

УДК 571.312.342

ГЕНЕТИКА

В. Б. МАКАРОВ, В. В. САФРОНОВ

АВТОРАДИОГРАФИЧЕСКИЙ И ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗЫ ТРАНСКРИПЦИИ В ХРОМОСОМАХ ТИПА ЛАМПОВЫХ ЩЕТОК ООЦИТОВ ТРИТОНОВ

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 11 III 1974)

Суммируя факты о поведении и структурно-функциональной организации хромомера в хромосомах типа ламповых щеток (¹, ²), Кэллан (³) предположил, что каждый хромомер состоит из серии тандемно расположенных генных копий, последовательно вступающих в транскрипцию по мере выхода оси ДНК из хромомера. Следствием данной гипотезы является наличие постоянного продвижения оси латеральных петель и поляризация синтеза ДНК у тонкого конца петли, соответствующего месту выхода ДНК из хромомера.

В данной работе мы предприняли попытку экспериментального анализа следующих вопросов. 1) Является ли постоянное продвижение ДНК-овой оси петель универсальным принципом при функционировании хромомера в хромосомах типа ламповых щеток? 2) Существуют ли иные картины дискретности транскрипции в пределах генетической единицы?

Если нарастание длины меченого участка от тонкого к толстому концу гигантской гранулярной петли отражает процесс протяжки ее ДНК-овой оси (²), то обнаружение аналогичного мечения всех или большинства ординарных петель может, на наш взгляд, служить в качестве положительного ответа на первый из поставленных вопросов.

Эксперименты выполнены на самках гребенчатых тритонов *Triturus cristatus*. Синтез РНК изучали методом автордиографии с ³H-уридином (производство ЧССР, удельная активность 26 С/ммоль, в дозах 150—200 мкС на 1мл среды). Постоянные препараты хромосом готовили по методу, предложенному Кэлланом (⁴). Для инкубации ооцитов *in vitro* использовали среду, содержащую 9 частей 0,1 М КСl/NaCl в отношении 3:1+1 часть 0,067 М фосфатного буфера, рН среды 7,0—7,2. Для обеспечения максимального включения изотопа при ограниченном времени инкубации обработку ооцитов ³H-уридином проводили следующими способами: 1) яичники выводили из тела животного и, сохраняя их связь с кровообращением, помещали в среду с изотопом; 2) тоже, что и в 1), но на главные сосуды накладывали лигатуру; 3) яичники вырезали и инкубировали *in vitro* в среде с изотопом; 4) то же, что в 3), но для истощения собственного пула предшественника яичники предварительно инкубировали в среде без ³H-уридина в течение 1 часа.

Для автордиографии препараты хромосом покрывали жидкой эмульсией типа «М» и экспонировали при 4° в течение 14—40 суток. Цитологический анализ проводили на отцентрифугированных хромосомах с помощью фазово-контрастного микроскопа с водноиммерсионным объективом 40× и 70×. При изучении включения ³H-уридина в хромосомы типа ламповых щеток эксперименты ставились следующим образом. Независимо от способа обработки ооцитов изотопом из инкубационной камеры с 10-минутным интервалом в течение 6 час. отбирали порции ооцитов, из которых готовили постоянные препараты для автордиографии.

Слабомеченные петли появляются уже через 1 час после начала инкубации с H^3 -уридином, причем гранулы серебра равномерно распределены по всей длине петель. Следует отметить, что время инкубации ооцитов с изотопом, требующееся для появления хорошо меченных хромосом, в значительной мере зависит от жесткости обработки и является минимальным в случае предварительного истощения собственного пула предшественника. При увеличении времени инкубации интенсивность метки увеличивается.

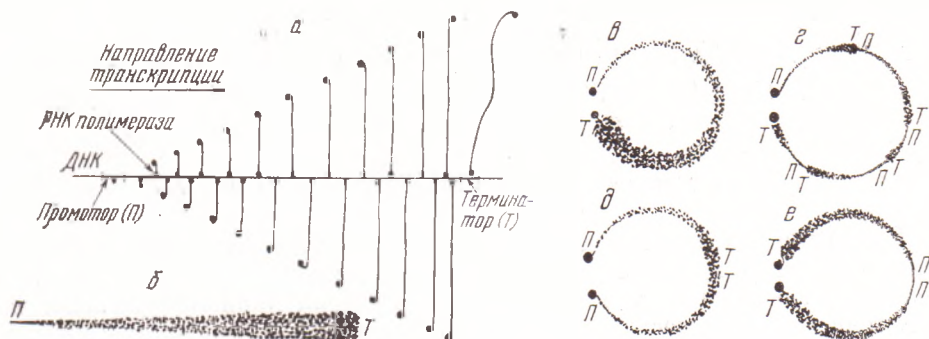


Рис. 2. Схема транскрипции и образования матрикса в латеральных петлях хромосом типа ламповых щеток. *а* — схема синтеза РНК, *б* — морфология единицы транскрипции, *в* — монополяризованная петля, *г* — многополяризованная петля с однонаправленными е.п., *д*, *е* — двухполяризованная петля с различным направлением е.п.

ется (рис. 1), однако картина мечения не претерпевает каких-либо качественных изменений. Необходимо подчеркнуть, что в зависимости от стадии развития ооцита и некоторых физиологических условий длина петель может значительно варьировать, однако в любом случае, независимо от размеров петель, включение H^3 -уридина происходит равномерно по всей их длине.

Сопоставление полученных результатов с электронно-микроскопическими фотографиями функционирующих петель, полученными в (3), позволяет сделать некоторые выводы о функциональной организации хромомера в мейотических хромосомах эукариотов. Основной из них заключается в том, что синтез РНК происходит на стационарных петлях по всей их длине одновременно. Если бы транскрипция в ординарных петлях была поляризована, то, учитывая наши данные о том, что H^3 -уридиновая метка покрывает петли в течение менее чем 2 час., пришлось бы предположить, что продвижение их оси происходит со скоростью 50—200 мк в 1 час. В таком случае полная протяжка ДНК хромомера должна занимать всего несколько часов. Однако известно, что стадия ламповых щеток в ооцитах тритона длится около 200 дней (4). Таким образом, каждая латеральная петля хромосом типа ламповых щеток является деспирализованным участком ДНК с фиксированной точкой начала и конца транскрипции (промотора и терминатора). Молекулы РНК-полимеразы постоянно продвигаются по ДНК и каждая из них считывает реплику РНК. Чем дальше находится РНК-полимераза от промотора, тем длиннее РНК, которую она считывает. В силу этого каждый транскрибирующий участок ДНК от промотора до терминатора в электронном микроскопе выглядит как характерная единица поляризации в виде «елочки» (5) (рис. 2а). Поскольку в интактных петлях хромосом типа ламповых щеток синтезируемые молекулы РНК сразу же упаковываются в гранулы РНП, каждая единица поляризации (е.п.) в световом микроскопе выглядит как непрерывный тяж, равномерно расширяющийся от тонкого к толстому концу (рис. 2б).

Цитологический анализ препаратов, содержащих хорошо расправленные хромосомы, показал, что для большей части латеральных петель вне зависимости от их длины характерно наличие одной е.п., т. е. участки,

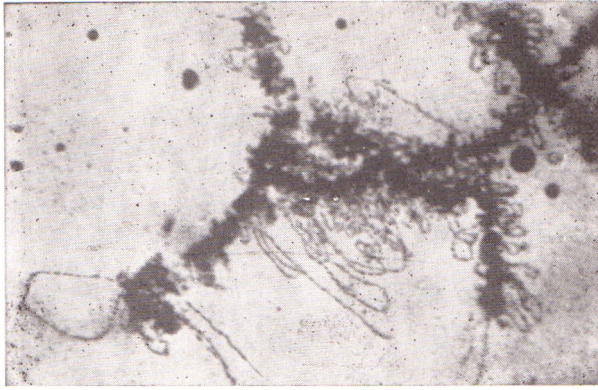


Рис. 1. Петли хромосом типа ламповых щеток, меченные H^3 -уридином в течение 2 час.

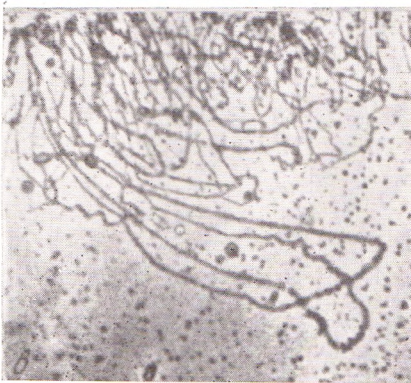
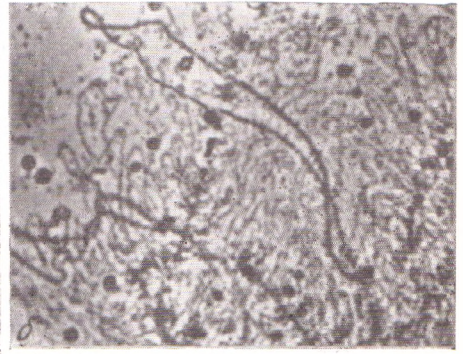
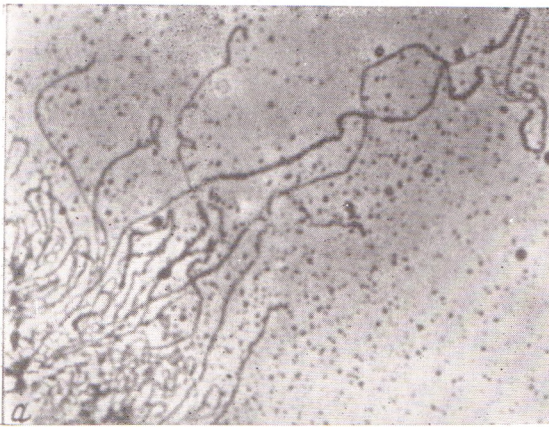


Рис. 3. Виды многополяризованных петель. *a* — шесть тандемно расположенных с.п., *б* — две с.п. в пределах петли, транскрипция направлена от средней части к хромомерам, *в* — две с.п. в пределах петли, транскрипция направлена от хромомеров к средней части, *г* — комбинация из *б* и *в*

соответствующие тонкому и толстому концам петли, всегда непосредственно прилежат к хромомерам (рис. 2*в*). Однако в ряде случаев нами обнаружены петли, составленные из нескольких е.п. Каждая из таких петель насчитывает от 2 до 6 сегментов матрикса, ограниченных тонким и толстым концами. Одну из петель оказалось возможным локализовать в пределах левого плеча XII бивалента. Данная петля чаще всего составлена из 6 одинаково ориентированных е.п. (рис. 2*г*, 3*а*). Размеры отдельных е.п. варьируют от 20 до 70 мкм и в пределах одной петли встречаются е.п. с двухкратными различиями по длине. Какой-либо закономерности в чередовании размеров е.п. нами пока не обнаружено.

Основная масса многополяризованных петель, общее число которых свыше десяти на геном, имеет две разнонаправленных по отношению к центромере е.п., причем чаще встречаются петли с направлением е.п. от середины петли к хромомерам (рис. 2*е*, 3*б*) и реже — от хромомеров к середине (рис. 2*д*, 3*в*). Размеры е.п. в таких петлях, как правило, неодинаковы. Предварительные расчеты указывают на отношение их длин как 2:1. В некоторых петлях расположение е.п. представлено комбинацией вышеприведенных способов (рис. 3*г*).

В настоящий момент мы не можем однозначно объяснить существование нескольких е.п. в пределах одной петли. Скорее всего петли, имеющие несколько сегментов матрикса, должны рассматриваться как полиоперонные структуры. Однако не исключено, что их возникновение обусловлено полной деспирализацией нескольких хромомеров. На наш взгляд, окончательное заключение о внутренней структуре е.п. можно сделать только на основании микробиохимического анализа ДНК и РНК в каждом сегменте.

Институт общей генетики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
11 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. G. Callan, L. Lloyd, Phil. Trans. Roy. Soc. London, v. 243, 702, 135 (1960).
² I. G. Gall, H. G. Callan, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., v. 48, 4, 562 (1962). ³ H. G. Callan, J. Cell. Sci., v. 2, 1, 1 (1967). ⁴ В. Б. Макаров, В. В. Сафронов, Цитология, т. 16, 2, 43 (1974). ⁵ O. L. Miller, B. R. Beatty, J. Cell. Physiol., v. 74, 1, 225 (1969).