

О.В. ГОРЕНСКАЯ¹, В.Ю. СТРАШНЮК¹,
В.Г. ШАХБАЗОВ¹, В.Т. КАКПАКОВ²

¹ Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПА НА ПУФИНГ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ И БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР *DROSOPHILA* *MELANOGASTER* В СВЯЗИ С ДЕЙСТВИЕМ ЭКДИЗОНА В ОПЫТАХ *IN VIVO* И *IN VITRO*



У высокоинбредных селективируемых линий НА (низкоактивная) и ВА (высокоактивная), а также у реципрокных гибридов F_1 НА $\times$ ВА и ВА $\times$ НА исследовали активность пучков политенных хромосом на стадии 0-часовой предкуколки и биоэлектрические свойства клеточных ядер слюнных желез под влиянием гормона 20-ОН-экдистерона *in vitro*. Инадаптивная линия НА отличается меньшими размерами пучков по сравнению с линией ВА, гибриды по величине большинства изученных пучков превосходят лучшую из родительских линий. Обнаружено явление гетеропуфирования на участках асинхронизации при изучении хромосом гибридов F_1 ВА $\times$ НА. Воздействие экдистерона *in vitro* повышает величину электрокинетического потенциала клеточных ядер, причем у гибридов эффект выражен сильнее, чем у родительских линий. Полученные результаты свидетельствуют о существовании генетических различий в активности пуфирования в политенных хромосомах дрозофилы в связи с действием инбридинга, дестабилизирующего отбора и эффекта гетерозиса, а также подтверждают связь биоэлектрических свойств клеточных ядер с регуляцией их генетической активности.

© О.В. ГОРЕНСКАЯ, В.Ю. СТРАШНЮК, В.Г. ШАХБАЗОВ,
В.Т. КАКПАКОВ, 2003

Введение. Известно, что в онтогенезе дрозофилы происходят циклические изменения картины пучков политенных хромосом в зависимости от уровня экдизона (20-ОН-экдистерона) в гемолимфе, в периоды, предшествующие линьке и метаморфозу [1, 2], причем система активных районов генома четко стабилизирована, что предполагает наличие генетического контроля в их регуляции [3].

Особый интерес вызывает участие ядерного генома в механизмах гормональной регуляции, поскольку ядро клетки является центром, регулирующим и координирующим все внутриклеточные процессы биосинтеза.

Данные литературы о влиянии на пуфтинг таких генетических факторов, как инбридинг, гибридизация, противоречивы. По одним данным, влияния нет [4, 5], по другим — оно может быть довольно значительным [6–8].

Изучение роли электрического заряда ядра в различных биологических явлениях помогает лучше понять основные генетические процессы, происходящие в клетке [9]. Существует мнение, что гормональная регуляция генной активности и репликация ДНК в онтогенезе опосредуется изменениями мембранного потенциала и содержанием катионов в цитоплазме и ядре [10]. Оценка электрического заряда ядра клеток при исследовании клеточных реакций на действие физиологически активных веществ гормональной природы дает новую ценную информацию о роли в этих реакциях механизмов регуляции активности генома на уровне целого ядра.

Целью настоящей работы было изучение влияния генотипа на пуфтинг политенных хромосом и электрокинетические свойства (ЭКС) клеточных ядер в слюнных железах *Drosophila melanogaster* Meig. под влиянием гормона экдизона *in vivo* и *in vitro*.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на высокоинбредных линиях ВА (высокоактивная) и НА (низкоактивная) и их межлинейных гибридах F_1 : ВА $\times$ НА и НА $\times$ ВА. Данные линии были получены Л.З. Кайдановым и др. [11] (Санкт-Петербургский университет) в результате длительного инбридинга в сочетании с отбором по половой активности самцов. Линии ВА и НА к началу исследований прошли более 750 поколений инбридинга. Дестабилизирующий отбор привел к появлению у низкоактивной линии комплекса генетически контролируемых изменений.

Линия ВА превосходит линию НА по ряду адаптивно важных признаков: плодовитости, теплоустойчивости, продолжительности жизни, скорости развития и др. [12]. По перечисленным признакам обнаруживается эффект гетерозиса у реципрокных гибридов между линиями ВА и НА [13–15].

Генетическая изменчивость в линиях в значительной степени определяется перемещениями мобильных элементов. Предполагается, что эти транспозиции являются источником нестабильности в геноме линии НА и родственных ей инбредных линий [16].

В опытах использовали синхронизированные культуры личинок, развивающихся в стандартной сахарно-дрожжевой среде при $t = 24^\circ\text{C}$.

Пуфинг политенных хромосом исследовали на давленных ацетоорсеиновых препаратах слюнных желез. В опыт брали самок на стадии 0-часовой предкуколки. Эта стадия легко идентифицируется по выворачиванию дыхалец.

Оценку размеров пухов проводили на хромосомах с одинаковой степенью политении — 1024С. На цитологических препаратах различия в степени политении обнаруживаются по ширине хромосом [15]. Учет степени политении в подобных исследованиях очень важен в связи с проявлением эффекта дозы генов — обратной зависимостью между пуховой активностью и уровнем политении хромосом [5].

Локализацию пухов проводили по уточненным картам Бриджеса [17].

Изучали активность пяти экдизоновых пухов: 63F, 71CE, 72CD, 82EF и 83E. Поперечные размеры пухов измеряли с помощью окуляр-микрометра при увеличении микроскопа $\times 400$ и сравнивали их с шириной близлежащего диска, не вовлеченного в процесс пуфирования. Отношение размера пуфа к размеру диска служило мерой пуховой активности: 63F/64A, 71CE/73A, 72CD/73A, 82EF/83C и 83E/83C. Исследовали по десять особей каждого генотипа, по пять ядер на каждом препарате.

В опытах *in vitro* изучали влияние 20-ОН-эксдистерона на биоэлектрические свойства клеточных ядер. Использовали метод внутриклеточного микроэлектрофореза, разработанный на кафедре генетики и цитологии Харьковского национального университета [18]. В опыт брали самок личинок 3-го возраста, за 10 ч

до окукливания, в межличиночный период развития. У личинок извлекали слюнные железы в физиологическом растворе Эфруссии-Бидла и переносили их в питательную среду для культивирования. В опыте 1 использовали среду C46+10 % FBS (бычья эмбриональная сыворотка) [19]. В опыте 2 использовали эту же среду с добавлением эксдистерона («Calbiochem», США) в концентрации 1 мкг/мл. Слюнные железы культивировали *in vitro* при температуре 24°C в течение 20 мин, затем вместе с каплей питательной среды помещали в камеру для микроэлектрофореза. Напряжение поля в камере составляло 7–8 В/см, сила тока — 0,7 мА. Процент ядер, смещающихся в электрическом поле к аноду (электроотрицательность ядер — ЭОЯ, %) служил показателем ЭКС ядер в данном образце ткани.

Результаты исследований и их обсуждение. Для установления механизмов эффекта гетерозиса на хромосомном уровне у дрозофилы исследовали активность пуфинга политенных хромосом на стадии 0-часовой предкуколки (рис. 1).

В инадаптивной линии НА установлено снижение размеров пухов по сравнению с линией ВА в локусах 82EF, 83E и 72CD на 25,8 % ($P < 0,01$), 21,6 % ($P < 0,001$) и 21,8 % ($P < 0,01$) соответственно. Гибрид ВА $\times$ НА превосходит лучшую из родительских линий по показателю активности пуфинга политенных хромосом во всех исследуемых локусах, кроме 83E, где различие в размерах недостоверно. Размеры пухов 63F, 82EF, 71CE и 72CD в линии ВА в среднем на 8,8–18,1 % ($P < 0,001$ –0,05) были меньше, чем у гибрида ВА $\times$ НА.

Размеры всех изученных крупных пухов гибрида НА $\times$ ВА больше, чем в линии ВА, в среднем на 8,4–32,3 % ($P < 0,001$ –0,05).

Разница по размерам пухов между гибридами достоверно проявляется только на участке 72CD и составляет 13,1 % ($P < 0,01$).

Ранее в опытах *in vivo* при изучении ряда линий *Drosophila melanogaster*, включая НА и ВА, на стадии 0-часовой предкуколки генетические различия по размерам пухов не были установлены [4]. У инбредных линий Oregon и Canton-S и их межлинейного гибрида F_1 Oregon $\times$ Canton-S не обнаружено значимых генетических различий по активности пуфирования поли-

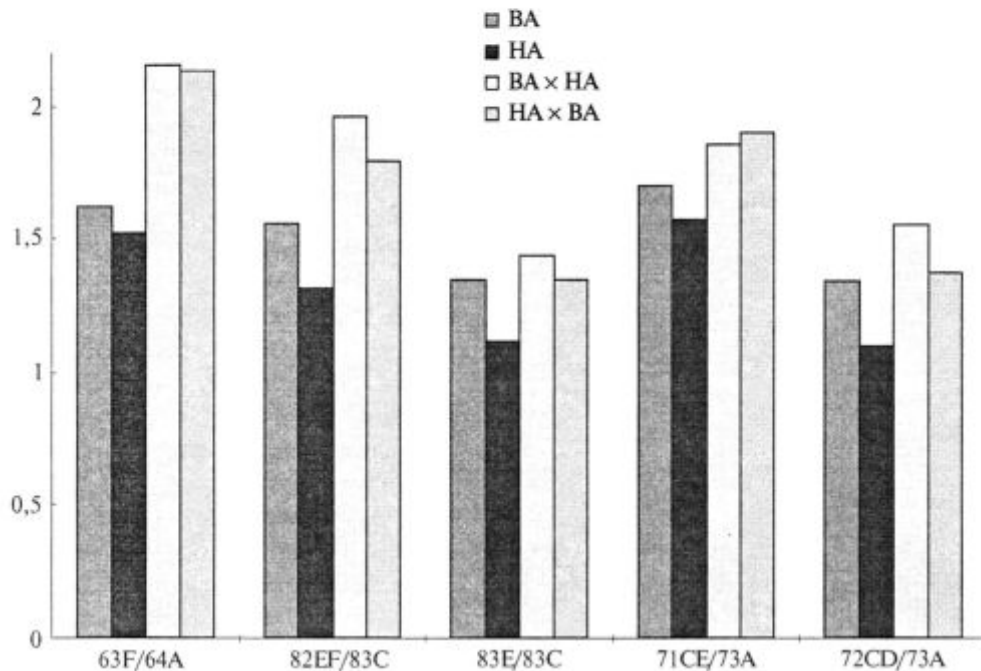


Рис. 1. Активность пуфинга политенных хромосом дрозофилы в связи с эффектом гетерозиса: по вертикали — пуф/диск

тенных хромосом на стадии 0-часовой предку- колки в условиях температурного оптимума — 24 °C [5]. Вместе с тем имеются данные, что после 34–41 поколений инбридинга у *Drosophila melanogaster* происходит снижение частоты встречаемости 28 пуфов [6], а также уменьшение общего числа активных районов хромосом у *Drosophila subobscura* [7]. В межличиночный период развития личинок (пуфовая стадия 1) отмечена более низкая активность пуфинга в двух районах у линии HA (низкоактивная) по сравнению с линией BA (высокоактивная) и гибридом F₁ BA × HA. Эти же линии и гибрид различались по скорости индукции ранних экдизоновых пуфов в опытах *in vitro* [8]. Однако авторы, как правило, размеры пуфов оценивали визуально, в баллах, более точными являются измерения с помощью объект-микрометра. Кроме того, не учитывали показанный в более поздней работе эффект дозы генов на уровне транскрипции — существование обратной зависимости пуфовой активности от степени политении гигантских хромосом [5]. В то же время генетическая вариабельность так же, как и модификационные изменения степени политении хромосом в слюнных железах дрозофилы, может быть весьма значительной [20].

В особенности это касается линий HA, BA и гибридов F₁ между ними [15].

При изучении препаратов хромосом слюнных желез гибридов BA × HA на участках асинопсиса нами было обнаружено явление гетеропуфирования или, как его еще называют, проявления гетерозиготности по пуфам [21] (рис. 2).

Впервые проявления гетерозиготности по пуфам были обнаружены Эшбернером [22] на двух участках хромосом — 22B8-9 и 64C у межлинейных гибридов *Drosophila melanogaster*. В обоих локусах в межлинейных гетерозиготах наблюдается гомоморфный пуф, если соответствующие участки хромосом синаптируют. Эшбернер предполагает, что гетеропуфирование может быть вызвано мутацией, в результате которой оба гомолога пуфируют, если родительские хромосомы синаптируют; в случае асинопсиса пуфирует только один гомолог. Мутации происходят в отдельном локусе, который контролирует активность пуфинга, и не являются мутациями структурных генов, расположенных в пуфах, так как гены транскрибируются, и это приводит к образованию пуфа. Возможно, ген-регулятор должен находиться в контакте со структурным геном, чтобы объяснить зависимость появления пуфа от синапсиса

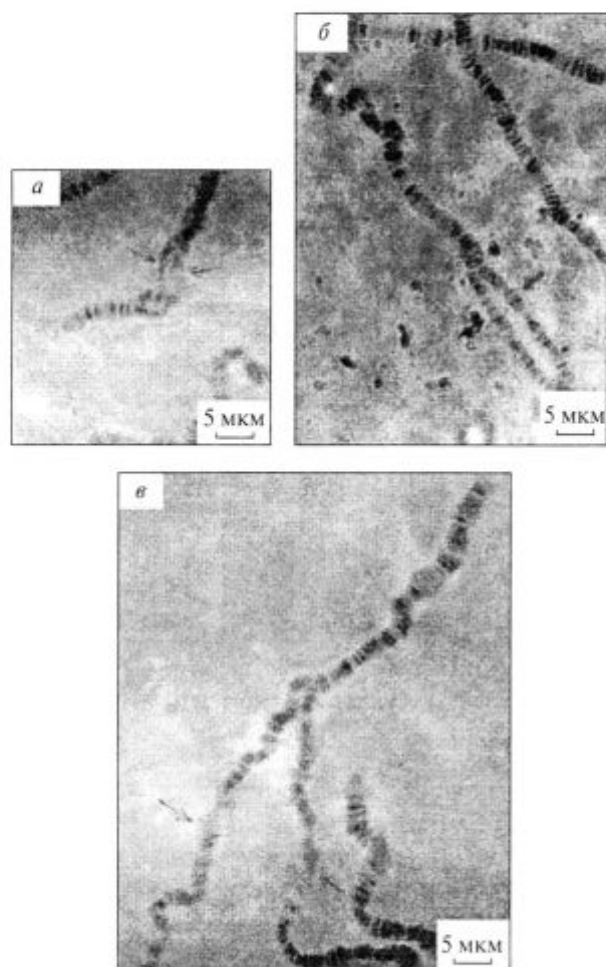


Рис. 2. Гетерозиготность по пuffed в районах асинхронизации полиплоидных хромосом (гибрид F_1 ВА $\times$ НА): а — межлиночный пuffed 25АС; б — поздний экдиозовый пuffed 95D; в — поздний экдиозовый пuffed 71СЕ

гомологов. Допускается, что передача регулирующего сигнала с гена-регулятора на структурный ген ограничивается телом хромосомы и не может осуществляться через нуклеоплазму.

Еще одной из причин гетерозиготности по пuffed может быть асинхронность пуфирования гомологов. Диск на одной хромосоме начинает и заканчивает пуфирование раньше, чем на другой, в результате чего образуется асимметричный пuffed.

Вместе с тем гетеропуфирование у гибридов можно объяснить различиями в размерах пuffed у родительских линий, при этом в случае асинхронизации пuffed появляется только на гомологе, происходящем от линии, которая имеет пuffed. Последний тезис подтверждают результаты, по-

лученные в нашей работе: гибриды по ряду пuffed превосходят инбредные родительские линии, а линия ВА превосходит линию НА. Таким образом, показано существование механизма регуляции генетической активности на хромосомном уровне, выраженное в различиях по уровню пуфирования у инбредных и гибридных особей в полиплоидных хромосомах дрозофилы.

Ранее при исследовании динамики электрокинетических свойств клеточных ядер в онтогенезе личинок и предкуколок дрозофилы было установлено, что увеличение содержания электроотрицательных ядер в слюнных железах дрозофилы в конце третьего личиночного возраста и у поздней предкуколки коррелирует по времени с возрастанием уровня экдиозона в гемолимфе, со сменой пуфовой пестроты и увеличением количества активных генов [23].

На рис. 3 представлены результаты исследования изменений биоэлектрических свойств клеточных ядер слюнных желез дрозофилы под влиянием гормона экдиозона *in vitro*.

Наши результаты подтверждают полученные ранее данные о сравнительно невысоких значениях уровня электроотрицательных ядер (ЭОЯ) в клетках слюнных желез личинок дрозофилы в межлиночный период развития [23, 24]. В то же время гибрид НА $\times$ ВА достоверно превышает ($P < 0,05$) по количеству ЭОЯ в контроле лучшую из родительских линий. У линии НА значение ЭОЯ наименьшее.

При культивировании слюнных желез в питательной среде в течение 20 мин (опыт 1) показатель ЭОЯ существенно не отличается от контроля. Экдистерон повышает количество электроотрицательных ядер. При культивировании клеток линий ВА и НА в среде с экдистероном (опыт 2) показатель ЭОЯ превосходил контроль на 101,69 ($P < 0,01$) и на 90,91 % ($P < 0,01$) соответственно. У гибридов в эксперименте наблюдается та же тенденция, что и у родительских линий. После культивирования клеток в среде с экдистероном величина показателя электрокинетического потенциала выросла на 127,56 % ($P < 0,01$) у гибридов НА $\times$ ВА и на 162,78 % у гибридов ВА $\times$ НА.

Превосходство гибридов над инбредными селекционируемыми линиями по показателю ЭОЯ коррелирует с эффектом гетерозиса, а также хорошо согласуется с данными о более быстрой

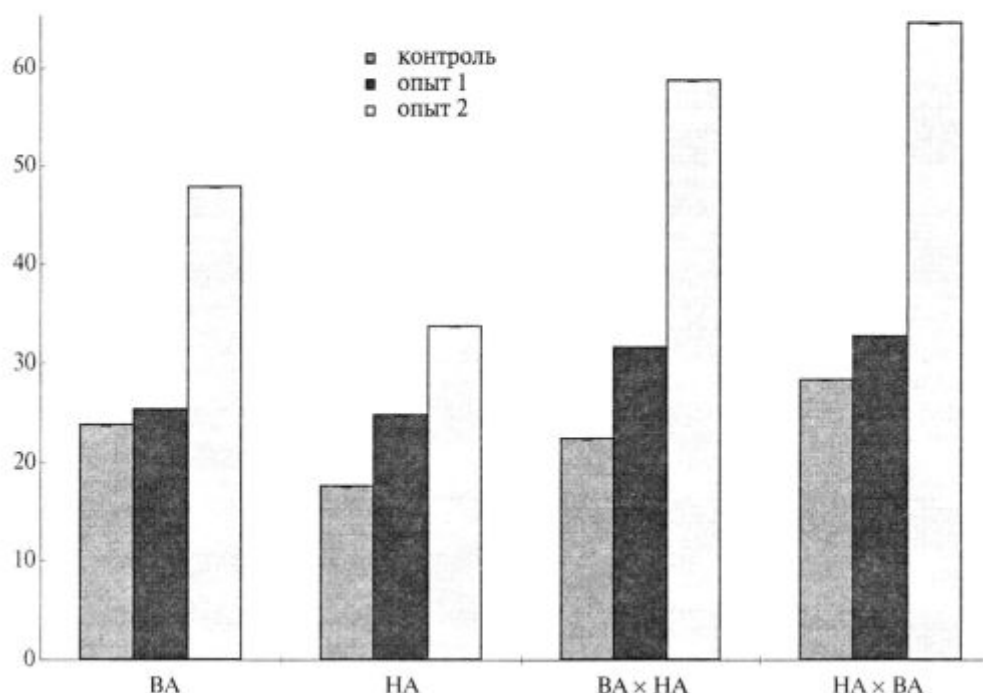


Рис. 3. Электроотрицательность клеточных ядер слюнных желез (по вертикали, %) *Drosophila melanogaster* (линии BA, HA, гибриды BA x HA, HA x BA) в условиях культивирования и при действии экдистерона *in vitro*.

индукции ранних экдизоновых пуфов у гибрида по сравнению с исходными линиями после культивирования клеток слюнных желез в среде с экдистероном *in vitro*, в то время как для линии HA характерна замедленная индукция пуфов [8].

Повышение величины показателя электрокинетического потенциала после культивирования в среде с экдистероном мы объясняем повышением транскрипционной активности ядер, поскольку ранее показано, что показатель ЭОЯ связан с функциональной активностью ядер [9].

Известно, что у мух линии HA отмечено повышенное содержание полиненасыщенных жирных кислот — линолевой и линоленовой. Следствием таких изменений в составе жирных кислот является «рыхлость» мембранных структур, что должно вести к их пониженной устойчивости [16]. Следует отметить, что такие изменения в структуре мембран инадаптивной линии HA также могут привести к снижению общего отрицательного заряда ядер. Изменения в липидном составе приводят к перераспределению заряда на поверхности и внутри ядра, что, возможно, влияет на электрокинетический потенциал ядра.

Полученные данные согласуются и с результатами изучения динамики ЭОЯ в онтогенезе личинок и предкулолок исследуемых линий и межлинейных гибридов F_1 : наименьшие значения изучаемого показателя наблюдались у линии HA, которая уступала линии BA на 12,7–37,3 % ($P < 0,05–0,01$); гибриды достоверно превосходили обе родительские линии [23].

Следует также отметить, что по скорости развития исследуемые линии и гибриды значительно различаются, стадии предкулолки гибриды достигают значительно раньше, а линия BA опережает по этому показателю линию HA [8].

Таким образом, в работе установлено существование генетических различий в активности пуфирования в политенных хромосомах дрозофилы в связи с действием инбридинга, дестабилизирующего отбора и эффекта гетерозиса. Показана роль биоэлектрических свойств клеточных ядер в механизме экдизоновой индукции, а также связь этого показателя с эффектом гетерозиса. Полученные результаты подтверждают связь биоэлектрических свойств ядерного генома с регуляцией генетической активности клеточного ядра.

SUMMARY. Activity of polytene chromosome puffs at the 0-hour prepupae stage and bioelectric properties of cellular nuclei of salivary glands were investigated under the influence of the hormone 20-OH-ecdysone *in vitro* in highly inbred selected lines LA (low activity) and HA (high activity) and their F_1 hybrids LA $\times$ HA and HA $\times$ LA. The inadaptive line LA differs from the line HA by the smaller size of the puffs. The hybrids exceed the best parental line by the size of the majority of the investigated puffs. In the course of investigation of F_1 hybrids HA $\times$ LA chromosomes the phenomenon of heteropuffing has been revealed at the asinapsis sites. *In vitro* impact of ecdysone increases the electrokinetic potential of cellular nuclei; in hybrids this effect expressed more strongly than in parental lines. The data obtained indicate genetic differences in puffing activity in *Drosophila* polytene chromosomes as a result of inbreeding, destabilizing selection and heterosis effect, and they also confirm the correlation of bioelectric properties of the nuclear genome with regulation of genetic activity of a cellular nucleus.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дубровский Э.Б., Жимулев И.Ф., Беляева Е.С. Параллельные изменения пуфинга и белкового синтеза в слюнных железах личинок и куколок дрозофилы // Онтогенез. — 1985. — 16, № 1. — С. 26–33.
2. Richards G., Ashburner M. Insect hormones and the regulation of genetic activity // Biol. Develop. — 1984. — 34B. — P. 215–253.
3. Беляева Е.С. Транскрипционно активные районы хромосом : Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Новосибирск, 1982. — 32 с.
4. Беляева Е.С., Жимулев И.Ф. О вариабельности размеров пуфов у *Drosophila melanogaster* // Генетика. — 1974. — 10, № 5. — С. 74–80.
5. Шаламов Ю.А. Температурные условия проявления эффекта гетерозиса у *Drosophila melanogaster* Meig.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1996. — 17 с.
6. Лычев В.А. Изучение активности хромосом при глубоком инбридинге у дрозофилы // Цитология. — 1965. — 7, № 3. — С. 325–329.
7. Frutos R. De, Latorre A., Pascual L. Patterns of puffing activity and chromosomal polymorphism in *Drosophila subobscura*. 3. Puffing activity depression by inbreeding // Theor. Appl. Genet. — 1984. — 69. — P. 101–110.
8. Страшнюк В.Ю., Таглина О.В., Шахбазов В.Г. Экдизонзависимые изменения активности пуфов онтогенеза в слюнных железах дрозофилы, культивируемых *in vitro*, в связи с эффектом гетерозиса и отбором по адаптивно важным признакам // Генетика. — 1991. — 27, № 9. — С. 1512–1518.
9. Шкорбатов Ю.Г., Шахбазов В.Г. Биоэлектрические свойства клеточных ядер // Усп. соврем. биологии. — 1992. — 112, № 4. — С. 449–511.
10. Kroeger H. Potentialdifferenz und Puff-Muster. Electrophysiologische und cytologische Untersuchungen an den Speicheldrüsen von *Chironomus thummi*. // Exp. Cell. Res. — 1966. — 41. — P. 64–80.
11. Кайданов Л.З., Кукушинская И.С., Мексина Н.С. Исследование генетики полового поведения *Drosophila melanogaster* // Генетика. — 1969. — 5, № 9. — С. 116–123.
12. Кайданов Л.З. Анализ генетических последствий отбора и инбридинга у *Drosophila melanogaster* // Журн. общ. биологии. — 1979. — 40, № 6. — С. 834–850.
13. Кайданов Л.З., Субботин А.М. Исследование комбинационной способности инбредных линий *Drosophila melanogaster*, различающихся по адаптивной ценности // Цитология и генетика. — 1984. — 18, № 6. — С. 429–433.
14. Шахбазов В.Г., Таглина О.В. Особенности динамики пуфов теплового шока у высокоинбредных линий и гетерозисных гибридов *Drosophila melanogaster* // Генетика. — 1990. — 26, № 1. — С. 43–47.
15. Страшнюк В.Ю., Ненейвода С.Н., Шахбазов В.Г. Цитоморфометрическое исследование политенных хромосом *Drosophila melanogaster* в связи с эффектом гетерозиса, отбором по адаптивно важным признакам и полом // Генетика. — 1995. — 31, № 1. — С. 24–29.
16. Кайданов Л.З., Мыльников С.В., Галкин и др. Генетические эффекты дестабилизирующего отбора при селекции по адаптивно важным признакам в линиях HA *Drosophila melanogaster* // Генетика. — 1997. — 33, № 8. — С. 1102–1109.
17. Lindsley D.L., Grell E.H. Genetic variations of *Drosophila melanogaster* // Carnegie Inst. Wash. Publ. — 1968. — № 627. — 472 p.
18. Шахбазов В.Г., Лобынцева Г.С. Биоэлектрические свойства ядра и ядрышка в клетках растений в связи с генотипом, физиологическим состоянием и действием высокой температуры // Биофизика. — 1971. — 16, № 3. — С. 457–461.
19. Какпакос В.Т. Получение и характеристика культур соматических клеток дрозофилы : Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М., 1989. — 48 с.
20. Страшнюк В.Ю. Генетична вариабельність та адаптивні модифікації ступеня політенії гігантських хромосом у *Drosophila melanogaster* // Труды по фундаментальной и прикладной генетике. — Харьков : Штрих, 2001. — С. 285–295.
21. Жимулев И.Ф. Хромомерная организация политенных хромосом. — ВО «Наука», Сиб. издат. фирма, 1994. — 565 с.
22. Эшбернер М. Генетический и гормональный контроль пуфинга политенных хромосом *Drosophila melanogaster* // Онтогенез. — 1974. — 5, № 2. — С. 107–121.
23. Шахбазов В.Г., Аленина С.Б., Горенская О.В., Самило С.М., Страшнюк В.Ю. Прояви ефекту гетерозису у *Drosophila melanogaster* біоелектричним властивостям клітинних ядер // Изв. Харьк. энтомол. об-ва. — 1999. — 7, вып. 1. — С. 127–131.
24. Шахбазов В.Г., Шкорбатов Ю.Г., Страшнюк В.Ю. Регуляция активности ядерного генома и биоэлектрические свойства хроматина и клеточного ядра // Докл. АН СССР. — 1986. — 260, № 5. — С. 1255–1258.

Поступила 27.07.02