



В. Е. Ерохин<sup>1</sup>, канд. биол. наук, вед. научн. сотр., А. В. Кузнецов<sup>2</sup>, доктор биол. наук, вед. научн. сотр.

<sup>1</sup>Институт биологии южных морей им. А. О.Ковалевского Национальной академии наук Украины,  
Севастополь, Украина

<sup>2</sup>Albert-Ludwig's University Freiburg, Freiburg, Germany

## ИНФОРМАЦИОННАЯ И РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ РАСТВОРЁННОГО В МОРСКОЙ ВОДЕ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА

Предложена гипотеза о возможной информационной и регуляторной роли высокомолекулярных компонентов РОВ. В модельных экспериментах показан захват экзогенной ДНК сперматозоидами мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. Установлен факт переноса этой ДНК в яйцеклетку при оплодотворении, с последующей экспрессией трансгена в плавающих личинках. Экзогенная ДНК проникала непосредственно в яйцеклетки мидий путём естественной трансфекции сперматозоидов, или при их обработке комплексом ДНК:белок:липиды. В составе комплекса ДНК: белок: липиды химерные белки *V-GAL4* и в большей мере *V-GCN4* обеспечивают доставку плазмиды *pCMVgfp* (bind) в ядро сперматозоида мидии, что приводит к экспрессии *GFP*-протеина в личинках после оплодотворения. Сделано заключение, что входящие в состав РОВ экзогенные ДНК способны специфическим образом блокировать оплодотворение и вмешиваться в программу развития личинок мидии. Предполагается, что транспорт экзогенной ДНК в процессе оплодотворения и её стабильное наследование возможны только в редких случаях компетентности как мужских, так и женских гамет, а также специфического сочетания их генотипов и эпигенетических факторов. Возможно, растворённые в морской воде ДНК, РНК, внехромосомные ДНК (плазмиды), а также их фрагменты, являясь своеобразным носителем эпигенетической информации, выполняют информационную и регуляторную роль в морских экосистемах. Для обсуждения использованы известные факты, полученные при исследовании прокариот, низших эукариот и морских беспозвоночных.

**Ключевые слова:** РОВ, ДНК, РНК, трансфекция, сперматозоиды, оплодотворение, *Mytilus galloprovincialis*, эпигенетическая информация.

В состав растворённого органического вещества (РОВ) входят практически все известные органические соединения и их дериваты. Основными источниками поступления РОВ в морскую воду являются как прижизненные выделения естественных метаболитов организмов, так и продукты их посмертного лизиса. Концентрация РОВ варьирует от 1 – 2 мг·л<sup>-1</sup> в поверхностных водах открытого океана до десятков мг·л<sup>-1</sup> в прибрежной зоне с зарослями макрофитов [4]. При качественном анализе РОВ идентифицированы органические кислоты и липиды, углеводы и полисахариды, аминокислоты, пептиды и белки, в т.ч. фер-

менты и гормоны [16]. Позднее в составе РОВ были определены сложные соединения: гликопротеины (лектины), прионы, ДНК, РНК, внехромосомные ДНК (плазмиды), а также их фрагменты. В настоящее время накоплен огромный массив данных по качественному и количественному содержанию РОВ в море [43]. Имеющиеся сведения полно освещены в специальной литературе.

Растворённая в воде ДНК, т.е. та ДНК, которая не задерживалась на фильтрах с размерами пор 0.2 мкм и не связана с вирусами или иными объектами, была найдена в пробах воды из различных пресноводных и

морских экосистем [40, 41, 54]. Содержание растворённой ДНК в эстуариях варьировало от 5 до 44 мкг·л<sup>-1</sup>, а в прибрежных океанических водах – от 2 до 15 мкг·л<sup>-1</sup>. В поверхностных олиготрофных водах концентрация растворённой ДНК составляла 1 – 5 мкг·л<sup>-1</sup>, в глубоководных пробах – до 1 мкг·л<sup>-1</sup> [24, 39]. Имеются данные, что концентрации растворённых ДНК в прибрежных экосистемах достигают 90 мкг·л<sup>-1</sup>, а РНК на порядок величин больше [31,40].

Учитывая, что РОВ обычно концентрируется на поверхностях раздела фаз [55, 17], следует предположить, что растворённые ДНК и РНК, обладающие высокой поверхностной активностью, будут иметь более значительные метаболические концентрации, превышающие средние величины при определении этих макромолекул в пробах воды.

Известно, что соотношение масс живых организмов, детрита и РОВ в Мировом океане составляет 1:10:100 [51, 52]. В последние годы условная граница разделения живого и растворённого в морской воде органического вещества была сдвинута с 0.5 мкм до 0.2 мкм [43]. Однако установленное соотношение не претерпело коренных уточнений до настоящего времени.

При создании теории эктокринов С. Лукас [37] исходил из того, что метаболиты в составе РОВ включают питательные, ростовые и поведенческие вещества. К. М. Хайлов [16], развивая гипотезу А. Пюттера [42], незаслуженно забытую в начале 30-х годов прошлого столетия, а также концепцию эктокринов С. Лукаса [37], сформулировал основные идеи экологического метаболизма [16], которые в дальнейшем получили экспериментальное подтверждение. Однако, давая определение экологического метаболизма, К. М. Хайлов [16] отметил значение только связей обменного типа, к которым он отнёс «питательные» и «ростовые» вещества, по классификации С. Лукаса. Связи сенсорные или сигнальные (например, «вещества испуга» у рыб) автором не были учтены, поскольку такие соединения, по его мнению, не включаются в экологический

метаболизм и в обмен веществ отдельных организмов, т.к. действуют только на внешние рецепторы.

В связи с интенсивным развитием исследований в области генной инженерии, в 1970 – 1980 гг. были получены множественные данные, которые показали, что прокариоты могут обмениваться фрагментами чужеродной ДНК. Позднее были установлены основные механизмы обмена фрагментами чужой ДНК для вирусов, прокариот, а затем и эукариот [18]. В некоторых исследованиях использовались и морские микроорганизмы. Например, при исследовании проницаемости сперматозоидов для макромолекул экспериментально установлено проникновение микрококковой эндонуклеазы и экзогенной ДНК в сперматозоиды 3 видов морских ежей [22]. Кроме того, показано, что если яйца морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* оплодотворить спермой, предварительно инкубированной с плазмидами *pSV2cat* или *pRSVcat*, то хлорамфениколацетилтрансферазная (*CAT*) активность обнаруживается в эмбрионах на стадии плавающей личинки. Таким образом, было доказано, что конструкции, несущие ген *cat*, доставлены сперматозоидами в яйца, и рекомбинантный ген экспрессируется в эмбрионах.

Однако в этих экспериментах использовались высокие концентрации экзогенной ДНК, далёкие от реальных эколого-физиологических значений, а постановка экспериментов с применением антибиотиков исключала бактериальную контаминацию.

Данные, полученные при изучении трансфекции экзогенной ДНК в яйцеклетку при оплодотворении у млекопитающих, были успешно повторены другими исследователями [53]. Однако результаты исследований естественной трансфекции на морских ежах [22] до настоящего времени так и не воспроизведены.

Тем не менее, мы приняли эти данные за основу для нашей рабочей гипотезы об информационной и регуляторной роли растворённого в морской воде органического вещества.

рѐнного в морской воде органического вещества.

Согласно этой гипотезе, внешние метаболиты в составе РОВ выполняют следующие функции:

- Питательные: органические кислоты, аминокислоты, углеводы, пептиды и т.д.
- Ростовые: ауксины, гиббереллины и др.
- Поведенческие и сигнальные: репелленты, вещества испуга, половые аттрактанты и т.п.
- Информационные и регуляторные: ДНК, внехромосомные ДНК (плазмиды), РНК, а также их фрагменты. Эти растворѐнные в морской воде органические вещества, являясь своеобразным носителем эпигенетической информации, выполняют информационную и регуляторную роль для прокариотов и низших эукариотов непосредственно. Функция по естественному переносу чужеродной генетической информации в морских экосистемах для имеющих внешнее оплодотворение организмов осуществляется с помощью сперматозоидов.

В настоящее время наиболее полно исследована трофическая роль РОВ. Имеются данные по влиянию ростовых стимуляторов и ингибиторов. Сигнальная и поведенческая функции РОВ изучены еще недостаточно для определения механизмов их действия. В этом направлении выполнен целый ряд работ, на которых мы не будем здесь останавливаться. Основная сложность в выполнении подобных исследований связана с тем, что РОВ представляют сложную смесь органических и неорганических соединений. Поэтому в экспериментах обычно использовали влияние вытяжек из среды обитания одних организмов на жизнедеятельность других. В некоторых исследованиях были использованы вещества, моделирующие те или иные компоненты РОВ [16].

Естественная передача через воду чужой (т.е. не имеющей отношения к данному виду) генетической информации для организмов, в том числе и имеющих внешнее оплодотворение, морскими биологами ранее не рассматривалась. Если факт обмена генетической информацией для прокариотов и, в меньшей мере, для низших эукариотов имеет доказательную базу [21, 32, 33], то корректные сведения

по естественной трансфекции экзогенной ДНК в яйцеклетку при оплодотворении отсутствовали.

Между тем, внешнее оплодотворение имеют многие морские организмы, поэтому имеются все предпосылки для реализации механизма переноса чужой ДНК, используя в качестве «тroyанского коня» сперматозоиды.

В представленной работе мы рассматриваем с позиций экологического метаболизма часть полученных нами ранее материалов по трансфекции сперматозоидов мидий *Mytilus galloprovincialis* Lam. чужеродной ДНК [1, 7, 9 – 11, 34]. Мидии имеют внешнее оплодотворение и являются удобным для экспериментов организмом. Единственный недостаток объекта – сезонность в работе, связанная с нерестом. Основная задача нашей работы заключалась в том, чтобы показать в модельных экспериментах на *M. galloprovincialis* вероятную роль высокомолекулярных компонентов РОВ в регуляции и передаче генетической информации. С этой целью использовали установленную нами способность растворѐнных в морской воде фрагментов экзогенной ДНК проникать в яйцеклетки мидий через сперматозоиды в результате оплодотворения:

- при естественной трансфекции сперматозоидов рекомбинантной ДНК;
- при переносе сперматозоидами рекомбинантной ДНК в составе комплекса ДНК: белок: липиды.

Полученные в рамках рабочей гипотезы результаты мы не публиковали ранее как единое целое, в ожидании подтверждения наших экспериментальных данных другими авторами [6, 30].

**Материал и методы.** Экспериментальные работы проводили с 1996 по 2000 гг. В работе участвовали специалисты генно-инженерного профиля из различных научных центров Российской Федерации. Используемые методы молекулярной генетики, а также полученные основные экспериментальные результаты опубликованы в 1999 – 2001 гг. [1, 7, 9 – 11, 34].

Эксперименты выполнены в периоды массового нереста моллюсков. Мидий собирали возле уреза воды со скал в районе мыса Фиолент и вблизи Балаклавы, а также с коллекторов марихозайства в бухте Казачьей. Искусственный нерест половозрелых особей вызывали повышением температуры воды до 17 – 18° С после предварительного охлаждения мидий до 10 – 12° С. В опытах использовали профильтрованную морскую воду с добавлением антибиотиков: по 50 мкг·мл<sup>-1</sup> ампициллина и стрептомицина. Использование антибиотиков успешно практиковалось нами и при исследовании трофической функции РОВ для беспозвоночных [5].

При отработке методов мы стремились максимально упростить технику эксперимента. В морскую воду добавляли фрагменты ДНК различной концентрации. Затем сюда же помещали сперматозоиды, обычно при плотности 10<sup>7</sup> – 10<sup>8</sup> кл·мл<sup>-1</sup>. При заданной экспозиции происходил захват ДНК сперматозоидами, после чего проводили искусственное оплодотворение.

Искусственное оплодотворение *M. galloprovincialis* осуществляли следующим образом: к 5 мл суспензии яйцеклеток с плотностью 2·10<sup>3</sup> кл·мл<sup>-1</sup> добавляли 100 мкл спермиев с концентрацией 10<sup>7</sup> кл·мл<sup>-1</sup>. Через 5 мин жидкость декантировали и доводили её объем до 10 мл. Культивирование личинок проводили в течение определённого времени при 17 – 20° С, а затем использовали для анализов в них экзогенной ДНК.

1. В ряде экспериментов использовали случайные низкомолекулярные фрагменты ДНК (озДНК), полученные при обработке ультразвуком на установке Soniper 150 (MSE) раствора ДНК из спермы лосося. Спермии мидий смешивали с различными количествами (0, 5, 50 и 500 мкг·мл<sup>-1</sup>) растворённой в воде фрагментированной ДНК длиной менее 1000 пар нуклеотидов (п.н.) и инкубировали в течение 0,5, 30, 60 и 120 мин, после чего проводили оплодотворение *in vitro*.

2. В другой серии опытов изучали самопроизвольный захват плазмидной ДНК спермиями мидии *M. galloprovincialis*. В опытах применяли плазмиду pGEM4Z. При этом к 1 мл фильтрованной стерильной морской воды, содержащей 10<sup>8</sup> спермиев мидий, добавляли 0.1 мкг ДНК pGEM4Z. После этого пробы инкубировали в течение 0, 5, 15, 30, 60 или 120 мин при температуре 18 – 20° С. Затем выделяли ДНК и исследовали её при помощи гибридизации.

3. В третьей серии использовали естественную трансфекцию спермиев рекомбинантными ДНК. В этом случае сперматозоиды мидий (10<sup>7</sup> кл·мл<sup>-1</sup>) инкубировали в течение 30 – 60 мин при 18°С в присутствии 10 – 100 мкг·мл<sup>-1</sup> ДНК pCMVlacZ и/или 10 – 50 мкг·мл<sup>-1</sup> pMTbGH, после чего спермии добавляли к яйцеклеткам. Личинок культивировали и анализировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). В описанных опытах по переносу экзогенной ДНК спермиями в яйцеклетки мидий применяли плазмиду pCMVlacZ, т.к. она активно экспрессируется в тканях млекопитающих и рыб как в интегрированном состоянии, так и автономно. Чтобы исключить ложные ПЦР-сигналы, возникающие в результате контаминации образцов молекулами ДНК бактерий, водорослей и простейших, дополнительно использовали плазмиду pMTbGH с бычьим гормоном роста, который отсутствует у этих организмов. На рис. 1 представлены физические карты плазмид pCMVlacZ и pMTbGH.

4. В четвертой серии экспериментов испытывали систему доставки рекомбинантной ДНК в сперматозоиды мидий в составе комплекса ДНК: белок: липиды. При этом предполагали, что сперматозоиды с большой вероятностью перенесут рекомбинантную ДНК в яйцеклетки мидий при оплодотворении. Пробы анализировали по флуоресценции GFP-протеина и с помощью ПЦР. Детальные методы обнаружения экзогенной ДНК и анализа трансформантов описаны нами ранее [1, 7, 9 – 11, 34], поэтому мы не будем на них останавливаться, чтобы не уйти от экологической проблемы.

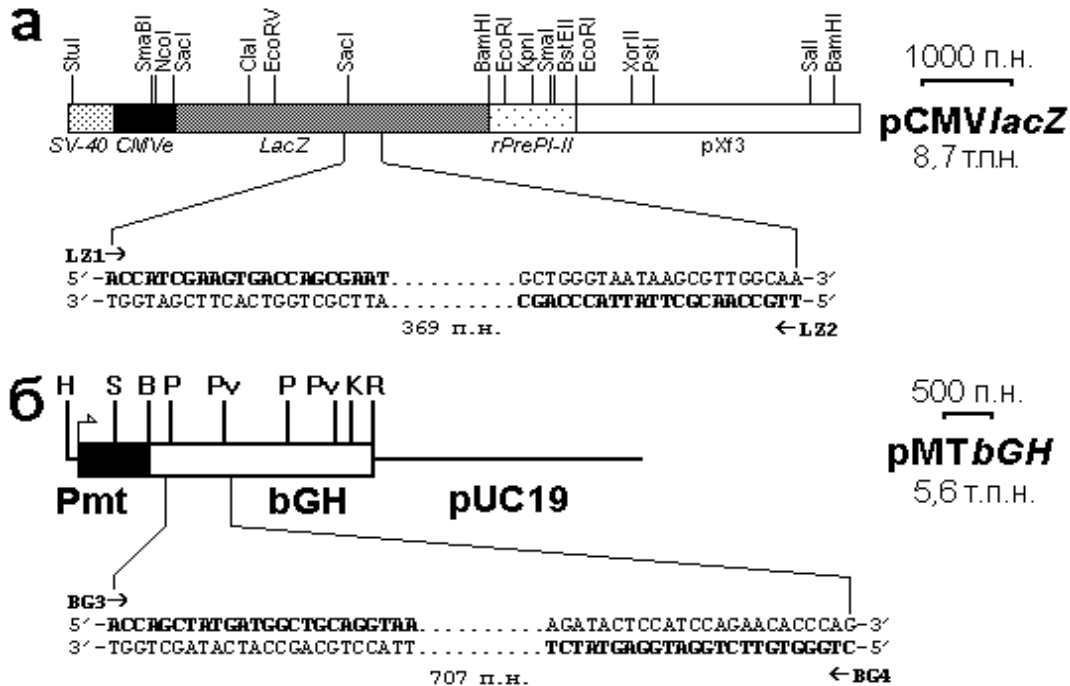


Рис.1 Физические карты плазмид pCMVlacZ, pMTbGH и расположение праймеров LZ1/LZ2, BG3/BG4: B - BamHI, H - HindIII, K - KpnI, P - PstI, Pv - PvuII, R - EcoRI, S - SacI, Sm - SmaI  
Fig.1 Physical maps of plasmids pCMVlacZ and pMTbGH, sites of primers LZ1/LZ2 and BG3/BG4: B - BamHI, H - HindIII, K - KpnI, P - PstI, Pv - PvuII, R - EcoRI, S - SacI, Sm - SmaI

Напомним, что в прибрежных экосистемах концентрации растворённых ДНК и РНК составляют от 0.56 до 88 мкг·л<sup>-1</sup> и от 4.03 до 871 мкг·мл<sup>-1</sup> соответственно, а отношение растворённых РНК и ДНК варьирует от 4.1 до 11.5 [31]. Мы признаём, что использованные в некоторых экспериментах концентрации фрагментов ДНК превышали их естественное содержание в морской воде, однако этот факт не отражается на доказательстве самого эффекта проникновения чужеродной ДНК при оплодотворении в яйцеклетки мидий.

**Результаты.** С целью облегчения восприятия материала и во избежание повторов проведём изложение результатов в соответствии с его разделением в предыдущем разделе.

**1. Фрагментированная ДНК из спермы лосося,** которую использовали при инкубации со спермиями мидии, в ряде случаев оказывала негативное влияние на оплодотворение и развитие личинок. При групповых скрещиваниях, когда сперматозоиды обрабатывали озДНК с концентрацией 200 мкг·мл<sup>-1</sup>, плотность раз-

вившихся до стадии велигера (4 сут.) личинок была в 10 раз меньше, чем при концентрации 20 мкг·мл<sup>-1</sup>. При проведении индивидуальных скрещиваний спермии мидии обрабатывали озДНК (концентрации 0, 5, 50 и 500 мкг·мл<sup>-1</sup>) в течение разных промежутков времени (0, 5, 30, 60 и 120 мин).

Количество развившихся трохофор (24 ч) в целом уменьшалось (P=0,95) в результате увеличения концентрации озДНК и времени обработки сперматозоидов (рис. 2). В другом случае, при концентрации озДНК 200 мкг·мл<sup>-1</sup>, как во время 30 мин инкубации спермиев с озДНК, так и при такой же обработке яиц через 15 мин после оплодотворения, плотности личинок на стадии велигера (2 суток) существенно не отличались.

Кроме того, с помощью дисперсионного анализа показано, что наибольший вклад в варибельность результатов вносят яйцеклетки (выбор самки), а не сперматозоиды.

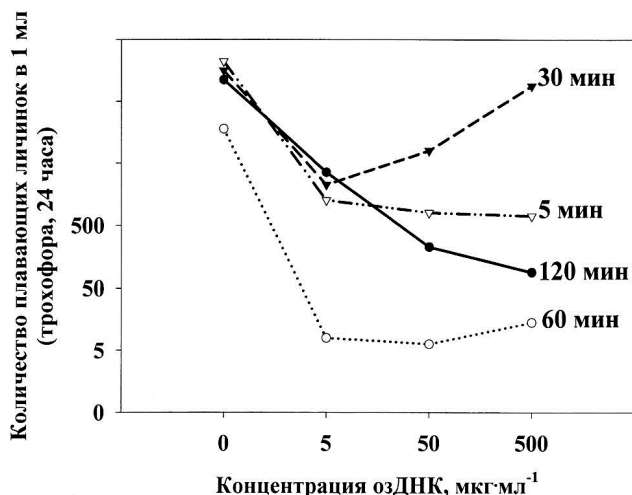


Рис. 2 Развитие личинок мидии *M. galloprovincialis* после обработки сперматозоидов различными концентрациями озДНК в течение разных промежутков времени

Fig. 2 Development of larvae *M. galloprovincialis* after sperm cells treatment by various DNA concentrations with different time intervals

Наибольшие вариации численности развившихся личинок наблюдали в группе интактных особей, меньше – после инкубирования спермиев с ДНК.

Полученные результаты показывают, что экзогенная ДНК избирательно связывается со сперматозоидами некоторых особей мидий. Блокировка оплодотворения может быть вызвана в результате связывания экзогенной ДНК с молекулами главного комплекса гистосовместимости класса II (МНСII), найденными у мышей [56]. Известно, что подобные молекулы иногда обнаруживаются на по-

верхности сперматозоидов и участвуют в узнавании спермия и яйцеклетки у млекопитающих [38]. Генетический и структурный полиморфизм МНСII-подобных молекул, возможно, влияет на эффективность связывания ДНК сперматозоидами отдельных экземпляров мидии.

2. В экспериментах по самопроизвольному захвату плазмидной ДНК спермиями мидии нами получены следующие результаты [7]. ДНК *pGEM4Z* в количестве 100 нг была добавлена к  $10^8$  сперматозоидов мидии. Через 5 мин инкубации с клетками связалось  $5 \times 10^5 = 50$  нг ДНК, т.е. 50% экзогенной ДНК. Через 15 мин зарегистрировано максимальное связывание, соответствующее 58% добавленной ДНК (рис. 3).

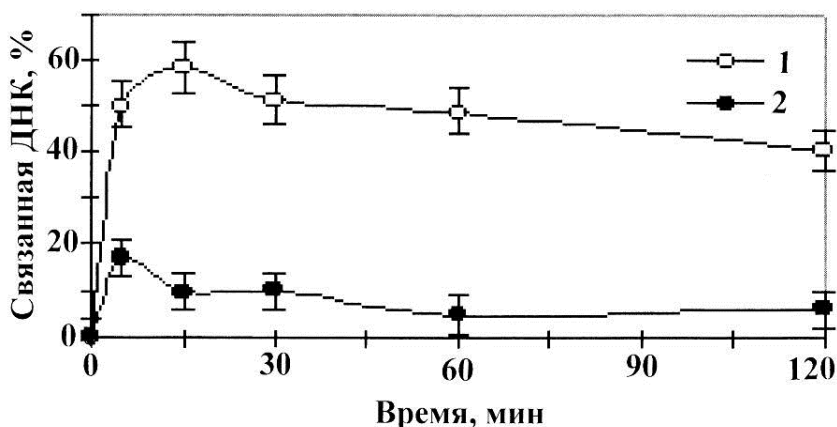


Рис. 3 Ассоциация ДНК *pGEM4Z* со сперматозоидами мидии: 1 – без ДНКазы I; 2 – после обработки спермиев ДНКазой I (1 нг/мл, 30 мин)

Fig. 3 Association of DNA *pGEM4Z* with mussel sperm cells: 1 – without DNase I treatment; 2 – after treatment of sperm by DNase I (1 ng/ml, 30 min)

Через 120 мин инкубации отмечено уменьшение количества ассоциированной ДНК до 40%. Обработка клеток ДНКазой I в концентрации 1 и 100 нг·мл<sup>-1</sup> приводила к уменьшению количества связанной ДНК приблизи-

тельно в 10 и 100 раз, т.к. содержание ДНК *pGEM4Z* составляло около 1 и 0.1 нг. После обработки спермиев ДНКазой I (1 нг·мл<sup>-1</sup>, 30 мин) максимальное количество связанной ДНК было зарегистрировано через 5 мин инкубации

плазмиды и спермиев. После тотальной обработки ДНКазой I оставалось 17% связанной ДНК (рис. 3), что свидетельствует о проникновении плазмиды pGEM4Z в малодоступный для ДНКазы I компартмент спермиев. Добавление к нативным клеткам 3% диметилсульфоксида (ДМСО) увеличивало содержание защищённой ДНК на 13 %, а предварительная обработка спермиев трипсином (20 мкг·мл<sup>-1</sup>, 30 мин) уменьшала этот показатель на 7 %.

Таким образом, в представленном эксперименте сперматозоиды мидии *M. galloprovincialis* спонтанно захватывали молекулы плазмидной ДНК. После добавления 100 нг ДНК pGEM4Z к 10<sup>8</sup> сперматозоидов мидии связалось ~60 нг ДНК. Следовательно, на 1 спермий приходится 6·10<sup>-16</sup> г ДНК или 200 молекул плазмиды pGEM4Z (длина плазмиды pGEM4Z равна 2746 п.н.; 1 тыс.п.н. ДНК=6,5·10<sup>5</sup> Да; 1 Да=1,66·10<sup>-24</sup> г). Исходя из этих расчётов, ёмкость 1 спермия мидии для экзогенной ДНК составляет ~550 тысяч п.н. (т.п.н.) В защищенной от ДНКазы I форме сперматозоид мидии способен удерживать от 2 до 20 молекул pGEM4Z или 5-55 т.п.н. ДНК.

Известно, что количество связанной ДНК варьирует от 50 до 10000 молекул на спермий и зависит от вида животного и отношения ДНК/сперматозоиды. Часть связанной ДНК (15 – 22 %) проникает в ядро спермия и защищена от ДНКазы I [23]. Экзогенная ДНК связывается со спермиями мидии быстрее, чем со спермиями млекопитающих [12, 14]. Максимум накопления ДНК наблюдали через 15 мин. Через 30 – 120 мин количество ассоциированной ДНК незначительно уменьшалось, вероятно, в результате проявления активности собственных нуклеаз [13]. Подтверждением этому также служит смещение временного максимума связывания плазмиды pGEM4Z от 15 мин, в случае простой инкубации с клетками, до 5 мин после обработки спермиев ДНКазой I (см. рис. 3). Изложенные данные свидетельствуют о том, что наиболее защищённой от собственных и внешних нуклеаз является фракция быстро проникающей в спермий ДНК,

т.е. фракция активно захватываемых молекул pGEM4Z. ДМСО способствовал ассоциации дополнительного количества ДНК, в отличие от предварительной обработки спермиев трипсином, что свидетельствует о существовании мембранных барьеров для экзогенной ДНК, а также ДНК-связывающих белковых факторов, обуславливающих компетентность спермиев и захват ДНК, вероятно, МНСП-подобных молекул.

Резюмируя изложенные в этом разделе материалы, можно сделать следующий вывод.

В модельных опытах компетентные сперматозоиды черноморской мидии *M. galloprovincialis* способны спонтанно захватывать из окружающей среды молекулы плазмидной ДНК и удерживать их в недоступном для внешних ДНКаз компартменте.

3. Все испытанные нами способы трансфекции, кроме простой инкубации спермиев с ДНК, заметно снижали оплодотворяющую способность сперматозоидов мидии. В последнем случае исследовали возможность естественного проникновения экзогенной ДНК в яйцеклетку мидии со сперматозоидом. При индивидуальном скрещивании мидий из одного и разных ареалов положительных результатов методом ПЦР не обнаружено. Только в одной из трёх серий экспериментов нами зарегистрирован эффект естественной трансфекции. В опытах использовали 10<sup>6</sup> спермиев, полученных от нескольких самцов (n<sub>min</sub>=3). Сперматозоиды инкубировали в 100 мкл морской воды при температуре 18 – 20° С в течение 30 мин в присутствии 1 – 2 мкг ДНК pMTbGH или 10 мкг ДНК pCMVlacZ. В результате оплодотворения яйцеклеток, взятых от нескольких самок (n<sub>min</sub>=3), чужеродные последовательности ДНК были обнаружены через 48 ч после оплодотворения в личинках, находящихся на стадии велигера.

Таким образом, только при групповых скрещиваниях (3 – 5 самцов на 2 – 3 самки) в двух пробах ДНК, выделенной из велигеров, обнаружен слабый ПЦР-сигнал в одном образце и интенсивный в другом, при отсутствии таковых в 3 контрольных экспериментах. По-

лосы искомого размера (369 и 707 п.н.) были выявлены при электрофорезе в результате 35 циклов амплификации в пробах, соответствующих опытам по переносу плазмид *pCMVlacZ* и *pMTbGH* спермиями в яйцеклетки после совместной инкубации спермиев и ДНК в морской воде [34].

Итак, подчеркнем ещё раз: факты случайного переноса экзогенных ДНК в яйцеклетку сперматозоидами мидии были выявлены только с помощью групповых скрещиваний. Эти результаты, с одной стороны, указывают на редкость подобных событий и общую «толерантность» сперматозоидов мидии к экзогенной ДНК, а с другой – говорят о существовании отдельных особей, продуцирующих компетентные спермии, способные к захвату и транспортировке чужеродных ДНК, а также о существовании яйцеклеток, «воспринимающих» эту ДНК.

Полагаем, что транспорт экзогенной ДНК в процессе оплодотворения, и её стабильное наследование возможны только в редких случаях компетентности как мужских, так и женских гамет и специфического сочетания их генотипов.

4. Для надёжной доставки рекомбинантной ДНК в сперматозоиды мидии применяли комплекс ДНК: белок: липиды. Использовали рекомбинантные двухдоменные белки *V-GAL4* и *V-GCN4*. Эти белки предназначены для транспорта ДНК в ядра соматических клеток. Техника получения макромолекулярного комплекса ДНК: белок: липиды нами описана [1]. Этим комплексом обрабатывали сперматозоиды мидии, после чего осуществляли искусственное оплодотворение. Личинки культиви-

ровали в профильтрованной морской воде с добавлением антибиотиков. *GFP* – протеин, ген которого входит в состав плазмиды *pCMVgfp* (Clontech, США) и которая, в свою очередь, включалась в макромолекулярный комплекс ДНК: белок: липиды, определяли с помощью спектрофлуорофотометра «RF-5000» фирмы «Shimadzu» (Япония). Флуоресценцию ( $\lambda_{\text{возб.}} = 489$  нм и  $\lambda_{\text{флуор.}} = 510$  нм) взвеси личинок в морской воде наблюдали на стадии велигера (5 сут.) или оценивали визуально под ультрафиолетовой (360 нм) лампой через 14 сут. Достоверность переноса плазмиды *pCMVgfp* (bind) спермиями в яйцеклетки мидий подтверждали с помощью ПЦР-анализа ДНК, выделенной из личинок.

В индивидуальном скрещивании, когда ДНК без белков включили в состав липосом, было зарегистрировано усиление флуоресценции на 31.5 %. При использовании комплекса ДНК:*V-GCN4* без липидов увеличение флуоресценции составило 115.4 %. В табл. 1 представлены данные, полученные при групповом скрещивании. Обработка спермиев «голой» ДНК или комплексом ДНК:*V-GCN4* вызвала прирост флуоресценции на 44.5 %. В случае применения липосом (без белков) этот показатель был ниже – 9 %.

Максимальные значения флуоресценции достигнуты при использовании полноценного комплекса – 178.8 % для ДНК:*V-GCN4*: липиды и 116.2 % для ДНК:*V-GAL4*: липиды. Практически у всех личинок в этих пробах отмечено равномерное зелёное свечение тканей под ультрафиолетом.

№ пробы	Варианты трансфекции	Флуоресценция GFP		
		Отн.ед.	%	$\Delta$ (%)
1	Контроль (без ДНК)	45.8	100.0	0
2	ДНК «голая»	66.2	144.5	44.5
3	ДНК: <i>V-GCN4</i>	66.2	144.5	44.5
4	ДНК: <i>V-GAL4</i> : липиды	93.0	216.2	116.2
5	ДНК: <i>V-GCN4</i> : липиды	127.7	278.8	178.8
6*	ДНК:липиды	49.9	109.0	9.0

Табл. 1 Эффективность переноса сперматозоидами мидии плазмиды *pCMVgfp* (bind) в яйцеклетки. Оценка по флуоресценции GFP в плавающих личинках.

Table 1 Efficiency of *pCMVgfp*(bind) plasmid transfer by spermatozoa into mussel ova. Valued on the GFP fluorescence in swimming larvae.

Примечание: \* - фрагмент иной длины.



В контрольных пробах без добавления ДНК или с использованием *GFP* плазмид (моСК-анализ) свечение отсутствовало. В образце, где использовали комплекс ДНК: липиды (проба № 6, табл. 1), при проведении ПЦР обнаружен ампликон другой длины. Это может свидетельствовать о существовании в сперматозоидах мидии ферментов, которые узнают bind-последовательность плазмиды *pCMVgfp* (bind) и осуществляют перестройки ДНК.

Можно предположить, что липиды обеспечивают перенос ДНК либо комплекса ДНК:белок через цитоплазматическую мембрану спермия, а ДНК-связывающие белки *V-GAL4* и *V-GCN4* – доставку плазмиды *pCMVgfp* (bind) в ядро сперматозоида, результатом чего является экспрессия *GFP*-протеина в личинках после оплодотворения. Гомогенное окрашивание личинок указывает на первоначальную ассоциацию плазмиды непосредственно с хроматином спермия и равномерное распределение экспрессирующегося трансгена по тканям эмбриона.

**Обсуждение.** Обмен генами путём конъюгации и мобилизация генов с помощью плазмид весьма распространены в мире прокариот [19]. Гены могут передаваться также из клетки в клетку без межклеточного контакта и без специальных переносчиков. Передачу генов в компетентные клетки прокариот при помощи свободной растворимой ДНК называют *трансформацией* [15]. Для трансформации требуются чрезвычайно малые концентрации ДНК (0.1 мкг ДНК на 1 мл суспензии клеточных реципиентов). Трансформировать удаётся только те бактерии, в которые может проникать интактная ДНК. Возможность передачи признаков с помощью очищенной ДНК была доказана для *Haemophilus influenzae*, *Neisseria*, *Rhizobium*, *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* и многих других бактерий. Этим способом могут передаваться такие признаки, как устойчивость к различным ядам, прототрофность в отношении отдельных аминокислот и другие.

В компетентные клетки может проникать любая ДНК, но рекомбинация происходит

лишь в том случае, если это – ДНК близкородственного вида. При этом возможен обмен гомологичными участками между собственной и проникшей извне ДНК [46]. Прокариоты очень широко обмениваются участками ДНК с представителями разных таксонов [25], но этот обмен происходит в значительной мере неупорядоченно. Эукариоты имеют принципиально иначе организованный генетический материал, тем не менее, они сохраняют межвидовой обмен, особенно у низших форм. Установлено наличие горизонтального переноса трансгенов между Archaea, Bacteria и Eucaria [21].

Бактерии самых различных родов могут содержать внехромосомные элементы ДНК – плазмиды, способные к автономной репликации. Размеры бактериальных плазмид, обычно встречающихся в природе, варьируют очень широко – от 2 до 300 т.п.н. и более [2]. Число копий плазмид на клетку строго определено и характерно для данной группы совместимости плазмид. Часто плазмиды несут гены, которые обуславливают фенотипическое отличие содержащих их клеток от бесплазмидных вариантов. Плазмиды могут содержать гены, которые в определённых условиях создают селективное преимущество хозяину. Некоторые из этих свойств определяются генами бактериальной хромосомы. Это свидетельствует о том, что происходит обмен генами между плазмидами и хромосомой. Плазмиды, возможно, играли важную роль в эволюции прокариот.

Реальный, экологически значимый поток генов в микробных сообществах осуществляется благодаря конъюгационному переносу. В наземных и водных популяциях микроорганизмов плазмиды распространены повсеместно. Конъюгативные плазмиды широкого спектра хозяев, в частности плазмиды группы совместимости IncP1, способны осуществлять перенос генов через эволюционные барьеры, например, из *Pseudomonas* и *Escherichia* в *Rhizobium*, *Alcaligenes*, *Mycococcus*, *Desulfovibrio*, в цианобактерии *Synechococcus*, во флавобактерии *Bacteroides*. Ti-плазмиды из

*Agrobacterium* способны к внесению бактериальных генов в клетки растений. Однако все эти данные получены в лаборатории, в чистых культурах микроорганизмов, на богатых питательных средах, при больших концентрациях доноров и реципиентов [29].

Кроме того, в мире микроорганизмов обмен генетическим материалом выполняют бактериофаги, а у животных – ретровирусы. Исключительная роль принадлежит сперматозоидам. С одной стороны, с появлением и развитием полового процесса эти клетки всё больше специализировались на точной и надёжной доставке генетического материала для его комбинирования в зиготе и настройке в онтогенезе. С другой стороны – мужские гаметы стали использоваться целым рядом экстрахромосомных генетических элементов, вирусов и внутриклеточных паразитов для распространения своей генетической информации, способной вмешиваться в работу генетической программы хозяина. Более того, оказалось, что сперматозоиды обладают возможностью захватывать любую ДНК и переносить её в процессе оплодотворения в яйцеклетки. Таким образом, спектр переносимых спермиями нуклеотидных последовательностей не ограничен, и этот факт свидетельствует в пользу возможности инфицирования неизвестными последовательностями ДНК и РНК при оплодотворении [50].

Предполагается, что цитоплазматическая ДНК и РНК эукариотов в ряде случаев способна выходить из клеток в окружающую среду, а затем поглощаться другими клетками, осуществляя, таким образом, «горизонтальный» перенос генетической информации и коррекцию клеточных функций в популяциях клеток при изменении условий их существования [20]. Данный феномен в применении к эукариотам получил название *трансфекция*. Существуют экспериментальные доказательства, что привнесённый чужеродный генетический материал из неродственного источника иногда остается более или менее постоянно в цитоплазме эукариотического хозяина, в его ядре, но вне хромосом, или же в каком-нибудь уча-

стке одной из хромосом и вносит вклад в регуляцию активности генома и наследственную изменчивость.

Однако вернёмся к прокариотам. В водных микробных экосистемах обнаружено много плазмидных штаммов микроорганизмов [44]. В частности, в озёрной воде плазмиды содержат до 46 % гетеротрофов, в речной воде – 10 – 15%. Большинство плазмид конъюгативны. Указанные плазмиды свойственны таким родам бактерий как *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Moraxella*. Частота переноса плазмид между интродуцированными бактериями в водных системах колеблется от  $5 \cdot 10^{-8}$  до  $2,5 \cdot 10^{-3}$  трансконъюгатов на 1 клетку-донора. Перенос плазмид из интродуцированных штаммов в природные водные микроорганизмы показан для бактерий эпиплтона (водные микробные сообщества, ассоциированные с камнями); частота такого переноса весьма высока –  $10^{-2}$  на клетку-донора [29]. В загрязнённой нефтепродуктами морской воде, так же как и в загрязнённой почве, содержится повышенное количество плазмидных штаммов микроорганизмов, что свидетельствует о селективном давлении, направленном на перенос соответствующих плазмид [26]. Почвы, загрязнённые тяжелыми металлами и органическими ксенобиотиками, отличаются уменьшенным микробным разнообразием и присутствием большого количества штаммов с плазмидами устойчивости к тяжёлым металлам и способностью к биodeградации [45]. Активный ил – тоже весьма благоприятная среда для конъюгационного переноса плазмид.

Однако результаты этих исследований по переносу генетической информации в низших звеньях трофической цепи (вирусы, бактерии, одноклеточные водоросли, простейшие) с помощью компонентов растворённого органического вещества до настоящего времени так и не привлекли внимания морских биологов, что связано, вероятно, с биотехнологической направленностью проведённых исследований.

Многие морские организмы вымётывают гаметы непосредственно в окружающую

среду. Размножающиеся таким способом животные сталкиваются с двумя проблемами: осуществление встречи спермиев и яиц при столь низкой их концентрации и создание механизмов, препятствующих оплодотворению яйцеклеток спермиями другого вида.

Для разрешения этих проблем в процессе эволюции выработались два механизма: видоспецифическое привлечение спермиев и их видоспецифическая активация. С другой стороны, сперматозоиды, вероятно, в связи с их эволюционной предысторией, ведут себя как истинные эукариоты, захватывая из внешней среды не только вирусы, гомологические и гетерологические макромолекулы, например, микрококковую эндонуклеазу, но также и другие химические соединения, как ДНК и РНК [22, 50].

Известно, что более 90 % частиц вируса инфекционного гематопоэтического некроза (IHN) менее чем за 1 мин адсорбируются на поверхностной мембране спермиев лососёвых рыб. Вирусы способны адсорбироваться и на сперматозоидах млекопитающих, что не исключает их участия в процессе «вертикальной» (от родителей к потомству) передачи вирусов и чужеродной генетической информации.

Систематические исследования взаимодействия экзогенной ДНК со сперматозоидами проводятся с 1989 г., когда впервые на примере 3 видов морских ежей была продемонстрирована проницаемость спермиев для высокомолекулярной ДНК [22].

Для обнаружения перенесённой чужеродной ДНК использовали репортерные (маркерные) гены. Кроме того, для подтверждения факта трансфекции используют разнообразные методы: радиоактивные метки, флуоресцентные зонды, ПЦР, идентификация специфических форм ДНК в клетках (дот-блот-анализ) и др.

В литературе имеются противоречивые сведения относительно условий и предполагаемых механизмов взаимодействия экзогенной ДНК со сперматозоидами, однако показано, что способность зрелых сперматозоидов связывать молекулы ДНК является общей для

разных видов животных [8]. Впоследствии было показано, что проницаемость для чужеродной ДНК не ограничивается сперматозоидами морских ежей, а присуща представителям различных таксономических групп, таким как иглокожие, насекомые, рыбы, земноводные, птицы и млекопитающие.

Следует подчеркнуть, что все работы этого направления имели ярко выраженную биотехнологическую, генно-инженерную направленность. Достичь естественного переноса чужеродной ДНК в яйцеклетки без специальных приёмов, например, электропорации, осмотического шока, химического воздействия на мембрану и других искусственных приёмов, достаточно просто и одновременно сложно, в связи с недостаточной изученностью вопроса.

Опосредованный сперматозоидами перенос генов имеет большое значение для гидробионтов с внешним оплодотворением и большим количеством яйцеклеток, т.к. в случае развития трансфецированных эмбрионов, в зависимости от различных условий, могут быть отобраны и реализованы определённые селективные преимущества. Накопленные экспериментальные данные указывают на то, что для представителей ряда таксонов (от иглокожих до млекопитающих, включая человека) не существует очевидных запретов на проникновение экзогенной ДНК во время оплодотворения в яйцеклетку. Следовательно, появляется возможность для практического использования этого пути введения чужеродной ДНК в организм [8]. Тем не менее, следует подчеркнуть, что процесс переноса чужеродной ДНК в геном и её передачи через зародышевые клетки, очевидно, сложнее, чем наши нынешние представления о нём. Доказательством тому служат частые неудачи в экспериментах по трансгенезу.

Как указано выше, в период с 1996 по 2000 гг. нами проведены 4 серии экспериментов, которые показали способность растворённой в морской воде экзогенной ДНК проникать в яйцеклетки мидий путём естественной трансфекции сперматозоидов, с последующей экспрессией трансгена в плавающих личинках.

Эти данные подтвердили основные выводы, сделанные в результате экспериментов на морских ежах [22].

В свою очередь, наши данные по естественной трансфекции сперматозоидов мидии *M. galloprovincialis* экзогенной ДНК также подтверждены [30]. Доказан факт трансфекции сперматозоидов двустворчатых моллюсков *Mytilus galloprovincialis*, *M. chilensis* и *Chamelea gallina* экзогенной ДНК– *p-GeneGrip* конструкцией, которая кодирует зелёный флуоресцентный белок. После краткой инкубации авторы оценивали методами флуоресценции и конфокальной лазерной микроскопии эффективность трансфекции, которая составила у исследованных видов около 58.5 – 70.0%. Чужеродный ген был расположен, главным образом, в ядрах сперматозоидов. Отмечено наличие трансфекции также и в митохондриях нескольких сперматозоидов. С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также идентификации специфических форм ДНК (Саузерн-блоттинг) было показано, что экзогенная ДНК ассоциировалась с геномом сперматозоидов *M. galloprovincialis*. Авторы сделали вывод, что этот простой метод для трансфекции сперматозоидов у промысловых видов моллюсков может иметь биотехнологические приложения [30]. Однако, по нашему мнению, эти результаты ещё раз подтверждают предложенную нами гипотезу об информационной и регуляторной роли растворённого в морской воде органического вещества в отношении к организмам с внешним оплодотворением.

Проблема переноса растворённых в морской воде фрагментов чужеродной ДНК мужскими гаметами представляет интерес с точки зрения онтогенеза и эволюционной теории, а также для эколого-физиологических исследований. Концепция SMGT (перенос генов с помощью сперматозоидов) уже не выглядит парадоксом или артефактом, как 20 лет назад [27]; напротив, появился оживлённый интерес к эпигенетической регуляции при оплодотворении. Эксперименты последних лет убедительно доказывают, что SMGT феномен объек-

тивно существует [36, 47 – 50] и требует глубокого молекулярного и широкого системного изучения [35]. Последнее связано с тем, что при этом выявляются ранее неизвестные стороны индивидуального развития и эволюции, а также подчёркивается роль эпигенетических факторов в глобальном регулировании и поддержании стабильности экосистем.

По мнению В. Гранта [3], в природе, наряду с половым процессом, происходит обмен генетическим материалом по методу проб и ошибок. Он высказал мнение, что «нестандартные» способы трансспецифического обмена генетическим материалом представляют издавна существующие процессы, которые действовали на прокариотической стадии эволюционной истории и продолжают играть вспомогательную роль в эволюции эукариот. Возможно, половой способ размножения, развитие которого протекало параллельно с эволюцией эукариот, вытеснил нестандартные парасексуальные способы обмена генетическим материалом. Это объясняется тем, что после достижения организмами определённого уровня сложности использование примитивных и неэффективных способов комбинирования генетической информации становится неадекватным [3]. Действительно, с появлением нейронной памяти должна снижаться необходимость в обмене «оперативной» генетической информацией.

Очевидно, что широкий пласт эпигенетических событий до последнего времени не привлекал внимания научного сообщества. Последние обзоры [28, 50] раскрывают огромную роль РНК в регуляции активности генома и физиологических процессов у эукариотов, а также значение РНК как посредника между экологическими факторами и генотипом. Возможно, что часть эпигенетической информации постоянно присутствует в окружающей среде, а организмы погружены в глобальный распределённый эпигеном (экстрахромосомная ДНК, РНК, ростовые и регуляторные факторы).

**Заключение. 1.** Предложена рабочая гипотеза о том, что растворённые в морской

воде ДНК, плазмиды, РНК, а также их фрагменты, являясь своеобразным носителем эпигенетической информации, выполняют информационную и регуляторную роль для прокариотов и низших эукариотов непосредственно. Эта часть гипотезы имеет необходимую доказательную базу, хотя, с другой стороны, её можно принять и априори. Для имеющих внешнее оплодотворение организмов функция по естественному переносу чужеродной генетической информации в морских экосистемах осуществляется с помощью сперматозоидов. До проведенных нами экспериментальных работ корректные сведения по проникновению экзогенной ДНК в яйцеклетку с помощью спермиев при оплодотворении отсутствовали. Работоспособность гипотезы подтверждена в модельных экспериментах. Показан эффект захвата экзогенной ДНК сперматозоидами *Mytilus galloprovincialis* Lam. Установлен факт переноса экзогенной ДНК в яйцеклетку при оплодотворении, с последующей экспрессией трансгена в плавающих личинках. Полученные авторами данные по естественной трансфекции экзогенной ДНК подтверждены другими исследователями. 2. Обнаружена способность экзогенной ДНК проникать в яйцеклетки мидий путем трансфекции сперматозоидов, как непосредственно, так и при обработке их комплексом ДНК: белок: липиды. Отмечено, что в составе комплекса ДНК: белок: липиды химерные белки *V-GAL4* и в большей мере *V-GCN4* обеспечивают доставку плазмиды *pCMVgfp* (bind) в ядро сперматозоида мидии, что приводит к экспрессии GFP-протеина в личинках после оплодотворения. 3. Сделано заключение, что входящие в состав РОВ ДНК и их фрагменты, способны специфическим образом блокировать оплодотворение и вмешиваться в программу развития личинок мидии, что, несомненно, свидетельствует о наличии регуляторных функций. Значение этих сигналов в момент оплодотворения неизвестно. Предполагается, что транспорт экзогенной ДНК в процессе оплодотворения и её стабильное насле-

дование возможны только в редких случаях компетентности как мужских, так и женских гамет и специфического сочетания их генотипов. 4. Естественно, мы понимаем всю сложность рассматриваемого процесса естественной интеграции трансгена, т.к. слишком мало установленных фактов при превалировании предположений. На основании имеющихся данных ещё трудно оценить с экологической точки зрения информационную и регуляторную роль растворённого в морской воде органического вещества в отношении онтогенеза и эволюции.

Тем не менее, полученные нами материалы позволяют сделать некоторые предположения. Во-первых – наличие во внешней среде различных фрагментов чужеродной ДНК и возможность их проникновения в организмы способствует приобретению ими новых свойств, изменению гено- и фенотипа, и в конечном итоге, получению селективного преимущества. Во-вторых – организмы, обладающие половым размножением, приобретают дополнительные возможности в получении «нового информационного материала» при оплодотворении (т.е. половое размножение и здесь даёт преимущества). Отсюда следует, что благодаря растворённому в морской воде органическому веществу, его информационной и регуляторной роли, природные возможности адаптации организмов (видов) в процессе их жизнедеятельности к изменениям среды практически безграничны, что является одним из важнейших условий эволюции.

**Благодарности.** Авторы сердечно признательны сотрудникам ИнБЮМ НАН Украины А. П. Гордиенко, Г. С. Минюк, Н. К. Ревкову, К. М. Хайлову, Н. В. Шадрину, а также И. Ю. Щит (Государственный научный центр Прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия), Т. Govenko (Institut für Berufspädagogik, Magdeburg, Deutschland) за интерес к работе, а также активное и плодотворное участие в обсуждении рукописи.

1. Анисимова С. А., Кузнецов А. В., Ерохин В. Е. и др. Опосредованный сперматозоидами перенос комплекса ДНК:белок:липиды в яйцеклетки мидии // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии: Тез. докл. II международн. научн. конф., 18-19 октября 2000. – М., 2000. – С. 43 – 44.
2. Брода П. Плазмиды. – М.: Мир, 1982. – 220 с.
3. Грант В. Эволюционный процесс. Критический обзор эволюционной теории. – М.: Мир, 1991. – 488 с.
4. Ерохин В. Е. Растворённые углеводы некоторых биотопов прибрежной зоны моря // Океанология. – 1972. – 12, 2. – С.291 – 298.
5. Ерохин В. Е. Использование антибиотиков при исследовании питания беспозвоночных экзотаболитами // Гидробиол. журн. – 1978. – 14, №4. – С.89 – 92.
6. Ерохин В. Е., Кузнецов А. В. Информационная роль растворённого в морской воде органического вещества // Проблемы биологической океанографии XXI века: тез. докл. международн. научн. конф., посвящённой 135-летию ИнБЮМ (19-21 сентября 2006г., Севастополь, Украина). – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2006. – С.144.
7. Кузнецов А. В., Ерохин В. Е. Проникновение экзогенной ДНК в компетентные сперматозоиды мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Экология моря. – 2000. – Вып. 56. – С. 76 – 79.
8. Кузнецов А. В., Кузнецова И. В. Подвижный вектор. 1998. – 189 с. <http://www.obomon.euro.ru>
9. Кузнецов А. В., Пиркова А. В., Дворянчиков Г.А. и др. Перенос чужеродных генов сперматозоидами в яйцеклетки мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam // Экология моря. – 1999. – Вып. 49. – С. 96 – 97.
10. Кузнецов А. В., Пиркова А. В., Дворянчиков Г. А. и др. Перенос чужеродных генов сперматозоидами в яйцеклетки мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. Компетентность гамет к экзогенной ДНК // Экология моря. – 2000. – Вып. 50. – С. 98 – 102.
11. Кузнецов А. В., Пиркова А. В., Дворянчиков Г. А. и др. Исследование переноса чужеродных генов сперматозоидами в яйцеклетки мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Онтогенез. – 2001. – 32, №4. – С. 309 – 318.
12. Кузнецов А. В., Сигаева В. А., Кузнецова И. В., Щит И. Ю. Сперматозоиды кролика способны связывать чужеродную ДНК // Проблемы репродукции. – 1996. – 1. – С. 7 – 10.
13. Кузнецова И. В., Щит И. Ю., Кузнецов А. В. О ДНКазной активности спермы различных видов животных в связи с особенностями их оплодотворения // Сельскохозяйств. Биол. – 1999. – №2. – С. 77 – 79.
14. Сигаева В. А., Кузнецова И. В., Кузнецов А. В. Связывание экзогенной ДНК сперматозоидами // Проблемы репродукции. – 1996. – 2. – С. 18 – 20.
15. Тихомирова Л. П., Вельков В. В. Методы введения чужеродной ДНК в клетку и селекции гибридных плазмид // Итоги науки и техники. Сер. Молекулярная биология. – М.: ВИНТИ, 1980. – 12 (ч. II). – С. 62 – 103.
16. Хайлов К. М. Экологический метаболизм в море. – Киев: Наук. думка, 1971. – 252с.
17. Хайлов К. М., Финенко З. З. Взаимодействие детрита с высокомолекулярными компонентами растворённого органического вещества морской воды // Океанология. – 1968. – 8, вып.6. – С.980 – 986.
18. Хесин Р. Б. Непостоянство генома. – М.: Наука, 1985. – 472 с.
19. Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 566 с.
20. Adams D. H. The problem of cytoplasmic DNA: its extrusion/uptake by cultured cells and its possible role in cell-cell information transfer // Int. J. Biochem. – 1985. – 17. – P. 1130 – 1141.
21. Andersson J. O. Lateral gene transfer in eukaryotes // Cell Mol. Life Sci. – 2005. – 62 (11). – P. 1182 – 1197. Review.
22. Arezzo F. Sea urchin sperm as a vector of foreign genetic information // Cell Biol. Int. Rep. – 1989. – 13 (4). – P. 391 – 404.
23. Atkinson P.W., Hines E.R., Beaton S. et al. Association of exogenous DNA with cattle and insect spermatozoa in vitro // Mol. Reprod. Dev. – 1991. – №29. – P.1 – 5.
24. Boehme J., Frischer M. E., Jiang S. C. et al. Viruses, bacterioplankton, and phytoplankton in the southeastern Gulf of Mexico: distribution and contribution to oceanic DNA pools // Mar. Ecol. Prog. Ser. – 1993. – №97. – P.1 – 10.
25. Boucher Y, Douady C. J., Papke R. T. et al. Lateral gene transfer and the origins of prokaryotic groups //Annu. Rev. Genet. – 2003. – 37. – P. 283 – 328. Review.

26. Bourton N. F., Day M. J., Bull A. T. Distribution of bacterial plasmids in clean and polluted sites in South Wales river // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1982. – **44**. – P.1026 – 1029.
27. Brinster R.L., Sandgren E.P., Behringer R.R., Palmiter R.D. No simple solution for making transgenic mice // *Cell.* – 1989. – **59** (2). – P.239 – 241.
28. Dinger M. E., Mercer T. R., Mattick J. S. RNAs as extracellular signaling molecules// *J. Mol. Endocrinol.* – 2008. – **40** (4). – P.151 – 159.
29. Fry J. D., Day M. J. Plasmid transfer in the epilithon // *Bacterial genetics in natural environments.* – J. C. Fry & M. J. Gay, eds. – Chapman & Hall, London, 1990. – P. 55 – 80.
30. Guerra R., Carballada R., Esponda P. Transfection of spermatozoa in bivalve molluscs using naked DNA // *Cell Biol. Internat.* – 2005. – **29**, № 2. – P. 159 – 164.
31. Karl D. M., Bailiff M. D. The measurement and distribution of dissolved nucleic acids in aquatic environments. // *Limnol. Oceanogr.* – 1989. – **34**. – P. 543 – 558.
32. Katz L A. Lateral gene transfers and the evolution of eukaryotes: theories and data // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2002. – **52**, 5. – P. 1893 – 1900.
33. Kidwell M. G. Lateral transfer in natural populations of eukaryotes // *Annu. Rev. Genet.* – 1993. – 27. – P.235 – 256. Review.
34. Kuznetsov A. V., Pirkova A. V., Dvorianchikov G. A., et al. Study of the transfer of foreign genes into mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. eggs by spermatozoa // *Ontogenez.* – 2001. – **32**(4). – P.309 – 318.
35. Kuznetsov A. V. Evolution by communication: a revision of sperm-mediated gene transfer// *Frontiers in the convergence of bioscience and information technologies* // *Ontogenez* – 2007. – P. 322 – 326.
36. Lavitrano M., Busnelli M., Cerrito M. G. et al. Sperm-mediated gene transfer // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2006. – **18** (1-2). – P.19 – 23. Review.
37. Lucas C. E. Interrelationships between aquatic organisms mediated by external metabolites // *Oceanography, Invited lectures.* M. E. Sears [ed.]. – AAAS, Washington, 1961. – P. 449 – 517.
38. Mori T., Guo M. W., Mori E. et al. Expression of class II major histocompatibility complex antigen on mouse sperm and its roles in fertilization // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 1990. – **24**. – P. 9 – 14.
39. Paul J. H., Jeffrey W. H., DeFlaun M. F. Dynamics of extracellular DNA in the marine environment // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1987. – **53**. – P. 170 – 179.
40. Paul J. H., Jiang S. C., Rose J. B. Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1991. – **57**. – P. 2197 – 2204.
41. Pillai T. N. V., Ganguly A. K. Nucleic acid in the dissolved constituents of seawater // *J. Mar. Biol. Assoc. India.* – 1972. – **14**. – P. 384 – 390.
42. Pütter A. Die Ernährung der Wassertiere und der Stoffhaushalt der Gewässer. – Iena.:Fischer, 1909. – 148 p.
43. Quan, T. M. Chemical characterization of dissolved organic matter (DOM) in seawater: structure, cycling, and the role of biology. Ph.D. Thesis. MIT/WHOI, 2005-05. – 215 p.
44. Saye D. J., Ogunstein O., Sayer G.C., Miller R.V. Potential for transduction of plasmids in natural freshwater environment: effect of plasmid donor concentration in a natural microbial community on transduction in *Pseudomonas aureginosa* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1987. – **53**. – P. 987 – 995.
45. Silver S., Misra T.K. Plasmid-mediated heavy metal resistance // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1988. – **42**. – P. 717 – 743.
46. Smith H. O., Danner D. B., Deich R. A. Genetic transformation // *Annual Review of Biochemistry.* – 1981. – **50**. – P. 41 – 68.
47. Smith K, Spadafora C. Sperm-mediated gene transfer: applications and implications // *Bioessays.* – 2005. – **27** (5). – P. 551 – 562.
48. Spadafora C. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation// *Bioessays.* – 1998. – **20** (11). – P. 955 – 964. Review.
49. Spadafora C. Sperm-mediated gene transfer: mechanisms and implications // *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* – 2007. – **65**. – P. 459 – 467. Review.
50. Spadafora C. Sperm-mediated 'reverse' gene transfer: a role of reverse transcriptase in the generation of new genetic information // *Hum Reprod.* – 2008. – **23** (4). – P.735 – 740.
51. Strickland J. D. H. Production of organic matter in the primary stages of the marine food chain // *Chemical Oceanography.* – Acad. Press, London – N. Y., 1965. – **1**. – P. 477 – 610.
52. Wangersky P.J. The organic chemistry of sea water // *American Scientist.* – 1965. – **53**, №3. – P.358 – 374.
53. Webster N. L., Forni M., Bacci M. L. et al. Multi-transgenic pigs expressing three fluorescent proteins produced with high efficiency by sperm me-

- diated gene transfer // *Mol Reprod Dev.* – 2005. – **72** (1). – P. 68 – 76.
54. Weinbauer M. G., Fuks D., Peduzzi P. Distribution of viruses and dissolved DNA along a coastal trophic gradient in the northern Adriatic Sea // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – **59**. – P. 4074 – 4082.
55. Williams P.M. Sea surface chemistry: organic carbon and organic and inorganic nitrogen and phosphorus in surface films and subsurface waters // *Deep-Sea Res.* – 1967. – **14**. – P. 791 – 800.
56. Wu G.M., Nose K., Mori E., Mori T. Binding of foreign DNA to mouse sperm mediated by its MHC class II structure // *Am. J. Reprod. Immunology.* – 1990. – **24**. – P. 120 – 126.

Поступила 17 июня 2008 г.

После доработки 12 января 2009 г.

**Інформаційна і регуляторна роль розчиненої у морській воді органічної речовини. В. Є. Єрохін, А. В. Кузнєцов.** Запропонована гіпотеза про можливу інформаційну і регуляторну роль високомолекулярних компонентів РОР. У модельних експериментах було показано захоплення екзогенної ДНК сперматозоїдами *Mytilus galloprovincialis* Lam. Встановлено факт перенесення цієї ДНК в яйцеклітину при заплідненні з подальшою експресією трансгена в плаваючих личинках. Екзогенна ДНК проникала безпосередньо в яйцеклітини мідій шляхом трансфекції сперматозоїдів, або при обробці їх комплексом ДНК: білок: ліпіди. Відмічено, що у складі комплексу ДНК: білок: ліпіди химерні білки *V-GAL4* і в більшій мірі *V-GCN4* забезпечують доставку плазмиди *pCMVgfp* (bind) в ядро сперматозоїда мідії, що призводить до експресії *GFP*-протеїну в личинках після запліднення. Зроблено висновок, що екзогенні ДНК, які входять в склад РОР, здатні специфічним чином блокувати запліднення і втручатися в програму розвитку личинок мідії. Зроблене припущення, що транспорт екзогенної ДНК в процесі запліднення і її стабільне спадкоємство можливі тільки в окремих випадках компетентності як чоловічих, так і жіночих гамет, а також специфічного поєднання їх генотипів і епігенетичних факторів. Можливо, розчинені в морській воді ДНК, РНК, позахромосомні ДНК (плазмиди), а також їх фрагменти, будучи своєрідним носієм епігенетичної інформації, виконують інформаційну і регуляторну роль в морських екосистемах. Для обговорення використані відомі факти, одержані при дослідженні прокариот, нижчих еукаріот і морських безхребетних.

**Ключові слова:** РОР, ДНК, РНК, плазмиди, трансфекція, сперматозоїди, запліднення, *Mytilus galloprovincialis*, епігенетична інформація

**Informative and regulatory roles of dissolved organic matter in seawater. V. E. Erokhin., A.V. Kuznetsov.** A hypothesis concerning the possible informative and regulatory roles of high molecular DOM components is proposed. As an example of DOM, the epigenetic role for foreign DNA is demonstrated in the model experiments on *M. galloprovincialis*. A penetration of foreign DNA into mussel's ova as a result of direct sperm transfection or processing by the carrier DNA:protein:lipids complex is shown. The results suggested a selective binding of foreign DNA with the sperm cells from different individuals. An assumption is made that the transport of foreign DNA by fertilization, as well as its stable inheritance was happened during a gamete's competence phase, also as a specific combination of their genotypes and epigenetic factors. The competent sperm cells are capable to uptake spontaneously foreign DNA molecules from environment and to keep them in a compartment inaccessible for external DNases. In the case of DNA:protein:lipids, complex, the proteins *V-GAL4* and mostly *V-GCN4* provide the delivery of *pCMVgfp*(bind) plasmid into nuclei of mussel's sperm cells that leads to expression of *GFP*-protein in larva after fertilization. The conclusion is made, the foreign DNA (plasmids) and their fragments included in DOM are capable to block the fertilization and interfere with the developmental program of mussels. The role of these signals in fertilization and future development is not understood. Probably, DOM carries out the informational and regulatory role, and sperm cells are an extraordinary vector for the epigenetic information. The available data for microorganisms and invertebrates are used in the discussion.

**Key words:** DOM, DNA, RNA, plasmids, transfection, sperm cells, fertilization, *Mytilus galloprovincialis*, epigenetically information