



ИТОГИ НАУКИ И ТЕХНИКИ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ
БИОЛОГИЯ

ТОМ 20



ISSN 0202—7070

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО НАУКЕ И ТЕХНИКЕ

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

ВСЕСОЮЗНЫЙ ИНСТИТУТ НАУЧНОЙ И ТЕХНИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

ИТОГИ НАУКИ И ТЕХНИКИ

СЕРИЯ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

ТОМ 20

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ОБЪЕКТЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Серия издается с 1972 года



МОСКВА 1984

Главный редактор информационных изданий ВИНТИ
профессор *А. И. Михайлов*

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

информационных изданий по физико-химической
биологии и биотехнологии

Главный редактор — академик *Ю. А. Овчинников*

Члены редакционной коллегии: академик *А. А. Баев*,
чл.-корр. АН СССР *И. В. Березин*, профессор *А. А. Богданов*,
профессор *Э. И. Будовский*, профессор *Ю. А. Владимиров*,
профессор *В. Г. Дебабов*, чл.-корр. АН СССР *Р. П. Евстигнеева*,
профессор *С. Г. Инге-Вечтомов*, чл.-корр. АМН СССР *К. П. Кашкин*,
профессор *Л. Л. Киселев*, академик *Н. К. Кочетков*,
академик *А. А. Красновский*, чл.-корр. АН СССР *В. Л. Кретович*,
канд. биол. наук *Г. Т. Жангельдина* (ученый секретарь),
академик АМН СССР *Р. В. Петров*, докт. биол. наук *О. Л. Поляновский*,
академик *С. Е. Северин*, академик *Г. К. Скрябин*,
чл.-корр. АН СССР *В. П. Скулачев*, академик ВАСХНИЛ СССР *А. А. Созинов*,
академик *А. С. Спириг*, чл.-корр. АН СССР *Р. Б. Хесин*,
академик *Е. И. Чазов*, профессор *Ю. А. Чизмаджев*,
академик *В. А. Энгельгардт*

Научные редакторы: докт. биол. наук *А. А. Нейфах*,
докт. биол. наук *Ю. В. Ильин*

ПРЕДИСЛОВИЕ

Начиная со времени становления молекулярной биологии как науки, ее успехи и достижения были тесно связаны с выбором подходящих объектов для решения тех или иных актуальных задач.

Сборник начинается с обзора, посвященного молекулярной биологии и генетике нематоды *Caenorhabditis elegans*. Этот новый для многих наших ученых объект привлекает в последние годы внимание широкого круга зарубежных исследователей как удобная модель для решения важных биологических проблем, таких как изучение процессов индивидуального развития, старения, нервной деятельности. Уже классическим объектом стала бактерия *Escherichia coli*. Однако для решения многих современных биологических проблем, таких как процессы клеточной дифференцировки, морфогенеза и других требуются более сложно организованные и, вместе с тем, еще довольно простые организмы. Так как все развитие молекулярной биологии шло и продолжает идти в тесной связи с генетическими исследованиями, наиболее подходящими здесь являются виды эукариот, хорошо изученные на генетическом уровне. Первое место среди них, несомненно, занимает плодовая мушка *Drosophila melanogaster*. К числу ее основных достоинств следует отнести сравнительную простоту генома, относительно короткий жизненный цикл, возможность прямой локализации генов на хромосомах с помощью методов молекулярной гибридизации. Неслучайно многие важные открытия последнего времени сделаны с использованием именно этого объекта. К числу наиболее ярких из них относится обнаружение подвижных генетических элементов. Сейчас становится ясным, что эти элементы чрезвычайно широко распространены в эукариотических геномах, выполняя сложные, во многом пока загадочные для нас функции. Вопросам, связанным с организацией мобильных генетических элементов, закономерностям их распределения в геноме дрозофилы посвящен один из обзоров сборника.

Из двух других обзоров этого сборника также следует, что дрозфила является удобным и подходящим модельным объектом для решения самых разнообразных задач современной молекулярной биологии, особенно процессов, связанных с регуляцией экспрессии генома. В самом деле, изучение явления теплового шока у дрозфилы, которое, как сейчас становится ясно, широко распространено и среди других высших организмов, показало, что быстрая реакция клетки на повышение температуры в первую очередь связана с изменением транскрипции генов — избирательным включением одних и выключением других. Еще более сложные процессы происходят при действии стероидного гормона экдистерона на клетки дрозфилы. Вызванная этим воздействием, чрезвычайно сложная система взаимодействия разных классов макромолекул лежит в основе реализации дифференцировочных и морфогенетических процессов. Однако и в этом случае точкой приложения регулирующего действия гормона является избирательная транскрипция генов.

Последний обзор сборника посвящен дифференциальной репликации ДНК у дрозфилы. Этой интересной проблемой сейчас занимается много исследователей; она имеет общее значение, так как подобное явление широко распространено у различных видов животных и растений.

Отмеченными организмами, однако, не исчерпывается список удобных и привлекательных объектов, которые широко используются в настоящее время в молекулярной биологии. Здесь следует отметить слизевиков *Dictiostelium discoideum*, широко применяемые для исследования морфогенеза, культуры клеток и др. Тем не менее, можно надеяться, что сборник окажется полезным для целого круга специалистов по биохимии и генетике, интересующихся молекулярно-генетическими проблемами.

УДК 34.15.05

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА НЕМАТОДЫ
CAERNORHABDITIS ELEGANS.

В.К. Равин

ВВЕДЕНИЕ

Период с 1953 по конец 60-х годов – время крупных достижений в биологии. Существуют две хорошо известные причины такого яркого всплеска в биологической науке – широкое использование физических и химических методов и выбор в качестве основных объектов исследования сравнительно просто устроенных вирусов и бактерий. Однако прогресс в решении таких важных биологических проблем, как клеточная дифференцировка, генетический контроль морфогенеза, нервная деятельность и др. был гораздо более скромным, ибо этих процессов просто нет у микроорганизмов. В такой ситуации у части исследователей возникло стремление применить идеи и технические возможности, развитые к этому времени к изучению более сложных, высших организмов, у которых уже есть и индивидуальное развитие, и морфогенез, и нервная деятельность. Поскольку работы с микроорганизмами продемонстрировали высокую эффективность генетического анализа, нужно было выбрать такой объект, который, с одной стороны, был бы достаточно сложным (т.е. "высшим"), но, с другой стороны, допускал бы возможность проведения глубокого генетического анализа. Традиционные объекты биологии развития – позвоночные животные – мало подходят для этой цели из-за длительного цикла развития и невозможности оперировать в лаборатории с большим числом (порядка 10^4 – 10^6) синхронно развивающихся организмов, что очень важно для генетика и биохимика. Наиболее подходящим объектом является дрозофила, тем более, что к этому времени генетика дрозофилы была разработана достаточно хорошо. Часть исследователей по инициативе С. Бензера перешла на работу с дрозофилой. Другая часть, насчитывающая в настоящее время более

20 лабораторий, перешла на работу с относительно новым объектом – нематодой *Caenorhabditis elegans*. Инициатором внедрения этого объекта в молекулярную биологию является по общему признанию Сидней Бреннер, работа которого "Генетика *C. elegans*"; опубликованная в 1974 г., стала фундаментом последующих исследований. В настоящее время нематода *C. elegans* используется как объект для изучения проблем индивидуального развития и нервной деятельности. В настоящем обзоре рассматривается только генетика и развитие *C. elegans*. Нематода *C. elegans* относится к роду *Rhabditis* класса круглых червей. Она впервые описана в 1900 г., но систематически поддерживается, начиная с работ Нигона, подробно изучившего биологию этого штамма. Существует два штамма: Bristol и Bergsgaе. Основные работы выполняются со штаммом Bristol (линия N2). С биологией нематод вообще можно познакомиться по монографиям [1, 2].

1. СТРОЕНИЕ, ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ

По своему строению *C. elegans* принципиально не отличается от других нематод. Тело взрослого животного имеет форму сильно вытянутого веретена (аксиальное отношение 1/20), длина достигает 1,2–1,4 мм. Билатерально симметричный псевдоцелом имеет 4 нервных тяжа. В передней трети тела находится глотка, окруженная кольцом из нейронов. Органов дыхания и кровообращения нет. Подавляющее большинство особей в культурах *C. elegans* – гермафродиты, изредка встречаются самцы, причины появления которых рассмотрены далее. Гермафродит имеет две трубкообразные гонады, имеющие совместный выход наружу через вульву приблизительно в середине тела. Оплодотворение внутреннее. У самца выход гонады (семенника) расположен в хвосте, где имеются специальные приспособления для оплодотворения гермафродитов. Самцы продуцируют значительно больше спермы, чем гермафродиты. Животные окружены кутикулой, состоящей в основном из коллагеновых белков. Имеется два типа мышц – мускулы тела и мышцы глотки. Мышцы тела представляют собой 4 толстых волокна, состоящие из 10–12 тонких фибрилл каждое, толстые тяжи мышцы глотки состоят из 6 тонких фибрилл. Общая схема строения нематоды показана на рис. 1 и 2.

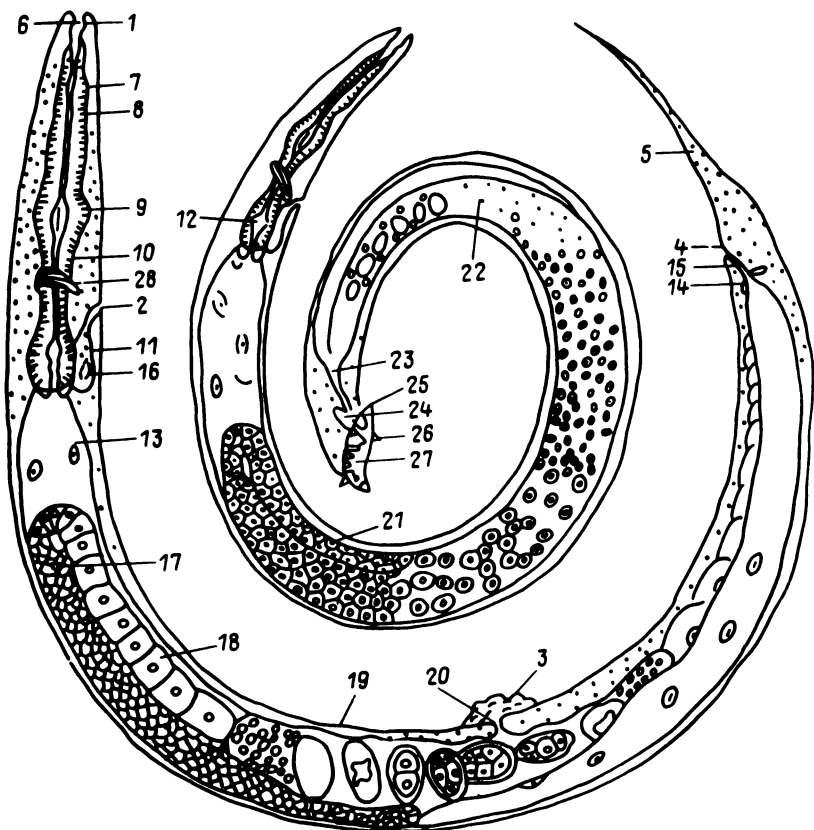


Рис. 1. Строение нематоды *C. elegans* снаружи - гермафродит, внутри - самец: 1 - губа; 2 - экскреторное отверстие; 3 - вульва; 4 - анус; 5 - фазмида; 6 - рот; 7 - глотка; 8 - прокорпус глотки; 9 - метакорпус глотки; 10 - перешеек глотки; 11 - задний выход глотки; 12 - клапан глотки; 13 - кишка; 14 - ректальная железа; 15 - прямая кишка; 16 - ренетт-клетка; 17 - зона начала роста яиц; 18 - зона роста яиц; 19 - матка; 20 - влагалище; 21 - яичник; 22 - семявыводная протока; 23 - клоака; 24 - губернакуллум; 25 - хвостовая лопасть; 26 - купулятивный шип; 27 - половые ворсинки; 28 - нервное кольцо [113]

В естественных условиях нематоды *C. elegans* питаются бактериями, при оптимальных условиях быстро растут, и каждые 14 ч, вплоть до прекращения роста, удваивают вес. Животные реагируют на различные химические вещества и температуру.

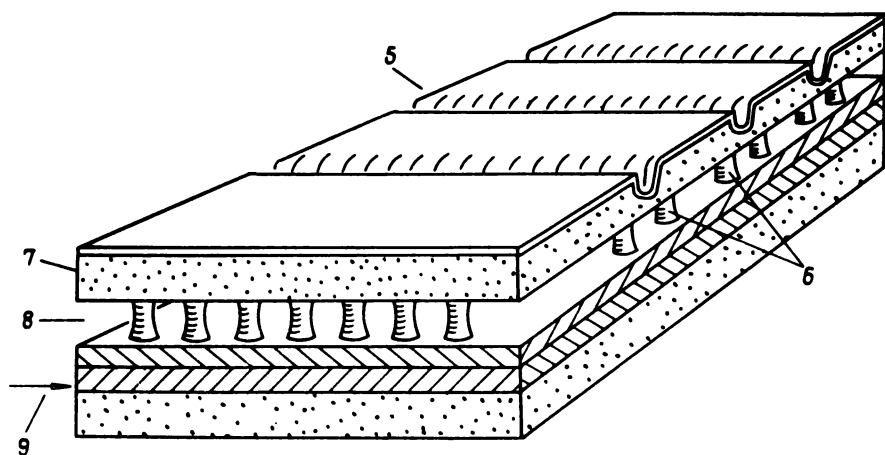
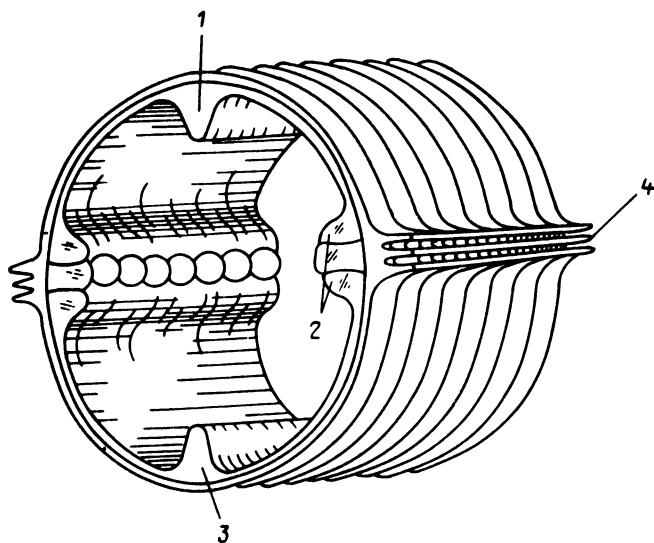


Рис. 2. Строение оболочки *C. elegans* (схема). В верхней части рисунка – поперечный разрез нематоды, в нижней части – схема строения оболочки [21]: 1 – спинная хорда; 2 – гиподермальный синтицизм; 3 – брюшная хорда; 4 – боковая пазуха; 5 – кольца; 6 – подпорки; 7 – кортикальный слой; 8 – средний слой; 9 – базальный слой

Реакции могут заключаться в избегании (например, высоких концентраций солей) или в движении по линии постоянной, оптимальной концентрации в градиенте. Детально изучены реакции на АТФ, ГТФ и другие соединения [25, 101, 102]. У *C. elegans* имеются даже элементы "социального" поведения. Так, в жидких культурах нематоды иногда образуются группы (комки), причем если их разрушить, эти группы возникают вскоре снова. На твердых средах также можно заметить скопления червячков, при разрушении таких скоплений они возникают снова, на другом месте.

Взрослая нематода имеет около 1000 соматических клеток, в том числе 92 мышечные (4 толстых волокна то 23 клетки), 28 клеток кишечника и около 300 нейронов. Деление соматических клеток почти отсутствует.

В лабораторных условиях *C. elegans* культивируют, либо на агаризованных чашках Петри, либо в жидких средах. В первом случае в чашки Петри разливают питательный агар как при обычной микробиологической работе. На агар наносят каплю ночной культуры бактерий и равномерно растирают. Чашки инкубируют ночь в термостате так, чтобы образовался бактериальный газон — питательная среда для развития нематод. Во избежание слишком обильного роста бактерий в агар вносят пониженное количество пептона и в качестве бактерий используют ауксотрофные штаммы, из которых наиболее распространен штамм ОР-56 — ауксотроф по урацилу. На чашке диаметром 90 мм можно содержать до 1000 взрослых особей или до 10 000 личинок. Желательно ежедневно переносить нематод на свежие чашки. Нематоды легко смываются с агара водой. В пробирке взрослые особи осаждаются на дно за несколько минут. Яйца нематод не смываются с агара, что используется для получения синхронных культур. Для этого производят два последовательных смыва с чашки, после первого смыва остаются яйца, во втором смыве получают "новорожденных" нематод. Чем меньше интервал времени между смывами, тем выше синхронность полученной популяции.

При культивировании в жидких средах нематод вносят в суспензию бактерий и энергично аэрируют. Если же культивирование производится без аэрации, то толщина слоя жидкости не должна превышать ~ 2 мм, а концентрация бактерий должна быть около $2 \cdot 10^8$ клеток/мл, концентрация нематод — около 50 особей/мл. Если суспензия хорошо аэрируется, то можно во много раз увеличить и концентрацию бактерий и нематод. Состояние нематод контролируют, просматривая культуры под

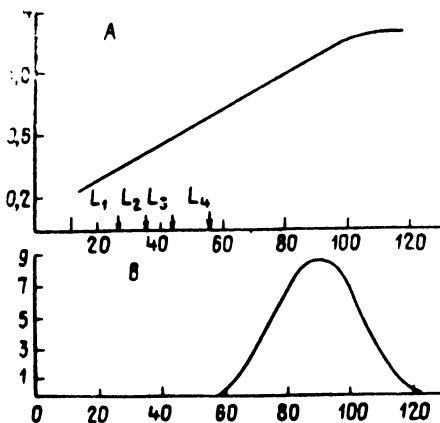


Рис. 3. Физиологические характеристики развития *C. elegans*: А - зависимость длины (ось ординат, мм) от времени (ось абсцисс, ч); L₁, L₂, L₃, L₄ - стадии личиночного развития. Вертикальные стрелки указывают моменты наступления линек. Время отсчитано от момента оплодотворения, выдувание из яйца происходит на 10-12 ч (вертикальная черта). В - зависимость скорости кладки яиц (ось ординат - число отложенных яиц в час) от времени

бинокляром (увеличение 20-60) в проходящем свете. Гораздо реже используются аксенические, безмикробные условия культивирования. В этом случае нематод культивируют в стерильных условиях в специально приготовленных довольно сложных средах. В аксенических условиях жизненный цикл нематоды удлиняется и существенно увеличивается продолжительность их жизни. Далее везде, если это не оговорено специально, имеется в виду, что нематод культивировали на бактериях *E. coli*. Обычно используются составы питательных сред и приемы работы, описанные в работах Нигона и Бреннера [15, 74-79]. Существуют приборы, облегчающие работу с нематодами, в частности, счетчик и измеритель длины [17]. Получение *C. elegans* в количествах, измеряемых граммами, не представляет проблем. В нормальных условиях культивирования при температуре 20°C отложенное яйцо через 10-11 ч выдувается и получившаяся личинка сразу начинает расти. Ее длина увеличивается от 0,2 мм до 1,2-1,4 мм, затем рост прекращается (рис. 3). Увеличение длины в интервале от 10 до 90 ч происходит почти линейно во времени. В моменты времени 26, 35, 44 и 56 ч (приблизительно) происходят 4 последовательные линьки, во время которых происходит смена кутикулы. Длительность линек составляет 1,5-3,0 ч, причем большие значения относятся к последним линькам. Линьки после стадий L₁ и L₂ легко обнаруживаются с помощью

Таблица 1

Развитие *C.elegans* при различных температурах [18]

Стадия развития	Температура, °C		
	16	20	25
Вылупление	16-18	10-12	8-9
1-я линька	36,5	26	18
2-я линька	48	34,5	25,5
3-я линька	60	43,5	31
4-я линька	75	56	39
Начало и конец кладки яиц	90-180	65-128	47-88
Размер взрослой особи, мм	1,15	1,06	1,11
Плодовитость	275	280	170

обычного бинокля, 3-ю и 4-ю линьки наблюдать труднее, особенно в жидких культурах. Частота сокращений глотки увеличивается от 1,5 сокращений в 1 с в момент вылупления до 3-5 к моменту первой линьки и затем сохраняется на этом уровне, варьируя для разных особей от 2 до 5. В периоды линек эта величина падает до нуля, нематода становится неподвижной (летаргическое состояние). Откладывание яиц начинается на 60-м часу и его скорость увеличивается, достигая 8-9 яиц/час к 90-му часу, после чего снижается до 0 к 120-му часу. С этого времени начинается гибель и к 8-му дню остается в живых около половины нематод. Увеличение температуры ускоряет развитие, но приводит к снижению плодовитости (общего числа отложенных яиц). В табл. 1 суммированы некоторые факты по влиянию температуры на рост и развитие *C.elegans* [18]. При температуре выше 28°C нематоды прекращают репродукцию и медленно погибают, при 35°C за 7 ч погибает 50% нематод [50]. Это означает, что работа с *C.elegans* совершенно безопасна для человека.

Изучено действие многих химических веществ на развитие и продолжительность жизни *C.elegans* [3, 4, 15]. Фтор-

дезоксиринидин в концентрации 2–5 мкг/мл полностью подавляет образование яиц, но не оказывает летального действия. Голодание, а также различные ингибиторы в соответствующих дозах увеличивают продолжительность жизни, искажают нормальное развитие и снижают плодовитость (см. разд. 8). Додецилсульфат натрия (1,0% 10 мин, 22°C) убивает нематод, но не действует на яйца, и нематод, находящихся в состоянии линьки или спящей личинки [19, 20], что, вероятно, связано с отсутствием кормления в указанных состояниях. Облучение в дозе 2–40 крад взрослых особей увеличивает на 10–15% их продолжительность жизни и делает их более устойчивыми к последующему облучению (через 24 ч) летальными дозами (~ 500 крад) [72].

2. ГЕНЕТИКА

Небольшой размер генома, высокая скорость репродукции, возможность получения миллионов особей за короткое время, простота культивирования и ряд других преимуществ делают нематоду удобным генетическим объектом. За последние 10 лет генетика *C.elegans* разработана почти столь же полно (а иногда и полнее), чем генетика классического объекта – дрозофилы. Недостатком *C.elegans* для генетических исследований является трудность анализа хромосомных перестроек и вообще микроскопии хромосом – у *C.elegans* нет ничего похожего на гигантские политенные хромосомы дрозофилы, и поэтому, хотя хромосомы можно наблюдать в микроскоп, при этом удается обнаружить очень мало деталей структуры. *C.elegans* – самооплодотворяющийся гермафродит, соматические клетки которого имеют 5 пар аутомосом и 1 пару X-хромосом, т.е. набор 2A+2X [78]. Вследствие утраты одной из X-хромосом при формировании гамет с частотой $\sim 10^{-3}$ получаются особи 2A + 1X – самцы. Самцы мельче гермафродитов, и сами по себе потомства не производят. При совместном культивировании самцов и гермафродитов первые способны инъецировать сперму и оплодотворить гермафродита. Хотя гермафродиты также производят сперму, при оплодотворении самцом его сперма имеет преимущество и более 30% потомства являются самцами. Причина этого преимущества неизвестна, возможно, определенную роль играет то обстоятельство, что самцы производят значительно больше спермы, чем гермафродиты. Эти два механизма – утрата X-хромосомы и преимущество спермы сам-

да при оплодотворении гермафродита поддерживают уровень самцов в популяции около долей процента. Один гермафродит оплодотворить другого не может. Хотя генетика *C.elegans* начинается с работ Нигона [74–79], первое подробное генетическое исследование предпринято Бреннером [15]. Генетическая рекомбинация идет одинаково как при образовании яиц, так и при образовании сперматозоидов [15]. Частота рекомбинации увеличивается в 3 раза при повышении температуры от 14 до 26°C, в области температурного оптимума частота рекомбинации не зависит от температуры [85, 86]. Частота рекомбинатного потомства у старых гермафродитов ниже (~ 3 раза), чем у молодых. Частота появления самцов увеличивается при повышении температуры и возраста. Частота рекомбинаций может изменяться в результате мутаций. Описаны штаммы *C.elegans*, у которых частота рекомбинаций в 3 раза выше, чем в норме [85, 86].

2.1. ФЕНОТИПЫ МУТАНТОВ

Жизнеспособные мутанты могут иметь морфологические, поведенческие и другие отличия от дикого типа. Морфологические мутанты включают фенотипы *dumpy*, *long*, *male abnormal*, *blistered*, *small*, *variable abnormal*. Животные с фенотипом *dumpy* короче, чем дикий тип, но имеют нормальную толщину, животные *small* не только короче, но и тоньше. В большинстве случаев мутантный фенотип хорошо выявляется только у взрослых особей. *Long* – мутанты длиннее и тоньше, чем дикий тип. У мутантов *blistered* имеется пузырь, наполненный жидкостью. Он располагается между двумя слоями кутикулы, фенотип выявляется только у взрослых животных. Среди поведенческих мутантов наиболее часто встречаются фенотипы *uncoordinated* и *roller*. Нормальные нематоды движутся за счет сокращения–растяжения брюшного и спинного мускулов, при этом животное лежит на боку. При движении нематоды по поверхности бактериального газона на последнем остается след, похожий на след змеи. У мутантов *roller* упомянутые мускулы не вытянуты вдоль тела, а спирально закручены, и животное вращается вокруг длинной оси, но не перемещается далеко. Мутанты легко могут быть узнаны по характерному кратеру, который они выедают в газоне. Категория *uncoordinated* включает мутантов с разнообразными наруше-

ниями правильного движения, начиная от слабых нарушений координации типа подергивания и кончая параличом. Некоторые фенотипы класса uncoordinated видны всегда (подергивание, закручивание в кольцо), другие – только во время движения нематоды. Для специальных целей получены мутанты, внешне не отличающиеся от дикого типа, но имеющие разнообразные биохимические дефекты: отсутствует эндодезоксирибонуклеаза [94], ацетилхолинэстераза [57], изменена флуоресценция клеток [8], нарушены хемотаксис [30, 31, 64, 102], осмотические свойства [28] и термотаксис [43]. Бреннером испытано около сотни веществ с целью получения мутаций резистентности. Найдены мутанты, устойчивые к ланнату ($\text{CH}_3\text{NCOO} : \text{CH}_2\text{CH}_3$ – ингибитор холинэстеразы, в концентрации 10^{-4} М вызывает паралич, кому и смерть) и тетраимизолу [15]. Детально исследована генетика устойчивости к левамизолу (см. разд. 2.8). Получено много мутантов с нарушенной способностью впадать в состояние спящей личинки и выходить из него (см. разд. 5). Описано и изучено большое число температурочувствительных мутантов (см. разд. 4). Некоторое представление о частоте появления мутантов разных типов дает табл. 2, взятая из работы Бреннера [15].

Таблица 2

Число мутантов разных типов, полученных при обработке метилметансульфонатом [15]

Фенотип	Количество мутантов	
	Обработка мутагеном	Спонтанные
unc	364	46
dpy, sma	110	12
lon	10	1
rol	7	3
bli	9	0
Неправильная морфология	44	7
Прочие	6	0

2.2. Получение мутантов

Обычно мутантов *C. elegans* получают с помощью монофункционального алкилирующего агента – этилметансульфоната (ЭМС). Молодых нематод суспендируют в 0,05 М ЭМС и инкубируют 4 ч при 20°C [15]. Частота мутаций (доля гетерозигот) достигает $5 \cdot 10^{-4}$ на ген. Мутантов обнаруживают в F₂, иногда в F₁. Большинство получающихся мутаций точечные, рецессивные, иногда встречаются делеции. Неизвестно, возникают или нет при такой обработке у *C. elegans* хромосомные перестройки. Обработка диэтилсульфатом (0,01 М, 2 ч, 20°C) почти столь же эффективна, как обработка ЭМС (цит. по 47, личное сообщение D.Riddle). Нитрозогуанидин малоэффективен, вещества акридинового ряда (типа ICR-191), часто используемые для индукции мутаций сдвига рамки у бактерий при концентрации 0,1 мкг/мл в течение 3,5 сут в 50 раз менее эффективны, чем ЭМС. Описаны и другие воздействия, вызывающие мутации у *C. elegans*: распад р32 [8, 15], ацетальдегид [52], формальдегид [47], X-лучи [46, 48], γ-лучи [84], калифорний 252 [81], УФ-облучение (неопубликованные данные Horvitz H., цит. по 47). Если выделяются мутанты по устойчивости к какому-либо веществу, удается использовать простые селективные методики. В других случаях используется тотальный перебор или специальные приемы, основанные на физиологических особенностях нематоды. Например, для отбора мутантов, способных впасть в состояние спящей личинки при необычных условиях, используется то обстоятельство, что спящие личинки не питаются, и поэтому детергент – додецилсульфат натрия, растворяющий клетки кишечника у нормально кормящихся нематод, просто не проникает внутрь, и животные выживают. После обработки детергентом, его удаления и создания условий, при которых нематоды выходят из состояния спящей личинки, выживают только нужные мутанты. Для отбора температурочувствительных мутантов разработана методика, аналогичная известному методу отпечатков Ледерберга [106]. Как можно заключить из встречающихся в литературе ссылок на личные сообщения и неопубликованные результаты, довольно часто мутантный фенотип бывает обусловлен двумя иногда близко сцепленными мутациями, что заставляет быть очень осторожным при проведении генетического анализа. Следует иметь в виду также, что нередко бывает такая ситуация, когда разные аллели одного и

того же гена дают качественно разный фенотип, поэтому даже при получении мутантов казалось бы с совершенно новым фенотипом нельзя исключить того, что часть из них может представлять собой аллели уже известных генов (см. разд. 2, 8, 2. 9).

Описанные выше мутанты даже в гомозиготе дают плодовитых и жизнеспособных животных. Кроме таких мутаций, у *C.elegans* описано много летальных или стерильных (в гомозиготе) мутаций. Рецессивные летальные мутации по X-хромосоме легко могут быть обнаружены по отсутствию самцов. Исходя из частоты летальных мутаций по X-хромосоме и общей скорости мутирования Бреннер рассчитал, что X-хромосома имеет ~300 генов. Если считать, что все хромосомы *C.elegans* примерно одинаковы, то получается, что нематода имеет всего около 2000 генов, мутации которых дают видимые изменения фенотипа. Общее число генов, по-видимому, в 1,5 - 2 раза больше этой величины [50, 45]. Для детального изучения летальных и стерильных мутаций у *C.elegans* Менели и Херман использовали нематод с дубликацией части X-хромосомы [71]. Идентифицировано 14 генов (изучен 21 мутант), все гены картированы в районе X-хромосомы, расположенном правее гена *unc-3*. 12 мутаций проявляются у ранних личинок, 2 - у поздних. Для двух мутантов яйца мутантного гермафродита дают живых червей после оплодотворения самцом дикого типа. Один из мутантов образует дефектную сперму. Большое число рецессивных леталей, балансированных хромосомной перестройкой *C1* во 2-й группе сцепления, изучено Херманом [45]. Из 102 ЭМС-индуцированных мутаций у нематод *C1 dpy-10 unc-52/unc-4 let* около половины были летальными и проявлялись на ранних личиночных стадиях, остальные были стерильными. Использование леталей и мутаций, приводящих к стерильности могло бы помочь идентифицировать конкретные белки, функция которых важна для развития, но подобных работ еще нет.

2.3. Номенклатура

Согласно достигнутой договоренности [55], каждая лаборатория присваивает своим мутантам номера, впереди которых ставится одна или две буквы латинского алфавита. Буквы специфичны только для данной лаборатории, а не для гена. Например, *e128*-мутация, полученная в лаборатории Салстона

16

Таблица 3

Сокращенное обозначение мутаций, штаммов и адрес лаборатории, присваивающей эти обозначения [55]

Мутация	Штамм	Лаборатории
a	GT	D. Dusenbery, School of Biology, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA
b	DH	D. Hirsh, Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of Colorado, Boulder, Colorado
bb	BM	D. Mitchel, Boston Biomedical Research Institute 20 Stanifod St., Boston, MA
ct	BW	W. Wood, Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of Colorado Boulder, CO
e	CB	J. Salston, MRC Laboratory of Molecular Biology Cambridge, England
f	FF	J. Brun, Department of Biologie Generale et Applique, Universite Claude Bernard Lyon-1, 43 Bd, du 11 Novembre 1918, 69621 Villeurbanne, France
g	GG	G. von Ehrenstein, Max Planck Institut für Experimentelle Medizin 3400, Göttingen, Herman Rein Strasse 3, West Germany
hc	BA	S. Ward, Department of Embriology, Carnegie Institution of Washington, Baltimore MD
hs	HH	R. Hecht, Department of Biophysical Sciences, University of Houston, Houston, TX
m	DR	D. Riddle, Divisin of Biological Sciences, University of Missouri, Columbia MO
mn	SP	R. Hermann, Department of Genetics and Cell Biology, University of Minnesota, St. Paul, MN
n	MT	R. Horvitz, Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA
rp	NE	R. Pertel, US EPA, CMZ, Room 1006 WH 568 Metabolic Effects Branch, 1921 Jefferson Davis Highway, Arlington, VA

Мутация	Штамм	Лаборатории
s	BC	D. Baillie, Department of Biological Sciences Simon Fraser University, Burnaby, British Columbia, Canada
sc	BE	R. Edgar, Thimann Laboratory, University of California, Santa Cruz, CA
st	RW	R. Waterson, Department of Anatomy and Neurobiology, Washington University of St. Louis, MO
su	HE	H. Epstein, Department of Neurology, Baylor College of Medicine, Texas Medical Center, Houston TX
sz	AF	A. Fodor, Biological Reserch Center, Department of Genetics, Hungarian Academy of Sciences, P.O. Box 521, H-6701 Szeged, Hungary
t	TT	P. Babu, Tata Institute of Fundamental Research, Bombbay, India
w	WW	M. Samoiloff, Department of Zoology, University of Manitoba, Winnepeg, Canada
x	ZZ	J. Levis, Department of Biological Sciens, Columbia University, New York, NY

(Кембридж, Англия). Список лабораторий, их адресов и присвоенных им буквенных обозначений приведен в табл. 3. Гены, затрагиваемые мутациями, обозначаются тремя буквами латинского шрифта и числом, например *unc-28*. Хромосомы (группы сцепления) обозначаются арабскими цифрами. Полное обозначение мутации выглядит: *unc-4/e120/II* - мутация *e120* в гене *unc-4*, расположенном во второй хромосоме. Обозначение гена представляет собой мнемоническое сокращение фенотипа *-rol* от *roller*. Нумерация и обозначение генов не связаны с группами сцепления. Список сокращенных обозначений генов и фенотипов, на основании которых дано это обозначение, приведен в табл. 4. Имеются также правила для обозначения дупликаций и т.п.

Существует генетический центр *Caenorhabditis*, финансируемый Национальным Институтом старения (США). Его адрес:

Dr. Riddle D.L. University of Missouri
Columbia, MO 65211, USA.

В обязанности центра входит контроль генетической карты, номенклатура штаммов, хранение и распределение среди исследователей мутантных линий и дикого типа *C.elegans*. Как правило, штаммы пересылаются авиапочтой (пластиковые чашки Петри с культурой *C. elegans* на агаре).

Таблица 4

Сокращенные обозначения генов, буквенное обозначение лаборатории, давшей это обозначение и фенотип, характерный для мутаций по данному гену [55]

Обозначение гена	Лаборатория	Фенотип
ace	p	Нарушение ацетилхолинэстеразы
bli	e	Пузырь (blistered)
cat	e	Нарушение катехоламинов
che	e	Нарушенный хемотаксис
daf	e	Нарушение формирования личинки
dpy	e	"Коренастый" (dumpy)
emb	g	Нарушение эмбриогенеза
fer	hc	Нарушение оплодотворения
flu	e	Ненормальная флуоресценция
her	e	Тенденция к гермафродитизму
him	e	Повышенная рождаемость самцов
isx	hc	Интерсексы
lan	e	Ненормальная чувствительность к лантану
let	mp	Леталь

Обозначение гена	Лаборатория	Фенотип
lev	x	Ненормальная чувствительность к левализации
lin	e	Нарушения в клеточных линиях
lon	e	Длинные
mab	e	Ненормальные самцы
tec	e	Ненормальная реакция на механические раздражения
nuc	e	Ненормальная нуклеаза
osm	p	Ненормальная осмотическая чувствительность
rol	e	Роллеры (вращающиеся)
sma	e	Маленькие
sns	p	Сенсорные нарушения
sqt	sc	Прижатые (squat)
sup	e	Супрессор
tax	a	Нарушенный хемотаксис
ttx	p	Нарушенный термотаксис
tra	e	Трансформированные (например по полу)
unc	e	Некоординированные
vab	e	Различные ненормальности

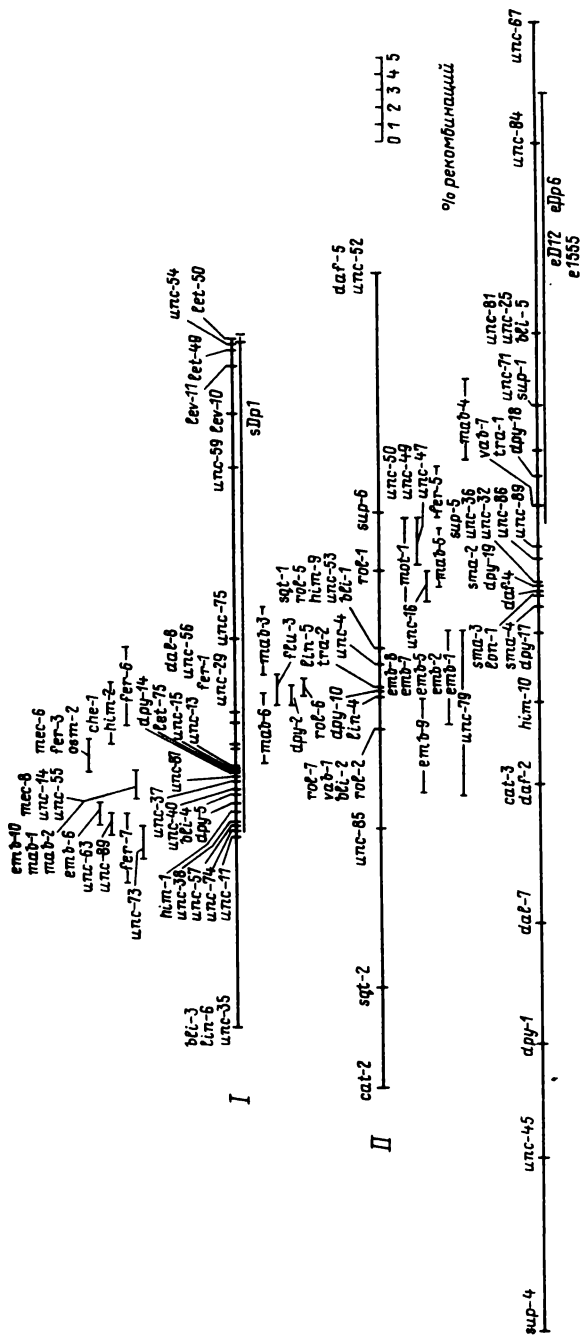
Каждая лаборатория хранит определенные штаммы *C.elegans*. Штамм – группа особей определенного генотипа, способных продуцировать потомство этого генотипа. Штаммы обозначаются двумя заглавными буквами латинского алфавита, специфичными для данной лаборатории (см. табл. 3) и числом. Как правило, штаммы сохраняются в жидком азоте в форме суспензии взрослых нематод в буферном растворе с глицерином.

2.4. Генетический анализ

Почти вся генетика *C.elegans* строится на анализе гетерозиготных гермафродитов и их потомства. Тест на комплементарность выполняется следующим образом. Пусть требуется выяснить, комплементируют ли мутации m_1 и m_2 . Гермафродитов m_1/m_1 скрещивают с самцами дикого типа и в потомстве отбирают самцов. Большинство из них будут гетерозиготными, поскольку большая часть их получится в результате оплодотворения гермафродитов самцами. Самцов $m_1/+$ скрещивают с гермафродитами m_2/m_2 и в потомстве отбирают только самцов (конечно, будут и гермафродиты типа m_1/m_2 и $+/m_2$, а также много гермафродитов типа m_2/m_2 , а отличить гермафродиты, получившиеся в результате самооплодотворения, от тех, которые имеют X-хромосому самца, невозможно. Наличие значительной примеси особей m_1/m_2 не позволяет решить вопрос о комплементации мутаций m_1, m_2). Полученные самцы будут двух типов: m_1/m_2 и $+/m_2$. Если все 100% отобранных самцов имеют дикий фенотип, то мутации комплементируют; если дикий фенотип имеют только 50% самцов, то мутации не комплементируют.

Для определения сцепленности мутаций m_1 и m_2 нужно проанализировать потомство гетерозиготы m_1+/m_2 . Если частота рекомбинации между мутациями m_1 и m_2 есть P , то особи с фенотипом M_1, M_2 будут появляться с частотой P^2 . Сама гетерозигота может быть получена при скрещивании $\text{♀ } m_1+/m_1+ \times \text{♂ } +m_2/+m_2$ (♀ – гермафродит; ♂ – самец). Для более точного картирования анализируют потомство гетерозигот $+/m_1 m_2$. Для уточнения порядка генов используют, как обычно, трехфакторные скрещивания. Методы конструирования различных гетерозигот и некоторые приемы генетического анализа *C.elegans* описаны в классической работе Бреннера [15]. На рис. 4 дана современная генетическая карта *C.elegans*, в основу которой положена карта, впервые составленная Бреннером.

Обращает на себя внимание одна особенность, впервые отмеченная Бреннером – кластерирование генов на аутосомах. Причина этого явления неизвестна, но возможно, что здесь имеет место часто наблюдаемое неполное соответствие генетической и физической карты вследствие неодинаковой частоты кроссинговера на различных участках хромосом. Большое количество мутаций в правой половине X-хромосомы скорее все-



го не является специфическим свойством данного района, а просто отражает интенсивный поиск леталей и др. перестроек в этой области [46-48]. Для генов, локализация которых точно не установлена, указан диапазон возможного распространения. Обозначения генов поясняет табл. 4. При анализе карты легко заметить, что гены, мутации в которых дают один и тот же фенотип (напр. *unc-101*, *lev* и др.), вовсе не имеют тенденции располагаться вместе, как это обычно наблюдается у микроорганизмов. По-видимому, у *C.elegans* так же, как и у других высших организмов, не существует простого соответствия ген-признак: один и тот же фенотип может быть следствием мутаций в совершенно разных генах. Более того, далее будут приведены примеры, когда различные аллели одного и того же гена дают совершенно разный фенотип (роллеры, некоординированные и др. см. разд. 2,8, 2.9). К сожалению, у *C.elegans* нет ничего похожего на гигантские хромосомы слонных желез дрозофилы, и поэтому невозможно сопоставить генетическую карту с цитологической.

2.5. Хромосомные перестройки

Имеется немного работ, в которых изучены дупликации, делеции и некоторые другие хромосомные перестройки у *C.elegans*. Отчасти это объясняется невозможностью проведения цитологических исследований, подобных тем, которые можно выполнять на полнотенных хромосомах дрозофилы - у *C.elegans* ничего подобного не обнаружено. При изучении супрессии различных аллелей гена *unc-54* и *unc-15(673)* была выделена супрессирующая мутация, обозначенная $\epsilon 1405$. $\epsilon 1405$ - рецессивная леталь, не рекомбинирующая с точечными мутациями по генам *unc-42*, *unc-41* и *vir-3*, хотя мутации по этим генам между собой рекомбинируют [110]. Было сделано заключение, что $\epsilon 1405$ - делеция. Ее супрессорное действие связано с тем, что в гетерозиготе $\epsilon 1405$ приводит к двукратному снижению продукта гена *vir-3*. Получено несколько других делеций, аналогичных $\epsilon 1405$. В гене *unc-54*, кодирующем тяжелую цепь миозина, выделена делеция длиной 280 нуклеотидов [68, 89]. Описано 13 делеций в области X-хромосомы, перекрываемой дупликацией *mn Dpl* [45]. После X-облучения нематод Херман выделил штамм, имеющий транслокацию для участка II-й хромосомы на X-хромосому [45]. Для получения дупликаций по X-хромосоме разработана специальная

методика. Самцов облучают (7500 рентген) и скрещивают с гермафродитами, имеющими какую-либо хорошо тестируемую мутацию в X-хромосоме. Без облучения при таком скрещивании все самцы получаются мутантными. Если у облученного самца дикий аллель мутантного гена был транслоцирован в аутосоме либо находился в форме свободной дупликации, то после оплодотворения спермой такого самца будут получаться самцы дикого типа. Если их теперь скрестить с мутантными гермафродитами, можно получить потомство самцов, состоящее из мутантов и дикого типа. В основном самцы дикого типа получаются стерильными, но около 5% жизнеспособны и имеют дупликацию по X-хромосоме [46, 48]. 13 полученных таким образом дупликаций детально изучены. Иногда дупликации участка X-хромосомы транслоцируются на аутосомы. Примером такой дупликации является дупликация *mn Dp1*, которая транслоцирована на V хромосому, *mn Dp1* ведет себя как супрессор кроссинговера вдоль левой половины хромосомы. Дупликации *mnDp10* и *mnDp25*, транслоцированные в правую половину I-хромосомы, могут быть обнаружены цитологически. Несколько других дупликаций описаны в работе Хермана [48]. Две хромосомные перестройки, селекционированные как доминантные супрессоры кроссинговера, описаны для II-хромосомы — *mnT1* (транслокация) и *C1* (инверсия или транспозиция) [45].

2.6. Межгенные взаимодействия

Основная информация о межгенных взаимодействиях у *C. elegans* получена при изучении супрессии в основном при анализе ревертантов различных мутантов. Очень часто ревертанты возникают не вследствие истинной реверсии в том же гене, а как результат вторичной мутации в другом гене, такая мутация называется супрессорной. Один из таких супрессоров *sup-5* был обнаружен при анализе ревертантов мутанта *el214* по гену *unc-15*, расположенному в I-хромосоме. У мутантов *el214* отсутствует парамецин, кодируемый геном *unc-15*, вследствие чего нематоды почти не движутся. Ревертанты способны двигаться, и поэтому легко могут быть выявлены. При скрещивании ревертантов с диким типом было обнаружено выщепление мутантного потомства, следовательно, ревертанты являются двойными мутантами. Одна из

таких супрессирующих мутаций – e1464 была картирована в 3-й хромосоме и соответствующий ген обозначен sup-5 [103, 104]. Мутация e1464 супрессирует не только мутацию e1214, но также и мутации в других генах, но только такие, при которых полностью отсутствует генный продукт (нуль – мутации). Вероятнее всего, e1464 – информационный супрессор для определенных кодонов, но соответствующий кодон и тРНК неидентифицированы. У *C. elegans* обнаружены два случая не прямой супрессии, связанной с взаимодействием белок-белок. Один тип супрессии связан с компенсацией дефекта мышечной структуры, возникающего при мутациях unc-54 (e1258), unc-54(e1315) и unc-15 (e73). Оба эти гена кодируют белки, входящие в состав толстых филаментов мышц. Обнаружено 9 супрессорных мутаций, все они картированы в одном гене, обозначенном sup-3 [110]. Супрессия аллель-специфична: для гена unc-53 лучше супрессируются аллели, у которых не обнаруживается генного продукта, для гена unc-15 – хорошо супрессируется мутация e73, при которой образуется испорченный параамиозин, но в нормальном количестве и не супрессируется мутация e1214, при которой нет параамиозина. Как показали авторы, у мутантов по гену sup-3 образуется измененный миозин, способный формировать активный агрегат с параамиозином, испорченным в результате мутации e73 [110]. Другой случай супрессии – подавление эффекта мутаций в генах unc-1 и unc-24 мутацией m48. Из 4 испытанных аллелей гена unc-24 все супрессировались, но несколько мутаций в других генах не супрессировались [110]. Интересный случай межгенного взаимодействия описан в работе Гринуайлда и Хорвица [41]. Авторы изучили большое количество ревертантов мутанта e1500 по гену unc-93, у которого нарушена координация движения и кладка яиц. Наряду со спонтанными, получено много ревертантов, индуцированных различными мутагенами (ЭМС, диэтилсульфат, ультрафиолетовое облучение, γ -облучение, ацетальдегид, нитрозогуанидин). Реверсия фенотипа возникает в результате мутаций в одном из трех локусов sup-911, sup-10X и unc-93. Авторы полагают, что мутация e1500 приводит к синтезу токсического продукта, вторичные мутации в том же гене, в том числе делеции, элиминируют этот продукт. Мутации в генах sup-9 или sup-10 устраняют белки, имеющие регуляторное значение для гена unc-93, или же белки, с которыми взаимодействует продукт гена unc-93.

Явление эпистаза удачно использовано в работе Риддла, где анализ двойных мутантов позволил выяснить генетический контроль и последовательность работы генов при формировании спящей личинки (см. разд. 5). Сложные взаимодействия генов обнаружены при формировании вульвы (неопубликованные результаты Ferguson C., Horvitz H., цит. по (47)).

2.7. Генетика пола

В норме гермафродиты диплоидны и хромосомный набор состоит из 5 пар аутосом (A) и пары X-хромосом (X) [78]. Вследствие нерасхождения X-хромосом в редких случаях ($\sim 10^{-3}$) происходит потеря одной X-хромосомы и получаются особи $2A+1X$ – самцы. Полиплоидные линии *C.elegans* впервые получены Нигоном [79, 75, 77]. Тетраплоиды были длиннее нормы и могли быть разделены на два класса. Нематоды 1-го класса (the lygenes по Нигону) имели хромосомный набор $4A+4X$, вели себя как гермафродиты и выщепляли самцов типа $4A+2X$ с частотой около $7 \cdot 10^{-3}$. Нематоды второго класса имели хромосомный набор $4A+3X$, также вели себя как гермафродиты, но выщепляли самцов с частотой 40%. Тетраплоидная линия Нигона прошла 78 генераций, после чего была случайно утрачена, позднее аналогичные результаты были получены заново [70]. Для получения тетраплоидов гермафродитов и самцов прогревают при $27,5^{\circ}\text{C}$ в течение 12 ч и скрещивают. Селекция длинных особей постепенно дает тетраплоидные линии, характеризующиеся теми же свойствами, что и штаммы Нигона. При скрещивании тетраплоидов с нормальными самцами были получены нематоды $3A+3X$, которые являются гермафродитами. Эти же авторы установили, что зиготы $3A+1X$ нежизнеспособны. Особи $3A+2X$ являются самцами. Таким образом у *C.elegans*, как и у других животных, пол определяется соотношением аутосом и половых хромосом. Следующий вопрос – какие гены аутосом и половых хромосом наиболее существенны в определении пола. Было исследовано влияние нескольких дупликаций фрагментов X-хромосомы, транслоцированных в аутосомы на фенотип особей $3A+2X$ (рис. 5) [70]. Дупликации *tn Dp8* и *tn Dp27* не влияли на фенотип самцов $3A+2X$, дупликации *tn Dp9* и *tn Dp25* приводили к сдвигу фенотипа в сторону $3A+3X$, т.е. встречались не только самцы, но и гермафродиты и интерсексы. Почти все

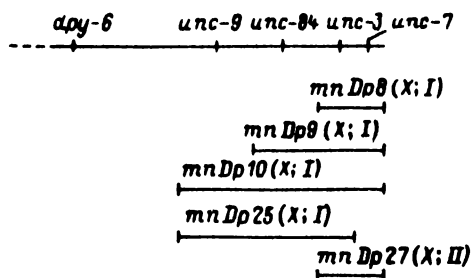


Рис. 5. Дупликации в X-хромосоме *C. elegans* [70]

животные, имеющие дупликацию *mn Dp10*, были гермафродитами. Однако это не означает, что фрагмент *mn Dp10* может заменить всю X-хромосому в определении пола: животные 2A+IX, самцы, остаются самцами даже при наличии дупликации *mn Dp10*. Эти данные показывают, что в X-хромосоме *C. elegans* существует по крайней мере 3 участка, действующие кумулятивно в определении пола: один участок в дупликациях *mn Dp9* и *mn Dp10*, другой — в *mn Dp10* и третий — в остальной части X-хромосомы.

Описано несколько точечных мутаций, влияющих на пол у *C. elegans*. Ходжкин и Бреннер описали 10 рецессивных мутаций, вызывающих трансформацию нормальных гермафродитов в фенотипических самцов [53]. Мутации образуют три группы комплементации: *tra 1*, *tra 2*, *tra 3*. Два аллеля гена *tra-1* вызывают полную трансформацию: получаются фертильные самцы (несмотря на наличие 2 X-хромосом в геноме). Один аллель этого гена вызывает лишь частичную трансформацию: у животных появляются внешние признаки самца (копулятивный аппарат), но они остаются гермафродитами. Мутации в генах *tra-2* и *tra-3* приводят к появлению различных внешних признаков самца, но животные остаются гермафродитами. На фенотип нормальных самцов все изученные мутации не оказывали никакого влияния. Один из аллелей гена *tra-2* был температурочувствительным. Прогревание этого мутанта при повышенной температуре приводит к образованию интерсексов двух типов: один имеет мужские гонады, которые, однако, содержат ооциты, другой имеет свойственные гермафродиту гонады, но продуцируется только сперма [62, 12]. Эти факты показывают, что гены *tra* кодируют белки, необходимые для развития гермафродита, но не самца.

В норме, появление самцов среди потомства гермафродитов является результатом нерасхождения X-хромосом. Описано много мутаций, влияющих на этот процесс [52]. Все мутации рецессивны и распределены по 10 генам, обозначенным *him*, причем только один ген находится в X-хромосоме. Частота появления самцов в потомстве *him* мутантов повышена до 2-35%, при этом часть потомства (от 0,8 до 6,7%) - гермафродиты с набором хромосом 2A+3X. У некоторых мутантов нарушено нерасхождение не только X-хромосом, но и аутосом (напр. *him-6*), у других - только X-хромосом (*him-8*). У 3 *him*-мутантов снижена частота рекомбинации X-хромосомных маркеров. *Him*-мутанты широко используются в утилитарных целях - для получения больших количеств самцов или спермы в биохимических экспериментах.

Большая часть генов, расположенных в X-хромосоме, определяет морфологические структуры, свойственные и самцу, и гермафродиту, и соответствующие мутации (*unc*, *lon*, *lev*, *dpy* и др.) одинаково проявляются у животных 2A : 2X и 2A : 1X. У многих организмов имеются механизмы компенсации дозы гена, обусловленной половыми различиями. Так, у млекопитающих одна из X-хромосом у самок не функционирует [66], у дрозофилы компенсация достигается снижением уровня транскрипции X-хромосом у мух 2A:2X [111]. Возможность инактивации одной из X-хромосом и гермафродитов *C.elegans* исключена, поскольку гетерозиготы по X-сцепленной рецессивной мутации и соответствующему аллелю дикого типа всегда имеют дикий фенотип. Попытка выяснить механизм компенсации дозы X-хромосомных генов в *C.elegans* была предпринята Ходжкиным [53, 54]. С этой целью им было проведено изучение фенотипа особей 2A:2X и 2A:1X, имеющих мутации в большом числе различных генов. В большинстве случаев мутантный фенотип у самцов и гермафродитов был сходным, но выявлено 4 категории генов, для которых экспрессия зависела от числа X-хромосом. 1. Гены, определяющие пол: мутации в гене *her-1* не проявляются у гермафродитов, мутации в генах *tra* не проявляются у самцов. 2. Гены, определяющие морфологические структуры, свойственные только одному полу. 3. Гены, мутации в которых слабо выражаются у самцов просто в силу их естественной повышенной подвижности. 4. Гены-"шовинисты" *dpy-21V*, *dpy-22X*, *dpy-23X*, *dpy-261V*, мутации в которых по-разному проявляются у животных с генотипом 2A:1X и 2A:2X даже в том случае, если их фенотип с помощью других мутаций (*her*, *tra*) сделаны одинаковы-

ми. Два гена *dpy-21V* и *dpy-26IV* детально изучены. Экспрессивность мутаций в этих генах зависит от числа X-хромосом: у животных 2A:3X мутации летальны, у животных 2A:2X отмечается различная степень выраженности фенотипа *dumpy* вплоть до летальности, у животных 2A:1X мутации не проявляются. Ген *dpy-26* обладает выраженным материнским эффектом. Мутации в генах *dpy-21* и *dpy-26* частично супрессируют маскулинизацию у животных 2A:2X, несущих мутацию в гене *tra-1*, а также повышают плодовитость гермафродитов *her-1* 2A:1X. По-видимому, гены *dpy-21* и *dpy-26* играют важную роль в компенсации двойной дозы X-хромосомных генов у гермафродитов, однако биохимический механизм их действия остается неизвестным. Возможно, что ген *dpy-26* в какой-то мере аналогичен гену *da* (*daughterless*) у дрозофилы [112].

2.8. Устойчивость к левамизолу

Левамизол – специфический антигельминтный агент, действие которого, предположительно, связано с блокированием ацетилхолиновых рецепторов (цит. по 65). В присутствии 1 мМ левамизола уже через 1 с после внесения у взрослых нематод отмечаются интенсивные мышечные сокращения, особенно в головной части тела, через 30 мин животные расслабляются и превращаются в неподвижные палочки. Первая стадия реакции – мышечные сокращения – обратима, и при удалении агента животные возвращаются к нормальному состоянию, вторая стадия реакции необратима и приводит к гибели. Нематоды в личиночной стадии лучше переносят ингибитор, но даже после его удаления, хотя и остаются живыми, никогда не восстанавливают нарушенную морфологию. Резистентные мутанты легко могут быть селекционированы и выделены сотни линий [65]. Мутанты получены 3 фенотипических группы: некоординированные, псевдодикого типа и судорожные (*twitcher*). Мутанты 1-й группы имеют повреждения в генах *unc-29*, *unc-63*, *unc-38*, *unc-74*, *unc-50* и в 2 специфических генах – *lev-1* и *lev-7*. Мутанты 2-й группы имеют мутации в генах *lev-1*, *unc-29*, *unc-63*, *unc-38*, *unc-74*, *lev-8*, *lev-10*, мутанты 3-й группы – в генах *unc-22* и *lev-11*. Интересно отметить, что иногда мутации устойчивости к левамизолу попадают в уже известные гены [например *unc*]), и, следова-

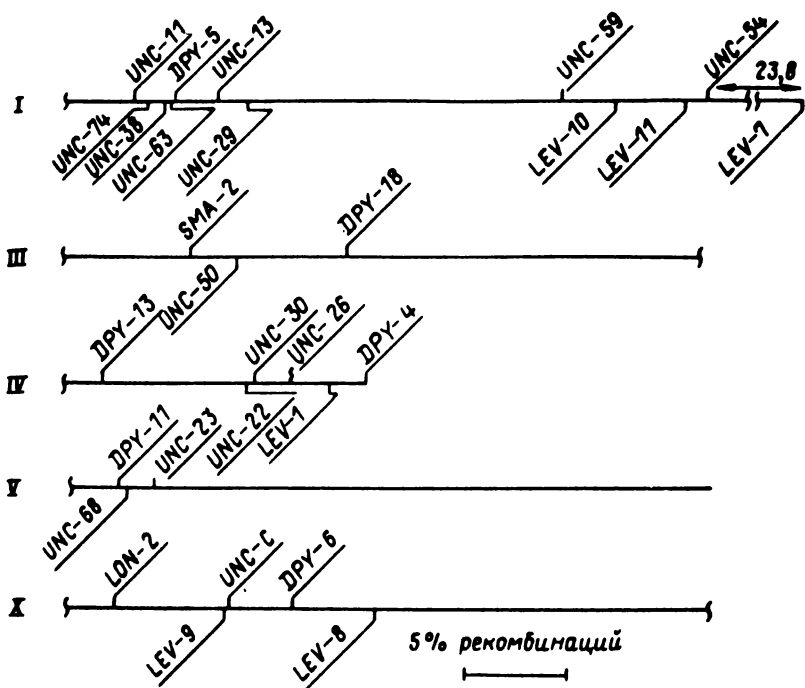


Рис. 6. Расположение локусов устойчивости к левамизолу (снизу) относительно маркерных генов (сверху линий) [65]

тельно, разные мутации в одном и том же гене могут иметь разное фенотипическое выражение. Всего выявлено 13 генов, мутации в которых могут приводить к устойчивости к левамизолу, мутации картированы во всех хромосомах, кроме II (рис. 6).

2.9. Роллер-мутанты

Как уже упоминалось выше, Бреннером впервые описаны мутанты, образующие круговые кратеры на бактериальном газоне. Если особи дикого типа передвигаются, лежа на боку, то у этих мутантов тело вращается вокруг своей длинной оси (Rol-фенотип) [15]. Как показали Хиггинс и Хирш [49], у этих мутантов кутикула и внутренние органы (мускулатура) спирально закручены. Детально изучение *rol*-мутантов

выполнено Кожсом и др. [21]. Было выделено и проанализировано 88 мутантов с фенотипом *Ro1*. Подавляющее большинство мутантов имеет *Ro1*-фенотип только в гомозиготе, Мутанты разбиты на 5 основных фенотипических классов. Класс *LR* — левые роллеры, Мутации картированы в генах *rol-1* (2 аллеля), *rol-3* (1 аллель), *rol-4* (3 аллеля) и *rol-5* (18 аллелей). Животные вращаются против часовой стрелки, если смотреть в направлении головы. Фенотип выражается только у взрослых нематод, в личиночных стадиях мутанты не отличаются от дикого типа. Часть мутантов имеет мутантный фенотип только при 26°C. Класс *LDR* — левые коренастые (*dumpy*) роллеры. Мутации картированы в генах *dpy-2* (14 аллелей), *dpy-3* (9 аллелей), *dpy-7* (5 аллелей), *dpy-8* (7 аллелей), *dpy-10* (9 аллелей) и *dpy-15* (2 аллеля) и представляют собой новые аллели уже известных по мутациям *dumpy* генов. Мутантный фенотип также выражен только у взрослых животных. Степень фенотипического отличия от дикого типа меньше при 16°C, чем при 20°C. Класс *RR* (правые роллеры). Имеется 8 аллелей, одного гена *rol-6*. Мутантный фенотип проявляется, начиная со стадии *L3*, и не зависит от температуры. Класс *LS* (левые: *squat* — прижатый). Имеется 6 аллелей одного гена *sqt-3*, все чувствительны к температуре. При 25°C нематоды вначале имеют несколько модифицированный *dumpy*-фенотип, но во взрослом состоянии гомозиготы неотличимы от дикого типа. Взрослые гетерозиготы — хорошо выраженные левые роллеры. Класс *RS* (правые *squat*). Имеется 14 аллелей, поровну распределенных по генам *sqt-1* и *sqt-2*. У гомозигот фенотип *rol* выражен только в стадии *L3*, гетерозиготы — выраженные роллеры, начиная со стадии *L3*. Расположение изученных генов *rol* в хромосомах *C.elegans* показано на рис. 7. I, III и IV хромосомы не содержат *rol*-генов, *rol*-мутанты классов *LDR*, *RR*, *LS* и *RS* имеют сложные нарушения структуры кутикулы. У большинства (но не у всех) *rol*-мутантов имеется спиральная закрутка кутикулы. Мутации, дающие левых и правых роллеров в двойных мутантах, обычно дают взаимную компенсацию — получается очень слабо выраженный *Ro1*-фенотип или дикий тип. Все мутации, дающие фенотип *Ro1*, подавляют мутации *blister* — не образуется пузыря, фенотип *Ro1* у двойных мутантов сохраняется. Хорошо разработанная генетика *rol*-мутантов, вероятно, будет полезной для детального изучения морфогенетических процессов при формировании кутикулы.

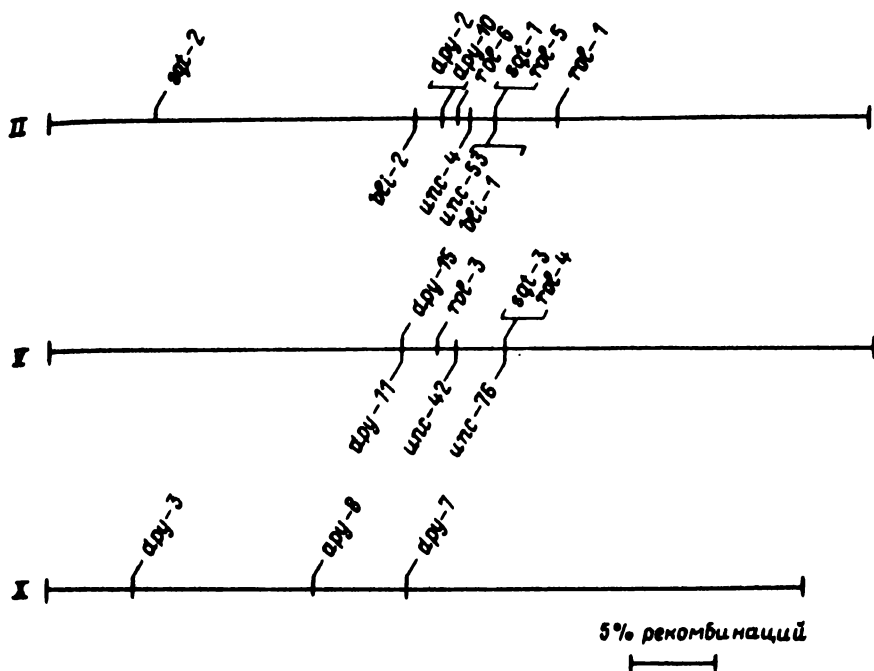


Рис. 7. Взаимное расположение *gol* - генов. Гены-маркеры показаны снизу группы сцепления [21]

3. ДНК

Общепринятый метод получения ДНК *C. elegans* включает разрушение нематод путем растирания замороженной в жидком азоте суспензии [95]. Затем вносится лизирующая смесь, содержащая додецилсульфат натрия и протеазу, и после инкубации при 37°C в течение 24 ч производится двукратная фенольная депротеинизация и осаждение ДНК этанолом. Выход ДНК составляет 1-2 мг на 1 г нематод. По нашим наблюдениям, метод дает препараты с весьма широким распределением по молекулярным массам, среднечисленная молекулярная масса составляет около 30 Мегадальто. Выделенная таким образом ДНК, по данным центрифугирования в хлориде цезия, содержит около 10% не-ДНК материала, вероятно, полисахарида. Для его удаления препараты можно фракционировать на гидроксипатите, но это снижает молекулярную массу [95].

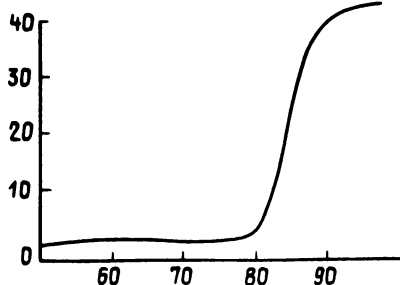


Рис. 8. Плавление ДНК *C.elegans* в 0,12 М фосфатном буфере [95]. Ось ординат – гиперхромизм; ось абсцисс – температура, °С

Как результаты центрифугирования в градиенте CsCl, так и прямое химическое определение, показывают, что ДНК *C.elegans* имеет 36% ГЦ, что является нижним пределом для нематод [9]. Небольшая фракция ДНК имеет около 51% ГЦ, причем эта фракция гибридизируется с рибосомальной РНК. Определение содержания ДНК у личинок на стадиях L_1 и L_2 дает значение $1 \cdot 10^{11}$ п. н., что соответствует около $0,8 \cdot 10^8$ п.н. на гаплоидный геном. Если считать, что ген в среднем состоит из 1000 п.н. и имеется ~ 4000 генов, то легко рассчитать, что около 95% ДНК является избыточной, как это наблюдается и для других высших организмов. Взрослые нематоды содержат примерно в 15 раз больше ДНК, чем личинки, что объясняется ростом гонад и формированием яиц внутри гермафродита. При мягких условиях лизиса и низкой температуре яйца не разрушаются и выход ДНК у взрослых нематод снижается. На рис. 8 дан профиль плавления ДНК *C.elegans* [95].

Кинетика ренатурации ДНК *C.elegans* исследована Салстоном и Бреннером [95]. Авторы выявили две основные фракции ДНК. Первая фракция, составляющая 17% ДНК ренатурирует быстро и кинетически гетерогенна, вторая фракция – 83% ДНК ренатурирует медленно и кинетически гомогенна. Наклон кривой ренатурации второй фракции составляет $\sim 4\%$ от соответствующего значения для ДНК *E.coli*. Быстро ренатурирующая фракция на 80% состоит из семейств повторяющихся по 10–10 000 раз последовательностей. Возможно, часть этой ДНК образуется из митохондрий. Около 20% фракции 1 (т.е. 3,4% всей ДНК) ренатурирует очень быстро ($C_0t \sim 10^{-7}$) и состоит, вероятно, из инвертированных пов-

торов. Не обнаружено разницы в кинетике ренатурации между ДНК личинок и ДНК взрослых особей. У взрослых нематод более 5% ДНК содержится в половых клетках, у личинок — менее 1%. Если бы половые клетки содержали больше ДНК, чем соматические, то это должно было бы отразиться на кинетике ренатурации. Поскольку на самом деле различий не обнаружено, делается заключение о том, что в ходе развития *C.elegans* не происходит диминуции хромосом и значительных потерь ДНК. В этом отношении *C.elegans* отличается от аскарид, у которых соматические клетки содержат на 30% меньше ДНК, чем половые [100].

Эммонс и др. провели детальное электронномикроскопическое исследование повторяющихся последовательностей ДНК *C.elegans* [33]. Высокополимерная ДНК была денатурирована и быстро ренатурирована ($C_0t \sim 7 \cdot 10^{-5}$). Для поиска инвертированных повторов просмотрено в общей сложности 3106 тыс. п.н., что составляет около 2% всего генома. Найдено 93 инвертированных повтора, что соответствует их общему числу в геноме ≈ 2400 . Длина двунитевого ствола в инвертированных повторах варьирует от 50 п.н., что является нижним пределом метода, до 9000 п.н., в среднем составляя 670 п.н. Длина петли варьирует от 230 до 9260 нуклеотидов, в среднем 1340, преобладают шпильки без петель (рис. 9). Подавляющее большинство инвертированных повторов случайно распределены по ДНК и среднее расстояние между ними составляет $33,4 \cdot 10^3$ нуклеотидов. Около 15% инвертированных повторов собраны в кластеры, на весь геном приходится ≈ 50 кластеров, содержащих 4–6 повторов, удаленных друг от друга на расстояние менее $2,2 \cdot 10^3$ нуклеотидов. Сравнение количества и распределения инвертированных повторов с количеством ДНК, выделяемой после быстрой ренатурации путем фракционирования на гидроксипатите (foldback-фракция), показывает, что помимо инвертированных повторов, в ДНК имеется большое число умеренно повторяющихся последовательностей (УПП). Детальный анализ результатов хроматографии фрагментов длиной 5000 нуклеотидов, ренатурированных при C_0t от 10^{-5} до 1,0 показывает, что УПП перемежаются с уникальными, как это имеет место у *Xenopus* и многих других эукариот. Судя по электронномикроскопическим снимкам, длина УПП варьирует от 50 до 1500 нуклеотидов, но встречаются и повторы длиной до 7000 нуклеотидов. Средняя длина УПП составляет 660 нуклеотидов, расстояние между УПП варьирует в широких пределах — от 0 до 14 000 нуклеотидов, а

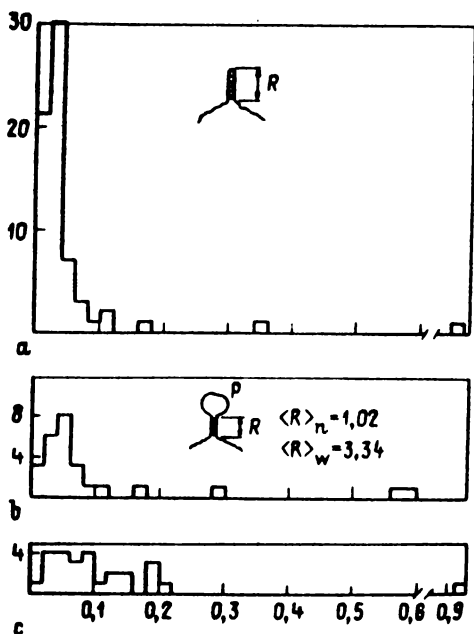


Рис. 9. Инvertированные повторы в ДНК *C. elegans* [95]. Ось ординат – число обнаруженных случаев; ось абсцисс – длина в т.п.н. стебля без петли (а), стебля, имеющего петлю (б), петли (с)

возможно, и больше. Вся фракция УПП составляет около 14% ДНК. Часть этой ДНК (около 3% общего количества ДНК) собрана в блоки длиной до 20000 нуклеотидов. Возможно, блоки состоят из часто повторяющихся коротких последовательностей типа сателлитной ДНК, но точно это не установлено. Если принять во внимание эти длинные блоки, а также инvertированные повторы, то число семейств повторов ДНК должно лежать в пределах от 130 до 1300 при частоте повторяемости от 10 до 100. В общем, эти результаты согласуются с более ранними данными Салстона и Бреннера [95]. Необходимо отметить, что при анализе хроматографии ренатурированных при разных C_0t фрагментов ДНК *C. elegans* на гидроксипатите Шахат и др. получили несколько иные результаты, [91]. В частности, эти авторы сделали заключение, что ДНК *C. elegans* по распределению повторяющихся последовательностей более похожа на ДНК дрозофилы, чем на ДНК *Xenopus*. В этой работе электронномикроскопическое исследование не проводилось.

В последнее время появилось большое количество данных, свидетельствующих о существовании специфических механизмов, вызывающих перестройки геномной ДНК у эукариот. Так, у некоторых организмов соматические клетки не содержат некоторых последовательностей ДНК, имеющих в половых клетках (явление диминуции хромосом). В ооцитах некоторых организмов амплифицированы гены, кодирующие рибосомальную РНК. Делеция генетического материала при дифференцировке лимфоцитов приводит к перестройке генов, кодирующих иммуноглобулины и т.п. [14, 16]. Существует уже обширная литература по мигрирующим генетическим элементам у дрозофилы (см. обзор в этом сборнике — Ананьев Е.В. "Молекулярная цитогенетика транспозибельных элементов дрозофилы"). Естественно, были предприняты попытки обнаружить перестройки ДНК в процессе развития *C.elegans*. Первая попытка такого рода предпринята в работе Салстона и Бреннера [95]. Сравнение профилей ренатурации ДНК личинок и взрослых нематод не выявило никаких отличий, что указывает на отсутствие крупных перестроек ДНК, однако чувствительность метода была недостаточной, чтобы обнаружить перестройки, в которые вовлекается несколько процентов или меньше суммарной ДНК. Эммонс и др. использовали для этой цели гораздо более чувствительный метод [32]. Из личинок штамма *C.elegans* Bristol N 2 была выделена ДНК, обработана рестриктазой BamHI и клонирована в векторе pBR313. Полученные таким образом фрагменты ДНК гибридизировали по Сюзерну с ДНК из 5 источников: ДНК личинок L₁ Bristol, ДНК личинок L₁ Bergerac, ДНК молодых особей Bristol и ДНК сперматозоидов штамма E879 (вариант Bristol, несущий мутацию *him*, в результате которой повышается доля самцов) и ДНК близкородственного вида *Caenorhabditis briggsae*. Фрагменты спермы и соматической ДНК вели себя идентично, между штаммами Bristol и Bergerac найдено около 15% различий, фрагменты ДНК *C. Bristol* и *C. briggsae* оказались негомологичными. На основании этих результатов можно рассчитать, что если в ходе развития *C. elegans* и происходят перестройки ДНК, то они касаются небольшого процента (менее 2%) фрагментов или сайтов рестрикции. Повторяющиеся последовательности, выявленные в большинстве клонированных фрагментов, расположены одинаково в ДНК половых клеток и ДНК личинок, а также взрослых особей. Довольно высоким оказался уровень различий между штаммами Bristol и Bergerac. Различия в 15% фрагментов, по оценкам авторов, соответствует

различию в $\approx 1\%$ нуклеотидов, что даже выше, чем аналогичная разница между видами у других животных [6]. Еще большие различия обнаружены между близкими по морфологическим признакам видами *C. elegans* и *C. briggsae*, что может указывать на высокую скорость эволюции этих видов. Существенная часть ДНК-дивергенции между штаммами Bristol и Bergerac обусловлена, как вскоре выяснилось, многочисленными включениями размером 1700 нуклеотидов. Одно из таких включений, обозначенное Tc-1, расположено вблизи кластера 3 актиновых генов в V-хромосоме штамма Bergerac. В геноме штамма Bristol Tc-1 встречается 25-30 раз, а в геноме штамма Bergerac - несколько сотен раз [87]. Судя по результатам рестрикционного картирования, практически все включения типа Tc-1 имеют одинаковую последовательность нуклеотидов. В отличие от штамма Bergerac, хромосомы штамма Bristol не содержат Tc-1 вблизи кластера актиновых генов. С помощью комплементарной ДНК активного гена *Dictyostellium* из библиотеки фрагментов ДНК штамма Bristol, включенных в λ Charon -10, были выделены фаги, содержащие актиновые гены и место включения Tc-1 [87]. Аналогично получены фаги, содержащие актиновые гены и включенный Tc-1 из набора фрагментов ДНК штамма Bergerac. E. coR1 - сегменты ДНК, содержащие Tc-1 (из штамма Bergerac) и соответствующая зона ДНК штамма Bristol были затем субклонированы в плазмиде pBR 325, после чего определена их нуклеотидная последовательность. Tc-1 имеет длину 1610 нуклеотидов, в том числе инвертированный повтор длиной 54 нуклеотида на концах. Последовательность Tc-1 фланкирована последовательностью AT слева и TA справа, место включения имеет последовательность ATTTTTTCAAA-Tc-1 - TATGTGCTAC. Tc-1 содержит внутри сигналы ЦААТ, ТАТА и поли-А. Предполагается, что Tc-1 может давать один транскрипт, кодирующий две полипептидные цепи длиной 273 и 112 аминокислот. В целом, структура Tc-1 аналогична структуре других транспозибельных элементов.

4. РАЗВИТИЕ

Возможность прижизненного наблюдения за делением и миграцией клеток эмбриона и сравнительная простота получения мутантов делают *C. elegans* чрезвычайно удобным объектом

для глубокого анализа процессов развития. Эмбриональное развитие *C.elegans* начинается с момента оплодотворения яйцеклетки, приблизительно через 30 мин, после этого происходит первое деление, и еще через 1-2 ч яйцо с развивающимся зародышем откладывается. Через 12-14 ч от момента оплодотворения эмбриональное развитие заканчивается и личинка нематоды вылупляется (*hatching*) из яйцевой оболочки. Образовавшийся червячок проходит 4 личиночные стадии (постэмбриональное развитие), после чего становится взрослой особью. Яйца нематод прозрачны и легко могут быть получены при разрезании взрослой особи. Для прижизненного наблюдения за делением бластомеров используется оптика Номарского (с интерференционным контрастом). Микроскоп соединяют с телевизионной камерой, что дает возможность записи на магнитную ленту. Это важный момент, поскольку деление бластомеров происходит довольно быстро - примерно каждые 20 мин. С помощью такой техники было изучено развитие оплодотворенного яйца до стадии 182 клетки [29]. При этом были установлены следующие факты. Все клетки эмбриона происходят в результате последовательных дроблений яйца. При каждом делении обе дочерние клетки имеют примерно одинаковый размер за исключением делений, приводящих к формированию стволовых клеток. Первое же дробление приводит к разделению яйца на переднюю (АВ) и заднюю (P_1) части. АВ является стволовой клеткой для передней эктодермы. Стволовые линии клеток *C.elegans* (как и у других нематод) характеризуются своим постоянным ритмом деления. В течение первых дроблений яйца образуются еще 5 стволовых клеток: MSt, E, C, D и P_4 , которые являются предшественниками клеток передней мезодермы, эндодермы, задней эктодермы, задней мезодермы и зачатков гонад (рис. 10). Каждая линия клеток имеет свои собственные эндогенные "часы", определяющие темп деления. Этот темп сохраняется, несмотря на перемещение клеток. "Волны" митозов, начинающиеся с деления клеток линии АВ, движутся от передней части яйца к задней. Даже если потомок стволовой клетки перемещается вдоль яйца, он сохраняет "память" о своем ритме деления. По-видимому, у *C.elegans* имеется мозаичная организация яйца и может быть построена соответствующая карта презумптивных зачатков или "карта судьбы". В отличие от аскариды, у *C.elegans* ранние эмбрионы не имеют билатеральной симметрии и почти не наблюдается делений "налево-направо". В целом картина раннего развития *C.elegans* соответствует мозаичному типу -

не обнаружено никакого влияния клеток друг на друга, путь развития каждой клетки полностью определяется эндогенными факторами и может быть предсказан, исходя из ее положения в соответствующей клеточной линии. Один из вариантов такого пути – запрограммированная гибель. Из 671 клетки, образующейся в течение эмбриогенеза, 113 клеток погибают до вылупления из яйца, еще 18 клеток погибают в течение личиночного развития, когда число ядер увеличивается с 558 до 959. В норме эти клетки поглощаются и лизируются соседними клетками [83]. Большая часть случаев гибели клеток в эмбриональном развитии имеет место между 5-м и 9-м часом после оплодотворения, и к моменту вылупления нельзя увидеть никаких следов погибших клеток. У погибающих клеток сначала происходит увеличение преломления света в цитоплазме и ядре, затем клетка поглощается другой (обычно соседней) и в ней лизируется. Весь процесс занимает не более 1 ч [97]. Путем тотального просмотра с помощью оптики Номарского потомства обработанных этилметансульфонатом нематод Хедгекок и др. [44] выделили 8 рецессивных мутаций, затрагивающих 2 гена, обозначенных *ced-1* (I хромосома) и *ced-2* (IV хромосома), у которых погибшие клетки не поглощаются и не лизируются. Фенотипически все мутанты неразличимы. Развитие нематод не нарушается в результате мутаций *ced-1* и *ced-2*, биохимические изменения при этих мутациях не изучались.

Строгая детерминированность судьбы клеток внутренними факторами, вначале выявленная в эмбриональном развитии, сохраняется и в постэмбриональный период. Салстон и Уайт изучили влияние инактивации отдельных клеток на судьбу других [98]. Для избирательной инактивации клеток был использован лазерный микропучок. В большинстве случаев инактивация клетки никак не отражается на соседних клетках и развитие продолжается, однако были отмечены и случаи взаимодействия клеток. Эти взаимодействия были 3 типов. 1. Индукция. Развитие структуры зависит от присутствия клеток, которые сами по себе не входят в состав этой структуры. Существует два примера такого взаимодействия – индукция вульвы клетками гонад и организация выводящей трубки клоаки. Другой тип взаимодействия, близкий к индукции, – взаимодействие между погибающими (по плану) клетками и их киллерами. 2. Линейная регуляция. Судьба одной клетки и ее потомков изменяется таким образом, чтобы компенсировать потерю другой. Ни в одном случае такая компенсация (замена) не была полной. Да-

же если в конце концов получалась взрослая особь, она содержала несколько ненормальных клеток. Компенсация возможна только для гомологичных, похожих клеток. 3. Функциональная регуляция. Функция одной клетки изменяется таким образом, чтобы компенсировать потерю другой. Простая замена, при которой одна клетка полностью изменяется и заменяет собой инактивированную, очень редка и обнаружена только для клеток хвоста самца. Чаще встречается случай, когда одна клетка "комбинирует" свою нормальную функцию с функцией утраченной клетки (эктодерма, мезодерма и энтодерма).

Другой подход, позволяющий оценить роль клеточных взаимодействий, а также дающий возможность расчленить генетическую программу развития *C.elegans*, основан на изучении мутантов, у которых нарушено деление клеток отдельных линий. Постэмбриональные клеточные линии особенно подходят для этой цели, поскольку каждая линия дает легко опознаваемые компоненты нервной, мышечной, пищеварительной и др. систем. Выделяя мутанты с нарушениями этих систем, можно тем самым получить мутации, проявляющиеся в одной линии клетки, но не в других. Хорвитц и Салстон [56] выделили и изучили 24 таких мутанта. Мутации картированы в 14 генах. Почти во всех случаях показано, что мутантный фенотип является следствием одной рецессивной мутации. Большинство мутаций нарушает (ускоряет или блокирует) деление клеток брюшного гиподермиса, ведущих к образованию вульвы. 3 мутации из 24 супрессировались супрессорами *sup-5* и *sup-7*, которые, по данным Ватерсона и Бреннера [103], супрессируют только нуль-аллели, т.е. мутации, при которых отсутствует продукт гена. Это означает, что, по крайней мере, в 3 случаях мутантный фенотип связан с полной утратой функции. У мутантов по гену *lin-5* подавлено постэмбриональное деление клеток, что приводит к многим морфологическим изменениям (тонкие, недоразвитые нематоды). Однако, как показали Альбертсон и др. [5], синтез ДНК в таких клетках продолжается, и получающиеся полиплоидные клетки иногда похожи на различных своих потомков, которые были бы, если бы клетки делились. Это показывает, что, по крайней мере, некоторые аспекты дифференцировки не требуют клеточного деления. Для мутантов по гену *lin-6*, у которых отсутствует постэмбриональное деление, тем не менее, имеет место нормальная реорганизация двигательных нейронов [105]. Это означает, что данный процесс не зависит от клеточного деления.

Другим примером, также показывающим необязательность клеточного деления для некоторых процессов дифференцировки, является формирование мускулов у эмбриональных мутантов. Госсет и др. [40] изучили экспрессию миозиновых генов у трех температурочувствительных мутантов B1, B126 и B209, описанных ранее [106]. При повышенной температуре у этих мутантов нарушаются деления дробления, хотя синтез ДНК в бластомерах продолжается еще некоторое время. Для обнаружения синтеза миозина и парамиозина использовались специфические антитела. При нормальном развитии первые иммунореактивные клетки (т.е. клетки, синтезирующие миозин или парамиозин) появляются, когда эмбрион состоит из 350–400 клеток, и затем их число быстро нарастает, достигая ≈ 85 к моменту вылупления, когда эмбрион состоит из ≈ 550 клеток. У мутанта B1 ядерное и клеточное деление нарушено при 25°C на ранних стадиях, но синтез ДНК продолжается до ≈ 500 ядерных эквивалентов, причем происходит синтез миозина и парамиозина. У мутантов B126 и B209 деление клеток прекращается позже, чем у мутанта B1, и эмбрионы имеют по 50–200 клеток, но синтез миозина и парамиозина происходит, причем приблизительно в то же время, как и у дикого типа. Эти факты ясно показывают, что биосинтез мышечных белков – миозина и парамиозина зависит не от взаимодействия клеток или числа пройденных делений, а регулируется эндогенным механизмом типа часового, находящимся внутри клетки. Дополнительные сведения о миозинах *C.elegans* и других нематод можно найти в обзоре Пенгеля и др. [106], методика получения “давленных” препаратов и определения числа ядер описана Госсетом и Хехтом [39].

Хорвитц и Салстон изучали жизнеспособных мутантов и это, естественно, ограничивает как глубину возможных нарушений фенотипа, так и число затрагиваемых мутациями генов. Эти ограничения могут быть сняты, если анализировать условно-летальные мутанты, например, температурочувствительные (*ts*). В этом случае размножение и поддержание штамма производится при 16°C, когда мутация не проявляется, а анализ мутантного фенотипа при 25 или 26°C. Использование *ts*-мутаций дает возможность получить обширную информацию о роли отдельных генов в детерминировании индивидуального развития. Уже первые работы по изучению *ts*-мутантов у *C.elegans* дали не только много новых сведений, но и позволили сделать некоторые обобщения о функционировании генов на разных стадиях эмбриогенеза. Ширенберг и др. [92]

провели детальное исследование небольшой группы *ts*-мутантов, описанных Мивой и др. [73]. У всех мутантов при повышенной температуре обнаруживаются видимые дефекты на самых ранних стадиях развития (до 50 клеток), даже если остановка развития происходит позже, при этом деление клеток продолжается даже при отсутствии нормального морфогенеза. Общая скорость клеточного деления у некоторых мутантов [*emb-3*, *emb-5* (*hc 67*)] увеличена, у других [*emb-2*, *emb-4*, *emb-5* (*hc 61*) *emb-6* и *emb-7*] понижена. У мутантов *emb-3*, *emb-4*, *emb-5* (оба аллеля) и *emb-7* изменена скорость деления отдельных линий клеток. Для всех мутантов, у которых нарушен ритм деления клеток, инкубация родительского гермафродита при 16°C (до оплодотворения) снимает мутантный фенотип. На основании этого и ряда других наблюдений авторы полагают, что счет времени (*timing*), а не взаимодействие клеток – основа упорядоченного развития *C.elegans*, что находится в согласии с аналогичным заключением, полученным при изучении клеточных линий у нормальных нематод [29]. При этом предполагается, что скорости деления клеточных линий препрограммированы цитоплазмой яйца. В почти одновременно опубликованной работе Вуд и др., используя несколько иные методы, изучили большую группу *ts*-мутантов с нарушенным эмбриональным развитием [106]. Из общего числа 257 *ts*-мутантов, отселекционированных по неспособности развиваться при 25°C до состояния нормальной, взрослой особи только 24 были эмбриональными летальными. Соответствующие мутации картированы в 23 генах, распределенных по всем хромосомам. Мутантный фенотип проявляется в неспособности вылупиться из яйца. Нематоды с фенотипом *Zug* нормально размножаются при 16°C, но при переносе на повышенную температуру откладывают яйца, из которых, однако, не вылупляются личинки. Столь небольшая доля *Zug*-мутантов среди всех температурочувствительных, возможно, указывает на то, что только ~10% общего числа генов должны функционировать на ранних стадиях развития – от оплодотворения до стадии L_1 . Часть этих генов определяют преддетерминированность цитоплазмы, т.е. функционируют во время оогенеза, часть – синтез продуктов, необходимых уже во время развития эмбриона. Для изучения роли преддетерминированности цитоплазмы яйца авторы использовали три теста, позволяющие выявить роль цитоплазмы. Аллели, участвующие в определении цитоплазмы и генотипа яйца при самооплодотворении рассматриваются как материнские. 1) S-тест. В этом тесте определяется, достаточно ли материнской экспрессии +

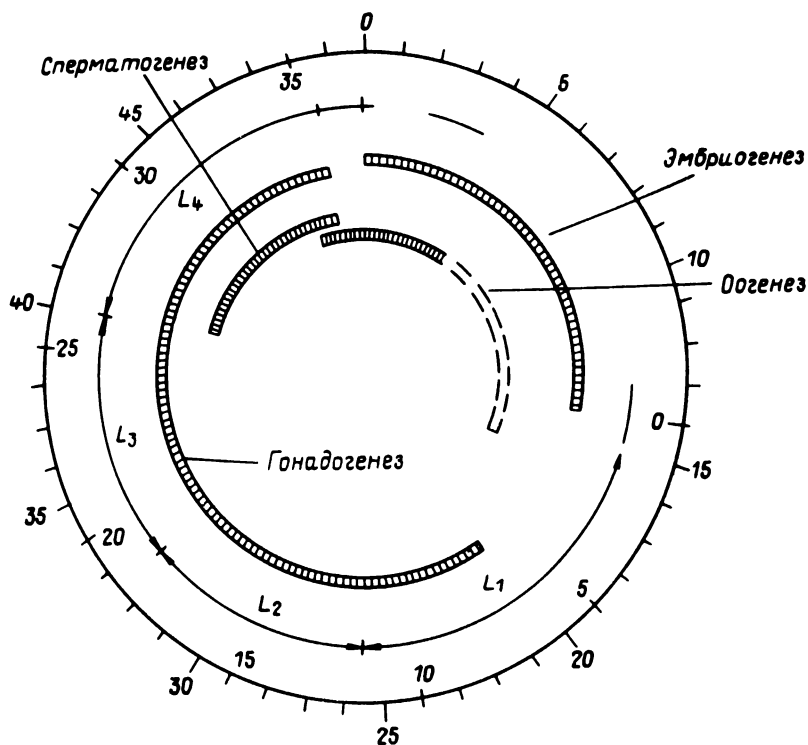


Рис. 11. Схема развития *C. elegans*. Внешний круг - время, ч. 0 - момент оплодотворения. L_1, L_2, L_3, L_4 - стадии личиночного развития. $t = 25^\circ\text{C}$ [106]

аллеля, т.е. нормальной цитоплазмы яйца для выживания мутантной гомозиготы (m/m). С этой целью анализируется потомство гетерозиготы $m/+$, получаемое при 25°C (сама гетерозигота получена при 16°C). Появление в потомстве гомозигот m/m указывает на достаточность нормальной цитоплазмы для компенсации мутантного генотипа. Этот тест не позволяет различить роль спермы или ооцита. 2) R-тест. В нем определяется, является ли необходимой нормальной цитоплазма ооцита для выживания $m/+$ потомства от скрещивания самца $m/+$ и гермафродита m/m . Самцы дикого типа скрещиваются с гомозиготными m/m гермафродитами при 25°C . Гермафродитов заранее переносят на 25°C в стадии L_4 так, чтобы у них не было жизнеспособного потомства (см. схему развития *C. elegans* на рис. 11). Потомство от такого скрещивания будет иметь генотип $m/+$, но развиваться

провели детальное исследование небольшой группы *ts*-мутантов, описанных Мивой и др. [73]. У всех мутантов при повышенной температуре обнаруживаются видимые дефекты на самых ранних стадиях развития (до 50 клеток), даже если остановка развития происходит позже, при этом деление клеток продолжается даже при отсутствии нормального морфогенеза. Общая скорость клеточного деления у некоторых мутантов [*emb-3*, *emb-5* (hc 67)] увеличена, у других [*emb-2*, *emb-4*, *emb-5* (hc 61) *emb-6* и *emb-7*] понижена. У мутантов *emb-3*, *emb-4*, *emb-5* (оба аллеля) и *emb-7* изменена скорость деления отдельных линий клеток. Для всех мутантов, у которых нарушен ритм деления клеток, инкубация родительского гермафродита при 16°C (до оплодотворения) снимает мутантный фенотип. На основании этого и ряда других наблюдений авторы полагают, что счет времени (*timing*), а не взаимодействие клеток — основа упорядоченного развития *C.elegans*, что находится в согласии с аналогичным заключением, полученным при изучении клеточных линий у нормальных нематод [29]. При этом предполагается, что скорости деления клеточных линий препрограммированы цитоплазмой яйца. В почти одновременно опубликованной работе Вуд и др., используя несколько иные методы, изучили большую группу *ts*-мутантов с нарушенным эмбриональным развитием [106]. Из общего числа 257 *ts*-мутантов, отселекционированных по неспособности развиваться при 25°C до состояния нормальной, взрослой особи только 24 были эмбриональными летальными. Соответствующие мутации картированы в 23 генах, распределенных по всем хромосомам. Мутантный фенотип проявляется в неспособности вылупляться из яйца. Нематоды с фенотипом *Zug* нормально размножаются при 16°C, но при переносе на повышенную температуру откладывают яйца, из которых, однако, не вылупляются личинки. Столь небольшая доля *Zug*-мутантов среди всех температурочувствительных, возможно, указывает на то, что только ~10% общего числа генов должны функционировать на ранних стадиях развития — от оплодотворения до стадии L_1 . Часть этих генов определяют преддетерминированность цитоплазмы, т.е. функционируют во время оогенеза, часть — синтез продуктов, необходимых уже во время развития эмбриона. Для изучения роли преддетерминированности цитоплазмы яйца авторы использовали три теста, позволяющие выявить роль цитоплазмы. Аллели, участвующие в определении цитоплазмы и генотипа яйца при самооплодотворении рассматриваются как материнские. 1) S-тест. В этом тесте определяется, достаточно ли материнской экспрессии +

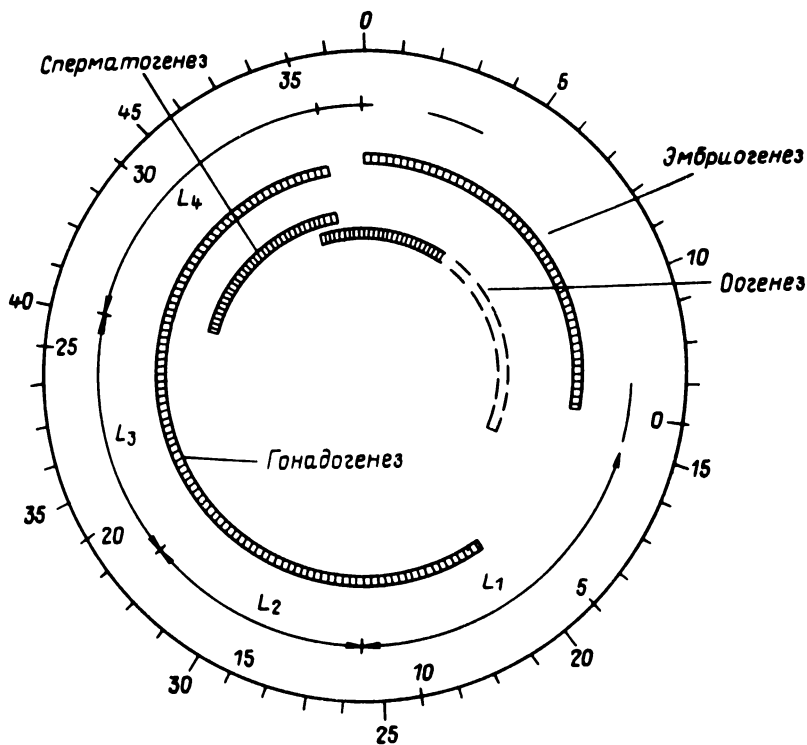


Рис. 11. Схема развития *C.elegans*. Внешний круг - время, ч. 0 - момент оплодотворения. L_1, L_2, L_3, L_4 - стадии личиночного развития. $t = 25^\circ\text{C}$ [106]

аллеля, т.е. нормальной цитоплазмы яйца для выживания мутантной гомозиготы (m/m). С этой целью анализируется потомство гетерозиготы $m/+$, получаемое при 25°C (сама гетерозигота получена при 16°C). Появление в потомстве гомозигот m/m указывает на достаточность нормальной цитоплазмы для компенсации мутантного генотипа. Этот тест не позволяет различить роль спермы или ооцита. 2) R-тест. В нем определяется, является ли необходимой нормальной цитоплазма ооцита для выживания $m/+$ потомства от скрещивания самца $m/+$ и гермафродита m/m . Самцы дикого типа скрещиваются с гомозиготными m/m гермафродитами при 25°C . Гермафродитов заранее переносят на 25°C в стадии L_4 так, чтобы у них не было жизнеспособного потомства (см. схему развития *C.elegans* на рис. 11). Потомство от такого скрещивания будет иметь генотип $m/+$, но развиваться

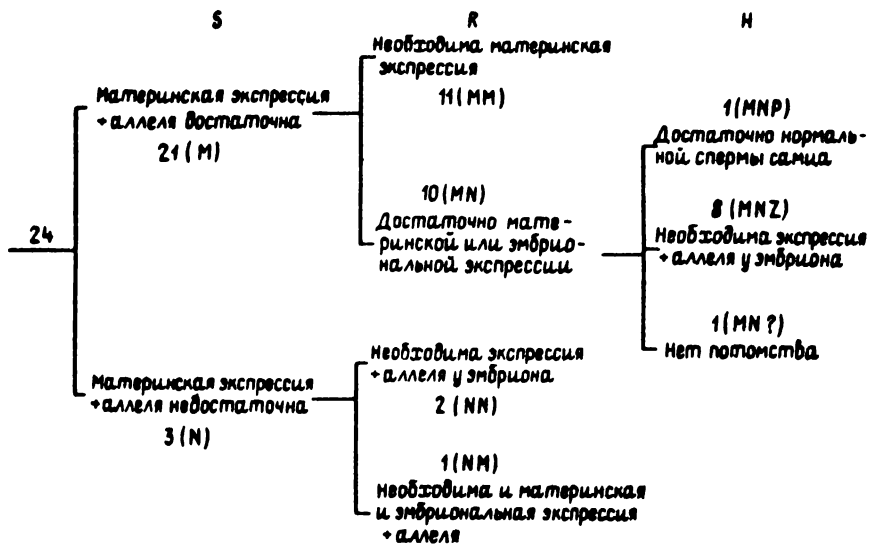


Рис. 12. Результаты применения S-и R-тестов для эмбриональных температурочувствительных мутантов [106]

будет в "мутантной" цитоплазме ооцита, смешанной с нормальной цитоплазмой сперматозоида. Если для развития необходима нормальная цитоплазма ооцита, потомства не будет, если достаточно цитоплазмы сперматозоида или экспрессии аллеля уже во время эмбриогенеза, потомство образуется. 3) H-тест. Гомозиготные m/m гермафродиты скрещиваются с гетерозиготным самцом $m/+$ при 25°C . Если образуется потомство как $m/+$, так и m/m , то это означает, что нормальной цитоплазмы сперматозоида достаточно для выживания мутанта, если образуется потомство только $m/+$, то это значит, что необходима экспрессия + аллеля у зиготы. Последовательное применение этих тестов к мутантам дало результаты, схематически показанные на рис. 12. 11 из 24 мутантов (группа MM) показывают строго материнский эффект как в тесте S, так и в тесте R. Это означает, что все 11 соответствующих генов обязательно должны функционировать у гермафродита, чтобы сформировалась нормальная цитоплазма яйца и эмбрион мог затем развиваться. У двух мутантов (NN) не обнаружен материнский эффект ни в S-, ни в R-тестах. Для выживания таких эмбрионов соответствующие гены у него должны функционировать. У одного мутанта (NM) отсутствует материнский эффект в тесте S, и его развитие не норма-

лизуется нормальной цитоплазмой сперматозоида. Это означает, что соответствующий ген должен функционировать и у гермафродита, и у эмбриона. Наконец, 10 мутантов (MN) показывают материнский эффект в S-тесте, и нормальная цитоплазма сперматозоида (R-тест) не снимает эффект мутации. Эти гены должны функционировать у гермафродита или у эмбриона (на основании S- и R-тестов нельзя решить, где именно). Для этих мутантов определенный ответ дает H-тест: для 8 мутантов необходима экспрессия генов у эмбриона, для одного (MNP) достаточно нормальной спермы самца, даже если соответствующий продукт отсутствовал в ооците и не синтезировался эмбрионом. Один мутант не давал потомства по неизвестной причине.

Эти факты показывают, что примерно половина генных продуктов, необходимых для раннего развития, должна быть подготовлена заранее, т.е. во время оогенеза, а другая половина — синтезирована уже во время развития эмбриона. Цитоплазма спермы самца большой роли не играет — отмечен всего один случай "спасения" эмбриона нормальной спермой. Если около половины генных продуктов, определяющих раннее развитие, должны быть заранее готовы в цитоплазме ооцита, то возникает вопрос, до каких этапов развития важны эти продукты. Для ответа на него Вуд и сотр. выполнили S- и R-тесты по отношению к 11 температурочувствительным мутантам, у которых развитие блокировано на стадии L₂, в период между 2-й и 3-й линьками. Мутанты описаны ранее Хиршем и др. [50]. Полученные результаты показывают, что для 8 из 12 изученных мутантов дикие аллели соответствующих генов должны начать функционировать до стадии L₂, для 4 остальных мутантов нормальная цитоплазма зародыша в состоянии обеспечить развитие до стадии L₂ и дальше, даже если соответствующие гены не функционируют у эмбриона. Для точного определения периода активности генов в течение эмбриогенеза может быть поставлен опыт по изменению температуры инкубации. В нем определяется температурочувствительный период (ТЧП) — интервал времени, в течение которого инкубация при повышенной температуре приводит к выявлению мутантного фенотипа. Начало ТЧП определяется в опыте по снижению температуры как самое раннее время, в которое перенос с высокой на низкую температуру предотвращает появление мутантного фенотипа. Конец ТЧП определяется как самое позднее время, в которое перенос с низкой на высокую температуру приводит к появлению мутантного фенотипа.

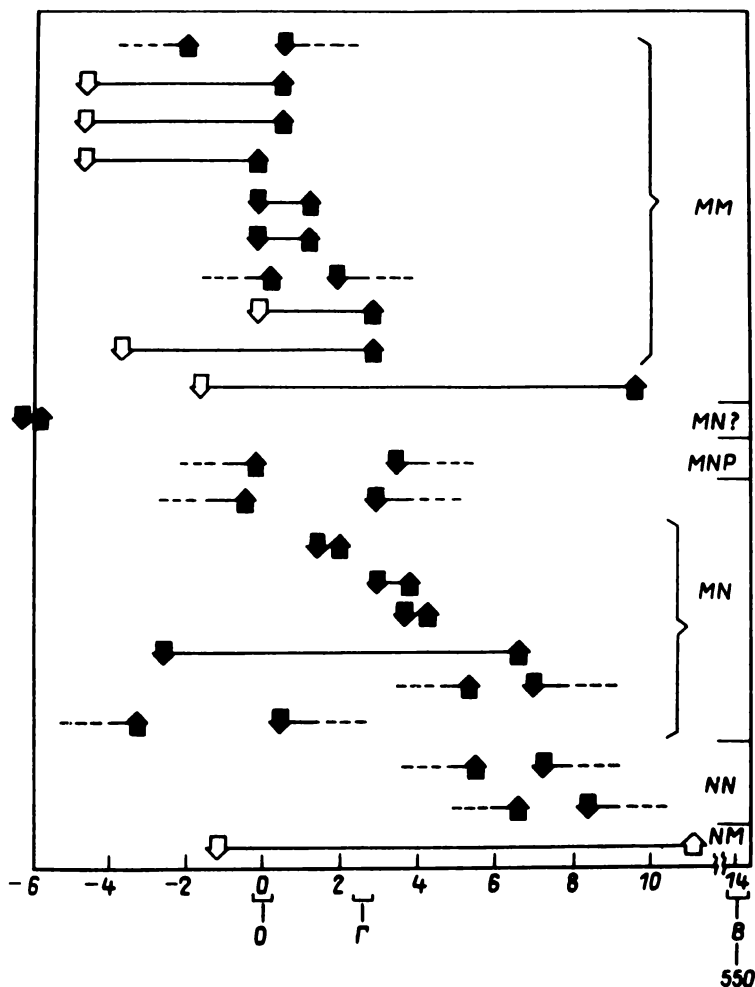


Рис. 13. Эксперимент по изменению температуры инкубации для эмбриональных ts -мутантов. Стрелка, направленная вверх, означает конец температурочувствительного периода (ТЧП), направленная вниз – начало. Светлые стрелки означают, что начало или соответственно конец ТЧП могут быть раньше или позже указанного срока. Сплошная горизонтальная линия – ТЧП, прерывистая – то же, но с неизвестным другим концом. Вертикальная ось – отдельные мутанты, смысл обозначений ММ и др. справа поясняет рис. 12. Горизонтальная линия – часы при 25°C . О – оплодотворение; Г – гастрюляция; В – вылупление [106]

На рис. 13 показаны ТЧП для ряда мутантов, изученных в работе Вуда и сотр. В основном мутанты со строгим материнским эффектом имеют ТЧП, начинающийся до оплодотворения и заканчивающийся перед гаструляцией. Интерпретация данных этого эксперимента для других мутантов затруднительна, поскольку ничего неизвестно о природе нарушенной в результате мутации биохимической функции. Однако анализ *ts*-мутантов с нарушенным развитием дает даже сам по себе много ценной информации. По-видимому, продолжение работ в этом направлении и, в особенности, идентификация функций, нарушенных в результате мутаций поможет постепенно разобраться в раннем развитии *C.elegans* так же, как это сделано для бактериальных вирусов.

5. СПЯШАЯ ЛИЧИНКА (dauer larva)

Спящая личинка (DL) представляет собой особую необязательную стадию в жизненном цикле нематоды *C.elegans*, возникающую или в условиях голодания, или при "перенаселенности" культуры. В некоторых отношениях DL напоминает инфекционные личинки паразитических нематод [13]. DL несколько тоньше нормальных молодых нематод, неподвижны, не питаются. Сокращения глотки отсутствуют. DL возникает как реакция на неблагоприятные условия и развитие останавливается на стадии второй линьки. Состояние DL обратимо: при внесении свежих бактерий или разбавлении культуры нематоды выходят из состояния DL и развитие продолжается. Интересно, что время пребывания в состоянии DL (вплоть до 30 дней) никак не отражается на последующем развитии и длительности жизни [60]. 1% SDS в течение 10 мин убивает до 99,99% нематод, в то же время в состоянии DL нематоды устойчивы к SDS, что используется для получения DL. Кассада выделил несколько мутантов *C.elegans*, впадающих в DL при нормальных условиях культивирования, но при повышенной температуре [19, 20]. Впадение в DL в перенаселенных культурах зависит от неидентифицированного, но термостабильного вещества, активного даже в 10-кратном разбавлении. Добавление этого фактора к нормальным культурам индуцирует переход нематод в состояние DL [21, 22]. Риддл и др. выделили и изучили большое количество мутантов с нарушением образования DL [82]. Получены мутанты (*daf*) двух классов: неспо-

способные формировать DL, т.е. DL-дефектные и впадающие в DL, даже при нормальном кормлении, т.е. DL-конститутивные. Основная масса мутантов 2-го класса – температурочувствительность. *ts*-мутации распадаются на 7 групп комплементации, мутанты первого класса – DL-дефектные – картированы в 15 генах. Было получено большое количество двойных мутантов, у которых мутации относились к разным классам, причем в некоторых случаях отмечалась супрессия: двойной мутант вел себя как дефектный, эффект *ts*-мутации не проявлялся. В принципе, у конститутивных мутантов просто мог быть заблокирован путь, ведущий к продолжению развития, т.е. в стадию L₃. Однако факт существования супрессии показывает, что скорее всего у конститутивных мутантов образуется некий ложный сигнал, ведущий к DL даже при нормальных условиях питания. В этом случае возможны две ситуации. Если у двойного мутанта мутация дефектности блокирует путь, ведущий к DL уже после ложного сигнала, то двойной мутант будет вести себя как дефектный (супрессия мутации *ts*). Если же ложный сигнал образуется после блока, создаваемого мутацией дефектности, то двойной мутант будет вести себя как конститутивный. Фенотипы двойных мутантов показаны в табл. 5. Цифры означают, степень супрессии *ts*-мутации.

На основании этой картины супрессии и некоторых дополнительных данных установлена последовательность функционирования генов, необходимых для формирования DL (рис. 14).

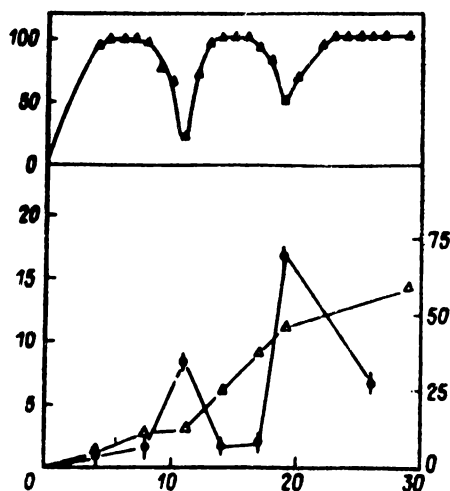


Рис. 14. Последовательность действия *dal*-генов при переходе в состояние спящей личинки [82]. Мутации в генах 10, 18, 17, 6, 16, 20, 3, 5, 12 (над прерывистыми линиями) приводят к блокированию DL, *ts*-мутации в генах 8, 11, 7, 14, 1, 4 блокируют выход из DL при повышенной температуре. Последовательность функционирования установлена на основании свойств двойных мутантов

Таблица 5

Супрессия *ts*-мутаций у двойных *daf*-мутантов [82]

Ген, имеющий мутацию дефектности	Ген, имеющий <i>ts</i> -мутацию						
	<i>daf-11</i>	<i>daf-8</i>	<i>daf-7</i>	<i>daf-14</i>	<i>daf-1</i>	<i>daf-4</i>	<i>daf-2</i>
<i>daf-3</i> X	100	100	100	100	100	100	0
<i>daf-5</i> II	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>daf-12</i> X	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>daf-20</i> X	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	0	100
<i>daf-16</i> I	-/-	60	20	25	35	-/-	-/-
<i>daf-6</i> X	70	30	100	35	0	-/-	0
<i>daf-17</i> I	100	100	-/-	0	-/-	-/-	100
<i>daf-18</i> IV	-/-	-/-	0	0	-/-	-/-	0

Предполагается, что этот генетический порядок должен соответствовать пути передачи сигнала по нервным волокнам. Как формально генетическая проблема, формирование DL приблизительно столь же сложно, как морфогенез у бактериофага T4. Поскольку почти никакие гены, затрагивающие развитие нематоды, не влияют на формирование DL, последний процесс рассматривается как относительно обособленный, контролируемый специфическими генами "боковой" путь развития.

6. БЕЛКИ

Число генов у *C. elegans* оценивается величиной порядка 2000-4000, можно ожидать, что общее число различных белков будет несколько меньше этой величины. Используя двумерный электрофорез по О'Фаррелло [36], можно надеяться разделить существенную часть этих белков и проследить за их синтезом и распадом. Такое исследование выполнено Джоном и Хиршем [58]. Общее содержание белков (на 1 особь) увеличивается во время роста нематод от 0,004 мкг в стадии L₁ до 0,04 в стадии L₃ и до 0,414 у взрослых особей. На электрофореграммах удается идентифицировать 600-

800 пептидов, которые, очевидно, соответствуют белкам, синтезируемым в заметных количествах. Большинство этих белков обнаруживается на всех стадиях развития от L₁ до взрослой особи, но имеются также белки (113 из 800), синтез которых изменяется во время развития. Чаще всего эти изменения происходят один раз: либо белок появляется и сохраняется в дальнейшем, либо исчезает раз и навсегда. Наибольшее число изменений происходит при переходе от стадии L₄ во взрослое состояние, в это время 11% белков или исчезают, или появляются, или сильно изменяются в количестве. Для каждой стадии развития имеется небольшое количество белков, специфичных только для нее. К сожалению, метод не настолько чувствителен, чтобы идентифицировать белки, представленные в небольших количествах, а именно среди них можно было бы ожидать появление регуляторных белков, направляющих процесс развития. Проведение подобной работы с мутантами представляет несомненный интерес, но пока таких исследований нет. В нескольких лабораториях предприняты исследования синтеза индивидуальных белков, выделяемых с помощью специфических методов. Сюда относятся миозины, белки кутикулы, основной белок спермы, гистоны и др. Нематода *C.elegans* имеет три формы тяжелых цепей миозина: А-форма с мол. массой 210 000, обнаруженная в мускулах тела и глотки, В-форма [мол. масса 210 000, локализованная в мышцах тела, и С-форма (мол. масса 206 000)], обнаруженная только в мускулатуре глотки [35]. А- и В-формы имеют различающиеся последовательности аминокислот и кодируются двумя различными структурными генами. Цепь В кодируется геном *unc-54* в I хромосоме [34, 42, 68, 69]. Миозин представляет собой димеры АА и АВ гибридов не обнаружено [89, 90]. В мышцах тела эти миозины, обозначаемые А и В, локализованы в одних и тех же клетках [67]. Цепи А и В синтезируются так, что сохраняется постоянное отношение их количеств 1:2, что соответствует количествам соответствующих миозинов. Механизм, с помощью которого обеспечивается это соотношение неизвестен. Мутации в гене *unc-52* (не кодирующем В-миозин) приводят к нарушению структуры саркомеров мышц тела, причем эти нарушения коррелируют со снижением уровня миозина В. В течение первых 2 ч личиночного развития, когда еще не выявляется мутантный фенотип, синтез В-миозина у мутанта *unc-52* происходит нормально, к 38 часам скорость его синтеза снижается, замедляется рост саркомеров, проявляется мутантный фенотип. Это показы-

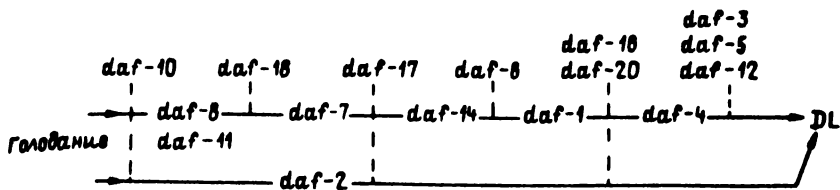


Рис. 15. Синтез белков кутикулы и общий синтез белка после пробуждения спящей личинки. Правая ось ординат – включение в общий белок (Δ) (10^{-3} имп/мин на 1000 нематод); левая – в белок кутикулы (10^{-2} имп/мин на 1000 нематод). (•) Длительность метки 1 час. Ось ординат – время от момента пробуждения спящей личинки, ч. В верхней части рисунка – доля нематод (%), у которых происходит сокращение глотки [22]

вает, что ген *unc-52* каким-то образом регулирует синтез В-миозина, причем этот эффект гена привязан к определенному моменту развития [108]. Кутикула нематоды состоит в основном из белков с небольшой примесью липидов и углеводов [13]. Внутренний слой кутикулы состоит из коллагеноподобных белков, связанных между собой дисульфидными связями [63], у *C.elegans* в составе кутикулы есть несколько различных коллагенов [21, 22, 23]. Внешний слой кутикулы состоит из неколлагеновых белков, иногда называемых кутикулинами [38]. Перед линькой примерно вдвое утолщается гиподермис, его цитоплазма изобилует рибосомами, происходит интенсивный синтез РНК. Эксперименты с использованием импульсной метки белков, показывают, что в этот период происходит усиленный синтез белков кутикулы. В период между линьками его скорость резко падает. Растворимые и нерастворимые белки внутреннего и внешнего слоя ведут себя в этом отношении одинаково [22]. Синтез других белков не претерпевает существенных изменений в течение линьки (рис. 15). Материал старой кутикулы не используется. Вопрос о механизме, запускающем синтез белков кутикулы перед линькой, остается открытым. Таким образом, линька *C.elegans* может служить удобной моделью для исследования молекулярно-генетических процессов, контролирующих отдельные события в индивидуальном развитии.

Другим изученным примером включения синтеза определенного белка в нужный момент является синтез основного белка спермы [61] (о строении спермы у нематод см. 13). Этот

белок имеет мол. массу 15 600, изоэлектрическую точку при pH 8,6 и функционирует как димер. На его долю приходится около 17% от тотального белка спермы. С помощью специфических антител показано, что белок локализован в проксимальном конце гонад самца, а также в сперме как самца, так и гермафродита. В других тканях он не обнаруживается. Синтез белка начинается на 39–42-м часу от момента выплывания, соответствующая мРНК впервые появляется непосредственно перед началом синтеза этого белка, что указывает на транскрипционный механизм регуляции. Функция белка неизвестна, высказано предположение, что он может играть важную роль в структуре псевдоподий, с помощью которых происходит перемещение спермы.

7. ТЕПЛОВОЙ ШОК

У многих организмов, в том числе дрожжей, насекомых и некоторых животных повышение температуры выше нормальной приводит к индукции синтеза особых белков, обычно называемых HSP (heat specific peptides). Наиболее подробно это явление, называемое тепловым шоком, изучено для дрозофилы ([7], а также обзор в этом сборнике – Е. Р. Лозовская, М. Б. Евгеньев, "Тепловой шок у дрозофилы и регуляция активности генома"). У *C. elegans* повышение температуры инкубации также приводит к синтезу HSP-белков [93]. Через 4 ч инкубации при 29, 31, 33 и 35°C синтез нормальных белков подавляется, но разрушения синтезированных ранее (при 20°C) белков не происходит. У *C. elegans* обнаружено 8 основных HSP-белков, с мол. массой 81,70, 41, 38, 39, 19, 18 и 16 кдальтон. Прежде других появляется белок с мол. массой 70 кд и его доля становится тем больше, чем выше температура. Белок 16 кд, иногда обнаруживаемый в контроле в малом количестве, появляется при 29°C, но при дальнейшем повышении температуры постепенно исчезает. Белки 81, 29, 19, 38 и 41 кд в больших количествах синтезируются только при 35°C, причем белки 19 и 29 кд не обнаруживаются при 20°C. Белки 81, 41, 38 кд обнаруживаются в контроле при 20°C, но при температуре 35°C их количество резко увеличивается. Общая картина появления HSP-белков не зависит от стадии развития нематоды. Как показывают опыты по трансляции *in vitro* м-РНК, выделенной из прогретых не-

метод, при высокой температуре синтезируется нормальный набор мРНК с добавлением мРНК, специфичных для HSP-белков, *in vivo* происходит лишь селективная трансляция HSP-мРНК, ДНК, кодирующая белок 70 кд у дрозофилы, гибридизируется с мРНК *C.elegans*, синтезированной при высокой (но не при низкой) температуре, что указывает на гомологию генов, кодирующих 70 кд пептид у дрозофилы и нематоды. Для изучения теплового шока *C.elegans* является очень подходящей моделью. Дело в том, что в состоянии спящей личинки у *C.elegans* практически отсутствует синтез белков и синтез мРНК, однако реакция на тепловой шок происходит и при высокой температуре специфические для HSP-пептидов мРНК появляются в большом количестве на фоне очень низкого уровня синтеза нормальных мРНК.

8. СТАРЕНИЕ

Простота культивирования и небольшая продолжительность жизни являются важными положительными факторами, предопределяющими возможность использования *C.elegans* для исследования проблем старения. Имеется, однако, одно неудобство. Дело в том, что нематода *C.elegans* живет при 20°C 8-10 дней (время, до которого доживает 50% особей, начиная от момента вылупления, T₅₀) а максимум плодовитости приходится на 3-4-й день. К 6-7-му дню уже невозможно отличить потомков от исходной родительской особи. Есть несколько приемов, позволяющих избежать этого затруднения. Можно ежедневно менять среду культивирования: мелкие нематоды и яйца легко отделяются от крупных при осаждении. Можно использовать *ts*-мутанты, не дающие потомства при повышенной температуре. Существует несложный аппарат проточного культивирования, в котором вытекающая жидкость проходит через фильтры, пропускающие яйца, но задерживающие взрослых нематод [99].

В культуре нематод иногда встречаются особи, в которых развитие потомства происходит внутри тела гермафродита, обычно образуется 10-20 личинок (маточное вылупление). Такие особи не являются мутантами и обычно составляют несколько процентов общего числа. Феномен маточного вылупления приводит к "загрязнению" синхронной популяции потомками. Чтобы избежать этого, предложен метод синхронизации,

Действие физиологически активных веществ на длительность жизни и плодовитость нематоды *C. elegans* [3-4]

Вещество	Концентрация	Длительность воздействия	Увеличение длительности жизни, %	Плодовитость, %
Циклогемид	10 мкг/мл	0-12	17	90
	30 " "	0-12	100	66
5-фтордезоксиридин	10 " "	0-12	20	5
	20 " "	0-12	28	5
Этиловый спирт	1%	0-12	33	90
	1 " "	0-2	18	-
	1 " "	2-12	0	-
	2 " "	1-12	31	-
Ацетон	2 " "	0-12	85	10
	2 " "	0-12	21	-
Эпигид	125 мкг/мл	0-12	0	97
2-этил-6-метил 3-оксипиридин	250 " "	0-12	21	90
	500 " "	0-12	43	86
Голодание	-	1-12	сокращает	-
	-	3-12	50	100

Флюоренасин	5 мкг/мл	0-12	0-12	-
Аминьзин	10 - ' -	0-12	23	-
	0,5 - ' -	0-12	12	-
	1,0 - ' -	0-12	23	-
Трифгазин	0,6 - ' -	0-12	12	-
	1,2 - ' -	0-12	23	-
Метеразин	5 - ' -	0-12	6	-
	10 - ' -	0-12	12	-
Дикаин сульфат	50 - ' -	0-12	0	30
	25 - ' -	0-12	13	83
Эфедрин сульфат	2000 - ' -	0-12	9	30
	1000 - ' -	0-12	20	88
	500 - ' -	0-12	9	100
ЭДА	250 - ' -	0-12	0	79
	125 - ' -	0-12	30	68

в котором помимо фильтрации для отделения яиц и личинок от взрослых особей используется также подвижность нематод для избавления от особей с маточным вылуплением (последние лишены подвижности) [37].

Описано много возрастных изменений у *C.elegans*. После прохождения 4-й линьки рост нематоды останавливается, отмечается увеличение содержания "пигмента старения" — липофусцина [59], снижается подвижность [27]. После 7–8-го дня резко падает частота сокращений глотки [26, 27]. Отмечается накопление материала с высокой электронной плотностью, изменение осмотических свойств.

Нематоды, питающиеся бактериями, умирают вскоре после прекращения кладки яиц, для нематод, живущих в безмикробных средах, длительность жизни больше [27].

Исследовано влияние возраста нематоды *C.elegans* на "качество" потомства [10, 11]. Плодовитость потомков старых нематод снижается по сравнению с плодовитостью потомков молодых нематод в ряду последовательных поколений, но после 4-го поколения эффект исчезает. Потомки старых нематод созревают раньше, но образуют на 15% меньше сперматозоидов, смертность яиц (не вылупляются) у них увеличена на 15%. Возраст нематоды имеет незначительное влияние на продолжительность жизни потомства, эта величина, по-видимому, зависит от сложного взаимодействия генетических факторов и условий культивирования [59]. *C.elegans* является удобным объектом для первичного отбора веществ, увеличивающих продолжительность жизни — геропротекторов. Было испытано действие различных химических веществ с известными свойствами на продолжительность жизни *C.elegans* [3, 4]. В число испытанных соединений входили ингибиторы синтеза белка, ДНК, антиоксиданты, этанол, нейролептики и др. Установлено, что при соответствующем подборе дозы все эти соединения в той или иной степени увеличивают продолжительность жизни T_{50} , однако это не проходит бесследно: увеличение T_{50} сопровождается снижением плодовитости и удлинением фаз L_1 и L_2 , отмечаются и другие отклонения от нормы. Для одних веществ незначительное увеличение T_{50} сопровождается существенным снижением плодовитости, для других, наоборот, существенное увеличение T_{50} сопровождается незначительным снижением плодовитости и небольшими искажениями нормального развития. Все вещества эффективны только при добавлении на ранних стадиях развития (табл. 6). Делается заключение, что увеличение длительности жизни, достигаемое добавлением несложных

химических веществ, является следствием искажения нормального развития, и этот вывод, возможно, справедлив не только для нематоды, но и для других организмов.

Много сведений о старении других нематод, а также об использовании нематод в изучении механизмов старения можно найти в обзоре Цуккермана и Химмельхока [109] и обзоре Ротштейна (ферменты) [88].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как видно из всего сказанного выше, нематода *C.elegans* — интересный и перспективный объект молекулярной биологии, молекулярной генетики и биологии развития, позволяющий в полной мере, почти как для микроорганизмов, использовать возможности генетического анализа. Основные достижения в работах с *C.elegans* касаются проблем регуляции генной активности, механизмов детерминации пола, процесса старения и др. Специфика объекта, до некоторой степени ограничивающая возможность экстраполяции на более высокий уровень организации закономерностей онтогенеза, связана с мозаичным характером развития *C.elegans*, четким детерминизмом судьбы клеток и незначительными межклеточными взаимодействиями. Однако раскрытие механизма "счета времени" при развитии *C.elegans*, вероятно, будет полезным и для анализа процессов развития более высокоорганизованных животных, где взаимодействия клеток играют уже существенную роль. Учитывая высокую скорость нарастания информации о *C.elegans*, можно надеяться, что в ближайшие годы можно будет дать ответы на важнейшие вопросы о механизмах клеточной дифференцировки и причинах появления возрастных изменений, "белые пятна", в картине онтогенеза *C.elegans*, по-видимому, будут быстро исчезать.

ЛИТЕРАТУРА

1. Догель В.А. Зоология беспозвоночных, М., "Высшая школа", 1981.
2. Натали В.Ф. Зоология беспозвоночных, М. "Просвещение", 1975,

3. Нейгауз Б.В., Равин В.К. . "Ж. общ. биол.", 1983, №6, 835-842
4. Равин В.К. Тезисы докладов 4-го Всесоюзного съезда геронтологов, Кишинев, Ин-т геронтологии АМН СССР, 1982, 271 с.
5. Albertson D., Sulston J., White J. "Dev. Biol.", 1978, 63, 165-178
6. Angerer R.C., Davidson E.H., Britten R.J. "Chromosoma", 1976, 56, 213-226
7. Ashburner M., Bonner J.J. "Cell.", 1979, 17, 241-254
8. Babu P. "Mol. Gen. Genet.", 1974, 135, 39-44
9. Behme R., Pasternak J. "Can. J. Genet. Cytol.", 1969, 11, 993-1000
10. Bequet B. "Exp. Gerontol.", 1972, 7, 207-218
11. Bequet B., Brun J. "Exp. Gerontol.", 1972, 7, 195-206
12. Bequet B., Gilbert M.A. "C.R. Hebd. Seances Acad. Sci.", Ser. D, 1978, 286, 989-992
13. Bird A.F. "The Structure of Nematodes", New York, Acad. Press, 1971
14. Brack C., Hirama M., Lenhard-Schuller R., Tonegawa S. "Cell", 1978, 15, 1-14
15. Brenner S. "Genetics", 1974, 77, 71-94
16. Brown D.D., Dawid I.B. "Science", 1968, 160, 272-280
17. Byerly L., Cassada R., Russel R.L. "Rev. Sci. Inst.", 1975, 46, 517-522
18. Byerly L., Cassada R., Russel R.L. "Dev. Biol.", 1976, 51, 23-33
19. Cassada R.C. UCLA winter conference on developmental biology. Eds D.M. McMahon, C.F. Fox. Squaw Valley, 1975, 537-547
20. Cassada R.C., Russel R.L. "Dev. Biol.", 1975, 46, 326-342
21. Cox G.N., Laufer J.S., Kusch M., Edgar R.S. "Genetics", 1980, 95, 317-339
22. Cox G.N., Kusch M., DeNevi K., Edgar R.S. "Dev. Biol.", 1981, 84, 277-285
23. Cox G.N., Kusch M., Edgar R.S. "J. Cell. Biol.", 1981, 90, 7-17
24. Cox G.N., Staprans S., Edgar R.S. "Dev. Biol.", 1981, 86, 456-470
25. Croll N.A. "The behavior of Nematodes", (Publ.) LTD, London, Edward Arnold, 1970.

26. Croll N.A. "J. Zool.", 1975, 176, 159-176.
27. Croll N.A., Smith J., Zuckermann B. "Exp. Ageing. Res.", 1977, 3, 175-199
28. Culotti J., Russel R.L. "Genetics", 1978, 90, 243-256
29. Deppe U., Schirenberg E., Cole T., Krieg C., Schmitt D., Yoder B., Ehrenstein G. "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 1978, 75, 376-380
30. Dusenbery D.B. "J. Exp. Zool.", 1976, 198, 343-352
31. Dusenbery D.B., Sheridan R.E., Russel R.L. "Genetics", 1975, 80, 297-309
32. Emmons S.W., Klass M.R., Hirsh D. "Pros. Natl. Acad. Sci. USA", 1979, 76, 1333-1337
33. Emmons S.W., Rosenzweig B., Hirsh D. "J. Mol. Biol.", 1980, 144, 481-500
34. Epstein H.F., Schachat F.H., Wolf J.A. In: Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies. Eds L.P. Rowland, Excerpta Medica, Amsterdam, 1977, 460-467
35. Epstein H.F., Waterson R.H., Brenner S. "J. Mol. Biol.", 1974, 90, 291-300
36. O'Farrel P.H. "J. Biol. Chem.", 1975, 250, 4007-4021
37. Findeis P.N., Barinaga C.J., Willett J.D., Farwell S.O. "Exp. Gerontol.", 1983, 18, 263-275
38. Fujimoto D., Kanaya S. "Arch. Biochem. Biophys.", 1973, 157, 1-6
39. Gosset L.A., Hecht R.M. "J. Histochem. Cytochem.", 1980, 28, 507-510
40. Gosset L.A., Hecht R.M., Epstein H. "Cell", 1982, 30, 193-204
41. Greewald I.S., Horvitz H.R. "Genetics", 1980, 96, 147-164
42. Harris H.E., Epstein H.F. "Cell", 1977, 10, 709-719
43. Hedgecock E.M., Russel R.L. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1975, 72, 4061-4065
44. Hedgecock E.M., Sulston J.E., Thomson J.N. "Science", 1983, 220, 1277-1279
45. Herman R.K. "Genetics", 1978, 88, 49-65
46. Herman R.K., Albertson D.G., Brenner S. "Genetics", 1976, 83, 91-105
47. Herman R.K., Horvitz H.R. In : Nematodes as Biological Models, New York, London, Acad. Press, 1980, 227-261
48. Herman R.K., Madl J.E., Kari C.K. "Genetics", 1979, 92, 419-435

49. Higgins B.J., Hirsh D. "Mol. Gen. Genet.", 1977, 150, 63-72
50. Hirsh D., Vanderslice R. "Dev. Biol.", 1976, 49, 220-325
51. Hodgkin J., Brenner S. "Genetics", 1977, 86, 275-287
52. Hodgkin J., Horvitz H.R., Brenner S. "Genetics", 1979, 91, 67-94
53. Hodgkin J. "Mol. Gen. Genet.", 1983, 192, 452-458
54. Hodgkin J. "Genetics", 1983, 103, 43-64
55. Horvitz H.R., Brenner S., Hodgkin J., Herman R.K. "Mol. Gen. Genet.", 1979, 175, 129-133.
56. Horvitz H.R., Sulston J.E. "Genetics", 1980, 96, 435-454
57. Johnson C.D. Philosophical Thesis, California Institute of Technology, Pasadena 1977
58. Johnson C., Hirsh D. "Dev. Biol.", 1979, 70, 241-248
59. Klass M. "Mech. Ageing Dev.", 1977, 6, 413-419
60. Klass M., Hirsh D. "Nature", 1976, 260, 523-525
61. Klass M., Hirsh D. "Dev. Biol.", 1981, 84, 299-312
62. Klass M., Wolf N., Hirsh D. "Dev. Biol.", 1976, 52, 1-18
63. Leushner J.R.A., Semple N.E., Pasternack J.P. "Biochim. Biophys. Acta", 1979, 580, 166-174
64. Lewis J.A., Hodgkin J.A. "J. Comp. Neurol.", 1977, 172, 489-510
65. Lewis J.A., Wu C.H., Berg H., Levine J.H. "Genetics", 1980, 95, 905-928
66. Lyon M.F. "Nature", 1961, 190, 372-373
67. Mackenzie J.M., Schachat F., Epstein H.F. "Cell", 1978, 15, 413-419
68. MacLeod A.R., Waterson R.H., Brenner S. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1977, 74, 5336-5340
69. MacLeod A.R., Waterson R.H., Fishpool R.M., Brenner S. "J. Mol. Biol.", 1977, 114, 133-140.
70. Madl J.E., Herman R.K. "Genetics", 1979, 93, 393-402
71. Meneely P.M., Herman R.K. "Genetics", 1979, 92, 99-115
72. Mitchell D., Rosenberg R., Koujian L. Abstracts of Paper presented on the Meeting on C. Elegans, New York, Cold Spring Harbor, 1980, 39
73. Miwa J., Schirenberg E., Miwa S., Ehrenstein G. "Dev. Biol.", 1980, 76, 160-174
74. Nigon V. "Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim.", 1949, 2, 1-132
75. Nigon V. "Bull. Biol. Fr. Belg.", 1951, 85, 187
76. Nigon V. In: Traite de Zoologie. Part 2. Ed. P.P. Grasse, Paris, Masson, 218-386

77. Nigon V. "Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse", 1951, 86, 195
78. Nigon V., Brun J. "Chromosoma", 1955, 7, 129-169
79. Nigon V. "C.R. Hebd. Seances Acad. Sci.", 1949, 228, 1161
80. Quazana R., Herbage D. "Biochim. Biophys. Acta", 1981, 669, 236-243
81. Rama and Siddiqui S.S. "Curr. Sci.", 1976, 45, 291
82. Riddle D.L., Swanson M.M., Albert P.S. "Nature", 1981, 290, 668-671
83. Robertson A.M.G., Thomson J.N. "J. Embriol. Exp. Morphol.", 1982, 67, 89
84. Rose A.M., Baillie D.L. "Can. J. Genet. Cytol.", 1977, 19, 579
85. Rose A.M., Baillie D.L. "Nature", 1979, 281, 599
86. Rose A.M., Baillie D.L. "Genetics", 1979, 92, 409
87. Rosenzweig B., Licia L.W., Hirsh D. "Nucleic Acid Res.", 1983, 11, 4201-4209
88. Rothstein M. In: Nematodes as Biological Models, New York, London, Acad. Press, 1980, 29-45
89. Schachat F., Harris H.E., Epstein H.F. "Cell", 1977, 10, 721-728
90. Schachat F.H., Garcea R.L., Epstein H.F. "Cell.", 1978, 15, 405-411
91. Schachat F., O'Conner D.J., Epstein H.F. "Biochim. Biophys. Acta", 1978, 520, 688-692
92. Svhirenberg E., Miwa J., Ehrenstein G. "Dev. Biol.", 1980, 76, 141-159
93. Snuth T.P., Baillie D.L. "Can. J. Biochem.", "Cell Biol.", 1983, 61, 480-487
94. Sulston J.E. "Philos. Trans. R. Soc. (London)", ser. B, 1976 275, 287-297
95. Sulston J.E., Brenner S. "Genetics", 1974, 77, 95-104
96. Sulston J.E., Dew M., Brenner S. "J. Comp. Neurol.", 1975, 163, 215-226
97. Sulston J.E., Horvitz H.R. "Science", 1977, 56, 110
98. Sulston J.E., White J.B. "Dev. Biol.", 1980, 78, 577-597
99. Tilby M., Moses V. "Exp. Gerontol", 1975, 10, 213-223
100. Tobler H., Smith K.D., Ursprung H. "Dev. Biol.", 1972, 27, 190-203
101. Ward S. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1973, 70, 817
102. Ward S. In: The Organisation of Nematodes, Eds N.A. Croll, New York, London, Acad. Press., 1976, 365-382

103. Waterson R., Brenner S. "Nature", 1978, 275, 715-719
104. Waterson R.H., Fishpool R.M., Brenner S. "J. Mol. Biol.", 1977, 117, 679-697
105. White J., Albertson D., Annes M. "Nature", 1978, 271, 764-766
106. Wood W., Hecht R., Carr S., Vanderslice R., Wolf N., Hirsh D. "Dev. Biol.", 1980, 74, 446-469
107. Zengel J.M., Epstein H.F. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1980, 77, 852-856
108. Zengel J.M., Epstein H.F. In: Nematodes as Biological Models. New York, London, Acad. Press, 1980, 73-102
109. Zuckerman B.M., Himmelhoch S. In: Nematodes as Biological Models, New York, London, 1980, 4-28
110. Riddle D.L., Brenner S. "Genetics", 1978, 89, 299-314
111. Stewart B., Merriam J. Dosage compensation. In: The genetics and biology of drosophila. V. 2. Eds M., Ashburner, T.R.E. Wright. New York, Acad. Press, 1980, 107-140
112. Cine T.W. "Genetics", 1981, 96, 903-926
113. Ehrenstein G. In: Jahrbuch der Max-Planck Gesellschaft zur Forderung der Wissenschaften E.V., Gottigen, Max-Planck Institute, 1973, 38-60

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЦИТОГЕНЕТИКА МОБИЛЬНЫХ
ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВDROSOPHILA MELANOGASTER

Е.В. Ананьев

ВВЕДЕНИЕ

В сороковых годах Барбара Мак-Клинтон [1], занимаясь изучением генетического контроля мозаичной окраски зерновок кукурузы, обнаружила, что это явление связано с регулярными разрывами одной из хромосом в строго определенном месте. Она предположила, что в районе разрыва присутствует особый генетический элемент, названный ею геном-"диссоциатором", который проявляет свое действие только в присутствии другого генетического элемента - гена-"активатора". Согласно приведенным ею данным, эти генетические элементы способны перемещаться из одного места хромосомы в другое, встраиваться в разные гены и вызывать их полную или частичную инактивацию. Это побудило Б.Мак-Клинтон назвать их "контролирующими элементами". Важной особенностью мутаций, индуцированных вставками "контролирующих элементов", являлось то, что они были высоконестабильны в присутствии гена-"активатора". Позже у кукурузы были выявлены другие перемещающиеся элементы, способные влиять на функционирование разных генов. Б. Мак-Клинтон высказала предположение, что геном кукурузы состоит из двух видов генетических элементов - собственно генов, кодирующих образование признаков, и контролирующих элементов, которые модифицируют работу генов. Она полагала, что аналогичные генетические элементы, выполняющие роль супрессоров, модификаторов и мутаторов, должны иметься и в геномах других организмов.

Однако на протяжении долгого времени кукуруза оставалась единственным объектом, на котором явление транспозиции генетических элементов можно было исследовать достаточно эффективно.

В то же время это явление не находило объяснения в терминах молекулярной биологии и поэтому оставалось вне поля зрения молекулярных генетиков.

Только после обнаружения в конце 60-х годов перемещающихся элементов у прокариот с их необычными свойствами, было впервые высказано предположение, что транспозоны прокариот и контролирующие элементы кукурузы представляют собой один класс генетических элементов [2]. Но истинное понимание природы перемещающихся генетических элементов и их фундаментальный вклад в структурную организацию генома эукариот были по-настоящему оценены только после того, как на совершенно другой методической основе в геноме дрозофилы были обнаружены мобильные диспергированные гены.

Выясняется, что мобильные генетические элементы составляют значительную фракцию генома эукариот и дрозофилы, в частности. Они образуют семейства родственных, повторенных и рассеянных по геному, последовательностей ДНК различной степени копийности, причем местоположение их в хромосомах разных особей может сильно варьировать при сохранении нормального взаимного расположения обычных структурных генов.

Несмотря на огромную литературу, которая посвящена мобильным генетическим элементам [3,4,5,118,6], ежегодно обнаруживаются факты, углубляющие понимание разнообразных функций мобильных элементов и открывающие новые возможности их использования, например, в качестве молекулярно-генетических маркеров в генетических исследованиях или в качестве векторов для введения в геном дрозофилы новой генетической информации. Интенсивное исследование свойств мобильных генетических элементов у дрозофилы и других эукариотических организмов показало, что они могут быть ответственны за целый ряд генетических явлений таких, как, например, гибридный дисгенез, гетерозис, мутагенез, нестабильные мутации, канцерогенез, видообразование и горизонтальный перенос генов.

1. ОБНАРУЖЕНИЕ МОБИЛЬНЫХ ДИСПЕРГИРОВАННЫХ ГЕНОВ ДРОЗОФИЛЫ

С целью изучения молекулярной организации активно функционирующих генов дрозофилы в середине 70-х годов были пред-

приняты попытки выделить индивидуальные гены с использованием методов генной инженерии. С этой целью из клеток *Drosophila melanogaster*, культивируемых *in vitro*, была выделена поли А-содержащая меченая РНК. Среди клонов флага λ , несущих фрагменты ДНК генома дрозофилы, были отобраны 2, из них "сориа" [7] и Dm 225 или МДГ-1 [8], которые наиболее эффективно гибридизовались с препаратами поли А-содержащей РНК. Для того, чтобы выяснить хромосомную локализацию фрагмента ДНК Dm 225, была использована методика гибридизации *in situ* с цитологическим препаратом политенных хромосом слюнных желез дрозофилы. Препараты политенных хромосом получали из личинок в результате скрещивания двух линий $gt\ w^a \times gt^{13z}$, в потомстве которых повышена доля гигантов (крупных личинок). Благодаря дополнительным циклам политенизации, политенные хромосомы таких личинок в 2-4 раза крупнее, что увеличивает эффективность выявления сайтов гибридизации.

Было обнаружено, что в каждом ядре над большим числом участков хромосом имеются кластеры метки. Число и местоположение сайтов гибридизации в разных ядрах одной и той же железы было постоянным.

В этом первом опыте также было обнаружено, что места гибридизации ДНК клона Dm 225 в гомологичных хромосомах в подавляющем большинстве случаев не совпадали. Поскольку в этом эксперименте личинки получали в результате скрещивания двух лабораторных линий дрозофилы, различающихся по происхождению, то можно было бы предположить, что исходные родительские линии тоже различаются по набору сайтов локализации Dm 225. Действительно, у особой линии $gt\ w^a$ было обнаружено 23 сайта гибридизации, а у особой линии gt^{13z} - 21 сайт гибридизации. Однако только 6 сайтов в хромосомах этих двух линий оказались общими. Вместе с тем, все места гибридизации, обнаруженные у родителей, представлены у гибридов. В хромосомах родителей можно также наблюдать незначительные различия как в числе, так и в расположении сайтов гибридизации. Однако эти межиндивидуальные различия менее существенны, чем различия между разными линиями. Было высказано предположение, что данная последовательность ДНК обладает необычным свойством, т.е. способна менять свое местоположение в хромосомах [9, 10]. Аналогичный вывод был сделан и в отношении независимо выделенного другими авторами фрагмента ДНК генома дрозофилы, который получил название "сориа" [11]. Обнаружение генети-

Мобильные генетические элементы
Drosophila melanogaster

Элемент	Размер	Концевые повторы	Дуплика-ции	Число ко-пий	Тип РНК	Литература
МДГ-1	7,2	442	4	20	поли А ⁺	[8-10,12]
МДГ-2*	-	-	-	50	поли А ⁺	[15]
МДГ-3	5,0	268	5	10	поли А ⁺	[16-19,48]
МДГ-4**	7,5	479	4	5	поли А ⁺	[12,20,49]
соріа	5,0	276	5	30	поли А ⁺	[7,11,13]
412*	7,0	481	4		поли А ⁺	[11,13,22]
297	6,5	412	4	30	поли А ⁺	[11,13]
В104	8,7	429	5	100	-	[23]
gypsy**	7,3	500	-		-	[24]
H.M.S.Beagle	7,3	266	4	50	-	[25]
17,6	7,0	510	6	40	-	[26]
FB	0,8-10,0	190-1300	8	25	-	[27-30]
P	2,9	31	8	0-30	-	[31,32]
hobo	1,3	12	8	-	-	[33]
F	4,7	нет	13	25	поли А ⁻	[34-37]

E	-	-	-	10	-	[36]
G	3,0	-	-	20	-	[35]
IS1	0,5-5,0	нет	11-14	250	поли А ⁻	[38-40]
IS2	1,4-3,5	нет	нет	-	-	[38,39,41]
Dm 47****	-	-	-	100	-	[12]
pYD6***	-	-	-	30	-	[42]
Dm 614***	-	-	-	40	поли А ⁻	[43]
Dm 89	-	-	-	15	поли А ⁻	[43]
Dm 25	-	-	-	15	-	[44]
Dm 2027	-	-	-	20	-	[14]
Dm 2028	-	-	-	10	-	[14]
Dm 2029****	-	-	-	100	-	[14]
Dm 2954	-	-	-	10	-	[14]
Dm 2066	-	-	-	25	-	[14]
Dm 2068****	-	-	-	40	-	[14]
Dm 2074	-	-	-	10	-	[14]
Dm 2078	-	-	-	50	-	[14]

Примечание. Звездочками помечены мобильные генетические элементы, которые, по-видимому, являются членами одного семейства. Заключение сделано на основе сходства рестриктивных карт или распределения в хромосомах:

* - МДГ-2 и 412, ** - МДГ-4 и "gypsy", *** - pYD6, Dm 614 и Dm 2068, **** - Dm 47 и Dm 2029

ческих элементов, обладающих такими необычными свойствами привлекло к ним внимание большого числа исследователей, и их изучение пошло одновременно по нескольким направлениям, призванным выяснить закономерности распределения мобильных генетических элементов в геноме дрозофилы, принципы их молекулярной организации и функции. Эти генетические элементы в настоящее время принято называть мобильными диспергированными генами (МДГ) [12], транспозонами [13], перемещающимися генетическими элементами [14] или мобильными генетическими элементами. Жестких ограничений на использование этих терминов нет, хотя по мере накопления новых фактов проявляется тенденция использовать нейтральный термин "мобильные генетические элементы", который отражает их главную отличительную особенность – способность к изменению местоположения в геноме.

2. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ

Клонирование последовательностей ДНК генома дрозофилы, с целью изучения тонкой молекулярной организации различных локусов хромосом дрозофилы, привело к обнаружению большого числа разных мобильных генетических элементов (табл. 1). Янг поставил специальный эксперимент для выяснения вопроса о том, какова частота встречаемости мобильных элементов в библиотеке клонов ДНК дрозофилы [14]. С этой целью была определена локализация в хромосомах двух тесторных линий дрозофилы клонированных последовательностей ДНК. Согласно этому тесту, впервые примененному при изучении МДГ-1 [10] из 80 случайно отобранных клонов 17 имели в своем составе повторяющиеся диспергированные последовательности ДНК с нестабильной локализацией. Таким образом, около 20% клонов содержат последовательности ДНК подвижных элементов. Согласно некоторым оценкам, около 10% генома дрозофилы приходится на мобильные генетические элементы [4].

К настоящему времени уже клонировано и охарактеризовано в той или иной степени около 30 независимо выделенных транспозоноподобных элементов (см. табл. 1). По своей структурной организации мобильные элементы могут быть разделены на несколько групп (см. рис. 1) в зависимости от того, какой критерий различия будет выбран при их сравнении.

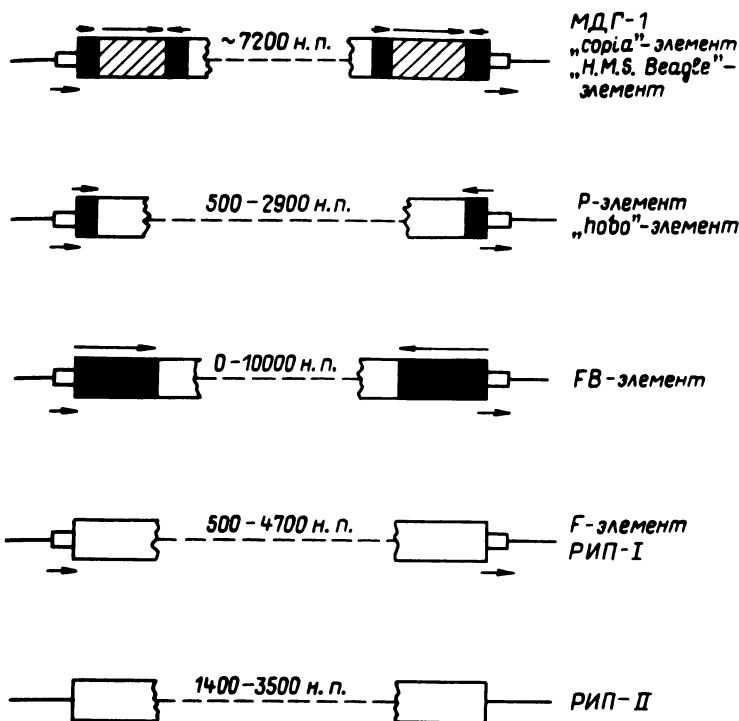


Рис. 1. Схемы строения мобильных генетических элементов:

- ДНК -хромосомы;
- ▭ - дупликация района хромосомы в месте интеграции мобильного элемента;
- ▨ - инвертированные повторяющиеся последовательности ДНК;
- ▩ - прямые длинные концевые повторы;
- ▭ - внутренний район мобильного элемента

2.1. МДГ - подобные мобильные генетические элементы

К первой наиболее представительной и хорошо изученной группе относятся МДГ, выделенные в лаборатории Г.П. Георгиева [8,12,20,45,46], а также ряд мобильных элементов, обозначаемых различными символами "сориа" [8], Dm 412 [11], Dm 297 [11], B104 [23], 17,6 [26], "gypsy" [24], "Н.М.S.Веагле" [25]. Характерной чертой строения мобильных элементов этой группы является наличие прямых длинных

концевых повторов, между которыми заключен фрагмент ДНК размером от 5 до 7 т.п.н.

Сравнение первичных последовательностей ДНК в местах интеграции мобильных генетических элементов в хромосомную ДНК позволило сделать три вывода. Во-первых, наблюдается дубликация небольшого участка хромосомной ДНК порядка 4–5 п.о. в месте встраивания мобильного элемента [12,13,20, 22,23,26]. Во-вторых, нет явной гомологии между концевыми последовательностями ДНК мобильных элементов и сайтами их интеграции в хромосому [13]. В-третьих, встраивание происходит по самым различным последовательностям ДНК [13]. Однако по мере накопления информации создается впечатление, что у некоторых мобильных элементов могут быть предпочтительные сайты интеграции. Например, описано несколько случаев интеграции МДГ-подобных элементов в регуляторные зоны структурных генов в район так называемого "ТАТА-бокса" [25, 33, 47]. Каждое семейство мобильных элементов этой группы состоит из различного числа копий, т.е. от 3 до 100 (см. табл. 1), причем члены одного семейства имеют высокую степень гомологии по последовательности оснований и размеру [12, 13]. Вместе с тем, наблюдаются и некоторые отклонения от этого правила, например, в некоторых семействах можно выявить отдельные копии элементов меньшего размера, чем основная повторяющаяся последовательность. Это, по-видимому, связано с делециями фрагментов ДНК исходного мобильного элемента [49].

Прямое определение последовательностей оснований длинных концевых повторов различных копий одного и того же семейства МДГ-элементов также показало, что в них имеются некоторые микровариации по отдельным парам нуклеотидов. В то же время длинные концевые повторы одной и той же копии мобильного элемента являются совершенными [13.]

У большинства семейств длинные концевые повторы сами фланкированы инвертированными несовершенными короткими повторами, как, например, у МДГ-1 [12] или "coria" [13].

Сходство общей структурной организации мобильных элементов этой группы со структурой ретровирусов [4, 6, 12, 13], интегрированных в "хозяйский" геном, побудило исследователей к прямому сравнению последовательностей оснований длинных концевых повторов и прилежащих к ним участков ретровирусов и МДГ-подобных элементов. В результате была обнаружена заметная гомология по первичной последовательности оснований между длинными концевыми повторами мобиль-

ного элемента дрозифилы, "17,6" и вирусом лейкоза птиц (AL-SV). Степень гомологии оказалась достаточно высока, для того, чтобы идентифицировать важные регуляторные участки, ответственные за инициацию транскрипции, полиаденилирование РНК и обратную транскрипцию [26].

Подобные участки ДНК были также обнаружены в длинных концевых повторах и прилежащих к ним участках у некоторых других мобильных элементов [22, 23]. Эти наблюдения делают весьма вероятным предположение о вирусном происхождении мобильных элементов этой группы [26, 45]. В пользу этого говорят данные о формировании ретровирус-подобных частиц в клетках дрозифилы, содержащие не только РНК размером 5 т.п.н. комплементарную элементу "coria", но и полипептид, иммунологически родственную полипептиду, который может быть синтезирован *in vitro* при трансляции этой РНК [53].

МДГ-подобные мобильные элементы эффективно транскрибируются с образованием РНК, часть которой в полиаденилированной форме обнаруживается в цитоплазме [12, 13, 50]. Транскрипция, по крайней мере копий МДГ-1, осуществляется в двух направлениях, т.е. с обеих комплементарных цепей [51]. РНК этого мобильного элемента, по-видимому, подвергается процессингу с вырезанием центрального участка. Вопрос о трансляции РНК МДГ-подобных элементов *in vivo* остается открытым. В системе синтеза белка *in vitro* удалось получить три полипептида с мол. массой 21 000, 33 000 и 51 000 д при использовании РНК мобильного элемента "coria" [52].

2.2. FB - мобильные элементы

Вторая группа мобильных генетических элементов представлена всего одним семейством, члены которого обладают длинными инвертированными концевыми последовательностями ДНК [27]. Определение первичной нуклеотидной последовательности концевых повторов показало, что они состоят из коротких повторяющихся последовательностей ДНК размером в 10, 20 и 30 н.п., образующих сложный иерархический ряд [30]. В концевых повторах не выявлено последовательностей, соответствующих промоторам эукариотических генов, но обнаружено большое количество "стоп-"кодонов во всех трех рамках считыва-

ния ДНК, что делает маловероятным предположение о возможности кодирования этими последовательностями каких-либо полипептидов. Размер инвертированных концевых повторов может сильно варьировать даже в составе одного элемента [29]. В тех случаях, когда концевые инвертированные последовательности близки по размеру, они обладают заметной гомологией. Однако между ними наблюдаются расхождения как по единичным парам оснований, так и по элементарным повторяющимся блокам последовательностей ДНК [30]. Внутренние участки FВ-элементов, по-видимому, не являются их постоянной частью. В одних случаях последовательности, родственные центральной вставке, обнаруживаются вне элемента и представляют собой другое семейство мобильных элементов [30]. В других случаях внутренний участок соответствует уникальным последовательностям, захваченным FВ-элементом, которые в норме локализованы в определенных районах хромосом [54]. Считают, что крупные транспозоны типа транспозона Изинга [55] приобретают способность перемещаться благодаря FВ-элементам.

Механизм транспозиции FВ-элементов пока остается не ясным, хотя известно, что они могут быть вырезаны из участка хромосомы с высокой точностью [56]. Предполагают, что FВ-элементы перемещаются с помощью транспозазы. Специфическая повторяющаяся структура концевых инвертированных последовательностей ДНК должна, по мнению исследователей, обеспечить более эффективное связывание транспозазы. Поскольку сами инвертированные концевые последовательности не могут, по-видимому, кодировать транспозазу, то полагают, что этот фермент должен быть закодирован в других генетических элементах или захватываться в виде центральной части FВ-элемента [30].

2.3. Р-элемент

Р-элемент был выделен в процессе изучения молекулярной природы факторов гибридного дисгенеза у дрозофилы [57, 58]. У особей из линий дрозофилы, относимых к Р-типу, в геноме имеется от 30 до 50 копий Р-элементов. Полно-размерные копии этого элемента размером около 2,9 т.п.н. высококонсервативны по последовательности оснований, в то время как производные этого элемента, возникшие в результа-

те делеций внутренних областей, гетерогенны по размеру. Р-элемент ограничен инвертированными повторяющимися последовательностями размером в 31 пару оснований. При интеграции в новое место хромосомы индуцируется дупликация размером в 8 п.о. [32]. В отношении именно этого элемента есть наибольшие основания предполагать, что он кодирует собственную транспозазу [59, 60]. Именно поэтому делеции внутренних районов Р-элемента приводят к утрате способности обеспечивать автономную интеграцию в хромосому. Нарушение же концевых инвертированных последовательностей резко подавляет как автономную, так и неавтономную транспозицию Р-элемента. Полагают, что определенная структура этих повторов ответственна за узнавание их транспозазой [61].

2.4. hobo-элемент

hobo-элемент был обнаружен при изучении структуры одного из мутантных аллелей локуса SGS-3, кодирующего образование одного из полипептидов сплюны. Он представляет собой последовательность длиной в 1273 п.о. с совершенными инвертированными повторяющимися концевыми последовательностями ДНК размером в 12 н.п. При интеграции этого элемента в новый сайт индуцируется образование дупликации участка ДНК хромосомы, в который он интегрирует. hobo-элемент образует гетерогенное семейство мобильных элементов, члены которого различаются по крайней мере по размеру [33].

2.5. Вставки в рибосомные гены

У дрозофилы более половины всех генов 28S р-РНК содержат вставки [41, 62], которые получили название рибосомных инсерционных последовательностей (РИП). Различают два типа негомологичных инсерционных последовательностей РИП-I и РИП-II. Первый тип инсерций (РИП-I) [38, 39, 63] встроен в рибосомные гены ядрышкового организатора X-хромосомы, а также встречается в виде тандемных повторов в хромоцентре и в районе 102С четвертой хромосомы. Вставки РИП-I образуют семейство, состоящее из более чем 100 родственных последовательностей ДНК. Основной повторяющийся элемент имеет размер порядка 5 т.п.н. (60% всех

копий) в то время, как оставшаяся часть членов этого семейства представляет собой гетерогенную группу размером от 0,5 до 1,0 т.п.н., соответствующую правой части основного повтора. При интеграции в ген 28S р-РНК эти вставки вызывают дубликацию участка рибосомного гена размером от 7 до 14 п.н. В некоторых случаях не обнаружено дубликации сайта интеграции, а, напротив, наблюдается делеция 9 п.н. Причина полиморфизма вариаций сайта интеграции по размеру в настоящее время неясна, однако считают, что сам факт их образования, тем не менее, подтверждает предположения о том, что эти вставки являются специализированными транспозонами. Необходимо отметить, что не обнаружено каких-либо повторяющихся последовательностей в составе самих вставок первого типа. Ни в центральных областях, ни на флангах, что отличает их от других мобильных элементов, описанных выше.

Примерно 15% всех 28S генов рРНК прерваны вставками второго типа РИП- II [64], которые имеются в ядрышковом организаторе как X-, так и Y- хромосомы. Эти последовательности образуют два основных класса размером в 1,4 и 3,5 т.п.н. В отличие от вставок первого типа, вставки второго типа не образуют дубликации в гене 28S рРНК. Напротив, наблюдаются небольшие делеции и несколько варьирует положение сайта интеграции этих вставок. Строго говоря, это семейство повторяющихся элементов не имеет сходства с другими мобильными элементами ни по одному из признаков, и вопрос о возможности самостоятельной транспозиции этих элементов остается открытым. В этой связи можно отметить, что в нескольких случаях удалось обнаружить вставки в ген 28S рРНК, состоящие одновременно из двух последовательностей ДНК, соответствующих РИП-I и РИП-II [38].

2.6. F-семейство

Вставки первого типа в гены 28S рРНК часто перемежаются другими повторяющимися последовательностями, некоторые из которых были идентифицированы как мобильные генетические элементы, так как они рассеяны по геному и их местоположение нестабильно [36, 40]. Примерно половина из 50 членов этого семейства, которое получило название F-семейства, локализована в хромоцентре, в то время как остальные копии этого семейства рассеяны по эухроматическим райо-

нам хромосом. Они обнаруживаются либо в виде полноразмерных копий, длина которых достигает 5 т.п.н., либо в виде разорванных фрагментов, которые перемежаются другими последовательностями ДНК. Этот мобильный элемент не имеет выраженных повторяющихся последовательностей на флангах, но вызывает дубликацию сайта интеграции размером в 13 п.о. [35, 36, 37]. Поскольку в составе этого элемента обнаружены олиго-(А) –последовательности и сигнал для полиаденилирования, то высказывается предположение, что эти элементы могут перемещаться с помощью механизма обратной транскрипции [37].

2.7. Дубликация сайта интеграции – общее свойство мобильных элементов

Анализ структурной организации представителей различных семейств мобильных генетических элементов позволяет прийти к заключению, что способность к перемещению может быть свойственна последовательностям ДНК с разнообразной внутренней организацией. Вместе с тем, можно произвести разделение мобильных генетических элементов на группы, учитывая, например, всего один какой-либо признак, и попытаться найти свойство, которое объединяло бы мобильные элементы одной группы.

К числу таких признаков следует отнести прежде всего способность всех мобильных генетических элементов вызывать дубликацию участка хромосомной ДНК, в который встраивается мобильный элемент (рис. 1). Это указывает, на то, что они, по-видимому, используют один и тот же принцип интеграции в ДНК-мишень, который заключается в том, что хромосомная ДНК подвергается разрезанию с образованием выступающих концов. Эти концы образуются за счет того, что разрывы в комплементарных цепях ДНК смещены относительно друг друга на несколько пар оснований. После лигирования ДНК мобильного элемента с выступающими концами разрезанной хромосомной ДНК остающиеся бреши застраиваются, по-видимому, ДНК-полимеразой, что и приводит к образованию дубликации этих коротких последовательностей ДНК (см. табл. 1). Единственным исключением является семейство вставок второго типа в ген 28S рРНК. По этой причине этот элемент не относят к мобильным элементам, однако обраба-

ется внимание на то, что он вызывает тот же эффект, что и вставки первого типа и встраивается в тот же ген. По этой причине его рассматривают как дефектный мобильный элемент, высокоспецифичный для гена 28S рРНК [41].

2.8. Инвертированные концевые повторы

Мобильные генетические элементы, принадлежащие к FB-R-, hobo-семействам, имеют на концах инвертированные повторяющиеся последовательности. ДНК различной длины (см. рис. 1). Хочется особенно подчеркнуть то обстоятельство, что и МДГ-подобные мобильные элементы также несут на флангах несовершенные инвертированные короткие повторы, которые могут являться (например, у МДГ-I) составной частью длинных концевых повторов. У членов F-семейства и вставок в рибосомные гены выраженных повторов нет. Следует обратить внимание на то, что эта вторая группа подвижных элементов отличается от первой преимущественной локализацией в определенных районах хромосом, т.е. в ядрышковом организаторе и в хромоцентре. Таким образом, на перемещения мобильных элементов второй группы по геному накладываются, по-видимому, вполне определенные ограничения.

В отношении мобильных элементов первой группы известно, что они широко распределены по всему геному. Напрашивается вывод, что именно наличие инвертированных концевых последовательностей обеспечивает условия для свободного выбора сайтов интеграции этих элементов.

2.9. Прямые длинные концевые повторы

Мобильные генетические элементы можно также разделить на две группы по другому признаку: на элементы, которые обладают длинными концевыми прямыми повторами, и на элементы, которые ими не обладают (см. рис. 1). Для первой группы, т.е. МДГ-подобных мобильных элементов, характерна относительно высокая степень консервативности структуры и последовательностей оснований в ДНК. Представители второй группы образуют семейства, которые состоят из копий дивергировавших последовательностей, ДНК, причем различия связаны как с заменами пар оснований, так и с изменением

размеров мобильных элементов. Естественно предположить, что именно прямые длинные концевые повторы обеспечивают сходство копий каждого отдельного семейства МДГ-подобных мобильных элементов. Механизм поддержания сходной структуры членов этих семейств, как полагают, может быть связан с механизмом амплификации, копий этих элементов с помощью обратной транскрипции [5, 12, 13, 45]. Действительно, в культуре клеток дрозофилы наблюдается резкое увеличение числа копий мобильных элементов этих семейств [12, 13]. При этом важно отметить, что длинные концевые прямые повторы являются интегральной частью мобильных элементов и не обладают способностью к самостоятельной транспозиции. В клетках дрозофилы, культивируемых *in vitro*, найдены кольцевые молекулы МДГ-подобных мобильных элементов. Анализ их структуры [65, 66] показал, что они могли возникнуть как в результате обратной транскрипции, так и в результате вырезания копий мобильных элементов из хромосомы.

3. ПРОИСХОЖДЕНИЕ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ

Получены прямые данные о сходстве строения проретровирусов животных и мобильных генетических элементов дрозофилы, относящихся к подгруппе мобильных диспергированных генов [12, 13]. Более того, обнаружено сходство последовательностей оснований длинных концевых повторов для двух мобильных элементов, а именно Dm 297 и 17,6 и длинных концевых последовательностей вируса саркомы птиц [26]. Этот факт позволил высказать предположение, что некоторые МДГ-подобные мобильные элементы дрозофилы возникли в результате интрогрессии в геном предков современной дрозофилы ретровирусов: родственных вирусу саркомы птиц.

Однако не все виды мобильных генетических элементов имеют сходство с ретровирусами животных. Так, например, от них резко отличаются члены FB-семейства, вставки в рибосомные гены, члены F-семейства. Более того, у других видов организмов, как у прокариот, так и эукариот [2, 6, 67], для которых неизвестно существование ретровирусов, также обнаруживаются мобильные генетические элементы, некоторые из которых имеют черты сходства с ретровирусами, в то время как другие нет. Создается впечатление,

что структура ретровирус-подобных мобильных элементов — это всего лишь частный случай некоторого общего принципа, заложенного в основу организации транспозонов. Поэтому проблеме возникновения мобильных элементов нельзя свести к сходству мобильных элементов с ретровирусами. Более того, происхождение же самих ретровирусов представляет собой нерешенную проблему. Высказывается мнение, что сами ретровирусы возникли как результат сложной эволюции некоторых генов эукариотических организмов [68], которые приобрели весь комплекс свойств ретровирусов. Можно высказать предположение, что явление транспозиции фрагментов ДНК представляет собой первичный и фундаментальный молекулярно-генетический процесс, реализующийся в силу существования ферментов, способных осуществлять разрезание и сшивание молекул ДНК. Многообразие видов мобильных элементов с различной структурной организацией показывает, что эта группа генетических элементов возникла в результате сложной и, возможно, разнонаправленной эволюции как ферментных систем, обеспечивающих транспозицию, так и структуры тех элементов, которые подвергаются транспозиции.

Более широкие исследования глобального масштаба мобильных генетических элементов различных видов организмов, принадлежащих к различным таксономическим группам, позволят, вероятно, выявить источники их образования и пути их миграции.

4. МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ И ПЕРВЫЕ ПОПЫТКИ ОБНАРУЖИТЬ ИХ ТРАНСПОЗИЦИЮ

Начиная с самых первых опытов, практически все авторы отмечали, что местоположение и число сайтов локализации мобильных генетических элементов в политенных хромосомах разных клеток слюнной железы одной и той же личинки одинаково [9, 15, 44]. Политенные хромосомы разных тканей, например, слюнной железы и желудка, одной и той же особи также имеют одинаковый набор мест локализации мобильных генетических элементов [69]. При формировании политенных хромосом, как известно, происходит недорепликация гетерохроматина. Поскольку в прицентромерных гетерохроматических районах хромосом и в Y-хромосоме дрозофилы имеется опре-

определенное количество копий мобильных генетических элементов [49], то диплоидные клетки и клетки с политенными хромосомами отличаются по числу этих генетических элементов, однако эти межтканевые различия по числу копий мобильных элементов возникают не самостоятельно, а как следствие общей редупликации гетерохроматина. Следовательно, на основании этих данных можно с большей долей вероятности утверждать, что в процессе онтогенеза, по крайней мере, местоположение генетических элементов в хромосомах не изменяется.

Высокая степень сходства или полная идентичность особей инбредных линий дрозофилы по распределению сайтов локализации мобильных генетических элементов в политенных хромосомах указывает на то, что транспозиции мобильных элементов происходят сравнительно редко [15, 44]. Более того, был поставлен специальный эксперимент, при котором удалось исключить факторы обычной генетической рекомбинации. С этой целью была выбрана линия дрозофилы, самки которой несут сцепление X-хромосомы, а самцы сцепление X- и Y-хромосом. В результате наследование половых хромосом идет от матери к дочери и от отца к сыну. Важно отметить, что эти сцепленные X-хромосомы были получены более 60 лет тому назад Морганом [70]. Если бы транспозиция мобильных генетических элементов происходила с заметной частотой, то неизбежно среди изученных особей должны были бы быть обнаружены такие, у которых изменено местоположение сайтов гибридизации мобильных элементов в X-хромосоме. Однако у 47 изученных самок этой линии не было обнаружено различий по 6 сайтам локализации МДГ-2 в X-хромосоме. Этот результат дал основание предположить, что межиндивидуальный и межлинейный полиморфизм возникает не как следствие сверхвысокой частоты транспозиции мобильных генетических элементов, а накоплен в ходе эволюции вида дрозофилы. Большой статистический материал, накопленный при анализе нескольких инбредных линий дрозофилы, использовавшихся в течение нескольких лет для определения сайтов локализации разных мобильных генетических элементов, дал основание заключить, что в обычных условиях в нормальных линиях дрозофилы не удается зафиксировать достоверных случаев их транспозиции, которая происходит не чаще чем 1×10^4 на сайт за поколение.

7081

5. МУТАГЕНЕЗ, НЕСТАБИЛЬНЫЕ МУТАЦИИ И ТРАНСПОЗИЦИИ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ

До недавнего времени считалось общепринятым, что основными факторами, влияющими на общий темп мутационного процесса, являются ошибки репликации, репарации и рекомбинации ДНК, а также прямое или косвенное воздействие на ДНК физических или химических факторов. Обнаружение мобильных генетических элементов, которые, по-видимому, имеются у всех видов организмов, и изучение их свойств, позволило выявить новые молекулярные механизмы и генетические системы, вовлеченные в этот процесс [2,6].

Впервые, как уже отмечалось, мобильные элементы были выявлены у кукурузы при изучении явления генетической нестабильности, т.е. случаев, когда мутирование генов или хромосомные аберрации происходят с очень высокой частотой. Б. Мак-Клинток удалось впервые установить причинно-следственную связь между транспозициями мобильных элементов и мутациями [1].

Первоначально благодаря изучению свойств мобильных элементов у прокариотических организмов было показано, что они отвечают за обширный класс так называемых инсерционных мутаций, наиболее характерной особенностью которых является высокая точность вырезания мобильного генетического элемента, что сопровождается восстановлением нормальной работы гена. Вторая особенность этого мутагенеза состоит в том, что мобильные элементы могут вызывать делеции участков хромосомы в своем окружении или захватывать и переносить другие гены, выполняя в этом случае роль вектора [6, 67, 71].

Первые попытки обнаружить транспозицию мобильных элементов в геноме дрозофилы путем анализа их распределения в хромосомах инбредных линий мух оказались безуспешными [15, 44]. По-видимому, в нормальных линиях мух ферментные системы транспозиции мобильных элементов жестко за-репрессированы или вообще отсутствуют.

Именно поэтому исследователи направили свои усилия на анализ молекулярной природы нестабильных мутаций дрозофилы, которые к тому времени уже были описаны. Наибольшего прогресса удалось достичь при исследовании нестабильных мутаций по локусу *white* (белые глаза). Это связано с тем, что этот ген уже был клонирован благодаря соседству с мобильным эле-

ментом "сориа" [72, 73]. Анализ структуры этого локуса в линиях, которые несли нестабильные мутации по нему [73, 58, 74, 54, 75, 76], позволил установить, что во всех случаях непосредственно в ген, либо рядом с ним встроены различные мобильные генетические элементы, принадлежащие к МДГ-подобным или FВ-семействам. В ряде случаев удалось показать, что реверсии к норме сопровождаются точным вырезанием вставки [32, 56]. Действие гена может быть модифицировано благодаря вставкам мобильных элементов в очень широких пределах. Сходное явление обнаружено при изучении нестабильных мутаций по локусу cut (вырезка на крыле) [77]. По-видимому, в некоторых случаях вставки мобильных генетических элементов утрачивают способность вырезаться из хромосомы с высокой частотой, и мутации, вызванные их интеграцией, становятся стабильными. Исследование серии из 13 стабильных, спонтанно возникших мутаций по локусу white позволило установить, что 7 из них являются вставками. Вставки мобильных элементов обнаружены и в большом числе других генов [25, 33, 47], затрагивающих образование морфологических и биохимических признаков.

В природных популяциях дрозофилы удается выделить особей, несущих гены-мутаторы [3]. Гены-мутаторы проявляют свое действие, как правило, при скрещивании с особями определенного генотипа. Описано несколько таких мутаторных систем, которые способны повышать частоту летальных и видимых мутаций, хромосомных aberrаций, вызывают рекомбинацию у самцов дрозофилы, стерильность у самок и нарушают правильную сегрегацию хромосом. Это явление получило название гибридного дисгенеза. Различают, по крайней мере, две системы гибридного дисгенеза Р-М [78] и I-R [79]. Установлено, что в хромосомах особей из Р-линий имеется генетический элемент, получивший название Р-фактора [57, 58]. Описание его структуры дано в одной из предыдущих глав. У особей М-линий этого элемента нет. При скрещивании самца из линии Р с самками из линии М происходит образование потомства с признаками гибридного дисгенеза. Важно отметить, что при гибридном дисгенезе активируется перемещение не только Р-элемента, но и других мобильных генетических элементов, например, "сориа" [58]. Эти элементы удалось выделить, анализируя структуру нестабильных мутаций по локусу white, которые были получены у потомков дисгенных особей.

Анализируя причины, которые могут вызвать транспозицию Р-элемента, Спрадлинг и Рубин [59] пришли к заключению, что этот элемент может кодировать собственную систему транс-позиции, которая обычно зарепрессирована, но активируется при попадании спермия в чужеродную цитоплазму, лишенную репрессора. Они установили, что Р-элемент образует гетерогенное по размеру семейство последовательностей ДНК. Предположив, что только полноразмерные копии этого элемента могут быть функционально активными, они поставили эксперимент по инъекции препарата плазмидной ДНК со вставкой этого элемента непосредственно в яйцо самок М-линии. Для того, чтобы заметить интеграцию Р-элемента в хромосомы, они выбрали такую линию дрозофилы, которая несла мутацию по локусу *ap* (опаленные щетинки), которая возникла в результате интеграции дефектной копии Р-элемента. Обычно при введении в геном таких особей набора хромосом от отца из Р-линии наблюдается исключительно высокая частота реверсии этого мутантного гена к норме за счет вырезания вставки. Сходным образом, среди потомков особей, переживших инъекцию ДНК, были найдены особи с нормальными щетинками [59, 60, 61]. Молекулярный анализ показал, что в геном этих особей произошла интеграция Р-элемента.

Во всех изученных случаях наблюдалась интеграция в геном дрозофилы только копии Р-элемента, а не плазмидной ДНК. Спрадлинг и Рубин предположили, что для интеграции этого элемента важны концевые инвертированные повторяющиеся последовательности ДНК. Они сконструировали *in vitro* плазмиду с дефектной копией Р-элемента, в которой была утрачена центральная часть, и встроили в нее фрагмент ДНК гена *gouy*, кодирующего образование ксантиндегидрогеназы. Инъекция такой плазмиды в яйцо дрозофилы не приводила к ее интеграции в хромосому, поскольку повреждена кодирующая часть Р-элемента. Если, однако, совместно с этой плазмидой инъецировалась плаزمида с полноразмерной копией Р-элемента, то тогда можно было обнаружить интеграцию дефектной копии Р-элемента совместно с геном *gouy* [59, 60, 61, 80]. В дальнейшем эта система была усовершенствована и созданы более удобные векторы, с помощью которых уже удалось ввести в геном дрозофилы ген алкогольдегидрогеназы [81] и ген DOPA-декарбоксилазы [82]. Распределение сайтов интеграции этих генов по хромосомам в целом носило случайный характер. На качественном уровне особых отклонений в работе генов, введенных таким способом в самые разные райо-

ны хромосом, обнаружено не было. Вновь введенные гены стабильно наследовались в ряду поколений дрозофилы. Таким образом, исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе явления генетической нестабильности, привело к неожиданному результату – созданию нового типа векторов, способных интегрироваться в геном эукариотического организма. Это достижение открывает совершенно новые возможности для изучения функциональной организации генов дрозофилы и направленной генетической трансформации.

Таким образом, в тех случаях, когда в геноме дрозофилы появляются генетические элементы, кодирующие образование ферментов транспозиции, частота перемещения мобильных элементов может резко увеличиваться. Остается пока не решенным вопрос: способны ли мобильные элементы спонтанно, без участия специальных ферментных систем, перемещаться в хромосомах.

Описан случай [83, 84] транспозиции мобильных элементов в инбредной линии мух с пониженной сексуальной активностью, при которой, однако, не наблюдается появления стабильных или нестабильных мутаций. В определенных условиях при объединении разных родственных сублиний дрозофилы и их совместном размножении происходит резкое восстановление нормального фенотипа и жизнеспособности. При этом изменяется набор сайтов локализации, по крайней мере, двух изученных семейств мобильных элементов, а именно МДГ-1 и МДГ-3. Ряд технических деталей при проведении этих опытов не позволяет рассматривать этот результат как окончательный, хотя он представляет несомненный интерес для дальнейшего изучения.

6: ВИДООБРАЗОВАНИЕ И МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ

Сравнение различных географически удаленных линий дрозофилы показало, что они могут сильно различаться по расположению мобильных генетических элементов в хромосомах [10, 12, 13, 15, 44], тем не менее число копий мобильных элементов на геном поддерживается на уровне, характерном для каждого семейства [14]. В целом, установлено, что коэффициент корреляции между числом копий в семействах мобильных элементов в разных линиях дрозофилы очень высок и превышает 0.9 (табл. 2). Следовательно, число копий

Таблица 2

Число сайтов гибридизации мобильных генетических элементов
в политемных хромосомах разных линий
D. melanogaster, а также у *D. simulans*, *D. virilis*

Клоны	Линии <i>D. melanogaster</i>				Виды	
	gtw ^a	Ore- gon RC	gt ^{13z}	XY	<i>D. simu- lans</i>	<i>D. viri- lis</i>
mdg-1	16	21	21	22	16	0
mdg-2	33	35	20	38	18	-/-
mdg-3	11	13	8	9	5	-/-
mdg-4	5	3	3	3	4	-/-
Dm 2027	19	24	-	-	1	-/-
Dm 2028	7	10	-	-	4	-/-
Dm 2029	97	78	99	75	41	-/-
Dm 2066	25	20	-	-	5	-/-
Dm 2068	43	-	-	-	-	-/-
Dm 2074	13	12	14	14	1	-/-
Dm 2078	51	41	53	27	8	-/-
coria	28	18	21	17	3	-/-
Сумма сай- тов	348	275	239	205	106	-/-

мобильных элементов — признак достаточно консервативный и, по-видимому, поддерживается на определенном уровне естественным отбором. В противном случае, в силу случайных сочетаний хромосом с различным числом мобильных элементов могли бы встречаться особи, резко отличающиеся по числу копий мобильных элементов от среднего значения. Возможно, этот факт лишний раз подчеркивает, что мобильные генетические элементы представляют собой важный компонент генома дрозофилы.

Первые убедительные доказательства того, что разные виды дрозофилы могут различаться по набору семейств мобил-

ных элементов были получены при попытках найти в геноме *D. virilis* фрагменты ДНК, соответствующие МДГ-1 и МДГ-3 *D. melanogaster*. В геноме *D. virilis* этих элементов не оказалось [85]. С помощью гибридизации *in situ* на поли-тенных хромосомах было также обнаружено, что в геноме отсутствуют еще десять других мобильных элементов. Более детальное исследование этого вопроса было предпринято у ряда видов, близкородственных *D. melanogaster* [86, 87, 88]. Оказалось, что у видов, сохранивших способность к скрещиванию, имеются, по-видимому, одинаковые наборы семейств мобильных генетических элементов. Однако число копий мобильных элементов в семействах может резко меняться. В ряде случаев отмечено, что это изменение носит направленный характер. Например, в геноме *D. simulans* снижено число копий для всех исследованных семейств мобильных элементов по сравнению с геномом *D. melanogaster*. У более отдаленных видов происходит полное исчезновение целых семейств мобильных элементов. Необходимо при этом отметить, что у тех же видов наблюдается высокая степень консервативности, например, сгруппированных повторяющихся последовательностей или уникальных последовательностей ДНК.

Поскольку наблюдаются сильные межвидовые различия по набору семейств мобильных генетических элементов, то многие исследователи высказывают предположение об экзогенном происхождении мобильных элементов [12, 13, 45, 85]. Если допустить возможность горизонтального переноса мобильных генетических элементов от одного вида организмов к другому, то особый интерес представляет анализ геномов организмов, связанных между собой в природе тесными взаимосвязями, по типу "патоген-хозяин", "паразит-хозяин" или анализ геномов симбиотических организмов. К числу такого рода взаимоотношений относят явление интеграции в геном хозяина ретровирусов животных [6] или интеграции части T_i -плазмиды агробактерий в геном растительных клеток [89]. Недавно было показано включение ДНК эукариотического организма в геном ДНК-содержащего вируса. Это явление было обнаружено при длительном пассировании вируса ядерного полиодроза на клетках капустной совки, культивируемых *in vitro*. Были выделены такие штаммы вируса, которые отличались от исходного наличием протяженной вставки, оказавшейся мобильным генетическим элементом генома капустной совки [90].

Межвидовые различия, связанные с изменением набора семейств мобильных генетических элементов или числа копий мо-

бильных элементов, являются наиболее заметными изменениями геномов родственных видов. С другой стороны, установлено, что мобильные элементы при определенных обстоятельствах приобретают способность к частным транспозициям, которые сопровождаются резким повышением темпа мутационного процесса. В этой связи можно указать на сравнительно недавно открытое явление гибридного дисгенеза [78], которое связано с распространением в популяциях "новых" для данного вида семейств мобильных генетических элементов. Внедрение в геном нового семейства мобильных элементов создает условия, при которых у гибридов наблюдается целый комплекс аномалий и резко падает плодовитость. Это создает благоприятные условия, при которых может начаться дифференциация исходного вида или популяции на подвиды.

7. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ В ГЕНОМЕ ДРОЗОФИЛЫ

Вопрос о закономерностях распределения мобильных генетических элементов в геноме дрозофилы представляет большой интерес для понимания свойств самих подвижных элементов и их взаимодействия со стабильно локализованными генами и генетическими элементами.

7.1. Общее число сайтов интеграции в геноме для мобильных генетических элементов

К настоящему времени накоплен достаточно большой материал о распределении разных мобильных генетических элементов как в хромосомах лабораторных линий дрозофилы, так и в хромосомах особей, взятых из популяций, обитающих в природе [12, 13, 92]. Однако точность локализации мест интеграции мобильных генетических элементов в политенных хромосомах в большинстве работ не превышает 1-2 подсекции по карте Бриджеса. Их список мог бы включить в себя около тысячи сайтов интеграции, которые могут быть обнаружены практически в любой из 612 подсекций политенных хромосом дрозофилы, хотя и с разной частотой.

Была предпринята попытка более тонкого анализа распределения мобильных элементов на двух инбредных линиях дрозофи-

лы [92]. Для повышения точности локализации сайтов гибридизации клонированных последовательностей ДНК были использованы политенные хромосомы, растянутые с помощью микроманипулятора, и препараты ДНК, меченные тритием [12, 19, 93]. В каждой инбредной линии дрозофилы при анализе всего 12 семейств мобильных генетических элементов было выявлено примерно по 300 сайтов интеграции.

Поскольку в некоторых дисках одновременно обнаруживается два или более разных мобильных генетических элементов, то общее число сайтов локализации несколько меньше для каждой линии и равняется примерно 200–250 дискам.

Следует отметить, что число копий мобильных генетических элементов, определяемое с помощью гибридизации *in situ*, достаточно хорошо соответствует числу копий, определяемых методами блоттинг-гибридизации или молекулярной гибридизации на фильтрах, хотя в последних случаях, как правило, число копий несколько больше [44, 49]. Это связано с тем, что в политенных хромосомах при политенизации не реплицируется Y-хромосома и прицентромерные гетерохроматические районы, в которых сосредоточены сотни мобильных элементов [94]. В целом распределение мобильных элементов по дискам хромосом оказалось отличным от того, которое должно было бы быть при условии их случайного и независимого распределения, т.е. имеется тенденция, хотя она и несильно выражена, к образованию ассоциаций мобильных элементов. Общее число сайтов локализации мобильных элементов оказалось всего в 1,25 раза меньше того числа, которое следовало бы ожидать при случайном их распределении по дискам хромосом. По данным разных авторов, на долю мобильных генетических элементов приходится около 10% всей ДНК генома дрозофилы [4, 14]. Если принять, что средний размер мобильного генетического элемента равен примерно 5 т.п.н., то тогда в геноме дрозофилы должно быть около 3000 копий подвижных элементов, принадлежащих, возможно, к 50–100 семействам [4, 95]. Если вся совокупность мобильных генетических элементов подчиняется тем же закономерностям распределения по геному дрозофилы, которые выявлены при анализе 12 случайно выбранных семейств, то тогда они должны занимать в геноме около 2500 дисков. Иными словами, мобильные элементы имеются в каждом втором диске, а если рассматривать двойные диски как одиночные, то почти в каждом из них. Таким образом, в одном геноме большая часть дисков может

содержать в своем составе мобильные генетические элементы.

Все исследователи отмечают, что линии дрозофилы сильно различаются прежде всего по расположению мобильных генетических элементов [12, 13]. Сравнение сайтов локализации 12 семейств мобильных элементов показало, что на цитологическом уровне только 10% всех копий мобильных элементов имеют одинаковую локализацию в хромосомах двух инбредных линий дрозофилы. Для остальной части мобильных элементов наблюдается перераспределение по геному. Правда, частично наблюдается как бы обмен одного мобильного элемента на другой. Это видно из того факта, что доля одинаковых дисков в политенных хромосомах, занятых любым из исследованных мобильных элементов, достигает 30%. Следовательно, имеется предпочтительность к перемещению по определенным сайтам для разных мобильных элементов. Аналогичный вывод был сделан при сравнении сайтов локализации мобильных элементов МДГ-1 и МДГ-3 в хромосомах более чем 20 линий дрозофилы [92].

В настоящее время можно с определенностью утверждать, что мобильные элементы могут интегрироваться в различные сайты ДНК, образующей хромомеру. Так при изучении 14 разных вставок в район локуса *white* (белые глаза) было установлено, что они интегрируют в разные сайты как самого локуса *white*, так и в непосредственной близости от него [54, 58, 73, 74, 75, 76]. Необходимо, однако, снова отметить, что для некоторых мобильных элементов наблюдается определенная сайт-специфичность. Так в нескольких независимых случаях Р-элемент встраивался в один и тот же сайт локуса *white* [32] с точностью до нуклеотида. Отмечено также несколько случаев интеграции мобильных элементов, например, Dm 297 и H.M.S.Beagle непосредственно в промоторную зону нескольких генов [25, 33, 47].

Таким образом, анализ распределения мобильных элементов по хромосомам, дискам и на внутрихромосомном уровне указывает на существование огромного числа потенциальных сайтов их интеграции в геноме дрозофилы. Вместе с тем нельзя исключить, что по мере более глубокого изучения этого вопроса на молекулярном уровне будут вскрыты особенности распределения мобильных элементов разных семейств, которые не выявляются при цитологическом анализе. В заключение можно отметить, что мобильные элементы обладают значительной свободой перемещения, а геном дрозофилы проявляет "терпимость" к их транспозициям.

Сравнение сайтов локализации независимо полученных клонов ДНК дрозофилы, которые содержат различные мобильные элементы, в хромосомах инбредной линии мух позволило установить, что некоторые из них, по-видимому, относятся к одним и тем же семействам. Например, два клона Dm 2029 [14] и Dm 49 [12] имели по 97 общих сайтов локализации, а два клона Dm 2028 и Dm 2054 [14] – по 7 общих сайтов локализации. Клоны Dm 2068 и Dm 614 [87], имеющие каждый около 40 сайтов локализации в политенных хромосомах, обнаружили 90% общих сайтов. По-видимому, эти два клона содержат родственные последовательности ДНК, соответствующие одному и тому же семейству мобильных элементов, и какие-то несовпадающие фланкирующие последовательности ДНК.

К сожалению, сравнивать сайты локализации мобильных элементов, приводимые в работах разных авторов, достаточно трудно, так как используются неродственные линии дрозофилы. Тем не менее, в ряде работ используется линия дрозофилы, по-видимому, общего происхождения, а именно линии *gt w^a*. Это позволило прийти к заключению, что мобильные генетические элементы "gypsy" [24] и МДГ-4 [12] также относятся к одному семейству. Значительное совпадение сайтов локализации наблюдается также для клонов *pY 406* [42], *Dm 101 F* [36], *Dm 2068* и *Dm 614* [12].

Считают, что в геноме дрозофилы имеется около 50–100 семейств повторяющихся и рассеянных последовательностей ДНК [4, 14]. Поэтому вполне естественно, что в будущем все чаще будут находиться МГЭ, которые уже выделены другими исследователями. Сравнение сайтов локализации в хромосомах тест-линии дрозофилы, например, *gt w^a* позволило бы резко упростить идентификацию мобильных элементов.

7.2. Взаимное распределение мобильных элементов

Более 30% всех сайтов локализации МГЭ содержат одновременно два и более мобильных генетических элемента. Важно отметить, что общий характер распределения мобильных элементов сохраняется в разных линиях дрозофилы. Сравнение сочетаний разных мобильных элементов в составе отдельных дисков показало, что наблюдаются все возможные сочетания мобильных элементов из всех семейств. Это указывает на вы-

раженную автономность и независимость мобильных элементов по отношению друг к другу. Согласно данным, основанным на анализе крупных клонированных фрагментов ДНК, следует, что можно обнаружить два разных мобильных генетических элемента в непосредственной близости, или, как в случае FВ-элементов, может наблюдаться встраивание одного мобильного элемента в другой [30, 116].

Нельзя ни отметить, что некоторые сочетания мобильных элементов встречаются чаще, чем следовало бы ожидать при абсолютно случайном их распределении в хромосомах. Так, например, сочетание двух мобильных элементов Dm 2029 и Dm 2078 встретилось 14 раз в линии $gt w^a$ и 4 раза в линии Oregon RC, а комбинация из трех мобильных генетических элементов МДГ-2, Dm2029 и "coria" встретилось дважды в линии $gt w^a$ в эухроматических районах 3C1-2 и 67D [11-12]. Эти примеры также указывают на то, что некоторые мобильные элементы, возможно, образуют единый транспозон и могут перемещаться совместно [92].

7.3. Распределение мобильных генетических элементов относительно районов хромосом с различной структурной и функциональной организацией

Авторадиографический анализ распределения мобильных генетических элементов в политенных хромосомах показал, что они локализованы в дисках [19, 92]. В междисках достоверной локализации мобильных элементов не обнаружено. В хромосомах разных линий дрозофилы гомологичные диски сильно различающиеся по числу мобильных элементов, сохраняют вместе с тем свою индивидуальность. Следовательно, интеграция или удаление мобильных элементов не приводит к образованию новых дисков или междисков и не нарушает механизма образования хромомеры как конденсированного участка хромосомы. Необходимо отметить, что вставка мобильного элемента была бы заметна при цитологическом анализе, если бы она сопровождалась образованием междиска.

Мобильные генетические элементы, по-видимому, не нарушают также механизма гомологичной конъюгации хромомер. Действительно, в некоторых случаях разные линии дрозофилы могут различаться по распределению мобильных элементов в сотнях, а возможно, и в тысячах дисков [12, 13]. Однако

раженных нарушений в конъюгации гомологичных хромосом не наблюдается. Способны ли рассеянные копии мобильных генетических элементов одного и того же семейства конъюгировать друг с другом, до конца не ясно. Однако есть основания полагать, что образование эктопических контактов в политенных хромосомах между самыми различными дисками связано именно с мобильными элементами [9, 10, 96].

В политенных хромосомах дрозофилы насчитывают несколько сот дисков, эффективная транскрипция в которых сопровождается образованием пуфов [97, 98]. Распределение мобильных генетических элементов относительно пуфов носит в целом случайный характер, хотя они определенно могут быть обнаружены в составе пуфирующих дисков. Поскольку мобильные генетические элементы, по крайней мере МДГ-подобные элементы, эффективно транскрибируются в клетках дрозофилы, то возникает вопрос, могут ли они самостоятельно формировать пуфы? Хорошо известно, что разные линии дрозофилы весьма сходны по наборам и порядку функционирования пуфов в развитии, хотя они сильно различаются по распределению мобильных генетических элементов в хромосомах. Этот факт дает основание заключить, что мобильные элементы, по-видимому, не способны самостоятельно формировать пуфы. Нельзя исключить, что мобильные элементы сами могут попадать под контроль промоторов генов, образующих пуфы. В некоторых случаях, по-видимому, удалось получить доказательство транскрипции отдельных копий мобильного элемента Dm 47 [12] в составе пуфа. Разные особи, следовательно, могут различаться не только по структуре генома, но и по наборам РНК, синтезируемых с мобильных генетических элементов. Биологическое значение такого соподчиненного принципа транскрипции последовательностей ДНК мобильных элементов может заключаться в модификации уровня экспрессии различных генов. Однако для дрозофилы пока достоверно установлено лишь, что вставки мобильных элементов непосредственно в ген или в его окружение чаще всего приводят к его инактивации, как это обнаружено в нескольких случаях интеграции мобильных элементов в промоторные зоны генов [25, 33, 47], или в ген 28S рРНК [99, 100]. Наряду с этим высказывается и противоположная точка зрения, что мобильные генетические элементы могут изменить характер экспрессии гена за счет собственных промоторов. Разумеется, пуфирующие диски представляют только ту часть генов дрозофилы, которые экспрессируются с высокой эффективностью. Помимо

этого установлено, что транскрипция может происходить еще примерно в 70% всех дисков [93]. Можно предположить, что в этой части транскрипционных единиц удастся найти автономно транскрибирующиеся мобильные генетические элементы.

В политенных хромосомах дрозофилы обнаруживается около 600 автономно реплицирующихся районов [101, 102]. Применение метода радиоавтографии меченых молекул ДНК позволило установить, что в эухроматической части генома диплоидных клеток дрозофилы имеется не менее 1000 репликонов [63], а на ранней эмбриональной стадии число репликонов достигает 10-15 тысяч на геном, за счет активации, по-видимому, дополнительных точек инициации репликации ДНК [104, 105]. Имеют ли мобильные генетические элементы последовательности ДНК, способные обеспечить инициацию репликации в хромосомах дрозофилы, пока не установлено. Скорее можно было бы предположить, что они лишены подобных участков, поскольку разные линии дрозофилы весьма сходны по хронологии репликации ДНК. Однако в последнее время появились сообщения, что "сориа" способен поддерживать собственную репликацию при трансформации клеток дрозофилы, культивируемых *in vitro* [117]. В любом случае, являются они или нет автономно реплицирующимися элементами, вставки мобильных элементов могут увеличивать некоторый естественный уровень асинхронности репликации гомологичных последовательностей ДНК. При средней скорости движения вилки репликации 36 т.п.н. в час [103] вставка одной копии мобильного элемента размером в 6 т.п.н. может вызвать 10-мин расхождение во времени репликации гомологичных генов. Десинхронизация репликации генов может иметь адаптивное значение.

В геноме дрозофилы выделяют прицентромерные и интеркалярные гетерохроматические районы. Прицентромерные гетерохроматические районы, состоят, главным образом, из сателлитных ДНК, которые не реплицируются при политенизации [105, 106]. С помощью гибридизации *in situ* с метафазными хромосомами различных мобильных генетических элементов удалось показать, что, по крайней мере, один элемент, а именно Dm 2078, представлен достаточно большим числом копий в Y-хромосоме и прицентромерных районах всех крупных аутосом [94]. Единичные копии других мобильных элементов, как например, МДГ-1, МДГ-3 и МДГ-4 [49] были выявлены в гетерохроматине с помощью блоттинг-гибридизации. С помощью гибридизации *in situ* с политенными хромосомами установлено, что примерно 11% всех копий мобильных генетических элементов

гов обнаруживаются в хромоцентре или в участках хромосом, которые непосредственно граничат с хромоцентром. Если экстраполировать эти данные на всю совокупность мобильных элементов, то в прицентромерных районах может быть сконцентрировано несколько сот копий разных мобильных элементов. В связи с этим было высказано предположение, что хромоцентр в ядрах с политенными хромосомами образуется за счет множественных эктопических контактов между гомологичными родственными мобильными элементами, сконцентрированными в прицентромерных районах разных хромосом [96]. На вероятностный и нестабильный характер образования этих контактов указывает также тот факт, что в некоторых ядрах отдельные хромосомы не связаны с хромоцентром. Таким образом, часть копий мобильных элементов, по-видимому, находится в составе прицентромерных гетерохроматических районов, которые не реплицируются при политенизации, а другая часть входит в состав пограничных прицентромерных районов хромосом, которые разделяют эухроматин от гетерохроматина. Интеркалярные гетерохроматические районы представляют собой гетерогенную группу участков хромосом, выделяемых различными авторами на основе, главным образом, трех признаков: способности образовывать эктопические контакты друг с другом и с хромоцентром, наличие слабых точек, поздней репликации ДНК [107, 108]. Поскольку точность локализации этих районов невелика, то вопрос о реальной протяженности этих участков в хромосомах пока остается открытым.

Эти признаки неравноценны с точки зрения их значимости. Например, слабые точки имеются примерно в 20 районах хромосом, и они, как правило, выявляются у всех линий дрозофилы [109]. Число поздно реплицирующихся участков значительно больше и включает в себя районы прицентромерного гетерохроматина и слабые точки [108]. Наконец, число участков, способных образовывать эктопические контакты, очень велико и не может быть учтено точно, так как наблюдается сильная межклеточная межиндивидуальная и межлинейная вариация по рисунку эктопических контактов [92, 108]. Районы слабых точек одновременно являются и участками, которые часто образуют мощные эктопические контакты с другими районами. Хотя число районов, образующих эктопические контакты, очень велико, тем не менее в политенных хромосомах выделяют примерно 100 участков, которые образуют наиболее заметные контакты [107, 108]. Таким образом, число участков интеркалярного гетерохроматина, согласно разным оцен-

кам, может варьировать от 50 до 100. Распределение мобильных генетических элементов относительно этих районов носит явно неслучайный характер, т.е. примерно 30% всех сайтов локализации мобильных элементов приходится на районы интеркалярного гетерохроматина [12]. Разные семейства мобильных генетических элементов имеют различное сродство к районам интеркалярного гетерохроматина, например, копии МДГ-1 встречаются в этих районах в 70% случаев [12, 15]. Причина повышенной концентрации мобильных элементов в районах интеркалярного гетерохроматина пока не выяснена.

К числу районов интеркалярного гетерохроматина относятся такие разнородные участки, как районы локализации генов гистонов, рибосомных рРНК, районы локуса *white* и *bithorax* и т.д. [107, 108]. Считают, что в районах интеркалярного гетерохроматина могут быть локализованы гены, отвечающие за количественные признаки – так называемые полигены [107]. Гены гистонов и рРНК могут служить как раз примером таких генов. Вставки мобильных элементов в эти гены, как видно на примере вставок в ген 28S рРНК, сопровождаются их инактивацией. Если и в случае других генных локусов мобильные элементы могут изменять работу генов таким образом, то на их счет можно отнести выполнение функции регулятора числа активных генов.

Причина повышенной концентрации мобильных генетических элементов в районах прицентромерного гетерохроматина может быть связана в равной степени как с тем, что гетерохроматин поглощает и инактивирует "лишние" копии мобильных элементов, так и с тем, что они могут образовывать там особые кластеры, функционирующие только на определенных стадиях развития.

К настоящему времени в политеменных хромосомах с высокой точностью определено около 70 сайтов, в которых локализованы гены транспортных РНК [4, 110], около 100 локусов, кодирующих ферменты и полипептиды [110], определено местоположение около 300 клонированных уникальных последовательностей ДНК [111], соответствующие этим генам или наборам мРНК из определенных органов. Мобильные генетические элементы распределяются относительно указанных генов случайным образом. Однако по мере накопления дополнительной информации о взаимосвязях между разными генами и выделения новых мобильных элементов, возможно определенные закономерности все же будут найдены.

Один из подходов к поиску подобных взаимосвязей был предложен при изучении молекулярной природы супрессируемых мутаций. Супрессор гена *Hw* (*Hairy wings* – волосатые крылья) может восстанавливать работу ряда мутантных генов, в том числе и некоторые аллели гена *bx* (*bithorax* – удвоенная грудь) [24]. При исследовании молекулярной организации локуса *bx* было обнаружено, что все аллели этого гена, супрессируемые геном *su* (*Hw*), имеют вставку размером в 7,3 т.н.п. Эта вставка оказалась мобильным элементом, который был назван "gypsy" – (цыган) (см. табл. 1). Эта вставка была обнаружена в составе 10 разных мутантных локусов, контролирующая самые разные признаки окраски тела, формы щетинок и т.д. Интересно отметить, что сам ген *su* (*Hw*) стабильно локализован в правом плече третьей хромосомы. Молекулярный механизм супрессии инсерционных мутаций пока не известен.

Предполагают, что вставка этого элемента может входить в состав транскрибируемой части гена и подвергаться вырезанию на уровне РНК как интрон. Во всяком случае вырезания вставки из хромосомы в присутствии гена *su* (*Hw*) не происходит. Независимо от того, каков механизм супрессии этих мутаций, это один из ярких примеров взаимодействия мобильных генетических элементов со стабильно локализованными генами.

Сведения о распределении мобильных элементов относительно стабильно локализованных генов нашли неожиданное применение для селективного выделения любого участка ДНК или гена из генома дрозофилы. В общей форме метод был предложен Бингхемом [73] и реализован при клонировании локуса *white*. С этой целью выбирается такой мобильный элемент, копия которого располагается вблизи района хромосомы с нужным геном. Далее на основе ДНК этой линии готовится банк генов. Из общей клонотеки фрагментов ДНК отбираются такие клоны, которые несут в своем составе последовательность ДНК выбранного мобильного элемента и его окружение. Далее проводится определение местоположения клонированных последовательностей на политенных хромосомах. Однако в качестве тест-линии берется такая линия дрозофилы, у которой в районе исследуемого структурного гена нет выбранного мобильного элемента. Если с каким-либо клоном все же удается получить гибридизацию в заданном районе хромосомы, то эта гибридизация могла произойти только за счет последовательностей ДНК, которые окружают мобильный элемент в составе клонированного фрагмента. Далее, используя процедуру

последовательного клонирования частично перекрывающихся последовательностей ДНК, полностью клонируют нужный участок ДНК.

В тех случаях, когда об интеграции определенного мобильного элемента в ген можно судить по появлению мутации, возможно прицельное выделение последовательностей ДНК исследуемого гена.

8. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ГЕНЕТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ В КАЧЕСТВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

Два противоположных свойства мобильных генетических элементов делают их исключительно удобным инструментом для решения генетических задач по определению групп сцепления или картированию генов. Первое свойство заключается в том, что мобильные генетические элементы распределены у разных особей по разным участкам хромосом и, следовательно, создают уникальный рисунок распределения мобильных элементов по хромосомам у каждого индивидуума. С другой стороны, частота транспозиций в нормальных геномах, не содержащих генов-мутаторов, пренебрежимо мала, так что их распределение по хромосомам можно считать жестко фиксированным, по крайней мере, в тех временных и численных масштабах, в которых обычно проходят опыты по генетическому картированию. Число таких маркеров на хромосому может быть достаточно велико, что позволит локализовать исследуемый ген с высокой точностью. Разумеется, особенно успешно этот прием можно было бы применять при генетическом анализе организмов с политенными хромосомами, например, у разных видов двухкрылых насекомых, у некоторых видов растений или простейших. Этот метод может дать определенные преимущества при работе с организмами, слабо изученными генетически. Для *D. melanogaster* этот прием имеет только демонстрационное значение.

У видов, которые не обладают политенными хромосомами, мобильные генетические элементы также можно использовать в качестве молекулярно-генетических маркеров при генетических исследованиях по картированию хромосом. В этом случае определяется полиморфизм длины рестриктных фрагментов геномной ДНК в окружении мобильных элементов с помощью метода блоттинг-гибридизации у родителей и потомков. Затем исследуется сцепление между различными вариантами рестрикт-

ных фрагментов ДНК и изучаемым признаком. Таким образом, мобильные диспергированные гены представляют собой множественные хромосомные маркеры, которые позволяют идентифицировать целые хромосомы, проследить их наследование в ряду поколений с одновременной регистрацией рекомбинационных событий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование мобильных генетических элементов дрозофилы и других эукариотических организмов привело к обнаружению целого ряда удивительных явлений и закономерностей. Однако, по мере накопления новой информации возникают и новые вопросы и проблемы, которые еще предстоит решить. К числу таких проблем относится проблема устойчивости генома дрозофилы к транспозиции мобильных элементов и их совместимости со стабильно локализованными последовательностями ДНК и генами. Действительно, много внимания уделяется вопросу о мутагенном действии мобильных элементов и механизмах их транспозиции, однако достойно удивления то обстоятельство, что геном дрозофилы, содержащий огромное число рассеянных родственных последовательностей ДНК, высокостабилен, хотя теоретически каждый акт рекомбинации между родственными последовательностями мобильных элементов должен был бы приводить к хромосомным aberrациям. Поскольку этого не происходит, то можно высказать предположение, что рекомбинация по последовательностям мобильных элементов строго запрещена.

Остается неясным вопрос о вкладе мобильных элементов и создаваемого ими структурного полиморфизма хромосом в эффективность протекания основных молекулярно-генетических процессов. В большинстве нормальных линий дрозофилы мобильные элементы существуют, никак себя не проявляя. По существу ни для одного мобильного элемента не найдено специфической функции или признака, который был бы жизненно важен для генома дрозофилы. Это отчасти побудило выдвинуть предположение о том, что они являются эгоистичной ДНК [113], основное назначение которой — обеспечить собственную репликацию. По-видимому, это сильно упрощенное представление о значении мобильных элементов для генома дрозофилы. Тот

факт, что мобильные генетические элементы могут эффективно транскрибироваться, отвечать за резкое увеличение темпов мутационного процесса, выступать в роли модификаторов активности генов и иметь отношение к процессу видообразования, противоречит этому предположению. Пока нет прямых данных, но можно предполагать, что сам факт структурного полиморфизма по вставкам мобильных элементов в хромосомы дрозофилы может оказывать модифицирующее действие на эффективность транскрипции стабильно локализованных генов, хронологию репликации и частоту общей и локус-специфической генетической рекомбинации. Эти воздействия могут носить как качественный, так и количественный характер, создавая исключительно высокий уровень полиморфизма генотипов и обеспечивая адаптацию популяций дрозофилы к различным условиям обитания и экологическим нишам.

Участие мобильных элементов в индукции явления гибридного дисгенеза дает основание поставить вопрос о роли мобильных элементов в снижении жизнеспособности особей при инбридинге и увеличении жизнеспособности при гетерозисе.

По-видимому, самая интересная проблема, которая еще далека от окончательного решения, — это проблема происхождения и эволюции мобильных генетических элементов. Возможно, что для создания исчерпывающего представления о происхождении, свойствах и функциях мобильных генетических элементов исследование мобильных генетических элементов только дрозофилы окажется недостаточным, поэтому клонирование и изучение мобильных генетических элементов других организмов представляется в настоящее время актуальной задачей.

Литература

1. McClintock B. "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 1951, 16, 13-47
2. Nevers P., Saedler H. "Nature", 1977, 268, 109-115
3. Green M.M. "Ann. Rev. Genet.", 1980, 14, 109-120
4. Spradling A.C., Rubin G. M. "Ann. Rev. Genet.", 1981, 15, 219-264
5. Ильин Ю.В. "Молек. биол.", 1982, 16, 229-257
6. Хесин Р.Б. Непостоянство генома. М., "Наука", 1984, 472 с.
7. Rubin G.M., Finnegan D.J., Hogness D.S. "Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.", 1976, 19, 221-234

8. Georgiev G.P., Ilyin Y.V., Ryskov A.P., Tchurikov N.A., Yenikolopov G.N., Gvozdev V.A., Ananiev E.V. "Science", 1977, 195, 394-397
9. Ананьев Е.В., Беляева Е.С., Гвоздев В.А., Чуриков Н.А., Ильин Ю.В., Георгиев Г.П. "Генетика", 1979, 15, 785-798
10. Ananiev E.V., Gvozdev V.A., Ilyin Y.V., Tchurikov N.A., Georgiev G.P. "Chromosoma", 1978, 70, 1-17
11. Finnegan D.J., Rubin G.M., Young M.W., Hogness D.S. "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 1978, 42, 1053-1063
12. Tchurikov N.A., Ilyin Y.V., Skryabin K.G., Ananiev E.V., Bayev A.A., Krayev A.S., Zelentzova E.S., Kulguskin V.V., Lyubomirskaya N.V., Georgiev G.P. "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 1981, 45, 655-665
13. Rubin G.M., Brorein W.J., Dunsmuir P., Flavell A.J., Levis R., Strobell E., Toole J.J., Young E. "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 1981, 45, 619-628
14. Young M.W. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1979, 76, 6274-6278
15. Ананьев Е.В., Ильин Ю.В., Чуриков Н.А. "Генетика", 1979, 15, 1360-1369
16. Ильин Ю.В., Хмеляускайте В.Г., Ананьев Е.В., Любомирская Н.В., Кульгускин В.В., Баев А.А. "Генетика", 1981, 17, 199-210
17. Ильин Ю.В., Хмеляускайте В.Г., Кульгускин В.В. "Генетика", 1981, 17, 212-221
18. Ильин Ю.В., Ананьев Е.В., Чуриков Н.А., Гвоздев В.А., Георгиев Г.П. "Докл. АН СССР", 1978, 5, 761-764
19. Ilyin Y.V., Chmeliauskaite V.G., Ananiev E.V., Georgiev G.P. "Chromosoma", 1980, 81, 27-53
20. Джумагалиев Е.Б., Баев А.А., Ильин Ю.В. "Докл. АН СССР", 1983, 273, 214-218
21. Potter S., Brorein W., Dunsmuir P., Rubin G. "Cell", 1979, 17, 415-427
22. Will B.M., Bayev A.A., Finnegan D.J. "J. Mol. Biol.", 1981, 153, 897-915
23. Scherer G., Tschudi C., Perera J., Delins H. "J. Mol. Biol.", 1982, 157, 435-451
24. Modolell J., Bender W., Meselson M. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1983, 80, 1678-1682
25. Snyder M., Kimbrell D., Hunkapiller M., Hill R., Fristrom J., Davidson N. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1982, 79, 7340-7434
26. Kugimiya W., Ikegana H., Saigo K. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1983, 80, 3193-3197

27. Truett M.A., Jones R.S., Potter S.S. "Cell", 1981, 24, 753-762
28. Potter S., Truett M., Phillip H., Maher A. "Cell", 1980, 20, 639-647
29. Potter S.S. "Mol. Gen. Genet.", 1982, 188, 107-110
30. Potter S.S. "Nature", 1982, 297, 201-204
31. Rubin G.M., Spradling A.C. "Nucleic Acids Res.", 1983, 11, 6341-6351
32. O'Hare K., Rubin G.M. "Cell", 1983, 34, 25-35
33. McGinnis W., Shermoen A.W., Beckendorf S.K. "Cell", 1983, 34, 75-84
34. David I.B., Long E.O., DiNocera P.P., Pardue M.L. "Cell", 1981, 25, 399-408
35. DiNocera P.P., Dawid I.B. "Nucleic Acids Res.", 1983, 11, 5475-5482
36. Pardue M.L., Dawid I.B. "Chromosoma", 1981, 83, 29-44
37. DiNocera P.P., Digan M.E., Dawid I.B. "J. Mol. Biol.", 1983, 168, 715-728
38. Dawid I.B., Rebbert M.L. "Nucleic Acids Res.", 1981, 9, 5011-5020
39. Roiha H., Glover D.M. "Nucleic Acids Res.", 1981, 9, 5521-5532
40. Kidd S.J., Glover D.M. "Cell", 1980, 19, 103-119
41. Glover D.M. "Cell", 1981, 26, 297-298
42. Sharp S., DeFranco D., Silberklang M., Hosbach H.A., Schmidt T., Kubli E., Gergen J.P., Wensink P.C., Soll D. "Nucleic Acids Res.", 1981, 9, 925-934
43. Вашакидзе Р.П., Колчинский А.М., Тамарина М.А., Ананьев Е.В., Мирзабеков А.Д. В сб.: "Молекулярные механизмы генетических процессов. М., "Наука", 1983, с. 13
44. Pierce D., Lucchesi J.C. "Chromosoma", 1981, 82, 471-492
45. Георгиев Г.П., Ильин Ю.В., Рысков А.П., Крамеров Д.А. "Генетика", 1981, 17, 222-232
46. Ильин Ю.В., Ананьев Е.В., Чуриков Н.А., Гвоздев В.А., Георгиев Г.П. "Докл. АН СССР", 1978, 5, 761-764
47. Ikenaga H., Saigo K. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1982, 79, 4143-4147
48. Bayev A.A., Krayev A.S., Lyubomirskaya N.V., Ilyin Y.V., Skryabin K.G., Georgiev G.P. "Nucl. Acids Res.", 1980, 8, 3263-3273
49. Bayev A.A., Lubomirskaya N.V., Dzhumagaliev E.B., Ananiev E.V., Amiantova I.I., Ilyin Y.V. "Nucl. Acids Res.", 1984, 12, 3145-3156

50. Falkenthal S., Graham M., Korn E.L., Lengyel J.A. "Dev. Biol.", 1982, 92, 294-305
51. Хмельяускяйте В.Г., Ильин Ю.В. "Генетика", 1980, 16, 1535-1549
52. Falkenthal S., Lengyel J.A. "Biochemistry", 1980, 19, 5842-5880
53. Shiba T., Saigo K. "Nature", 1983, 302, 119-124
54. Levis R., Collins H., Rubin G.M. "Cell", 1982, 30, 551-565
55. Ising G., Block K. "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 1981, 45, 527-544
56. Collins M., Rubin G.M. "Nature", 1983, 303, 259-261
57. Bingham P.M., Kidwell M.G., Rubin G.M. "Cell", 1982, 29, 995-1004
58. Rubin G.M., Kidwell M.G., Bingham P.M. "Cell", 1982, 30, 987-994
59. Spradling A.C., Rubin G.M. "Science", 1982, 218, 341-347
60. Rubin G.M., Spradling A.C. "Science", 1982, 218, 348-353
61. Rubin G.M., Spradling A.C. "Nucleic Acids Res.", 1983, 11, 6341-6351
62. Glover D.M., Hogness D.S. "Cell", 1977, 10, 167-176
63. Dawid I.B., Wellauer P.K. "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 1978, 42, 1185-1194
64. Wellauer P.K., Dawid I.B., Tartof K.D. "Cell", 1978, 14, 269-278
65. Flavell A.J., Ish-Horowicz D. "Nature", 1981, 292, 591-595
66. Flavell A.J., Ish-Horowicz D. "Cell", 1983, 34, 415-419
67. Calos H.P., Miller J.H. "Cell", 1980, 20, 579-595
68. Temin H.M. "Ann. Rev. Genet.", 1974, 8, 155-177
69. Ananiev E.V., Ilyin Y.V. "Chromosoma", 1981, 82, 429-435
70. Lindsley D.L., Greel E.H. Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institute Washington Publication, 1968, 627 p.
71. Kleckner N. "Ann. Rev. Genet.", 1981, 15, 341-404
72. Bingham P.M., Yudd B.H. "Cell", 1981, 25, 705-711
73. Bingham P.M., Levis R., Rubin G.M. "Cell", 1981, 25, 693-704
74. Collins M., Rubin G.M. "Cell", 1982, 30, 71-79
75. Zachar Z., Bingham P.M. "Cell", 1982, 30, 529-541
76. Levis R., Rubin G.M. "Cell", 1982, 30, 543-550
77. Герасимова Т.И. "Генетика", 1982, 18, 454-461
78. Kidwell M.G. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1983, 80, 1655-1659
79. Bregliano J.C., Kidwell M.G. In: Mobile Genetic Elements. Eds J.A. Shapiro, New York, Acad. Press, 1983, 363-410
80. Spradling A.C., Rubin G.M. "Cell", 1983, 34, 47-57

81. Goldberg D.A., Posakony J.W., Maniatis T. "Cell", 1983, 34, 59-73
82. Scholnick S.B., Morgan B.A., Hirsh J. "Cell", 1983, 34, 37-45
83. Беляева Е.Сп., Пасюкова Е.Г., Гвоздев В.А., Ильин Ю.В., Амосова И.С., Кайданов Л.З. "Генетика", 1981, 17, 1566-1588
84. Belayeva E.Sp., Pasykova E.G., Gvozdev V.A., Ilyin Y.V., Kaidanov L.Z. "Mol. Gen. Genet.", 1982, 185, 324-328
85. Evgeniev M.B., Yenikolopov G.M., Peunova N.I., Ilyin Y.V. "Chromosoma", 1982, 85, 375-386
86. Young M.W., Schwartz H.E. "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 1981, 45, 628-640
87. Dowsett A.P., Young M.W. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1982, 79, 4570-4574
88. Dowsett A.P. "Chromosoma", 1983, 88, 104-108
89. Ursic D., Slighton J.L., Kemp J.D. "Molec. Gen. Genet.", 1983, 190, 494-503
90. Miller D.W., Miller L.K. "Nature", 1982, 299, 562-564
91. Montgomery E.A., Langley C.H. "Genetics", 1983, 104, 473-483
92. Ananiev E.V., Barsky V.E., Ilyin Y.V., Ryzik M.V. "Chromosoma", 1984, 91
93. Ananiev E.V., V.E. "Chromosoma", 1978, 65, 359-371
94. Ананьев Е.В., Рыжик М.В. В сб.: Организация и экспрессия тканеспецифических генов, Новосибирск, 1982, с. 4
95. Manning J.E., Schmid C.W., Davidson N. "Cell", 1975, 4, 141-155
96. Ananiev E.V., Barsky V.E., Ilyin Y.V., Tchurikov N.A. "Chromosoma", 1981, 81, 619-628
97. Zhimulev I.F. "Chromosoma", 1974, 46, 59-76
98. Zhimulev I.F., Belyaeva E.S. "Chromosoma", 1975, 49, 219-231
99. Long E.O., Dawid I.B. "Nucleic Acids Res.", 1979, 7, 205-216
100. Long E.O., Rebbert M.L., Dawid I.B. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1981, 78, 1513-1517
101. Howard E.F., Plaut W. "J. Cell Biol.", 1968, 39, 415-429
102. Ananiev E.V., Gvozdev V.A. "Chromosoma", 1975, 49, 233-241
103. Ananiev E.V., Polukarova L.G., Yurov Y.B. "Chromosoma", 1976, 59, 259-272
104. Blumenthal A.B., Kriegstein H.J., Hogness D.S. "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 1974, 38, 205-214
105. Wolstenholme D.R. "Chromosoma", 1973, 43, 1-18
106. Sinkler H.C. "Nature", 1983, 306, 198-200
107. Rudkin G.T., Tartof K.D. "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 1974, 38, 397-403

108. Peacock W.J., Lohe A.R., Gerlach W.L., Dunsmuir P., Dennis E.S., Apples R. "Cold Spring harbor Symp. Quant. Biol.", 1978, 42, 1121-1135
109. Гвоздев В.А. В сб.: Молекулярные основы генетических процессов. М., "Наука", 1981, 389-402
110. Zhimulev I.F., Semeshin V.F., Kulichkov V.A., Belyaeva E.S. "Chromosoma", 1982, 87, 197-228
111. Жимулев И.Ф., Куличков В.А. "Генетика", 1977, 13, 85-94
112. Doane W.W., Treat-Clemons L.G. "Dros. Inform. Serv.", 1983, 58, 41-46
113. Merriam J. "Dros. Inf. Service", 1983, 59, 1-9
114. Goldberg M.L., Paro R., Gehring W.J. "EMBO J.", 1982, 1, 93-99
115. Doolittle W.F., Sapienza C. "Nature", 1980, 284, 601-603
116. Tchurikov N.A., Zelentzova E.S., Georgiev G.P. "Nucleic Acids Res.", 1980, 8, 1243-1258
117. Sinclear J.H., Sang J.H., Burke J.F., Ish-Horowicz D. "Nature", 1983, 306, 198-200
118. Ильин Ю.В. В сб.: Итоги науки и техн. ВИНТИ, Молек. биол., 1982, 18, 5-48

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ДЕЙСТВИЯ
ЭКДИСТЕРОНА НА КЛЕТКИ

А.А. Крамеров, В.А. Гвоздев

ВВЕДЕНИЕ

Линька и окукливание насекомых находятся под контролем стероидных гормонов, главный из которых – экдистерон. Во время линьки экдистерон вместе с ювенильным гормоном контролирует замену старой кутикулы на новую, активируя ферменты, участвующие в метаболизме хитина. Под действием экдистерона образуется куколка и происходит формирование взрослых органов в результате метаморфоза их зачатков – имагинальных дисков.

Многообразие биологических процессов, регулируемых экдистероном, обусловлено различным характером компетентности к нему клеток разных тканей, которые могут по-разному отвечать на действие гормона, в зависимости от стадии развития [1–3].

Исследование молекулярных механизмов действия экдистерона на примере *Drosophila melanogaster*, наиболее изученного генетиками эукариотического организма, имеет определенные преимущества, поскольку удастся проследить влияние гормональных воздействий на отдельные гены. В этом случае открывается также возможность генетического анализа многоступенчатого процесса взаимодействия клеток с гормоном при использовании мутаций, нарушающих отдельные звенья этого процесса.

В работе рассмотрены результаты исследований первичных процессов взаимодействия экдистерона с клетками и их генетическим аппаратом. Кроме того, предметом обсуждения будут служить эффекты гормона на разные классы макромолекул, регуляция синтеза которых может лежать в основе реализации сложной последовательности процессов, составляющих развитие дрозофилы.

Экдистерон (20-оксизекдизон) – основной стероидный гормон, участвующий в регуляции ключевых этапов жизненного

цикла насекомых. Предшественник экдистерона, α -экдизон, обладающий в 100 раз меньшей активностью, синтезируется в проторакальной железе под действием гормона, выделяемого мозгом личинки [1,4]. В ряде личиночных тканей экдистерон образуется в результате гидроксирования α -экдизона в положении С-20 [2, 5] (рис. 1).

Концентрация экдистерона в гемолимфе изменяется в ходе развития дрозифилы от эмбриона до взрослой мухи (рис. 2). Радиоиммунологическим методом выявляется 5 больших пиков концентрации гормона, как правило, предшествующих ключевым моментам жизненного цикла: вылуплению личинки, двум личиночным линькам, формированию куколки и метаморфозу имагинальных дисков [6-8]. Титр экдистерона никогда не падает до нулевого уровня и у взрослых мух, а у самок обнаруживается нарастание концентрации экдистерона, связанное, вероятно, с накоплением гормона и его предшественников в ооцитах [9, 10]. Поскольку проторакальные железы личинки формируются лишь спустя 10 ч после вылупления, происхождение первого пика гормона можно объяснить, вероятно, за счет превращения в клетках эмбриона запасенных в ооците неактивных производных экдистерона в активный гормон [10, 11]. Второй и третий пики гормона предшествуют двум личиночным линькам, в ходе которых происходит разрушение старой и закладка новой кутикулы [12]. Образование куколки наступает одновременно с четвертым пиком экдистерона. Однако и в этом случае удалось обнаружить небольшой пик, выявляемый за 30 ч до начала окукливания и служащий, вероятно, сигналом к переключению на путь развития, ведущий к образованию куколки [13]. Пятый, самый большой пик экдистерона, предшествует формированию кутикулы взрослой мухи [7].

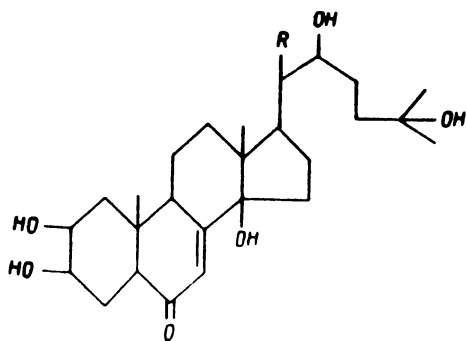


Рис. 1. Структурные формулы экдистерона ($R = OH$) и α -экдизона ($R = H$)

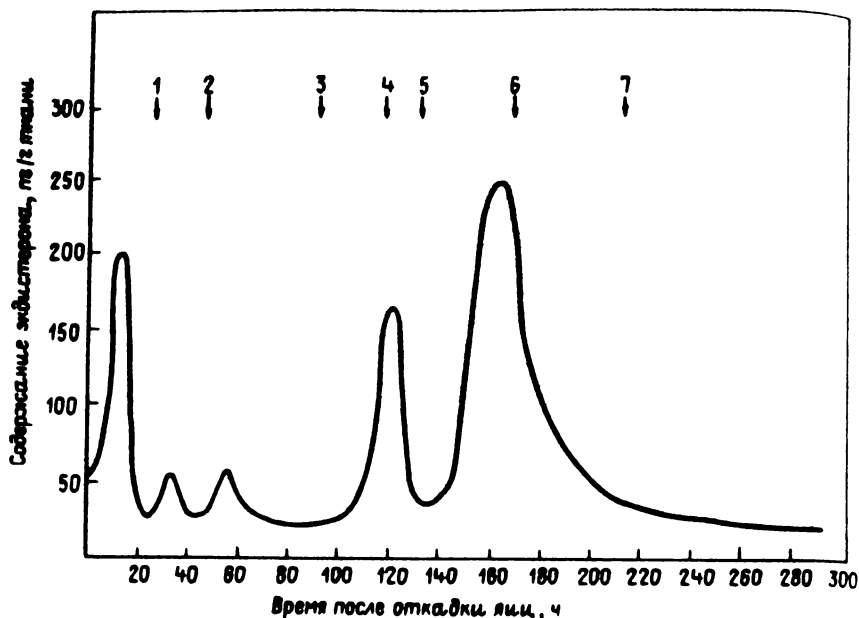


Рис. 2. Профиль изменения титра экдистерона в ходе жизненного цикла дрозофилы [7]. Стрелками обозначены ключевые стадии развития: 1 - вылупление; 2 и 3 - 1-я и 2-я линьки; 4 - формирование куколки; 5 - окукливание; 6 - закладка кутикулы; 7 - вылет взрослой мухи

Повышение концентрации экдистерона может обуславливать синтез специфических белков, что наиболее отчетливо было показано при определении в эпидермальных клетках активности фермента, необходимого для склеротизации кутикулы - диоксифенилаланиндекарбоксилазы (ДОФА-ДК) [14, 15]. Обнаружили 5 пиков ферментной активности, совпадающих с пятью **ключевыми** этапами развития дрозофилы. Сравнение профилей активности фермента и титра экдистерона показывает, что каждому пику ДОФА-ДК предшествует повышение концентрации гормона [15]. .

Взаимодействие экдистерона с другим основным гормоном насекомых - ювенильным гормоном - носит сложный характер, зависящий от стадии развития и ткани-мишени. Как правило, эти гормоны выступают как антагонисты [16-18], но в редких случаях их действие аддитивно [19]. Характер развития личинки определяется соотношением титров двух гормонов. Если в гемолимфе присутствуют оба гормона в высокой концент-

радии, то происходит очередная линька. Если же титр ювенильного гормона мал, то экдистерон вызывает образование куколки и метаморфоз имагинальных дисков [20].

Прежде чем перейти к изложению результатов исследований взаимодействия экдистерона с клетками дрозофилы, кратко рассмотрим современные представления о механизме действия стероидных гормонов.

1. СХЕМА ДЕЙСТВИЯ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА КЛЕТКИ-МИШЕНИ

Многочисленные исследования стероидных гормонов позвоночных показали, что, проникая в клетку, гормон связывается в цитоплазме со специфическим рецептором, после чего комплекс гормона с рецептором переносится в ядро [см. обзоры 21-23]. Накопление связанных с гормоном рецепторов в ядре было продемонстрировано при анализе распределения внутри клеток меченого гормона [24, 25] и рецепторного белка [26] в разные сроки после введения гормона. Используя меченные тритием препараты стероидных гормонов, удалось выделить и охарактеризовать высокоаффинные рецепторы для большинства стероидных гормонов [24, 27-31]. Рецепторные молекулы, способные связывать стероидные гормоны, находили в составе высокомолекулярной фракции белков цитоплазмы. Рецепторы обладают высоким сродством к соответствующим гормонам: константы связывания составляют 10^{-9} - 10^{-10} [25, 27-30]. Обычно молекулы рецепторов представлены одной полипептидной цепью, молекулярная масса которой составляет 80-90 кд [32, 33]. Исключением является рецептор прогестерона, состоящий из двух субъединиц с мол. массой 80 и 120 кд [34]. Обнаружено, что *in vivo* может происходить ассоциация и диссоциация субъединиц рецепторов [35, 36], конформационные изменения их молекул [37, 38], присоединение к ним цитоплазматических белковых факторов [39, 40], химическая модификация (например, фосфорилирование [41, 42]) молекулы и, наконец, их частичный протеолиз [43, 44]. Предполагается, что структурные перестройки молекулы рецептора необходимы для его "активации", обеспечивающей эффективное связывание гормон-рецепторного комплекса с теми генами, регулируя активности которых зависит от присутствия гормона [22]. Показано, что большая роль в функ-

ционировании акцепторных участков, отвечающих за связывание гормон-рецепторных комплексов с хромосомой, принадлежит негистоновым белкам [45] и самой ДНК [46], тогда как участие гистонов в этом процессе незначительно [47].

Очищенные рецепторы были использованы для поиска последовательностей ДНК, специфически взаимодействующих *in vitro* с гормон-рецепторным комплексом. Использование клонированных фрагментов генов, кодирующих лизоцим и овальбумин цыпленка [48, 49], показало, что *in vitro* рецепторы предпочтительно связываются с областью, прилегающей к 5' концу гена. Аналогичные результаты были получены при исследовании связывания глюкокортикоидных рецепторов с фрагментами клонированных генов вируса рака молочной железы мышей [23, 50]. В этом случае было показано, что гормон-рецепторный комплекс преимущественно связывается с ограниченной областью в составе "длинного концевого повтора", расположенного на 5'-конце гена *env*. В последние годы был разработан ряд подходов, основанных на исследовании экспрессии клонированных генов после введения их в клетки, отвечающие на действие гормона. Это позволило получить следующие интересные результаты. Делеционное картирование области 5'-конца генов показало, что в интервале от -70 до -200 нуклеотидных пар от точки инициации транскрипции расположены последовательности, необходимые для транскрипции генов, индуцируемых гормоном [23, 51]. На примере генов овальбумина курицы [51] и вируса рака молочной железы мышей [52] было обнаружено, что эта область совпадает с теми последовательностями, которые наиболее эффективно связываются *in vitro* с белками-рецепторами. Эти результаты позволяют предполагать, что *in vivo* гормон-рецепторный комплекс взаимодействует с районом, расположенным от -100 до -250 нуклеотидных пар от начала транскрипции гена, и непосредственно активирует транскрипцию. В последнее время большая роль при активации транскрипции генов отводится регуляторным последовательностям ДНК, принадлежащим к классу "усилителей" (энхансеров или промоторов) [53], которые могут далеко отстоять от генов, экспрессию которых они регулируют. Можно предполагать, что участки специфического связывания стероидных гормонов представляют собой "усилители", для которых гормон-рецепторный комплекс выступает как регуляторный сигнал. Однако, судя по предварительным данным, активация стероидными гормонами транскрипции генов, вероятно, не связана с использованием регуляторных элемен-

тов типа "усилителей" (Шаффнер, Шамбон). Вместе с тем, в этих исследованиях были получены указания на существование негативного механизма регуляции генной активности в отсутствие гормона. Высказано предположение, что при взаимодействии с гормон-связывающими участками хроматина стероид-рецепторный комплекс оказывает дерепрессирующее действие на транскрипционную активность генов, возможно, за счет вытеснения гипотетического репрессора.

Итак, к настоящему моменту доказана ключевая роль специфических рецепторов стероидных гормонов на ранних этапах гормонального воздействия на клетку. После взаимодействия рецепторов с гормоном, предположительно, происходит их "активация", после чего гормон-рецепторный комплекс переходит в ядро. В значительной степени остается неясным, что представляют собой акцепторные участки хроматина и каков молекулярный механизм активации гормоном экспрессии генов.

Как будет видно из последующего изложения, механизм действия эрдистерона, в целом, также описывается этой общей схемой. Необходимо упомянуть о долго существовавшей, но сейчас имеющей только исторический интерес гипотезе Крегера [54, 55], касающейся механизма действия эрдистерона на клетки насекомых. Предполагалось, что первичный эффект эрдистерона связан с изменением соотношения концентраций K^+ и Na^+ внутри клеток слонных желез, что в свою очередь может приводить к изменению транскрипционной активности генов. Последующие исследования, выполненные как на слонных железах [56], так и на имагинальных дисках [57, 58], не подтвердили эту гипотезу. Так, активность K^+, Na^+ -зависимой АТФ-азы, регулирующей водный баланс, не изменялась при действии гормона на клетки имагинальных дисков [57]. Более того, подавление активности этого фермента убаином, резко изменяющее содержание Na^+ , не влияло на способность гормона вызывать метаморфоз имагинальных дисков [57].

Рассмотрим результаты исследований механизма действия эрдистерона, главным итогом которых явилось обнаружение белковых рецепторов гормона и доказательство активации генов на уровне транскрипции в результате прямого взаимодействия гормон-рецепторного комплекса с хромосомой.

2. МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭКДИСТЕРОНА С КЛЕТКАМИ ДРОЗОФИЛЫ

2.1. Белковые рецепторы экдистерона

Исследование связывания экдистерона с рецепторами долгое время было затруднено из-за низкой удельной активности препаратов ^3H -экдистерона. С появлением высокоочищенного препарата ^3H -понастерона А, экдистероида (структурного аналога гормона), обладающего в 50 раз большей биологической активностью, чем экдистерон, удалось обнаружить и охарактеризовать молекулы, связывающие понастерон А и экдистерон.

Существенной очистки рецепторов из клеток дрозофилы достигнуто не было, а сведения об их биохимических свойствах далеки не полны и носят отрывочный характер. После обработки ^3H -понастероном А пересеваемых клеток или имажинальных дисков *D. melanogaster* метка, судя по результатам гель-фильтрации, обнаруживается в высокомолекулярной фракции клеточного лизата. Молекулярная масса белков (или комплексов белков), способных связывать ^3H -понастерон А, определенный при гель-хроматографии лизата клеток имажинальных дисков, составляла 250–480 кД [59]. Чувствительность этих молекул к проназе и нагреванию позволяет предположить, что они имеют белковую природу [59, 60]. Интересные результаты были получены в опытах, где удалось ковалентно присоединить меченый экдистерон к рецептору после облучения ультрафиолетом культивируемых клеток линии Кс. Был обнаружен единственный ковалентно связанный с гормоном белок с видимой мол. массой 130 кД, определенной при электрофорезе в денатурирующих условиях [61]. Присоединение экдистерона к этому белку является специфическим, так как подавляется избытком немеченых биологически активных экдистероидов. Количество клеточных рецепторов можно определить, исходя из известной удельной активности меченого гормона и предположения об эквимольном характере взаимодействия гормона с рецептором. Такой расчет показал, что на клетку приходится 1000–2000 молекул рецепторов как в имажинальных дисках, так и в пересеваемой культуре [59, 62].

В результате изучения рецепторов гормона из клеток культуры и имажинальных дисков выявлено большое сходство их кинетических характеристик. Рецепторы обладают высоким сродством к ^3H -понастерону А, константа связывания которой

го составляет $3-4 \cdot 10^{-9} M$ [59, 62]. Эта величина близка значению минимальной концентрации экдистероида, вызывающей метаморфоз имагинальных дисков *in vitro* ($5 \cdot 10^{-9} M$) [63] или специфические морфологические изменения пересеваемых клеток в ответ на действие гормона ($7 \cdot 10^{-9} M$) [64]. Специфичность связывающих свойств рецепторов из клеток обоих типов обнаруживается в опытах, где эффективность конкурентного ингибирования связывания 3H -понастерона А в присутствии избытка немеченых α -экдизона, экдистерона и понастерона А падала параллельно уменьшению их биологической активности, установленной по способности индуцировать метаморфоз имагинальных дисков [59, 62].

Несмотря на большое сходство связывающих свойств рецепторов клеток культуры и имагинальных дисков, имеются существенные различия, касающиеся, главным образом, внутриклеточной локализации рецепторов. Остановимся отдельно на результатах, полученных при изучении длительно культивируемых клеток и имагинальных дисков. Было обнаружено, что присоединенный к рецепторному белку меченый гормон выявляется как в цитоплазматической, так и в ядерной фракциях пересеваемых клеток [60, 62], причем связывающая способность ядерных и цитоплазматических рецепторов идентична ($K_{дисс} = 3-4 \cdot 10^{-9} M$). Удалось убедительно показать перемещение белка, "сшитого" с помощью ультрафиолета с меченым гормоном из цитоплазмы в ядро [61]. Можно предположить, что при транслокации в ядро происходит изменение свойств гормон-рецепторного комплекса, если судить по его седиментационным характеристикам: в цитоплазме он обнаруживается в составе 4S, а в ядре - 6S фракции [60]. После добавления 3H -понастерона А к культивируемым клеткам *D. melanogaster* происходит быстрый перенос метки в ядро: уже через 30 мин большая часть меченого гормона имеет ядерную локализацию [62]. Однако при этом в ядрах не наблюдается накопления рецепторов [65]. Можно предположить, что либо происходит эквимолярный обмен рецепторами между двумя клеточными компартментами, либо цитоплазматические рецепторы служат лишь средством транспортировки гормона к ядерной мембране [66].

Неожиданные результаты были получены при изучении внутриклеточной локализации рецепторов понастерона А и экдистерона в имагинальных дисках. При исследовании как целых клеток, так и субклеточных фракций обнаружили, что практически все рецепторы гормонов находятся в ядрах [59, 67]. Было

показано, что эти результаты отражают истинное распределение рецепторов в клетке [67]. Обнаруживалось также незначительное количество цитоплазматических рецепторов (2-4% от общеклеточных) [59]. Но при дальнейшем исследовании оказалось, что цитоплазматическое связывание гормона носит неспецифический характер [67]. Авторы предполагают, что отсутствие рецепторов в цитоплазме клеток имагинальных дисков, составляющее главное отличие рецепторных аппаратов для стероидных гормонов клеток дрозофилы от позвоночных связано с особенностями физиологии насекомых и свойств экдистероидов. Предполагается, что значительно большая растворимость в воде понастерона А и экдистерона, по сравнению с другими стероидными гормонами, делает возможным их транспорт в свободном состоянии через цитоплазму к ядру [59].

С другой стороны, ядерная локализация рецепторов экдистерона в клетках имагинальных дисков, возможно, связана с тем, что они уже подвергались действию высокой концентрации гормона в ходе личиночных линек. Это могло привести к перераспределению рецепторов, сохраняемому в последующих клеточных поколениях [59]. Проверка этого предположения возможна при использовании имагинальных дисков, рост и развитие которых происходили бы на фоне резко сниженного титра экдистерона. Результаты изучения недостаточных по продукции экдистерона температурочувствительных мутантов *ecd¹* [9] и *ts 67* [68] (см. ниже) позволяют рассчитывать на успех при разработке такой системы.

Перейдем к обсуждению данных о регуляции экдистероном экспрессии генов на уровне транскрипции.

2.2. Регуляция экдистероном экспрессии генов на хромосомном уровне

Как уже говорилось, стероидные гормоны активируют транскрипцию генов, с которыми они взаимодействуют в составе гормон-рецепторного комплекса. Изучение влияния экдистерона на транскрипцию генов существенно облегчается при использовании политенных хромосом, поскольку активная транскрипция генов сопровождается, как правило, образованием пuffed-морфологически различимых деконденсированных участков политенных хромосом [69, 70]. Подтверждением того, что пuffed-участки являются местами активной транскрипции, служит обнаружение

в них большого количества метки после инкубации слонных желез с ^3H -уридином [70]. Было обнаружено, что вслед за повышением титра экдистерона в конце третьего личиночного возраста наблюдается последовательная смена пуфов [69], которая может быть воспроизведена *in vitro* при культивировании слонных желез в присутствии гормона [70]. Отметим, что индуцированное экдистероном образование пуфов политенных хромосом до сих пор служит одним из лучших доказательств того, что стероидные гормоны регулируют транскрипционную активность генов.

Влияние экдистерона на формирование пуфов политенных хромосом было тщательно проанализировано при изучении культивируемых *in vitro* слонных желез [71-74]. Все пуфы, на развитие которых экдистерон оказывает регулирующее действие, могут быть разделены на три группы, в зависимости от характера и времени реализации ответа на воздействие гормона [71]. Экдистерон ускоряет регрессию пуфов первой группы, активных в период между линьками (межлиничных пуфов). Через несколько минут после введения в инкубационную среду гормон активизирует транскрипцию ранее неактивных локусов, приводя к формированию второй группы - ранних пуфов, которые достигают максимального развития через 2-3 ч, а затем регрессируют. Через 3 и более часов происходит индукция третьей группы - поздних пуфов. Отметим, что концентрация экдистерона, при которой происходит 50%-ная индукция *in vitro* как ранних, так и поздних пуфов ($1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) близка обнаруживаемому *in vivo* титру гормона перед окукливанием ($3 - 5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$). Однако степень индукции ранних пуфов растет в очень широком диапазоне концентраций гормона ($10^{-9} - 10^{-6} \text{ M}$), тогда как индукция поздних имеет "пороговый" характер - концентрации гормона, вызывающие минимальную и максимальную индукцию отличаются лишь в 3 раза [72]. Было показано, что *in vitro* индукция ранних пуфов (за исключением пуфа 23 E) не зависит от синтеза белка, в то время как их регрессия, а также активация поздних пуфов блокируется при обработке ингибиторами белкового синтеза [73]. Удаление гормона из инкубационной среды после индукции ранних пуфов ускоряет их регрессию и индукцию поздних пуфов [74].

На основании приведенных фактов была предложена схема действия экдистерона на клетки слонных желез, в которой гормон выступает как триггер (пусковой механизм), необходимый лишь на начальных этапах реализации программы дифферен-

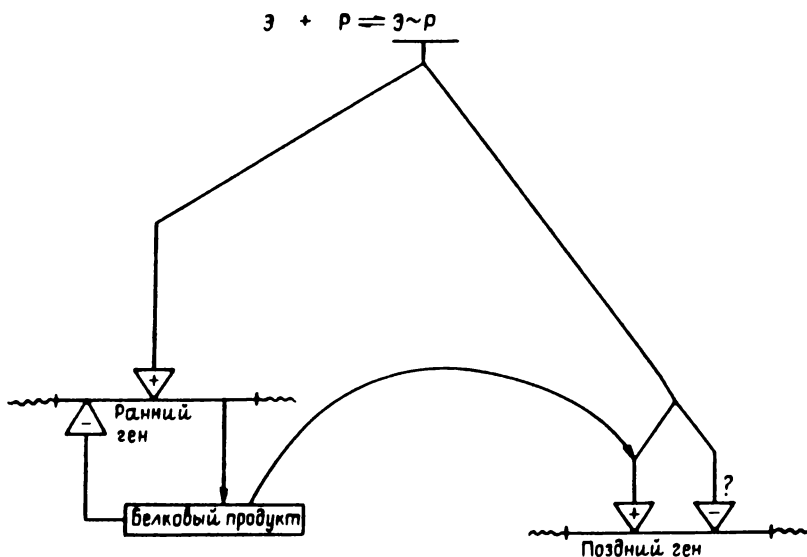


Рис. 3. Схема действия экдистерона с участием его рецептора на транскрипцию генов [75] (с дополнением).
Использованы обозначения: индуцирующее Δ и ингибирующее ∇ действие экдистерона (Э) в комплексе с рецептором (Р)

циальной активности генов при переходе от личиночной стадии развития к куколке (рис. 3). Предполагается, что после проникновения в ядро гормон-рецепторный комплекс связывается с регуляторными участками как ранних генов, активируя их транскрипцию, так и поздних, подавляя ее. Белковые продукты, кодируемые генами ранних пуфов, оказывают двойное действие: подавляют активность ранних пуфов и активируют поздние. Таким образом, считается, что как регрессия ранних, так и активация поздних пуфов определяются конкуренцией между гормон-рецепторным комплексом и продуктами ранних пуфов [75]. Надо отметить, что эта схема не может объяснить полученные в последнее время данные о закономерностях связывания экдистерона с поздними пуфами [76], которые подробнее будут рассмотрены ниже. Оказалось, что гормон-рецепторный комплекс участвует в активации поздних пуфов, тогда как их репрессия вызывается другими факторами. В соответствии с этими результатами в предлагаемой в настоящем обзоре схеме (см. рис. 3) ставится под вопрос постулированная ранее возможность прямого ингибирующего действия экдистерона на развитие поздних пуфов.

Для проверки предположения о важной роли продуктов ранних пуфов в регуляции их собственной активности и при развитии поздних пуфов были использованы генетические подходы, основанные на анализе мутаций и хромосомных перестроек, нарушающих нормальную последовательность формирования экдистероновых пуфов. Один из подходов был основан на использовании анеуплоидных по району ранних пуфов 74E^F-75B линий дрозофилы [77]. Оказалось, что дупликация этого района приводит как к сокращению периода активности самых ранних пуфов, так и к ускоренному и более мощному развитию ряда поздних пуфов. Напротив, нехватка по этой области приводит к более длительному периоду активности ранних пуфов и замедленному развитию тех же нескольких поздних пуфов.

Наиболее интересные результаты были получены при анализе мутаций генов ранних пуфов в районе 2B4-2B8 [78]. Мутации, принадлежащие к группе комплементации o.c.s., которая расположена в районе диска 2B5, приводят к нарушению самых первых этапов гормональной индукции пуфинга. В хромосомах личинок, гомозиготных по этим мутациям, отсутствуют как ранние (кроме 2B5), так и поздние пуфы, а регрессия межличинечных пуфов замедлена. Эти результаты указывают на ключевую роль продукта пуфа 2B5 на начальных этапах взаимодействия клетки с гормоном. Анализ второй группы мутаций *aw1*, расположенной в локусе 2B6-2B7 выявил нарушение развития большинства поздних пуфов при нормальной индукции и регрессии ранних пуфов [78]. Эти факты свидетельствуют о том, что для регрессии ранних и индукции поздних пуфов необходимы разные продукты и что развитие пуфов обоих типов подчиняется более сложным закономерностям, чем те, которые суммированы в приведенной схеме (см. рис. 3).

Таким образом, продемонстрировано существование генов-триггеров, действие которых лежит в основе каскада генных взаимодействий, обуславливающих многоступенчатость ответа клеток на действие экдистерона.

Исследование пуфинга показывает, что точкой приложения действия гормона служат отдельные гены. Представляет интерес выявить присутствие гормона в непосредственной связи с генами, экспрессия которых находится под контролем экдистерона.

После облучения ультрафиолетом слюнных желез гормон удается "пришить" к белкам, и его локализация может быть определена методом непрямой иммунофлуоресценции с использованием антител, специфически взаимодействующих с экдис-

тероном. Показано, что экдистерон обнаруживается, главным образом, в пуфах, активность которых находится под его контролем [79]. Более того, обнаружена четкая корреляция между последовательностью развития пуфов и связывания с ними гормона [76]. Через несколько минут после введения экдистерона обнаруживается в составе ранних (например, 63F, 74EF, 75B) и межлинейных (68C и 3C и др.) пуфов, причем транскрипционная активность первых индуцируется, а вторых — подавляется. Таким образом, связывание гормона (вероятно, в составе гормон-рецепторного комплекса) с регулируемым геном может приводить не только к активации, но и к репрессии генов.

Интересные данные были получены при анализе связывания гормона с поздними пуфами. В соответствии с предложенной схемой [75] экдистерон оказывает непосредственное ингибирующее действие на развитие поздних пуфов, которое снимается при возрастании количества продуктов ранних генов, выступающих в качестве активаторов поздних пуфов. Результаты иммунофлуоресцентного окрашивания политенных хромосом, однако, показывают, что подавление активности поздних пуфов на ранних стадиях после введения гормона не связано с заметным содержанием в них экдистерона [76]. Напротив, наблюдается накопление гормона в поздних пуфах лишь после их индукции. Этот результат можно сопоставить с предварительными данными, полученными группами Шаффнера и Шамбона при изучении генов позвоночных. В этих работах были получены данные о том, что гормон-рецепторный комплекс может вытеснить ранее ассоциированные с регуляторным участком гена молекулы, репрессирующие его транскрипционную активность. В таком случае стероидный гормон выступает, скорее, в роли дерепрессора, чем активатора. Индукция экдистероном поздних пуфов может быть основана на сходном механизме, требующем участия продуктов ранних пуфов, лишь во взаимодействии с которыми экдистерон способен дерепрессировать поздние гены. Возможно и другое объяснение результатов, полученных при изучении связывания гормона с поздними пуфами. Оно основано на данных, указывающих на существование различных механизмов, регулирующих образование пуфов и собственно транскрипционную активность локализованных в них генов при взаимодействии с ними экдистерона [80, 81]. Так, было обнаружено, что развитие пуфов, отвечающих за синтез секреторных белков слонных желез, у мутантов *ts 67*, дефицитных по продукции экдистерона [68], не нарушено, тогда как соответ-

ствующих транскриптов обнаружить не удается [82]. Можно предположить, что деконденсация хроматина в локусах, соответствующих поздним генам (развитие поздних пуфов), находится под контролем не экдистерона, а продуктов ранних генов, тогда как транскрипция генов поздних пуфов активируется экдистероном, присоединение которого необходимо в продолжение всего периода активности регулируемых им генов поздних пуфов. Так или иначе, при рассмотрении схемы (см. рис.3) следует учитывать, что взаимодействие экдистерона с поздними пуфами не является во всех случаях примером негативной регуляции и может приводить в отдельных случаях к их активации.

Наличие политенных хромосом в разных тканях дрозофилы позволяет рассматривать вопрос о тканеспецифичности действия экдистерона. Тканеспецифический характер воздействия гормона на транскрипцию генов подтверждается различиями картин индуцированного экдистероном пуфинга политенных хромосом клеток жирового тела [83, 85], слюнных [71] и проторакальных желез [84]. Менее строгим доказательством тканеспецифичного действия экдистерона могут служить результаты, полученные при сравнении наборов полипептидов и пуфов, индуцированных гормоном в клетках жирового тела и слюнных желез [86]. Обнаружена корреляция между набором полипептидов, индуцируемых экдистероном на разных стадиях пуфинга, и последовательной сменой пуфов при культивировании *in vitro* как жировых тел, так и слюнных желез. При этом оказалось, что из 36 полипептидов, синтез которых резко усиливается под действием гормона в обеих тканях, общим для них является лишь 1 полипептид [86]. Можно обнаружить большие различия наборов мРНК, индуцируемых в разных тканях под действием экдистерона, используя в качестве критерия картины гибридизации *in situ* с политенными хромосомами препаратов меченых мРНК (или их кДНК), выделенных из слюнных желез и имагинальных дисков [87, 88], жирового тела [89] и клеток линии Кс [90]. В то же время, имеется некоторое сходство в характере изменения транскрипции генов, вызываемого гормоном в разных клетках. Так, пуф 74ЕF активируется в слюнных [71] и проторакальных [84] железах, жировом теле [85], а в клетках линии Кс под влиянием экдистерона накапливается транскрипт, гибридизующийся *in situ* в пуфоне 74F [91]. Поскольку участок политенной хромосомы, выявляемый при гибридизации *in situ* или анализе распределения пуфов, содержит кластер генов, нельзя утверждать,

что экистерон активирует один и тот же ген в разных тканях [92].

Приведенные данные о регуляции экистероном транскрипции генов, полученные при анализе индуцированного гормоном пупинга, весьма убедительны. Однако такой способ изучения регуляции экспрессии генов имеет естественные ограничения. В последнее время интенсивно изучается активация гормоном отдельных генов, часто вне связи с пупами, с использованием клонированных фрагментов генома.

2.3. Регуляция экистероном экспрессии индивидуальных генов на уровне транскрипции

В последние годы перечень клонированных генов *D.melanogaster* значительно расширился. Заметную часть в этом списке составляют гены, активность которых изменяется в ходе регулируемого экистероном развития [93-100]. Наличие клонированных генов позволяет проводить целый комплекс исследований, включающих сопоставление структурной организации генов с особенностями их экспрессии, регулируемой гормоном. Рассмотрим некоторые примеры такого рода работ, проведенных как на отдельных личиночных тканях, так и на культуре клеток, успешно используемой в качестве модели для изучения молекулярных событий, вызываемых экистероном *in vivo*.

Одной из наиболее изученных в биологическом и генетическом отношении систем тканеспецифических генов является комплекс генов, кодирующих сывороточные белки, продуцируемые клетками жирового тела личинки [101-104]. В настоящее время гены главных сывороточных белков клонированы [94], а их структура подробно изучается [100, 105]. Наличие клонированных генов этих белков позволило изучить закономерности экспрессии соответствующих генов в ходе личиночного развития [100]. Используя культивируемые *in vitro* жировые тела, удалось продемонстрировать экистерон-зависимый характер экспрессии некоторых из этих генов [106]. Наиболее интересные результаты были получены при изучении активности генов главных сывороточных белков у температурочувствительных мутантов *esd¹*, развитие личинок которых нарушено при переносе на 29°C вследствие падения титра экистерона [9]. Оказалось, что у мутантных личинок при этой температуре блокирована экспрессия генов всех главных сывороточных белков

[107]. Введение гормона в корм личинок, находящихся при непериодической температуре, приводило к восстановлению уровня активности этих генов [107, 108]. Было также обнаружено, что при введении экзогенного гормона последовательность индукции синтеза мРНК, тестируемого с помощью клонированных генов этих белков, в целом, повторяла "график" экспрессии соответствующих генов в нормальном развитии [99, 109]. Показано, что вскоре после введения гормона количество транскриптов одного из генов (гена P1) увеличивается в 50 раз [109]. Независимость индукции транскрипции этого гена от циклогексимида указывает на непосредственное активирующее действие экдистерона на экспрессию гена P1 [109].

К разряду первичных ответов на повышение титра экдистерона можно отнести индукцию синтеза трех полипептидов, обозначенных EIP28, EIP29 и EIP40, в пересеваемых эмбриональных клетках линии Kc [109]. Под действием гормона уже через 30 мин обнаруживается синтез специфических транскриптов и самих этих белков, резко нарастающий через несколько часов [110, 111].

Из библиотеки ДНК дрозофилы были выделены клоны, содержащие последовательности ДНК, кодирующие все три типа EIP-белков [110]. Локализация клонированных последовательностей при гибридизации *in situ* на политенных хромосомах показала, что клоны находятся в составе регулируемых экдистероном пуфов 55BD и 71CD [91].

Координированная экспрессия этих генов, индуцируемая гормоном *in vitro* может служить моделью для изучения закономерностей экспрессии семейств множественных генов, широко распространенных в геноме дрозофилы [93, 97-99]. К их числу относятся гены, кодирующие вителлогенины - белки, образующие желточные гранулы яиц и активно синтезируемые в жировых телах и яичниках самок при их созревании [95, 111]. В гемолимфе и созревающих ооцитах удается обнаружить 3 типа вителлогенинов с близкими значениями молекулярных масс, интенсивность синтеза которых примерно одинакова [112]. Локализация генетическими методами генов всех трех типов вителлогенинов в X-хромосоме показала, что их экспрессия не только ограничена полом, но и сцеплена с ним [95, 113]. При исследовании клонированных генов вителлогенинов обнаружили, что каждый из них является уникальным геном, причем два из них сцеплены очень тесно и локализуются в районе 8F-9A, а третий - в 12BC [95]. Как сами гены, так и их белковые продукты имеют значительное струк-

турное сходство, причем наибольшее родство проявляют два тесно сцепленных гена, 80% последовательности которых гомологичны [114].

Экспрессия этого семейства генов регулируется экдистероном, роль которого как регулятора активности генов распространяется и на стадию имаго в жизненном цикле дрозофилы. Участие гормона в регуляции экспрессии вителлогениновых генов было выявлено в опытах с мухами, брюшной отдел которых был изолирован от гормон-продуцирующих тканей [19, 115], а также при культивировании *in vitro* отдельных органов [106]. Оказалось, что, как и другой регулятор вителлогенеза — ювенильный гормон, экдистерон стимулирует синтез и секрецию вителлогенинов в гемолимфу самок [106, 115], причем действие обоих гормонов аддитивно [111]. Различие в характере действия гормонов, состоит, в том, что экдистерон активен лишь в отношении жировой ткани, тогда как ювенильный гормон стимулирует продукцию вителлогенинов также и в яичниках [18, 116]. Более того, только экдистерон способен активировать синтез вителлогенинов в жировой ткани самцов [117], в норме их не продуцирующих. Используя клонированные гены, удалось показать, что усиление в десятки раз синтеза вителлогенинов, которое происходит при созревании самки, является результатом увеличения количества транскриптов генов вителлогенинов в клетках жировой ткани, достигающего $42 \cdot 10^6$ копий на самку [118]. Добавление экдистерона к культивируемым жировым телам самцов приводит уже через 8 ч к появлению заметного ($2,7 \cdot 10^6$ копий на самца) числа транскриптов генов вителлогенинов, что может быть следствием прямого активирующего действия гормона на транскрипцию этих генов [115]. Неясен механизм дифференциальной в половом отношении экспрессии генов вителлогенинов *in vivo*, поскольку у мух обоих полов находят примерно одинаковый уровень как экдистерона, так и ювенильного гормона [117, 7]. Возможно, причина состоит в меньшей чувствительности самцов к действию экдистерона (10 мкМ), чем самок (0,1 мкМ) [19, 106]. Это в свою очередь может быть связано с характеристиками самих клеток-мишеней, такими как количество рецепторов гормона [119] или структура хроматина вблизи регулируемого гена [120, 121]. Детальное изучение клонированных генов вителлогенинов позволит выявить общие черты их структурной организации, в частности, общие регуляторные последовательности ДНК, которые, возможно, обеспечивают координированную экспрессию всех трех генов *in vivo*.

Исследование активации генов, вызываемой экдистероном, представляет особый интерес, если имеется возможность одновременно изучить образование пухов, экспрессию генов и синтез соответствующих белков. Примером этого служит исследование действия экдистерона на экспрессию генов, кодирующих секреторные белки слюнных желез (*sgs*-белки), которые входят в состав "клея", необходимого для прикрепления куколки к субстрату. Главные из этих белков, *sgs*-3 и *sgs*-4, подробно изучены в биохимическом отношении [122-124], определена локализация их генов на политенных хромосомах в районах 3С и 68С [123, 125] и эти гены клонированы [96, 126]. Синтез *sgs*-белков начинается в первой половине третьего личиночного возраста и завершается на стадии поздней личинки того же возраста, что сопровождается активацией и регрессией соответствующих пухов [122, 123]. Сигналом к началу синтеза этих белков служит, вероятно, небольшое повышение титра гормона, которое обнаруживается как раз незадолго до начала продукции мРНК *sgs*-белков [13]. Предполагают, что этот пик ответственен за переключение с личиночного на куколочный путь развития [127], начало которого отмечено синтезом *sgs*-белков.

Интересные результаты, указывающие на возможную роль экдистерона как активатора экспрессии генов *sgs*-белков, были получены при использовании мутанта *ts* 67, у личинки которого при 30°C резко ослаблена продукция экдистерона [68]. Оказалось, что синтез белков *sgs*-3 и *sgs*-4 может быть блокирован путем переноса на непермиссивную температуру, но восстанавливается после добавления в корм экзогенного экдистерона [68, 127]. Используя клонированные гены этих белков в качестве проб, показали, что введение гормона мутантной личинке при 30°C приводит к накоплению мРНК, соответствующих *sgs*-белкам [82].

Многочисленные исследования гормональной регуляции продукции *sgs*-белков при переходе от стадии личинки к куколке показали, что при повышении титра гормона перед окукливанием происходит остановка синтеза этих белков и регрессия пухов, отвечающих за их синтез [123, 129, 130, 71]. Так, в конце третьего личиночного возраста одновременно с прекращением синтеза белков *sgs*-3 и *sgs*-4 наблюдается регрессия межличинечных пухов 3С и 68С [123]. При локализации экдистерона *in situ* на политенных хромосомах оказалось, что гормон обнаруживается в этих пухах в течение всего периода их регрессии [76]. Этот результат может указывать на то, что в

основе вызываемой гормоном инактивации генов *sgs*-белков, лежит непосредственное взаимодействие этих генов с эрдистероном.

Различный характер ответа клеток слюнных желез на действие гормона на разных стадиях развития, возможно, является следствием вызываемой эрдистероном дифференцировки этих клеток, приводящей к изменению реакции на гормональный стимул. Эта реакция может определяться как доступностью регуляторных последовательностей ДНК, так и участием специфических для каждой стадии развития белков-регуляторов, способных взаимодействовать с ДНК или с гормон-рецепторным комплексом.

Клонирование генов *sgs*-белков позволило приступить к изучению роли специфических последовательностей ДНК в гормональной регуляции активности генов [26, 126]. Интересные результаты такого рода получены к настоящему времени лишь при изучении гена *Sgs-4*. Обнаружено, что область, необходимой для нормальной экспрессии этого гена, является район от -300 до -500 нуклеотидов от точки инициации транскрипции [131]. Этот результат был получен при исследовании ряда линий, различающихся по продукции белка *sgs-4*. Определение последовательности ДНК в случае мутаций показало, что существенное снижение экспрессии гена *Sgs-4* может быть вызвано заменой 1 нуклеотида в позиции -344 от начала транскрибируемой части гена *Sgs-4* [132]. Увеличение числа замен и появление нехваток в этой области полностью нарушает экспрессию гена *Sgs-4* [132]. Интересно, что делетируемая область длиной в 95 нуклеотидов от -487 до -392) содержит АТ-богатый фрагмент из 18 нуклеотидов, который имеет высокую степень гомологии с 18-членной последовательностью, расположенной в 5'-фланкирующей области овальбуминового гена курицы и способной связываться с А-субъединицей рецептора прогестерона [49].

Специфические последовательности ДНК, которые могут быть вовлечены в регуляцию активности генов эрдистероном, выявлены также на примере других клонированных генов.

Используя технику микродиссекции района ранних эрдистероновых пуфов 74E-75B политенных хромосом, выделили ряд клонов, гибридизирующих с транскриптами, характерными для стадии наибольшего развития пуфов 74E-75B [133]. Определение первичной структуры ДНК клона, гибридизирующегося с районом 74F, показало наличие обращенного повтора из 14 нуклеотидов (от -256 до -280). Этот повтор интересен тем, что

близок по структуре последовательности, которая окружает точковую мутацию в позиции -344 от 5'-конца гена *Sgs-4*, резко подавляющую его экспрессию [132].

Остается неясной функциональная роль выявленных участков 5'-фланкирующей области регулируемых генов. Можно предполагать, что эти районы представляют собой гормон-зависимые "усилители" (энхансеры), при взаимодействии с которыми экдистерон высупает непосредственно в роли активатора. С другой стороны, возможно, что в 5'-фланкирующей области расположены места связывания как гормон-рецепторного комплекса, так и молекул гипотетического репрессора, подавляющего транскрипцию генов. В этом случае вытеснение репрессоров при конкурентном связывании гормон-рецепторного комплекса с регуляторным участком может приводит к активации транскрипции гена. Предстоит изучить также вопрос о том, связано ли наблюдаемое на разных этапах развития изменение характера регулирующего влияния гормон-рецепторного комплекса на один и тот же ген с участием разных, специфичных для каждой стадии, регуляторных последовательностей или с присутствием белков, модулирующих действие гормона.

3. РЕГУЛЯЦИЯ ЭКДИСТЕРОНОМ МОРФОГЕНЕЗА И КЛЕТОЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Результаты анализа пуфирования и влияния на него мутаций показали многоступенчатость процесса воздействия экдистерона на гены дрозофилы. Гормон выступает в роли пускового механизма серии межгенных взаимодействий, которые приводят к вторичным эффектам экдистерона, лежащим в основе дифференцировки клеток дрозофилы.

Идеальным объектом для изучения влияния экдистерона на клеточную дифференцировку являются имагинальные диски личинки - зачатки органов взрослого насекомого. Под влиянием гормона имагинальные диски претерпевают метаморфоз, в ходе которого образуются части тела и органы имаго. Первый этап метаморфоза - эвагинация имагинальных дисков - представляет собой сложный морфогенетический процесс, сопровождающийся перемещением клеток, разрывом старых и установлением новых межклеточных контактов [133, 134]. В процессе метаморфоза осуществляется дифференцировка клеток с последующим образованием дефинитивных кутикулярных структур [135]. Та-

ким образом, на примере имагинальных дисков можно исследовать не только активацию отдельных генов, ведущую к синтезу специфических белков, но и сложную систему генных взаимодействий, обеспечивающих, в конечном итоге, морфогенетические изменения и терминальную дифференцировку клеток.

Перспективным подходом для решения этих задач служит изучение ряда недавно полученных мутаций, нарушающих отдельные этапы метаморфоза имагинальных дисков [136-138]. Предпринимаемые в последнее время попытки клонировать гены из района 2B5, где локализуется часть этих мутаций, возможно, позволят вплотную подойти к изучению генов, отвечающих за морфогенез у насекомых. Однако надо сразу отметить, что исследование закономерностей морфогенеза на примере имагинальных дисков еще только начинаются. Представления в этой области очень ограничены.

Попытаемся описать сложную последовательность взаимосвязанных событий, развивающихся в имагинальных дисках после действия экдистерона. Перед эвагинацией имагинальных дисков клеточные деления замедляются, а затем прекращаются [139]. В конце третьего личиночного возраста происходит "синхронизация" клеток имагинальных дисков и накопление тетраплоидных клеток, находящихся в G_2 -фазе клеточного цикла [140]. Активно делящиеся в течение личиночного периода клетки имагинальных дисков при линьках дважды подвергаются действию высокой концентрации гормона, что, однако, не влияет на их пролиферативную активность. Повышение (в несколько раз по сравнению с периодом линьки) титра экдистерона перед формированием куколки совпадает по времени с остановкой деления клеток и роста имагинальных дисков. В случае мутации *ecd¹*, приводящей к нарушению образования экдистерона [9], число клеток и размеры имагинальных дисков мутантных личинок, задержанных в развитии и соответствующих по возрасту предкуколке, почти вдвое больше нормы [141].

Ингибирование клеточных делений связано с подавлением экдистероном синтеза ДНК. В течение первых часов после обработки гормоном включение 3H -тимидина *in vitro* в клетки имагинальных дисков [142] и в меньшей степени в клетки линии Kc [143] усиливается. Судя по чувствительности включения к оксимочевине, оно связано с усилением, скорее, инициации, чем элонгации в процессе синтеза ДНК [142]. Наблюдаемое временное усиление включения 3H -тимидина, вероятно, можно объяснить ускорением синтеза ДНК в клетках, завер-

шающих последний раунд клеточного деления и переходящих из S - в G_2 -период клеточного цикла. Последующая обработка гормоном приводит (через 18–48 ч) к двукратному подавлению включения тимидина [144], что сопровождается снижением активности ДНК-полимеразы α и тимидинкиназы, необходимых для синтеза ДНК.

Считается, судя по способности к активной пролиферации [145] и сходным наборам изозимов [146, 147], что культивируемые эмбриональные клетки близки по своему происхождению к клеткам-предшественникам имагинальных дисков. Наряду с результатами изучения действия гормона на имагинальные диски, рассмотрим данные, полученные при исследовании пересеваемых клеток.

Было показано, что экдистерон вызывает остановку деления пересеваемых клеток большинства изученных линий [148–150]. Вызываемый гормоном блок клеточной пролиферации в линии K_c происходит в G_2 -фазе клеточного цикла [151], как и в случае клеток имагинальных дисков [140]. Остановка деления — это специфичная реакция клеток линии K_c на действие экдистерона, так как она осуществляется, по-видимому, при участии рецепторов гормона [151, 152]. На пятый день инкубации с экдистероном клетки вновь начинают делиться, но количество рецепторов гормона у них снижено втрое, и они уже не способны отвечать на действие экдистерона остановкой деления [151]. Клетки сохраняют это состояние в течение 3–5 мес, после чего они вновь приобретают чувствительность к гормону, причем количество рецепторов восстанавливается до 80% от исходного уровня [152]. Можно предполагать, что потеря рецепторов гормона и чувствительности к нему клеток линии K_c , а также восстановление этих свойств при последующем культивировании отражают происходящие *in vivo* при развитии личинки изменения компетентности имагинальных дисков к экдистерону.

Рассмотрим другие общие эффекты, вызываемые *in vitro* гормоном в клетках имагинальных дисков. В первые часы после действия экдистерона на культивируемые имагинальные диски усиливается синтез компонентов аппарата трансляции (рРНК и рибосомных белков) и образование клеточного белка [153, 154]. Синхронность усиления синтеза рРНК и рибосомных белков, вероятно, лежит в основе увеличения числа рибосомных частиц, что может приводить к усилению белкового синтеза [153]. Вызываемое гормоном ускорение синтеза белка обусловлено также увеличением скорости инициации трансля-

ции [155]. Под действием эрдистерона усиливается синтез ряда белков, диссоциирующих из комплекса с рибосомами в присутствии 0,5M KCl и представляющих собой, вероятно, факторы инициации трансляции [154]. Было обнаружено, что в состав полисом клеток имагинальных дисков, обработанных эрдистероном, входят, главным образом, вновь образующиеся рибосомы [153]. Это может указывать на то, что новые рибосомные частицы более активны, чем рибосомы из контрольных дисков при трансляции матриц, индуцируемых эрдистероном. Синтез новых рибосом может сильнее сказываться на уровне общего белкового синтеза, чем активация предсуществующих [154].

Через 2-4 ч после введения гормона включение 3^{11} -уридина увеличивается вдвое, причем РНК, синтезируемая в присутствии гормона, на 90% представлена рРНК [156]. Удаление эрдистерона из среды ведет к быстрому снижению скорости синтеза РНК, который возвращается к контрольному уровню через 3-4 часа. При изучении синтеза и созревания рРНК выявили следующие основные эффекты эрдистерона [156], носящие, по-видимому, вторичный характер. Через 1 ч после введения гормона наблюдается заметное увеличение абсолютного содержания рРНК. В присутствии эрдистерона активность РНК-полимеразы I увеличивается в 1,5 раза [157]. Этот эффект, вероятно, является результатом инактивации под действием эрдистерона белковых факторов, репрессирующих синтез РНК. Действительно, ингибиторы белкового синтеза также увеличивают активность РНК-полимеразы I в имагинальных дисках независимо от присутствия гормона [154]. Обнаружено также увеличение скорости созревания 38S рРНК, приводящего к образованию 18S и 28S рРНК [156].

Большой интерес представляет выявление эффектов эрдистерона на синтез индивидуальных полипептидов при анализе тотального клеточного белка в культивируемых *in vitro* имагинальных дисках. Как правило, удавалось обнаружить, что под действием гормона происходит изменение скорости синтеза нескольких полипептидов [154, 158]. В большинстве случаев эффект гормона состоял, скорее, в усилении, чем в индукции синтеза фракций, природа и биологическая роль которых оставались неизвестными. Сравнение наборов полипептидов, синтезируемых ножными, крыловыми и глаз-антеннальными дисками в присутствии эрдистерона показало, что разные диски, находящиеся на одной и той же стадии метаморфоза, в большей степени сходны между собой, чем диски одного вида в разные сроки после введения гормона [159].

Используя для анализа обще клеточного белка метод двумерного электрофореза, обладающий высокой разрешающей способностью, удается выявить 300 и более фракций. Обнаружилось, что в ходе эвагинации имагинальных дисков, вызываемой экдистероном *in vitro*, изменяется интенсивность включения меченых аминокислот в состав 8-12 полипептидных фракций [160, 161]. Сходные результаты получены в работах с разными линиями пересеваемых клеток [162-165]. В ряде случаев была выявлена природа фракций, индуцируемых гормоном. Так, было показано, что экдистерон стимулирует синтез белков теплового шока (БТШ-22-, 23-, 26-, 27) как в линии S-3 [166], так и при эвагинации имагинальных дисков [167, 168]. В связи с тем, что в настоящее время БТШ и их гены тщательно изучены (см. обзор Е.Р. Лозовской, М.Б. Евгеньева "Тепловой шок у дрозофилы и регуляция активности генома"), представляется перспективным дальнейшее исследование действия экдистерона на их экспрессию для углубления наших представлений о механизме воздействия гормона на клетки дрозофилы.

Известно, что во многих случаях морфогенетические процессы сопровождаются преобразованием структуры цитоскелета, которое может быть результатом изменения скорости синтеза его компонентов или характера сборки микротрубочек и микрофиламентов [169]. Обнаруженное подавление эвагинации имагинальных дисков под действием цитохалазина В [133] указывает на возможную роль вызываемой гормоном перестройки микрофиламентов клеток имагинальных дисков при их эвагинации. Интересные результаты были получены при исследовании пересеваемых клеток. Индукция синтеза актина (главного компонента микрофиламентов) была продемонстрирована на клетках линии Kc [170, 171], причем эффект гормона носит характер первичного ответа, так как накопление специфических транскриптов выявляется уже в первые 30 мин после введения гормона. Изучая те же клетки, показали вызываемое экдистероном увеличение степени полимеризации тубулина при формировании микротрубочек, тогда как уровень его синтеза оставался неизменным [172].

В процессе эвагинации имагинальных дисков происходит перегруппировка клеток и изменение клеточных взаимодействий [173, 174]. Предполагается, что эти процессы во многом обусловлены изменением свойств клеточной поверхности. Под действием экдистерона изменяется интенсивность включения ³⁵S-метионина в состав большой фракции белков плазматичес-

ких мембран клеток имагинальных дисков [175]. Было показано, что гормон вызывает резкие изменения (как усиление, так и ослабление) включения метки в состав 15 из 75 выявляемых мембранных полипептидов, тогда как доля белков цитоплазмы, синтез которых изменяется под влиянием экдистерона, составляет лишь 7 из 600 обнаруживаемых меченых белков [160]. Эффекты гормона на синтез мембранных белков развиваются в течение небольшого интервала времени, соответствующего начальным этапам эвагинации имагинальных дисков [175]. Эти данные указывают, возможно, на ведущую роль клеточной поверхности в инициируемом гормоном морфогенезе имагинальных дисков.

Сходные результаты, свидетельствующие о влиянии экдистерона на свойства клеточной поверхности, получены при исследовании ряда линий пересеваемых клеток [150]. В обработанных гормоном пересеваемых клетках часто удается обнаружить изменения ряда свойств поверхности клеток: усиление агрегации клеток [176], изменение способности клеток прикрепляться к субстрату [162] и другие. При исследовании свойств мембран клеток линии Кс, обработанных гормоном, было показано, что увеличение способности клеток агглютинировать в присутствии кон А, коррелирует по времени с моментами приобретения клетками морфологических изменений [177]. Однако при исследовании сублинии клеток Кс(Кс-Н) был описан противоположный эффект - снижение агглютинации клеток в присутствии кон А [178]. Аналогичный результат был получен ранее при изучении клеток линии 67 j 25D [179].

При исследовании наборов меченных Na^{125}J полипептидов, расположенных на поверхности пересеваемых клеток, было показано, что под действием экдистерона изменяется относительная интенсивность мечения 27 из 175 (линия Кс-Н) [178] и 34 из 150 (линия Schneider L2D) выявляемых мембранных полипептидов [180]. В клетках последней линии обнаружена сложная последовательность вызываемых экдистероном изменений состава полипептидов клеточной поверхности, сопровождающих изменения морфологии клеток и их способности агрегировать [180]. Почти все мембранные полипептиды, скорость синтеза и/или степень экспонированности которых на клеточной поверхности изменяется под действием экдистерона, являются гликопротеидами, что показано по способности связываться с лектинами [180]. Это согласуется с общими представлениями о роли гликопротеидов в определении свойств поверхности клеток

[181]. При анализе наборов гликопротеидов пересеваемых клеток, длительно меченных ^3H -глюкозамином, обнаружили, что экдистерон вызывает большие изменения спектра гликопротеидов клеток ряда линий [182]. Для каждой из независимо полученных линий при добавлении гормона наблюдаются характерные изменения набора новосинтезированных гликопротеидов.

Вслед за эвагинацией имагинальных дисков на поздних этапах развития куколки происходит терминальная дифференцировка клеток и формирование кутикулы [135, 183]. При морфологическом и биохимическом исследовании культивируемых *in vitro* имагинальных дисков был обнаружен координированный синтез основных компонентов кутикулы — хитина и белков кутикулы, начинающийся через 11 ч после введения гормона [184]. Оказалось, что для образования кутикулы необходимо присутствие экдистерона в высокой концентрации лишь в первые 3–5 ч, после чего гормон начинает оказывать ингибирующее действие, существенно ослабляющее и задерживающее формирование кутикулы. Условия обработки имагинальных дисков *in vitro* экдистероном, оптимальные для синтеза компонентов кутикулы, повторяют наблюдаемую *in vivo* смену высокого титра экдистерона, появляющегося за 6 ч до закладки кутикулы, низким уровнем гормона в последующие 10–12 ч [8]. На рис. 4 приведена схема, отражающая последовательное изменение синтеза макромолекул в ходе метаморфоза имагинальных дисков, вызываемого экдистероном *in vitro*. Обращает на себя внимание значительный интервал времени (около 10 ч), разделяющий первичные эффекты гормона (индукция синтеза РНК и белка), предшествующие эвагинации, и синтез кутикулы, интенсивность которого достигает 50% от максимального уровня лишь к моменту завершения эвагинации.

В качестве модели для изучения конечных этапов дифференцировки клеток имагинальных дисков можно рассматривать индукцию ряда ферментов в пересеваемых клетках, происходящую в поздние сроки после действия гормона. В клетках линии Кс экдистерон индуцирует синтез 3 ферментов — β -галактозидазы [185], ацетилхолинэстеразы [186–188] и каталазы [189]. Кинетика нарастания ферментной активности одинакова во всех трех случаях — заметное увеличение активности происходит через 20 ч, а максимальный уровень (7–10-кратное увеличение) достигается через 3 сут после введения гормона. Специфичность индуцирующего действия экдистерона была продемонстрирована при изучении клонов клеток, нечувст-

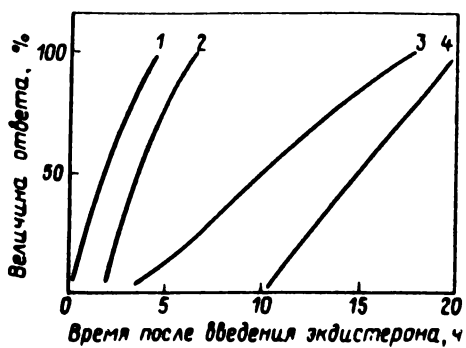


Рис. 4. Последовательность процессов, индуцируемых экдистероном в культивируемых *in vitro* имагинальных дисках. Представлены кривые, описывающие изменение скорости синтеза РНК (1), белков (2) и кутикулы (4), а также — динамику эвагинации (3) [154]

вительных к гормону (судя по отсутствию характерных изменений морфологии и остановки деления клеток), у которых индукции трех ферментов обнаружить не удалось [189].

Процессы эвагинации и дифференцировки клеток имагинальных дисков при развитии дрозофилы очень сложны, и их последовательность вряд ли может объясняться действием одного лишь экдистерона. Можно предположить, что в ходе метаморфоза имагинальных дисков большая роль принадлежит регулирующим факторам, подобным тем, которые участвуют в регуляции транскрипционной активности политенных хромосом спонных желез.

Многоступенчатость биологического действия экдистерона делает трудным его изучение. Большую помощь при этом может оказать применение генетических подходов, таких как использование мутаций, нарушающих отдельные этапы метаморфоза [136-138]. Особый интерес для исследования метаморфоза имагинальных дисков представляют так называемые гомеозисные мутации. У мутантных личинок оказывается нарушенной детерминация имагинальных дисков, что приводит к формированию иных частей тела и органов, чем при нормальном развитии [190]. Можно предполагать, что в случае этих мутаций происходит изменение компетентности эмбриональных предшественников клеток имагинальных дисков, в результате чего под действием экдистерона, выступающего в роли пускового механизма, реализуется иная, чем в норме, программа развития [190]. Изучение клонированных крупных фрагментов ДНК, содержащих гены, отвечающие за гомеозисные мутации *bithorax* [191] и *antennapedia* [192], и прилегающие к ним регуляторные участки, может существенно развить пред-

ставления о регуляторных механизмах, которые лежат в основе вызываемого экдистероном нормального развития имагинальных дисков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследований последних лет показали, что точкой приложения регулирующего действия экдистерона является транскрипция генов. Было обнаружено, что при взаимодействии с гормоном, находящимся в комплексе с рецептором, важная роль может принадлежать специфичным последовательностям ДНК, расположенным в районе, примыкающем к 5' концу регулируемого гена. В будущем в этой области можно ожидать большой прогресс, поскольку удалось клонировать многие гены [93–99], активность которых изменяется в ходе развития под влиянием непосредственно гормон–рецепторного комплекса или вторичных медиаторов его действия. Это позволит углубить знания о молекулярной организации как самих генов, так и прилегающих к ним областей. Остается, однако, неясным вопрос о молекулярных механизмах приобретения клетками качественно разной компетентности к действию гормона на разных стадиях развития. В случае обнаружения белков–модуляторов действия экдистерона и/или регуляторных последовательностей ДНК, специфичных для каждой стадии развития, можно было существенно развить представления о молекулярных механизмах, лежащих в основе действия экдистерона на клетки дрозофилы. Следует подчеркнуть, что решение этих вопросов может быть ускорено за счет применения методов генетического анализа при изучении сложных цепей взаимодействующих генов, которые участвуют в регуляции морфогенеза и клеточной дифференцировки, инициируемых экдистероном в онтогенезе дрозофилы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Riddiford L.M. "Ann. Rev. Physiol.", 1980, 42, 511–528
2. Richards G. "Biol. Rev.", 1981, 501–549
3. Буров В.Н. В сб.: Труды Всесоюзного Энтомологического общества, Л., "Наука", 1983, 64, 44–63
4. Кинд Т.В., Карпунина Н.Н., Тысячнюк М.С. В сб.: Труды Всесоюзного Энтомологического общества, Л., "Наука", 1983, 64, 5–28

5. Chino H., Sakurai S., Ohtaki T., Ikekawa N., Miyazaki H., Ishibahi M., Abuki H. "Science", 1974, 183, 529-530
6. De Reggi M., Hirn M., De Laage P. "Biochem. Biophys. Res. Commun.", 1975, 66, 1307-1315
7. Hodgetts R., Sage B., O'Connor J.D. "Dev. Biol.", 1977, 60, 310-317
8. Richards G. "Mol. Cell. Endocrinol.", 1981, 21, 134-142
9. Garen A., Kauvar L., Lepezant J.A. "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 1977, 74, 5099-5103
10. Audit-Lamour C., Busson D. "J. Insect Physiol.", 1981, 27, 829-837
11. Hoffman J., Lagueux M., Hetru C., Charlet M., Goltzene F. In: "Progress in ecdysone research". Eds J. Hoffman, Amsterdam, Biomedical Press, 1980, 431-465
12. Winicur S., Mitchell H. "J. Insect Physiol.", 1974, 20, 1795-1805
13. Berreur P., Porsheron P., Berreur-Bonnenfant J., Simpson P. "J. Exp. Zool.", 1979, 210, 347-352
14. Marsh J., Wright T. "Dev. Biol.", 1980, 80, 379-387
15. Kraminsky G.P., Clark W.C., Estelle N.A., Gietz R.D., Sage B., O'Connor J.D. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1980, 77, 4175-4179
16. Chichara C., Fristrom J. "Dev. Biol.", 1973, 35, 36-46
17. Logan W., Fristrom D., Fristrom J. "J. Insect Physiol.", 1975, 21, 1343-1354
18. Lezzi M., Wyss C. In: The juvenile hormones. Eds. L.I. Gilbert, New York, London, Plenum Press, 1976, 252-269
19. Jowett T., Postlethwait J. "Dev. Biol.", 1980, 80, 225-234
20. Riddiford L.M. "Nature", 1976, 259, 115-117
21. Yamamoto K.M., Alberts B. "Ann. Rev. Biochem.", 1976, 45, 721-746
22. Grody W.W., Schrader W.T., O'Malley B.W. "Endocrinol. Rev.", 1982, 3, 141-163
23. Groner B., Kennedy N., Skroch P., Hynes N., Ponta H. "Biochim. Biophys. Acta", 1984, 781, 1-6
24. Noteboom W.D., Gorski J. "Arch. Biochem. Biophys.", 1965, 111, 559-568
25. O'Malley B.W., Sherman M.R., Toft D.O. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1970, 67, 501-505
26. Papamichail M., Tsokos G., Tsowdaroglou N., Sekeris G.E. "Exp. Cell Res.", 1980, 125, 490-493
27. Jensen E.V. "Proc. Can. Cancer Res. Conf.", 1965, 6, 143-145
28. Sherman M.R., Corvol P.L., O'Malley B.W. "J. Biol. Chem.", 1970, 245, 6085-6092

29. Baxter J., Rousseau G., Bensor M., Garen R., Ito J., Tomkins G. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1972, 69, 1892-1896
30. Tang S., Liao S. "J. Biol. Chem.", 1971, 246, 16-20
31. Edelman I., Fimognari G. "Recent Prog. Horm. Res.", 1968, 24, 1-6
32. Yamamoto K.R. "Recent Prog. Horm. Res.", 1976, 32, 2-32
33. Chang C.H., Rowley D.R., Tindell D. "Biochemistry", 1983, 22, 6170-6175
34. Kuhn R. "J. Biol. Chem.", 1975, 250, 4220-4226
35. O'Malley B.W., Schrader W.T. "J. Steroid Biochem.", 1972, 3, 617-624
36. Schrader W., Coty W., Smith R., O'Malley B. "Ann. N.Y. Acad. Sci.", 1977, 286, 64-71
37. Thanki K., Beach T., Bass A., Dickerman A. "Nucl. Acids Res.", 1979, 6, 3859-3864
38. Thrower S., Hall C., Lin L., Davidson A. "Biochem. J.", 1976, 160, 271-278
39. Kalimi M., Colman P., Feigelson P. "J. Biol. Chem.", 1975, 250, 1080-1084
40. Baily A., Lefevre B., Savouret J., Milgrom E. "J. Biol. Chem.", 1980, 255, 2729-2734
41. John J., Moudgil V. "Biochem. Biophys. Res. Commun.", 1979, 90, 1242-1246
42. Moudgil V.K., Toft D.O. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1975, 72, 901-906
43. Sherman M., Bickering L., Hollwagen F., Miller L. "Fed. Proc.", 1978, 37, 107-108
44. Wrangle O., Gustafsson J. "J. Biol. Chem.", 1978, 253, 856-859
45. Spelsberg T., Steggels A., Chytil F., O'Malley B. "J. Biol. Chem.", 1972, 247, 1368-1373
46. O'Malley B., Spelsberg T., Schrader W., Chytil F., Steggels A. "Nature", 1972, 235, 141-145
47. Spelsberg T., Steggels A., O'Malley B. "J. Biol. Chem.", 1971, 246, 4188-4192
48. Compton J., Schrader W., O'Malley B. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1983, 80, 16-20
49. Mulvihill E.R., Le Pennec J.-P., Chambon P. "Cell", 1982, 28, 621-632
50. Payvar F., Wrangle O., Carlstedt-Duke J., Okert S., Gustafsson J., Yamamoto K.R. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1981, 78, 6628-6632
51. Dean D.C., Knoll B.J., Riser M.E., O'Malley B.W. "Nature", 1983, 305, 551-554

52. Renkawitz R., Beug H., Graf T., Mattias P., Grez M., Schütz G. "Cell", 1982, 31, 167-176
53. Khoury G., Gruss P. "Cell", 1983, 33, 313-314
54. Kroeger H. "Chromosoma", 1964, 15, 36-70
55. Kroeger H. "Mol. Cell. Endocrinol.", 1977, 7, 105-110
56. Ashburner M., Cherbas P. "Mol. Cell. Endocrinol.", 1976, 5, 89-107
57. Fristrom J., Kelly L. "J. Insect Physiol.", 1976, 22, 1697-1707
58. Milner M., Sang J. "J. Embryol. Exp. Morphol.", 1977, 37, 119-131
59. Yund M.A., King D.S., Fristrom J.W. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1978, 75, 6039-6043
60. O'Connor J., Maroy P., Beckers C., Dennis R., Alvares C., Sage B. In: Gene Regulation by steroid Hormones. Eds A.K. Roy, J.H. Clark, New York, London, Berlin, Springer, 1980, 263-277
61. Schaltmann K., Pongs O. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1982, 79, 6-10
62. Maroy P., Dennis R., Beckers C., Sage B., O'Connor J.D. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1978, 75, 6035-6038
63. Fristrom J., Yund M. In: Invertebrate Tissue Culture. Eds K. Maramorosch, New York, Acad. Press, 1976, 161-180
64. Cherbas L., Cherbas P. In: Advances in Cell Culture. V.1, Eds K. Maramorosch, New York, Acad. Press, 1981, 91-124
65. Sage B., Tannis M., O'Connor J. "J. Biol. Chem.", 1982, 257, 6373-6379
66. Bonner J.J. "Cell", 1982, 30, 7-8
67. Yund M.A. "Mol. Cell. Endocrinol.", 1979, 14, 19-35
68. Hansson L., Lineruth K., Lambertsson A. "W. Roux's Archiv.", 1981, 190, 308-312
69. Ashburner M., Berendes H. In: Genetics and Biology of Drosophila. V.2b, Eds M. Ashburner, T.R.F. Wright, New York, Acad. Press, 1978, 316-392
70. Berendes H. "Int. Rev. Cytol.", 1973, 35, 61-116
71. Ashburner M. "Chromosoma", 1972, 38, 255-281
72. Ashburner M. "Dev. Biol.", 1973, 35, 47-61
73. Ashburner M. "Dev. Biol.", 1974, 39, 141-157
74. Ashburner M., Richards G. "Dev. Biol.", 1976, 54, 241-255
75. Ashburner M., Chichara C., Meltzer P., Richards G. "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 1974, 38, 655-662
76. Dworniczak B., Seidel R., Pongs O. "EMBO J.", 1983, 2, 1323-1330
77. Walker V., Ashburner M. "Cell", 1981, 26, 269-279
78. Belyneva E.S., Vlasova I.E., Biyasheva Z.M., Kakpakov V.I., Richards G., Zhimulev I.F. "Chromosoma", 1981, 84, 207-211

79. Gronemeyer M., Pongs O. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1980, 77, 2108-2112
80. Holt T.K. "Chromosoma", 1972, 37, 423-432
81. Berendes H., Alonso C., Helmsing P., Leenders H., Derksen J. "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 1974, 38, 645-654
82. Hansson L., Lambertsson A. "Mol. Gen. Genet.", 1983, 192, 395-401
83. Richards G. "Chromosoma", 1980, 79, 241-250
84. Holden F., Ashburner M. "Chromosoma", 1978, 68, 205-227
85. Richards G. "W. Roux's Arch.", 1982, 191, 103-111
86. Poeting A., Koerwer W., Pongs O. "Chromosoma", 1982, 87, 89-102
87. Bonner J.J., Pardue M.A. "Cell", 1976, 12, 219-225
88. Bonner J.J., Pardue M.A. "Cell", 1976, 12, 227-234
89. Lepezant J.-A., Kejzlarova-Lepezant J., Garen A. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1978, 75, 5570-5574
90. Savakis C., Koehler M.M.D., Cherbas P. "EMBO J.", 1984, 3, 235-243
91. Möritz T., Edström J., Pongs O. "EMBO J.", 1984, 289-295
92. Zhimulev I.F., Belyaeva E.S., Semeshin V.F. "CRC Crit. Rev. Biochem.", 1981, 11, 303-340
93. Spradling A.C. "Cell", 1981, 27, 193-201
94. Smith D., McClelland A., White B., Addison C., Glover D. "Cell", 1981, 23, 441-449
95. Barnett T., Pahl C., Gergen J., Wensink P. "Cell", 1980, 21, 729-738
96. Meyerowitz E., Hogness D. "Cell", 1982, 28, 165-173
97. Fyrberg E., Mahhafey J., Bond B., Davidson N. "Cell", 1983, 33, 115-123
98. Snyder M., Hirsh D., Davidson N. "Cell", 1981, 25, 165-177
99. Snyder M., Hunkapiller M., Yuen G., Silvert D., Fristrom J., Davidson N. "Cell", 1982, 29, 1027-1040
100. Levine M., Lepezant J.-A., Garen A., Kejzlarova-Lepezant J., Rat L., Somme-Marin G. "J. Mol. Appl. Gen.", 1982, 1, 371-383
101. Roberts D., Wolfe J., Akam M. "J. Insect Physiol.", 1977, 23, 871-878
102. Keeley L. "Ann. Rev. Entomol.", 1978, 23, 329-352
103. Thomasson W., Mitchell H. "J. Insect Physiol.", 1972, 18, 1885-1899
104. Sato J., Roberts D. "Insect Biochem.", 1981, 13, 1-5
105. McClelland A., Smith D., Glover D. "J. Mol. Biol.", 1981, 153, 257-273

106. Jowett T., Postlethwait J. "Nature", 1981, 292, 633-635
107. Lepezant J., Kejzlarova-Lepezant J., Garen A. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1978, 75, 5570-5574
108. Garen A., Lepezant J. In: Gene Regulation by Steroid Hormones, Eds A.K.Roy, J.H.Clark, New York, Springer-Verlag, 1980, 255-262
109. Nakanishi Y., Garen A. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1983, 80, 2971-2975
110. Savakis C., Demetri K., Cherbas P. "Cell", 1980, 22, 665-674
111. Cherbas P., Cherbas L., Savakis C., Koehler M. "Am. Zool.", 1981, 21, 743-750
112. Bownes M.A. "Quart. Rev. Biol.", 1982, 57, 247-273
113. Postlethwait J., Jowett T. "Cell", 1980, 20, 671-678
114. Hung M., Wensink P. "Nucl. Acids Res.", 1981, 9, 6407-6419
115. Postlethwait J., Handler A. "J. Insect Physiol.", 1979, 25, 455-460
116. Postlethwait J., Shirk P. "Am. Zool.", 1981, 21, 681-700
117. Postlethwait J., Bownes M., Jowett T. "Dev. Biol.", 1980, 79, 379-387
118. Shirk P., Minoo P., Postlethwait J. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1983, 80, 186-190
119. Clark J., Peck E. In: Female Sex Steroid Receptors and functions, Berlin, Springer, 1979, 99-130
120. Weintraub J., Groudine M. "Science", 1976, 193, 848-856
121. Wu C. "Nature", 1980, 286, 854-860
122. Beckendorf S., Kafatos F. "Cell", 1976, 9, 365-373
123. Korge G. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1975, 72, 4550-4554
124. Korge G. "Dev. Biol.", 1977, 58, 339-355
125. Korge G. "Chromosoma", 1977, 62, 155-174
126. Muskavitch M., Hogness D. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1980, 77, 7362-7366
127. Nijhout H. "J. Insect Physiol.", 1976, 22, 453-463
128. Hansson L., Lambertsson A. "W. Roux's Archiv", 1984, 193, 48-51
129. Kress H. "J. Insect Physiol.", 1974, 20, 1041-1055
130. Berendes H. "Proc. 4th Int. Cong. Endocr.", 1974, 311-314
131. Muskavitch M., Hogness D. "Cell", 1982, 29, 1041-1051
132. McGinnis W., Shermoen A., Heemskerk J., Beckendorf S. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1983, 80, 1063-1067
133. Fristrom D., Fristrom J. "Dev. Biol.", 1975, 43, 1-23
134. Fristrom D. "Dev. Biol.", 1976, 54, 163-171
135. Milner M. "J. Embryol. Exp. Morphol.", 1977, 37, 105-117
136. Kiss I., Scabad J., Major J. "Mol. Gen. Genet.", 1978, 164, 77-83

137. Kis6 I., Bencze G., Fekete E., Fodor A., Gausz J., Maroy P., Szabad J., Szidonia J. "Theor. Appl. Genet.", 1976, 48, 217-226
138. Kiss I., Szabad J., Belyaeva E., Zhimulev I., Mayor J. In: Development and neurobiology of *Drosophila*. Eds. O. Siddiqu, P. Babu, New York, Plenum Press, 1980, 163-181
139. Postlethwait J. In: Genetics and Biology of *Drosophila*. V.2c, Eds M. Ashburner, T.R.F. Wright, New York, Acad. Press, 1978, 359-441
140. Fain M., Stevens B. "Dev. Biol.", 1982, 92, 247-258
141. Garen A., Lepezant J. In: Gene Regulation by Steroid Hormones. Eds A.K. Roy, J.H. Clark, New York, Springer-Verlag, 1980, 255-262
142. Logan W., Fristrom D., Fristrom J. "J. Insect Physiol.", 1975, 21, 1343-1354
143. Cherbas P., Cherbas L., Demetri G., Manteuffel-Cymborowska M., Savakis C., Yonger C., Williams C. In: Gene Regulation by Steroid Hormones. Eds A.K. Roy, J.H. Clark, New York, Springer-Verlag, 1980, 278-305
144. Munsch N., Cade-Treyer D. "Experientia", 1982, 38, 1197-1199
145. O'Connor J.D., Chang E.S. In: Metamorphosis: a problem in developmental Biology. Eds L. Gilbert, E. Friedman, New York, Plenum Press, 1981, 241-261
146. Debec A. "W. Roux's Archiv", 1974, 174, 1-19
147. Debec A. "W. Roux's Archiv", 1976, 180, 107-119
148. Гвоздев В.А., Какпаков В.Т., Муховатова Л.М., Полударова Л.Г., Тарантул В.З. "Онтогенез", 1974, 5, 33-42
149. Courgeon A. "Exp. Cell Res.", 1975, 94, 238-291
150. Schneider I., Blumenthal A. In: Genetics and Biology of *Drosophila*. V.2a, New York, Acad. Press, 1978, 266-305
151. Stevens B., Alvares C., Bohman R., O'Connor J. "Cell", 1980, 22, 675-682
152. Stevens B., O'Connor J. "Dev. Biol.", 1982, 94, 176-182
153. Siegel J., Fristrom J., Gregg T. "Dev. Biol.", 1974, 41, 304-313
154. Siegel J., Fristrom J. In: Genetics and Biology of *Drosophila*. V.2a, New York, Acad. Press, 1978, 317-394
155. Kuniuki A., Fristrom J. "Insect Biochem.", 1977, 7, 169-173
156. Petri W., Fristrom J., Stewart D., Hanly E. "Mol. Gen. Genet.", 1971, 110, 245-262
157. Nishiura J., Fristrom J. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1975, 72, 2984-2988
158. Seigel J., E. Fristrom J. "Dev. Biol.", 1974, 41, 301-313
159. Seybold W., Sullivan D. "Dev. Biol.", 1978, 65, 69-80

160. Hill R., Watt F., Yund M., Fristrom J. "Dev. Biol.", 1982, 90, 340-357
161. Крамеров А.А., Метакровский Е.В., Муха Д.В., Гвоздев В.А. "Докл. АН СССР", 1981, 259, 226-229
162. Berger E., Ringler R., Alahiotis S., Frank M. "Dev. Biol.", 1978, 62, 498-511
163. Coudrec J., Dastugue B. "Biochem. Biophys. Res. Commun.", 1980, 97, 173-181
164. Rosset R. "Exp. Cell Res.", 1978, 111, 31-36
165. Berger E., Ireland R., Wyss C. "Somatic Cell Genet.", 1980, 6, 719-729
166. Ireland R., Berger E. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1982, 79, 855-859
167. Ireland R., Berger E., Sirotkin K., Yund M., Ostebur D., Fristrom J. "Dev. Biol.", 1982, 93, 498-507
168. Cheney C., Shearn A. "Dev. Biol.", 1983, 95, 323-330
169. Wessels N., Spooner B., Ash J., Bradley M., Ludeuna M., Taylor E., Wrenn J., Yamada K. "Science", 1971, 171, 135-143
170. Coudrec J., Cadic A., Sobrier N., Dastugue B. "Biochem. Biophys. Res. Commun.", 1982, 107, 188-195
171. Coudrec J., Sobrier N., Giraud G., Becker J., Dastugue B. "J. Mol. Biol.", 1983, 164, 419-430
172. Berger E., Sloboda R., Ireland R. "Cell Motil.", 1980, 1, 113-129
173. Fristrom D., Fristrom J. "Dev. Biol.", 1982, 92, 418-427
174. Fristrom J., Fristrom D., Fekete E., Kuniyuki A. "Am. Zool.", 1977, 17, 671-684
175. Rickoll W., Fristrom J. "Dev. Biol.", 1983, 95, 275-287
176. Courgeon A. "Exp. Cell Res.", 1972, 74, 327-336
177. Dennis R., Haustein D. "Insect Biochem.", 1982, 12, 83-89
178. Johnson T., Brown L., Denell R. "W. Roux's Archiv", 1983, 192, 103-107
179. Метакровский Е.В., Какпаков В.Т., Гвоздев В.А. "Докл. АН СССР", 1975, 221, 960-963
180. Woods D., Poodry C. "Dev. Biol.", 1983, 96, 23-31
181. Hughes G., Sharon N. "Nature", 1978, 274, 637-639
182. Kramerov A., Metakovsky E., Polukarova L., Gvozdev V. "Insect Biochem.", 1983, 13, 655-663
183. Edwards J., Milner M., Chen S. "W. Roux's Archiv", 1978, 185, 59-77
184. Fristrom J., Doctor J., Fristrom D., Logan R., Silvert D. "Dev. Biol.", 1982, 91, 337-350

185. Best-Belpomme M., Courgeon A., Rambach A. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1978, 75, 6102-6106
186. Cherbas P., Cherbas L., Williams C. "Science", 1977, 177, 275-277
187. Best-Belpomme M., Courgeon A. "FEBS Lett.", 1977, 82, 345-347
188. Berger E., Wyss C. "Somat. Cell Genet.", 1980, 6, 631-640
189. Best-Belpomme M., Ropp M. "Eur. J. Biochem.", 1982, 121, 349-355
190. Ouweneel W. "Adv. Genet.", 1976, 18, 179-194
191. Bender W., Akam M., Karch F., Beachy P., Peifer M., Spierer P., Lewis E., Hogness D. "Science", 1983, 221, 23-29
192. Scott M., Weiner A., Hazelrigg T., Polisky B., Pirrott V., Scalenghe F., Kaufman T. "Cell", 1983, 35, 763-776

ТЕПЛОЙ ШОК У ДРОЗОФИЛЫ И РЕГУЛЯЦИЯ
АКТИВНОСТИ ГЕНОМА

Е.Р. Лозовская, М.Б. Евгеньев

ВВЕДЕНИЕ

Проблема регуляции активности генов у эукариот является одной из центральных проблем современной молекулярной биологии. Изучена она, однако, гораздо слабее, чем у вирусов и бактерий. Это объясняется не только более сложным характером самой регуляции, но и тем, что существует очень мало простых модельных систем, доступных для экспериментальных воздействий. Таковую систему удалось найти у дрозофилы генетически наиболее исследованного объекта, который уже не раз предоставлял биологам уникальные возможности для изучения самых разнообразных генетических, цитологических и биохимических проблем.

Клетки некоторых личиночных и взрослых органов дрозофилы содержат гигантские политенные хромосомы, благодаря которым проявления активности генов можно наблюдать прямо под световым микроскопом. Часто они выглядят как участки декоденсированного хроматина — пuffs. При сравнении характера puffирования (т.е. размеров и локализации puffов) в разных тканях или в одной ткани на разных стадиях развития можно увидеть закономерную смену одних puffов другими, то есть одних активных генов другими. Кроме puffов, закономерно возникающих и исчезающих во время нормального развития дрозофилы, существует специфический набор генов, активирующихся при самых различных экспериментальных воздействиях, например, при резком повышении температуры (тепловом шоке; ТШ). Открыл это явление итальянский исследователь Ф. Ритосса в 1962 г. [1]. Это первое наблюдение повлекло за собой интенсивное изучение хромосомной локализации и структурной организации генов ТШ, а также изучение мРНК и белков, синтезирующихся при повышении температуры. Сейчас становится очевидным, что ответ генома дрозофилы на высокую температуру может быть примером более общей био-

логической реакции на резкие изменения окружающей среды, так как гены, активирующиеся при таких изменениях и кодирующие специфический набор белков с молекулярной массой,* близкой к белкам ТШ дрозофилы, найдены у самых различных эукариот, от простейших до млекопитающих.

1. ПУФЫ, АКТИВИРУЮЩИЕСЯ ПРИ ТШ И ДРУГИХ ВНЕШНИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Если изолированные слонные железы дрозофилы или целую личинку поместить в 37 вместо 25°C, то в нескольких, очень немногих, локусах политенных хромосом образуются новые пуфы [1-10]. У разных видов *Drosophila* образуется от 5 до 9 пуфов ТШ: у *D. virilis* возникает 5 пуфов (20СВ, 29С, 33Е, 37Н), у *D. hydei* - 6 (32А, 36А, 48ВС, 81В, 31С, 85В), у *D. melanogaster* - 9 (33В, 63В, 64, 67В, 70А, 87А, 87С, 93, 95) (рис. 1). Пуфы ТШ развиваются на основе 1-2 дисков, за исключением "сложных" пуфов 20С у *D. virilis* и 48ВС у *D. hydei*, которые образуются из 4-5 дисков [7, 12]. Пуфы в ответ на повышение температуры начинают развиваться очень быстро - в течение первой минуты после начала воздействия [6, 9-11]. Через некоторое время (для каждого пуфа свое: от 5 мин для 63В и до 20 мин для 87С у *D. melanogaster* они достигают максимальных размеров, а через 30-40 мин начинают медленно регрессировать. Если снизить температуру до нормальной, то регрессия пуфов будет происходить значительно быстрее [10]. Максимальный размер пуфа зависит от температуры воздействия: при 29 или 33°C данный пуф меньше, чем при 37°C [6, 10].

ТШ вызывает перераспределение некоторых белков вдоль хромосом. Молекулы РНК-полимеразы II мигрируют во вновь образованные пуфы [13-15]. В этих же пуфах концентрируются молекулы белка, дестабилизирующего двойную спираль ДНК [16] и некоторые другие неидентифицированные негистоновые белки [17-22, 51, 52]. С другой стороны, количество гистона H1 уменьшается в районах, которые активируются при ТШ [15]. Образование пуфов при повышенной температуре можно предотвратить с помощью действия на клетки α-аманитина или актиномицина D, однако этого не удается

*Все последующие данные приводятся в килодальтонах

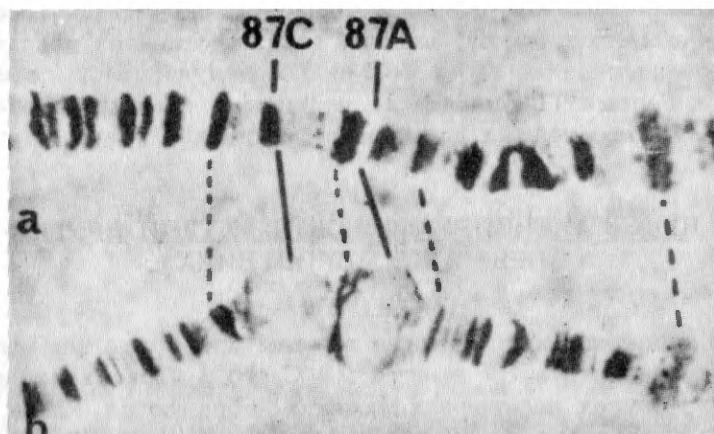


Рис. 1. Индукция пuffed при ТШ у *D. melanogaster* [36]

достичь при помощи циклогексимида. Иными словами, этот процесс зависит от синтеза РНК, но не белков [11, 24, 26]. Тем не менее, если не происходит синтеза белков во время ТШ, то не происходит и нормальной регрессии пuffed ТШ до тех пор, пока температура не будет снижена. Исключение представляет пuffed 2-48BC *D. hydei*, регрессия которого не зависит от белкового синтеза [25]. Ингибиторы синтеза РНК предотвращают не только образование пuffed ТШ, но и транспорт в них РНК-полимеразы II [26].

Показано, что при ТШ во всех тканях дрозофилы и на всех стадиях развития этого организма, а также в клетках, культивируемых *in vitro*, активируются одни и те же гены. Образование пuffed при ТШ не удастся вызвать на изолированных ядрах, что говорит о необходимости для их активации какого-то цитоплазматического фактора. Действительно, если ядра, выделенные из слюнных желез, не подвергшихся ТШ, инкубировать с цитоплазмой клеток после ТШ, то образуются соответствующие пuffed. Исключение составляет район 93D *D. melanogaster*, который в этих условиях не поддается активации [26].

Кроме появления новых пuffed, при повышении температуры происходит и другой процесс – регрессия пuffed, которые были активны в данной ткани или на данной стадии до нагревания [1, 5, 30, 31].

Таблица 1

Индукторы, вызывающие появление пуфов теплового шока у *Drosophila* [1-7, 33, 34, 108, 111, 123-125]

Индуктор	Концентрация	Вид	Индуцируемые пуфы
1	2	3	4
Амифал	$3,4 \times 10^{-4} M$	hydei	Все
Антимицин А	Насыщенный раствор	hydei	Все, кроме 81B
Арсенит натрия	$7,5 \times 10^{-5} M$	hydei	Все
Азид натрия	$3,0 \times 10^{-3} M$	buskii	- ' -
		hydei	- ' -
Бензамид	1,3% вес/объем	melanogaster	Только 93D
Валиномицин	$2,0 \times 10^{-5} M$	melanogaster	Все
Витамин В ₆	Инъекция 0,5 мллх $\times 0,1 M$	hydei	48BC
	Культура органов: $5 \times 10^{-2} M$ $6 \times 10^{-2} M$	hydei virilis	Все 20 CD
Витамин В ₆ + олигомицин	$2 \times 10^{-2} M$	hydei	48BC

Продолжение табл. 1

1	2	3	4
2-гептил-4-гидрокси- хинолинноксид	0,25 мг/мл	hydei	Все, кроме 81B
Гидроксилламин	0,01M	melanogaster	93D, 87 A/C
Дикумарол	10 ⁻³ M	buskii	Все
Динактин	10 ⁻⁶ M	melanogaster	" "
Динитрофенол	10 ⁻³ M	buskii	" "
		hydei	" "
		melanogaster	" "
Колхицин	0,1 мг/мл	virilis	20CD
Менадион	10 ⁻³ M	hydei	Все
Метиленовый синий	10 ⁻² M	hydei	" "
Олигомицин	10 ⁻⁵ M	melanogaster	63 BC
Олигомицин+атрактила- зид	10 ⁻⁵ M	hydei	Все, кроме 81B
Олигомицин+КСN	10 ⁻⁵ M	hydei	" "

Тепловой шок

buskii	Все	--' --
virilis		
hydei	Все	
melanogaster		--' --
hydei		--' --
buskii		--' --
melanogaster	93D, 87A/C	
melanogaster	93D, 87A/C	
buskii	Все	--' --
hydei		--' --
melanogaster		--' --

Ротенон Насыщенный раствор

$10^{-2} M$

Салицилат натрия $10^{-2} M$

Уридин

0,01M

Хлорид алюминия

Восстановление после анаэробных условий

Уже в работе Ритоссы [1] было показано, что динитрофенол влияет на активность генома таким же образом, как и повышение температуры. Активацию генов ТШ можно вызвать и другими воздействиями. Они приведены в табл. 1. Пока остается совершенно не ясным, каков механизм действия этих веществ, общий ли он для всех случаев или каждый агент влияет на активность генома своим путем? Предложенные до сих пор объяснения нельзя признать удовлетворительными.

Многие вещества, действующие аналогично ТШ, блокируют перенос электронов и окислительное фосфорилирование в митохондриях. Может быть именно эти процессы являются общей точкой приложения для всех (или многих) агентов, вызывающих активацию пуфов ТШ и репрессию работавших ранее генов. Однако необходимо учитывать, что все эти вещества могут иметь множественный эффект. Было, например, показано, что добавление экзогенного АТФ угнетает образование пуфов при высокой температуре [33, 34]. В то же время нет прямой связи между индукцией пуфов и внутриклеточным пулом АТФ [33, 35]. Образованию пуфов при ТШ также препятствует снижение pH среды до 4,4 [36].

Несмотря на сложность интерпретации данных по действию различных агентов на активность генома, имеются данные о том, что именно митохондрии являются первичной мишенью для различных индуцирующих пуфы стимулов [37]. Митохондрии выделяли из клеток слюнных желез *D. hydei*, развивавшихся при нормальной температуре. Далее их подвергали тепловому шоку *in vitro*. В супернатанте после осаждения таких митохондрий содержится некий недиаализуемый фактор, который при инъекции в слюнные железы вызывает образование двух пуфов ТШ - 36А и 48ВС. Инъекция контрольных митондрий не влияла на размер исследуемых пуфов. В то же время два других района хромосом - 32А и 81В не реагировали на инъекцию прогретых митохондрий, что говорит о том, что данный эксперимент не вполне моделирует ситуацию *in vivo*. Однако эти опыты открывают некоторые подходы к изучению природы сигналов, активирующих специфический набор генов в геноме дрозофилы.

2. СИНТЕЗ РНК ПРИ ТШ

В активированных при повышенной температуре локусах происходит синтез новых РНК. Некоторые из них (но не все) затем транслируются в цитоплазме с образованием белков теп-

лового шока (БТШ). Синтез же большинства видов старых мРНК прекращается [9, 24, 28, 31, 32, 38, 39]. Это не относится к рибосомным и гистоновым РНК и к РНК, кодируемым митохондриальным геномом — они транскрибируются по-прежнему [30, 40, 47]. Однако процессинг и транспорт рибосомных РНК: 18S, 28S и 5S рРНК нарушается [11, 41–44]. С той же интенсивностью, что и при нормальной температуре, продолжается транскрипция тРНК и, по крайней мере, двух низкомолекулярных ядерных РНК [41].

Вновь синтезированные при ТШ РНК были исследованы различными методами. Оказалось, что в разных клетках дрожифилы и на разных стадиях развития в ответ на повышение температуры транскрибируются одинаковые РНК [28]. Часть этих последовательностей РНК присутствует и в контрольных, не подвергавшихся нагреванию клетках, но в чрезвычайно малых количествах [32]. Цитоплазматическая поли-А⁺ РНК, выделенная из клеток после ТШ, дает в сахарозном градиенте два пика с константами седиментации 20 и 12S [39, 40, 45, 46]. Методом электрофореза в полиакриламидном геле показано, что 20S пик содержит четыре фракции (рис. 2). При гибридизации *in situ* этих РНК с политенными хромосомами оказалось, что самая большая по молекулярному весу фракция А1 синтезируется в локусе 63BC, А2 образуется в локусах 87А и 87С, пуф 95D отвечает за образование фракции А3, а А4 гибридизуется преимущественно с пуфом 87С и в слабой степени с 87А. Достигнуть хорошего электрофоретического разрешения пика 12S не удалось. Эта РНК в основном гибридизуется с локусом 67В. Пять упомянутых выше пуфов являются основными пуфами ТШ. Часть поли-А⁺ РНК из полисом гибридизуется также с малыми пуфами — 33В, 64F и 70А, но эти РНК до сих пор не идентифицированы, неизвестны и кодируемые ими белки. С девятым довольно активным пуфом ТШ — 93D гибридизуется неполиаденилированная цитоплазматическая РНК и неясно, участвует ли она в трансляции. Помимо этого, РНК, синтезированные при ТШ, гибридизуются с хромоцентром и некоторыми эухроматическими сайтами, которые не образуют пуфов при повышенной температуре [30, 31, 40, 48].

Дополнительную информацию дали исследования ядерных и цитоплазматических РНК ТШ и их конкурентная гибридизация с политенными хромосомами. В настоящее время лучше всего изучены РНК, образующиеся в трех пуфах — 93D, 87А и 87С.

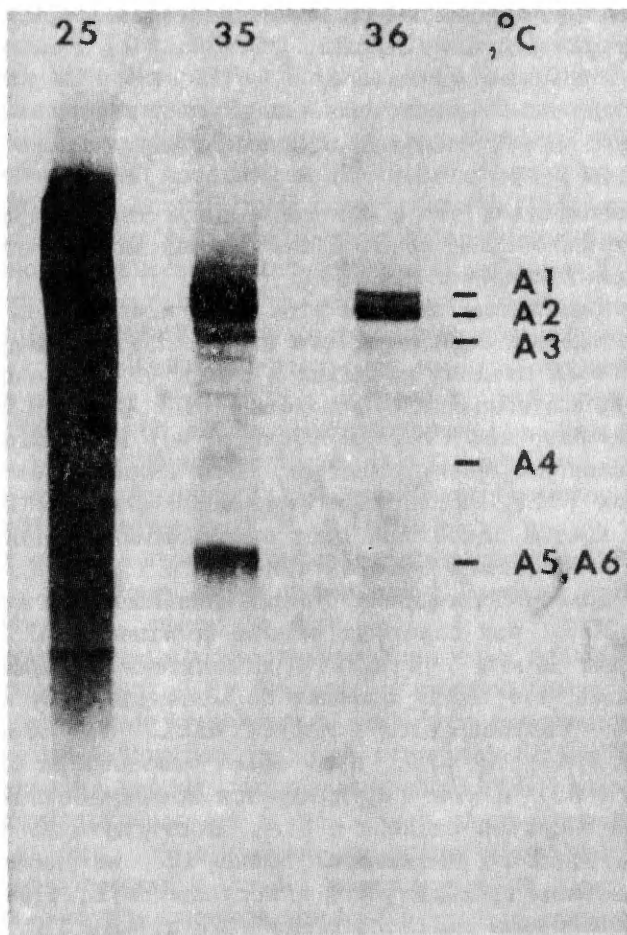


Рис. 2. Синтез мРНК в культуре клеток *D. melanogaster* при разных температурах. Справа указаны обозначения основных фракций РНК, синтезируемых при ТШ [30]

Показано, что в цитоплазме представлена только часть первоначального транскрипта 93D – приблизительно 41–55% [49]. Транскрибированная в пуфе 93D РНК в ядре представлена в равной степени как поли- A^+ , так и поли- A^- молекулами, в то время как в цитоплазму выходит почти исключительно неполиаденилированная РНК [50]. Хотя полученные данные свидетельствуют о том, что в 93D образуется гигантский ядерный предшественник (9,6 тыс. пар оснований), не исключено также, что в этом локусе транскрибируются несколько различных РНК.

РНК, комплементарная локусам 87A/C и кодирующая самый обильный из БТШ (БТШ-70), представлена в цитоплазме примерно равным количеством поли-А⁺ и поли-А⁻ РНК, причем в цитоплазме концентрация этих РНК выше, чем в ядре. Как уже упоминалось, в локусе 87С есть дополнительные последовательности, которые во время ТШ транскрибируются так же интенсивно, как и РНК, кодирующая БТШ-70. Однако оказалось, что в цитоплазму выходит в 5 раз меньше этих молекул и они не участвуют в трансляции. Функция этой РНК неизвестна [40, 48, 49].

Активация большинства генов ТШ происходит координированно, тем не менее, как видно из приведенных выше данных, дальнейшая судьба различных транскриптов неодинакова. Более того, даже синтезирующиеся в одном локусе РНК ведут себя по-разному: распределение их между ядром и цитоплазмой может быть различно. Таким образом, группа координированно образующихся РНК может регулироваться независимо на пост-транскрипционном уровне: во время процессинга первичного транскрипта и транспорта РНК в цитоплазму.

3. БЕЛКИ ТШ

Вызванные ТШ изменения активности генов у дрозофилы сопровождаются резкими изменениями в синтезе белков: начинается синтез нескольких новых полипептидов, а синтез большинства старых белков прекращается [10, 27, 31, 57].

Менее чем через 10 мин после повышения температуры предсуществующие в клетке полисомы разрушаются, а через некоторое время образуются новые, в которых содержатся мРНК, транскрибирующиеся при высокой температуре, синтезируются белки теплового шока - БТШ [31, 48, 53]. Интересно, что разрушение старых полисом происходит не в результате конкуренции старых и новых мРНК за рибосомы. Действительно, если одновременно с повышением температуры к клеткам добавить актиномицин D, то новые мРНК не синтезируются, но старые полисомы, тем не менее, разрушаются [31]. Старые мРНК относительно стабильны при высокой температуре, они сохраняются в цитоплазме [46], однако часть полиаденилированных РНК теряет свои поли-А концы [47]. Согласно работе [54], старые матрицы по-прежнему обнаруживаются во фракции полисом, однако в условиях ТШ они не транслируются. При снижении температуры на этих мРНК во-

обновляется синтез нормальных белков. Трансляция гистоновых мРНК и мРНК для небольшого набора других неидентифицированных белков оказывается нечувствительной к повышению температуры [47, 56].

Итак, в клетках дрозофилы существует некий механизм, который в условиях ТШ переключает трансляцию со старых РНК на новые. Природа этого переключения неясна. По-видимому, дело заключается не в особых свойствах вновь синтезированных РНК, а в свойствах белок-синтезирующего аппарата. Показано, что в бесклеточной системе, приготовленной из подвергнутых ТШ клеток дрозофилы, преимущественно транслируются РНК ТШ, а в системе из клеток, растущих при нормальной температуре, одинаково хорошо транслируются как мРНК ТШ, так и мРНК, синтезированные при нормальных условиях [47, 54].

Единственное пока обнаруженное отличие мРНК, образующихся при 25 и при 37°C - это строение экзона - групп, блокирующих 5'-конец мРНК и имеющих структуру $m^7GpppX(m)pY(m)pZp$ мРНК ТШ в X-положении этих групп содержат почти исключительно (95,7%) пурины, кроме этого наблюдается обычно большой процент, по сравнению с нормой, экзона $m^7GpppAmpAp$ [55].

Скорость инициации трансляции при 37°C составляет 8-14 рибосом в минуту, что соответствует данным, полученным для других эукариот. Одна полипептидная цепь синтезируется за 1,7-2,8 мин [56].

Во всех исследованных тканях дрозофилы, а также в клетках, культивируемых *in vitro*, в ответ на ТШ синтезируется одинаковый набор БТШ [10, 27], хотя обнаруживаются и небольшие различия, которые могут объясняться как посттрансляционной модификацией, так и различиями в транскрипции [29, 46].

В клетках *D. melanogaster* образуются БТШ с мол. массой 82 000, 70 000, 68 000, 36 000, 27 000, 26 000, 23 000 и 22 000 дальтон [27, 46] (рис. 3). Обозначим их как БТШ-82, БТШ-70 и т.д. У *D. virilis* синтезируется 6 БТШ с молекулярными массами, близкими к молекулярным массам БТШ *D. melanogaster* [29]. В дополнение к основным БТШ образуются несколько минорных компонентов, которые можно выявить только при очень больших экспозициях радиоавтографов.

При помощи трансляции мРНК ТШ в бесклеточной системе [29, 39, 45, 46] и путем гибридизации этих мРНК с кло-

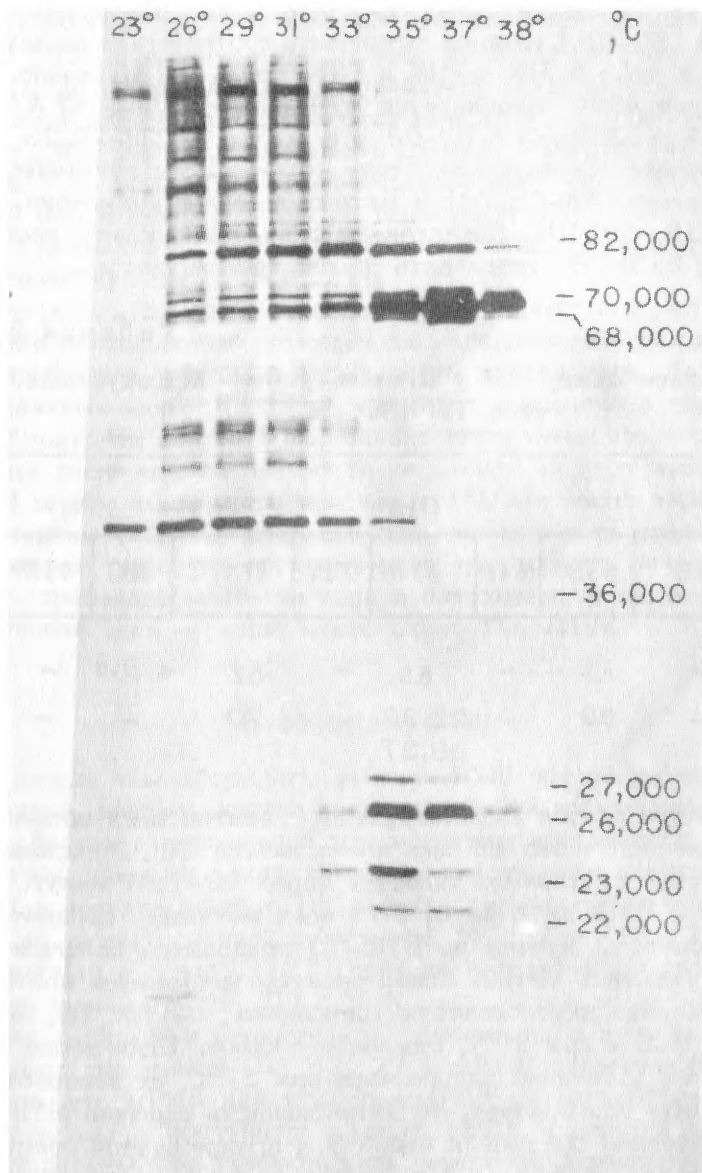


Рис. 3. Синтез белков в клетках *D. melanogaster* при разных температурах (полиакриламидный гель). Справа указан молекулярный вес основных белков, синтезируемых при ТШ, в дальтонах [46]

нированными последовательностями ДНК, комплементарными пуфам ТШ [58-65], удалось установить соответствие между различными пуфами ТШ, мРНК и БТШ (табл. 2). Показано, что в локусе 63BC кодируется БТШ-82, в локусах 87 А/С - БТШ-70, в 95D - БТШ-68 и в 67В - БТШ-22, 23, 26, 27. Эти данные были впоследствии подтверждены генетическими методами [66-68, 74] и методами геной инженерии [58, 62-65, 69-73]. Локализацию гена, кодирующего восьмой белок БТШ-36, установить до сих пор не удалось.

Таблица 2

Соответствие между ТШ у *D.melanogaster* и продуктами генов ТШ [40, 72, 74]

Кодируемое вещество	Пуф								
	33В	63В	64F	67В	70А	87А/С	87С	93D	95D
РНК	-	A1	-	A5	-	A2	α, β, α	-	A3
БТШ	-	82	-	22, 23 26, 27	-	70	-	-	68

В культуре клеток *D.melanogaster* синтез всех восьми БТШ начинается через 10 мин после начала ТШ. Максимальная скорость синтеза достигается через 90-120 минут. В это время в БТШ включается 90% всех меченых предшественников синтеза, причем на БТШ-70 приходится половина всей включившейся метки. Вслед за этим начинается постепенное снижение интенсивности трансляции мРНК ТШ, так что через 6-8 ч при 37°C она падает вдвое. Если после инкубации клеток в течение одного часа при 37°C их перенести в нормальную температуру, то интенсивность синтеза БТШ падает значительно быстрее и через 8 ч прекращается совсем. БТШ довольно стабильны и не разрушаются по крайней мере 20 часов. Благодаря своей стабильности и высокой интенсивности синтеза, при продолжительном температурном воздействии БТШ накапливаются в клетке, и через 6-8 ч после начала ТШ составляют до 10% всех клеточных белков [31, 39, 46].

Интересно, что максимальная скорость синтеза для различных БТШ достигается при разных температурах. Показано, что в культуре клеток *D.melanogaster* БТШ-82 в максимальных количествах образуется при 33°C, а БТШ-70 – при 37°C, при 33°C интенсивность синтеза БТШ-70 составляет лишь 10% от максимальной. Это означает, что соотношение БТШ неодинаково при разных температурах. Предполагается, что эти различия обусловлены неодинаковой концентрацией соответствующих мРНК [117].

Хотелось бы особо отметить чрезвычайно быстрый ответ клетки на повышение температуры: хромосомные локусы активируются в течение первой минуты воздействия. Добавление актиномина D одновременно с повышением температуры блокирует синтез БТШ, однако добавление его через 5 мин после начала ТШ почти не влияет на этот процесс [10]. БТШ можно обнаружить уже через 10 мин после перенесения клеток в 37°C, следовательно, на всю цепь процессов: активацию гена, синтез первичного транскрипта, его процессинг, транспорт мРНК из ядра в цитоплазму и синтез полипептидной цепи – уходит всего около 10 минут.

4. ФУНКЦИИ БТШ

Прежде чем обсуждать функции БТШ при повышенной температуре, следует кратко остановиться на возможной роли этих белков в нормальной жизнедеятельности клетки. Сейчас имеется довольно много данных о присутствии некоторых БТШ в неподвергшихся ТШ клетках эукариотических организмов на разных стадиях онтогенеза [47, 95, 126–129]. Зиммерман и соавт. [127], проводя гибридизацию различных клонированных генов ТШ с РНК, выделенной из яичников и ранних эмбрионов *Drosophila*, обнаружили в этих клетках матрицы для трех БТШ: 82, 27 и 26. Исследователи установили, что мРНК для этих трех БТШ синтезируются в питающих клетках и поступают в ооцит, где сохраняются до стадии бластодермы. Они предположили, что БТШ играют какую-то важную роль в оогенезе. Возможно, именно они обеспечивают репрессию генома до стадии бластодермы. О важной роли БТШ на ранних стадиях эмбриогенеза свидетельствуют также исследования Бенсауда с соавт. [128]. Как известно, самые первые этапы развития зародыша у различных организмов контролируются материнскими генами, благодаря мРНК, накоп-

ленным во время оогенеза. Собственный геном зародыша на ранних стадиях репрессирован и транскрипции РНК не происходит. У мыши геном зародыша активируется очень рано: на стадии двух бластомеров. Интересно, что этой активации предшествует уменьшение суммарной интенсивности синтеза белка и появление набора полипептидов с мол. массой 70 кд. Авторы показали, что эти белки, образующиеся на ранних этапах развития, идентичны БТШ-70 мыши.

Другой интересный случай описали Бинц и Гердон [129], работавшие с ооцитами *Xenopus*. Они установили, что при повышении температуры выше 31°C в ооцитах прекращается синтез всех белков, кроме БТШ-70. Замечательно, что энуклеация или применение α -аманитина, ингибирующего активность РНК-полимеразы II, не препятствует синтезу БТШ-70 в этих условиях, следовательно, эти клетки содержат большие количества мРНК, кодирующей БТШ-70, которая была транскрибирована в ходе созревания ооцита.

Если для маленьких БТШ *D.melanogaster* (22, 23, 26 и 27 кд) твердо установлено, что они могут синтезироваться и в нормальных условиях, то для "главного" БТШ, обнаруженного у самых разных организмов - белка с мол. массой 70 кд, ситуация более противоречивая. Некоторым авторам удалось детектировать этот белок в клетках *Drosophila* и при нормальной температуре, в то время как другие исследователи ставили под сомнение эти работы. Лишь в самые последние годы положение прояснилось. В 1982 г. Бузин и Петерсен [130] опубликовали результаты исследований, в которых они подвергли БТШ двумерному электрофорезу. Согласно их данным, БТШ-70 образуют 7 незначительно отличающихся по молекулярной массе групп, более того, в пределах каждой такой группы имеется несколько вариантов, различающихся по изоэлектрической точке. Эти результаты трудно было объяснить, исходя из известного числа копий генов для БТШ-70 [5-6]. Возможным объяснением служит посттрансляционная модификация этого белка. Можно также предположить, что на самом деле существует больше копий гена, кодирующих БТШ-70, чем считалось ранее. Последняя возможность нашла свое подтверждение в работах Инголиа и Крейга [131, 132], продемонстрировавших, что в геномах *Drosophila*, а также дрожжей, кроме копий гена для БТШ-70, индуцируемых при повышении температуры, существуют и другие копии, сохранившие 80-85% гомологии с генами для БТШ-70: так называемые "родственные" гены. Они транскри-

бируются при нормальной температуре и интенсивность их синтеза не увеличивается при ТШ. Интересно, что в геноме *D. melanogaster* эти "родственные" гены расположены в трех местах и только в 3-й хромосоме (70С, 87D и 88E). Существуют данные, свидетельствующие о том, что "родственные" гены образовались благодаря обратной транскрипции мРНК БТШ-70 с последующим встраиванием копии ДНК в хромосому. Существование этих дополнительных генов объясняет, во-первых, большое число вариантов БТШ-70, обнаруживаемое при двумерном электрофорезе и, во-вторых, становится ясно, почему разные авторы получали противоречивые данные о существовании БТШ-70 в клетках *Drosophila* при нормальной температуре. Лишь получение моноклональных антител, сильно повышающих чувствительность иммунологических тестов, показало, что в клетках *Drosophila* при нормальной температуре существует весьма низкое, едва детектируемое количество БТШ-70: примерно одна тысячная от такового при 35°C

Очень мало известно о структуре и свойствах белков, синтезируемых во время ТШ, не ясно также, каковы их непосредственные функции. Ранее уже упоминалось, что в отсутствие синтеза белка не происходит регрессии пuffed ТШ. Более того, клетка не в состоянии вернуться к синтезу "нормальных" белков при снижении температуры, если образование БТШ было подавлено [36]. Эти факты свидетельствуют о том, что БТШ могут играть роль в регуляции активности генов. При исследовании синтеза РНК во время ТШ и после него в присутствии ингибиторов синтеза белков показано, что БТШ скорее всего отвечают за возобновление транскрипции в тех локусах, которые были активны при 25°C, но, вероятно, не влияют на их репрессию во время инкубации клеток при высокой температуре [75].

Высказанное выше предположение о роли БТШ подтверждается также данными о внутриклеточном распределении этих белков [75-78, 134, 135]. Оказалось, что вскоре после синтеза БТШ транспортируются в ядро (кроме БТШ-82), где связываются с хромосомами. Распределение БТШ по хромосомам, согласно [75, 78], неслучайно: концентрация их в гетерохроматине значительно ниже, а в ядрышке в несколько раз выше по сравнению с остальными локусами. Однако в других работах [76, 79], а также в наших собственных исследованиях [138] не было зарегистрировано преимущественное связывание БТШ с активными при нормальной температуре локусами. Создастся скорее впечатление, что БТШ свя-

зываются с хроматином более или менее равномерно по длине хромосом. Часть БТШ, оставшаяся в цитоплазме, оказывается распределенной в ней более или менее равномерно с несколько большей концентрацией возле мембран.

Через 1 ч после начала ТШ около 80% синтезируемых в клетке БТШ-22,23,26,27 и 35% БТШ-68,70 находятся в ядрах. Если обработанные высокой температурой клетки далее инкубировать при 25°C, то через некоторое время БТШ начинают возвращаться в цитоплазму. В это время спектр синтезируемых в клетке РНК и белков приближается к нормальному. При повторном повышении температуры БТШ из цитоплазмы снова переходят в ядро.

Необычным кажется большое количество синтезируемых БТШ. Действительно, за 2 ч инкубации при высокой температуре в каждой клетке дрозофилы накапливается около $1,7 \times 10^7$ молекул БТШ-70 и $2,9 \times 10^6$ БТШ-82 [56]. Еще через несколько часов эти белки становятся самыми обильными белками в клетке: их количество превышает количество актина, который при 25°C синтезируется с наибольшей интенсивностью [78].

Интересно, что в момент своей максимальной аккумуляции в ядре БТШ составляют примерно 40% от всех гистонов (не считая H1). Подсчеты показывают, что на 10-17 нуклеосом во внеядрышковом хроматине приходится по одной молекуле каждого БТШ с малыми молекулярными массами, ядрышковый хроматин содержит этих белков примерно в 10 раз больше [75]. Сейчас трудно с уверенностью сказать взаимодействуют ли БТШ непосредственно с ДНК или какими-то другими белками хроматина. Бурдон [133], например, оценивал способность БТШ-72-74 человека связываться с ДНК, используя белковые блоты, и получил отрицательные результаты. Аналогичные данные получены и на *Drosophila*. У *Chironomus* также, по крайней мере, 2 из 9 БТШ вскоре после синтеза окисляются в ядре и связываются с хромосомами [79].

Приведенные выше данные говорят о том, что БТШ могут играть в клетке не только регуляторную, но и структурную роль. О том, что БТШ могут играть структурную роль, говорит весьма интересный факт о 40%-ной гомологии низкомолекулярных БТШ *D.melanogaster* и α -кристаллина млекопитающих [131], являющимся основным структурным компонентом глазной линзы позвоночных. Молекулы α -кристаллина образуют большие агрегаты в линзе, что придает ей уникальные структурные свойства. Показано, что "маленькие" БТШ также

образуют агрегаты в ядрах клеток *D.melanogaster* во время ТШ [93, 94].

Более того, Шлезенгер с соавт. [136] показали, что два БТШ в клетках щипленка (БТШ-70 и БТШ-24) связаны с цитоскелетом. Цитоскелет, оказывается, участвует в ответе на ТШ и у *Drosophila* [137]. После повышения температуры до 37°C два белка с мол. массой 46 и 40 кд, в норме находящиеся в цитоскелете и связанные с микросомной фракцией, образуют агрегаты вокруг ядер клеток культуры. Белок с мол. массой 46 кд напоминает виментин – компонент цитоскелета у позвоночных. Виментиновые филаменты дезинтегрируют при ТШ, а сам белок может быть обнаружен после ТШ вокруг ядра.

В настоящее время нет общего мнения ни о содержании разных БТШ в клетках при нормальной температуре, ни о функции БТШ в этих условиях, однако роль этих белков при повышении температуры не вызывает ни у кого сомнения.

О важной роли этих белков свидетельствуют прежде всего данные о высокой гомологии генов, кодирующих БТШ у разных организмов. Так, клонированный ген для БТШ-70 дрозофилы гибридизовался с последовательностями ДНК человека, мыши, кур, ящериц, дрожжей и кукурузы. То же самое касается, естественно, и самих БТШ. Проведенный анализ показал, что БТШ-70 дрожжей проявляет 72%-ную гомологию по аминокислотной последовательности с соответствующим белком дрозофилы [132]. Показано также, что антитела к двум главным БТШ щипленка проявляют кросс-реакцию со сходными белками, выделенными из самых разных организмов [136].

Кроме приведенных косвенных данных о важной роли БТШ в клетке при резком повышении температуры, существуют результаты, прямо свидетельствующие о "спасающей" функции этих белков. Так показано, что у *Drosophila* "маленькие" БТШ появляются в клетках в конце 3-го личиночного возраста и в предкуколке, а также в культуре клеток под действием гормона экдизона. Интересно, что личинки ранних возрастов и клетки в культуре погибают, если их подвергнуть нагреванию до 40,5°C в течение 25 мин, в то время как предварительно обработанные экдизоном клетки и предкуколки *Drosophila* переносят такое воздействие [139].

Мак Алистер и Финкельстейн [140] показали, что если дрожжи *Saccharomyces cerevisie* подвергнуть тепловому шоку, перенеся на 90 мин из 23 в 36°C, то они могут пережить нагревание до 52°C, которое убивает клетки, предварительно

не нагревавшиеся. В опытах с циклогексимидом показана корреляция между содержанием в клетках БТШ-100 и их терморезистентностью. Исследователям удалось также получить *ts* -мутант с нарушенным транспортом мРНК ТШ из ядра в цитоплазму. Этот мутант гибнет при повышении температуры. Аналогичный мутант, обнаруженный у *D. melanogaster*, подробно описан нами в разд. 6.

Интересные результаты были получены недавно на проростках сои [141]. При повышении температуры до 40°C происходит резкое увеличение включения ³H -лейцина в белки, дальнейшее нагревание приводит к уменьшению включения меченого лейцина. Если же проростки предварительно выдержать 2 ч при температуре 40°C, то впоследствии наблюдается высокий уровень включения этого предшественника в БТШ даже при температурах 45-47,5°C.

Ямамори и Юра [142] выделили *ts* -нонсенс мутант у *E. coli* с нарушенной системой ответа на ТШ. Оказалось, что продукт, контролируемый мутантным геном, необходим для активной транскрипции индуцируемых высокой температурой оперонов у этого организма.

Таким образом, опыты с применением ингибиторов белкового синтеза, а также исследования, в которых удалось получить мутации в генах, контролирующих ответ клетки на ТШ, однозначно свидетельствуют о важной "спасающей" роли БТШ при резком повышении температуры.

Еще об одной возможной функции БТШ говорит тот факт, что предсуществующие мРНК оказываются менее стабильными во время ТШ, если синтез БТШ подавлен. Возможно, это свидетельствует о том, что некоторые БТШ могут играть роль белков, защищающих РНК от действия нуклеаз [78].

Кроме того, во время ТШ изменяется активность и кинетические характеристики некоторых ферментов, участвующих в процессах дыхания. Например, увеличивается K_M для митохондриальной α -глицерофосфатоксидазы [35]. Также возрастает V_{\max} для НАДН-дегидрогеназы. Причем последнее изменение зависит от синтеза РНК и белка *de novo* [25, 80, 81]. Однако существующих сейчас данных недостаточно для того, чтобы говорить о локализации в пуфах ТШ генов, кодирующих эти ферменты. Повышение температуры может индуцировать фермент, не связанный с митохондриями, а именно кутикулярную глутаминсинтетазу I [82], которая является продуктом гена, *ebony*, локализованного в районе 93D, где находится один из самых активных пуфов ТШ. Однако впо-

следствии выяснилось, что этот ген просто очень тесно сцеплен с геном ТШ [83]. По-видимому, в настоящее время только локализация гена тирозинаминотрансферазы в локусе 48BC *D. hydei*, который активируется высокой температурой и, специфически, витамином В₆ (кофермент тирозин аминотрансферазы), может считаться твердо установленной [84-87]. Помимо этого, было показано, что в культуре клеток HeLa при повышении температуры падает активность связанной с мембранами Na⁺/K⁺ АТФазы. Эта активность может быть частично восстановлена при понижении температуры до нормальной. Восстановление активности блокируется актиномицином D и циклогексимидом [133]. Поскольку максимальное восстановление активности этого фермента по времени совпадает с максимальной интенсивностью синтеза БТШ, автор полагает, что эти белки могут способствовать восстановлению нормальной работы Na⁺/K⁺ АТФазы. Следует отметить также тот факт, что трансформирующий белок вируса саркомы Рауса, pp60^{src}, взаимодействует в эмбриональных фибробластах цыпленка с двумя полипептидами pp50 и pp90. Последний из них является БТШ [143, 144]. Он, по-видимому, эквивалентен БТШ-84 *D. melanogaster*. Биологическое значение комплексования этих трех белков, как и роль pp90 в нем, неизвестны.

5. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОВ ТШ

В последнее время у таких различных организмов, как *E. coli* [88], дрожжи [89], хламидомонада [90], *Naegleria* [91], тетрахимена [92, 93], слизневой гриб [94, 95], кукуруза [96, 97], табак и горох [98] и даже в куриных фибробластах и клетках млекопитающих [99] были обнаружены БТШ, более или менее сходные по молекулярной массе с аналогичными белками дрозофилы. Такое широкое распространение, исключительно интенсивный синтез и характерное поведение этих белков при ТШ, несомненно, свидетельствует об их важной роли в жизни клетки. Многие гены "домашнего хозяйства", такие как гистоновые или рибосомные, весьма консервативны в эволюции. Очевидно, и гены ТШ не являются в этом отношении исключением.

В последние годы были выделены и клонированы почти все гены *D. melanogaster* активирующиеся при повышении темпе-

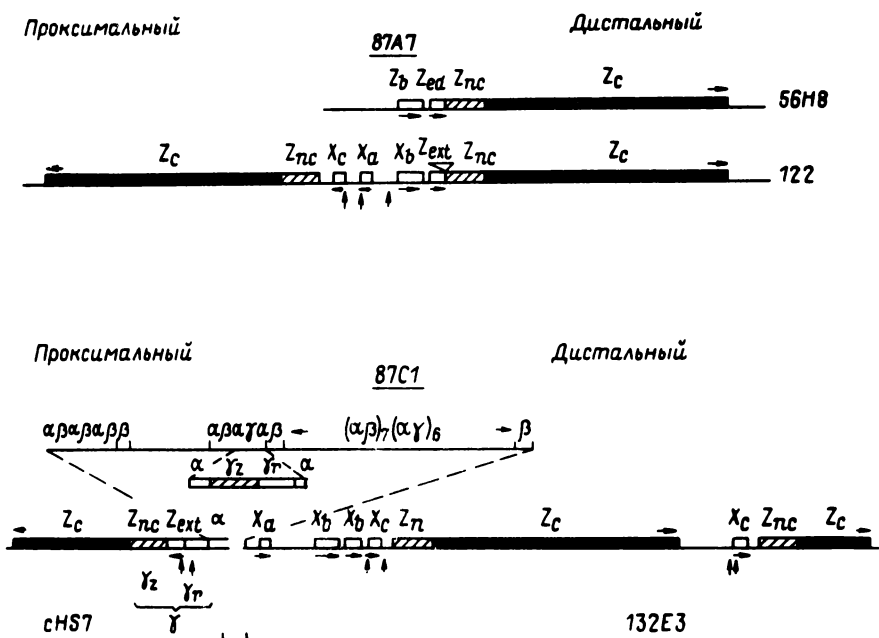


Рис. 4. Расположение гомологических последовательностей БТШ-70 в районах 87A7 и 87C1 у *D. melanogaster*. Z_c - кодирующие БТШ-70 элементы примерно 2,2 т.п.н. в длину, комплементарные мРНК Z_{nc} - различные элементы, не кодирующие никакого белка; имеют длину порядка 0,35 т.п.н. Другие элементы, встречающиеся в обоих локусах, обозначены Z_{ext} , X_a , X_b , X_c . $(\alpha, \beta)_7$, $(\alpha, \gamma)_6$ - короткие повторяющиеся последовательности, ограниченные локусом 87C1 и хромосомом. Функция их неизвестна. Стрелка над Z_c показывает направление транскрипции. Стрелки под обозначенными элементами отражают их взаимную ориентацию. Стрелки, идущие вверх, показывают места, в которых наблюдали внедрение повторяющихся последовательностей в изучаемые локусы. 56N8, 122, cHS7 и 132E3 - названия рекомбинантных клонов [103]

ратуры, что позволило подробно изучить их структуру. Особенно хорошо исследованы гены, кодирующие основной белок ТШ - БТШ-70 [58-61, 68-73, 100-106]. Они расположены в диске 87A7, в котором находятся две копии гена, и в диске 87C1 который в зависимости от линии дрозофилы содержит от 3 до 5 копий (рис. 4). Каждый такой ген представ-

ляет собой последовательность ДНК длиной в 2,5 т.п.о., не содержащую интронов, причем 0,25 т.п.о. на 5'-конце не транслируются. Две копии гена для БТШ-70, локализованные в диске 87A7, находятся друг от друга на расстоянии 1,7 т.п.о. и транскрибируются с разных нитей ДНК, то есть представляют собой обращенный повтор. В диске 87C1 одна копия гена отделена от двух остальных, транскрибирующихся в другом направлении отрезком ДНК примерно в 39 кб, в котором локализованы короткие повторы, так называемые α, β -элементы. Они транскрибируются при ТШ, но, по-видимому, не транслируются. Кроме локуса $C1, \alpha, \beta$ -элементы локализованы в хромоцентре и некоторых других участках хромосомом, но там, однако, они не организованы в тандемные повторы и не транскрибируются.

Оказалось, что гены, кодирующие БТШ-70, могут быть организованы и по-другому: получены плазмиды, содержащие геномную ДНК из локуса 87C1, где эти гены считываются в одном направлении и разделены спейсерами меньших размеров. Такие отличия могут объясняться особенностями линий или культур клеток дрозофилы, из которых эти гены были выделены, или тем, что в некоторых случаях была клонирована только часть ДНК, содержащейся в исследуемом диске.

Изучение последовательностей, кодирующих основной белок ТШ, у ряда видов, близких к *D. melanogaster*, путем построения подробных рестрикционных карт, показало, их высокую консервативность и позволило высказать предположение о внутри- и межлокусной конверсии, служащей коррекционным механизмом для поддержания их гомологии. Последовательности, фланкирующие гены для БТШ-70, дивергировали сильнее, чем сами гены. α, β -элементы, не кодирующие никакого белка, полностью отсутствуют в соответствующих локусах близких видов и, по-видимому, не влияют на фертильность и выживаемость мух [106].

О консервативности генов, кодирующих БТШ, свидетельствуют также данные экспериментов по гибридизации *in situ* мРНК, образующихся при ТШ в клетках одного вида дрозофилы, с политенными хромосомами других отдаленных видов. Так, в наших опытах мРНК, выделенная из культуры клеток *D. melanogaster* после ТШ, эффективно гибридизовалась с несколькими локусами хромосом *D. virilis* - вида, относящегося к другому подроду [107]. На основании такой перекрестной гибридизации можно лучше представить себе гомо-

логию различных участков генома отдаленных видов дрозофилы (см. табл. 3).

Таблица 3

Гомология различных пуфов ТШ у некоторых видов *Drosophila* [8, 107, 112]*

<i>D. melanogaster</i>	63BC	87A/C	87C	93D	95D	-
<i>D. hydei</i>	81B	32A	-	0	36A	48BC
<i>D. virilis</i>	33E	29C	-	20F	0	20CD
<i>D. pseudoobscura</i>	XP-23	2-53,58	0	0	0	0

* - - обозначает отсутствие гомологичного локуса у другого вида;

0 - обозначает отсутствие данных

Однако не все гены, активируемые ТШ, консервативны. Помимо упоминавшихся уже α , β -элементов, существует, по крайней мере, по одному локусу у *D. hydei* [48BC] и *D. virilis* (20CD), которые характеризуются рядом особенностей, отличающих их от остальных пуфов ТШ: они развиваются на основе 4-5 дисков [7,12]; специфически индуцируются витамином B_6 [7, 108]; в обоих локусах обнаружены сложные РНП-частицы [108, 109, 114], и в них транскрибируется несколько различных РНК, часть из которых не выходит в цитоплазму [12, 84, 109, 110].

В то же время эти локусы, объединяющие их с другими, пуфами ТШ. Например, то, что часть транскриптов, образующихся в локусах 48BC и 20CD, не выходит из ядра, делает их похожими на пуф 87C1 *D. melanogaster* [48], а данные по тесному сцеплению локуса 48BC с геном *ebony* позволяют предположить, что он гомологичен 93 *D. melanogaster* и 20F *D. virilis* [107, 113]. Однако в пуфе 87C1 не обнаружено сложных РНП-частиц [109], и ни один район *D. melanogaster*, так же как и локус 20F *D. virilis* не активируется витамином B_6 (пуф 93D можно индуцировать бензамидом) [111]. Более того, при гибридизации РНК ТШ, выделенной из клеток *D. melanogaster* и *D. virilis* с хромосомами

D. hydei, оказалось, что среди них нет последовательностей, комплементарных локусу 48BC [112].

Все это позволяет сделать вывод о том, что, хотя многие гены, кодирующие БТШ, консервативны в эволюции (во всяком случае в пределах рода *Drosophila*), существуют, однако, последовательности ДНК, также принимающие участие в ответе генома на ТШ, которые дивергировали достаточно сильно даже внутри этого рода.

В разд. 5 в основном рассматривались данные о структуре и эволюции генов, кодирующих главный белок ТШ, (БТШ-70). Это вполне понятно, поскольку они изучены лучше других. В последнее время, однако, появляется все больше работ, посвященных и другим генам ТШ.

Было показано, что гены, кодирующие остальные БТШ, представлены в геноме уникальными последовательностями ДНК и не содержат интронов [58, 64], за исключением гена для БТШ-82, в котором обнаружена инсерция длиной в 1 т.п.о. [64]. Неожиданно была выявлена значительная гомология последовательностей, кодирующих БТШ-68 и БТШ-70 [58], в то время как анализ триптических пептидов не показал сколько-нибудь существенной гомологии в аминокислотной последовательности этих белков [46].

Недавно был клонирован отрезок ДНК в 11 т.п.о., который гибридизуется с районом 67B *D. melanogaster* и содержит гены, ответственные за синтез всех четырех низкомолекулярных БТШ [62-64]. Интересно, что гены для БТШ-27, -23 и -22 транскрибируются в одном направлении, тогда как участок, кодирующий БТШ-26, - в обратном. В этом отношении они напоминают кластер гистоновых генов дрозофилы.

Появились работы по сиквенированию генов ТШ и прилежащих к ним последовательностей [102, 104, 146-150], что позволило подробнее исследовать участки ДНК, играющие роль в регуляции транскрипции этих генов (см. разд. 6).

6. КОНТРОЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ТШ

Быстрое координированное включение генов ТШ, а также детально прослеженный путь реализации их генетической информации позволяет на этой модели вплотную подойти к изучению регуляции активности генов. Накопленные к настоящему моменту данные об экспрессии генов ТШ, позволяют говорить о том, что их регуляция представляет собой многоэтапный про-

цесс. Прежде всего она осуществляется на уровне транскрипции. Об этом говорят факты неодинаковой транскрипции генов ТШ. Так, наряду с локусами, специфически активирующимися только при ТШ, есть гены, которые хотя и слабо, но работают и при нормальной температуре (такие как 81B *D.hydrei*, 20CD *D.virilis* и 87A *D.melanogaster*). Интенсивность транскрипции этих генов при 37°C возрастает во много раз [7, 32, 47]. Кроме этого, некоторые пуфы ТШ можно индуцировать независимо от остальных действием витамина B₆ (48BC и 20CD), колхицина (20CD), действием бензамида или инкубацией в старой среде Грейса (93D). И, наоборот, при действии антимицина А и 2-гептил-4-гидрокси-хинолина N-оксида у *D.hydrei* активируются все гены ТШ, за исключением 81B (см. табл.1). Наконец, интенсивность транскрипции в пуфе 93D *D.melanogaster* не координирована с интенсивностью этого процесса в остальных пуфах ТШ [122]. Более того, недавно было показано, что особи, несущие гомозиготную делецию по локусу 93D, способны образовывать все белки ТШ. Таким образом, локус 93D не кодирует никакого белка ТШ и, по-видимому, не нужен для регуляции всей системы генов ТШ.

Как уже упоминалось в предыдущих разделах этого обзора (см. разд. 2), судьба РНК, транскрибированной в локусах 87A7, 87C1 и 93D, совершенно различна. Это говорит о том, что регуляция работы генов ТШ происходит и на следующем этапе: во время процессинга первичных транскриптов и транспорта зрелых мРНК из ядра в цитоплазму.

Можно утверждать, что существует и трансляционный уровень регуляции, так как старые мРНК во время ТШ сохраняются в цитоплазме, но перестают транслироваться и, кроме этого, не все РНК, синтезированные при ТШ и вышедшие из ядра, участвуют в трансляции (см. разд. 2).

Таким образом, события, происходящие на посттранскрипционном уровне, могут значительно модифицировать работу генома.

Говоря о регуляции генов, следует различать две стороны этого процесса. С одной стороны, каждый ген, в том числе и гены ТШ, очевидно, имеют последовательности, с которыми связывается агент-регулятор, индуцирующий транскрипцию этих генов. С другой стороны, вещества, обладающие регулирующей (в данном случае, мы говорим об индуцирующей) функцией, также должны где-то вырабатываться, и их происхождение и структура заслуживают особого внимания. Следует оговориться, что быстро и координированно запускаемая при повышении

температуры (и при прочих воздействиях) система генов ТШ, несомненно, должна регулироваться специфическим образом и отличаться в этом отношении от других "нормальных" уникальных генов, определяющих онтогенетическое развитие организма и жизнедеятельность клетки в обычных условиях.

Еще в 1969 г. Бриттен и Дэвидсон сформулировали представление о батареях генов, имеющих идентичные или сходные последовательности ДНК около своих 5'-концов и включающихся при взаимодействии с одним и тем же индуктором [145]. Сейчас можно с уверенностью сказать, что такие батареи генов не так уж часто встречаются в геномах высших организмов и являются скорее исключением, чем правилом. Однако они все же существуют и обеспечивают, например, быструю координированную реакцию клетки при действии экстремальных факторов. Что же известно в настоящий момент о регуляторных последовательностях для генов ТШ? При сравнении последовательностей, прилегающих к 5'-концу различных генов ТШ, некоторые исследователи обнаружили определенную гомологию и симметрию [146], однако без экспериментальной проверки оценить значение этих участков ДНК было затруднительно. Тестами такого рода послужили опыты по трансформации клеток различных организмов плазмидами, содержащими гены ТШ дрозофилы. Так, Корцес с соавт. [147, 148] трансформировали L-клетки мышцы плазмидой pBR 229, содержащей участок ДНК в 2,25 т.п.о., соответствующий мРНК для БТШ-70, и фрагменты в 1,1 и 0,2 т.п.о. прилегающие к 5' и 3' концам этого гена, соответственно. При повышении температуры до 43°C (ТШ для клеток млекопитающих) в клетках трансформированной линии происходил синтез нормальных по размеру мРНК БТШ-70. Для более точной локализации регуляторных последовательностей был сконструирован химерный ген, содержащий 1,3 т.п.о. фрагмент плазмиды pPW 229, введенный посредством BamHI в сайт, находящийся за 59 н.п. до первого АТГ-триплета кодирующей области гена гормона роста человека. Таким же образом был сконструирован другой химерный ген, где этот же кусок ДНК дрозофилы был сцеплен с геном тимидинкиназы вируса герпеса (рис. 5). При ТШ и в первом и во втором случае появляются транскрипты такой длины, которую следует ожидать, если синтез РНК начинается на дрозофилиной ДНК. В дальнейшем были проведены опыты с делециями в районе, прилегающем к 5'-концу

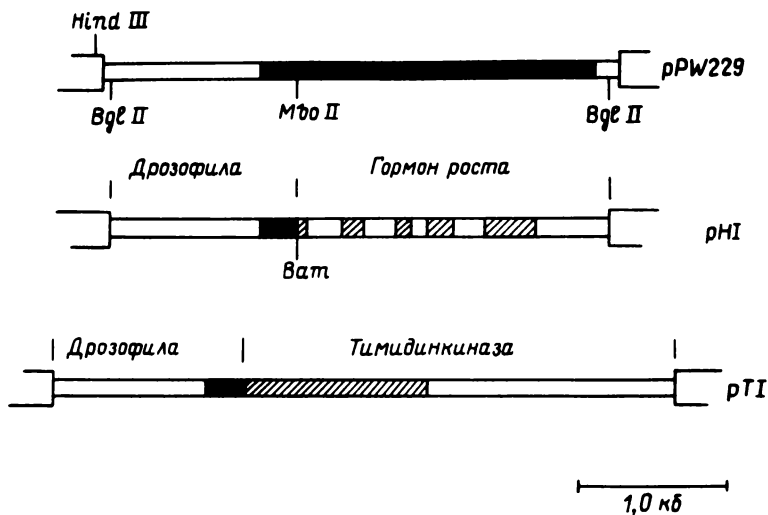


Рис. 5. Карты плазмиды pRW229, содержащей последовательность *D.melanogaster*, а также химерных плазмид pNI и pTI. □ - Транскрибируемая область гена БТШ-70 *D.melanogaster*. ▨ - 5 экзонов гена человеческого гормона роста в pNI и транскрибируемая область гена тимидинкиназы в pTI. Транскрипция идет слева направо. Указаны сайты рестрикции [147]

гена БТШ-70 в соответствующих плазидах. Эти эксперименты показали, что участки ДНК, расположенные левее -51 н.п., не необходимы для ответа на ТШ. Для включения этого гена при повышении температуры достаточно присутствия последовательности в 249 н.п., простирающейся от -51 до +199 н.п.

Аналогичные результаты получил Миро с соавт. [149], используя вектор, полученный из плазмиды pBR322 и несущей небольшой фрагмент ДНК вируса SV = 40 с началом репликации. Гены дрозофилы, кодирующие БТШ-70, были клонированы в этом векторе с ориентации, противоположной вставленному раннему промотору SV = 40. В одном случае использовали ген, локализованный в локусе 87A7, а в другом - в 87C1. И в том и в другом варианте отсутствовала примерно половина области, прилежащей с 5'-конца ко всем генам для БТШ-70 дрозофилы. Плазмиды также не содержали полного 72 н.п. повтора, необходимого для вирусной транскрипции. Для трансформации была использована

линия клеток обезьяны CV-1, трансформированная мутантом SV-40, дефектным по началу репликации, но нормальным по экспрессии Т-антигена. Такие клетки (они обозначаются как COS) способны обеспечить высокий уровень репликации любой плазмиды, содержащий начало репликации SV-40. При повышении температуры гены дрозофилы оказались способны к активации в клетках обезьяны. Более того, они активировались и при действии арсенита. Опыты с делетированными плазмидами показали, что для ответа на ТШ необходима последовательность ДНК примерно в 70 н.п., прилегающая к 5'-концу гена для БТШ-70.

Наиболее детальный анализ последовательностей, необходимых для активации генов ТШ провели Пэлхэм и Бинц [150]. В своей работе они использовали плазмиду, содержащую полный ген, кодирующий БТШ-70 и 600 н.п. ниже гена тимидинкиназы вируса герпеса. Такой плазмидой они трансформировали как линию COS, так и ооциты *Xenopus*. Эти исследователи показали, что для индукции гена БТШ-70C высокой температурой не нужна последовательность, кодирующая мРНК. Они сконструировали плазмиду, в которой область ДНК дрозофилы размером в 2 т.п.о. правее позиции -10 была пришта к соответствующему сайту гена тимидинкиназы. Получившийся гибрид оказался индуцибельным в COS клетках при высокой температуре. Опыты с делециями показали, что для индукции вполне хватает участка от -10 до -186. Более того, дальнейшие эксперименты еще точнее определили регуляторную область: так делеция последовательностей ДНК, находящихся левее позиции -66, не препятствовали полной индукции гена, мутант с делецией участка до -44 нуклеотида характеризовался слабой транскрипцией как при нормальной, так и при повышенной температуре, при этом считывание начиналось с правильного места и молекулы РНК имели обычный размер. Однако делеция до -28 нуклеотида, затрагивающая ТАТА-последовательность, приводила к полному прекращению транскрипции. Аналогичные результаты были получены при использовании этих плазмид для трансформации ооцитов *Xenopus*.

Анализ последовательностей в районе от -47 до -66 от 5'-конца различных генов ТШ показал наличие определенной гомологии этих участков. Более того, гомологичные последовательности ассоциированы с инвертированными повторами, что характерно для многих сайтов, связывающихся с белками. Следует подчеркнуть, что такая гомология не абсолютна, и разные гены ТШ сохранили ее в неодинаковой степени.

Что же известно о веществах, регулирующих включение генов ТШ и существует ли вообще такой индуктор? Хотя гены ТШ включаются под самыми разными воздействиями (правильнее было бы называть их генами стресса), предполагается, что все они активируют один специфический индуктор который в свою очередь связывается с регуляторными последовательностями генов ТШ, что и приводит к их запуску. Этот гипотетический индуктор, по-видимому, всегда находится в цитоплазме и при ТШ происходит лишь его активация. Вывод можно сделать, во-первых, на основании скорости индукции генов ТШ (всего 1-2 мин) и, во-вторых, основываясь на опытах с ингибиторами белкового синтеза, продемонстрировавшими, что индукция этих генов происходит и при отсутствии белкового синтеза. Выше уже было рассказано об исследованиях, в которых предпринималась попытка доказать, что индуцирующий фактор может находиться в митохондриях (см. разд. 1). К сожалению, эти работы до сих пор не имеют продолжения. Попытку выделить агент - активатор системы ТШ предпринял Боннер [151], который добавлял к ядрам слонных желез цитозоль из культуры клеток дрозофилы, подвергшихся ТШ, и наблюдал индукцию всех пуфов ТШ. Он попытался также очистить активатор генов ТШ с помощью хроматографии на сефадексе G-200. Две полученные фракции белковой природы активировали, согласно Боннеру, разные пуфы. В последних работах этот автор показал, что индуцирующий фактор термостабилен [152].

Крейн и Корнберг [153], использовавшие в качестве модельной системы изолированные диплоидные ядра культуры клеток дрозофилы, также наблюдали индукцию транскрипции генов ТШ во время инкубации ядер с экстрактом цитоплазмы прогретых до 37°C клеток. Эти исследователи сообщили о частичной очистке индуцирующего фактора белковой природы. Интересно, что со времени публикации этих работ прошло уже несколько лет, а новых данных о веществе и/или веществах, регулирующих работу генов ТШ, пока не появилось. Единственным исключением служат работы из лаборатории Геринга [52, 154]. Используя метод, при котором комплексы ДНК-белок связываются с нитроцеллюлозными фильтрами, исследователи показали, что в ядрах личинок *D. melanogaster* третьего возраста имеется белковый компонент, способный специфически связываться со сравнительно короткой последовательностью, находящиеся за 0,8-1 т.п.о. от 5'-конца гена, кодирующего БТШ-70. В последних исследованиях Джек и Ге-

ринг [155] использовали клонированную ДНК из локусов 87А, 87С и 67В и проводили поиск последовательностей, специфически связывающихся с ядерными белками. Установлено, что сайты связывания для всех изученных генов не только находятся на разном расстоянии от кодирующей области генов ТШ, но даже не всегда расположены на 5'-конце. Примечательно, что последовательности такого рода никогда не присутствуют внутри генов. С одной стороны, из работ по трансформации различных клеток [147-150]. Известна локализация последовательностей, необходимых для успешной индукции генов ТШ. Ясно, что ни белки, ни последовательности, обнаруженные в работах Геринга, не играют непосредственной регуляторной роли (расположение РНК-полимеразы, контроль точной инициации транскрипции). С другой стороны, поскольку исследователям не удалось обнаружить аналогичные сайты связывания на других клонированных генах дрозофилы таких, например, как гистоновые гены и ген для алкогольдегидрогеназы, можно предположить, что найденные ими белки обеспечивают определенное состояние хроматина, необходимое для быстрой индукции транскрипции при ТШ.

Простота индукции, а также наличие всех клонированных генов ТШ сделали эти локусы популярной моделью для исследования хроматина. При этом хроматин до и после ТШ подвергают слабому перевариванию ДНКазой I, микрококковой или стафилококковой нуклеазой и фракционируют на агарозном геле. После переноса на нитроцеллюлозу по Саузерну гибридизуют полученные фрагменты с различными ³²P-мечеными клонированными последовательностями генов ТШ. Используя такой подход, Карл Ву [156, 157] локализовал последовательности ДНК, проявляющие гиперчувствительность к ДНКазе у ряда генов ТШ. Так, для генов, кодирующих БТШ-70, обнаружены два близко расположенных гиперчувствительных района, прилегающих и захватывающих 5'-область кодирующей последовательности. Первый из них расположен от -38 до -215 н.п., второй - от -8 до +100. Интересно, что участок в 30 н.п., находящийся между ними, сравнительно менее чувствителен к нуклеазе, причем ТАТА-бокс, как ни странно, лежит в этой нечувствительной зоне. Примечательно, что подобные гиперчувствительные области расположены в идентичных сайтах всех пяти генов БТШ-70. Гиперчувствительная к ДНКазе I область была обнаружена также вблизи 5'-конца гена БТШ-83, причем она также захватывала и часть кодирующей мРНК последовательности.

Что же происходит с хроматином при повышении температуры? Работы ряда авторов [158-160] позволили заключить, что при индукции генов ТШ вся область, участвующая в транскрипции, становится чувствительной к ДНКазе I, однако уровень этой чувствительности ниже, чем в случае гиперчувствительных зон, описанных выше. На основании анализа продуктов переваривания хроматина при ТШ многие исследователи считают, что в индуцированных локусах каким-то образом нарушена нуклеосомная структура, высказывалось также предположение об отсутствии нуклеосом в гиперчувствительных зонах.

Интересные данные в этом отношении были получены в лаборатории А.Д. Мирзабекова [161]. Исследователи анализировали присутствие гистонов в различных участках гена для БТШ-70, пришивая гистоны к модифицированной диметилсульфатом ДНК. После пришивки свободные фрагменты ДНК, а также последовательности, ассоциированные с гистонами H1 или остальными гистонами, разделяли в двумерном электрофорезе, переносили на ДВН-бумагу и гибридизовали с различными ³²P-мечеными клонированными последовательностями. Исследователи продемонстрировали отсутствие всех гистонов, включая и H1 в гиперчувствительной зоне, прилегающей к 5'-концу структурных генов БТШ-70. Наличие таких свободных от нуклеосом последовательностей и обеспечивает, по-видимому, исключительно быструю индукцию этих генов в ответ на повышение температуры. Исследователи показали, что во время ТШ сначала H1, а затем и все остальные гистоны исчезают из кодирующей БТШ-70 области, что делает ее полностью доступной для нуклеаз. Отсутствие нуклеосомной структуры Мирзабеков с соавт. приписывают действию большого числа молекул РНК-полимеразы, с большой скоростью двигающихся по транскрибируемой области.

Если, в результате использования клонированных последовательностей, сейчас более или менее хорошо известно, что происходит при повышении температуры на уровне хроматина и какие именно последовательности ДНК нужны для индукции транскрипции генов ТШ, то дальнейшие этапы регуляции экспрессии этой системы изучены недостаточно.

Известно, что, кроме активации генов ТШ, повышение температуры приводит у *Drosophila* к очень быстрому ингибированию транскрипции почти всех других активных до начала ТШ генов. Неясно, что именно приводит к репрессии этих генов, почему в этих условиях РНК-полимераза II успешно считывает локусы ТШ и перестает транскрибировать другие гены

[13-15]. Сами БТШ здесь, по-видимому, ни при чем: во-первых, выключение остальных генов происходит чрезвычайно быстро и, во-вторых, отсутствие белкового синтеза никак не сказывается на этом процессе [75].

Как уже отмечалось, мРНК, синтезированные при 25°C, сохраняются в цитоплазме и после повышения температуры, однако при этих условиях происходит трансляция только БТШ. Интересно, что при промежуточных температурах (например, при 33°C) мРНК БТШ также активно продуцируются в клетках, но в этом случае белок-синтезирующий аппарат "не отличает" их от мРНК, образованных в нормальных условиях, поэтому происходит синтез и обычных белков и БТШ [115].

Таким образом, в клетках *Drosophila* существует какой-то механизм, способный отличать эти два вида мРНК. Такая дискриминация зависит не от каких-либо свойств самих мРНК, а возникает в клетке при повышении температуры.

Особый интерес представляет контроль возвращения клетки к нормальной жизнедеятельности после снятия ТШ. Известно, что в большинстве изученных случаев при повышении температуры происходит интенсивный синтез БТШ, который затем постепенно снижается, даже если организм по-прежнему находится в условиях повышенной температуры [10]. Если же температура снижается до оптимальной (25°C для дрозофилы, 37°C - для культур клеток млекопитающих), то восстановление нормального синтеза РНК и белков происходит довольно быстро. Скорость этого процесса зависит от времени воздействия высокой температурой на клетки и от перепада температур, иными словами: зависит от интенсивности ТШ. Интересно, что если мРНК, синтезированные при 25°C, сохраняются в интактном состоянии во времени ТШ у *D. melanogaster*, то мРНК для БТШ после прекращения температурного воздействия подвергаются быстрой избирательной деградации [116]. В этом процессе по-видимому, играют роль сами БТШ. Показательны здесь исследования Линдквист с соавт. [118]. Для того, чтобы доказать ауторегуляцию синтеза БТШ, были заблокированы функции БТШ при помощи введения в инкубационную смесь при ТШ аналогов аминокислот. В этом случае после возвращения клеток в условия нормальной температуры синтез обычных белков и оставался по-прежнему заблокированным, а синтез БТШ продолжал идти с высокой интенсивностью. Это было обусловлено как образованием мРНК для БТШ, так и их высокой стабильностью.

Ауторегуляцию на уровне транскрипции исследовали, блокируя синтез БТШ циклогексимидом с последующим анализом образующихся мРНК и белков. Если в отсутствие циклогексамида клетки, подвергнутые в течение одного часа ТШ, возвращали в нормальные условия, то синтез мРНК для БТШ прекращался и восстанавливался синтез обычного набора мРНК. Напротив, при добавлении этого ингибитора белкового синтеза непосредственно перед ТШ транскрипция, характерная для ТШ, оставалась неизменной в течение нескольких часов и при 25 °С.

Таким образом, БТШ, защищающие клетку от вредного действия повышенной температуры, способны ингибировать свой собственный синтез и способствуют реактивации нормального синтеза.

Сходные результаты получил и Боннер [152], работавший на системе ядер слонных желез дрозофилы. Он показал, что индуктор пуфов ТШ находится в цитоплазме прогретых клеток. Этот индуктор выдерживает двухминутное кипячение, чувствителен к обработке трипсином и не связывается с гидроксипатитом. С другой стороны, в цитоплазме прогретых клеток накапливается ингибитор образования пуфов, причем действие этого ингибитора при кипячении исчезает. Боннер предположил, что сами БТШ могут играть такую ингибирующую роль, более того, ему удалось установить, что этой активностью обладает БТШ-82, который локализован исключительно в цитоплазме клеток, подвергнутых ТШ. Добавление этого частично очищенного белка к политенным ядрам ингибировало образование всех пуфов ТШ, кроме 67В. Однако, результаты этих экспериментов следует рассматривать с осторожностью, поскольку использованный в них препарат БТШ-82 не был очищен иммунологически, а представлял собой смесь белков, лишь обогащенную БТШ-82.

Было высказано предположение, что гены, активирующиеся при повышении температуры, могут находиться под контролем одного или нескольких генов-регуляторов. Если такой гипотетический ген (или гены) существует, то можно попытаться получить мутацию в нем. Она должна влиять на работу сразу нескольких генов ТШ в гене-регуляторе и сказываться на синтезе нескольких БТШ одновременно. Среди каких же мутаций следует ее искать? По-видимому, она должна быть температурочувствительной и летальной. Это связано с тем, что ген-регулятор должен проявлять свое действие при повышенной температуре и с тем, что БТШ играют важ-

ную роль в формировании компенсаторного механизма, спасающего клетку от повреждающего действия высокой температуры (блокирование синтеза этих белков приводит к гибели клетки в условиях ТШ). Нарушение этого механизма защиты, в частности, мутация в гене - регуляторе, приведет к тому, что клетка не сможет выжить при 37°C, то есть мутация действительно окажется *ts*-леталю. В настоящее время известны сотни *ts*-леталей, но искомая мутация должна относиться к категории достаточно редкой, а именно, к полифазным леталю, действующим во всех тканях. Поскольку известно, что БТШ синтезируется при повышенной температуре на всех стадиях развития от эмбриона до имаго, то мутация, выводящая из строя эту систему, должна при повышенной температуре приводить к гибели клеток на любой стадии.

Проанализировав ряд таких мутаций, полученных из лаборатории проф. Сузуки и Аркинга, мы обнаружили мутацию *I(1)ts-403*, которая по своим свойствам могла бы быть мутацией гена-регулятора системы ТШ. Эта мутация локализована в X-хромосоме, то есть не сцеплена ни с одним геном ТШ. Оказалось, что в клетках мутантных мух при нагревании синтезируется в 10-20 раз меньше БТШ, чем в клетках нормальных немутантных особей. Более того, у мутантов изменен и спектр синтезируемых БТШ: некоторые из них вовсе отсутствуют, в то время как другие образуются в иных, по сравнению с нормой соотношениях [119, 120]. (рис. 6). Было показано, что БТШ, синтезированные в клетках мутантных особей, в большой степени утратили способность транспортироваться в ядро и, следовательно, действие *I(1)ts 403* приводит не только к снижению количества синтезируемых БТШ по сравнению с нормой, но и к тому, что они плохо выполняют свою функцию.

Далее было важно выяснить на каком этапе экспрессии батареи генов ТШ действует эта мутация. Опыты по комбинированному воздействию на клетки анаэробных условий и высокой температуры показали, что исследуемая мутация действует не на уровне трансляции. При восстановлении после анаэробных условий активируются те же гены и синтезируются те же РНК и белки, что и при ТШ [3,5,123]. Поскольку мутация *I(1)ts - 403* температурочувствительная, то при восстановлении от анаэробных условий она не проявляет своего действия и происходит нормальный синтез РНК и белков ТШ.

Если мутация действует не на уровне трансляции, то при повышении температуры до 37°C сразу после восстановления

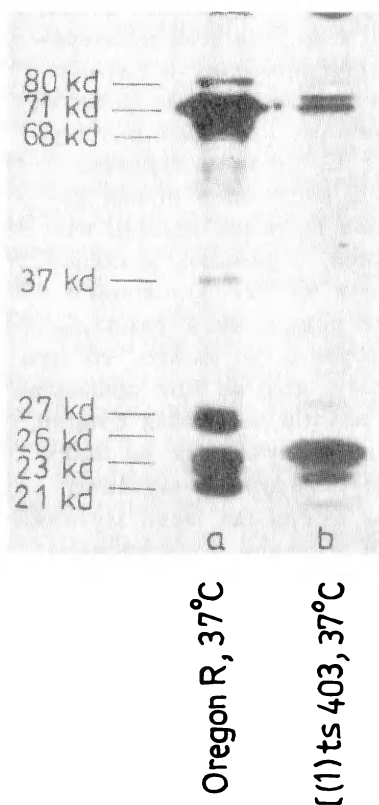


Рис. 6. Характер белкового синтеза в слюнных железах нормальных мух *D.melanogaster* (дикий тип) и в железах мутантных личинок (L(1)ts 403) [107]

от кислородного голодания можно будет наблюдать, по крайней мере, частичное увеличение интенсивности синтеза БТШ. Это произойдет потому, что при анаэробнозе будут заготовлены матрицы для синтеза БТШ и ничто не мешает им транслироваться. Если же мутация действует при трансляции мРНК ТШ, то такое увеличение не наблюдается, так как сколько бы мРНК не было заготовлено заранее, они все равно будут плохо транслироваться. Опыты показали, что при 37°C происходит увеличение интенсивности синтеза БТШ, если до этого клетки подвергались кислородному голоданию (табл. 4). Более того, происходит восстановление спектра синтезируемых БТШ.

Эти опыты позволяют прийти к выводу, что исследуемая мутация проявляет свое действие до трансляции, на более ранних этапах экспрессии генов ТШ: во время транскрипции или процессинга. С одной стороны, размер пуфов ТШ и интенсивность включения ^3H -уридина в них достоверно не различаются у мутантной и дикой линии. С другой стороны, у мутанта

Таблица 4

Влияние предварительной инкубации личинок в условиях кислородного голодания на интенсивность синтеза БТШ [121]

Условия инкубации	Нормальные условия выращивания (25°C)	15' при 37°C	30' при 37°C	60' при 37°C	Анаэробные условия	Анаэробные условия 15' при 37°C	Анаэробные воз-действия 30'+ при 37°C	Анаэробные воз-действия 60'+ при 37°C

Oregon R/I(1)ts 403 1,2 1,6 8,1 22,1 1,2 1,4 2,5 4,2

Oregon R/I(1)ts 403 - это отношение интенсивности синтеза БТШ у Oregon R к интенсивности синтеза БТШ у I(1)ts-403. После различных воздействий у личинок выделяли слюнные железы и помещали их в раствор, содержащий ³⁵S-метионин. Включенную радиоактивную метку на 10 желез определяли на сцинтилляционном счетчике, эту величину и принимали за интенсивность синтеза белков.

выходит из ядра меньше РНК, и в цитоплазме содержится в несколько раз меньше поли-А⁺ РНК, чем у особой контрольной линии.

Все это указывает на то, что мутация l(1)ts-403 приводит к нарушению процессинга, а не транскрипции РНК при повышенной температуре.

В работе по исследованию ауторегуляции синтеза БТШ мы воспользовались изученным мутантом l(1)ts-403, характеризующимся резким снижением синтеза БТШ при повышении температуры. Как уже подчеркивалось, БТШ в мутантных клетках практически утратили способность поступать после ТШ в ядро и связываться с хроматином. БТШ-82, которому приписывается способность по мере накопления ингибировать синтез БТШ, как показано, у этого мутанта в условиях ТШ не синтезируется [119, 120]. Интересно выяснить, как происходит восстановление нормальной жизнедеятельности в клетках этого мутанта после прекращения ТШ. Проведенные эксперименты показали, что в клетках мутантных особей после снятия ТШ еще долгое время сохраняются пuffs ТШ и идет синтез БТШ. Эти данные являются однозначным и прямым подтверждением работ Линдквист и Боннера, постулирующих ауторегуляторную роль БТШ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Остается коротко перечислить те проблемы, ключ к решению которых можно найти при изучении системы генов ТШ дрозофилы.

Во-первых, эта модель позволяет ближе подойти к исследованию регуляции экспрессии генов у эукариотических организмов, что и отражено в названии работы. При этом оказывается возможным исследовать регуляцию на последовательных этапах реализации генетической информации.

Прежде всего, это регуляция транскрипции. Здесь важна природа сигналов, координированно включающих батарею генов ТШ, и механизмы, приводящие к репрессии остальной части генома. Можно также исследовать регуляторные последовательности ДНК, взаимодействие с ними регуляторных молекул и изменения в структуре хроматина при активации и репрессии генома во время ТШ.

Вторым регулируемым этапом является процессинг первичных транскриптов и транспорт зрелых мРНК из ядра в цитоплазму. Здесь представляется возможным исследовать механизмы, нарушающие процессинг рибосомных РНК, но позволяющие гистоновым мРНК созреть нормально. Можно также понять, почему одни РНК ТШ выходят в цитоплазму, а другие остаются в ядре. Неясно, какую функцию выполняют последние.

Несомненный интерес представляет регуляция третьего этапа экспрессии генов – трансляция. Здесь необходимо выяснить, почему большинство старых мРНК перестают транслироваться и заменяются на РНК ТШ, а также почему не все РНК ТШ, вышедшие в цитоплазму, участвуют в трансляции.

И наконец, как бы замыкая круг, надо выяснить как вновь синтезированные белки – БТШ участвуют в регуляции активности генома и какие еще функции в клетке они выполняют.

Другая группа вопросов, которую можно исследовать при помощи этой модели, связана с эволюцией. Широкое распространение генов ТШ, явное адаптивное значение реакции клетки на повышение температуры и возможность применения самых разнообразных современных методов исследования позволит подойти к эволюции этой системы с молекулярных позиций.

Кроме этого, изучение батареи генов ТШ и их экспрессии поможет лучше понять структуру генома высших организмов, а также взаимодействие различных клеточных компонентов, то есть клетку как целостную систему.

Описанная в нашем обзоре модель – система генов теплового шока дрожофилы является, таким образом, уникальной моделью для изучения почти всех проблем современной молекулярной генетики и молекулярной биологии вообще.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ritossa F.M. "Experientia", 1962, 18, 571–573
2. Ritossa F.M. "Exp. Cell Res.", 1964, 35, 601–609
3. Ritossa F.M. "D.J.S.", 1963, 37, 122–123
4. Berendes H.D., van Breugel F.M.A., Holt Th.K.H. "Chromosoma", 1965, 16, 35–46
5. Ashburner M. "Chromosoma", 1970, 31, 356–376
6. Ellgaard E.G. "Chromosoma", 1972, 37, 417–422
7. Губенко И.С., Баричева Э.М. "Генетика", 1979, 15, 1399–1414

8. Pierce D.A., Lucchasi J.C. "Chromosoma", 1980, 76, 245-254
9. Belyaeva E.S., Zhimulev I.F. "Cell Diff.", 1976, 4, 415-427
10. Lewis M., Helmsing P., Ashburner M. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1975, 72, 3604-3608
11. Ellgaard E.G., Clever U. "Chromosoma", 1971, 36, 60-78
12. Bisseling T., Berendes H.D., Lubsen N.H. "Cell", 1976, 8, 299-304
13. Plagens U., Greenleaf A.L., Bauts E.K.F. "Chromosoma", 1976, 52, 157-166
14. Jamrick M., Greenleaf A.L., Bauts E.K.F. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1977, 74, 2079-2083
15. Greenleaf A.L., Plagens U., Jamrick M., Bauts E.K.F. "Chromosoma", 1978, 65, 127-136
16. Patel G.L., Thompson P.E. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1980, 77, 6749-6753
17. Holt Th. K.H. "Chromosoma", 1970, 32, 428-441
18. Helmsing P.J., Berendes H.D. "J. Cell. Biol.", 1971, 50, 893-896
19. Silver L.M., Elgin S.C.R. "Cell", 1977, 11, 971-985
20. Elgin S.C.R., Serunian L.A., Silver L.M. "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 1978, 42, 832-840
21. Mayfield J.E., Serunian L.A., Silver L.M., Elgin S.C.R. "Cell", 1978, 14, 533-548
22. Spruill W.A., Hurwitz D.R., Lucchesi J.C., Steiner A.L. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1978, 75, 1480-1484
23. Holt Th. H., Kuijpers A.M. "Chromosoma", 1972, 37, 423-432
24. Berendes H.D. "Chromosoma", 1968, 24, 418-429
25. Leenders H.J., Beckers P.J.A. "J. Cell. Biol.", 1972, 55, 257-265
26. Compton J.L., McCarthy B.J. "Cell", 1978, 14, 191-201
27. Tissieres M., Mitchell H.K., Tracy O.M. "J. Mol. Biol.", 1974, 84, 389-398
28. Bonner J.J., Pardue M.L. "Cell", 1976, 8, 43-50
29. Sondermeijer P.J.A., Lubsen N.H. "Eur. J. Biochem.", 1978, 88, 331-339
30. Spradling A., Penman S., Pardue M.L. "Cell", 1975, 4, 395-408
31. McKenzie S.L., Henikoff S., Meselson M. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1975, 72, 1117-1121
32. Findly R.C., Pederson T. "J. Cell Biol.", 1981, 88, 323-328
33. Leenders H.J., Berendes H.D. "Chromosoma", 1972, 37, 433-444
34. Behnel J., Rensing L. "Exp. Cell. Res.", 1975, 91, 119-124
35. Vossen J.G.H.M., Leenders H.J., Derksen J., Jeucken G. "Exp. Cell Res.", 1977, 109, 277-283
36. Ashburner M., Bonner J.J. "Cell", 1979, 17, 241-254

37. Sin Y.T. "Nature", 1975, 258, 159-160
38. Ritossa F.M. "Exp. Cell Res.", 1964, 36, 515-523
39. Moran L., Mirault M.-E., Arrigo A.P., Goldschmidt-Clermont M., Tissieres A. "Proc. Royal. Acad. Sci.", 1978, B283, 391-406
40. Spradling A., Pardue M.L., Penman S. "J. Mol. Biol.", 1977, 109, 559-527
41. Rubin G.M., Hogness D.S. "Cell", 1975, 6, 207-213
42. Lengyel J.A., Pardue M.L. "J. Cell Biol.", 1975, 67, 240-249
43. Jacq B., Jourdan R., Jordan B.R. "J. Mol. Biol.", 1977, 117, 785-795
44. Levis R. "J. Mol. Biol.", 1978, 122, 279-283
45. McKenzie S.L., Meselson M. "J. Mol. Biol.", 1977, 117, 279-283
46. Mirault M.-E., Goldschmidt-Clermont M., Moran L., Arrigo A.P., Tissieres A. "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 1978, 42, 819-827
47. Storti R.V., Scott M.P., Rich A., Pardue M.L. "Cell", 1980, 22, 825-834
48. Henikoff S., Meselson M. "Cell", 1977, 12, 441-451
49. Pardue M.L., Scott M.P., Storti R.V., Lengyel J.A. In: Development and Neurobiology of Drosophila. New York, Plenum Press, 1980, 31-42
50. Lengyel J.A., Ranson L.J., Graham M.L., Pardue M.L. "Chromosoma", 1980, 80, 237-252
51. Howard G.C., Abmayr S.M., Shinefeld L.A., Sato V.L., Elgin S.C.R. "J. Cell Biol.", 1981, 88, 219-225
52. Jack R.S., Gehring W.J., Brack C. "Cell", 1981, 24, 321-331
53. Biessmann H., Levi B.W., McCarthy B.J. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1978, 75, 759-763
54. Krüger C., Benecke B.-J. "Cell", 1981, 23, 595-603
55. Levis R., Penman Sh. "J. Mol. Biol.", 1978, 120, 487-515
56. Lindquist S.L. "J. Mol. Biol.", 1980, 137, 151-158
57. Koninks J.F.J.G. "Biochem. J.", 1976, 158, 623-628
58. Holmgren R., Livak K., Morimoto R., Freund R., Meselson M. "Cell", 1979, 18, 1359-1370
59. Craig E.A., McCarthy B.J., Wadsworth S.C. "Cell", 1979, 16, 575-588
60. Schedl P., Artavanis-Tsakonas S., Steward R., Gehring W.I., Mirault M.-E., Goldschmidt-Clermont M., Moran L., Tissieres A. "Cell", 1978, 14, 921-929
61. Livak K.J., Freund R., Schweber M., Wensink P.C., Meselson M. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1978, 75, 5613-5617
62. Craig E.A., McCarthy B.J. "Nucl. Acids Res.", 1980, 8, 4441-4457

63. Wadsworth S.C., Craig E.A., McCarthy B.J. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1980, 77, 2134-2137
64. Corces V., Holmgren R., Freund R., Morimoto R., Meselson M. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1980, 77, 5390-5393
65. Voellmy R., Goldschmidt-Clermont M., Southgate R., Tissieres A., Levis K., Gehring W.J. "Cell", 1981, 23, 261-270
66. Ish-Horowicz D., Holden J.J., Gehring W.J. "Cell.", 1977, 12, 643-652
67. Ish-Horowicz D., Pinchin S.M. "Nature", 1978, 275, 481
68. Coggese C., Caizzi R., Morea M., Scalenghe F., Ritossa F.M. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1979, 76, 2385-2389
69. Mirault M.-E., Goldschmidt-Clermont M., Artavanis-Tsakonas S., Schedl P. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1979, 76, 5254-5258
70. Ish-Horowicz D., Pinchin Sh.M., Schedl P., Artavanis-Tsakonas S., Mirault M.-E. "Cell", 1979, 18, 1351-1358
71. Ish-Horowicz D., Pinchin Sh.M. "J. Mol. Biol.", 1980, 142, 231-245
72. Lis J.T., Prestidge L., Hogness D.S. "Cell", 1978, 14, 901-919
73. Moran L., Mirault M.-E., Tissieres A. "Cell", 1979, 17, 1-8
74. Petterson N.S., Moller G., Mitchell H.K. "Genetics", 1979, 92, 891-902
75. Arrigo A.P. "Mol. Gen. Genet.", 1980, 178, 517-524
76. Arrigo A.P., "Experientia", 1979, 35, 955
77. Arrigo A.P., Fakan S., Tissieres A. "Dev. Biol.", 1980, 78, 86-103
78. Velazques J.M., DiDomenico B.J., Lindquist S. "Cell", 1980, 20, 679-689
79. Vincent V., Tanguay R.M. "Nature", 1979, 281, 501-503
80. Koninkx J.F.J.G. "Biochem. J.", 1975, 152, 17-22
81. Koninkx J.F.J.G., Leanders H.J., Birt L.M. "Exp. Cell Res.", 1975, 92, 275-282
82. Scalenghe F., Ritossa F.M. "Atti Acad. Natl. Lincei", 1976, 13, 439-443
83. Henikoff S. "D.I.S.", 1980, 55, 60
84. Berendes H.D., Alonso C., Helmsing P.J., Leanders H.J., Derksen J. "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 1974, 38, 645-654
85. Leanders H.J., Berendes H.D., Helmsing P.J., Derksen J., Koninkx J.F. "Sub. Cell. Biochem.", 1974, 3, 119-147
86. Brady T., Belew K. "Chromosoma", 1981, 82, 89-98
87. Belew K., Brady T. "Chromosoma", 1981, 92, 99-106
88. Yamamori T., Ito K., Nakamura Y., Yura T. "J. Bacteriol.", 1978, 134, 1133-1140

89. Miller M., Xuong Ng.-H., Geiduschek P. "Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.", 1979, 76, 5222-5225
90. May G.S., Rosenbaum J.L. "J. Cell Biol.", 1980, 87, 272a
91. Walsch Ch. "J. Biol. Chem.", 1980, 255, 2629-2636
92. Glover C.V., Guttman S.D., Gorovsky M.A. "J. Cell Biol.", 1980, 87, 48a
93. Weisburg W.G., Wilhelm J.M. "J. Cell Biol.", 1980, 87, 282a
94. Loomis W.F., Wheeler S. "Dev. Biol.", 1980, 79, 399-408
95. Francis D., Lin L. "Dev. Biol.", 1980, 79, 238-242
96. Sachs M.M., Freeling M. "Mol. Gen. Genet.", 1978, 161, 111-115
97. Sachs M.M., Freeling M., Okimoto R. "Cell", 1980, 20, 761-768
98. Dawson W.O., Grautham A.N. "Biochem. Biophys. Res. Commun.", 1981, 100, c. 23
99. Kelley P.M., Schlesinger M.J. "Cell", 1978, 15, 1277-1286
100. Gautz J., Bencze G., Gyurkovics H., Ashburner M., Ish-Horowitz D., Holden J.J. "Genetics", 1979, 93, 917-934
101. Goldschmidt-Clermont M. "Nucl. Acids Res.", 1980, 8, 235-252
102. Ingolia T.D., Craig E.A., McCarthy B.J. "Cell", 1980, 3, 669-679
103. Török J., Karch F. "Nucl. Acids Res.", 1980, 8, 3105-3123
104. Hackett R.W., Lis J.T. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1981, 78, 6196-6200
105. Goldschmidt-Clermont M., Karch F., Mirault M.-E., Török J., Völlmy R., Tissieres A. "Experientia", 1979, 35, 964
106. Brown A.J.L., Ish-Horowitz D. "Nature", 1981, 290, 677-682
107. Evgen'ev M.B., Kolchinsky A., Levin A.V., Preobrazenskaya O.V. "Chromosoma", 1978, 68, 357-365
108. Leenders H.J., Derksen J., Maas P.M.J.M., Berendes R.D. "Chromosoma", 1973, 41, 447-460
109. Derksen J., Willart E. "Chromosoma", 1968, 55, 57-68
110. Lubsen N.H., Sondemeijer P.J.A., Pages M., Alonso C. "Chromosoma", 1978, 65, 199-219
111. Lakhotia S.C., Mukherjee T. "Chromosoma", 1980, 81, 125-136
112. Peters F.P.A.M.N., Lubsen N.H., Sondermeijer P.J. "Chromosoma", 1980, 81, 271-280
113. Evgen'ev M.B. "D.I.S.", 1977, 52, 59-60
114. Derksen J., Berendes H.D., Willard E. "J. Cell Biol.", 1973, 59, 661-668
115. Ballinger D.G., Pardue M.L. In: Heat shock. From Bacteria to Man. Eds M.J. Schlesinger, M. Ashburner, A. Tissieres. Cold Spring Harbor, 1982, 183-190
116. Krüger Ch., Benecke B.-J. In: Heat Shock. From Bacteria to Man. Eds M.J. Schlesinger, M. Ashburner, A. Tissieres. Cold Spring Harbor, 1982, 191-198

117. Lindquist S. "Dev. Biol.", 1980, 77, 463-479
118. Lindquist S., DiDomenico B., Budaisky G., Kurtz S., Petko L., Sonoda S. In: Heat Shock. From Bacteria to Man. Eds M.J. Schlesinger, M. Ashburner, A. Tissieres. Cold Spring Harbor, 1982, 167-176
119. Евгеньев М.Б., Левин А.В. "Генетика", 1980, 16, 1026-1028
120. Evgen'ev M.B., Levin A.V., Lozovskaya E.R. "Molec. Gen. Genet.", 1979, 176, 275-280
121. Евгеньев М.В., Левин А.В., Лозовская Е.Р. "Генетика", 1984, 20, № 6, 949
122. Mukherjee T., Lakhota S.C. "Chromosoma", 1979, 74, 75-82
123. Zhimulev I., Grafodatskaya V.E. "Dros. Inf. Serv.", 1974, 51, 96
124. Rensing L. "Cell Diff.", 1973, 2, 221-228
125. van Breugel F.M.A. "Genetica", 1966, 37, 17-28
126. Sanders M.M. "J. Cell Biol.", 1981, 91, 579-583
127. Zimmerman J.L., Petri W., Meselson M. "Cell", 1983, 32, 1161-1170
128. Bensaude O., Babinet C., Morange M., Jacob F. "Nature", 1983, 305, 331-333
129. Bienz M., Gurdon J.B. "Cell", 1982, 29, 811-819
130. Buzin C.H., Petersen N.S. "J. Mol. Biol.", 1982, 158, 181-202
131. Ingolia Th.D., Craig E.A. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1982, 79, 525-529
132. Craig E.A., Ingolia Th.D., Slater M., Manseau L., Bardwell J. In: Heat Shock. From Bacteria to Man. Eds Schlesinger M.J., M. Ashburner, A. Tissieres. Cold Spring Harbor, 1982, 11-18
133. Burdon R.H. In: Heat Shock. From Bacteria to Man. Eds M.J. Schlesinger, M. Ashburner, A. Tissieres. Cold Spring Harbor, 1982, 283-288
134. Mitchell H.K., Lipps L.S. "Biochem. Genet.", 1975, 13, 585-603
135. Arrigo A.P., Ahmad-Zadeh C. "Molec. Gen. Genet.", 1981, 184, 73-79
136. Schlesinger M.J., Kelley Ph.M., Aliperti G., Malfer C. In: Heat Shock. From Bacteria to Man. Eds M.J. Schlesinger, M. Ashburner, A. Tissieres. Cold Spring Harbor, 1982, 243-250
137. Beissmann H., Falkner F.-G., Saumweber H., Walter M.F. In: Heat Shock. From Bacteria to Man. Eds M.J. Schlesinger, M. Ashburner, A. Tissieres. Cold Spring Harbor, 1982, 275-282
138. Евгеньев М.Б., Левин А.В., Лозовская Е.Р. "Генетика", 1984, 20, 949
139. Berger E.M., Woodward M.P. "Exp. Cell Res.", 1983, 147, 437-443
140. Mc Alister L., Finkelstein D.B. "Biochem. Biophys. Res. Commun.", 1980, 93, 819-824

141. Key J.L., Lin Ch.-Y., Ceglazr E., Schöffe F. In: Heat Shock. From Bacteria to Man. Eds M.J.Schlesinger, M.Ashburner, A.Tissieres. Cold Spring Harbor, 1982, 329-336
142. Yamamori T., Yura T. "Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.", 1982, 79, 860-864
143. Brugge J., Erikson E., Erikson R.L. "Cell", 1981, 25, 363-372
144. Oppermann H., Levinson W., Bishop J.M. "Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.", 1981, 78, 1067-1071
145. Britten R.J., Davidson E.H. "Science", 1969, 165, 349-357
146. Holmgren R., Corces V., Morimoto R., Blackman R., Meselson M. "Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.", 1981, 78, 3775-3778
147. Corces V., Pellicer A., Axel R., Mei Sh.-Y., Meselson M. In: Heat Shock. From Bacteria to Man. Eds M.J.Schlesinger, M. Ashburner, A. Tissieres. Cold Spring Harbor, 1982, 27-34
148. Corces V., Pellicer A., Axel R., Meselson M. "Proc. Natl. Acad.Sci.U.S.A.", 1981, 78, 7038-7042
149. Mirault M.-E., Delwart E., Sothgate R. In: Heat Shock. From Bacteria to Man. Eds M.J.Schlesinger, M. Ashburner, A. Tissieres. Cold Spring Harbor, 1982, 35-42
150. Pelham H., Bienz M. In: Heat Shock. From Bacteria to Man. Eds M.J.Schlesinger, M.Ashburner, A.Tissieres. Cold Spring Harbor, 1982, 43-48
151. Bonner J.J. "Dev. Biol.", 1981, 86, 409-418
152. Bonner J.J. In: Heat Shock. From Bacteria to Man. Eds M.J.Schlesinger, M.Ashburner, A.Tissieres. Cold Spring Harbor, 1982, 147-154
153. Crain B.L., Kornberg Th. "Cell", 1981, 25, 671-681
154. Jack R.S., Brack C., Gehring W.J. "Forschr.Zool.", 1981, 26, 271-285
155. Jack R.S., Gehring W.J. In Heat Shock. From Bacteria to Man. Eds M.J.Schlesinger, M. Ashburner, A. Tissieres. Cold Spring Harbor, 1982, 155-159
156. Wu C. "Nature", 1980, 286, 854-860
157. Wu C. In: Heat Shock. From Bacteria to Man. Eds M.J.Schlesinger, M. Ashburner, A. Tissieres. Cold Spring Harbor, 1982, 93-97
158. Levi A., Noll M. In: Heat Shock. From Bacteria to Man. Eds M.J.Schlesinger, M.Ashburner, A. Tissieres. Cold Spring Harbor, 1982, 99-108
159. Wu C., Wong Y.-C., Elgin S.C.R. "Cell", 1979, 16, 807-812
160. Levi A., Noll M. "Nature", 1981, 289, 198-201
161. Preobrazenskaya O.V., Karpov V., Mirzabekov A.D. "Cell", 1984, 36, 423-431

Б.А. Лейбович

ВВЕДЕНИЕ

Проблема непостоянства генома, обусловленного множеством разнообразных механизмов, является сейчас одной из центральных в молекулярной биологии [1]. Различные проявления генетической нестабильности могут влиять на активность различных генов, обеспечивать их закономерное перемещение в онтогенезе, определять взаимодействие различных частей генома, а также вызывать мутационные изменения, важные для микроэволюционных процессов. Среди множества феноменов непостоянства генома существенное место занимает изменчивость количества различных последовательностей ядерной ДНК отдельных типов клеток и тканей, обнаруженная у многих организмов в самых разных ситуациях. Механизмы, приводящие к вариациям численности разных последовательностей ДНК, как правило, неясны и не всегда связаны с особенностями репликации этих последовательностей. Однако для простоты подобные явления часто называют дифференциальной репликацией. Именно в таком широком смысле это понятие использовано в данной работе. В ней будут рассмотрены феномены дифференциальной репликации только у представителей рода *Drosophila*, так как многочисленные данные, полученные для этой группы организмов, весьма разнообразны и интересны. В то же время у других эукариот обнаружены сходные явления, описания которых читатель частично найдет в цитируемой литературе.

1. ГЕНЫ рРНК

1.1. Структура рибосомных генов

Общепринято считать ядрышковый организатор (ЯО), локус *bobbed(bb)* и гены 18S + 28S рРНК (рДНК, р-гены) у дрозофилы идентичными понятиями. Этот локус у *D. melanogaster* расположен в проксимальном гетерохроматине X-хромосомы и

коротком плече Y-хромосомы [2-5]. ЯО у других видов дрозофилы расположены, как правило, аналогично. Даже если р-гены локализованы в иных местах, то данные участки хромосом либо гетерохроматинизируются при нормальных условиях [6], либо окружены небольшими блоками гетерохроматина [7]. Вероятно, связь рДНК с гетерохроматином у дрозофил является необходимым условием ее функционирования.

Кратко рассмотрим структуру локуса, что необходимо для дальнейшего изложения. Подробные схемы приведены в ряде обзоров [3, 8, 9]. Каждый ядрышковый организатор в X- и Y-хромосомах содержит в норме 150-250 tandemно повторяющихся единиц, состоящих из генов 18S и 28S рРНК. Гены двух этих рРНК разделены внутренним транскрибируемым спейсером. К 5'-концу гена 18S рРНК прилегает внешний транскрибируемый спейсер, где сосредоточены последовательности, необходимые для правильной инициации транскрипции повтора РНК-полимеразой I. С каждого такого повтора считается пре-рРНК размером 38S, которая затем распадается на зрелые 18S рРНК, 28S рРНК и низкомолекулярные компоненты 5,8S и 2,5S РНК. Описанная элементарная единица отделена от соседних подобных единиц так называемым не-транскрибируемым спейсером.

50-60% 28S рРНК-генов содержат вставки (инсерции) двух типов. Вставки типа I у разных видов дрозофилы гомологичны и локализованы в одинаковых по последовательности участках гена 28S рРНК. Разные по длине подклассы инсерции типа I находятся в основном в ЯО X-хромосомы и являются ее молекулярным маркером. Кроме того, обнаружены блоки tandemно организованных вставок I типа по флангам кластера генов рРНК [10-13] и, по крайней мере, у одной из линий *D. melanogaster* в участке 102C 4-й хромосомы [12]. Tandемные кластеры этих последовательностей прерываются негомологичными последовательностями разного типа, в том числе и мобильными элементами различной природы [14]. Гены рРНК, содержащие вставки I типа у *D. melanogaster*, могут, по-видимому, как случайно перемешаться с генами без вставок [15, 16], так и образовывать субкластеры [17]. Является ли такая блочно-диспергированная организация нормой или отражает особенности построения р-генов в разных ЯС, неясно. Однако это может иметь значение для интерпретации некоторых нижеописываемых феноменов.

В кластере генов рРНК у *D. melanogaster* обнаружены также вставки типа II, негомологичные инсерциям типа I. Они

содержатся приблизительно в 15% генов рРНК X- и Y-хромосом. По-видимому, могут существовать их тандемные блоки и вне ЯО [18].

Совокупность вставок разного типа и разной длины, а также наличие гетерогенности по длине нетранскрибируемых спейсеров, отличающихся в разных ЯО [19], позволяет в достаточной степени безошибочно судить о структуре кластера генов рРНК в любом генотипе.

Гены, содержащие вставки обоих типов, в норме практически не транскрибируются [20–22], хотя количество образующих на них минорных РНК может зависеть от стадии развития и типа клеток [22].

1.2. Изменчивость количества генов рРНК

В ряде генетических ситуаций число р-генов может меняться. Их число в настоящее время уже достаточно велико. Их описанию будет посвящено несколько следующих разделов.

1.2.1. Мутации bobbed

Мутации bobbed (bb), характеризующиеся укорочением всех типов щетинок, недоразвитием брюшных хитиновых щитков у имаго и задержкой эмбрионального развития, являются делециями части генов рРНК [2]. В целом, особенно у *D. melanogaster*, имеется некоторая зависимость между числом делетированных генов рРНК и степенью выраженности мутации [2]. Однако это правило имеет много отклонений [23, 24]. Отсутствие прямой корреляции может объясняться многими причинами (транскрипционной регуляцией, наличием кластеров и субкластеров генов со вставками, неодинаково затрагиваемых различными делециями [17], разной долей таких генов в различных ЯО и др.). Поэтому не обнаружено строгой корреляции между общим количеством генов рРНК и длиной щетинок, отражающей экспрессивность мутации, но выявлена существенная зависимость проявления признака от скорости синтеза рРНК [23]. Таким образом, независимо от механизма, основным типом регуляции работы множественных генов рРНК является транскрипционная регуляция. Ее важность подчеркивается обнаружением типичных мутаций bb, проявляющих

ts –фенотип [25]. Это показывает, что в работе р-генов должны участвовать и другие генетические факторы, которые могут располагаться как в непосредственной близости к тандему генов рДНК (мутация bb^{ts}), так и в других хромосомах [26]. Однако в большинстве случаев при мутации bb теряется часть р-генов, причем, очевидно, часто вместе с фрагментами окружающего гетерохроматина [13].

1.2.2. Неравный мейотический кроссинговер в локусе bb

Наличие неравного мейотического кроссинговера в локусе bb было впервые описано Шалетом [27]. Он показал, что если скрещивать мух с различными аллелями bb в X-хромосомах, то в потомстве таких гетерозиготных самок обнаруживаются потомки, bb -фенотип которых отличается от фенотипа, определяемого аллелями bb каждой из родительских хромосом. Каждая рекомбинантная хромосома "приобретает" сразу стабильный аллель. Это отличает данное явление от других, которые будут описаны дальше. Частота такого события в среднем составляет 0,4% и зависит от возраста родительских самок, что показывает связь между частотой неравных обменов и физиологическими условиями внутри организма, определяемыми скорее всего полигенно. Это также свидетельствует о влиянии многочисленных факторов на численность повторяющихся генов.

В опытах Шалета [27] значительно реже появлялись новые bb -мутанты в нерекомбинантных хромосомах, причем у гетерозигот по инверсиям X-хромосомы, блокирующим нормальную рекомбинацию между гомологами. Это свидетельствует о том, что в данном локусе могут происходить неравные обмены не только между гомологами, но и между сестринскими хроматидами.

Маддерн [28] выявил наличие неравных мейотических обменов между bb -локусами, расположенными на X- и Y-хромосомах с нормальной структурой. В то же время в работе Палумбо и соавт. [29] подобные обмены были обнаружены между этими хромосомами, инвертированными относительно друг друга. Это может свидетельствовать о наличии в кластере рДНК генов в неодинаковой полярности. В молекулярных исследованиях пока этого выявить не удалось.

Очевидно, что сама возможность неравных мейотических обменов в локусе bb между X- и Y-хромосомами у сам-

цов является свойством, присущим исключительно повторяющимся последовательностям, так как обычной рекомбинации у самцов дрозофилы практически нет. Подавлять обмены между локусами генов рРНК на разных хромосомах должна и высоко-мозаичная организация этого кластера генов. Она определяется разнообразием числа, расположения и типов вставок, способом их распределения по кластеру, существованием разных по длине спейсеров, противоположной ориентацией некоторых повторяющихся единиц и наличием инсерций посторонних генетических элементов. Однако неравная рекомбинация наблюдается с вполне измеримой частотой. Следовательно, в клетке должны существовать специальные механизмы, регулирующие, с одной стороны, неизменность существующей организации повторов, а, с другой, при необходимости ее меняющие. Роббинс [30] выявил в прицентромерном гетерохроматине X-хромосомы полудоминантный локус Rex, который повышает частоту расщепления хромосомы XY, происходящего, по всей видимости, внутри локуса bb. Автор предполагает, что подобный фактор действует и на нормальные хромосомы, определяя возможность обменов по повторяющимся последовательностям. Весьма вероятно, что в результате конкуренции противоположно направленных процессов численность любых повторяющихся последовательностей приводится в соответствие с остальным геномом. Возможно, именно поэтому разные дикие лабораторные линии отличаются по числу генов рРНК [31] и сохраняют эти различия постоянно. Можно предположить, что для этого и выработаны другие специальные механизмы изменения численности генов рРНК, описанные ниже.

1.2.3. Компенсация генов рРНК

У взрослых особей дрозофилы, содержащих не 2, а один ЯО, скорость синтеза рРНК оказалась почти такой же, как у диких мух [2, 32]. В то же время у одноядрышковых мух увеличивается вдвое число генов рРНК на сохранившемся локусе р-генов [33]. Способность к увеличению их числа присуща и X-, и Y-хромосоме, но проявляется по-разному в зависимости от генотипа и/или конкретного аллеля bb [2, 33, 34].

Изменение числа генов рРНК на единственном ЯО происходит в онтогенезе и, вероятно, только в соматических клетках, поскольку увеличенное содержание рДНК в последующих поло-

вых поколениях не наследуется [33]. Высокая скорость процесса делает маловероятным участие в нем межхроматидных и внутрихроматидных рекомбинаций. Существенно, что само по себе увеличение числа генов рРНК при компенсации не определяет одинаковую скорость синтеза рРНК у особей с 1 и 2 ЯО, обнаруженную Моханом и Ритосса [32], так как даже при достижении нормального количества р-генов мухи могут сохранять bb-фенотип [33], хотя обычно мухи с одним ЯО имеют нормальный фенотип. Это показывает, что генов одного ЯО в большинстве случаев достаточно для нормального функционирования рибосом, а дополнительная рДНК, образованная при компенсации, не транскрибируется.

Различные соматические клетки по-разному реагируют на существование в их геноме лишь одного локуса bb⁺. В диплоидных клетках, по крайней мере, мозга и имагинальных дисков личинок содержание рДНК пропорционально числу ЯО [31, 35-37]. В политенных клетках слюнных желез, наоборот, количество генов рРНК практически не зависит от числа ЯО [31]. Поскольку имаго сохраняют некоторые ткани с политенными хромосомами, то Спир и Голл [31, 35] считают, что компенсация есть только в клетках с политенными хромосомами, и это определяет примерно одинаковое содержание рДНК в целых мухах. Как отмечает Башкиров В.Н. [3], доля клеток с политенными хромосомами у имаго не столь велика, чтобы приводить к равному числу р-генов у мух с одним и двумя ЯО.

Ритосса [2] обнаружил, что число генов рРНК может увеличиваться и в том случае, если исходное их количество нормальное. Это, например, наблюдается у самцов X/O, в X-хромосоме которых содержится 2 ЯО. Ритосса предположил, что триггерную роль в запуске экстрасинтеза рДНК играет взаимодействие гомологов, по крайней мере, в районе локусов р-генов. При нарушении этого взаимодействия, например, при хромосомной aberrации, начинается образование дополнительной рДНК. Подобные соображения других авторов привели к открытию *sr⁺*-локуса.

1.2.4. Локус *sr⁺*

Прокуньир и Тартоф [38] с помощью серии перестроек, затрагивающих проксимальный гетерохроматин X-хромосомы *D. melanogaster*, выявили локус, расположенный дистальнее кластера генов рРНК и влияющий в определенных условиях

на численность генов рРНК. Она увеличивается в той же хромосоме, где находится данный локус, если он присутствует в единичной дозе или если гомологичный ему участок в другой хромосоме инверсией перенесен в иное место. В связи с этим локус назвали *compensative response* (cr). Таким образом, его основное свойство – способность оценивать состояние гомологичного участка в оппозитной хромосоме и включать диспропорциональную репликацию соседних с ним генов, если их взаимосвязь нарушена. Свойство локуса изменять свою активность при взаимодействии с гомологом, по крайней мере у дрозофилы, не уникально. Подобное явление (трансквекция) известно для ряда генов. Способность локуса cr включать экстрасинтез рДНК никак не зависит от числа генов рРНК в соседнем с ним локусе r-генов или суммарного их количества в геноме. По-видимому, это свидетельствует, что маловероятно участие рекомбинантивных событий в компенсации. Очевидно, интенсивность последних должна быть пропорциональна исходному числу генов рРНК. Можно предположить, что в данном случае гиперрепликация определяется механизмом, сходным с амплификацией генов белков хорiona (см. разд. 5). Однако здесь она приводит к суммарному увеличению транскрипции, продукты которой в конечном итоге участвуют в образовании белков.

Компенсация же генов рРНК не направлена на восстановление нормального количества продуктов этих генов и связана с иными хромосомными механизмами, назначение которых неясно.

1.2.5. Магнификация/ генов рРНК

Кроме ненаследуемого увеличения числа r-генов у одноядрышковых мух, удалось обнаружить в определенных генетических ситуациях и наследуемое их увеличение. Этот процесс был назван магнификацией [39] и описан очень подробно в ряде обзоров [2,3]. В связи с этим отмечают только основные характеристики явления и рассматриваются новые сведения, появившиеся в последние годы.

Магнификация наблюдается только у самцов с фенотипом bb, если в одной из половых хромосом находится мутантный аллель bb, а в другой – полная или существенная утеря r-генов. В первом поколении большинство таких гете-

розиготных самцов имеют резко выраженный bb -фенотип, несмотря на то, что количество рДНК у них уже увеличено по сравнению с суммой р-генов обеих родительских хромосом. Число р-генов у них повышено и в соматических, и в генеративных клетках, причем в последних относительно больше [36]. По крайней мере, часть новообразованной рДНК в семенниках присутствует в виде экстрахромосомных кольцевых молекул [40]. В экстрареплицированной рДНК имеются в том же соотношении все те типы последовательностей, которые встречаются в магнифицирующемся локусе до ее начала, независимо от того, содержат они вставки или нет [13]. Экстрарепликация затрагивает и тандемно повторенные, расположенные по флангам ЯО, инсерции типа I [13]. Количество р-генов и вставок I типа на этом этапе, называемом стадией премагнификации, увеличивается в 4 раза по сравнению с исходным.

В ходе дальнейших скрещиваний с соответствующими по генотипу самками, так что генетическая конституция самцов остается прежней, измеренное на совокупности мух количество рДНК за счет увеличения доли мух с магнифицированной рДНК продолжает увеличиваться, а у индивидуальных падает в 2 раза и остается постоянной [13]. При этом начинает появляться все больше самцов с нормальным фенотипом. На первом этапе магнификации число самцов с bb -фенотипом в потомстве индивидуальных самцов может колебаться от 0 до 80% [33, 41]. После 4–10 поколений все мухи имеют нормальный фенотип. Количество поколений зависит от исходного числа р-генов в магнифицирующемся локусе [2].

рДНК, образованная на первых стадиях магнификации, находится в относительно неустойчивом состоянии, так что магнифицированный bb^m -локус, оказавшись в гетерозиготе с нормальным локусом рДНК, начинает терять новоприобретенную ДНК. Мухи с данной хромосомой вновь при этом имеют bb -фенотип. Данное явление названо реверсией. Эффективность ее падает по мере увеличения числа поколений в магнификации и уже не наблюдается после полного ее завершения. Реверсия, по-видимому, отличается по своим механизмам от другого явления, названного редукцией [42]. Реверсия наблюдается в новомагнифицированном локусе рДНК и происходит у гетерозигот bb^m/bb^+ , а редукция осуществляется в нормальном кластере рНК-генов при его контакте с Y^{bb} -хромосомой, содержащей небольшое количество генов рНК, большинство которых со вставками 2 типа [43].

При описании компенсации генов рРНК было отмечено, что экстрасинтезированная в ходе этого процесса рДНК, по всей видимости, не транскрибируется, и ее образование связано только с активацией st^+ -локуса. При магнификации в некоторых случаях, хотя и не всегда [44], на ее первой стадии, премагнификации, в семенниках самцов обнаружен избыток незрелого 38S-предшественника рРНК, который к тому же сильно недометилован [45]. Это коррелирует с отсутствием "улучшения" bb -фенотипа у таких мух. В ходе дальнейшей магнификации количество "дефектного" предшественника снижается [2], что можно связать с появлением нормального фенотипа у мух. Процессы созревания и метилирования предшественников рРНК, очевидно, должны контролироваться ферментами, кодируемыми нерибосомными генами. Это свидетельствует, как и в описанных выше случаях, о комплексной регуляции активности рассматриваемой группы генов.

В ходе магнификации существенно усиливается транскрипция генов, содержащих вставки обоих типов [46]. Она особенно заметна на самых первых этапах образования дополнительной рДНК. По мере завершения магнификации, хотя и несинхронно, транскрипция генов со вставками падает до исходного чрезвычайно низкого уровня. Значение таких транскриптов совершенно не ясно, тем более, что увеличение их количества на 1-2 порядка все равно сохраняет огромное преобладание нормальных молекул рРНК и не зависит от выраженности исходного bb -фенотипа. Скорее всего, это отражает неспецифическое усиление транскрипции вследствие, например, изменения структуры хроматина в локусе рДНК, а не компенсаторный целенаправленный процесс. Если бы такой механизм существовал, то он функционировал бы и у мутантов по локусу bb . Однако из работы Лонга и др. [44] известно, что в целом транскрипция генов, содержащих вставки, у bb -мутантов не усиливается, хотя и по этому признаку разные типы клеток у различных bb -мутантов могут отличаться. Эти исключения не коррелируют с количеством сохранившихся генов.

1.2.6. Механизмы магнификации генов рРНК

В настоящее время рассматриваются две модели магнификации, предложенные Ритосса [2] и Тартофом [42]. Модель Ритосса выглядит предпочтительней, поскольку практически

любые данные относительно магнификации ей не противоречат или могут быть объяснены при минимальном количестве дополнительных предположений. Согласно модели, в соматических и генеративных клетках самцов bb соответствующих генотипов продуцируются экстрахромосомные копии рДНК. В генеративной линии клеток экстракопии либо в линейной, либо в кольцевой форме могут во время мейоза интегрировать в геном. Как считает В.Н. Башкиров [3], подобный механизм может действовать и при компенсации генов рРНК, однако в данном случае исключается последний этап — интеграция реплицирующихся вне хромосом молекул рДНК. В результате при компенсации дополнительная рДНК не наследуется.

По Тартофу постулируется наличие в условиях магнификации эффективного неравного митотического кроссинговера между сестринскими хроматидами в гониальных клетках на предмейотических стадиях. Недостатки последней гипотезы подробно проанализированы в обзоре В.Н. Башкирова [3]. Низкая эффективность процесса неравных обменов в рДНК недавно была продемонстрирована и на молекулярном уровне. Бончинелли и др. [47], используя как маркеры хромосом различные по длине наборы спейсеров, показали, что частота этого процесса в норме не превышает 10^{-5} , что явно недостаточно для относительно быстрого увеличения числа генов рРНК при магнификации. Конечно, частота этого процесса может резко увеличиваться именно в тех генетических условиях, которые благоприятствуют магнификации. Например, за счет неоднократного совершения актов неравной рекомбинации в ходе митотических делений гониальных клеток. Однако генетические эксперименты Ритосса с соавт., свидетельствуют о мейотической природе протекающих процессов [2]. Кроме того, неравные митотические обмены между сестринскими хроматидами при магнификации приводили бы к образованию со сравнимыми частотами особей и с bb^+ -фенотипом, и с bb^1 -фенотипом (летальный аллель локуса *bobbed*). Но, как показано Малва и др. [41], частота появления последних при магнификации чрезвычайно низка. Таким образом, совокупность имеющихся в настоящее время данных позволяет с достаточной степенью уверенности считать гипотезу Тартофа о механизме магнификации несостоятельной. Однако это не исключает, что в определенных ситуациях предложенный им механизм может вносить некоторый минимальный вклад в вариабельность количества рДНК.

Каков бы ни был на самом деле механизм магнификации, совершенно очевидно, что в любом случае он зависит от активности в клетках систем, обеспечивающих рекомбинацию. Действительно, и интеграция экстрахромосомных копий, и неравные межсестринские обмены должны быть связаны с этими системами, поскольку требуют разрывов исходных двойных нитей ДНК и их соединения. В связи с этим рассмотрим влияние мутаций по рекомбинации и репарации на магнификацию.

1.2.7. Влияние мутаций mei на магнификацию

У мейотического мутанта $mei\ 9^a$ нарушен процесс обменов в мейозе, а также репаративная репликация ДНК, поврежденной УФ- или X-лучами [48]. Кроме того, мутация повышает чувствительность мух к широкому набору мутагенов и увеличивает частоту спонтанных хромосомных aberrаций в соматических клетках [48-50]. Оказалось, что у двойных мутантов $mei\ 9^a\ bb$ процесс восстановления bb^+ -фенотипа в условиях, способствующих магнификации, сильно нарушен и повторяемость цистронов рРНК не достигает нормального уровня, в отличие от мух без мутации $mei\ 9^a$ [51]. Авторы предполагают, что мутация подавляет интеграцию образованных в ходе магнификации экстрахромосомных копий рДНК, так как количество р-генов оказывается одинаковым как в первом, так и втором цикле магнификации (второй цикл магнификации - это повторная магнификация ревертированного аллеля bb , идущая обычно быстрее, чем в первом цикле, поскольку bb -аллель, возникший из магнифицированного bb^m -аллеля, все-таки сохраняет большее число генов рРНК, чем в локусе наблюдалось исходно [2], Осгуд [52] показал, что $mei\ 9^a$ -мутация гена, кодирующего нуклеазу или контролирующей ее фактор. Ранее Пепе и Полито [53] наблюдали увеличение в семенниках самцов, у которых идет магнификация, активности ДНКазы, которая, вероятно, и кодируется в локусе $mei\ 9^a$.

Холи и Тартоф [54] обнаружили влияние на магнификацию другой мейотической мутации - $mei\ 41$, подавляющей пост-репликативную репарацию ДНК, уменьшающей частоту мейотических рекомбинаций и увеличивающей частоту спонтанных хромосомных aberrаций в соматических клетках и чувствительность к мутагенам [49, 50]. Ингибирующий эффект этой

мутации на магнификацию в несколько раз выше, чем у $mei\ 9^a$. Разные делеции рДНК имеют неодинаковую "чувствительность" к мутации $mei\ 41$ при магнификации. У мутантов $mei\ 41$ увеличивается на 1-2 порядка частота появления bb -мутаций исключительно в X-хромосоме. В то же время $mei\ 41$ не вызывает обратных мутаций и, следовательно, не является обычным мутатором. По-видимому, нормальный продукт этого гена подавляет вырезание фрагментов рДНК, происходящее в результате внутрихроматидных обменов. Специфичность действия мутации по отношению к X-хромосоме авторы объясняют наличием в ее генах рРНК вставок I типа, которые, по их мнению, представляют собой особые рекомбиногенные точки в кластере р-генов. Эти данные могут быть использованы и для объяснения магнификации по Ритосса: продукт гена $mei\ 41$ в мутантном состоянии не способен блокировать вырезание только что встроенных копий экстрахромосомных рДНК, которые и так связаны нестабильно с магнифицирующейся хромосомой, как это следует из обратимости процесса магнификации.

Совокупность данных по влиянию мутаций генов систем рекомбинации и репарации на стабильность кластера генов рРНК и работу механизмов его количественной изменчивости подчеркивает зависимость организации и функционирования повторяющихся последовательностей от целого набора генетических факторов, разбросанных по геному.

Очевидно, что не всегда механизмы количественной изменчивости повторяющихся последовательностей функционируют просто для исправления дефектов фенотипа. Они могут действовать, по-видимому, и независимо, реагируя только на изменения работы факторов, приводящих численность повторов в соответствие с требованиями генома как целого. Вероятно, поэтому имеются и другие, необъяснимые в настоящий момент с функциональной точки зрения случаи изменения количества р-генов.

1.2.8. Локус abo

Сандлер и др. [55] обнаружили в хромосоме 2 мутацию $abnormal\ oocyte\ (abo: 2-38)$. Вследствие нарушения оогенеза у гомозиготных самок развитие отложенных этими самками оплодотворенных яиц, независимо от их генотипа, прекращается на самых ранних стадиях. У одноядрышковых мух и

bb -мутантов с мутацией *abo* ее эффект выражен сильнее [56]. Дупликации фрагмента проксимального гетерохроматина X-хромосомы или фрагментов Y-хромосомы сильно подавляет материнский эффект мутации *abo* [57]. Авторы предположили наличие специфического участка в проксимальном гетерохроматине X-хромосомы (X^{abo}), функционирование которого влияет на проявление локуса *abo* и может быть связано с расположенными рядом р-генами. Действительно, обнаружена корреляция между падением экспрессивности мутации *abo* в ходе размножения гомозиготной линии *abo/abo* и накоплением рДНК [58, 59]. Увеличение количества р-генов происходит, по-видимому, только в X-хромосоме [60] и избирательно за счет диспропорциональной репликации исходно минорного компонента, не обнаруживаемого в обычных линиях [61]. Действие участка X^{abo} не взаимосвязано с действием локуса *sr⁺*, так как была обнаружена инверсия в X-хромосоме, не проявляющая компенсаторный эффект, но сохранившая свойство влиять на проявление мутации *abo* [62]. Само по себе увеличение числа Р-генов не является причиной исправления *abo*-фенотипа, так как дупликации участков хромосом, содержащих ЯО, не всегда в этом эффективны [38, 57]. В то же время известны случаи, когда материнский эффект *abo* подавлен, но увеличения количества рДНК не наблюдается [62]. Это показывает, что *abo*-функции могут быть не связаны с изменчивостью числа генов рРНК.

В районе локализации гена *abo* картирована целая группа генов со сходной функцией [63]. Они также реагируют на определенные участки гетерохроматина X-хромосомы, но эти районы для разных генов, вероятно, различны. В настоящее время их взаимодействие между собой и с кластером генов рРНК неясно, но похоже, что в этой системе существует транс-взаимодействие разных элементов генома.

1.2.9. Репликация рДНК в политепных хромосомах

Согласно Лейерду и др. [64], в политепных хромосомах реплицируется полностью около 70% всех последовательностей ДНК. Среди разных типов последовательностей в политепных хромосомах недореплицируются и гены рРНК [31, 35, 65]. Они проходят всего 6-7 циклов репликации вместо 9-10, характерных для большинства других типов последовательно-

стей. Число генов рРНК не зависит от количества ЯО и того, находятся они на X- или Y-хромосоме [31, 35, 66 и др.]. Эти данные привели к предположению, что в политенных ядрах реплицируются р-гены только одного ЯО.

Эндоу и Гловеру [66] с использованием молекулярных маркеров - вставок разного типа в р-гены - удалось доказать, что, действительно, в политенных ядрах реплицируются гены только одного ЯО. В разных линиях у самцов реплицирующимся кластером генов рРНК оказались либо гены X-хромосомы, либо гены Y-хромосомы [66-68]. У самок, гибридных по X-хромосомам, также реплицируется ЯО лишь одной из них. Это явление было названо ядрышковым доминированием при политенизации. В некоторых случаях оба ЯО оказываются кодоминантными. У таких особей в равной степени политенизируются р-гены обоих ЯО. Таким образом, данные показывают, что политенизация генов рРНК регулируется в клетке специальными механизмами, ограничивающими суммарное количество этих генов на клетку. Политенизируются в основном гены без вставок [66]. Вероятно, в разных хромосомах, отличающихся по соотношению генов со вставками и без них, а также по их взаимному распределению, число генов со вставками, реплицирующихся при политенизации, может различаться. Это хорошо видно у *D. hydei*, в геноме которой существует четкое разграничение блока генов без вставок и со вставками [69]. Оказалось, что в генотипах с преобладанием генов без вставок политенизируются только они, а в генотипах с их малым числом в политенизацию вступают и гены со вставками [70]. Размер политенизирующего блока в этом случае равен приблизительно 1700 кб. Доля генов со вставками в блоке обратно пропорциональна числу генов без вставок в данных линиях. Кроме того, в таких линиях наблюдается более полная политенизация генов без вставок, по-видимому, за счет дополнительного цикла их репликации. Поскольку и у *D. hydei* гены со вставками не транскрибируются [71], то, как предполагают Франц и др. [70], вовлечение генов со вставками в политенизацию не является компенсаторным механизмом, а отражает неточность ее регуляции.

1.2.10. Влияние окружающего гетерохроматина на репликацию рДНК в политенных хромосомах

По данным Эндоу [72], делеции проксимального и дистального по отношению к ЯО гетерохроматина X-хромосомы как в

доминантной, так и рецессивной по репликации рДНК X-хромосоме, не влияют на доминирование на политенизации. Если в доминантной X-хромосоме делетирована часть самих р-генов, то политенизация рДНК начинается в обоих ЯО. Поэтому предполагается наличие некоей активности, ассоциированной с самим кластером генов рРНК на доминантной хромосоме и пропорциональной их числу. Не обнаружено зависимости ее работы от аутосом и рецессивной X-хромосомы, хотя она вызывает активацию репликации в транс-положении на рецессивной X-хромосоме. Функционирование регулятора доминирования политенизации не связано с активностью ci^+ -локуса. Это подтверждает точку зрения многих авторов, что ядрышковое доминирование не определяет компенсацию р-генов, у одноядрышковых мух.

Эндоу [72] анализировала самок, гетерозиготных по нормальной X-хромосоме и хромосоме с инверсией $In(1)sc^8$, в которой ЯО вместе с фланкирующим его гетерохроматином перенесен в дистальную часть X-хромосомы, а также у гетерозиготных самок с нехватками дистального и проксимального гетерохроматина, полученными облучением хромосомы $In(1)sc^8$ X-лучами [27].

В другой работе с той же целью анализировали самцов с нормальной Y-хромосомой и X-хромосомой с инверсией $In(1)w51b$ [73]. Нехватки в гетерохроматине, окружающем ЯО, получали облучением этой хромосомы. Оказалось, что при делециях части дистального по отношению к генам рРНК гетерохроматина в политенных клетках, кроме репликации ДНК в инвертированной X-хромосоме, которая доминирует в норме, начинается репликация и ЯО Y-хромосомы. Если делеция затронула примерно 50% рДНК, то репликация генов рРНК в Y-хромосоме вновь практически прекращается. При полном удалении рДНК и всего дистального гетерохроматина включается репликация ЯО на Y-хромосоме.

Довольно трудно сопоставлять данные изложенных работ, так как результаты получены на самках и самцах в разных генетических системах с использованием различных перестроек. Существенно, что в обеих статьях показано влияние нехваток собственно самой рДНК на ядрышковое доминирование при политенизации. Это свидетельствует, что, по крайней мере, часть регуляторов репликации рДНК в политенных хромосомах, локализована внутри самого локуса bb^+ . Другие регуляторы могут присутствовать в окружающем ЯО гетерохроматине. Их взаимодействие возможно с участием мо-

бильных элементов, влияющих, например, на специфичность контактов разных регуляторных элементов, и будет определять тот кластер рДНК, который станет реплицироваться в политенном ядре.

Сама способность недореплицироваться в политенных ядрах, как уже было давно предположено [35], может объясняться влиянием окружающего гетерохроматина, который всегда недореплицируется [74]. Действительно, у *Chironomus tentans* ЯО расположен вне гетерохроматина и полностью реплицирован в политенных клетках слюнных желез [75]. В связи с этим Спир и Голл [35] предположили, что для выхода из-под контроля гетерохроматина репликация рДНК, особенно у одноядрышковых мух, должна осуществляться внехромосомно. Действительно, в серии работ Харфорда и Цуховски [76-80] такая рДНК в составе низкомолекулярных фрагментов, отделяемых от основной массы рДНК в градиенте сахарозы, была выделена из слюнных желез *D.melanogaster*. Количество этой ДНК здесь, независимо от генотипа, было постоянным (42%). Подобная низкомолекулярная ДНК была также обнаружена и в диплоидных клетках мух определенных генотипов, у которых вследствие хромосомных aberrаций, затрагивающих ЯО, нарушен, как предполагают авторы, контакт между ЯО, что и приводит к появлению подобных экстрахромосомных молекул рДНК. Лифшиц и Харевен [81] показали для некоторых из этих генотипов, что в интерфазных диплоидных клетках кластеры рДНК неспособны образовывать единые структуры, а независимо разнесены по объему ядра. Обнаружение низкомолекулярных рДНК в диплоидных клетках опровергает предположение, что их появление связано с влиянием окружающего ЯО гетерохроматина. По мнению Харфорда и Цуховски, образование экстрахромосомной рДНК объясняется каким-то определенным нарушением механизма их репликации, так как количество этой низкомолекулярной рДНК независимо от генотипа всегда равнялось 40-42%. В любом случае очевидно, что ее появление не коррелирует ни с диспропорциональной ее репликацией, ни с влиянием окружающего гетерохроматина.

1.2.1.1. Ядрышковое доминирование у межвидовых гибридов

Особым случаем изменения количества рДНК у дрозофилы является амплификация рДНК одного из ЯО в политенных хромосомах межвидовых гибридов. Она обнаружена у гибридов раз-

линых видов комплекса "mulleri" из группы *terpeta* [6, 82-84]. У самок-гибридов первого поколения от скрещивания *D. mulleri* × *D. arizosiensis* ядрышко образует только ЯО X-хромосомы, пришедшей от *D. arizosiensis*. У гибридных самцов, имеющих только одну X-хромосому, пришедшую от *D. mulleri*, X-хромосомный ЯО не способен образовывать ядрышко. Однако у этих гибридов с ядрышком ассоциирована микрохромосома. При этом она увеличена в размерах, содержит в несколько раз больше ДНК [6] и эффективнее гибридизуется *in situ* с рРНК [85]. Предполагается, что в условиях подавления активности ЯО в X-хромосоме р-гены этой хромосомы селективно амплифицируются. Контроль этой репликации не слишком жесткий, так как микрохромосомный ЯО изредка активируется в отдельных клетках и негибридных самок при сохранении активности ядрышкового организатора на X-хромосоме [83]. ЯО микрохромосомы полностью заменить его не может, так как гибридные самцы имеют типичный bb-фенотип [6].

Амплификация рДНК в микрохромосоме не зависит от цитоплазмы и контролируется генетическими факторами, локализованными в X-хромосоме и аутосомах [82-84]. Изучение этого процесса у разнообразных гибридов нескольких видов комплекса "mulleri" позволило автору прийти к заключению, что при определенном сочетании генетических факторов у гибридных самок активным может быть ЯО одной X-хромосомы. Второй ЯО в X-хромосоме и ЯО на микрохромосоме им подавляется. Этот последний в свою очередь у гибридных самцов определяет возможность работы X-хромосомного кластера генов рРНК.

Существуют ли сходные системы у других дрозофил, неясно. Показано, например, наличие ядрышкового доминирования у гибридов *D. melanogaster* × *D. simulans* [86]. Оно выражается в подавлении образования вторичной перетяжки в метафазной X-хромосоме *D. simulans*. Делеции различных участков гетерохроматина приводят к активации ЯО. Связано ли это с какими-либо механизмами диспропорциональной репликации ДНК, неизвестно.

1.2.1.2. Гиперрепликация рДНК в диплоидных клетках

Дифференциальная репликация рДНК в политенных хромосомах, в действительности, отражает ее более общую способность в этом отношении к автономной регуляции. Данное положение

ярко демонстрируется работами Гримма и др. [87, 88]. Авторы измеряли количество рДНК в диплоидных клетках мозга личинок и тетраплоидных клетках мышц торакса взрослых мух *D.hydei*. В последней ткани гены рРНК реплицируются нормально. Оказалось, что в присутствии различных перестроек в гетерохроматине X- и Y-хромосом доля рДНК может существенно повышаться. Повышение ее количественно тканеспецифично: разные ткани не сходным образом реагируют на различные транслокации и нехватки в гетерохроматине. Влияние транслокаций и нехваток неодинаково. При делециях различных районов гетерохроматина количество рДНК увеличивается строго 3 раза. Это не зависит от исходного числа р-генов и наблюдается в геномах с их высоким содержанием. Следовательно, данный феномен не связан с механизмами компенсации, которая известна и у *D.hydei* [89]. Компенсация затрагивает все гены (со вставками и без них) [13], но при гиперрепликации в диплоидных и тетраплоидных клетках увеличивается количество только цельных генов без вставок. При компенсации ЯО Y-хромосомы в большинстве случаев неактивен, а при гиперрепликации экстра-ДНК образуется на обоих ЯО Y-хромосомы. Это явление аддитивно, так что в результате в геноме содержание рДНК может превышать 1500 единиц. Может ли гиперреплицироваться рДНК из X-хромосомы, неясно, так как нет подходящих для анализа хромосом, но, тем не менее, гетерохроматин X-хромосомы влияет на гиперрепликацию. Для нее, по-видимому, важно не просто отсутствие каких-либо областей гетерохроматина, а их соотношение. У самцов X/O *D.hydei* в диплоидных клетках нет ни гиперрепликации, ни компенсации.

В совокупности описанные выше данные показывают несколько важных моментов функционирования генов рРНК: способность автономно реплицироваться в низкоплоидных клетках, зависимость этой репликации от целостности гетерохроматина и отсутствие взаимосвязи между гиперрепликацией и компенсаторными механизмами.

1.3. Общие замечания по дифференциальной репликации генов рРНК

В разд. 1 были рассмотрены многочисленные случаи изменчивости численности генов рРНК. Оно может меняться по-разному в зависимости от генетической ситуации и типа клеток. Механизмами изменчивости могут быть как основанные

на повторяющейся природе этих генов (например, неравный кроссинговер – межхромосомный, межхроматидный и внутрихроматидный), так и связанные с латеральной репликацией, вероятно, осуществляемой за счет образования множества вилок репликации. По крайней мере, в некоторых случаях определенную роль играет образование внехромосомных копий рДНК, способных к репликации вне основного кластера генов и к последующей интеграции. Вероятно, можно считать беспорядочным участие в этих процессах участков гетерохроматина, окружающего ЯО. С одной стороны, они могут содержать в своем составе немногочисленные гены, прямо вовлеченные в регуляцию числа генов рРНК, т.е. их автономную репликацию, а с другой стороны, быть рекомбиногенными точками при разных типах кроссинговера, так как содержат разнообразные повторяющиеся последовательности. Не исключено также участие фланкирующего кластера рДНК гетерохроматина в процессе взаимного опознавания разных ЯО и в определении локальных особенностей структуры хроматина в данных районах, что может влиять на изменчивость числа р-генов.

К сожалению, имеющиеся на сегодняшний день сведения нельзя объединить в некую модель дифференциальной репликации рДНК. Многие данные противоречивы, получены либо только генетическими методами, либо только с помощью молекулярно-биологических подходов. Однако, очевидно, что контролирующее количество р-генов механизмы множественны, включают участки генома вне ЯО и многие из них могут быть элементами каскадных систем регуляции. Важно отметить, что, строго говоря, изменчивость числа генов рРНК, по крайней мере, в ряде случаев, не направлена на регуляцию синтеза рРНК, а связана с какими-то еще неизвестными нам процессами функционирования генома как целого.

2. ГЕНЫ 5S рРНК

У *D. melanogaster* кластер генов 5S рРНК расположен в сайте 56 EF вне ЯО, т.е. отдельно от генов "больших" [90, 91]. У других видов может быть несколько разбросанных по хромосомам кластеров генов 5S рРНК, каждый из которых содержит неодинаковое количество генов [92].

У *D. melanogaster* на гаплоидный геном приходится 160–200 генов 5S РНК [4, 90, 93], отделенных друг от друга спейсерами. В блоке генов 5S рРНК могут встре-

чаться мобильные элементы [94]. Между районами локализации генов 5S рРНК [95], а также ними и ЯО [96] в политепных ядрах наблюдается эктопическая конъюгация. По-видимому, синтез 5S рРНК скоординирован с синтезом 18S и 28S рРНК [97], но число генов не зависит от количества генов рРНК. Во всяком случае оно не уменьшено у мутантов bb [97].

Нехватка около половины генов 5S рРНК приводит к bb-подобному фенотипу - mini [93, 98]. Это оспаривается Чуди и др. [94], утверждающих, что в данных экспериментах нехватки в кластере генов 5S рРНК затронули соседние гены тРНК, выпадение которых и вызвала mini-фенотип. В работе [94] делеция 60% генов 5S рРНК не приводила к фенотипическим эффектам. В хромосоме, находящейся против хромосомы с полной делецией всего кластера генов 5S рРНК, число этих генов увеличивается практически вдвое [93]. Это явление аналогично компенсации генов рРНК. У особей с тремя дозами генов 5S рРНК количество генов оказывается утроенным.

В политепных клетках слонных желез или полиплоидных клетках яичника относительное содержание генов 5S рРНК такое же, как в диплоидных клетках [99, 100]. Увеличение дозы соответствующих участков хромосом приводит к пропорциональному увеличению числа генов [100]. Как и в ДНК целых мух, в политепных хромосомах число генов у особей с двумя участками локализации генов 5S рРНК равно их числу у гетерозигот по нехватке.

Таким образом, в некоторых аспектах умеренно повторяющиеся гены 5S рРНК ведут себя аналогично генам рРНК, а в других (при политепизации) отличаются. Хотя гены 5S рРНК изучены значительно меньше, ясно, что и эти гены способны в некоторых условиях к независимой регуляции своей репликации. Различия же могут быть вызваны либо отсутствием на флангах высокоповторяющихся последовательностей, т.е. локализацией в эухроматине, либо своеобразным набором мобильных генетических элементов, расположенных в этом районе, либо, наконец, иными причинами.

3. САТЕЛЛИТНЫЕ ДНК

Большинство организмов содержит нетранскрибируемые последовательности, выявляемые при центрифугировании в градиенте плотности солей цезия в виде отдельных пиков сател-

литной ДНК [101, 102]. У каждого вида таких фракций может быть несколько. Каждая из них представляет один или несколько тандемных блоков коротких повторов (от 5 до 360 н.п.). Количество ДНК, приходящееся на эти фракции, в геномах разных видов дрозофилы может варьировать от 0 до 60%. Некоторые фракции сходны между собой внутри вида и у близких видов, другие – могут быть видоспецифичны. Локализуется сателлитная ДНК в основном в гетерохроматических участках хромосом: либо всех [103], либо только одной [104]. Гетерохроматин разных хромосом содержит различное количество (от 0 до 100%) отдельных фракций сателлитной ДНК [73, 103, 105, 106]. Известно наличие в блоках сателлитной ДНК вставок мобильных генетических элементов [107].

В политенных хромосомах, подобно рДНК, сателлитная ДНК обычно недореплицируется. Однако степень ее недорепликации значительно больше: она проходит, по-видимому, не более одного – двух циклов репликации [108]. Разные ядра даже внутри одной личинки могут сильно отличаться по количеству сателлитной ДНК [109]. Недорепликация сателлитной ДНК обнаружена и в полиплоидных клетках [110, 111]. С недорепликацией в полиплоидных и политенных клетках связано, вероятно, уменьшение доли сателлитной ДНК в ДНК взрослых мух по сравнению с ДНК эмбрионов [105, 112]. В этих исследованиях показано, что степень недорепликации различных фракций сателлитной ДНК неодинакова в разных хромосомах. Например, у *D. melanogaster* часть фракции с плавающей плотностью $1,672 \text{ г/см}^3$, локализуемая в участке 81F, реплицируется, по-видимому, в 4–5 раз больше, чем тот же сателлит в 4-й хромосоме [113]. Кроме недорепликации в большинстве типов полиплоидных клеток, сателлитные последовательности могут и гиперреплицироваться. Так, доля сателлитной ДНК увеличена в полиплоидных клетках яичника куколок и только что вылетевших мух [110].

Вероятно, и диплоидные клетки отдельных тканей способны к избирательной репликации сателлитной ДНК. Было показано [114, 115], что количество хроматина, окрашиваемого Hoechst 33258 и содержащего в основном обогащенную А+Т-парами сателлитную ДНК, неодинаково в диплоидных эмбриональных клетках, клетках нервных ганглиев и имажинальных дисков личинок. По-видимому, в последних двух типах тканей специфично усилена репликация сателлитной ДНК.

Количество отдельных фракций сателлитной ДНК может изменяться при определенных генетических условиях. Так, описан случай появления в X-хромосоме линии *D.melanogaster* с инверсией sc^4Lsc^8R , отсутствующей в норме на границе эухроматина и гетерохроматина сателлитной последовательности сплавучей плотностью $1,705 \text{ г/см}^3$ [116]. В этом случае, однако, неясно, отсутствовал ли сателлит здесь до образования под действием X-лучей перестройки. Стон и др. [117] показали, что в линии $CyL^4/M(2)S2^{10}$ (нехватка в прицентромерном гетерохроматине 2-й хромосомы) увеличено количество этой же сателлитной фракции. На разных стадиях развития и в разных тканях оно неодинаково. Особенно сильно выражено увеличение содержания этого типа ДНК в яичниках. Формально данное явление может соответствовать феномену компенсации нехватки генов рРНК, описанному выше. Доля сателлитной ДНК в разных участках также может зависеть от особенностей структуры других хромосом. Например, в присутствии в геноме некоторых инвертированных X-хромосом может уменьшаться количество этой ДНК в хромосоме 3 [113]. Было также показано увеличение содержания тотальной сателлитной ДНК у мух, развитие которых приходило при пониженной температуре [118].

В совокупности эти данные свидетельствуют о существенной вариабельности количества сателлитной ДНК у дрозофилы, которое может меняться и в полиплоидных, и в диплоидных клетках. Эта вариабельность, по крайней мере частично, зависит от генетического фона и не связана с локализацией сателлитной ДНК в прицентромерном гетерохроматине. Отноше не все последовательности, даже повторяющиеся, здесь недо-реплицируются [119]. И, наоборот, способность менять свое количество может быть характерна для некоторых типов пов-торов, не локализованных в норме в прицентромерном гете-рохроматине. Уже было отмечено это для генов 5S-рРНК (разд. 2). То же было показано для своеобразной структуры, названной торомерой и обнаруженной у *D.melanogaster* [120] и у вида группы *virilis* - *D.lummei* [121]. Было продемонстрировано, что эта структура ярко окрашивается акрихином, содержит ДНК и связана с дистальным участком маленькой 6-й хромосомы [121]. Число торомер в клетке и число клеток с ними увеличивается при понижении темпера-туры развития. Евгеньев М.Б. и др. [122] показали, что эта структура не содержит сателлитных ДНК, но обогащена поли- dAT-повтором.

Таким образом, в зависимости от генетических и внешних условий может меняться количество самых разных типов последовательностей ДНК. Совокупность приведенных в разд. 1-4 данных показывает, что различные повторяющиеся элементы генома дрозофилы как транскрибируемые, но не кодирующие белки, так и транскрипционно неактивные (сателлитные ДНК), способны дифференциально реплицироваться. Есть основания предполагать, что изменчивость их содержания в различных типах клеток необходима в связи с тем, что геном эукариот является дезоксирибонуклеопротеидом [123]. Возможно, что избыток или недостаток некоторых фракций ДНК приводит к количественной и качественной реорганизации белкового компонента хромосом. Перестройка предполагаемого "рисунка" белков может быть основана на "перетягивании" разных типов белков с одних последовательностей ДНК на другие, обусловленного неодинаковым сродством белков к различным фракциям ДНК [124-126], ее конформациям [127], уже связанным с ней белкам [128] и т.д. Это все должно сказываться на генетической активности разных участков хромосом. Такие соображения имеют некоторые основания [123-129], но требуют прямых доказательств.

В отдельных случаях могут увеличиваться в своем количестве и некоторые типы последовательностей, кодирующие белки. Это хорошо известно для млекопитающих [130]. У дрозофилы также известны случаи изменения числа структурных генов. Одна ситуация связана с повторяющимися генами гистонов, а вторая - с уникальными генами, кодирующими белки хориона насекомых. Рассмотрены эти явления в разд. 4 и 5.

4. ИЗМЕНЧИВОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ ГЕНОВ ГИСТОНОВ

150-200 повторов, состоящих из структурных генов всех пяти типов гистонов, у *D. melanogaster* тандемно сгруппированы в единственном локусе на хромосомах в участке 39DE хромосомы 2 [131-133]. Существуют два типа повторов, отличающихся по длине за счет вставки между генами, кодирующими гистоны H1 и H3, так что в составе блока гистоновых генов у дрозофилы можно выделить длинные (L) и короткие (S) повторы [132]. В разных диких линиях их соотношение варьирует от 1:1 до 1;4 [134]. Оба типа повторов в основном образуют субкластеры и практически не перемежа-

ются между собой [135]. В некоторых линиях выявляются минорные повторы различного размера [134], одинаковые для всех мух каждой линии. В ряде случаев появление таких миноров связано с инсерциями различных мобильных генетических элементов [136]. В политенных хромосомах гены гистонов недореплицируются [137]. В культуре клеток они могут иногда амплифицироваться [138].

В работе Чернышева с соавт. [133, 139], а также Мура и др. [140] был исследован вопрос об изменении числа структурных генов гистонов при их частичной нехватке. В линии, у которой хромосома с делецией всего кластера генов гистонов находится длительное время против нормальной хромосомы, число генов гистонов в последней увеличивается почти вдвое, так что в данном генотипе число гистоновых генов оказывается практически нормальным. Вся "избыточная" ДНК, судя по гибридизации *in situ*, находится в нормальном гомологе и вместе с ней передается потомству. Если хромосома с нехваткой оказалась в гетерозиготе с другой нормальной хромосомой, то и в последней количество гистоновых генов увеличивается. В первых поколениях у мух из таких последовательных скрещиваний избыточная ДНК связана с нормальной хромосомой нестабильно и не наследуется. Начиная с 6-8 поколения, если хромосома с избытком генов гистонов находилась все время против хромосомы с нехваткой, новая гистоновая ДНК в ней относительно стабилизируется и передается потомству. Количество гистоновых генов в целой хромосоме при этом постепенно увеличивается.

У самцов в первом поколении с нехваткой удалось обнаружить небольшое количество ДНК в виде кольцевых молекул [139]. Можно предполагать, что в ряду поколений дополнительно возникшие гены гистонов интегрируют в гомологичный локус целой 2-й хромосомы. Их интеграция, однако, не слишком стабильна, и в течение нескольких поколений, если хромосома с умноженными гистоновыми генами находится против нормальной хромосомы, количество гистоновых генов в ней падает до исходного уровня. Таким образом, процесс увеличения гистоновых генов при их частичной нехватке в некоторых аспектах напоминает компенсацию и магнификацию *r*-генов, а в других - не сходен. Еще одним отличием "магнификации" гистоновых генов от процесса наследуемого умножения генов *r*РНК, является избирательная репликация определенных типов повторов. В разд. 1.2 было отмечено, что при магнификации рибосомных генов увеличивается количество всех их типов, да-

же со вставками. При мультипликации генов гистонов происходит избирательное размножение только повтора S-типа [139].

У мух с тремя участками района 39DE количество гистоновых генов в 1,5 раза больше, чем у нормального диплоида [131]. Такая же ситуация наблюдается для генов 18S + 28S рРНК [37] и 5S рРНК [93]. Все это показывает, что избыток повторяющихся генов менее вреден, чем их недостаток. Правда, известны случаи ликвидации целых лишних ЯО в ходе пассирования линии мух с 3 и 4 ЯО [37] и снижения количества рДНК, приходящегося на 1 ЯО, у трехядрышковых особей [141]. Последнее явление было названо ретрокомпенсацией.

5. ГЕНЫ БЕЛКОВ ХОРИОНА

У *D. melanogaster* гены белков хориона являются родственными генами, образующими мультигенное семейство [142]. Каждый ген кодирует один определенный полипептид, входящий в хорион. У *D. melanogaster* таких генов насчитывается около 20 [143]. Они объединены в подгруппы по 2-3 гена, локализованные в нескольких участках хромосом [144-147]. Между генами находятся небольшие промежутки некодирующей ДНК. Разные группы генов активируются последовательно, а гены одной группы, расположенные рядом, транскрибируются синхронно на одной стадии образования хориона.

Гены активны только в фолликулярных клетках, образующих хорион, в течение довольно кратковременного периода (у *D. melanogaster* - 5 час. [148]).

Расчеты показывают, что одной копии данного гена недостаточно для синтеза того количества белка, которое обнаруживается в хорионе [149]. Однако в эмбриональных клетках дрозофилы в гаплоидном геноме имеется всего по одной копии каждого из генов. Поэтому выработался механизм их амплификации в фолликулярных клетках во время образования хориона. Амплификация генов белков хориона начинается незадолго до начала образования белка и достигает максимума уже во время синтеза белка [149, 150]. Гены сохраняются в амплифицированном виде и после его завершения. Интересно, что, согласно данным Тиреоса с соавт. [150],

РНК, специфическая для данного белка, образуется в начале амплификации, когда еще нет синтеза белка. Однако она быстро разрушается и не транслируется.

Таким образом, амплификация сама по себе, по-видимому, является сигналом для начала транскрипции, но вместе с тем требуется действие дополнительных регуляторных факторов, определяющих стабильность новообразованной мРНК. Подобная амплификация характерна для всех изученных к настоящему времени генов белков хориона дрозофилы. Однако степень амплификации разных генов может быть неодинаковой и колебаться от 14 до 60 раз. Различия в уровне амплификации приблизительно соответствуют количеству разных белков в хорионе. Амплификация, наблюдаемая в ходе хорионогенеза, не ограничивается зоной структурных генов, поскольку мультиплицируются большие фрагменты ДНК – до 40–50 т.н.п. по обе стороны от локализованных рядом двух структурных генов [151]. Максимальная амплификация наблюдается в центре амплифицирующегося участка (10 000 – 20 000 н.п.) и градиентно снижается к концам домена.

Амплификация генов белков хориона зависит, по-видимому, от специального контролирующего элемента. В X-хромосоме обнаружена мутация *ocelliless* (*oc*), подавляющая образование некоторых белков хориона [152]. У гомозиготных по этой мутации мух в фолликулярных клетках в значительной степени снижена амплификация соседних генов белков хориона. Мутация *oc* оказалась короткой инверсией, один из разрывов которой произошел рядом (в пределах 1000–3000 н.п. ДНК) с двумя расположенными по соседству генами белков хориона [153]. По-видимому, в результате инверсии контролирующий элемент перенесен в другое место, но, однако, не весь, так как амплификация, хотя и в меньшей степени, сохраняется. Это позволяет предполагать, что контролирующий элемент состоит из повторяющихся сегментов ДНК, каждый из которых способен реагировать с включающим мультипликацию генов сигналом. В амплифицирующемся участке может быть расположен другой регуляторный элемент [142], снижение амплификации которого вызывает уменьшение количества других белков хориона, кодируемых генами, расположенными на другой хромосоме [152] и амплификация которых не нарушена [153]. Следовательно, данный регуляторный элемент влияет на иные механизмы экспрессии этих генов, например стабильность мРНК, ее трансляционную способность и т.п., и является, вероятно, элементом каскадной регуляции.

Более отдаленные от контролирующего элемента последовательности ДНК роли в амплификации скорее всего не играют, так как Спрадлинг показал (см. [154]), что гены белков хориона, введенные в клетки вместе с Р-элементом и интегрированные в новые для себя, непривычные районы хромосом, прекрасно амплифицируются в соответствующий период. В то же время в X-хромосоме вдали от структурных генов белков хориона обнаружено два гена, мутации которых вызывают стерильность самок и дефекты в морфологии хориона, обусловленные подавлением в транс-положении амплификации генов всех главных белков хориона [155].

Любопытно, что последовательность ДНК, которая после образования инверсии $In(1)os$ стала контактировать с оставшейся частью контролирующего амплификацию элемента, также приобрела способность мультиплицироваться на соответствующей стадии функционирования фолликулярных клеток [153]. Если данный участок хромосомы содержит какие-либо существенные гены, то в результате амплификации их функционирование должно измениться. Это равноценно значительному увеличению их дозы, которой пропорциональна активность большинства ферментов. Подобная ситуация может привести к нежелательным фенотипическим эффектам и это, возможно, является причиной плейотропного действия мутации os . По крайней мере в некоторых случаях, вероятно плейотропное действие мутаций может объясняться одновременным изменением дозы их генов, когда они локализуются рядом с участками хромосом, способными к регулируемой мультипликации, но нарушенной при мутационном изменении последней.

Хотя амплификация скорее всего является триггером транскрипции генов белков хориона, она не исключает дифференциальной регуляции активности и на уровне транскрипции. Гриффин-Шиа и др. [156] показали, что в участке 66D в хромосоме 3 одновременно и равно амплифицируются 4 гена белка хориона, но уровень каждой из транскрибируемых РНК далеко не одинаков.

В настоящее время становится ясным механизм амплификации генов белков хориона. Ошейм и Миллер [157] получили электронномикроскопические картины реплицирующегося хроматина ядер фолликулярных клеток на той стадии их развития, когда наблюдается максимальная амплификация генов белков хориона. Обнаружены структуры, образующие множество вилок репликации, причем так, что каждая реплициро-

ванная нить образует следующую вилку репликации, последняя – еще одну и т.д. Используя как маркеры генов видимые при этих условиях транскрипты, длина которых грубо пропорциональна длине белков, было показано, что origin репликации расположен рядом со структурными генами слева от них, как предполагалось и ранее [142]. Лшейм и Миллер также показали, что механизмы амплификации одинаковы для двух групп генов, расположенных в разных хромосомах и отличающихся по степени амплификации.

Данная работа имеет более общее значение, так как показывает возможные механизмы мультпликации последовательностей, обнаруженной и в других случаях. Например, у сциарид, представителей другого рода отряда Diptera, на определенных стадиях развития происходит образование своеобразных пухов в политенных хромосомах [158, 159]. В этом случае в части дисков политенных хромосом наблюдается 16-кратная гиперрепликация ДНК, начинающаяся также незадолго до синтеза РНК, необходимой для быстрого и интенсивного образования специальных белков слюны. Легче всего представить, что и в данном случае механизмом амплификации этих последовательностей должен быть синтез экстра-ДНК с образованием множества вилок репликации. Однако он может осуществляться, по-видимому, только в тех типах клеток, которые уже терминально дифференцированы.

6. НЕКОТОРЫЕ ДРУГИЕ СЛУЧАИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ РЕПЛИКАЦИИ ДНК

Описанные выше многочисленные примеры дифференциальной репликации ДНК у дрозофилы, однако, не ограничивают все их разнообразие. Кроме того, широкий смысл понятия "дифференциальная репликация" позволяет рассматривать в этом аспекте и другие феномены изменчивости генома. Некоторые из них рассматриваются в следующем разделе.

6.1. Изменение количества ДНК на границах перестроек

Описано довольно много случаев изменения содержания ДНК на границах перестроек. В большинстве случаев наблюдается недорепликация ДНК в политенных ядрах слюнных желез в районах, приближенных в результате перестройки к гетерохроматину, особенно в условиях, способствующих проявлению

нию эффекта положения мозаичного типа [160-162]. Необходимо подчеркнуть, что не любая такая перестройка приводит к локальному снижению политенизации ДНК [163]. В некоторых случаях наблюдали не только снижение политенизации вблизи точек разрыва, но и ее увеличение в соседнем районе [164, 165]. Эти два противоположных процесса, строго говоря, могут быть и не связаны с эффектом положения. Так, Кроуэлл и Хартман-Гольдштейн [165] показали, что факторы, влияющие на проявление эффекта положения, не действуют в этом смысле закономерно на репликацию соседних участков около границ изученной ими перестройки.

Любопытный случай описан Робертсом [166], показавшим, что при определенных перестройках (двух транслокациях хромосомы 4 на хромосому 3) начинается репликация в политенных хромосомах левого плеча хромосомы 4; которое в норме в политенных ядрах не реплицируется совсем. Автор предполагает, что в данном случае репликация левого плеча хромосомы 4 вышла из-под контроля гетерохроматина.

6.2. Изменение политенизации хромосом и их отдельных участков

Сам факт существования политенных хромосом можно рассматривать как пример дифференциальной репликации ДНК. Функции политенизации хромосом до сих пор неясны, но общепринято, что это необходимо для выработки гигантских количеств некоторых белков. Оказалось, что политенизация зависит от ряда генетических факторов, мутации по которым могут изменять степень политении, а также физиологических и внешних условий. Хорошо известна мутация *gt* [167], в этом случае политенные хромосомы проходят у мутантов дополнительно 1-2 цикла репликации, и это позволяет эффективно использовать их для локализации различных последовательностей с помощью гибридизации *in situ*. Особенно сильно увеличена политения у гетерозигот по разным аллелям данной мутации. Кинг и др. [168] показали, что мутация *fs 231* вызывает стерильность самок, увеличивает степень политении и индуцирует синапсис гомологов в питающих клетках яичника. У гибридных самцов, полученных при скрещивании *D. azteca* × *D. athabasca*, хромосомы в слюнных железах проходят дополнительный цикл репликации [169]. Это отражает общее нарушение регуляции синтеза ДНК у таких гибридов,

так как дополнительная репликация наблюдается и в клетках крыловых имагинальных дисков [170].

Политения может также увеличиваться при выращивании личинок при пониженной температуре [171], инкубации инъецированных в более молодые личинки слюнных желез личинок поздних возрастов [172], а также у личинок, инфицированных вирусами и простейшими [173].

Все это указывает, что нет жесткого контроля репликации при политенизации. Действительно, иногда даже в культуре диплоидных клеток спонтанно могут возникать клетки с политенными хромосомами [174]. К сожалению, ни в одном из этих случаев не изучался вопрос о дифференциальной репликации отдельных классов последовательностей, что позволило бы установить примерные соотношения между жесткостью регуляции общей репликации при политенизации и ее автономностью для некоторых типов ДНК.

Различные причины могут влиять на политенизацию специфических участков хромосом. Так, Бишудо [175] описал весьма интересный случай увеличения в 2-3 раза политенизации в нескольких ядрах небольшого участка одной из хромосом у *D. septentrionalis*. Обнаружена специфическая амплификация ДНК одного диска в X-хромосоме самцов *D. arizosiensis* [176], отражающая, вероятно, особый механизм компенсации дозы сцепленных с полом генов у этого вида. У родственного вида *D. mulleri* подобной амплификации не обнаружено, но она сохраняется у гибридных самок *D. mulleri* × *D. arizosiensis* в X-хромосоме, пришедшей от *D. arizosiensis*.

Описано также увеличение содержания ДНК в районах прицентромерного и интеркалярного гетерохроматина политенных хромосом мутантов *ecd¹* [177], у которых в личиночный период снижен титр экдизона и нарушено развитие ряда тканей [178]. Это весьма интересно, поскольку показывает связь между процессами репликации ДНК и нормально действующим гормональным контролем. Не исключено, что дифференциальная репликация некоторых типов последовательностей, наблюдаемая в политенных и полиплоидных клетках дрозофил, прямо или косвенно связана с действием экдизона и других веществ, имеющих гормональную активность. Поскольку они, вероятно, запускают по крайней мере в политенных хромосомах, каскадную систему событий [179], то, возможно, одним из этапов этого каскада является дифференциальная репликация определенных последовательностей ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре была сделана попытка охватить множество разных случаев отклонения от правила постоянства содержания разных фракций ДНК у дрозофилы. Не рассмотрен только весьма любопытный феномен амплификации мобильных диспергированных генов в культуре клеток дрозофилы, так как он описан в обзоре Ильина Ю.В. [180]. Кроме того, сознательно ограничены по ряду причин приведенные примеры только дрозофилой. Об аналогичных явлениях у других организмов читатель может узнать из цитируемой литературы и ряда обзоров (например, из книги Хесина Р.Б. [1]). Наличие сходных феноменов во всем живом мире позволяет думать, что должны быть и общие механизмы подобного непостоянства генома. В настоящее время в большинстве конкретных случаев эти механизмы неясны, но очевидно, что они основаны на всех возможных и взаимосвязанных молекулярно-генетических процессах — репликации, транскрипции, рекомбинации и репарации. Например, магнификация генов рРНК, вероятно, обусловлена возможностью дополнительного синтеза рДНК на вырезанных из хромосомы и неинтегрированных матрицах и последующего встраивания за счет рекомбинационных механизмов реплицированных копий в линейном порядке в состав хромосомы. Не исключено, что некоторое количество экстрахромосомной рДНК образуется за счет обратной транскрипции, а также спонтанной репликации с образованием множества вилок репликации, аналогичной по механизму с амплификацией генов белков хориона.

В настоящее время очевидна распространенность феноменов непостоянства генома и, следовательно, их неслучайность. Изучение действующих при этом механизмов, безусловно, выявит особенности функционирования генома эукариот, а в ряде случаев может иметь и чисто прикладное значение.

Автор глубоко признателен Р.Б. Хесину за критическое обсуждение рукописи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хесин Р.Б. "Непостоянство генома", М., "Наука", 1984, 472 с.
2. Ritossa F. In: Genetics and Biology of Drosophila. Eds. M. Ashburner and E. Novitski, Acad. Press, New York, 1976, 1b, 801–846

3. Башкиров В.Н. "Генетика", 1980, 16, 7-29
4. Long E.O., Dawid I.B. "Annu. Rev. Biochem.", 1980, 49, 727-764
5. Glover D.M. "Cell", 1981, 26, 297-298
6. Bicudo H.E.M. de C., Richardson R.H. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1977, 74, 3498-3502
7. Stuart W.D., Bishop J.G., Carson H.L., Frank M.B. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1981, 78, 3751-3754
8. Zegarelli-Schmidt E.C., Goodman R. "Int. Rev. Cytol.", 1981, 71, 246-363
9. Носиков В. В., Брага Э.А. В сб. Итоги науки и техники, сер. Молекулярная биология, М., ВИНТИ, 1982, 18, 110 -215
10. Kidd S.J., Glover D.M. "Cell", 1980, 19, 103-119
11. Roiha H., Miller J.R., Woods L.C., Glover D.M. "Nature", 1981, 290, 749-753
12. Peacock W.J., Appels R., Endow S., Glover D. "Genet. Res.", 1981, 37, 209-214
13. de Cicco D.V., Glover D.M. "Cell", 1983, 32, 1217-1225
14. Dawid I.B., Long E.O., Di Nocera P.P., Pardue M.L. "Cell", 1981, 25, 399-408
15. Wellauer P.K., Dawid I.B. "Cell", 1977, 10, 193-212
16. Pellegrini M., Manning J., Davidson N. "Cell", 1977, 10, 213-224
17. Sharp Z.D., Gandhi V.V., Procunier J.D. "Mol. Gen. Genet.", 1983, 190, 438-443
18. Lifschytz E., Hareven D. "Chromosoma", 1982, 86, 429-442
19. Indik Z.K., Tartof K.D. "Nature", 1980, 284, 477-479
20. Long E.O., Dawid I.B. "Cell", 1979, 18, 1185-1196
21. Long E.O., Rebbert M.L., Dawid I.B. "Cold Spring Harbor Symp Quant. Biol.", 1981, 45, 667-662
22. Kidd S.J., Glover D.M. "J. Mol. Biol.", 1981, 151, 645-662
23. Shermoen A.W., Kiefer B.I. "Cell", 1975, 4, 275-280
24. Schafer U., Kunz W. "Heredity", 1976, 37, 351-355
25. Procunier J.D., Williamson J.H. "Dev. Biol.", 1974, 39, 198-209
26. Beck H. "Arch. Genetik", 1975, 48, 69-72
27. Schalet A. "Genetics", 1969, 63, 133-153
28. Maddern R.H. "Genet. Res.", 1981, 38, 1-7
29. Palumbo J., Caizzi R., Ritossa F. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1973, 70, 1883-1885
30. Robbins L.G. "Genetics", 1982, 99, 443-459

31. Spear B.B. "Chromosoma", 1974, 48, 159-179
32. Mohan J., Ritossa F. "Dev. Biol.", 1970, 22, 495-512
33. Tartof K.D. "Genetics", 1973, 73, 57-71
34. Gargano S., Graziani F. "Mol. Gen. Genet.", 1976, 145, 255-258
35. Spear B.B., Gall J.G. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1973, 70, 1359-1363
36. Locker D., Marrakechi M. "Mol. Gen. Genet.", 1977, 154, 249-254
37. Kubaneishvili M. Sh., Vorobyova N.V., Kakpakov V.T., Schuppe N.G. "Mol. Gen. Genet.", 1983, 190, 331-335
38. Procunier J.D., Tartof K.D. "Genetics", 1978, 88, 67-79
39. Ritossa F. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1968, 60, 509-516
40. Graziani F., Caizzi R., Gargano S. "J. Mol. Biol.", 1977, 112, 49-63
41. Malva C., La Volpe A., Gargiulo G. "Mol. Gen. Genet.", 1980, 180, 511-515
42. Tartof K.D. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1974, 71, 1272-1276
43. Endow S.A. "Genetics", 1982, 102, 91-99
44. Long E.O., Collins M., Kiefer B.I., Dawid I.B. "Mol. Gen. Genet.", 1981, 182, 377-384
45. Graziani F., Gargano S. "J. Mol. Biol.", 1976, 100, 59-71
46. Labella T., Vicari L., Manzi A., Graziani F. "Mol. Gen. Genet.", 1983, 190, 487-493
47. Boncinelli E., Borghese A., Graziani F., La Mantia G., Manzi A., Mariani C., Simeone A. "Mol. Gen. Genet.", 1983, 189, 370-374
48. Baker B.S., Hall J.C. In: 'Genetics and Biology of Drosophila', Eds M. Ashburner and E. Novitski, Acad. Press, New York, 1976, 1a, 351-434
49. Boyd J.B. In: DNA Mechanisms, Eds P.C. Hanawalt, E.C. Friedberg, C.F. Fox, Acad. Press, New York, 1978, 449-452
50. Gatti M. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1979, 76, 1377-1381
51. Polito L.C., Cavaliere D., Zazo A., Furia M.A. "Genetics", 1982, 102, 39-48
52. Osgood C.J. "Mol. Gen. Genet.", 1982, 186, 235-239
53. Pepe I., Polito L.C. "Atti Assoc. Genet. Ital.", 1975, 20, 154-156
54. Hawley R.S., Tartof K.D. "Genetics", 1983, 104, 63-80

55. Sandler L., Lindsley D.L., Nicoletti B. "Genetics", 1968, 60, 525-528
56. Sandler L. "Genetics", 1970, 64, 481-493.
57. Parry D.M., Sandler L. "Genetics", 1974, 77, 535-539.
58. Krider H.M., Levine B.I. "Genetics", 1975, 81, 501-518
59. Krider H.M., Yedvobnick B., Levine B. "Genetics", 1979, 92, 879-889
60. Sandler L. "Isr. J. Med. Sci.", 1975, 11, 1124-1134.
61. Graziani F., Vicari L., Boncinelli E., Malva C., Manzi A., Mariani C. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1981, 78, 7662-7664
62. Yedvobnick B., Krider H.M., Levine B.I. "Genetics", 1980, 95, 661-672
63. Sandler L. "Genetics", 1977, 86, 567-582
64. Laird C.D., Chooi W.J., Cohen E.H., Dickson E., Hutchinson N., Turner S.H. "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 1974, 38, 311-327
65. Hennig W., Meer B. "Nature New Biol.", 1971, 233, 70-71
66. Endow S.A., Glover D.M. "Cell", 1979, 17, 597-605
67. Endow S.A. "Cell", 1980, 22, 149-155
68. Endow S.A. "Genetics", 1982, 100, 375-385
69. Renkawitz-Pohl R., Glätzer K.H., Kunz W. "J. Mol. Biol.", 1981, 148, 95-101.
70. Franz G., Kunz W., Grimm C. "Mol. Gen. Genet.", 1983, 191, 74-80
71. Glätzer K.H. "Chromosoma", 1979, 75, 161-175
72. Endow S.A. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1983, 80, 4427-4431
73. Hilliker A.J., Appels R. "Chromosoma", 1982, 86, 469-490
74. Rudkin G.T. "Results and Probl. Cell Diff.", 1972, 4, 59-85
75. Hollenberg C.P. "Chromosoma", 1976, 57, 185-197
76. Zuchowski C.I., Harford A.G. "Chromosoma", 1976, 58, 219-233
77. Zuchowski C.I., Harford A.G. "Chromosoma", 1976, 58, 235-246
78. Zuchowski C.I., Harford A.G. "Cell", 1977, 11, 383-388
79. Harford A.G., Zuchowski C.I. "Cell", 1977, 11, 389-394
80. Zuchowski-Berg C.I. "Nature", 1978, 271, 60-61
81. Lifschytz E., Hareven D. "Chromosoma", 1982, 86, 443-455
82. Bicudo H.E.M. de C. "Biol. Zbl.", 1981, 100, 597-612
83. Bicudo H.E.M. de C. "Caryologia", 1981, 34, 231-253

84. Bicudo H.E.M. de C. "Brazil J. Genet.", 1981, 4, 347-355
85. Bicudo H.E.M. de C., Richardson R.H. "Brazil J. Genet."; 1981, 4, 477-481
86. Durica D.S., Krider H.M. "Genetics", 1978, 89, 37-64
87. Grimm C., Kunz W. "Mol. Gen. Genet.", 1980, 180, 23-26
88. Grimm C., Kunz W., Franz G. "Chromosoma", 1984, 89, 48-54
89. Kunz W., Schäfer U. "Genetics", 1976, 82, 25-34
90. Tartof K.D., Perry R.P. "J. Mol. Biol.", 1970, 51, 171-184
91. Hershey N.D., Conrad S.E., Sodja A., Yen P.H., Cohen M., Davidson N., Ilgen C., Carbon J. "Cell", 1977, 11, 585-598
92. Wimber D.E., Wimber D.R. "Genetics", 1977, 86, 133-148
93. Procnier J.D., Tartof K.D. "Genetics", 1975, 81, 515-523
94. Tchudi C., Pirrotta V., Yunakovic N. "The EMBO J.", 1982, 1, 977-985
95. Cohen M. "Chromosoma", 1976, 55, 349-358
96. Rudkin G.T., Stollar B.D. "Nature", 1977, 265, 472-473
97. Mohan J. "Genetics", 1975, 81, 723-738
98. Procnier J.D., Dunn R.J. "Cell", 1978, 15, 1087-1093
99. Renkawitz-Pohl R. "Chromosoma", 1978, 66, 249-258
100. Renkawitz-Pohl R. "Chromosoma", 1979, 70, 305-312
101. Brutlag D.L. "Annu. Rev. Genet.", 1980, 14, 121-144
102. Беридзе Т.Г. "Сателлитные ДНК". М., "Наука", 1982, 120 с.
103. Peacock W.J., Lohe A.R., Gerlach W.L., Dunsmuir P., Dennis E.S., Appels R. "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 1978, 42, 1121-1135
104. Wheeler L.L., Arrighi F., Cordeiro-Stone M., Lee C.S. "Chromosoma", 1978, 70, 41-50
105. Wollenzien P., Barsanti P., Hearst J.E. "Genetics", 1977, 87, 51-65
106. Renkawitz R. "Chromosoma", 1978, 66, 237-248
107. Carlson M., Brutlag D. "Cell", 1978, 15, 733-742
108. Gall J.G., Cohen E.H., Atherton D.D. "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 1974, 38, 417-421
109. Lakhotia S.C., Mishra A. "Chromosoma", 1980, 81, 137-150.
110. Endow S.A., Gall J.G. "Chromosoma", 1975, 50, 175-192
111. Renkawitz-Pohl R. "Chromosoma", 1975, 49, 375-382
112. Blumenfeld M., Forrest H.S. "Nature New Biol.", 1972, 93, 170-172
113. Steffensen D.M., Appels R., Peacock W.J. "Chromosoma", 1981, 82, 525-541.

114. Lakhotia S.C., Kumar M. "Indian J. Exp. Biol.", 1980, 18, 1066-1071
115. Lakhotia S.C. "Genetica", 1983, 54, 247-250
116. Peacock W.J., Appels R., Dunsmuir P., Lohe A.R., Gerlach W.L. In: "International Cell Biology". Eds B.R. Brinkley, K.P. Porter, Rockefeller Univ. Press, New York, 1977, 494-504
117. Stone J.C., Hauseman J., Cseko Y., Sederoff R. "Genetics", 1976, 83, s74
118. Chernyshev A.I., Leibovitch B.A. "Drosophila Inform. Serv.", 1981, 56, 30-32
119. Renkawitz R. "Chromosoma", 1978, 66, 225-236
120. Barr H.J., Ellison J.R. "J. Cell Biol.", 1973, 59, 17a
121. Sinibaldi R.M., Grilly M.E., Barr H.J. "Chromosoma", 1976, 58, 63-71
122. Евгеньев М.Б., Степанова Н.Г., Левин А.В., Шилов А.А., Чернышев А.И. "Молек. биол.", 1982, 16, 626-632
123. Хесин Р.Б., Лейбович Б.А. "Молек. биол.", 1976, 10, 3-34
124. Hsieh T.-S., Brutlag D.L. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1979, 76, 726-730
125. Schmidt E.R., Keyl H.-G. "Chromosoma", 1981, 82, 197-204
126. Levinger L., Varshavsky A. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1982, 79, 7152-7156
127. Nordheim A., Tesser P., Azorin F., Kwon Y.H., Moller A., Rich A. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1982, 79, 7729-7733
128. Караванов А.А., Афанасьев Б.Н. "Молек. биол.", 1983, 17, 213-233
129. Лейбович Б.А., Богданова Е.С. "Молек. биол.", 1983, 17, 162-171
130. Хесин Р.Б. Мол. биол., 1980, 14, 1205-1233
131. Pardue M.L., Kedes L.H., Weinberg E.S., Birnstiel M.L. "Chromosoma", 1977, 63, 135-151
132. Lifton R.P., Goldberg M.L., Karp R.W., Hogness D.S. "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 1978, 42, 1047-1051
133. Чернышев А.И., Башкиров В.Н., Лейбович Б.А., Хесин Р.Б. "Молек. биол.", 1981, 15, 387-393
134. Strausbaugh L.D., Weinberg E.S. "Chromosoma", 1982, 85, 489-505
135. Saigo K., Mollstein L., Thomas C.A. "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", 1981, 45, 815-827
136. Ikenaga H., Saigo K. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1982, 79, 4143-4147

37. Lifshytz E. "J. Mol. Biol.", 1983, 164, 17-34
38. Saigo K., Ueda R., Myake T. "Biochim. Biophys. Acta", 1983, 740, 390-401
139. Чернышев А.И. "Молек. биол.", 1982, 16, 593-603
140. Moore G.D., Sinclair D.A., Grigliatti T.A. "Genetics", 1983, 105, 327-344
141. Башкиров В.Н., Кубанейшвили М.Ш., Ялакас М.Э., Карпов И.А., Шуппе В.Г. "Докл. АН СССР", 1984, 275, 754 - 758
142. Лейбович Б.А. "Генетика", 1983, 19, 853-863
143. Waring G.L., Mahowald A.P. "Cell", 1979, 16, 599-607
144. Spradling A.C., Digan M.E., Mahowald A.P., Scott M., Craig E.A. "Cell", 1980, 19, 905-914
145. Spradling A.C., Mahowald A.P. "Cell", 1979, 16, 589-598
146. Griffin-Shea R., Tzeos G., Kafatos F.C., Petri W.H., Villa-Komaroff L. "Cell", 1980, 19, 915-922
147. Yannoni C.Z., Petri W.H. "Wilhelm Roux's Archives", 1981, 190, 301-303
148. David J., Merle J. "Drosophila Inform. Serv.", 1968, 43, 122-123
149. Spradling A.C., Mahowald A.P. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 77, 1980, 1096-1100
150. Thireos G., Griffin-Shea R., Kafatos F.C. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1980, 77, 5789-5793
151. Spradling A.C. "Cell", 1981, 193-201
152. Spradling A.C., Waring G.L., Mahowald A.P. "Cell", 1979, 16, 609-616
153. Spradling A.C., Mahowald A.P. "Cell", 1981, 27, 203-209
154. Ashburner M. "Nature", 1982, 300, 15-16
155. Komitopoulou K., Gans M., Margaritis L.H., Kafatos F.C., Masson M. "Genetics", 1983, 105, 897-920
156. Griffin-Shea R., Tzeos G., Kafatos F.C. "Dev. Biol.", 1982, 91, 325-336
157. Osheim Y.N., Miller O.L. "Cell", 1983, 33, 543-553
158. Crouse H.V., Keyl H.G. "Chromosoma", 1968, 25, 357-364
159. Glover D.M., Zaha A., Stocker A.J., Santelli R.V., Puevo M.T., de Toledo S.M., Lara F.J.S. "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", 1982, 79, 2947-2951
160. Spofford J.B. In: Genetics and Biology of Drosophila *, Eds M. Ashburner and E. Novitski, Acad. Press, New York, 1976, 1c, 955-1018

161. Ananiev E.V., Gvozdev V.A. "Chromosoma", 1974, 45, 173-191
162. Wargent J.M., Hartmann-Goldstein I.J., Goldstein D.J. "Nature", 1974, 248, 55-57
163. Hennikoff S. "Chromosoma", 1981, 83, 381-393
164. Cowell J.K., Hartmann-Goldstein I.J. "Chromosoma", 1980, 79, 329-340
165. Cowell J.K., Hartmann-Goldstein I.J. "Chromosoma", 1980, 81, 55-64
166. Roberts P.A. "Genetics", 1972, 72, 607-614
167. Lindsley D.L., Grell E.H. "Genetic Variations in *Drosophila melanogaster*", Carnegie Institute Washington Publication, 1968, N 627
168. King R.C., Riley S.F., Cassidy J.D., White P.E., Paik Y.K. "Science", 1981, 212, 441-443
169. Meer B. "Chromosoma", 1976, 57, 235-260
170. Meer B. "Wilhelm Roux's Archives", 1980, 189, 83-89
171. Hartmann-Goldstein I., Goldstein D.J. "Chromosoma", 1979, 71, 333-346
172. Hadorn E., Gehring W., Staub M. "Experientia", 1963, 19, 530-531
173. Pavan C., da Cuhna A.B. "Genetics", 1969, 61, Suppl., 289-304
174. Shields G., Dubendorfer A., Sang J.H. "J. Embryol. Exp. Morphol.", 1975, 33, 159-175
175. Bicudo H.E.M. de C. "Drosophila Inform. Serv.", 1972, 49, 74-75
176. Bicudo H.E.M. de C. "Biol. Zbl.", 1983, 102, 685-695
177. Sinha P., Mishra A., Lakhotia S.C. XV International Congress of Genetics (Abstracts), New Delhi, Oxsword and IPH Publishing, 1983, p. 502
178. Redfern C., Bownes M. "Mol. Gen. Genet.", 1983, 189, 432-440
179. Ashburner M. "Nature", 1980, 285, 435-436
180. Ильин Ю.В. В сб. Итоги науки и техники, сер. Молекулярная биология. М., ВИНТИ, 1982, 18, 5-48

СОДЕРЖАНИЕ

(соответствует рубрике 34.15.05 Рубрикатора ГАСНТИ)

Предисловие	3
В. К. Равин. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА НЕМАТОДЫ CAENORHABDITIS ELEGANS.	
<u>Введение</u>	5
1. Строение, жизненный цикл и культивирование.	6
2. Генетика	12
2.1. Фенотипы мутантов	13
2.2. Получение мутантов	15
2.3. Номенклатура	16
2.4. Генетический анализ .	21
2.5. Хромосомные перестройки .	24
2.6. Межгенные взаимодействия	25
2.7. Генетика пола	27
2.8. Устойчивость к левамизолу	30
2.9. Роллер-мутанты	31
3. ДНК .	33
4. Развитие	38
5. Спящая личинка (dauer larva)	49
6. Белки	51
7. Тепловой шок .	54
8. Старение	55
Заключение	59
Литература	59
Е. В. Ананьев. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЦИТОГЕНЕТИКА МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ DROSOPHILA MELANOGASTER	
<u>Введение</u>	65
1. Обнаружение мобильных диспергированных генов дрозофилы	66
2. Структурная организация мобильных генетических элементов	70
2.1. МДГ-подобные мобильные генетические элементы	71
2.2. FВ-мобильные элементы	73
2.3. Р-элемент	74

2.4.	hobo –элемент	75
2.5.	Вставки в рибосомные гены	75
2.6.	F –семейство	76
2.7.	Дупликация сайта интеграции – общее свойство мобильных элементов	77
2.8.	Инвертированные концевые повторы	78
2.9.	Прямые длинные концевые повторы	79
3.	Происхождение мобильных генетических элементов	79
4.	Мобильные генетические элементы в онтогенезе и первые попытки обнаружить их транспозицию	80
5.	Мутагенез, нестабильные мутации и транспозиции мобильных генетических элементов	82
6.	Видообразование и мобильные генетические элементы	85
7.	Распределение мобильных генетических элементов в геноме дрозофилы	88
7.1.	Общее число сайтов интеграции в геноме для мобильных генетических элементов.	88
7.2.	Взаимное распределение мобильных элементов	91
7.3.	Распределение мобильных генетических элементов относительно районов хромосом с различной структурной и функциональной организацией	92
8.	Использование мобильных элементов в генетическом анализе в качестве молекулярно–генетических маркеров	98
	Заключение	99
	Литература	100
А.А. Крамеров, В.А. Гвоздев. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ДЕЙСТВИЯ ЭКДИСТЕРОНА НА КЛЕТКИ		
	Введение	106
1.	Схема действия стероидных гормонов на клетки-мишени	109
2.	Механизмы взаимодействия экдистерона с клетками дрозофилы	112
2.1.	Белковые рецепторы экдистерона	112
2.2.	Регуляция экдистероном экспрессии генов на хромосомном уровне	114
2.3.	Регуляция экдистероном экспрессии индивидуальных генов на уровне транскрипции	120

3. Регуляция экдистероном морфогенеза и клеточной дифференцировки .	125
Заключение	133
Литература	133

Е.Р. Лозовская, М.Б. Евгеньев. ТЕПЛОВОЙ ШОК У ДРОЗОФИЛЫ И РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНОМА	142
Введение	142
1. Пуфы, активирующиеся при ТШ и других внешних воздействиях	143
2. Синтез рНК при ТШ	148
3. Белки ТШ	155
4. Функции БТШ	161
5. Структурная организация и эволюция генов ТШ..	161
6. Контроль экспрессии генов ТШ	165
Заключение .	178
Литература	179

Б.А. Леябович, ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ РЕПЛИКАЦИЯ ДНК У ДРОЗОФИЛЫ	186
Введение	186
1. Гены рРНК	186
1.1. Структура рибосомных генов	186
1.2. Изменчивость количества генов рРНК . .	188
1.2.1. Мутации bobbed	188
1.2.2. Неравный мейотический кроссинговер в локусе bb	189
1.2.3. Компенсация генов рРНК	190
1.2.4. Локус sg	191
1.2.5. Магнификация генов рРНК	192
1.2.6. Механизмы магнификации генов рРНК. .	194
1.2.7. Влияние мутаций mei на магнификацию	196
1.2.8. Локус avo	197
1.2.9. Репликация рДНК в политенных хромосомах	198
1.2.10. Влияние окружающего гетерохроматина на репликацию рДНК в политенных хромосомах	199
1.2.11. Ядрышковое доминирование у межвидовых гибридов	201

1.2.12, Гитеррапликация рДНК в диплоидных клетках	202
1.3. Общие замечания по дифференциальной репликации генов рРНК	203
2. Гены 5S рРНК	204
3. Сателлитные ДНК	205
4. Изменчивость содержания генов гистонов	208
5. Гены белков хориона	210
6. Некоторые другие случаи дифференциальной репликации ДНК	213
6.1. Изменение количества ДНК на границах перестроек	213
6.2. Изменение политенизации хромосом и их отдельных участков	214
Заключение	216
Литература	216

Технический редактор С.В. Василенко Корректор В.П. Прошина

Сдано в набор 13.09.84

Подписано в печать 31.08.84	Т-15680
Формат 60 × 90 1/16	Бум.офс. № 1 Печать офсетная
Усл.печ.л. 14,25	Усл.кр.-отт. 14,44 Уч.-изд.л. 13,32
Тир. 500 экз.	Цена 2 р. 50 к.
	Зак. 7081

Адрес редакции: 125219, Москва, А-219, Балтийская ул.14.
Тел. 155-43-19

Производственно-издательский комбинат ВИНТИ
140010, Люберцы 10, Московской обл.,
Октябрьский проспект, 403

ИНТ. Молекулярная биология, т. 20, 1984, с. 1 - 228
Индекс 56877

УДК 576.8*313*

В.К. Равин. Молекулярная биология и генетика нематоды *Caenorhabditis elegans*. "Итоги науки и техн. ВИНТИ. Молекулярная биология", 1984, 20, 5 - 64

Отмечено, что простота культивирования, небольшая продолжительность жизни, доступность мутантных линий и хорошая генетическая изученность делают *C.elegans* удачным объектом для анализа закономерностей индивидуального развития, старения, нервной деятельности. Предлагаемый обзор ориентирован на генетиков и биохимиков, интересующихся этими проблемами. Библи. 113.

УДК 595.774.4

Е.В. Ананьев. Молекулярная цитогенетика мобильных диспергированных элементов *Drosophila melanogaster*. "Итоги науки и техн. ВИНТИ. Молекулярная биология", 1984, 20, 65 - 105

Рассматриваются вопросы, связанные с организацией мобильных генетических элементов дрозофилы и закономерностями их распределения в геноме. Обсуждается проблема многообразия типов структурной организации мобильных элементов в связи с механизмами их транспозиции и с проблемой их происхождения. Библи. 118.

УДК 577.17

А.А. Крамеров, В.А. Гвоздев. Молекулярные основы действия эхдистерона на клетки. "Итоги науки и техн. ВИНТИ. Молекулярная биология", 1984, 20, 106-141

Приведены доказательства регулирующего действия эхдистерона на уровне транскрипции генов, а также данные об участии рецепторов гормона и специфических последовательностей ДНК в процессе взаимодействия гормона с генетическим аппаратом клетки. Обсуждается роль вызываемых гормоном изменений синтеза макромолекул при морфогенезе и дифференцировке клеток. Библи. 192.

УДК 575.113:547.963.32

Е.Р. Лозовская, М.Б. Евгеньев. Тепловой шок у дрозофилы и регуляция активности генома. "Итоги науки и техн. ВИНТИ. Молекулярная биология", 1984, 20, 142-185

Рассматривается широкий круг вопросов, касающихся реакции клетки на повышение температуры (тепловой шок). Приводятся материалы о структуре (клонированных) генов, индуцируемых тепловым шоком, о молекулярных механизмах, регулирующих их экспрессию, о биологической функции белков теплового шока. Постулируется наличие древней в филогенетическом отношении системы, контролирующей реакцию клетки на тепловой шок. Библи. 161.

УДК 576.31

Б.А. Лейбович. Дифференциальная репликация ДНК у дрозофилы. "Итоги науки и техн. ВИНТИ. Молекулярная биология", 1984, 20, 186-223

Рассмотрены многочисленные примеры вариабельности количества разных типов последовательностей ДНК у дрозофилы, в частности генов рРНК и 5S рРНК, сателлитной ДНК, генов гистонов и белков хориона. Отмечено, что только тканеспецифичная амплификация генов белков хориона направлена на изменение количества продуктов этих генов. Библи. 180.

О П Е Ч А Т К И

ИНТ. Серия «Молекулярная биология», 20, 1984 г.

Страница	Строка	Напечатано	Следует читать
6	14 (сверху)	Bergerac	Bergerac
9	25 (сверху)	ОР-56	ОР-50
29	24 (сверху)	и гермафродитов	у гермафродитов
33	5 (снизу)	Мега дальто.	Мегадальтон.
38	20 (сверху)	ТС-1	Тс-1
41	6 (сверху)	эмбриогенеза	эмбриогенеза
50		рис. 14	с. рис. 15 (без под- писи)
53		рис. 15	см. рис. 14 (без под- писи)
53	4 (сверху)	чувствительность	чувствительные
52	14 (снизу)	димеры АА и АВ	димеры АА и ВВ
69	4 (снизу)	рестриктивных	рестриктных
90	10 (снизу)	внутрихромосомном	внутрихромосомном
104	3 (сверху)	Scolnick S. B.	Skolnick S. B.
104	21 (сверху)	Апаньев Е. В. В. Е.	Апаньев Е. В., Вар- ский В. Е.
186	8 (снизу)	давления	явления
197	15 (сверху)	блокировать	блокировать
203	12 (сверху)	вызвала	вызвало
222	1 (сверху)	37.	137.
»	2 (сверху)	38.	138.
223	6-7 (снизу)	Oxford and IPH Publi- sxing	Oxford and IPH Publi- shing
227	1 (сверху)	гиперрепликация	гиперрепликация

Зак. 7081