbordoni, V.* (1996) *J. Mol. Evol.*, **43**, 135–144.
26. *Mantovani, B.* (1998) *Mol. Biol. Evol.*, **15**, 1288–1297.
27. *Mantovani, B., Tinti, F., Bachmann, L., Scali, V.* (1997) *Mol. Biol. Evol.*, **14**, 1197–1205.
28. *Badaracco, G., Tubiello, G., Benfante, R., Cotelli, F., Maiorano, D., Landsberger, N.* (1991) *J. Mol. Evol.*, **32**, 31–36.
29. *Meredith, S.E., Unnasch, T.R., Karam, M., Piessens, W.F., Wirth, D.F.* (1989) *Mol. Biochem. Parasitol.*, **36**, 1–10.
30. *Bachmann, L., Sperlich, D.* (1993) *Mol. Biol. Evol.*, **10**, 647–659.
31. *Dimitri, P., Junakovic, N.* (1999) *Trends Genet.*, **15**, 123–124.
32. *Kapitonov, V.V., Holmquist, G.H., Jurka, J.* (1998) *Mol. Biol. Evol.*, **15**, 611–612.
33. *Kipling, D., Warburton, P.E.* (1997) *Trends Genet.*, **13**, 611–612.
34. *Smith, A.F., Riggs, A.D.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 1443–1448.
35. *Agudo, M., Losada, A., Abad, J.P., Pimpinelli, S., Ripoll, P., Villasante, A.* (1999) *Nucleic Acids Res.*, **27**, 3318–3324.

36. Miller, W.J., Nagel, A., Bachmann, J., Bachmann, L. (2000) *Mol. Biol. Evol.*, **17**, 1597–1609.
37. Salsler, W., Bowen, S., Browne, D., el-Adli, F., Fedoroff, N., Fry, K., Heindell, H., Paddock, G., Poon, R., Wallace, B., Whitcome, P. (1976) *Fed. Proc.*, **35**, 23–35.
38. Macas, J., Meszaros, T., Nouzova, M. (2002) *Bioinformatics*, **18**, 28–35.
39. Flavell, R. (1986) *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B.*, **312**, 227–242.
40. Lapitan, N.L.V. (1992) *Genome*, **35**, 171–181.
41. Hemleben, V., Zentgraf, U., King, K., Borisjuk, N., Schweizer, G. (1992) *Advances Mol. Gen.*, **5**, 157–170. Hüthig Verlag, Heidelberg.
42. Hemleben, V. (1993) *Current Topics Mol. Genet.*, **1**, 173–184.
43. Schmidt, T., Heslop-Harrison, J.S. (1996) *Plant Mol. Biol.*, **30**, 1099–1113.
44. Vershinin, A., Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, J.S. (1995) *Plant Cell.*, **7**, 1823–1833.
45. Grebenstein, B., Grebenstein, O., Sauer, O., Hemleben, V. (1996) *Genome*, **39**, 1045–1050.
46. Lima-de-Faria, A. *Molecular Evolution and Organization of the Chromosome*. (1983) Elsevier, Amsterdam.
47. Zhong, X.B., Frasz, P.F., Wennekes-Eden, J., Ramanna, M.S., van-Kammen, A., Zabel, P., Hans-de-Jong, J. (1998) *Plant J.*, **13**, 507–517.
48. Stadler, M., Stelzer, T., Borisjuk, N., Zanke, C., Schilde-Rentschler, L., Hemleben, V. (1995) *Theor. Appl. Genet.*, **91**, 1271–1278.
49. Leber, B., Hemleben, V. (1979) *Nucl. Acids Res.*, **7**, 1263–1281.
50. Fischer, T.C., Groner, S., Zentgraf, U., Hemleben, V. (1994) *Z. Naturforsch.*, **49**, 79–86.
51. Hemleben, V., Torres-Ruiz, R.A., Schmidt, T., Zentgraf, U. In: *Progr. Botany* (Behnke et al., eds.). (2000) **61**, 91–117. Springer Verlag.
52. Fann, J.-Y., Kovarik, A., Hemleben, V., Tsirekidze, N.I., Beridze, T.G. (2001) *Theor. Appl. Genetics*, **103**, 1068–1073.
53. Hemleben, V., Leweke, B., Roth, A., Stadler, I. (1983) *Nucl. Acids Res.*, **10**, 631–644.
54. Ganal, M., Riede, I., Hemleben, V. (1986) *J. Mol. Evol.*, **23**, 23–30.
55. Ganal, M., Hemleben, V. (1986) *Theor. Appl. Genet.*, **73**, 129–135.
56. Timmis, J.N., Ingle, J. (1977) *Biochem. Genet.*, **15**, 1159–1173.
57. Zentgraf, U., King, K., Hemleben, V. (1992) *Acta Bot. Neerl.*, **41**, 397–406.
58. Brennicke, A., Hemleben, V. (1983) *Z. Naturforsch.*, **38c**, 1062–1065.
59. Jeffrey, C. (1980) *Bot. J. Linn. Soc.*, **81**, 233–247.
60. Singh, A.K. In: D.M. Bates, R.W. Robinson & Jeffrey, C. (Eds.), *Biology and Utilization of the Cucurbitaceae*. (1990) P. 10–28. Cornell University Press, Ithaca, London.
61. Leclercq, R.F., Siegel, A. (1987) *Plant Mol. Biol.*, **8**, 497–507.
62. Perl-Treves, R., Zamir, D., Navot, N., Galun, E. (1985) *Theor. Appl. Genet.*, **71**, 430–436.
63. Fann a. Hemleben, in preparation.
64. Schmidt, T., Jung, C., Metzclaff, M. (1991) *Theor. Appl. Genet.*, **82**, 793–799.
65. Ingle, J., Pearson, G.G., Sinclair, J. (1973) *Nature*, **242**, 193–197.
66. Bragvadze, G.P. (1983) *Biokhimia (USSR)*, **48**, 54–61.
67. Bragvadze, G.P., Beridze, T.G. (1983) *Biokhimia (USSR)*, **48**, 673–677.
68. Beridze, T.G., Tsirekidze, N.I., Roitberg, M.A. (1992) *Biochimie*, **74**, 187–194.
69. Beridze, T.G., Tsirekidze, N.I., Turishcheva, M.S. (1994) *FEBS Lett.*, **338**, 179–182.
70. Colot, V., Rossignol, J.L. (1999) *Bioessays*, **21**, 402–411.
71. Jost, J.P., Saluz, H.P. In: *DNA methylation: Molecular biology and biological significance*. (1993) Birkhäuser Verlag, Basel.
72. Li, E., Bestor, T.H., Jaenisch, R. (1992) *Cell*, **69**, 915–926.

73. Finnegan, E.J., Peacock, W.J., Dennis, E.S. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci., **93**, 8449–8454.
74. Guseinov, V.A., Vanyushin, B.F. (1975) Biochim. Biophys. Acta, **395**, 229–238.
75. Gruenbaum, Y., Naveh-Many, T., Cedar, H., Razin, A. (1981) Nature, **292**, 860–862.
76. Selker, E.U., Stevens, J.N. (1987) Mol. Cell Biol., **7**, 1032–1038.
77. Matassi, G., Melis, R., Kuo, K.C., Macaya, G., Gehrke, C.W., Bernardi, G. (1992) Gene, **122**, 239–245.
78. Kovarik, A., Matyasek, R., Leitch, A., Gazdova, B., Fulnecek, J., Bezdek, M. (1997) Gene, **204**, 25–33.
79. Lindroth, A.M., Cao, X., Jackson, J.P., Zilberman, D., McCallum, C.M., Henikoff, S., Jacobsen, S.E. (2001) Science, **292**, 2077–2080.
80. Papa, C.M., Springer, N.M., Muszynski, M.G., Meeley, R., Kaeppler, S.M. (2001) Plant Cell, **13**, 1919–1928.
81. Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, X., Jacobsen, S.E. (2002) Nature, **416**, 556–560.
82. Vongs, A., Kakutani, T., Martienssen, R.A., Richards, E.J. (1993) Science, **260**, 1926–1928.
83. Jeddeloh, J.A., Stokes, T.L., Richards, E.J. (1999) Nat. Genet., **22**, 94–97.
84. Assaad, F.F., Tucker, K.L., Signer, E.R. (1993) Plant Mol. Biol., **22**, 1067–1085.
85. Garrick, D., Fiering, S., Martin, D.I., Whitelaw, E. (1998) Nat. Genet., **18**, 56–59.
86. Matzke, M.A., Matzke, A.J. (1998) Cell Mol. Life Sci., **54**, 94–103.
87. Kovarik, A., Koukalova, B., Lim, K.Y., Matyasek, R., Lichtenstein, C.P., Leitch, A.R., Bezdek, M. (2000) Chromosome Res., **8**, 527–541.
88. Flavell, R.B., O'Dell, M., Thompson, W.F. (1988) J. Mol. Biol., **204**, 523–534.
89. Torres-Ruiz, R.A., Hemleben, V. (1994) Plant Mol. Biol., **26**, 1167–1179.
90. Chen, Z.J., Pikaard, C.S. (1997) Genes Dev., **11**, 2124–2136.
91. Bird, A., Tweedie, S. (1995) Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., **349**, 249–253.
92. Kass, S.U., Pruss, D., Wolffe, A.P. (1997) Trends Genet., **13**, 444–449.
93. Hirochika, H., Okamoto, H., Kakutani, T. (2000) Plant Cell, **12**, 357–369.
94. Banks, J.A., Masson, P., Fedoroff, N. (1988) Genes Dev., **2**, 1364–1380.
95. Maloisel, L., Rossignol, J.L. (1998) Genes Dev., **12**, 1381–1389.
96. Hansen, R.S., Wijmenga, C., Luo, P., Stanek, A.M., Canfield, T.K., Weemaes, C.M., Gartler, S.M. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci., **96**, 14412–14417.
97. Glyn, M.C., Egertova, M., Gazdova, B., Kovarik, A., Bezdek, M., Leitch, A.R. (1997) Chromosoma, **106**, 485–492.
98. Trifonov, E.N. (1985) CRC Crit. Rev. Biochem., **19**, 89–106.
99. Diekmann, S. (1986) FEBS Lett., **195**, 53–56.
100. Marini, J.C., Levene, S.D., Crothers, D.M., Englund, T. (1982) Proc. Nat. Acad. Sci. **79**, 7664–7668.
101. Murphy, M.R., Fowlkes, D.M., Fitzgerald Hayes, M. (1991) Chromosoma, **101**, 189–197.
102. Martinez-Balbas, A., Rodrigues-Campos, A., Garcia-Ramirez, M., Sainz, J., Carrera, P., Aymami, J., Azorin, F. (1990) Biochemistry, **29**, 2342–2348.
103. Matyasek, R., Gazdova, B., Fajkus, J., Bezdek, M. (1997) Chromosoma, **106**, 369–379.
104. Bechert, T., Heck, S., Fleig, U., Diekmann, S., Hegemann, J.H. (1999) Nucl. Acids Res., **27**, 1444–1449.
105. Královics, R., Fajkus, J., Kováčik, A., Bezdek, M. (1995) J. Biomol. Struct. Dyn., **12**, 1103–1119.
106. Beridze, T.G., Turishcheva, M.S., Kokonashvili, G.N., Masiukov, M.V. Abstracts of 14-th International Congress of Biochemistry. (1988) FR136.
107. Benfante, R., Landsberger, N., Tubiello, G., Badaracco, G. (1989) Nucl. Acids Res., **17**, 8273–8282.

108. Plohl, M., Borstnik, B., Ugarkovic, D., Gamulin, V. (1990) *Biochimie*, **72**, 665–670.
109. Ugarkovic, D., Plohl, M., Lucijanec-Justic, V., Borstnik, B. (1992) *Biochimie*, **74**, 1075–1082.
110. Shpiegelman, E.S., Trifonov, E.N., Bolshoy, A. (1993) *CABIOS*, **9**, 435–440.
111. Koo, H.S., Wu, H.M., Crothers, D.M. (1986) *Nature*, **320**, 501–506.
112. Vogt, P. (1990) *Human Genet.*, **84**, 301–336.
113. Levinger, L., Varshavsky, A. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**, 7152–7156.
114. Shaw, D. D. (1994) *Tree*, **9**, 170–175.
115. Miyazaki, W.Y., Orr-Weaver, T.L. (1994) *Ann. Rev. Genet.*, **28**, 167–187.
116. McKim, K.S., Hawley, R.S. (1995) **270**, 1595–1601.
117. Pluta, A.F., Mackay, A.M., Ainsztein, A.M., Goldberg, I.G., Earnshaw, W.C. (1995) *Science*, **270**, 1591–1594.
118. Allshire, R.C. (1997) *Current Opinions in Genetics and Development*, **7**, 264–273.
119. Nicklas, R.B. (1997) *Science*, **275**, 632–637.
120. Karpen, G.H., Allshire, R.C. (1997) *Trends in Genetics*, **13**, 489–496.
121. Clarke, L. (1998) *Current Opinions in Genetics and Development*, **8**, 212–218.
122. Richards, E.J., Dawe, R.K. (1998) *Current Opinion in Plant Biology*, **1**, 130–135.
123. Grancell, A., Sorger, P.K. (1998) *Curr. Biol.*, **8**, R382–R385.
124. Willard, H.F. (1998) *Current Opinion in Genetics and Development*, **8**, 219–225.
125. Pidoux, A.L., Allshire, R.C. (2000) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 308–319.
126. Tyler-Smith, C., Florida, G. (2000) *Cell*, **102**, 5–8.
127. Henikoff, S., Ahmad, K., Malik, H.S. (2001) *Science*, **293**, 1098–1102.
128. Traut, W. *Chromosomen*. (1991) Springer, Heidelberg
129. Pimpinelli, S., Goday, C. (1989) *Trends in Genetics*, **5**, 310–315.
130. Cheeseman, I.M., Drubin, D.G., Barnes, G. (2002) *J. Cell Biol.*, **157**, 199–203.
131. Sullivan, B.A. (2002) *Trends in Biotech.*, **20**, 89–92.
132. Karpen, G.H., Spradling, A.C. (1992) *Genetics*, **132**, 737–753.
133. Murphy, T.D., Karpen, G.H. (1995) *Cell*, **82**, 599–609.
134. Sun, X., Wahlstrom, J., Karpen, G.H. (1997) *Cell*, **91**, 1007–1019.
135. Rosenfeld, M.A. (1997) *Nature Genet.*, **15**, 333–335.
136. Schueler, M.G., Higgins, A.W., Rudd, M.K., Gustashaw, K., Willard, H.F. (2001) *Science*, **294**, 109–115.
137. Tyler-Smith, C., Corish, P., Burns, E. (1998) *Chromosome Res.*, **6**, 65–67.
138. Palmer, D.K., OrDay, K., Trong, H.L., Charbonneau, H., Margolis, R.L. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 3734–3748.
139. Sullivan, K.F. (2001) *Curr. Opinion Genet. Dev.*, **11**, 182–188.
140. Peacock, W.J., Dennis, E.S., Rhoades, M.M., Pryor, A.J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**, 4490–4494.
141. Martinez-Zapater, J., Estelle, M.A., Somerville, C.R. (1986) *Mol. Gen. Genet.*, **204**, 417–423.
142. Simoens, C.R., Gielen, J., Van Montagu, M., Inzé, D. (1988) *Nucleic Acids Res.*, **16**, 6753–6766.
143. Alfenito, M.R., Birchler, J.A. (1993) *Genetics*, **135**, 589–597.
144. Jiang, J., Nasuda, S., Dong, F., Scherrer, C.W., Woo, S.-S., Wing, R.A., Gill, B., Ward, D.C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 14210–14213.
145. Thompson, H.L., Schmidt, R., Dean, C. (1996) *Plant Mol. Biol.*, **32**, 553–557.
146. Thompson, H.L., Schmidt, R., Dean, C. (1996) *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3017–3022.
147. Aragon-Alcaide, L., Miller, T., Schwarzacher, T., Reader, S., Moore, G. (1996) *Chromosoma*, **105**, 261–268.

148. Miller, J.T., Jackson, S.A., Nasuda, S., Gill, B.S., Wing, R.A., Jiang, J. (1998) *Theor. Appl. Genet.*, **96**, 832–839.
149. Fransz, P., Armstrong, S., Alonso-Blanco, C., Fischer, T.C., Torres Ruiz, R.A., Jones, G. (1998) *The Plant J.*, **13**, 867–876.
150. Copenhaver, G.P., Nickel, K., Kuro-mori, T., Benito, M.I., Kaul, S., Lin, X., Bevan, M., Murphy, G., Harris, B., Parnell, L.D., McCombie, W.R., Martienssen, R.A., Marra, M., Preuss, D. (1999) *Science*, **286**, 2468–2474.
151. *Arabidopsis Genome Initiative* (2000) *Nature*, **408**, 796–815.
152. Fransz, P.F., Armstrong, S., de Jong, J.H., Parnell, L.D., van Drunen, C., Dean, C., Zabel, P., Bisseling, T., Jones, G.H. (1998) *Cell*, **100**, 367–376.
153. Cheng, Z., Buell, C.R., Wing, R.A., Gu, M., Jiang, J. (2001) *Genome Res.*, **11**, 2133–2141.
154. Richards, E.J., Goodman, H.M., Ausubel, F.M. (1991) *Nucleic Acids Res.*, **19**, 3351–3357.
155. Presting, G.G., Frary, A., Pillen, K., Tanksley, S.D. (1996) *Mol. Gen. Genet.*, **251**, 526–531.
156. Pelissier, T., Tutois, S., Tourmente, S., Deragon, J.M., Picard, G. (1996) *Genetica*, **97**, 141–151.
157. Gortner, G., Nenno, M., Weising, K., Zink, D., Nagl, W., Kahl, G. (1998) *Chromosome Res.*, **6**, 97–104.
158. Mayer, K. (1999) *Nature*, **402**, 769–77.
159. Lin, X., *et al.* (1999) *Nature*, **402**, 761–768.
160. Salanoubat, M., *et al.* (2000) *Nature*, **408**, 820–822.
161. Tabata, S., *et al.* (2000) *Nature*, **408**, 823–826.
162. Theologis, A., *et al.* (2000) *Nature*, **408**, 816–820.
163. Haupt, W., Fischer, T.C., Winderl, S., Fransz, P., Torres Ruiz, R.A. (2001) *The Plant J.*, **27**, 285–296.
164. Moore, G., Roberts, M., Aragon-Alcaide, L., Foote, T. (1997) *Chromosoma*, **105**, 321–323.
165. Searle, J.B. (1998) *Genome Res.*, **8**, 1–3.
166. Zhang, P., Friebe, B., Lukaszewski, A.J., Gill, B.S. (2001) *Chromosoma*, **110**, 335–344.
167. Jones, R.N., Rees, H. B *Chromosomes*. (1982) Academic Press, London.
168. Kaszas, E., Birchler, J.A. (1998) *Genetics*, **150**, 1683–1692.
169. Weide, R., Hontelez, J., van Kammen, A., Koornneef, M., Zabel, P. (1998) *Mol. Gen. Genet.*, **259**, 190–197.
170. Murata, M., Ogura, Y., Motoyoshi, F. (1994) *Jpn. J. Genet.*, **69**, 361–370.
171. Round, E.K., Flowers, S.K., Richards, E.J. (1997) *Genome Res.*, **7**, 1045–1053.
172. Copenhaver, G.P., Browne, W.E., Preuss, D. (1998) *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **95**, 247–252.
173. Maluszynska, J., Heslop-Harrison, J.S. (1991) *The Plant J.*, **1**, 159–166.
174. Saunders, V.A., Houben, A. (2001) *Genome*, **44**, 955–961.
175. Nonomura, K., Kurata, N. (2001) *Chromosoma*, **110**, 284–291.
176. Houben, A., Brandes, A., Pich, U., Manteuffel, R., Schubert, I. (1996) *Theor. Appl. Genet.*, **93**, 477–484.
177. Schubert, I. (1998) *Trends in Genetics*, **14**, 385–386.
178. Choo, K.H.A. (2001) *Dev. Cell*, **1**, 165–177.
179. Haaf, T., Willard, H.F. (1997) *Chromosoma*, **106**, 226–232.
180. Page, B.T., Wanous, M.K., Birchler, J.A. (2001) *Genetics*, **159**, 291–302.
181. Iwahara, J., Kigawa, T., Kitagawa, K., Masumoto, H., Okazaki, T., Yokoyama, S. (1998) *EMBO J.*, **17**, 827–837.
182. Maluszynska, J., Heslop-Harrison, J.S. (1993) *Annals Bot.*, **71**, 479–484.
183. Kamm, A., Galasso, I., Schmidt, T., Heslop-Harrison, J.S. (1995) *Plant Mol. Biol.*, **27**, 853–862.
184. Du Sart, D., Cancilla, M.R., Earle, E., Mao, J., Saffery, R., Tainton, K.M., Kalitsis, P., Martyn, J., Barry,

- A.E., Choo, K.H.A. (1997) *Nat. Genet.*, **16**, 144–153.
185. Williams, B.C., Murphy, T.D., Goldberg, M.L., Karpen, G.H. (1998) *Nat. Genet.*, **18**, 30–37.
186. Csink, A.K., Henikoff, S. (1998) *Trends in Genetics*, **14**, 200–204.
187. Dawe, R.K., Cande, W.Z. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 8512–8517.
188. Rhoades, M.M., Vilkomerson, H. (1942) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **28**, 433–443.
189. Hiatt, E.N., Kentner, E.K., Dawe, R.K. (2002) *Plant Cell*, **14**, 407–420.
190. Hendzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B.R., Bazett-Jones, D.P., Allis, C.D. (1997) *Chromosoma*, **106**, 348–360.
191. Wei, Y., Mizzen, C.A., Cook, R.G., Gorovsky, M.A., Allis, C.D. (1998) *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **95**, 7480–7484.
192. Houben, A., Guttenbach, M., Krebs, W., Pich, U., Schubert, I., Schmid, M. (1995) *Chromosome Res.*, **3**, 27–31.
193. Meluh, P.B., Yang, P., Glowczewski, L., Koshland, D., Smith, M.M. (1998) *Cell*, **94**, 607–613.
194. Buchwitz, J.G., Ahmad, K., Moore, L.L., Roth, M.B., Henikoff, S. (1999) *Nature*, **401**, 547–548.
195. Henikoff, S., Ahmad, K., Platero, J.S., van Steensel, B. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 716–721.
196. Takahashi, K., Chen, E.S., Yanagida, M. (2000) *Science*, **288**, 2215–2219.
197. Talbert, P.B., Masuelli, R., Tyagi, A.P., Comai, L., Henikoff, S. (2002) *Plant Cell*, **14**, 1053–1066.
198. Noma, K., Allis, C.D., Grewal, S.I.S. (2001) *Science*, **293**, 1150–1155.
199. Mercier, R., Vézou, D., Bullier, E., Motamayor, J.C., Sellier, A., Lefevre, F., Pelletier, G., Horlow, C. (2001) *Genes Dev.*, **15**, 1859–1871.
200. Martinez-Perez, E., Shaw, P., Moore, G. (2001) *Nature*, **411**, 204–207.
201. Wordeman, L., Steuer, E.R., Sheetz, M.P., Mitchison, T. (1991) *J. Cell Biol.*, **114**, 285–94.
202. Zinkowski, R.P., Meyne, J., Brinkley, B.R. (1991) *J. Cell Biol.*, **113**, 1091–1110.
203. Yu, H.G., Hiatt, E.N., Dawe, R.K. (2000) *Trends Plant Sci.*, **5**, 543–547.
204. Yu, H.G., Muszynski, M.G., Dawe, R.K. (1999) *J. Cell Biol.*, **145**, 425–435.
205. Dawe, R.K., Reed, L.M., Yu, H-G., Muszynski, M.G., Hiatt, E.N. (1999) *Plant Cell*, **11**, 1227–1238.
206. Mole-Bajer, J., Bajer, A.S., Zinkowski, R.P., Balczon, R.D., Brinkley, B.R. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**, 3359–3603.
207. Palevitz, B.A. (1990) *Protoplasma*, **157**, 120–127.
208. Binarova, P., Cihalikova, J., Dolezel, J. (1993) *Cell Biol. Int.*, **17**, 847–856.
209. Schmit, A.C., Stoppin, V., Chevriert, V., Job, D., Lambert, A.M. (1994) *Chromosoma*, **103**, 343–351.
210. Houben, A., Wako, T., Furushima-Shinogawara, R., Presting, G., Kinzel, G., Schubert, I., Fukui, K. (1999) *Plant J.*, **18**, 675–679.
211. ten Hoopen, R., Manteuffel, R., Dolezel, J., Malysheva, L., Schubert, I. (2000) *Chromosoma*, **109**, 482–489.
212. Suzuki, T., Noriko, I., Tanaka, I. (1997) *Chromosoma*, **106**, 435–445.
213. Riggs, C.D. (1997) *BioEssays*, **19**, 925–931.
214. Starr, D.A., Williams, B.C., Li, Z., Etemad-Moghadam, B., Dawe, R.K., Goldberg, M.L. (1997) *J. Cell Biol.*, **138**, 1289–1301.
215. Binarova, P., Hause, B., Dolezel, J., Draber, P. (1998) *The Plant J.*, **14**, 751–757.
216. Joshi, H.C., Palacios, M.J., McNamara, L., Cleveland, D.W. (1992) *Nature*, **356**, 80–83.
217. Harrington, J.J., Bokkelen, G.V., Mays, R.W., Gustashaw, K., Willard, H.F. (1997) *Nat. Genet.*, **16**, 345–355.
218. Kaszas, E., Birchler, J. (1996) *EMBO J.*, **15**, 5246–5255.
219. Pryor, A., Faulkner, K., Rhoades, M.M., Peacock, W.J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 6705–6709.

-
220. *Blower, M.D., Sullivan, B.A., Karpen, G.H.* (2002) *Dev. Cell*, **2**, 319–330.
221. *Southern, E.M.* (1975) *J. Mol. Biol.*, **94**, 51–69.
222. *Orgel, L.E., Crick, F.H.C.* (1980) *Nature*, **284**, 604–607.
223. *Doolittle, W.F., Sapienza, C.* (1980) *Nature*, **284**, 478–491.
224. *Bonaccorsi, S., Gatti, M., Pisano, C., Lohe, A.* (1990) *Chromosoma*, **99**, 260–266.
225. *Rojas, A.A., Vazquez-Tello, A., Ferbeyre, G., Venanzetti, F., Bachmann, L., Paquin, B., Sbordoni, V., Cedergren, R.* (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4037–4043.