

Ю. Л. НИКИФОРОВ, М. Н. САХАРОВА, М. М. БЕКНАЗАРЬЯНЦ, И. А. РАПОПОРТ

**СПЕЦИФИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ХРОМА НА ХАРАКТЕР
ПУФООБРАЗОВАНИЯ У DROSOPHILA MELANOGASTER**

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 6 V 1970)

В 1952 г. пуфы гигантских хромосом и так называемые кольца Бальбиани, открытые еще в прошлом веке, приобрели благодаря работам Беермана⁽¹⁾ характер экспериментального доказательства морфологического выражения активности генов. Вслед за Беерманом ряд авторов исследованиями на гигантских хромосомах различных представителей отряда двухкрылых показали, что существует закономерная последовательность в порядке активации пуфов, которая четко связана со стадиями онтогенеза⁽¹⁻⁵⁾. Клевер и Карлсон⁽⁶⁾ обнаружили, что гормон проторакальных желез эндизон индуцирует образование пуфов, которые возникают на известных стадиях личинки. Результаты специфического воздействия эндизона в различных концентрациях привели авторов к выводу, что активность, по крайней мере некоторых пуфов, оказывается под прямым контролем этого гормона⁽⁷⁻¹²⁾. Кротер с соавторами выдвигают иную гипотезу, согласно которой эндизон и другие агенты — цинк, магний, хлороформ, тиоацетамид, наркотики и т. д., являющиеся, по их мнению, имитаторами действия эндизона, действуют не прямо, а посредством изменения соотношения калия и натрия⁽¹³⁾.

В настоящей работе была поставлена задача изучения характера пуфообразования под влиянием одного из ферментных ядов CrCl_3 . И. А. Рапопорт⁽¹⁴⁾ показал, что это соединение вызывает у дрозофилы специфические морфологические изменения, т. е. морфозы, выражаются в меланических опухолях внутренних органов у личинок и имаго. Исследования проводились на дикой Батумской линии Д-32. Хлористый хром в концентрации $2,5 \cdot 10^{-5} M$ содержался в питательной среде, на которую затем дрозофилы откладывали яйца. Для приготовления препаратов использовали личинок 3 стадии, достигших возраста 120 час. Слюнные железы извлекались в стандартном растворе Ришера, фиксировались в 45% уксусной кислоте и окрашивались ацетокармином. Приготавливались также постоянные препараты по стандартной методике.

В каждой железе исследовались только несколько самых крупных дискальных ядер. Оценку пуфов проводили согласно общепринятым критериям по степени разрыхленности структуры и утолщению диаметра локуса в сравнении с прилегающими участками. Пуфы были разделены на 4 типа: I тип — небольшое увеличение междискового пространства, не выходящее за диаметр хромосомы; II тип — хорошо заметное расхождение дисков и небольшое превышение диаметра; III тип — разрыхленная структура и превышение диаметра хромосомы в 1,5—2 раза, IV тип — еще более крупные пуфы. Локализация пуфов проводилась по стандартной карте хромосом Бриджеса⁽¹⁵⁾.

Полученные результаты представлены в виде гистограмм (рис. 1). Сверху от шкалы, разбитой подобно карте хромосомы, на 20 групп, каждая из которых содержит 6 делений, соответствующих отрезкам («локусам») A, B, C, D, E, F, расположены данные эксперимента с воздействием хлористого хрома, а снизу от шкалы — данные контроля. Степень активности пуфов, оцениваемых по четырем типам, отражена на гистограммах соответственно в виде одного, двух, трех и четырех квадратиков.

В работе приводятся только данные по аутосомам — правому и левому плечам 2 и 3 хромосом. На 4 хромосоме никаких признаков изменения структуры обнаружено не было.

2L-хромосома. В нормальном развитии это плечо используемой нами линии имеет 17 пупфов (рис. 1A). В эксперименте число их стало 18, так как появился новый пупф 34D — II типа.

Было обнаружено появление двух других новых пупфов III типа — 34C и 39C, которые на гистограммах не отражены, так как встречаются редко. Пупф 34A в эксперименте сократил свои размеры до I типа. Ряд пупфов: 21EF, 32C, 33B показали противоположный эффект — в эксперименте они выражены сильнее, чем в контроле, и, кроме того, небольшие пупфы 25B и 25D слились в один мощный сложный пупф 25 ABCD.

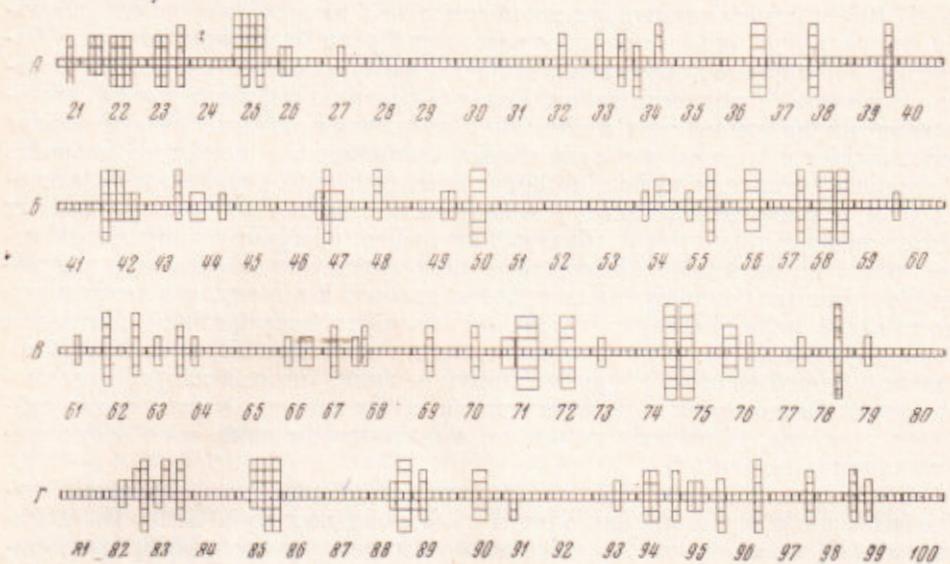


Рис. 1. Влияние CrCl_3 в концентрации $2,5 \cdot 10^{-5} M$ на пупфы у личинок *D. melanogaster* 120-часового возраста. А — 2L-; Б — 2R-; В — 3L-; Г — 3R-хромосомы

2R-хромосома. В норме для этого плеча хромосомы нами зарегистрировано 18 пупфов, в эксперименте 19 (рис. 1Б). Специфическим на воздействие хлористого хрома является, очевидно, новый пупф II типа 54DE. Редко встречается более крупный новый пупф III типа 53E. В локусах 43E, 48B, 56DE наблюдается значительное возрастание синтетической активности, пупф 42A преобразуется в мощный сложный пупф 42AD.

3L-хромосома. Общее количество пупфов в контроле 24, в эксперименте также 24 (рис. 1В). У личинок, подвергнутых воздействию хлористого хрома, зарегистрировано появление нескольких новых, но редко встречающихся пупфов — 61D, 61F, 62F, 68F. Пупф 67F в эксперименте был более крупный (III типа), чем в норме (I типа).

3R-хромосома. Это плечо личинок 120-часового возраста в нормальном развитии имеет 18 пупфов. В результате воздействия хлористого хрома суммарная протяженность материала пупфов увеличилась, но число их стало 15 (рис. 1Г). Это уменьшение общего количества пупфов произошло за счет объединения 82C и 82F путем охвата пупфообразованием промежуточных локусов. Аналогичным путем образовался и другой, такой же сложный пупф 85DF. Пупф 83E в эксперименте выражен сильнее, чем в контроле. Новым является пупф 83C, возникший, очевидно, под влиянием хрома. Подавление синтетической функции произошло в локусах 95BC, 95F и 99B, которые в норме выглядят как хорошо развитые пупфы II—III типа, а в эксперименте выражены по I типу.

Таким образом, воздействие хлористого хрома на пупфообразование у *D. melanogaster* оказалось весьма значительным. Во-первых, было заре-

гистрировано появление четырех новых пупков — 34D, 54DE, 83C, 85E, которых нет ни в норме нашей линии, ни в данных других авторов, описавших различные линии *D. melanogaster* (², ⁴, ⁵, ¹⁶). Во-вторых, тринадцать пупков — 21EF, 25AD, 32C, 33B, 42AC, 43E, 48B, 56DE, 67F, 82CF, 83AB, 83E, 85DE в эксперименте имеют значительно большие размеры, чем в контроле, что, очевидно, связано с усилением их синтетической активности. В-третьих, было обнаружено обратное явление на менее многочисленной группе: четыре пупка — 34A, 95BC, 95F, 99B в опыте спадают до минимума, что свидетельствует о достаточно сильном подавлении активного в норме синтеза в этих локусах. Кроме того, у личинок, выросших на среде с хромом, было обнаружено семь новых пупков — 34C, 39C, 53E, 61D, 61F, 62F, 68F, которые появляются с низкой частотой, вследствие чего их активность на гистограммах не отражена. Важно отметить, что все изменения в формировании пупков были вызваны низкой концентрацией хлористого хрома ($2,5 \cdot 10^{-5} M$), которая не вызвала понижения жизнеспособности личинок. В результате действия сублетальной концентрации CrCl_3 , вызвавшей морфозы (¹⁴), не было обнаружено существенных различий в формировании пупков по сравнению с действием микродозы того же вещества. Все предшествовавшие описанные в литературе эксперименты по воздействию различных агентов проводились либо в условиях инъекции личинки, либо в условиях изоляции слюнной железы в физиологическом растворе, содержащем исследуемое вещество. Неоднократно подчеркивалось (¹⁵), что минимальные на первый взгляд ранения органа могут привести к серьезным сдвигам в динамике работы пупков. Условия постановки эксперимента с воздействием микродозы вещества, внесенного в питательную среду, исключают грубое механическое воздействие и одновременно позволяют проследить весь морфогенез насекомого. Это дает возможность сопоставить местонахождение пупка на карте хромосом с фенотипическим проявлением модификации, что представляет собой принципиально новый подход к локализации гена.

Локализация генов на мутационном материале, осуществляемая с помощью кроссинговера, использует различия между аллеломорфами. Результат кроссинговера учитывается во втором, иногда в третьем поколении. Локализация генного материала на основе сопоставления фенокопий с изменениями в картине пупков осуществляется в нулевом поколении и представляет собой результат прямого вмешательства ингибиторов в синтез ферментов. Несмотря на то что новый подход более грубый, чем локализация генов на мутационном материале, он ценен возможностью перекрыть один вид информации, с помощью которого строится карта хромосом, другим, независимым, полученным в специализированной функциональной сфере. Важным преимуществом в использовании корреляции между индуцированными пупками и фенокопиями является возможность наблюдать сразу полный набор хромосом, между тем как обычный способ генной локализации обычно тщательно исследует кроссинговер лишь на отдельной хромосоме.

Приведенные выше результаты эксперимента свидетельствуют о том, что мы столкнулись с веществом, действие которого на пупкообразование носит, несомненно, иной характер, чем влияние других агентов, таких как экдизон, калий, натрий, магний, хлороформ, наркотики и другие.

И. А. Рапопорт (¹⁴) показал, что хром в числе других ферментных ядов вызывает специфические формообразовательные изменения у личинок и имаго *D. melanogaster* путем инактивации важного для морфогенеза фермента или группы ферментов.

Результаты настоящего эксперимента позволяют предположить, что оригинальность действия хрома на пупкообразование может быть связана с регуляцией функции фермента по типу обратной связи. Можно допустить, что первым этапом влияния хрома на формирование пупка является блокирование катализитической активности фермента, необходимого для

морфогенеза или метаболизма. В связи с этим увеличивается количество вещества, преобразуемого этим ферментом в норме, но не переходящего после отравления фермента в следующую стадию синтеза. Такое повышение концентрации субстрата на уровне блокированного звена может служить сигналом для осуществления синтеза фермента, который должен преобразовать блокированный метаболит. Иными словами, если в нашем

материале ингибитор полностью инактивирует фермент, то создаются предпосылки для возникновения специфического пуфа. Если же фермент подавляется частично, то это также может послужить стимулом для преодоления каталитического дефицита. По-видимому, таким путем в нашем эксперименте возникла многочисленная группа пуфов с повышенной по сравнению с контролем активностью.

На рис. 2 показан уровень разрыва связи между ферментом и субстратом в результате отравления фермента. Восстановление синтеза в том же гене происходит по принципу обратной связи. С возникновением новых индуцированных пуфов часто морфологически проявляется ряд синтезов, которые до этого в политеинной хромосоме не удается локализо-

Рис. 2. Схема обратной связи, вызывающей появление пуфа под влиянием ферментного яда

вать из-за их малой интенсивности, связанной или с ограниченными потребностями в синтезируемом веществе, или с большой продолжительностью синтеза. Кроме того не исключена возможность задержки в активном состоянии пуфов, которые в норме угасают к 120 часам, или интенсивного включения в работу новых, максимум активности которых приходится не на эту, а на более позднюю стадию развития. Эти предположения можно проверить, изучая динамику развития пуфов в синхронизированной культуре. Возникновение новых пуфов возможно и в тех случаях, когда инактивация фермента ведет к синтезу каталитического продукта в другом, нередко удаленном гене, в норме не являющемся активным для данного органа. В этом случае основной механизм обратной связи, очевидно, модифицируется.

Между трактовкой пуфов, которая дается, с одной стороны, цитофизиологами и, с другой, генетиками, существует расхождение, поскольку по генетическим данным на отрезках хромосом между нормальными пуфами находятся десятки тысяч генов, способных давать летальные мутации. Следовательно, эти гены необходимы для отдельных органов или всего организма и участвуют в формировании специфических ферментов. Для отдельного органа, например слюнной железы, количество производящих ферменты генов должно составлять величину порядка нескольких тысяч, если учитывать, помимо метаболической активности, еще и формообразование. Таким образом, ферментативные яды, индуцирующие новые пуфы, коррелированные с фенокопиями, обогащают «пуфотип», приближая его в какой-то мере к генотипу.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
6 V 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ W. Beegman, Chromosoma (Berl.), **5**, 139 (1952). ² H. I. Becker, ibid., **10**, 654 (1959). ³ M. E. Breuer, C. Pavan, ibid., **7**, 371 (1955). ⁴ M. Aschbacher, ibid., **21**, 398 (1967). ⁵ H. D. Berendes, ibid., **17**, 35 (1969). ⁶ U. Clever, P. Karlson, Exp. Cell. Res., **20**, 623 (1960). ⁷ U. Clever, Chromosoma (Berl.), **12**, 607 (1961). ⁸ U. Clever, ibid., **13**, 385 (1962). ⁹ U. Clever, ibid., **13**, 651 (1963). ¹⁰ U. Clever, Develop. Biol., **6**, 73 (1963). ¹¹ R. Panitz, Biol. Zbl., **83**, 197 (1964). ¹² H. D. Berendes, Chromosoma (Berl.), **22**, 274 (1967). ¹³ H. Krogger, M. Lezzi, In: Annual Review of Entomology, **11**, 1 (1966). ¹⁴ И. А. Рапопорт, Тр. Инст. цитологии, гистологии и эмбриологии АН СССР, **2**, в. 1, стр. 3 (1948). ¹⁵ C. B. Bridges, J. Hered., **26**, 60 (1935). ¹⁶ В. А. Лычев, Цитология, **7**, 325 (1965).