

Л. Я. ЛЕВИНА

**ЭФФЕКТ ПОЛОЖЕНИЯ ГЕНА CUBITUS INTERRIPTUS
У DROSOPHILA MELANOGASTER**

**АВТОРАДИОГРАФИЧЕСКИЙ И ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ
ТРАНСЛОЦИРОВАННОГО УЧАСТКА IV ХРОМОСОМЫ
ПРИ ЭФФЕКТЕ ПОЛОЖЕНИЯ**

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 8 IV 1974)

Зависимость действия гена от его положения в хромосоме в настоящее время можно считать доказанной (¹⁻³). В связи с этим эффект положения можно рассматривать как интересную модель для анализа взаимодействия генетических единиц в хромосоме эукариотов. Однако до настоящего времени нет экспериментальных данных, позволяющих вскрыть молекулярную природу инактивации генов при эффекте положения. Остается неизвестной взаимосвязь эффекта положения с процессами репликации.

В связи с этим основной целью данной работы было изучение особенности репликации ДНК в транслоцированном участке IV хромосомы *Dr. melanogaster* при эффекте положения гена *subitus interruptus* (*s.i.*).

Материалом для работы послужили полученные ранее по методу Н. П. Дубинина, Б. Н. Сидорова (¹) линии *Dr. melanogaster* с транслокациями, несущими эффект положения гена *s.i.* Самцов нормальной линии Д-32 облучали дозой 5000 р (РУП-200, 290 кв, 15 а, 240 в, расстояние 16 см, время 21 мин.) и скрещивали с самками 86 линии, гомозиготной по двум рецессивным генам IV хромосомы *s.i.* и *eu.* В F₁ обнаруживали мух с проявлением признака *s.i.* Дальнейшее исследование проводили на клетках с транслокацией IV хромосомы на 3R (рис. 1*), с сильно выраженным эффектом положения гена *s.i.*

Слюнные железы личинок 3-го возраста *Dr. melanogaster* извлекали в физиологическом растворе Бидла, инкубировали в растворе Н³-тимидина в концентрации 10 мкС/мл (уд. активность 23С/ммол, Англия) в течение 20 мин. при комнатной температуре. Фиксированные смесью спирт — уксусная кислота (3:1) 30 мин. железы окрашивали 2% лакт-орсеином. Материал обрабатывали последовательно по несколько секунд 45% СН₃СООН, 45%, 75% молочной кислотой. Давление препараты получали на специально приготовленных предметных стеклах с подслоем 1% желатины под силиконизированными покровными стеклами. После удаления покровных стекол, на охлажденной жидким азотом металлической пластине, препарат проводили по понижающей серии спиртов. Препараты погружали в теплую воду (40°) и затем заливали жидкой фотоэмульсией типа «М» (НИИХИМФОТО, Москва). Автографы экспонировали при 4° от 20 дней до 6 мес., проявляли в Д-19, фиксировали Ф-10, переводили в постоянные препараты и анализировали.

Известно, что клетки в слюнных железах *Dr. melanogaster* синтезируют ДНК асинхронно. Введение импульсной метки Н³-тимидина обнаруживает два типа меченых клеток: 1) клетки с интенсивно мечеными хромосомами; 2) клетки с меткой над некоторыми участками хромосом, что связано с тем, в какой момент периода S находились клетки во время введения метки. В дальнейшем анализе были использованы только клетки второго типа (рис. 2).

* Рис. 1, 2, 3 см. на вклейке к стр. 455.

Анализ проводили по числу зерен серебра в каждой клетке над двумя гомологами IV хромосомы. Один из гомологов (t_1) всегда занимает нормальное положение у хромоцентра (рис. 1а), другой транслоцированный гомолог (t_2) перенесен на хромосому 3R (рис. 1б). Были выбраны препараты с интенсивностью метки над хромосомами от 5 до 25 зерен серебра в обоих гомологах и примерно одинаковым фоном.

Результаты анализа получены следующим образом. Определяли общее количество зерен (m) над t_1 и t_2 , далее вычисляли долю зерен серебра, приходящуюся на каждый гомолог по отношению к общему числу зерен в обеих хромосомах (m_{t_1}/m и m_{t_2}/m).

В качестве нулевой гипотезы принято, что вероятность включения H^3 -тимидина в каждую из гомологичных хромосом одинакова. Это должно означать, что включение идет одновременно в обе хромосомы и с одинаковой скоростью. Несовпадение данных (вычисленное при помощи критерия χ^2) дает возможность опровергнуть нулевую гипотезу. Подсчет около 1000 зерен проведен в 70 клетках. Вычисленное среднее значение (m_{t_1}/m)_{ср} в соответствии с нулевой гипотезой должно быть равно 0,5. Эта величина сравнивалась с эмпирической по критерию χ^2 .

Оказалось, что (m_{t_1}/m)_{ср} = 0,65 ± 0,0187, соответственно $m_{t_2}/m = 0,35$. Различия статистически достоверны, $P \ll 1\%$. Это означает, что включение H^3 -тимидина в исследуемых хромосомах идет неодинаково. Как известно, хромосомы эукариотов представляют собой полирепликонную систему. Однако механизмы, лежащие в основе репликационной организации, до сих пор не выяснены.

До недавнего времени считали, что хромосомные участки сохраняют исходную последовательность в общей последовательности репликации, когда они перенесены на другую хромосому (⁴⁻⁵). Однако наряду с этими данными появились другие, противоречащие представлению об автономности отдельных участков хромосом в процессе репродукции (⁶). Было замечено, что у грызунов в участках X-хромосом, транслоцированных на аутоosome, наблюдается изменение времени репликации (⁷⁻⁸). Количественное автордиографическое исследование репликации аномальных хромосом человека в сравнении с их нормальными гомологами, а также изучение влияния аномалий хромосомного набора на репликацию неперестроенных хромосом показало, что порядок репликации отдельных участков хромосом не является строго закрепленным (⁹). Существование координированного характера репликации отдельных участков внутри одной и той же хромосомы показано и другими авторами (¹⁰). Все это наводит на мысль, что в инактивации перенесенных локусов при эффекте положения также может играть роль изменение в порядке репликации данных локусов. Изучение хронологии редупликации ДНК по включению H^3 -тимидина в нормальном и транслоцированном гомологах IV хромосомы с эффектом положения гена с.и. показало, что репликация в гомологах идет неодинаково. В транслоцированном гомологе при эффекте положения обнаруживается сниженный синтез ДНК. На основании этих данных можно считать, что при эффекте положения хронология редупликации ДНК в транслоцированном гомологе дрозофилы меняется.

Известно (¹¹), что при эффекте положения сами гены структурно не повреждены. В связи с этим представляют интерес данные, полученные при флюоресцентном анализе политечных хромосом дрозофилы с транслокацией, проявляющей эффект положения.

Препараты хромосом готовили как и для автордиографии. Окраска проводилась 0,5% флюорохромом — атебрином (Atebrin, ФРГ) после буферного раствора рН 7,0. Просмотр препарата осуществляли в ультрафиолетовых лучах на микроскопе МЛ-2 (лампа 250 вт с фильтром). Микрофотографии получены с пленки М-200, обработанной фенидонгидрохиноновым проявителем на фотобумаге № 7.

Флюоресцентный анализ после окраски атебрином политенных хромосом *Drosophila melanogaster* показал, что IV хромосома имеет несколько ярких полос свечения. Обычно наблюдается яркая широкая полоса в локусе 102 D, небольшое пятно в районе 101 F и менее яркая полоса в 102 EF (рис. 3а). Подобное свечение наблюдалось рядом авторов при использовании различных флюорохромов⁽¹²⁻¹³⁾. Дифференциальное свечение IV хромосомы является надежным средством для маркирования ее в любой клетке. В связи с этим она может быть легко обнаружена в случае транслокации даже в клетках с не очень хорошим разбросом хромосом. В наших опытах в случаях транслокации IV хромосомы на 3R (в линиях *Drosophila melanogaster* с эффектом положения гена *s.i.*) наблюдается изменение характера свечения транслоцированного гомолога IV хромосомы. На рис. 3 видно, что транслоцированный гомолог всегда обнаруживает в районе прикрепления к другой хромосоме большую яркую полосу свечения, которой не наблюдается у нормального гомолога (рис. 3б).

Природа дифференциального свечения участков хромосом, окрашенных флюорохромами, до конца не выяснена и активно обсуждается в литературе⁽¹⁴⁾. Многие исследователи считают, что основой для избирательного связывания флюорохромов с ДНК является химическая гетерогенность ДНК, а именно преобладание А—Т-пар оснований. Интересно, что у млекопитающих светящиеся области хромосом совпадают с позднореплицирующимися районами⁽¹⁴⁾. В последнее время появились данные, указывающие на взаимосвязь поздней репликации с ДНК, богатой АТ-парами⁽¹⁴⁾. Следует иметь в виду, что ген *s.i.* находится непосредственно вблизи линии разрыва — присоединения IV хромосомы⁽¹¹⁾, как раз в зоне, меняющей свое свечение.

Ранее⁽¹¹⁾ было показано, что распространение эффекта положения ограничено. Только достаточно близкие к гену разрывы и присоединения дают изменения его действия. В настоящее время известен еще лишь один случай, когда локус, изменивший свое положение и свою функциональную активность в результате транслокации, изменил свое свечение⁽¹²⁾. В этих наблюдениях нельзя объяснить изменение свечения различиями в нуклеотидном составе ДНК. Интенсивность свечения зависит, по-видимому, от структурно-функциональной организации локуса, т. е. от его нуклеотидного состава, последовательности и повторяемости нуклеотидов, и от структуры комплекса ДНК — белок, степени его спирализации, а также функционального состояния локуса. Одной из характерных особенностей проявления эффекта положения является инактивация генов, вызванная их переносом к гетерохроматину⁽¹⁻²⁾. Это обнаружено не только на локусах хромосом *Drosophila melanogaster*, дающих морфологически видимый эффект, но и на молекулярном уровне⁽³⁾ на локусах, определяющих синтез отдельных легковыявляемых белков — амилазы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы. Причина инактивации гена при приближении к гетерохроматину остается пока малоизученной. Не исключено, что особенности репликации гетерохроматина, а именно запаздывание его репликации, играют важную роль в процессах функционирования локуса при эффекте положения. Учитывая изменение в хронологии репликации в транслоцированном гомологе, показанное авторами радиографически, и изменение свечения при окраске флюорохромом, можно предполагать, что ген *s.i.* перенесенный при транслокации, возможно, попадает в условия задержанной репликации, что существенно сказывается на его функционировании.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. П. Дубинин, Б. Н. Сидоров, Биол. журн., т. 3, 2 (1934). ² W. K. Backer, *Advances Genetics*, v. 14, 133 (1968). ³ В. А. Гвоздев, Т. И. Герасимова, В. Я. Бирштейн, *Генетика*, т. 9, 6, 64 (1973). ⁴ Н. У. Barr, I. I. Valencia, *W. Plant, J. Cell Biol.*, v. 39, 8a (1968). ⁵ М. Б. Евгеньев, Э. И. Лубенникова, И. М. Шапиро, ДАН, т. 204, № 1, 215 (1972). ⁶ W. E. Kalisch, K. Hägele, *Chromosoma*, v. 44, 3, 265 (1973). ⁷ N. Bianchi, M. S. A. de Bianchi, *Genetics*, v. 61, Suppl., 275 (1969). ⁸ В. М. Cattapanach, I. H. Isaacson, *Genetics*, v. 57, 331 (1965). ⁹ О. А. Подугольникова, Автореф. кандидатской диссертации, Л., 1973. ¹⁰ W. Howard, *Plant J. Cell Biol.*, v. 39, 2, 415 (1968). ¹¹ Н. П. Дубинин, Н. Н. Соколов, Г. Г. Тиняков, Биол. журн., т. 4, 4, 707 (1935). ¹² К. Р. Adkisson, W. I. Perreault, H. Gay, *Chromosoma*, v. 34, 2, 190 (1971). ¹³ А. Б. Иорданский, А. А. Прокофьева-Бельговская и др., ДАН, т. 201, № 1 (1971). ¹⁴ А. Ф. Захаров, *Итоги науки*, 1, 45 (1973).