НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ

На правах рукопису

ЧЕРВАТА
ГАЛИНА РОМАНІВНА

ДОСЛІДЖЕННЯ НЕСТАБІЛЬНОСТІ ДЕЯКИХ ГЕНІВ Х-ХРОМОСОМИ *Drosophila melanogaster*, ІНДУКОВАНОЇ ХІМІЧНИМИ ФАКТОРАМИ.

03.00.15-Генетика

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового
ступеня кандидата біологічних наук

КИЇВ - 1996

575

ЛННБ України ім.В.Стефаника
00754306 (Р)

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Львівсь[illegible] державному університеті імені І.Франка

Науковий керівник: кандидат біологічних наук, доцент
Дарія Володимирівна Максимів

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, академік
Сергій Михайлович Гершензон

кандидат біологічних наук
Юрій Вікторович Вагін

Провідна організація: Київський державний університет імені Т.Шевченка

Захист дисертації відбудеться 29 лютого 1996 року на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 50.09.01 по захисту дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора наук при Інституті фізіології рослин і генетики НАН України за адресою : 252022, Київ-22, вул. Васильківська 31/17.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту фізіології рослин і генетики НАН України.

Автореферат розісланий 29 січня 1996 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Труханов В.А.

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

АВ-34.170

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ

Багато генних мутацій, які викликають продовжену дестабілізацію генів, є результатом дії мутагенів фізичної і хімічної природи безпосередньо на молекулу ДНК (або РНК у деяких вірусів). Подібні мутації можуть виникати і спонтанно як випадкові помилки процесів реплікації і репарації ДНК. Крім того, мутабільність, як спонтанну, так і індуковану дією деяких мутагенів, можуть стимулювати гени-мутатори. Однак, відомо, що причиною більшості, якщо не всіх спонтанних мутацій у про- і еукаріот є переміщення мобільних генетичних елементів (МГЕ) [Ananiev et al., 1978]. Транспозиції МГЕ у геномі вищих організмів відбуваються з частотою не вищою, ніж 10^{-5} на генерацію, але при певних умовах вони можуть активуватись. Було встановлено [Engels, 1979; Kidwell, 1979; Finnegan, 1988], що в результаті схрещувань між деякими лініями дрозофіли відбувається індукція транспозицій МГЕ. Окреме місце займають системи, в яких під впливом факторів, поки що невідомої природи, виникають одночасно множинні переміщення різних класів мобільних елементів. Такі транспозиційні вибухи були найбільш детально вивчені на прикладі експериментально одержаної родини ліній: ct^{MR2} та ряду її похідних [Gerasimova et al., 1984]. Іншим подібним випадком є зміна локалізації мобільних елементів при активації НА лінії дрозофіли [Pasyukova et al., 1988]. В обох системах механізми активації на даний час залишаються невиясненими; імовірно, велику роль в них відіграє стимуляція процесів рекомбінації і генної конверсії. Транспозиції МГЕ можуть індукуватись факторами, відмінними від схрещувань між певними лініями. Дослідження на дрозофілі показали, що зараження деякими вірусами, ін'єкції екзогенної ДНК, синтетичні полінуклеотиди [Гершензон, Шандала, 1986; Набирочкин и др., 1987] і деякі інші хімічні і фізичні фактори [Georgiev et al., 1990, Смирнова и др., 1991] стимулюють транспозиції МГЕ. Специфічна функція мобільних елементів на сьогодні невідома, а аналіз закономірностей їх розподілу в геномі не дає відповіді на це питання. Однак, активна транскрипція МГЕ і постійна їх кількість дозволяє вважати, що вони можуть виконувати важливі функції в організмі. Автори припускають [Corses, Geyer, 1991], що на кожній стадії розвитку і для кожної тканини є свій набір транскрипційно активних МГЕ. Гвоздєв і Кайданов [Гвоздев, Кайданов, 1986] показали, що невипадкові транспозиції МГЕ в райо-

ни "гарячих" точок або зникнення мобільних елементів в цих районів приводить до сильних плейотропних ефектів і є власне причиною зниження або підвищення пристосованості та життєздатності організму. Таким чином, дослідження генетичної нестабільності як основної ланки в механізмах еволюції і пристосованості організмів є важливою проблемою сучасної біології.

МЕТА І ОСНОВНІ ЗАВДАННЯ НАУКОВОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

Метою роботи було дослідити механізми дії деяких хімічних речовин, а саме мітоміцину С, бромистого етидію і N-етил-N-нітрозосечовини, на генетичний апарат дрозофіли.

У зв'язку з цим були поставлені наступні завдання:

- визначити частоту і спектр мутацій в досліджуваних лініях в залежності від дії обраного мутагену;
- дослідити локалізацію МГЕ в Х-хромосомах отриманих мутантів за допомогою гібридизації in situ;
- провести молекулярне дослідження природи мутаційних змін в локусі white методом блот-гібридизації по Сауєрну;
- дати характеристику нової системи продовженої генетичної нестабільності, індукованої N-етил-N-нітрозосечовиною; дослідити стабільність мутантів на протязі 40 поколінь;
- встановити молекулярно-генетичну природу мутантів і реверстантів по локусу cut, одержаних в новій системі продовженої нестабільності.

НАУКОВА НОВИЗНА РОБОТИ

У результаті проведених експериментів встановлено, що при впливі різних хімічних мутагенів (мітоміцину С, бромистого етидію, N-етил-N-нітрозосечовини) відбувається активація мутагеневу, який проявляє локусну специфічність до генів yellow і white. Виявлено ряд нових, раніше не описаних мутацій. З допомогою експериментів по гібридизації in situ було виявлено, що причиною високої частоти появи мутантів є активація транспозиційних і рекомбінаційних процесів. Вперше виявлена нова система продовженої генетичної нестабільності, індукована N-етил-N-нітрозосечовиною. При молекулярно-генетичному дослідженні структури локусів white і cut показано, що поява нових мутацій зумовлена ексцизіями фрагментів ДНК, які містять мобільні генетичні елементи, а також включенням ділянок ДНК, що мають подібну до МГЕ природу.

Таким чином, у представленій роботі досліджені особливості дестабілізації геному при дії хімічних факторів, які пов'язані з

переміщеннями мобільних елементів.

НАУКОВО-ПРАКТИЧНА ЦІННІСТЬ РОБОТИ

Робота, в основному, присвячена вирішенню фундаментальних проблем механізмів мутагенезу. У процесі виконання даної роботи створена велика колекція ліній D.melanogaster, яка характеризується новими мутаціями і буде використана в наступних молекулярно-генетичних дослідженнях. Досліджений механізм відповіді геному дрозофіли на вплив екстремальних факторів хімічної природи. Одержані результати відкривають нові можливості для аналізу механізмів транспозицій і впливу МГЕ на унікальні локуси дрозофіли. Пошук нових мобільних елементів, включених в описану систему генетичної нестабільності, буде сприяти виявленню зручних векторів для генно-інженерних досліджень.

Апробація роботи

Основні наукові результати дисертаційної роботи доповідались на звітній науковій конференції біологічного факультету Львівського державного університету імені Івана Франка (лютий 1995). Матеріали роботи були представлені на 6-му з'їзді товариства Генетиків і Селекціонерів імені М.І.Вавілова (Мінськ, листопад 1992) і на II з'їзді радіобіологів України (Дніпропетровськ, вересень 1995).

Структура і об'єм роботи

Дисертація викладена на 129 сторінках, включаючи 8 таблиць, 13 рисунків і фотографій і складається зі вступу, огляду літератури, експериментальної частини з обговоренням одержаних результатів, висновків, а також списку літератури, який включає 225 джерел.

На захист виносяться такі основні положення:

1. Дослідження впливу хімічних мутагенів на стабільність геному лабораторних ліній D.melanogaster.
2. Молекулярно-генетичне дослідження природи одержаних мутантів.

Особистий внесок дисертанта у розробку наукових результатів полягає у виконанні експериментів, представлених у роботі; підготовці матеріалів для друку в наукових журналах. Експерименти з молекулярної генетики проводились автором в Інституті Біології гену РАН.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Матеріалом досліджень служили стабільні лабораторні лінії D.melanogaster: y^2w^{a4}, $y^2w^{a4}ct^{MR2}sn^w$, $y^2sc^1w^acv$ es v f. Для ін-

дукції мутагенезу використовували мітоміцин С, бромистий етидій і N-етил-N-нітрозосечовину. Молекулярно-генетичні дослідження одержаних мутантів проводили методами гібридизації in situ на політенних хромосомах із міченою ^{3}H ДНК МГЕ (Pardue, 1986), а також блот-гібридизації по Саузерну ^{32}P ДНК рекомбінантних плазмід, які містили фрагменти локусів white і cut (Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989).

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Особливості мутагенезу, індукованого мітоміцином С, бромистим етидієм і N-етил-N-нітрозосечовиною, в стабільних лабораторних лініях D.melanogaster

Для досліджень нами були використані лабораторні лінії D.melanogaster, марковані видимими мутаціями по Х-хромосомі. Досліджувані лінії виявилися стабільними. Частота мутування не перевищувала спонтанного рівня 0,005%-0,042% (табл.1). В якості індукторів генетичної нестабільності використовували хімічні мутагени мітоміцин С, бромистий етидій і N-етил-N-нітрозосечовину в концентрації LD_{50}. При вивченні впливу мітоміцину С на різні організми (прокаріоти, культури еукаріотичних клітин) було показано [Кубанейшвили и др.,1983], що він збільшує кількість хромосомних аберацій, сестринських хроматидних обмінів, змінює частоту рекомбінації, є індуктором переміщень МГЕ. Ми вирішили індукувати генетичну нестабільність в досліджуваних лініях, вводячи мітоміцин С у вигляді ін'єкцій молодим 3-5 денним самцям, а також шляхом згодовування личинкам III віку, вносячи мутаген в середовище (табл.1).

Особини кожної лінії реагували по-різному на дію даного мутагену. У самців лінії $y^{2}w^{a4}$ при ін'єкціях мітоміцину С в концентрації 0,04 мг/мл у першому, другому і третьому поколіннях трьох дослідів з частотою 0,060%-0,706% з'являлись ревертанти по локусу white і одночасно по двох локусах - white і yellow (табл.1). У другому поколінні ми відзначили появу мух з мутацією y^{1}. Серед проаналізованих 12786 самців контрольного досліду, в яких замість мутагену використовували дистильовану воду, було одержано лише 4 мутанти (табл.1), частота появи яких була низькою 0,031%. Тому можна вважати, що всі виявлені нами мутанти і ревертанти індуковані дією мітоміцину С. Таким чином, мітоміцин С, введений шляхом внутрішньочеревних ін'єкцій, підвищує частоту появи однолокусних мутантів у даної лінії. Після личинкового згодо-

Таблиця 1

Частота виникнення мутантів у лабораторних лініях D. melanogaster при дії хімічних речовин

Лінія / Дослід	y^2w^{a4} Кількість проан. мух	y^2w^{a4} Кількість мутантів	y^2w^{a4} Частота	$y^2w^{a4}ct^{MR2}sn^w$ Кількість проан. мух	$y^2w^{a4}ct^{MR2}sn^w$ Кількість мутантів	$y^2w^{a4}ct^{MR2}sn^w$ Частота	$y^2sc^1w^aes$ cv v f Кількість проан. мух	$y^2sc^1w^aes$ cv v f Кількість мутантів	$y^2sc^1w^aes$ cv v f Частота
	Внутрішньочеревні ін'єкції мітоміцину С								
Контроль	12786	4	0,031%	13109	4	0,031%	20782	1	0,005%
Дослід 1	8310	5	0,060%	10018	9	0,090%	28794	34	0,118%
Дослід 2	7693	8	0,104%	7693	--	--	17700	11	0,062%
Дослід 3	23782	168	0,706%	2376	--	--			
	Личинкове згодовування								
Контроль	6837	1	0,014%	3846	1	0,026%	2359	1	0,042%
MtC									
Дослід 1	5365	2461	45,871%	7231	1600	22,126%	20782	4	0,019%
Дослід 2	26557	163	0,613%	8318	244	2,993%	7602	278	3,657%
Дослід 3	24116	18	0,075%						
BrEt									
Дослід 1	10646	19	0,178%	7604	22	0,289%	3298	--	--
ENU									
Дослід 1	9°31	3	0,031%	5374	19	0,354%	Загибель на стадії лялечки		

Примітка: MtC - мітоміцин С. BrEt - бромистий етидій. ENU - N-етил-N-нітрозосечовина

вування розчином мітоміцину С у мух лінії y^2w^{a4} і в першому, і в другому поколіннях переважна більшість мутантів (78,0%) складали мухи з фенотипом y^1w^+. Крім того, були одержані як повні ревертанти y^+w^+, так і ревертанти лише по одному локусу white. Разом із цим з частотою були виявлені прямі мутації y^1, w, w^x (лимонні очі), m і неідентифікована мутація Х-загнутий край крила. Частота мутацій становила 45,871%-0,075% і була вищою на один-три порядки для різних мутантів у порівнянні з контролем (табл.1). Отже, зміни, які відбувалися при дії мітоміцину С на личинок лінії y^2w^{a4} - це, в основному, реверсії і локусно спрямовані мутації (yellow і white).

Виникло питання про можливість індукції мутагенезу мітоміцином С в інших лабораторних лініях. Для цього нами була взята лінія $y^2w^{a4}ct^{MR2}sn^w$, синтезована з стабільної y^2w^{a4} і нестабільної $ct^{MR2}sn^w$, а також лінія, яка несе 7 генетичних маркерів - $y^2sc^1w^{a4}es$ cv v f. Затравляли самців цих ліній, як і в попередньому досліді, вводячи мітоміцин С у вигляді мікроін'єкцій і вносячи в середовище (табл.1).

В лінії $y^2w^{a4}ct^{MR2}sn^w$ в контрольних дослідах із частотою 0,031% виявили 3 ревертанти w^+ і один мутант $y^1w^+ct^+sn^+$. Ін'єкції мітоміцину С у мух даної лінії не викликали активації мутагенезу, і серед 20087 проаналізованих самців одержали лише двох ревертантів по локусу white і сімох ревертантів по локусу cut. Введення розчину мітоміцину С методом личинкового згодовування збільшило частоту мутування в середньому у 200 разів. Усі одержані генетичні зміни представляли собою одномоментні мутації в кількох локусах. Частота появи мутантів була високою (3,657%). Як у лінії y^2w^{a4}, так і в лінії $y^2w^{a4}ct^{MR2}sn^w$ проявились прямі мутації y^1 і w^x.

Лінія $y^2sc^1w^aes$ cv v f виявилась стабільною, частота виникнення мутантів у контрольних дослідах становила 0,005% (табл.1). При ін'єкціях мітоміцину С самцям цієї лінії з'являлись поодинокі реверсії в локусах white, vermilion, forked і мутації w і ct. При личинковому згодовуванні розчину мітоміцину С цей показник підвищився на два порядки. Як і в попередній серії дослідів, з'явились мухи з оберненими мутаціями у всіх локусах і прямими мутаціями y^1 і w. Найбільше число мутантів складали ревертанти по трьох локусах - forked, scute і crosswineless: 116 серед потомків першого покоління і 124 серед самців-потомків другого покоління.

Слід відмітити, що в усіх лініях метод згодовування личинкам мутагену викликав ширший спектр мутацій і підвищував частоту їх виникнення. Це свідчить про те, що ефективність мутагену залежить від його впливу на певній стадії сперматогенезу. Відомо [Литвинова, 1977], що у личинок третього віку (76-86 год.) сперматогенез знаходиться на стадії утворення ранніх первинних сперматоцитів. Ін'єкції мутагенів проводили 3-4 денним самцям, коли сперматоцити I порядку проходили профазу першого поділу мейозу або вступали в стадію діакінезу. Здатність мітоміцину С утворювати розриви ДНК, активувати процеси рекомбінації та генної конверсії [Schewe et al., 1971] у ранніх сперматоцитах личинок третього віку, можливо, приводить до появи пучків мутацій.

У наступних дослідженнях був проаналізований вплив бромистого етидію і N-етил-N-нітрозосечовини на стабільність геному досліджуваних лабораторних ліній D.melanogaster і можливість індукції ними генетичної нестабільності. Акридиновий барвник бромистий етидій (3,8-Диаміно-5-етил-6-феніланантридіумбромід), як і мітоміцин С, приводить до утворення вільних кінців ДНК. Механізм його дії полягає в утворенні комплексу з ДНК, що перешкоджає нормальному ходу реплікації [Тарасов, 1984]. N-етил-N-нітрозосечовина, на відміну від двох попередніх мутагенів, викликає, в основному, точкові мутації [Тарасов, 1984]. Механізм дії даного мутагену полягає в етилюванні азотистих основ [Scorek et al., 1992]. Мутагени вводили методом личинкового згодовування. Результати досліджень зведені в таблицю 1. Бромистий етидій викликав у потомків затравлених личинок лінії y^2w^{a4}, головним чином, однолокусні мутації y^1, w, w^x і sc^1. Частота мутування становила 0,178%. Крім того, як і при личинковому згодовуванні мітоміцином С в лінії y^2w^{a4} з'являлись мухи y^1w^+ і y^2w^+. Тест на алелізм виявив їх ідентичність із мутантами такого самого генотипу, одержаними при дії мітоміцину С. У лінії $y^2w^{a4}ct^{MR2}sn^w$ бромистий етидій викликав зовсім інший, порівняно із впливом мітоміцину С, спектр мутацій : з'являлись мухи w^x, f, поодинокі ревертанти ct^+, sn^+ та ревертанти по кількох локусах одночасно $y^2w^+ct^+sn^w$, $y^+w^{a4}ct^+sn^+$. Частота появи мутацій, викликаних бромистим етидієм, становила 0,289% (табл.1). На стабільність лінії $y^2sc^1w^{a}es$ cv v f бромистий етидій, введений в середовище, не вплинув. Серед більше як трьох тисяч проаналізованих мух не виявили ні одного мутанта в першому, другому і третьому поколіннях (табл.1).

При личинковому згодовуванні N-етил-N-нітрозосечовиною в першому поколінні самців лінії y^2w^{a4} було проаналізовано 10646 хромосом і виявлено три мутанти з частотою 0,031% (табл.1): один - із мутацією y^1w^+; другий - sc; третій - $y^2w^{22}sc^1$. У лінії $y^2w^{a4}ct^{MR2}sn^w$ при впливі N-етил-N-нітрозосечовини в першому поколінні з'явився ревертант по двох локусах $y^2w^{a4}ct^+sn^+$. У другому поколінні в одній із пробірок виник пучок із 18 мутантних особин, в яких відбулися зміни у всіх маркерних локусах, у тому числі 10 самок з реверсією в локусі singed і мутаціями w^x і ct^{pN34}. При впливі N-етил-N-нітрозосечовини на личинок лінії $y^2sc^1w^aes$ cv v f спостерігали токсичний ефект при даній концентрації мутагену ($ЛД_{50}$). Розвиток проходив до стадії лялечки, на якій припинявся. Було проведено серію дослідів для визначення впливу різних концентрацій N-етил-N-нітрозосечовини на личинок даної лінії - $ЛД_{40}$, $ЛД_{20}$ та $ЛД_{10}$, але у всіх випадках спостерігали загибель мух на стадії лялечки. Можливо, висока чутливість даної лінії до мутагену пов'язана з наявністю багатьох мутантних локусів, що зумовлює зниження життєздатності організму.

Таким чином, при дослідженні впливу різних мутагенів на стабільність лабораторних ліній D.melanogaster, ми можемо стверджувати, що кожна лінія специфічно реагує на вплив певної хімічної речовини. Мітоміцин С, введений методом мікроін'єкцій самцям, як і бромистий етидій, згодований личинкам, головним чином, викликають поодинокі локусні мутації. Лінія $y^2sc^1w^aes$ cv v f виявилась стійкою до дії бромистого етидію і водночас проявила найвищу чутливість до впливу N-етил-N-нітрозосечовини, що проявилось у загибелі мух на стадії лялечки. Личинкове згодовування бромистого етидію і N-етил-N-нітрозосечовини стимулює утворення одномоментних мутацій в різних локусах. Найвищу частоту мутагенезу (45,871% і 22,126%) індукував мітоміцин С при згодовуванні личинок досліджуваних ліній.

Викликана мітоміцином С, бромистим етидієм та N-етил-N-нітрозосечовиною генетична нестабільність досліджених ліній могла бути результатом активації транспозицій мобільних елементів, рекомбінаційних і мутаційних процесів. Можливість класичного кросинговеру була виключена, так як одержаних мутантних самців схрещували з самками C(1)DX,y^1f, що несли вчеплені Х хромосоми. Для виявлення причин одержаних генетичних змін використали метод гібридизації in situ на політенних хромосомах з H^3-ДНК мобільних

елементів МДГ1, МДГ2, МДГ4. Оскільки фенотипово однакові мутанти, одержані від різних ліній і при впливі різних хімічних речовин, виявились алельними, проводили локалізацію мобільних елементів в Х-хромосомі в окремих мутантах кожного типу. Порівнювали сайти розміщення досліджуваних елементів в їх місцеположенням у вихідних лініях y^2w^{a4} і $y^2w^{a4}ct^{MR2}sn^w$. Результати представлені в таблиці 2. Кожен МДГ у вихідній лінії y^2w^{a4} і похідних мутантах має як однакові (для МДГ1 9А, 20А), так і відмінні сайти локалізації. Відмінності характеризувалися ексцизією цих елементів в постійних місць розташування, або, навпаки, їх інсерцією в новий сайт. Так, у всіх одержаних мутантів відбулось вирізання МДГ1 із сайту 10С, а МДГ2 із сайту 6А порівняно з вихідною лінією. Мутанти y^1w^+ (одержані від різних ліній і різним шляхом) характеризувалися серією однотипових включень МДГ2 в сайти 10С,11А,13F. Мутант $y^2w^{a4}ct^{MR2}sn^+f$, похідний лінії $y^2w^{a4}ct^{MR2}sn^w$, одержаний при впливі бромистого етидію, характеризувався включенням МДГ4 в район 15F, який відповідає локусу forked. Таким чином, було одержано докази того, що мітоміцин С, бромистий етидій і N-етил-N-нітрозосечовина активізують одночасні транспозиції різних мобільних елементів. Подібна активація різних МГЕ МДГ4, Сталкера і жокея у дрозофіли була показана Георгієвим і співр. [Георгиев и др., 1988]. Разом в цим, появу не всіх одержаних генетичних змін можна пояснити транспозиціями мобільних елементів. Так, для мутантів, у яких відбулась мутація в локусі yellow (y^2-y^1) і реверсія w^+ характерна поява сайтів гібридизації МДГ2 1А, 2В, 3А, а також відсутність місць гібридизації в МДГ4 в Х-хромосомі. Такі сайти локалізації МДГ2 властиві лінії $C(1)DX,y^1w^+f$. Поява цих сайтів у мутантних самців можлива у випадку проходження аномальної рекомбінації між Х-хромосомою самця і будь-якою із Х-хромосом самки лінії $C(1)DX,y^1w^+f$. В результаті такої рекомбінації локуси $yellow^1$ і $white^+$, характерні для зчеплених Х-хромосом, переходять в Х-хромосому самців. Ці рекомбінаційні процеси могли бути причиною виникнення сайтів гібридизації МДГ4 в місць його локалізації 1В,3D,4D,19E,20С у вихідній лінії, оскільки Х-хромосома самок не містить сайтів локалізації МДГ4. Про можливість такої рекомбінації свідчить поява мозаїків в першому і другому поколіннях, самок з фенотиповими ознаками вихідних ліній та самок-ревертантів.

Таким чином, індукція мутагенезу під впливом мітоміцину С,

Таблиця 2

Сайти локалізації мобільних генетичних елементів на препаратах політенних хромосом личинок ліній y^2w^{a4}, $y^2w^{a4}ct^{MR2}sn^w$ і одержаних мутантів

| №п/п. Дослід. Лінія. | Сайти локалізації* | | |

бромистого етидію і N-етил-N-нітрозосечовини в досліджених нами лабораторних лініях обумовлена як транспозиціями мобільних елементів, так і рекомбінаційними процесами.

Дослідження молекулярно-генетичної природи мутацій в локусі white, які виникли при впливі хімічних речовин

При дослідженні впливу мітоміцину С , бромистого етидію і N-етил-N-нітрозосечовини на стабільність досліджуваних лабораторних ліній D.melanogaster було одержано серію мутантів зі зміненим кольором очей. Комплементаційний аналіз показав, що всі генотипові зміни відбувалися в локусі white. Для вияснення молекулярних механізмів появи цих мутантів використали метод блот-гібридизації по Сауверну. За допомогою рестриктаз XbaI, BamHI, EcoRI проаналізували геномні ДНК лінії y^2w^{a4} і її мутантних похідних. Результати блот-гібридизації приведені на рисунку 1. Відомо, що мутація w^{a4} зумовлена включенням мобільного диспергованого елементу BEL в тіло мобільного елемента copia [Zachar et al., 1985]. Гібридизацію проводили з допомогою мічених ^{32}P ДНК плазмід pw+(B-S) і pw+(B-R), які містили фрагменти локусу white лінії дикого типу OregonR. Одержані результати свідчать про те, що вихідна лінія в локусі white містить мобільний елемент copia з включеним у нього МГЕ BEL і неідентифіковану нами вставку ДНК розміром ~11,5 т.п.н. (НВ) (рис.2.1, 2.2), яка знаходиться в сайті рестрикції BamHI промоторної області [O'Hara et al., 1984] (+4,7 т.п.н.)(рис.2.2).

На основі аналізу довжини рестриктних фрагментів у ревертантів y^2w^+ і y^1w^+ показано, що реверсія не привела до відновлення структури локусу лінії дикого типу. У ревертанта y^2w^+ відбулась делеція copia, BEL і неідентифікованої вставки; остання вирізалась неточно, залишивши частину своєї ДНК і захопивши частину ДНК з р-ону першого экзону (рис.1, 2.2В). Поява ревертанта з фенотипом y^1w^+ зумовлена включенням ділянки ДНК розміром ~5 т.п.н. в область другого экзона, з якого вирізались мобільні елементи copia і BEL (рис.1, 2.2Г).

У мух y^2w^x (фенотип лимонні очі) мутація викликана делецією розміром ~11,5 тпн, яка включала частину неідентифікованої вставки і відрізка ДНК першого экзона локусу white (рис.1, 2.2Д). Змін в дистальній ділянці локуса виявлено не було.

Мутант з фенотипом $y^2sc^1w^{22}$ характеризувався значними змінами в будові локусу white. Дистальна ділянка локусу у нього співпадала з такою у лінії дикого типу Oregon-R, тобто мобільні еле-

Рис. 1 Блот-гібридизація по Сауазерну ДНК ліній (1-OregonR, 2-y^2w^{a4}, 3-y^2w^+, 4-y^1w^+, 5-y^2w^x, 6,7-y^2w^{35}, 8-y^2w^{35-2}, 9-$y^2sc^1w^{22}$), розщепленої BamHI-EcoRI (А,Б) і XbaI (В), в плазмідами pw^+(B-S) (А) і pw^+(B-R) (Б,В)

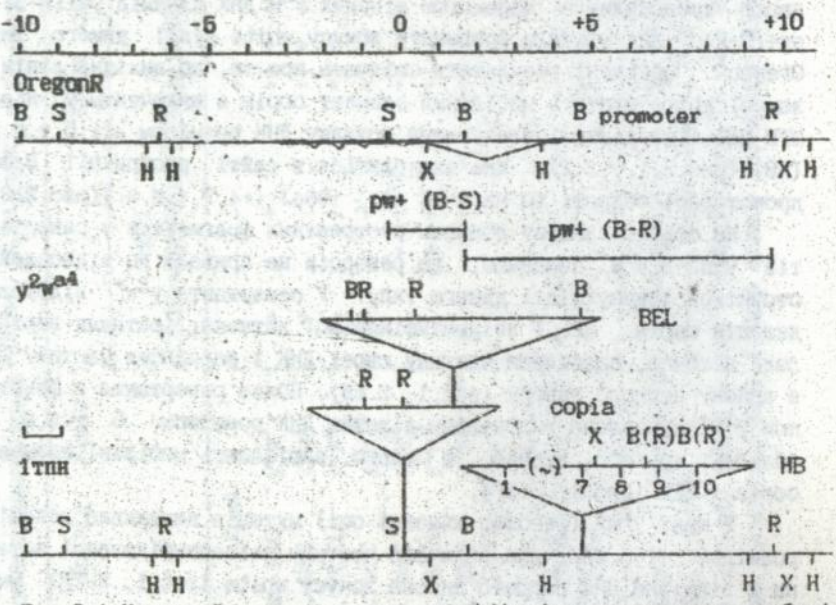

Рис.2.1 Карти фрагментів локусу white і використаних в роботі плазмід. — - екзони. Трикутниками вказані місця інсерції мобільних елементів: BEL, copia і неідентифікованої вставки (HB)

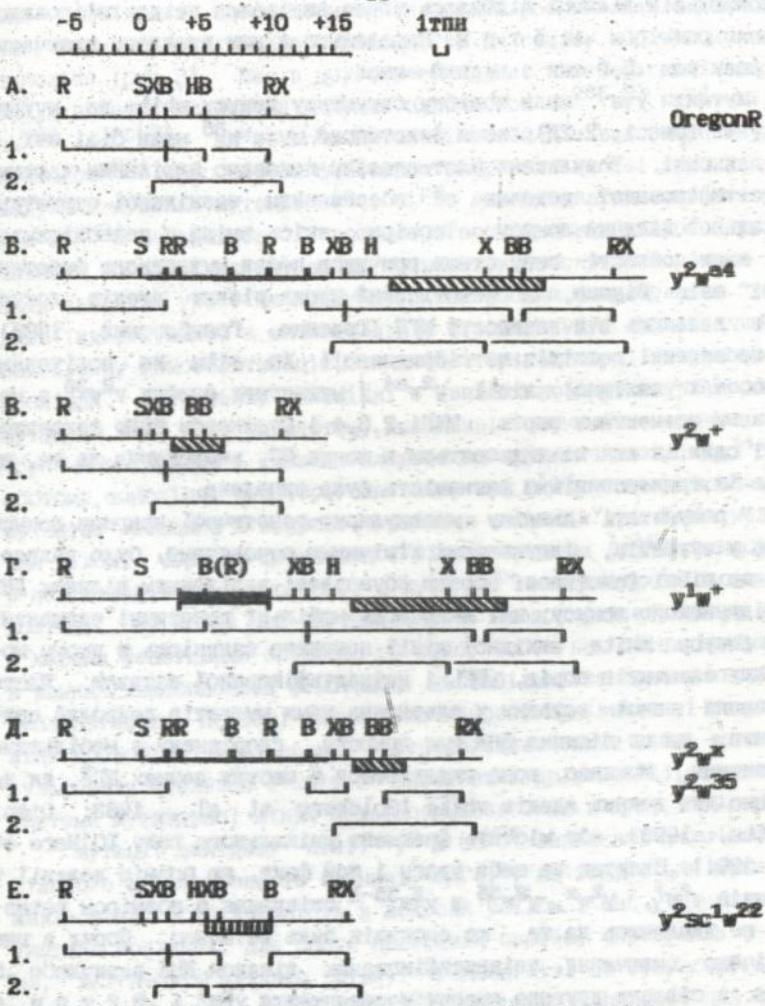

Рис.2.2. Рестриктні карти одержаних white мутантів:
1- розщеплення геномної ДНК ендонуклеазами EcoRI-BamHI; 2- XbaI. Позначено: гібридизацію з міченими плазмідами: ⌊⌋ - pw+(B-S), ⌐¬ - pw+(B-R); включення фрагментів ДНК: — - copia, ▬ - BEL, ▨ - неідентифікованої вставки, ▮ - вставки у мутанта y^2w^x, ▮ - вставки у мутанта $y^2sc^1w^{22}$; сайти рестрикції: B- BamHI, S - SacI, R - EcoRI, X - XbaI, H - HindIII.

менти copia і BEL делетували в другого екзону (рис.1,2.2Е). У проксимальній ділянці відбулось точне вирізання неідентифікованої вставки розміром ~11,5 т.п.н. Паралельно в цим виявлено включення ДНК розміром ~5,2 тпн в перший екзон.

Мутанти y^2w^{35} мали подібну структуру локусу white до мутантів y^2w^x (рис.1, 2.2Д), хоча фенотипово мухи w^{35} мали білі очі, а w^x - лимонні. Результами блот-аналізу покавано вирізання частини неідентифікованої вставки зі збереженням невміненої структури дистальної ділянки локусу. Імовірно, якісь зміни у недосліджуваній нами області гену стали причиною появи мутантного фенотипу "білі" очі. Відомо, що фенотиповий прояв різних алелів локусу white залежить від наявності МГЕ [Юрченко, Голубовский, 1988]. При проведенні дослідів по гібридизації in situ на політенних хромосомах вихідної лінії y^2w^{a4} і мутантних особин y^2w^{35} з мобільними елементами copia, МДГ1,2,3,4 і Сталкером було покавано, що ні один із них не включається в локус ЗС, незважаючи на те, що певна їх транспозиційна активність була виявлена.

У результаті аналізу молекулярно-генетичної природи локусу white у мутантів, індукованих хімічними речовинами, було виявлено, що різні фенотипові прояви обумовлені вирізанням ділянок ДНК досліджуваного локусу, які включають мобільні генетичні елементи. Для локусу white вихідної лінії показана наявність в ньому мобільних елементів copia, BEL і неідентифікованої вставки. Часте вирізання даної вставки у одержаних нами мутантів дозволяє припустити, що ця ділянка ДНК має природу, споріднену з мобільними елементами. Можливо, вона складається в частин деяких МГЕ, як це описано для деяких алелів white [Goldberg et al., 1983; Qian, Pirotta, 1995] або містить фрагмент унікального гену [O'Hare et al., 1991]. Звертає на себе увагу і той факт, що розмір делеції у мутантів y^2w^+, y^2w^x, y^2w^{35} и y^2w^{35-1} співпадає з розміром вставки, не дивлячись на те, що ексцизія була неточною. Поряд в цим відмічено включення неідентифікованих ділянок ДНК величиною ~5 т.п.н. в область другого екзону у ревертанта y^2w^+ і ~5,2 т.п.н. в промоторну частину в мутанта $y^2sc^1w^{22}$.

Нова система продовженої генетичної нестабільності, викликана N-етил-N-нітрозосечовиною

При личинковому вгодовуванні N-етил-N-нітрозосечовини в концентрації $ЛД_{50}$ личинкам лінії $y^2w^{a4}ct^{MR2}sn^w$ в одній із пробірок другого покоління був виявлений пучок із 18 мутантних особин, в

яких відбулись зміни у всіх маркерних локусах. Оскільки в наступних поколіннях одержані мутанти давали розщеплення серед потомків, була прослідкована стабільність їх геному протягом сорока поколінь (рис.3). Вже в другому поколінні спостерігали появу мутацій по всіх маркерних локусах одночасно: y^2 - y^1, w^{a4} - w, w^x, ct^{MR2} - ct^{pN34}, sn^w - sn^+. Мутантні особини з видозміненим краєм крила ct^{pN34} (рис.4А) за фенотипом розділили на дві групи, що нагадували музейні мутації ct^n і ct^{pN}, але одержати гомозиготну лінію ct^{pN34} не вдалось. У потомстві постійно відбувалось розщеплення, тобто спостерігалась різна експресивність даного гену. Слід звернути увагу на появу мутантних самок (схрещування проводили індивідуально з самками лінії C(1)DX, yf), що свідчить про самовільну гомозиготизацію, яка спостерігалася і в попередніх дослідах. У третьому поколінні з'явилися нові мутантні особини з мутацією sc^1, а у четвертому поколінні - мухи з жовтим тілом, чорними щетинками і темними плямами на грудях і голові (y^{34a}). В шостому поколінні спостерігали появу мух з короткими крилами m. Мутантні особини з яскраво-червоними очима (w^v) і мутанти з жовтим тілом, чорними щетинками і сірими крилами (y^{34b}) виплодилися у дев'ятнадцятому поколінні, а мухи sn^{ex} - в двадцять сьомому поколінні. На даний час нестабільність продовжується, однак особин з новими фенотипами одержано не було, тобто всі зміни відбувались в рамках вищеописаних фенотипів. Нестабільність такого типу можна реплікативною. Подібні явища були описані при вивченні ряду поколінь дрозофіли після впливу нітрозоетилсечовини або етилметансульфонату Абелевою і співр. [Абелева и др., 1974], а також для системи мутаторної лінії D.melanogaster [Ким и др., 1989, 1991].

Мутації вихідної лінії y^2 і ct^{MR2} викликані включенням мобільного диспергованого елементу МДГ4, у зв'язку з цим була проаналізована його наявність в локусах yellow і cut у одержаних мутантних похідних. Для цього проводили систему схрещувань з лініями, які несуть мутацію su(Hw). Гомозиготні по супресору $su(Hw)^2$ мутанти y^1, y^{34a}, y^{34b} і ct^{pN34}, одержані в процесі цих схрещувань, не показали реверсії до дикого типу. Оскільки, su(Hw) супресує мутантні алелі локусів, індуковані МДГ4 [Modolle et al.,1983], відсутність реверсії свідчила про те, що дані мутації не викликані інсерцією МДГ4 в досліджувані локуси. Паралельно нами встановлено, що мутації y^2 і ct^{MR2} вихідної лінії, які несуть у своєму складі МДГ4, ревертували до дикого типу при наявності

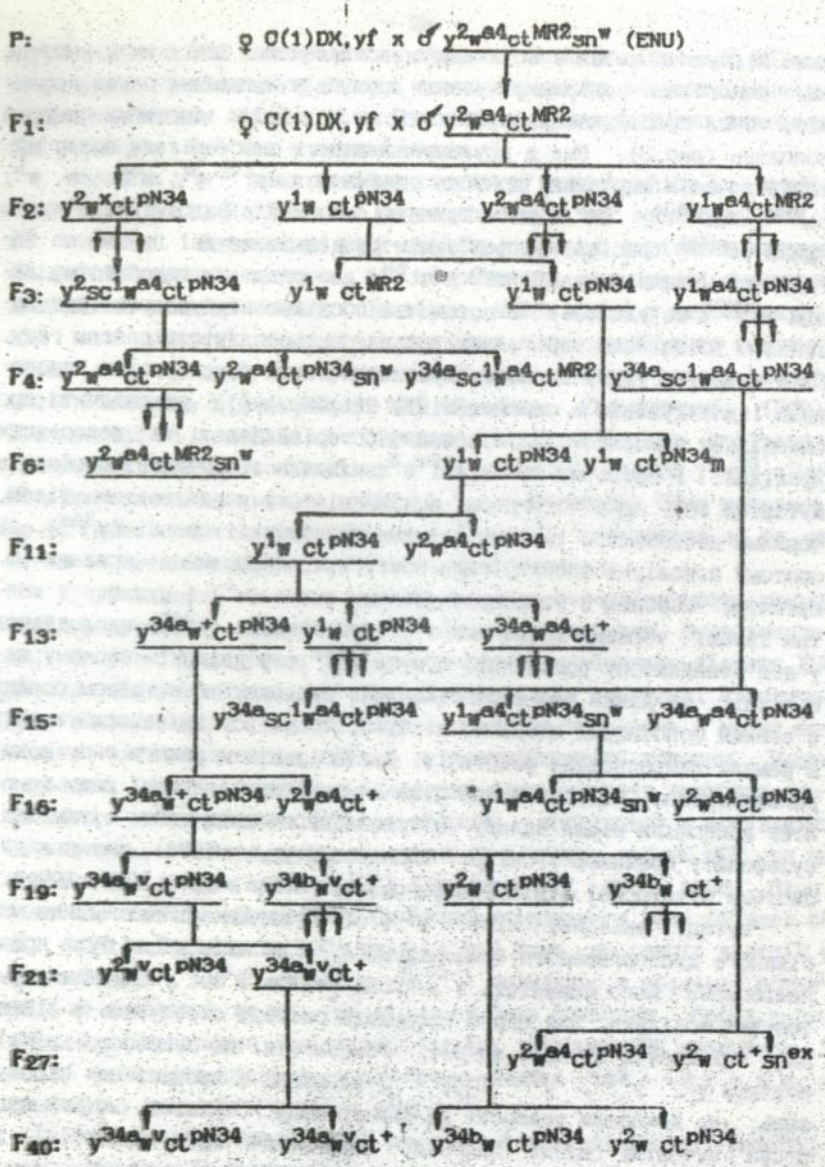

Рис.3 Фрагмент схеми системи продовженої нестабільності лінії $y^2_w a^4 ct^{MR2} sn^w$, індукованої N-етил-N-нітрозосечовиною (ENU)

su(Hw) в гомозиготному стані. Одержані дані дали підстави вважати, що в системі продовженої нестабільності лінії $y^2w^{a4}ct^{MR2}sn^w$ (рис.3) спостерігається явище вирізання та повторного включення МДГ4 у локусах y^2 і ct^{MR2}. Для підтвердження цього припущення була досліджена локалізація даного мобільного елемента на Х-хромосомах досліджуваних ліній методом гібридизації in situ. Встановлено, що мобільний елемент МДГ4 включений в сайт 1В, в якому цитологічно знаходиться локус yellow, у всіх ліній, які несли мутацію y^2. Також були виявлені інсерції МДГ4 в область локуса cut (7В) в мутантних лініях $y^2w^{a4}ct^{MR2}sn^w$ і $y^{34b}w^vct^+sn^+$ і його ексцизію у мутантів ct^{pN34}.

Таким чином, нами виявлена і досліджена протягом 40 поколінь нова система продовженої генетичної нестабільності у D.melanogaster, індукована N-етил-N-нітрозосечовиною. Нестабільність характеризувалась появою мутацій в локусах yellow, scute, white, cut, singed, miniature, vermilion.

Молекулярний аналіз мутантів по локусу cut, одержаних в новій системі продовженої генетичної нестабільності

Оскільки мутанти по локусу cut, одержані в цій системі, належали до другої групи комплементації, то з допомогою блот-аналізу по Саузерну був проскринований район, що відповідає вставкам МДГ4 в мутаціях ct^6 і ct^{MR2}, які відносяться до цієї ж групи комплементації [Johnson, Judd, 1979; Чуриков и др., 1987]. Для розщеплення геномних ДНК використали рестриктази EcoRI і BamHI; гібридизацію мутантів і ревертантів провели з плазмідою p8.3 (рис.4В,Г). Аналіз довжини рестриктних фрагментів підтвердив, що локус cut вихідної лінії характеризується вставкою мобільного елементу МДГ4 в ділянку, що відповідає інсерції МДГ4 в мутанта ct^6 [Johnson, Judd, 1979]. В ревертанта ct^+ не спостерігалось змін в розподілі смуг гібридизації в цьому районі порівняно з контрольною лінією OregonR. Аналіз довжини рестриктних фрагментів ДНК мутантів ct^{pN34} (типу ct^n і ct^{pN}) не виявив між ними відмінностей у будові ДНК досліджуваної ділянки локусу. Порівнюючи розподіл смуг гібридизації цих мутантів із вихідною лінією та особинами дикого типу, можна стверджувати, що мутація ct^{pN34} виникла в результаті значних перебудов в регуляторній ділянці локусу cut: відбулася ексцизія мобільного елементу МДГ4 і делеція невеликої ділянки ДНК розміром 1,7тпн з району -125 одиниць рестриктійної карти, крім того, в сайті -122,7 виявлено

Львів. н.-т. б-ка ім. В. Стефаника
АН України

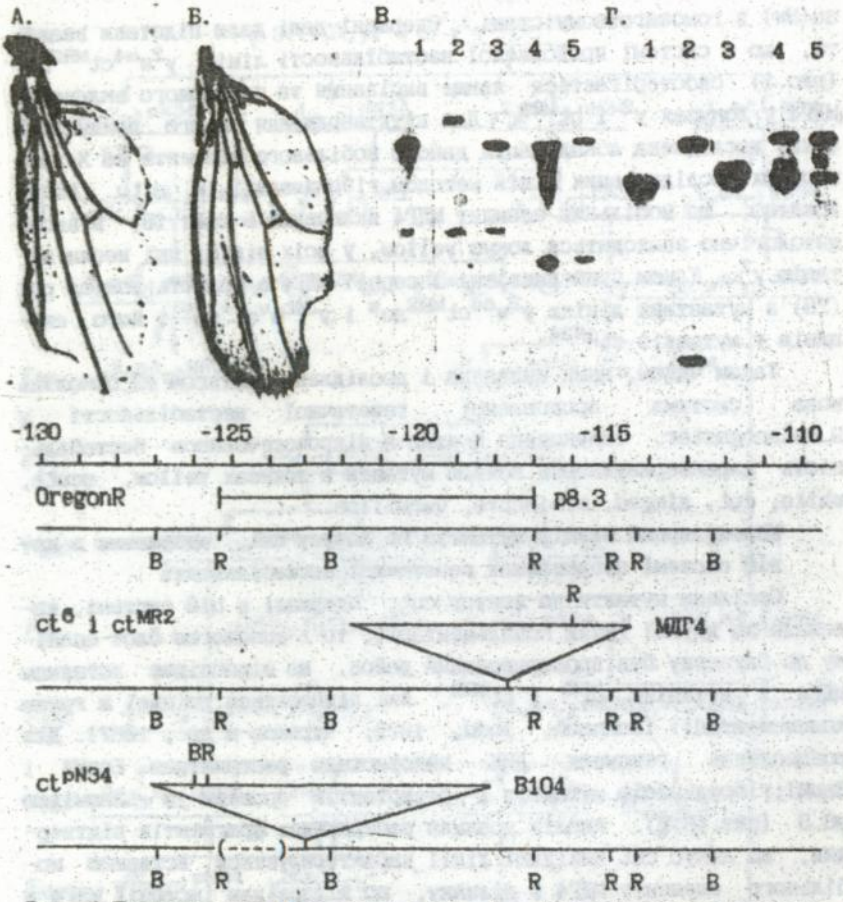

Рис. 4 Природа мутацій в локусі cut. А - форма крилової пластинки мутантів $y^2w^{a4}ct^{pN34}$ (типу ct^n), Б - $y^2w^{a4}ct^{pN34}$ (типу ct^{pN}); В - блот-гібридизація по Сауверну геномної ДНК cut мутантів, розщепленої ендонуклеазою BamHI, Г - EcoRI (1-OregonR, 2-$y^2w^{a4}ct^{MR2}sn^w$, 3-$y^2w^{a4}ct^+$, 4-$y^2w^{a4}ct^{pN34}$ (типу ct^n), 5 - $y^2w^{a4}ct^{pN34}$ (типу ct^{pN}); Д - рестриктна карта частини локуса cut [Чуриков и др., 1987]. p8.3 - плазміда, використана для гібридизації. Трикутниками позначені сайти інсерції МДГ4 і неідентифікованої вставки, штрихова лінія означає делецію, B і R - сайти рестрикції BamHI і EcoRI відповідно.

вставку ДНК розміром 8,7тпн (рис.4В-Д). Дослідження множинних трансповицій в локусі cut, описаних Чуріковим і Герасимовою [Чуриков и др., 1987; Герасимова и др., 1988] показало, що різні фенотипові прояви даної мутації зумовлені включенням ряду мобільних гентичних елементів: мутація ct^{n} викликана включенням мобільного елемента B104 (roo), ct^{MRpN} - вставкою жокея в МДГ4, мутації з локальних груп комплементації - інсерціями Геркулеса і репейника. Ладвіщенко зі співавт. [Ладвищенко и др. 1985] також досліджували дану область локусу cut у мутантів, одержаних на фоні супернестабільності в локусі singed в умовах поєднання двох систем нестабільності: P - M гібридного дисгенезу і системи продовженої нестабільності, в якій активно переміщувався Сталкер. Автори показали, що одержані ними мутації зумовлені делеціями ділянок ДНК розміром від 1,2 до 1,4тпн у мутантів ct^{pNS} і приблизно 0,5тпн у мутантів ct^{ns} в району -125 одиниць рестриктної карти. У досліджуваній нами системі продовженої нестабільності одержані мутанти ct^{pN34} характеризувалися аналогічною делеціею розміром 1,7тпн. Аналізуючи вставку ДНК розміром 8,7тпн, можна припустити, що крім делеції, дану мутацію зумовила також інсерція МДГ B104 (roo), який відповідає розмірам вставки, має характерні для неї сайти рестрикції для EcoRI і BamHI. Тобто, структура локусу одержаних нами мутантів ct^{pN34} нагадує описану Чуріковим зі співавт. [Чуриков и др., 1987] мутацію ct^{MRpN}. Однак, за даними аналізу довжини рестриктних фрагментів у мутантів ct^{pN34} мобільний елемент B104 включається в локус cut в протилежному напрямку, що спричиняє інший фенотипічний прояв у порівнянні з мутантами ct^{MRpN}.

Отже, методом блот-гібридизації по Сауєрну були досліджені мутанти по локусу cut, одержані в новій системі продовженої генетичної нестабільності у D. melanogaster, індукованій N-етил-N-нітрозосечовиною. Ревертанти характеризувались відновленням структури локусу лінії дикого типу OregonR. Мутація ct^{pN34}, що привела до видозміни форми краю крила, локалізована в II групі комплементації, зумовлена інсерцією фрагменту ДНК розміром 8,7тпн, делеціею МДГ4 та невеликої ділянки розміром 1,7тпн в області -125 одиниць карти [Чуриков и др., 1987].

ВИСНОВКИ

1. В результаті дослідження впливу хімічних мутагенів на стабільність лабораторних ліній D.melanogaster виявлено, що реакція на дію певного мутагену залежить від генотипу лінії. Мітоміцин С, введений методом внутрішньочеревних ін'єкцій і бромистий етидій, згодований личинкам, викликають поодинокі локусні мутації; мітоміцин С і N-етил-N-нітрозосечовина при згодовуванні личинкам приводять до появи мутацій одночасно у кількох локусах. Показано, що лінія $y^{2}w^{a}sc^{1}es$ cv v f є стійкою до дії бромистого етидію, однак проявляє найвищу, у порівнянні з іншими проаналізованими лініями, чутливість до впливу N-етил-N-нітрозосечовини.

2. Встановлено, що індукована хімічними реагентами генетична нестабільність досліджених ліній є результатом активації транспозицій мобільних елементів МДГ1, МДГ2 і МДГ4.

3. Методом блот-гібридизації по Саузерну виявлено, що різні генотипові зміни в локусі white у індукованих хімічними речовинами мутантів викликані вирізанням ділянок ДНК досліджуваного локусу, які включають мобільні генетичні елементи. Поряд з цим відмічено включення неідентифікованих вставок ДНК в область другого екзону у ревертанта $y^{2}w^{+}$ і в промоторну частину в мутанта $y^{2}sc^{1}w^{22}$.

4. Виявлена і досліджена протягом 40 поколінь нова індукована N-етил-N-нітрозосечовиною система продовженої генетичної нестабільності у D. melanogaster, яка характеризується появою нових мутацій в локусах yellow, scute, white, cut, singed, miniature, vermilion.

5. Показано, що виявлена в новій системі продовженої генетичної нестабільності мутація ct^{pN34}, яка привела до видозміни форми краю крила, локалізована в II групі комплементації локусу cut; вона обумовлена інсерцією фрагменту ДНК розміром 8,7тпн, що нагадує за будовою мобільний генетичний елемент B104, делецією МДГ4 та невеликої ділянки розміром 1,7 тпн. Одержані ревертанти характеризувались відновленням структури локусу cut, властивої для лінії дикого типу OregonR.

Список наукових публікацій, що відображають основні положення дисертації:

1. Максимив Д.В., Мороз О.М., Мочурад-Щербата Г.Р. и др. Генетические изменения некоторых локусов Х-хромосомы дрозофилы под влиянием митомицина С // Тез. докл. I Всес. конф. по генетике насекомых. Москва. 1991. С.71.

2. Максимів Д.В., Мороз О.М., Петрук С.Ф., Мочурад-Щербата Г.Р. Нестабільність окремих локусів Х-хромосоми дрозофіли під впливом мітоміцину С // Тез. доп. VI з'їзду УТГІС. Київ. 1992. Т.1. С.23.

3. Максимів Д.В., Щербата Г.Р. Індукція генетичної нестабільності деяких локусів Х-хромосоми дрозофіли мітоміцином С і бромистим етидієм // Вісник Львівського ун-ту, сер. Біол., вип. 23. Львів, Світ, 1994, с. 131-135.

4. Chernik Ya.I., Bobak Ya.P., Shcherbata G.R. Genetic unstability of Drosophila melanogaster by complex effect of irradiation and nitroethylurea // 2nd International Conference Radiobiol. Consequences of Nuclear Accidents. Moscow, 1994, p. 39.

5. Максимів Д.В., Щербата Г.Р., Черник Я.І. Виявлення і дослідження мутаційних змін, індукованих мітоміцином С, в стабільних лініях D. melanogaster // Цитологія і генетика. 1995. N1.С.62-68.

6. Черник Я.І., Шоханов С.О., Щербата Г.Р. Молекулярно-генетична природа мутацій, що індуковані рентгенівським опроміненням у Drosophila melanogaster// II з"їзд радіобіол. України. Дніпро-

петровськ. Тез.доп., 1995, с.34.

7. Шоханов С.О., Щербата Г.Р., Черник Я.І. Геномная изменчивость лабораторных линий и природных популяций D.melanogaster при действии рентгеновского излучения // Генетика, 1996, N5, С.

8. Щербата Г.Р., Максимив Д.В. Исследование молекулярно-генетической природы мутаций по локусу white, индуцированных химическими веществами у D.melanogaster // Генетика, 1996, N5, С.

Shcherbata G.R. The Investigation of Instability of Some *Drosophila melanogaster* X-chromosoma Genes Appeared by the Influence of Chemical Reagentes
Thesis S.D. (in Biology) on the speciality 03.00.15.-genetics. Inst. of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Sciencies of Ukraine, Kiev, 1996.

The influence of chemical mutagens mitomicin C, ethydium bromide and N-ethyl-N-nitrosourea on stability of genetic apparatus of D.melanogaster laboratory strains was investigated. It was shown that the mutagenesis has specific character on loci yellow, white and cut. The series of obtained mutants was investigated by the in situ hybridization and it was shown that transpositions of mobile genetic elements are the main mutagenic mechanisms. The new system of prolonged genetic instability obtained under the influence of N-ethyl-N-nitrosourea was characterized by the appearance of new mutations in some X-chromosome loci was researched during 40 generations. It was shown by the method of Southern blot hybridization that the different phenotypes of white and cut mutants are causes by deletions and insertions DNA fragments includes mobile elements.

Щербата Г.Р. Исследование нестабильности некоторых локусов Х-хромосомы *Drosophila melanogaster*, индуцированной химическими мутагенами. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.15 - Генетика. Институт физиологии растений и генетики, НАН Украины, Киев, 1996.

Исследовано влияние химических мутагенов митомицина С, бромистого етидия и N-этил-N-нитрозомочевины на стабильность генетического аппарата лабораторных линий D.melanogaster. Показано, что мутагенез носит локусоспецифический характер, затрагивая, в основном, локусы yellow, white и cut. Гибридизацией in situ проанализирована серия полученных мутантов и показано, основным механизмом мутагенеза являются транспозиции мобильных генетических элементов. Под действием N-этил-N-нитрозомочевины получена и исследована на протяжении 40 поколений новая система продленной генетической нестабильности у дрозофилы, которая характеризовалась возникновением новых мутаций в ряде локусов Х-хромосомы. При анализе white и cut мутантов методом блот-гибридизации по Сауверну выявлено, что их различные фенотипы обусловлены делециями и вставками фрагментов ДНК, включающих мобильные элементы.

Ключові слова: D.melanogaster, генетична нестабільність, мобільні елементи, хімічні мутагени, локуси white і cut.

Ав 34.170

Ротапринт ЛеЦНТЕІ Замовлення 19 Тираж 100