

Л. Д. САФРОНОВА, Ю. С. ДЕМИН

**АНАЛИЗ ПОСТСЕГРЕГАЦИОННОГО ДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ
В ГАМЕТАХ МЫШЕЙ**

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 12 IV 1972)

Для биологии и медицины требуется разработка методов, с помощью которых можно влиять на менделевское соотношение, лежащее в основе передачи потомству генов гетерозиготной и гетерогаметной особью. В области биологии это имеет прямое отношение к проблеме регуляции естественного соотношения полов, которая теоретически сводится к исключению из участия в оплодотворении одного из двух классов гамет, формируемых гетерогаметным полом. У млекопитающих, о которых пойдет речь в данном сообщении, в связи с мужской гетерогаметией, регулирование полового состава требует разделения спермы на X и Y классы^(1, 2). В области медицины возможность вмешательства в менделевское соотношение наметит подходы к элиминации из генофонда популяции аллелей, имеющих летальное и патологическое действие. Поэтому перспективны исследования по генетике гамет млекопитающих и, в частности, исследования постсегрегационного эффекта, т. е. действия генов в гаплоидном состоянии, после мейотической редукции. Очевидно, что особь, гетерозиготная по гену с постсегрегационным действием, должна продуцировать сперму, представляющую собою смесь двух групп клеток. Фенотип каждой группы будет определяться аллелем, находящимся в гаплоидном состоянии, а соотношение групп будет 1 : 1. Если же постсегрегационное действие обнаружится у генов, спрепленных с полом, то следствием его будут фенотипические различия X- и Y-несущих спермий. Таким образом, в данной постановке проблема вмешательства в естественное менделевское соотношение сводится к обнаружению генов с постсегрегационным действием. Относительно животных вообще и млекопитающих в частности вопрос о постсегрегационном эффекте до сих пор остается нерешенным. Однако результаты некоторых работ позволяют ответить на него положительно⁽³⁻⁷⁾. Использование иммунологических методов анализа поверхностных антигенов спермий дает возможность не только подойти к изучению постсегрегационного эффекта, но и наметить пути использования найденных различий для разделения спермы на альтернативные классы⁽⁶⁻⁸⁾.

Настоящая работа планировалась, принимая во внимание соображения о перспективности использования постсегрегационного эффекта, с одной стороны, и недостаточность данных в его пользу у млекопитающих — с другой.

Целью исследования было изучение постсегрегационного действия генов у половозрелых мышей-самцов с помощью иммунофлуоресцентного анализа. Ождалось, что полученные результаты покажут перспективность иммуногенетического подхода к вмешательству в менделевское соотношение в потомстве гибридов.

В работе использованы половозрелые самцы мышей линии СВА, C57Bl/6 и коммерческие гибриды F₁ между этими линиями. Животных получали из питомника «Столбовая». Для иммунофлуоресцентного анализа использован непрямой метод Кунса⁽⁹⁾. Реципрокные межлинейные антисыворотки (анти-СВА и анти-C57) получали по схеме⁽¹⁰⁾ после 6-кратной иммунизации животных одной линии клетками селезенки другой. Антисыворотки имели средний индекс флуоресценции 0,30, что показывает их достаточную активность⁽⁹⁾. В качестве флуоресцирующего агента

была взята меченная ФИТЦ коммерческая крольчья антисыворотка (л.с.) против мышного γ -глобулина. Сперму (с.и.) получали из эпидидимусов гибридов F₁, дважды промывали физиологическим раствором на фосфатном буфере (здесь и далее рН 7,3–7,4), наносили каплю живой спермы на стекло и инкубировали во влажной камере 45 мин. при 37°, чтобы дать возможность клеткам прикрепиться к стеклу. Препараты фиксировали охлажденным ацетоном 15 мин., затем высушивали и инкубировали 45 мин. во влажной камере при 37° с мышными антисыворотками, отмывали физиологическим раствором (15 мин.) и вновь инкубировали при 37° с меченой крольчей антисывороткой. После окончательной промывки препараты заключали в 50% забуференный глицерин и анализировали с использованием масляной иммерсии (900×). Каждую клетку анализировали дважды — при фазовом контрасте (для установления морфологической целостности) и в свете видимой флуоресценции. Определялась частота свечения клеток по специальному типу (⁸) среди общего числа внешние полноценных клеток. Всего проведено 7 экспериментов, давших однозначенный результат. Для каждого эксперимента препараты спермы гибридов обрабатывались антисыворотками в трех вариантах: 1) сп. + анти-CBA + л.с.; 2) сп. + анти-C57 + л.с.; 3) сп. + смесь (анти-CBA + анти-C57) + л.с. В случае постсегрегационного эффекта частота светящихся клеток в 3-м варианте должна быть выше, чем в 1-м и 2-м порознь и приближаться к суммарной частоте клеток 1-го и 2-го вариантов. Если же частоты всех трех вариантов окажутся равными, то это в большей степени будет указывать на отсутствие постсегрегационного эффекта в данной системе. Очевидно, что схема эксперимента позволяет преибречь нормальными межлинейными антителами, если таковые имеются у использованных линий. Обработка спермы только люминесцентной антисывороткой (контроль) дала отрицательный результат.

Результаты экспериментов представлены на рис. 1, где за 100% принята частота свечения, ожидаемая на основании суммирования частот двух первых вариантов. Частота каждого варианта в отдельности тогда составит 50% от этого уровня, так как во всех экспериментах частоты первого и второго вариантов статистически достоверно друг от друга не отличались. Частота третьего варианта отложена как процент от ожидаемых в случае суммирования частот двух первых вариантов (т. е. при возможном постсегрегационном эффекте). Можно видеть, что 6 из 7 экспериментов дали высоко достоверное ($P \geq 0,99$) превышение над частотой 50%, средняя частота для всех опытов третьего варианта составила 78%. Иными словами, смесь антисывороток статистически достоверно повышает частоту светящихся клеток, что согласуется с теоретическим ожиданием при постсегрегационном эффекте, но уровень частоты светящихся клеток в третьем варианте достигает теоретической величины (т. е. суммы двух свечений порознь) лишь в 2 опытах из 7. Полученные данные, таким образом, позволяют заключить, что фенотип спермиев межлинейных гибридов представляет собой, вероятно, результат постсегрегационного эффекта двух гаплотипов, частоты которых соответствуют частотам пары аллелей при менделеевском расщеплении (1:1). Имеется, однако, ряд моментов, требующих специального разбора. Прежде всего, необходимо объяснить, почему частота светящихся клеток в третьем варианте не достигает частоты, ожидаемой при суммировании первых двух. В этой связи можно указать, что в используемой для анализа генетической системе в иммунофлуоресцентной реакции участвуют не только гены, имеющие постсегрегационное действие. Очевидно, что на поверхности спермиев представлены также антигены, обусловленные действием диплоидного набора (¹¹). Они дают «фон», который скрывает эффект сегрегации и не позволяет выявить ожидаемые 100%. Сходные частоты получены (⁹) при анализе с помощью цитотоксических сывороток постсегрегационного эффекта генов тканевой совместимости у человека. Из вышеизложенного очевидно, что лучшее

совпадение теоретических и экспериментальных результатов может быть, вероятно, получено лишь при использовании конгениального материала. Дальнейший анализ полученных результатов позволяет предположить, что в работе наблюдалось постсегрегационное проявление антигенов, кодируемых локусом тканевой совместимости (H-2). Использованные линии различаются по этому локусу (СВА несет аллель H-2^a, C57Bl/6H-2^b, гибриды F₁ H-2^{a/b}), а в литературе имеются указания в пользу постсегрегационного эффекта генов тканевой совместимости (^{6, 8}). Окончательное решение этого вопроса можно приблизить при использовании линий, конгениальных по локусу H-2, однако до настоящего времени такая работа не проведена.

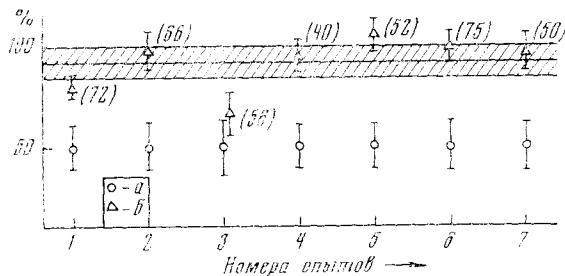


Рис. 1. Результаты иммунофлуоресцентного анализа спермы гибридов F₁. *a* — 50% частота светящихся клеток в первом или втором варианте в отдельности; *b* — частота светящихся клеток для каждого опыта третьего варианта. Заштрихованная зона — средняя частота (и 99% доверительный интервал) светящихся клеток в третьем варианте. Цифры в скобках — абсолютная частота светящихся клеток в каждом эксперименте

И последнее, что требует особого внимания — это **причины**, лежащие в основе проявления гаплоидных фенотипов на поверхности спермииев. Фенотипическая гаплоидность спермииев может быть обусловлена не только постсегрегационным эффектом, но и регуляцией клеточной активности по типу аллельного исключения в клетках до редукции (¹²). Очевидно, что если гены, определяющие фенотип, регулируются таким путем, это приведет к фенотипической гаплоидности спермия. Но фенотип спермия будет предопределен еще до редукции и не обязательно явится отражением его гаплоидного генотипа. Такую возможность всегда следует принимать во внимание в работах по постсегрегационному эффекту.

Таким образом, в работе установлено, что гаметы гетерозиготных мышей имеют по некоторым признакам гаплоидный фенотип, что может быть результатом постсегрегационного действия генов в спермиогенезе. Полученный материал показывает перспективность исследований по генетике гамет млекопитающих для проблемы разделения спермииев на альтернативные по данному признаку классы.

Авторы приносят благодарность Е. А. Кабановой за обсуждение и Н. Д. Панёвой за помощь при проведении работы.

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
10 IV 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Б. Л. Астауров, В. кн. Актуальные вопросы современной генетики, М., 1966.
- ² R. A. Beatty, Biol. Rev., **45**, 73 (1970).
- ³ A. W. H. Braden, J. Cell. and Comp. Physiol., **56** (Suppl.), 17 (1960).
- ⁴ V. Monesi, Exp. Cell. Res., **39**, 137 (1965).
- ⁵ G. Moore, Exp. Cell. Res., **68**, 462 (1971).
- ⁶ M. Fellous, J. Daussett, Nature, **225**, 191 (1970).
- ⁷ R. Popivanov, V. H. Vulchanov, Zs. Immunitätsforsch. und exp. Therap., **124**, 206 (1962).
- ⁸ M. Vojtíškova, M. Poláčkova, Z. Pokorná, Folia Biol., **15**, 322 (1969).
- ⁹ O. M. Лежнева, В. кн. Иммунохимический анализ. М., 1968, стр. 189.
- ¹⁰ G. Möller, J. Exp. Med., **114**, 415 (1961).
- ¹¹ M. Vojtíškova, Z. Pokorná, Folia Biol., **18**, 1 (1972).
- ¹² J. J. Cerba et al., J. Exp. Med., **123**, 547 (1966).