

М. Б. ЕВГЕНЬЕВ, Э. И. ЛУБЕННИКОВА, И. М. ШАПИРО

**АВТОРАДИОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕДУПЛИКАЦИИ
ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ ДРОЗОФИЛЫ
ХРОНОЛОГИЯ РЕДУПЛИКАЦИИ ДНК В НОРМЕ И ПРИ ТРАНСЛОКАЦИИ**

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 6 VII 1971)

В предыдущем сообщении было показано, что последовательность редупликации ДНК дисков хромосом не меняется при инверсии (¹). Из этого следовало, что хронология редупликации ДНК данного района является автономной, т. е. зависит от свойств включенных в него дисков. Подобное заключение было сделано и на основании анализа редупликации ДНК хромосом *D. melanogaster* при некоторых перестройках (^{2, 3}). С другой стороны, опыты с межвидовыми гибридами *D. virilis* и *D. littoralis* и результаты анализа хронологии репродукции политенных хромосом *D. melanogaster* (⁴) позволили предположить, что в клетках высших организмов имеется также геномный контроль редупликации ДНК хромосом. В связи с этим интересно было получить дополнительные данные о редупликации политенных хромосом при транслокациях. Изучению этого вопроса посвящено настоящее сообщение.

Опыты были проведены на личинках третьего возраста трех линий *D. virilis*, две из которых имели реципрокные транслокации участков третьей и пятой хромосом, а третья линия не имела изменений в кариотипе. Линии с транслокациями отличались по генам *ru*, *st*, *V³*, *pe*, *sv*. При цитологическом анализе оказалось, что места разрывов в транслоцированных хромосомах в обеих линиях совпадали. В результате транслокации пятая хромосома была практически полностью перенесена на оставшийся участок третьей хромосомы, тогда как дистальный район третьей хромосомы оказался в непосредственной близости от хромоцентра. Был изучен дистальный участок пятой хромосомы от *Aa* до *H1*, оказавшийся в результате транслокации более отдаленным от хромоцентра, чем в нормальном кариотипе. В третьей хромосоме исследован весь транслоцированный участок от *Aa* до *Ei*. В работе использовали карту политенных хромосом *D. virilis* (⁵).

Слюнные железы инкубировали 15 мин. в растворе Рингера для насекомых, содержащем H^3 -тимидин в концентрации 500 μ C / мл с удельной активностью 30 С / ммол (Чехословакия). Метод приготовления радиоавтографов и окраски препаратов был описан в (⁴). Как известно, популяция клеток в слюнных железах *Diptera* является асинхронной в отношении редупликации ДНК (⁵). После импульсной метки H^3 -тимидином можно видеть: 1) немеченые ядра, т. е. ядра клеток, находившихся вне S-периода во время метки; 2) клетки, хромосомы которых были интенсивно мечены по всей длине, и 3) клетки, в которых метка располагалась лишь над некоторыми дисками. Для анализа выбирали ядра, относящиеся к третьему типу. Для иллюстрации радиоавтографы изученных участков третьей и пятой хромосомы *D. virilis* представлены на рис. 1. В каждом случае анализировали от 80 до 100 хромосом, регистрируя наличие или отсутствие метки в дисках. При этом для удобства анализа изучаемый район третьей хромосомы был разделен на 8, а в пятой хромосоме на 10 участков. От общего числа зерен над хромосомой зависит число меченых дисков в ней, т. е. чем больше зерен над данной хромосомой, тем, весьма вероятно, выше доля меченых дисков. Чтобы исключить этот фактор, для сравнения выбирали пары, имеющие одинаковое число зерен над изучаемыми районами

хромосом. В указанных выше участках хромосом каждый диск (или группу) учитывали как меченый или немеченый, а затем подсчитывали процент меченых дисков по всем парам хромосом. Меченым считали диск, содержащий 3 или больше зерен серебра.

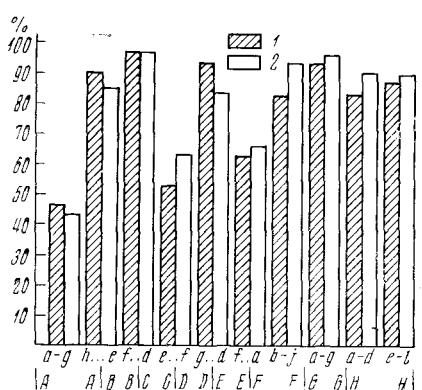


Рис. 2

Рис. 2. Индекс метки дисков в двух линиях с транслокацией участка пятой хромосомы. Транслоцированная линия *D. virilis* 151 T3,5 (1) и *D. virilis* 152 T3,5 (2)

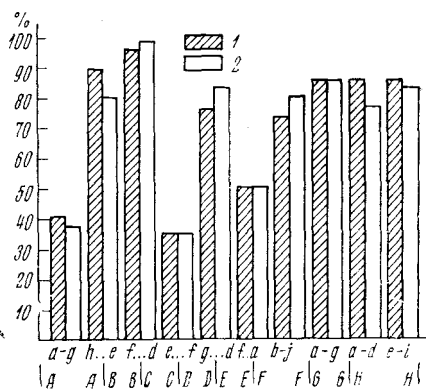


Рис. 3

Рис. 3. Индекс метки дисков пятой хромосомы в норме (1) и в двух линиях с транслокацией (2)

При статистической обработке ошибку измерений определяли по формуле $m = \sqrt{\frac{P(1-P)}{n-1}}$, где P — частота встречаемости метки в данной группе дисков (в %), которую в дальнейшем будем называть индексом метки, n — число проанализированных пар хромосом. Различия средних оценивали согласно t — критерию Стьюдента.

Результаты подсчета индекса метки в 30 парах транслоцированных участков с пятой хромосомы на третью представлены на рис. 2. Можно видеть, что индекс метки по всем группам дисков хорошо совпадает в обеих транслокациях. Имеющиеся небольшие различия индекса метки в дисках $C_e - D_f$ и $D_g - E_d$ недостоверны. Таким образом, можно заключить, что исследованные две линии с транслокациями сходны не только по размерам и по локализации транслоцированного участка, но и по хронологии их репликации. Это послужило основанием при последующем анализе объединить данные по этим транслокациям.

На рис. 3 представлены результаты индекса метки в 46 парах пятых хромосом *D. virilis* и в линиях с транслокацией. Можно видеть, что индексы метки в обоих случаях хорошо совпадают. Отсюда следует, что при транслокации участка пятой хромосомы на третью не меняется хронология редупликации ДНК его дисков.

Далее, мы сравнивали индексы метки в 20 парах участков третьей хромосомы, транслоцированных на пятую с аналогичными районами в линии с нормальным кариотипом. На рис. 4 можно видеть, что индексы метки в изучаемых парах совпадают. Различия в дисках $B_e - C_s$ и $D_d - D_i$ не существенны ($P > 99\%$). Отсюда можно заключить, что транслокация не изменила очередности редупликации ДНК в дисках данного участка третьей хромосомы.

Таким образом, из представленных данных следует, что хронология редупликации ДНК в дисках какого-либо участка хромосомы не меняется после изменения его положения в геноме. Это указывает на относительную автономность процесса редупликации данной группы репликонов. Особый интерес с этой точки зрения представляют диски E_{1-4} третьей хромосомы, непосредственно прилегающие к месту разрыва. Именно в них в первую

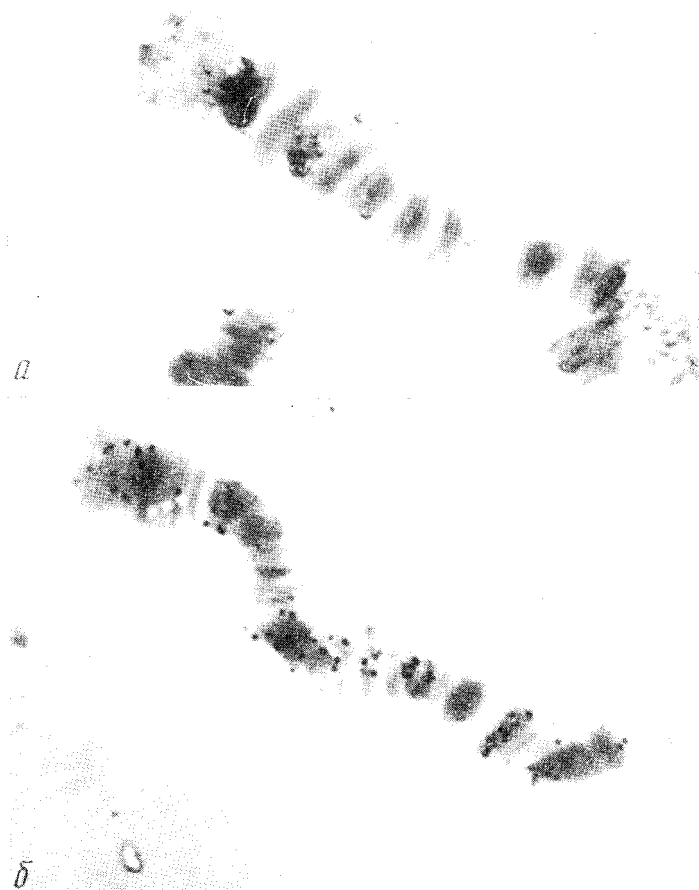


Рис. 4. Радиоавтографы исследованных участков третьей хромосомы (а) и пятой хромосомы (б) слюнных желез *D. virilis*. Импульсная метка 32 -тимидином

К статье Т. Ф. Кулешовой и Ф. Н. Макарова, стр. 243

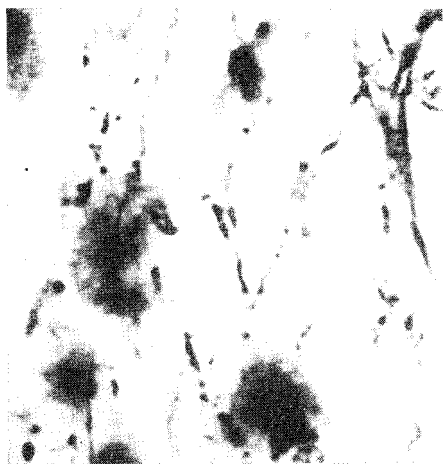


Рис. 2. Дегенерирующие комиссуральные волокна в 4-м слое коры передней супра-сильвиевой борозды. Методика Наута — Гиганс. Об. 20 $\times$. Оку. 15 $\times$

очередь можно было ожидать изменения порядка редупликации, поскольку после транслокации они оказываются вблизи хромоцентра, состоящего, как известно, из гетерохроматина. Как видно из рис. 3, существенных различий в индексе метки этих дисков при транслокации по сравнению с нормой не было обнаружено. Это позволяет считать, что в данном случае гетерохроматиновые районы хромосом не оказывают заметного влияния на хронологию редупликации ДНК в прилежащих районах. К аналогичному выводу мы пришли ранее при анализе редупликации ДНК в микрохромосомах *D. virilis* и *D. littoralis*. У *D. littoralis* шестая хромосома представляет собой практически полностью инвертированную микрохромосому *D. virilis*. В результате проксимальный конец этой хромосомы у *D. virilis* оказывается в непосредственной близости к хромоцентру, хронология редупликации микрохромосомы при этом не меняется. Было показано ⁽⁶⁾, что временной контроль репликации ДНК гетерохроматиновых и эухроматиновых сегментов полнотенных хромосом *D. melanogaster* является автономным и сохраняется при дупликациях и транслокациях.

При объяснении полученных данных мы исходили из гипотезы о неодинаковой степени спирализации молекулы ДНК как фактора, определяющего время их редупликации. Менее спирализованные участки будут реплицироваться раньше, чем более спирализованные. Участки ДНК с одинаковой степенью спирализации, независимо от их локализации в одной или в разных хромосомах, будут реплицироваться синхронно. Степень спирализации данного диска, являясь свойством *sui generis*, не должна меняться при его транслокации, дупликации и т. д., не должна поэтому изменяться при таких перестройках и хронология их редупликации. Это проявится как автономность процесса редупликации ДНК в данном диске (или дисках), что и наблюдалось в экспериментах ⁽¹⁻³⁾.

С другой стороны, ограниченное число участков хромосом, различающихся по степени спирализации, должно приводить к упорядоченности вариантов образцов метки дисков одной и той же хромосомы и между хромосомами. Действительно, это было обнаружено в опытах на полнотенных хромосомах *D. melanogaster* ⁽²⁾. Вместо с тем, очевидно, что при прочих равных условиях продолжительность репликации данного диска зависит от количества в нем ДНК.

Результаты опытов по межвидовой гибридизации ⁽¹⁾ можно объяснить тем, что в гибридном геноме происходит разбалансированность системы генетического контроля, вследствие чего могут возникать локальные изменения степени спирализации некоторых участков хромосом, что проявляется в изменении хронологии редупликации ДНК.

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
23 VI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. Б. Евгеньев, Э. И. Лубенникова, И. М. Шапиро, ДАН, 200, № 5 (1971). ² E. F. Howard, W. Plaut, J. Cell Biol., 39, 2, 415 (1968). ³ W. Plaut, Genetics, Suppl. 61, 239 (1969). ⁴ W. Plaut, D. Nash, T. Fanning, J. Mol. Biol., 16, 85 (1966). ⁵ T. C. Hsu, Univ. Texas Publ., № 5204, 35 (1952). ⁶ A. Sengun, Pathol. Biol. Semaine Hop. (N. S.), 9, 753 (1961). ⁷ H. G. Keyl, C. Pelling, Chromosoma, 14, 347 (1963). ⁸ W. Plaut, D. Nash, The Role of Chromosomes in Development, N. Y.—London, 1964, p. 113. ⁹ H. D. Berendes, Chromosoma, 20, 32 (1966). ¹⁰ J. I. Valencia, W. Plaut, J. Cell Biol., 47, 2, 2, 216 (1970).

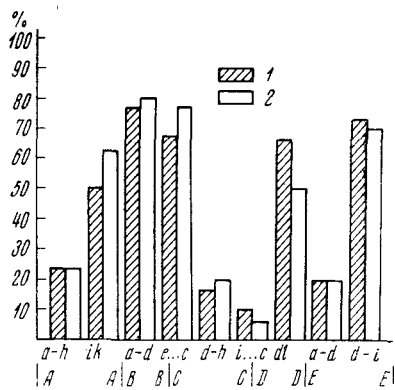


Рис. 4. Индекс метки дисков в участке третьей хромосомы в норме (1) и в двух линиях с транслокацией (2)