



МУТАГЕНЕЗ И КАНЦЕРОГЕНЕЗ

Е.Д. Гаврилова¹,
О.В. Антоненко¹,
Л.А. Васильева^{1,2}

ПАРЫ ЭТАНОЛА ИНДУЦИРУЮТ ТРАНСПОЗИЦИИ МГЭ412 У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

¹ Институт цитологии и генетики
СОРАН, г. Новосибирск;

² Новосибирский государствен-
ный университет, кафедра
цитологии и генетики

✿ Исследован феномен возрастания скоростей индукции транспозиций МГЭ412 у потомков самцов, обработанных различными дозами паров этанола. Показано, что по сравнению с контролем ($\lambda_k = 1,84 \times 10^{-3}$) скорость транспозиций при обработке самцов парами этанола в течение 1,5 минут увеличивалась до $\lambda = 3,79 \times 10^{-2}$, при обработке в течение 2-х минут – $\lambda = 6,89 \times 10^{-2}$, в течение 3-х минут – $\lambda = 6,29 \times 10^{-2}$. Констатируется, что эксперименты с предельной алкоголизацией должны заканчиваться либо гибелью особей, либо вспышками генетической изменчивости в их потомстве. Таким образом доказано, что этанол наряду с другими стрессовыми факторами, является достаточно мощным индуктором транспозиций МГЭ у дрозофилы.

✿ **Ключевые слова:** мобильный генетический элемент (МГЭ), пары этанола, транспозиции, изогенная линия, сайт.

ВВЕДЕНИЕ

Мобильные генетические элементы (МГЭ) обнаружены во многих исследованных геномах эукариот. Одной из основных характеристик МГЭ является их способность к перемещениям в различные участки генома. Именно это их свойство является причиной инсерционного мутагенеза. Ранее было показано, что внешние стрессовые факторы, такие как тепловой и холодный шок, γ -облучение и внутригеномные стрессовые факторы (аутбридинг, инбридинг, изогенизация, селекция) индуцируют перемещение мобильных генетических элементов [2, 5, 6, 7, 11, 12]. При этом скорость индуцированных транспозиций возрастает на 2–3 порядка по сравнению со спонтанной скоростью. В компактном виде полученные результаты можно представить в виде табл. 1.

Мы продолжили исследование роли внешних стрессовых факторов в индукции транспозиций мобильных генетических элементов в геноме *D. melanogaster*. В данной работе в качестве фактора, вызывающего индукцию транспозиций мобильного генетического элемента Dm412, использованы различные дозы паров этанола.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изогенная линия. Эксперимент осуществлялся на изогенной линии № 51 *Drosophila melanogaster*, которая была выведена в 1991 году из гетерогенной линии (*riC*), несущей менделевскую мутацию *radius incompletus* (*ri*). Линия *riC* ранее использована в различных экспериментах и описана в работах Васильевой и соавт. [12, 13]. Изогенизация осуществлялась путем скрещивания одного самца или одной самки из линии *riC* с особью из балансерной линии. Конкретная балансерная линия была выведена в лаборатории и содержала запиратели кроссинговера на трех больших хромосомах, маркированных доминантными мутациями: M^5 (X-хромосома), *Su/Pm* (2-я хромосома) и *D/Sb* (3-я хромосома) [9]. Изогенная линия № 51 также неоднократно использована нами ранее в исследованиях явлений индукции транспозиций мобильных генетических элементов [2, 6, 12]. Линия легко откликается на стрессовые воздействия, а при наличии индуцированного стрессом генетического разнообразия — на селекцию по количественному признаку [4].

Обработка самцов дрозофилы парами этанола. При обработке самцов дрозофилы парами этанола в начале необходимо было подобрать дозу, которая не была бы смертельной для мух, но в то же время эффективной. Трудность состояла в том, что при предъявлении самцам любой дозы паров этанола они засыпали и не просыпались достаточно длительное время. В процессе подбора времени экспонирования выяснилось, что обработка самцов более 5-ти минут смертельна [5]. При обработке в течение 4–5 минут погибает часть самцов. Поэтому были выбраны одновременно

Таблица 1

Оценки скоростей транспозиций МГЭ412 до и после индукции транспозиций различными факторами

Стрессовые факторы	λ (скорость транспозиций на сайт, на геном)	Авторы, годы
Линия 51 (изогенная)		
Контроль	$1,8 \times 10^{-3}$	Васильева и др., 1998 г.
Аутбридинг	$6,9 \times 10^{-1}$	
Инбридинг	$2,07 \times 10^{-1}$	
Двойной рекомбинантный перенос	$1,87 \times 10^{-1}$	
Линия 49 (изогенная)		
Контроль	$< 3,31 \times 10^{-5}$	Забанов и др., 1995 г.
γ -облучение		
300P	$0,39 \times 10^{-2}$	
800P	$1,05 \times 10^{-2}$	
1300P	$1,87 \times 10^{-2}$	

более шадящие, но в то же время эффективные дозы обработки 1.5, 2 и 3 минуты. При таких дозах все самцы также засыпали, но все просыпались через 2–3 часа.

Три десятка самцов изогенной линии № 51 помещали в чистые пустые пробирки при 25°C, закрытые пипеткой с резервуаром для жидкости, в котором находилась вата, смоченная этанолом. Пары спирта проникали в пробирку по каналу пипетки. Мерой дозы служило время экспонирования: 1.5, 2 и 3 минуты. Затем самцов сразу переносили в другие чистые пробирки без паров этанола, что позволило четко ограничить временную дозу экспонирования.

Через двое суток после воздействия обработанных самцов скрещивали с необработанными самками той же линии в пропорции 1♂⁵×5♀ в пробирки с питательной средой. Из личинок-потомков F1 приготавливали давленные препараты политенных хромосом слюнных желез, на которых выявляли рисунок локализации копий МГЭ412 путем гибридизации *in situ*.

В качестве контроля использовали такие же скрещивания при тех же условиях, но самцы при этом не были обработаны парами этанола. Контрольная выборка представлена 27-ю препаратами, объем опытной выборки составил 53 препарата.

Гибридизация *in situ*. Гибридизацию выполняли по стандартной методике [9, 10, 12]. Зонд содержал ³H-ДНК клона pOR708, которая имела встроенную полноразмерную копию МГЭ412 в векторе pAT153 [11] (клон получен от К. О'Наре). Зонд гибридизовали с ДНК политенных хромосом на давленных препаратах клеток слюнных желез личинок-потомков, полученных от скрещивания обработанных парами этанола самцов с виргинными необработанными самками.

Препараты в фотоземлюсии экспонировали в течение 15–30 суток. Далее исследовали включение радиоактивной метки в сегменты политенных хромосом карты Бриджеса. Обнаруженные новые сайты локализации МГЭ можно было считать инсерциями транспозиций.

Статистический анализ. Оценку скоростей индуцированных транспозиций, λ , проводили согласно формуле (Ратнер, Васильева 1996):

$$n = n \frac{m \times n}{m}$$

где Δn — среднее число транспозиций на гаплоидный геном за поколение; n — число сайтов, занятых копиями МГЭ в исходной изогенной линии, не подвергавшейся стрессовому воздействию; m — число сайтов, которые были заняты МГЭ412 в каком-либо из экспериментов с линией *riC* и ее производными; $(m-n)$ — число вакантных сайтов в данной изогенной линии для данного МГЭ; λ — искомая скорость транспозиций (событий) на сайт, на геном, за поколение.

Важно отметить, что таким способом можно провести только нижнюю оценку скорости индуцированных транспозиций, поскольку в качестве m было принято число позиций в геноме, которые оказывались занятыми данным МГЭ, хотя бы в одном из предыдущих экспериментов, следовательно:

$$\lambda = \frac{\Delta n \times m}{n \times (m - n)}$$

Статистическую значимость различий между частотами транспозиций в опытном и контрольном вариантах определяли при помощи критерия Фишера F [3], разработанного для оценки достоверности различий частот с низкими значениями и выраженными в радианах углов, по формуле:

$$\varphi = 2 \arcsin \sqrt{p}$$

Тогда критерий Фишера:

$$F = (\varphi_1 - \varphi_2)^2 \frac{k_1 \times k_2}{k_1 + k_2}$$

где k_1 и k_2 — размеры сравниваемых выборок. В данном случае $k = (\text{число личинок}) \times (\text{число сайтов})$, поскольку оценивается скорость транспозиций на сайт исходной изогенной линии. φ_1 и φ_2 берется в стандартных таблицах для соответствующих p_1 и p_2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты индукции транспозиций МГЭ412 до и после обработки самцов дрозофилы парами этанола представлены в табл. 2. В левом столбце таблицы представлены данные по гибридизации *in situ* в исходной изогенной линии, где изначально зафиксировано 32 стабильных сайта. Следует заметить, что в течение нескольких лет такое число сайтов и их мономорфность оставались неизменными, однако обработка этанолом самцов этой линии резко меняет картину.

Таблица 2

Паттерн МГЭ412 до и после обработки самцов дрозофилы парами этанола

Хромосомы	Сайты политенных хромосом	Контроль (N=27)	Время обработки			Суммарное число личинок с транспозициями (N=53)
			1,5 мин (N=21)	2 мин (N=13)	3 мин (N=19)	
X	6E	+	+	+	+	+
	12B	-	*(1)	*(1)	-	*(2)
	16F	+	+	+	+	+
	17C	+	+	+	+	+
	19A	+	+	+	+	+
	20A	+	+	+	+	+
2L	21D	+	+	+	+	+
	24E	+	+	+	+	+
	25F	+	+	+	+	+
	26C	+	+	+	+	+
	30A	+	+	+	+	+
	32C	+	+	+	+	+
	34B	-	*(1)	-	*(2)	*(3)
	36E	-	-	-	*(1)	*(1)
39C	+	+	+	+	+	
2R	42B	-	*(1)	-	-	*(1)
	42E	+	+	+	+	+
	42F	+	+	+	+	+
	43B	-	*(1)	*(3)	*(2)	*(6)
	43F	-	-	*(1)	-	*(1)
	45C	+	+	+	+	+
	47B	-	-	*(1)	*(2)	*(3)
	48B	-	-	*(1)	-	*(1)
	49C	+	+	+	+	+
	51D	-	-	*(1)	*(2)	*(3)
	56B	-	*(3)	*(2)	*(1)	*(6)
	56E	-	*(3)	*(4)	*(4)	*(11)
	57B	-	-	*(1)	-	*(1)
60C	+	+	+	+	+	
3L	62F	-	-	*(1)	-	*(1)
	64A	+	+	+	+	+
	65A	-	-	*(1)	-	*(1)
	65E	+	+	+	+	+
	67DE	+	+	+	+	+
	75A	+	+	+	+	+
	75C	-	*(1)	*(1)	*(3)	*(5)
	76A	+	+	+	+	+
3R	82E	+	+	+	+	+
	84D	+	+	+	+	+
	85E	+	+	+	+	+
	88E	+	+	+	+	+
	88F	+	+	+	+	+
	90B	+	+	+	+	+
	96A	+	+	+	+	+
	97DE	-	*(5)	-	*(3)	*(8)
	98CD	+	+	+	+	+
	99A	+	+	+	+	+
	99B	+	+	+	+	+
100B	-	-	-	*(4)	*(4)	
Всего сайтов		32	40	44	42	49
Число новых сайтов		<1	8	12	10	17
Всего событий		<1	16	18	24	58
Среднее число событий на геном Δl		0,037	0,762	1,385	1,263	1,283
Скорость транспозиций на сайт на геном, λ		$1,84 \times 10^{-3}$	$3,79 \times 10^{-2}$	$6,89 \times 10^{-2}$	$6,29 \times 10^{-2}$	$6,39 \times 10^{-2}$

Примечание: «+» — означает стабильное присутствие МГЭ412 в данном сайте карты Бриджеса; «-» — отсутствие метки в данном сайте; *() — число инсерций транспозиций в данном сайте.

Таблица 3

Оценка частот транспозиций до и после обработки самцов дрозофилы парами этанола

Признак	Частота транспозиций до обработки, контроль	Время обработки самцов дрозофилы парами этанола		
		1,5 мин	2,0 мин	3,0 мин
Частота инсерций транспозиций, ρ	0,00006	0,001	0,002	0,002
Частота транспозиций, выраженная в радианах углов, ϕ	0,0155	0,0632	0,0895	0,0895

Примечание: $F_{\alpha/1,5} = 16,1, P > 0,999$; $F_{\alpha/2} = 28,8, P > 0,999$; $F_{1,52,0} = 3,0, P < 0,95$; $F_{1,53,0} = 3,0, P < 0,95$; $F_{2,03,0} = 0, P < 0,95$.

Результаты обработки самцов парами этанола в течение 1,5, 2 и 3 минут представлены в табл. 2 в столбцах 2–4 соответственно. После 1,5-минутного воздействия этанолом в выборке из 21-й личинки выявлено 16 транспозиций в 8-ми сегментах (сайтах). Более половины транспозиций (11 из 16) зафиксированы в трех сайтах: **56B** (3 события), **56E** (3 события) и **97DE** (5 событий). Такая высокая частота инсерций позволяет эти сайты занести в список «горячих», по крайней мере, для данной выборки [2, 11]. После 2-минутной обработки в выборке из 13-ти личинок обнаружено 18 транспозиций в 12-ти новых сайтах. Из них сайт **43B** (3 события) и сайт **56E** (4 события) могут претендовать на звание «горячих». Выборка из 19-ти личинок после 3-минутной обработки содержит 24 инсерции в 10 сайтах. Причем обнаружены явные признаки преобладания транспозиций в сайтах **56E** (4 события), **75C** (3 события), **97DE** (3 события) и **100B** (4 события).

Суммарные результаты по трем экспериментам представлены в последнем столбце табл. 2. Всего в выборке, состоящей из 53-х личинок, обнаружено 58 транспозиций в 17-ти сайтах. Почти половина транспозиций сосредоточена в четырех сегментах (**43B**, **56B**, **56E** и **75C**), которые встречаются с достаточно высокой частотой во всех трех экспериментальных выборках независимо от продолжительности обработки самцов парами этанола. Представляется важным подчеркнуть тот факт, что некоторые из перечисленных сайтов являлись «горячими» при индукции транспозиций и различными температурными воздействиями [2,12].

Кроме того, к списку «горячих» новых сайтов следует отнести сайты **34B**, **97DE**, **100B**, транспозиции в которых встречаются с высокой частотой, но в отдельных выборках. Эти сайты также проявляли свойства «горячих» в других экспериментах по индукции транспозиций [1, 2, 12]. Этот факт позволяет предположить, что в основе индукции парами этанола лежат механизмы, сходные по своему действию с таковыми и при температурных воздействиях; по-видимому, у дрозофилы существует общая система генерализованного ответа на стрессовые воздействия. Оценки скоростей транспозиций в опыте для 1,5, 2 и 3 минут представлены в последней строке табл. 2 и имели значения: $3,79 \times 10^{-2}$, $6,89 \times 10^{-2}$ и $6,29 \times 10^{-2}$ соответственно, а в контроле $\lambda_k = 1,84 \times 10^{-3}$, т.е. значение скоростей транспозиций в опыте на порядок выше возможной максимальной скорости спонтанных транспозиций.

В табл. 3 приведено значение частоты транспозиций МГЭ412 до обработки самцов изогенной линии № 51 парами этанола при допущении, что существует возможность появления хотя бы одной транспозиции, т.е. максимально возможная оценка частоты

спонтанных транспозиций, а также частоты транспозиций в опыте. Как видно, различия между частотами в опыте и контроле достоверны ($P > 0,999$). Достоверных различий между частотами появления транспозиций при обработке самцов дрозофилы различными дозами паров этанола не обнаружено. По-видимому, уже самая непродолжительная обработка самцов парами этанола является ощутимым стрессом, приводящим к существенному увеличению скорости транспозиций. Тем не менее существование дозового эффекта требует более обстоятельного исследования.

Таким образом, доказано, что этанол, наряду с другими внешними стрессовыми факторами, является достаточно мощным индуктором транспозиций МГЭ у дрозофилы, ответственным за возникновение новой генетической изменчивости в потомстве родителей, подвергнутых воздействию алкоголя.

Работа частично поддержана грантам РФФИ № 03-04-49609, грантом Минобразования РФ по фундаментальным исследованиям в области естественных наук № Е02-6.0-48 и грантом по Программе «Фундаментальные исследования» Президиума РАН «Динамика генофондов растений, животных и человека» № 24.

Литература

1. Аникеева Н.В., Забанов С.А., Васильева Л.А. и др. Влияние теплового шока на транспозиции МГЭDm412 в трех изогенных линиях *Drosophila melanogaster* // Генетика. — 1994. — Т. 30. — № 2. — С. 212–217.
2. Бубеицкова Е.В., Антоненко О.В., Васильева Л.А. и др. Индукция транспозиций МГЭ412 отдельно тепловым и холодным шоком в сперматогенезе у самцов дрозофилы // Генетика. — 2002. — Т. 38. — № 1. — С. 46–55.
3. Васильева Л.А. Биологическая статистика. — Новосибирск, 2000.
4. Васильева Л.А., Бубеицкова Е.В., Антоненко О.В. и др. Отклик паттерна МГЭ412 на отсекающий отбор количественного признака в изогенной линии дрозофил после тяжелого теплового шока (ТТШ) // Генетика. — 2000. — Т. 36. — № 6. — С. 774–781.

5. Васильева Л.А., Ратнер В.А., Антоненко О.В. и др. Индукция транспозиций МГЭ412 различными дозами паров этанола в изогенной линии *Drosophila melanogaster* // Генетика. — 2003. — Т. 39. — № 5. — С. 717–720.
6. Васильева Л.А., Ратнер В.А., Бубенщикова Е.В. Стрессовая индукция транспозиций ретротранспозонов дрозофилы: реальность явления, характерные особенности и возможная роль в быстрой эволюции // Генетика. — 1997. — Т. 33. — № 8. — С. 1083–1093.
7. Забанов С.А., Васильева Л.А., Ратнер В.А. Индукция транспозиций МГЭ412 при помощи γ -облучения в изогенной линии *D. melanogaster* // Генетика. — 1995. — Т. 31. — № 6. — С. 798–803.
8. Ратнер В.А., Васильева Л.А. Мобильные генетические элементы (МГЭ): «эгоистическая ДНК» или функциональная часть генома? // Современные концепции эволюционной генетике / Ред. В.К. Шумный, А.Л. Маркель. — Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2000. — С. 128–150.
9. Ashburner M. *Drosophila: A Laboratory handbook*. N.Y.: Cold Spring Harbor Press. — 1989, 1331.
10. Finnegan D.J., Rubin G.M., Young H.M. et al. Repeated gene families in *Drosophila melanogaster* // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. — 1978. — Vol. 2d. — P. 225–294.
11. Shepherd B.M., Finnegan D.J. Structure of circular copies of the 412 transposable element present in *Drosophila melanogaster* tissue culture cells and isolation of terminal repeats // J. Mol. Biol. — 1984. — Vol. 180. — P. 21–40.
12. Vasilyeva L.A., Bubenshchikova E.V., Ratner V.A. Heavy heat shock induced retrotransposon transpositions in *Drosophila* // Genet. Res. Cambr. — 1999. — Vol. 74., N 2. — P. 111–119.
13. Vasilyeva L.A., Zabanov S.A., Ratner V.A. et al. Expression of the quantitative character radius incompletus, temperature effects, and localization of mobile genetic element Dm-412 in *D. melanogaster* // Genet. Sel. Evol. — 1998. — Vol. 20., N 2. — P. 159–180.

Steams of ethanol induct transpositions of the MGE412 in isogenic lines of *Drosophila melanogaster*

E.D. Gavrilovava¹, O.V. Antonenko¹, L.A. Vasilyeva^{1,2}

¹ Institute of Cytology & Genetics, SBRAS, Novosibirsk, Russia; ² Novosibirsk State University, Russia

☼ **SUMMARY:** Influence of treating with limited doses of steams of ethanol on a transpositions MGE412 was investigated in the males from isogenic lines of *Drosophila melanogaster*. It was proved the phenomenon of the induction. The rates of induced transpositions was estimated. Ones was $3,79\text{--}6,89 \times 10^{-2}$ in comparison with control, $\lambda_c = 1,84 \times 10^{-3}$. It was established that alcohol made be finished either death of individuals or increase genetic variability in the posterity. It was proved that ethanol is powerful inductor of transpositions MGEs of *Drosophila* like other different external (temperature shock, γ -irradiation) and genetic factors, the main of them are isogenization and selection.

☼ **KEY WORDS:** mobile genetics element, induction of transpositions, stress, ethanol.