

УДК 575.1:595.773.4

## СТЕРИЛИЗУЮЩИЙ ЭФФЕКТ МУТАНТНОГО АЛЛЕЛЯ $sbr^{10}$ ( $l(1)ts403$ ) В КОМПАУНДЕ С НУЛЕВЫМ АЛЛЕЛЕМ У САМОК *Drosophila melanogaster*

© 2004 г. Е. В. Голубкова, О. М. Пугачева, Е. П. Демина, А. С. Мусорина,  
А. Н. Шершарова, Л. А. Мамон

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и селекции, Санкт-Петербург 199034;  
факс: (812) 328-05-41; e-mail: gelena@EG10217.spb.edu; mamon@LM2010.spb.edu

Поступила в редакцию 20.02.2003 г.

Показано, что присутствие аллеля дикого типа гена *small bristles* (*sbr*) в одной дозе у самок генотипа  $Df(1)v-L4/+$  (0/+) не сказывается существенно на их плодовитости, в то время как уменьшение дозы теплочувствительного аллеля  $sbr^{10}$  ( $l(1)ts403$ ) оказывает на самок  $Df(1)v-L4/sbr^{10}$  (0/ $sbr^{10}$ ) в условиях перmissive температуры сильный стерилизующий эффект. Оценивали вклад таких факторов, как резорбция яйцевых камер, уменьшение яйцекладки, гибель потомков на эмбриональной и личиночной стадиях и снижение плодовитости самок 0/ $sbr^{10}$ . Показали, что стерилизующий эффект мутантного аллеля  $sbr^{10}$ , в первую очередь, обусловлен гибелью потомков на эмбриональной стадии развития и стадии личинки первого возраста. Если у самок 0/+ большая часть неразвившихся яиц представлена яйцами, в которых эмбрионы погибли на поздних стадиях развития, то у самок 0/ $sbr^{10}$  более 50% неразвившихся яиц либо не обнаруживают видимых признаков развития, либо эмбрионы в них остановились в развитии на ранних этапах эмбриогенеза. Полученные результаты свидетельствуют о гаплонедостаточности теплочувствительного аллеля  $sbr^{10}$  в обеспечении репродуктивных функций самок *Drosophila melanogaster*.

Ген *sbr* (*small bristles*) у *Drosophila melanogaster* является жизненно важным и у разных организмов, включая человека, имеет ортологов, которые принадлежат к семейству генов, названных NXF (nuclear export factor) [1]. Эволюционный консерватизм генов данного семейства определяется тем, что гены NXF вовлечены в контроль активного транспорта мРНК из ядра в цитоплазму [1]. Использование модельных объектов, таких, как дрозофила, позволяет понять роль этих генов в определении репродуктивных функций организма, регуляции развития и морфогенеза.

Мутации генов, контролирующих основные процессы жизнедеятельности клетки, как правило, обладают плейотропным эффектом, это является характерной особенностью и мутантных аллелей гена *sbr*, в том числе и теплочувствительного аллеля –  $l(1)ts403$  ( $sbr^{10}$ ), у *D. melanogaster* [2]. Мутация  $sbr^{10}$  была получена Аркингом и охарактеризована как клеточная *ts*-леталь с рестриктивной температурой 29°C [3]. Данная мутация была цитологически картирована в районе 9F5-6–9F8-11 политенных хромосом *D. melanogaster* между дистальными точками разрыва делеции  $Df(1)v^{L3}$  (L3, не удаляет ген *sbr*) и  $Df(1)v^{L4}$  (L4, удаляет его) [4]. У мутантных особей  $sbr^{10}$  при тепловом воздействии наблюдается временный блок синтеза белков теплового шока (БТШ) [5], двигательный паралич [2]. Нарушенными также оказываются:

расхождение половых хромосом в мейозе у самок [6], пролиферативная активность митотических клеток [7], конденсация митотических хромосом [8], эмбриональное развитие [2], а также морфогенез различных структур личинки [3] и взрослого насекомого [9]. После того, как была выявлена роль гена *sbr* в ядерном экспорте мРНК [10, 11], стал понятен механизм нарушения на посттранскрипционном уровне экспрессии генов белков теплового шока у мутантов  $sbr^{10}$  при тепловом воздействии [5]. Данное проявление мутантного аллеля  $sbr^{10}$  можно объяснить нарушением транспорта из ядра в цитоплазму мРНК генов *hsp* (heat shock proteins) [12]. Однако следует отметить, что не для всех перечисленных проявлений мутантного аллеля  $sbr^{10}$  понятен механизм, лежащий в основе какого либо конкретного эффекта. Это прежде всего связано с тем, что не только само по себе нарушение транспорта мРНК может иметь широкий плейотропный эффект, но и нехватка БТШ может оказывать самостоятельный плейотропный эффект благодаря шаперонным функциям этих белков [13, 14].

Особый интерес в понимании функции гена *sbr* представляют такие проявления мутантного аллеля  $sbr^{10}$ , которые можно выявить, не прибегая к тепловому воздействию. Среди них – влияние мутации  $sbr^{10}$  в условиях перmissive температуры  $24.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  на репродуктивные функции са-

мок, в том случае, когда мутантный аллель *sbr<sup>10</sup>* присутствует в одной дозе (на фоне делеции *Df(1)v-L4*, удаляющей ген *sbr*) [4].

В задачу данного исследования входило определение причин крайне низкой плодовитости самок *sbr<sup>10</sup>/Df(1)v-L4*, несущих одну дозу мутантного аллеля *sbr<sup>10</sup>*, по сравнению с самками гомо- и гемизиготными по нормальному аллелю гена *sbr*, а также с самками, гомозиготными по аллелю *sbr<sup>10</sup>*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие линии и гибриды:

1. Линия, не содержащая мутацию *sbr<sup>10</sup>*, несущая маркер *v* (*vermilion*), в дальнейшем обозначаемая “+”.

2. Линия, несущая мутацию *sbr<sup>10</sup>* [3] с маркерами *raspberry<sup>2</sup>* и *vermilion* – *ras<sup>2</sup> sbr<sup>10</sup> v*, в дальнейшем обозначаемая *sbr<sup>10</sup>*.

3. Линия, несущая нулевой аллель гена *sbr* – делецию *Df(1)v<sup>L4</sup>*, затрагивающую район X-хромосомы 9F4–10A2 и удаляющую гены *vermilion*, *raspberry* и *small bristles* [4]: *Df(1)v<sup>L4</sup>, ras m<sup>D</sup>/FM6l, y<sup>31d</sup> sc<sup>8</sup> dm B/Dp(1;Y) v<sup>+</sup> y<sup>+</sup>*. В дальнейшем хромосома с нулевым аллелем гена *sbr* обозначается как “0”.

4. Линия, несущая делецию *Df(1)v<sup>L3</sup>*, затрагивающую район X-хромосомы 9F10–10A7 и удаляющую ген *vermilion*, но не удаляющую ген *sbr*: *Df(1)v<sup>L3</sup>/In(1)FM6l, y<sup>31d</sup> sc<sup>8</sup> dm B/Dp(1;Y) v<sup>+</sup> y<sup>+</sup>*. В дальнейшем хромосома с данной делецией обозначается – L3.

5. Линия *w<sup>a</sup>B* (*white<sup>apricot</sup>* и *Bar*), которая во всех экспериментах по оценке плодовитости самок использовалась в качестве отцовской.

6. Гибридные самки (0/+) генотипа *Df(1) v<sup>L4</sup>, ras<sup>2</sup> m<sup>D</sup>/v*, полученные в результате реципрокных скрещиваний с использованием линий *v* и *Df(1)v<sup>L4</sup>, ras m<sup>D</sup>/FM6l, y<sup>31d</sup> sc<sup>8</sup> dm B/Dp(1;Y) v<sup>+</sup> y<sup>+</sup>*.

7. Гибридные самки (0/*sbr<sup>10</sup>*) генотипа *Df(1) v<sup>L4</sup>, ras<sup>2</sup> m<sup>D</sup>/ras sbr<sup>10</sup> v*, полученные в результате реципрокных скрещиваний с использованием линий *ras<sup>2</sup> sbr<sup>10</sup> v* и *Df(1)v<sup>L4</sup>, ras<sup>2</sup> m<sup>D</sup>/FM6l, y<sup>31d</sup> sc<sup>8</sup> dm B/Dp(1;Y) v<sup>+</sup> y<sup>+</sup>*.

8. Гибридные самки (*sbr<sup>10</sup>/+*) генотипов *ras sbr<sup>10</sup> v/v*, полученные в результате реципрокных скрещиваний, с использованием соответствующих линий.

9. Гибридные самки (L3/*sbr<sup>10</sup>*) генотипа *Df(1)v<sup>L3</sup>/ras<sup>2</sup> sbr<sup>10</sup> v*, полученные в результате реципрокных скрещиваний с использованием линий *Df(1)v<sup>L3</sup>/In(1)FM6l, y<sup>31d</sup> sc<sup>8</sup> dm B/Dp(1;Y) v<sup>+</sup> y<sup>+</sup>* и *ras<sup>2</sup> sbr<sup>10</sup> v*.

10. Гибридные самки (L3/+) генотипа *Df(1)v<sup>L3</sup>/v*, полученные в результате реципрокных скрещи-

ваний, с использованием линий *Df(1)v<sup>L3</sup>/In(1)FM6l, y<sup>31d</sup> sc<sup>8</sup> dm B/Dp(1;Y) v<sup>+</sup> y<sup>+</sup>* и *v*.

Описание генотипа линий дано в соответствии со справочником Lindsley, Grell [15].

Развитие особей всех линий и гибридов происходило при температуре  $24.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ .

Оценивали плодовитость самок-имаго, которых в возрасте трех суток помещали с самцами линии *w<sup>a</sup>B* массово в соотношении 1 ♀:1 ♂ в емкости объемом 0.9 л. Откладка яиц происходила на пластинки с агаровой средой, смазанной суспензией дрожжей. Каждые сутки пластинки сменяли на свежие, получая, таким образом, четыре суточные яйцекладки. Сразу после откладки яиц определяли их число, а через 48 ч – число вылупившихся личинок. Личинок учитывали и помещали на изюмно-дрожжевую среду для завершения развития.

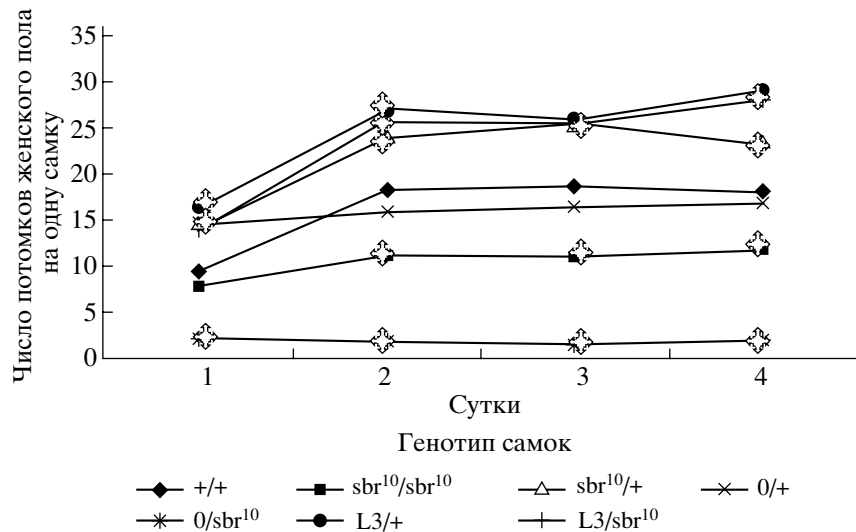
Для каждой четырех суток определяли плодовитость самок как отношение числа вылетевших потомков-имаго женского пола к числу родительских самок, исключение самцов при учете плодовитости связано с тем, что часть потомков мужского пола, полученных в ряде скрещиваний, не выживает из-за летального эффекта соответствующих делеций.

Состояние яичников самок оценивали каждые сутки, окрашивая препарированные яичники акридином оранжевым [16; 17]. Анализ препаратов проводили с помощью люминисцентного микроскопа ЛЮМАМ И–2, оборудованного черно-белой CCD камерой, подключенной к компьютеру. Для анализа изображений использовали компьютерную программу VideoTest FISH v. 1.0. Каждые сутки определяли долю яичников с окрашенными в оранжевый цвет ядрами [16, 17]. Яичник считали поврежденным, если половина и большее число овариол имели окрашенные в оранжевый цвет ядра в зоне гермария и яйцевых камерах до стадии 10.

Динамику яйцекладки оценивали как отношение числа отложенных за сутки яиц к числу родительских самок.

Гибель особей на эмбриональной стадии определяли как отношение числа яиц, из которых не вылупились личинки, к общему числу отложенных яиц. При определении периода эмбриональной смертности эмбрионы подвергали дехорионизации 3%-ным раствором гипохлорита натрия, и девителлинизации смесью формальдегида и метанола, после чего окрашивали красителем Хехст 33258 [18]. Различали раннюю гибель – яйца без следов развития или эмбрионы, остановившиеся в развитии в возрасте не более 3 ч, и позднюю эмбриональную гибель.

Все эксперименты проводили не менее чем в пяти повторностях.



**Рис. 1.** Плодовитость самок различных генотипов, определяемая каждые сутки в течение четырех последовательных суток. @ – отмечены значения, статистически значимо отличающиеся при  $P < 0.05$  от таковых, полученных для самок +/+.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Поскольку ген *sbr* локализуется в половой хромосоме, плодовитость оценивали по числу потомков женского пола на одну родительскую самку. Из рис. 1 видно, что наибольшая плодовитость характерна для гибридных самок, несущих “+” аллель гена *sbr*, в том числе и тогда, когда они были гетерозиготны по мутантному аллелю *sbr*<sup>10</sup>. У самок *sbr*<sup>10</sup>/*sbr*<sup>10</sup>, по сравнению с самками других генотипов, плодовитость снижена, но не более чем втрое. Самки генотипа *sbr*<sup>10</sup>/0 отличаются статистически значимо от самок других исследуемых генотипов тем, что их плодовитость крайне низкая – около трех потомков на одну самку за одни сутки. Объем выборки для каждого варианта составляет 50 самок.

Плодовитость зависит от многих факторов, от протекания оогенеза, количества откладываемых яиц, выживаемости потомков на эмбриональной, личиночной и куколочной стадиях.

Яичники самок, не подвергавшихся какому-либо воздействию, окрашивали акридином оранжевым. Это давало возможность оценить нарушения в оогенезе, приводящие к резорбции яйцевых камер. Известно, что в оогенезе, начиная со стадии 12, питающие клетки претерпевают апоптоз, и это детектируется окраской акридином оранжевым [16]. Оказалось, что в яичниках самок *sbr*<sup>10</sup>/0 ядра, окрашивающиеся в желтый и красный цвет, можно наблюдать в ооцитах более ранних стадий (ранее стадии 10), в основном на стадиях 6–7, а также в гермариях. Яичник считали дефектным, если половина и более овариол характеризовались массовой гибелью ядер. При этом часть яйцевых камер в дефектных яичниках не обнаружи-

вала видимых нарушений. Максимальную частоту яичников с гибнущими ооцитами наблюдали у самок *sbr*<sup>10</sup>/0. Она не превышала 50% (рис 2). У самок *sbr*<sup>10</sup>/*sbr*<sup>10</sup> доля яичников с гибнущими ооцитами в 2 раза превышала этот показатель у самок остальных исследованных генотипов и составляла не более 20%. На основании полученных данных можно заключить, что резорбция яйцевых камер не является главной причиной снижения плодовитости самок генотипа *sbr*<sup>10</sup>/0. Гибель ооцитов могла снизить плодовитость самок не более чем вдвое по сравнению с контрольными самками. Объем выборки для каждого варианта также составляет 50 самок.

Резорбция яйцевых камер, а также изменения скорости оогенеза могут приводить к уменьшению числа откладываемых яиц за определенный промежуток времени. Мы анализировали продуктивность самок различных генотипов как среднее число яиц на самку, отложенных за сутки. Среднее число яиц, откладываемых одной самкой за сутки, для большинства гибридных самок является более высоким, чем этот показатель у самок линии дикого типа (+/+) (таблица). Это проявляется и в увеличении плодовитости этих самок (рис. 1). В то же время самки генотипов *sbr*<sup>10</sup>/*sbr*<sup>10</sup> и *sbr*<sup>10</sup>/0 откладывают в течение суток в 2 раза меньше яиц по сравнению с самками других исследованных генотипов (таблица).

Следующим этапом, существенным в определении плодовитости, является эмбриональный период. Следует отметить, что присутствие в генотипе самок делеции *Df(1)ᵛ<sup>L4</sup>* (0), удаляющей ген *sbr* и проявляющей летальный эффект в гомо- и гомозиготе, несомненно повышает такой показа-

Показатели, определяющие плодовитость самок различных генотипов: продуктивность, гибель потомков на эмбриональной стадии и личиночной стадии 1-го возраста

Линии и гибриды	Общее число отложенных яиц	Среднее число яиц на самку за сутки	Эмбриональная смертность, %	Общее число личинок	Частота аномальных личинок, % от общего числа личинок
<i>sbr</i> <sup>10</sup>	5943	25.3**	14.7 ± 0.46*	1804	0.4 ± 0.15
+/+	7520	40.1	5.7 ± 0.27	5116	0.4 ± 0.06
<i>sbr</i> <sup>10</sup> /0	5309	25.0**	72.9 ± 0.61***	197	25.7 ± 3.11*
0/ <i>sbr</i> <sup>10</sup>	3755	29.9**	82.8 ± 0.61***	518	27.0 ± 1.95*
+/0	3950	47.8*	26.6 ± 0.70*	2071	0.2 ± 0.10
0/+	3404	45.8*	29.2 ± 0.78*	1938	0.4 ± 0.14
+/ <i>sbr</i> <sup>10</sup>	2292	50.8*	3.1 ± 0.36**	1917	0.2 ± 0.10
<i>sbr</i> <sup>10</sup> /+	2187	49.8*	6.5 ± 0.91	672	0.2 ± 0.17
<i>sbr</i> <sup>10</sup> /L3	3234	47.9*	26.4 ± 0.78*	2153	0.2 ± 0.10
L3/ <i>sbr</i> <sup>10</sup>	4679	50.5*	26.4 ± 0.64*	3511	0.4 ± 0.11
+/L3	1741	47.1*	24.5 ± 1.03*	1300	0.2 ± 0.12
L3/+	2150	48.4*	26.1 ± 0.95*	1551	0.2 ± 0.11

Примечание. При обозначении генотипов гибридных самок, полученных в результате реципрокных скрещиваний, на первом месте указывается генотип материнской линии, используемой при получении соответствующих гибридов.

\* Отмечены значения, превышающие статистически значимо при  $P < 0.05$  значения, полученные для самок +/+.

\*\* Отмечены значения, которые являются статистически значимо при  $P < 0.05$  ниже таковых, полученных для самок +/+.

\*\*\* Отмечены значения, превышающие статистически значимо при  $P < 0.05$  значения, полученные для самок остальных исследуемых генотипов.

тель, как эмбриональная смертность, поскольку половина самцов (гемизиготы по данной делеции) погибает на эмбриональной стадии развития. Чтобы учесть вклад летального эффекта делеции в определение частоты эмбриональной смертности среди потомков гетерозиготных самок, в качестве дополнительного контроля использовали самок, гетерозиготных по другой делеции –  $Df(1)v^{L3}$ . Делеция  $Df(1)v^{L3}$ , как и  $Df(1)v^{L4}$ ,

обладает летальным эффектом в гемизиготе, но не удаляет ген *sbr*. Эмбриональная смертность в потомстве самок +/0, *sbr*<sup>10</sup>/L3, +/L3 колебалась от 24.5 до 29.2%, что соответствует теоретически ожидаемой гибели 1/4 потомков – самцов, гемизиготных по соответствующей делеции. При этом большая часть эмбрионов погибает на поздней стадии эмбрионального развития (рис. 3). В то же время доля неразвившихся яиц в потомстве самок генотипов *sbr*<sup>10</sup>/0 и 0/*sbr*<sup>10</sup>, полученных в результате реципрокных скрещиваний, составляет 72.9 и 82.8% соответственно и статистически значимо превышает данный показатель для самок других исследуемых генотипов (таблица). Следует отметить, что самки *sbr*<sup>10</sup>/L3, +/0, +/L3 не обнаруживают статистически значимых различий между собой по показателям эмбриональной смертности. Если среди неразвившихся яиц, полученных от самок *sbr*<sup>10</sup>/L3, +/0, +/L3, основная доля приходится на позднюю эмбриональную гибель, то у самок *sbr*<sup>10</sup>/0 и 0/*sbr*<sup>10</sup> основную долю составляют яйца без признаков развития или погибшие на ранних этапах эмбриогенеза (рис. 3).

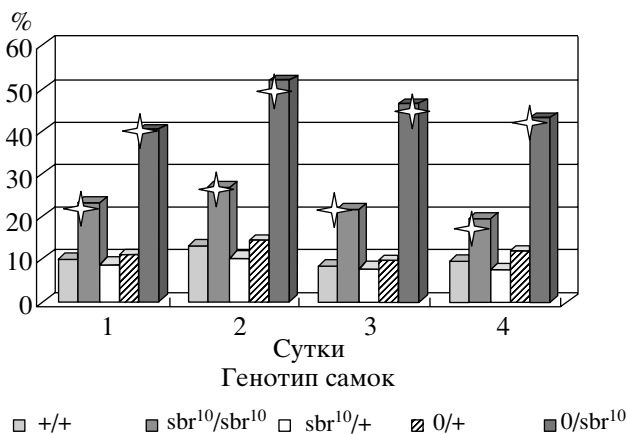
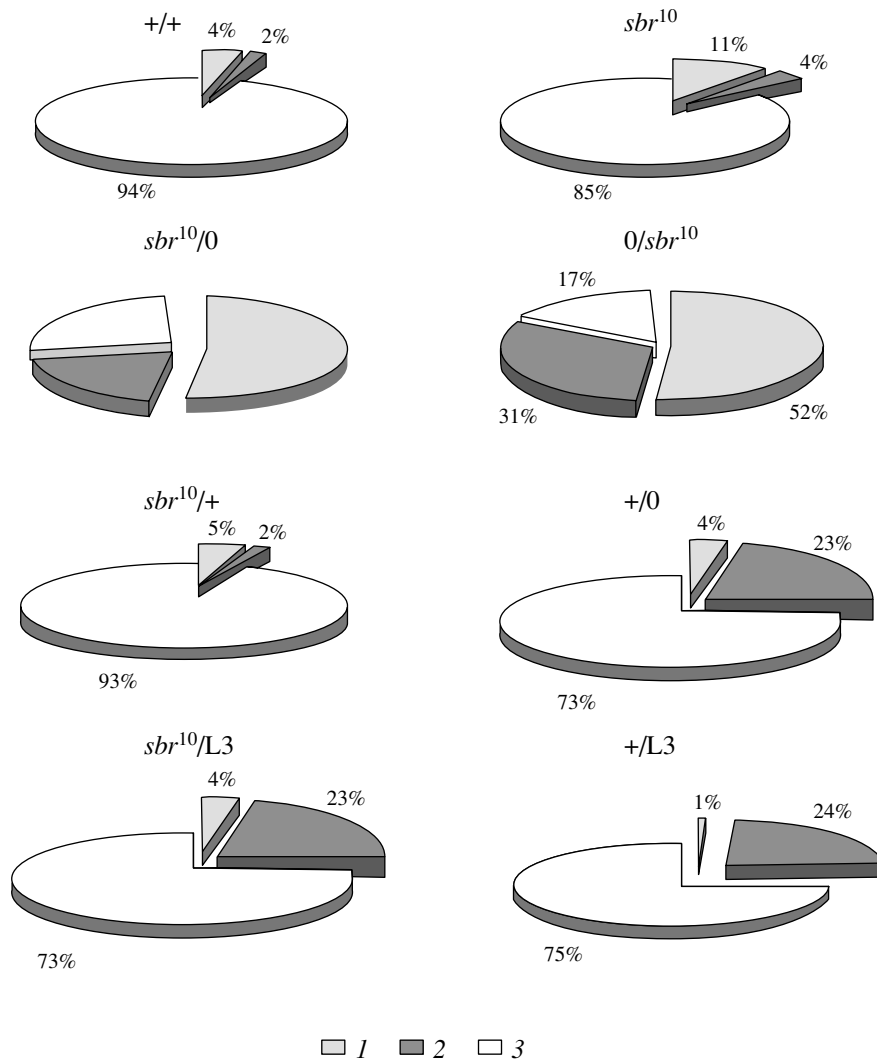


Рис. 2. Доля яичников (%) с массовой гибелью ядер в гермариях и яичевых камерах, выявленных при окраске акридином оранжевым. ◇ – отмечены значения, статистически значимо отличающиеся при  $P < 0.05$  от таковых, полученных для самок +/+.

Самки генотипа *sbr*<sup>10</sup>/0 и 0/*sbr*<sup>10</sup> отличаются от самок других исследуемых генотипов еще по одному показателю – появлению в потомстве личинок с характерными нарушениями мальпигиевых сосудов. Частота появления личинок с такими аномалиями, среди общего числа вылупившихся



**Рис. 3.** Частота эмбриональной смертности (%) в потомстве самок различных генотипов. 1 – ранняя гибель, 2 – поздняя эмбриональная гибель, 3 – выжившие эмбрионы.

личинки, достигает 25%. Обычно аномальные личинки погибают на стадии первого возраста. В потомстве самок других исследуемых генотипов доля аномальных личинок не превышает 0.4% (таблица).

Гибель на стадиях личинки 2-го и 3-го возраста и на куколочной стадии была незначительна, не вносила весомого вклада в определение плодовитости и была одинакова в потомстве самок всех исследуемых генотипов.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано [19], что на самок, гомозиготных по теплочувствительному аллелю *sbr*<sup>10</sup>, тепловой шок оказывает стерилизующий эффект. Однако в условиях перmissive температуры (24.5 ± 0.5°C) плодовитость самок *sbr*<sup>10</sup>/*sbr*<sup>10</sup> лишь не более чем в 3 раза ниже, чем у самок дру-

гих исследованных генотипов (рис. 1). В то же время присутствие в генотипе самок мутантного аллеля *sbr*<sup>10</sup> в одной дозе приводит в условиях перmissive температуры к снижению плодовитости самок *sbr*<sup>10</sup>/0 почти до нуля. Нами показано, что причиной снижения плодовитости самок *sbr*<sup>10</sup>/0 является не только повреждение яйцевых камер и снижение числа яиц, откладываемых одной самкой за одни сутки, но и гибель потомков на эмбриональной и личиночной стадиях развития (таблица). Причем по частоте эмбриональной и личиночной гибели потомков самки генотипа *sbr*<sup>10</sup>/0 отличаются от самок других проанализированных генотипов, в том числе и от самок *sbr*<sup>10</sup>/*sbr*<sup>10</sup>. В то же время самки +/0, несущие нормальный аллель гена *sbr* в одной дозе, не проявляют статистически значимого снижения плодовитости по сравнению с самками +/+. Подобные данные свидетельствуют о том, что ген *sbr* по по-

казателю плодовитости не является гаплонедостаточным. Это характерно и для других проявлений аллеля дикого типа гена *sbr* [11, 20, 21].

Нами показано, что снижение плодовитости самок *sbr<sup>10</sup>/0* в первую очередь обусловлено эмбриональной смертностью потомков. При этом основную долю составляют яйца без признаков развития или погибшие на ранних этапах эмбриогенеза (рис. 3). Процесс эмбрионального развития у дрозофилы во многом зависит от работы генов материнского организма, называемых генами материнского эффекта. Мутации генов материнского эффекта влияют на развитие потомков-эмбрионов независимо от генотипа потомков, фенотипическое проявление их мутаций зависит от генотипа матери [22]. В ооцитах дрозофилы продукты данных генов, главным образом белки и мРНК, участвуют в формировании так называемой позиционной информации [23]. Неслучайная локализация в яйце продуктов генов материнского эффекта определяет план строения будущего взрослого насекомого [24, 25]. Большинство носителей позиционной информации синтезируется в питающих клетках и транспортируется в ооцит в составе сложных макромолекулярных комплексов [26, 27]. Общим свойством всех генов материнского эффекта является то, что они экспрессируются до оплодотворения, хотя их продукты могут действовать как в ходе оогенеза, так и после оплодотворения, благодаря способности сохраняться в цитоплазме длительное время и тем самым оказывать свое влияние на процессы раннего и позднего развития. Таким образом, транспорт макромолекул играет определяющую роль в формировании позиционной информации. Нарушение плодовитости самок *sbr<sup>10</sup>/0* можно связать с одной из функций данного гена – участием в транспорте мРНК из ядра в цитоплазму [20, 28, 29]. Нарушения транспорта мРНК могут привести к изменениям в распределении позиционной информации, что повлечет за собой аномалии эмбриогенеза и морфогенеза органов взрослого организма. В ооцитах материнские мРНК сохраняются в виде рибонуклеопротеиновых комплексов. При этом продукт гена *sbr*, являясь компонентом ядерного экспорта мРНК, может влиять на формирование таких комплексов, а также их последующую локализацию.

Известно, что у дрозофилы, мыши, человека и других организмов существует по нескольку генов-паралогов, принадлежащих к семейству NXF (nuclear export factor). У *Drosophila melanogaster* ген *sbr* – один из генов данного семейства [28, 29]. Наибольшее сходство генами *sbr* *D. melanogaster* и TAP (NXF1) Homo sapiens позволяет считать ген *sbr* главным в семействе NXF [11, 29]. Учитывая столь важную роль гена *sbr* в транспорте мРНК, можно было предположить, что у потомков мужского пола, гемизиготных по нуле-

вому аллелю, развитие будет останавливаться с началом функционирования зиготического генома. В то же время показано, что большинство потомков, полученных от самок *+/0*, погибает на поздней эмбриональной стадии (рис. 3). Это позволило высказать два предположения: 1) либо эмбриональное развитие продолжается за счет накопления продукта материнского гена *sbr*; 2) либо существуют альтернативные пути транспорта мРНК из ядра в цитоплазму, способные поддержать развитие эмбриона до поздних стадий, но не позволяющие нормально завершить эмбриогенез [30].

Среди потомков самок *0/sbr<sup>10</sup>* лишь небольшая часть (меньше 27%) способна завершить эмбриональное развитие и превратиться в личинок, из которых, в свою очередь, около 25% имеют несовместимые с жизнью нарушения развития (таблица). Измененными, прежде всего, являются мальпигиевы сосуды. Ранее было показано, что появление личинок с нарушенными мальпигиевыми сосудами – одна из характерных особенностей самок, гомозиготных по аллелю *sbr<sup>10</sup>*, подвергнутых ТШ, в потомстве которых аномальные личинки появляются с частотой около 20%. Методом FISH было показано, что такие личинки – моносомии по второй хромосоме [31]. Одно из проявлений теплочувствительного аллеля *sbr<sup>10</sup>* – то, что у самок, гомозиготных по данной мутации, при тепловом воздействии (37°C, 1 ч) в зрелых ооцитах индуцируется нерасхождение половых хромосом [6]. Показано, что данный эффект не является следствием нарушения синтеза БТШ у мутантных самок [19]. Остается неизвестным, опосредовано ли нарушение расхождения хромосом, индуцируемое тепловым шоком в мейозе у самок *sbr<sup>10</sup>/sbr<sup>10</sup>*, нарушениями транспорта мРНК или это еще одна функция гена *sbr* [21].

Если рассматривать нарушения расхождения половых хромосом в мейозе у самок *sbr<sup>10</sup>/sbr<sup>10</sup>* и появление личинок с характерными аномалиями мальпигиевых сосудов, для которых показана моносомия по хромосоме 2 [31], как проявление нестабильности в поведении хромосом в процессе клеточных делений, то можно ожидать, что в основе этих событий лежат общие механизмы.

Важно отметить, что в потомстве самок *0/sbr<sup>10</sup>*, несущих одну дозу мутантного аллеля, личинки с нарушениями мальпигиевых сосудов появляются в условиях перmissive температуры (с частотой более 20%) (таблица). Появление таких личинок в условиях нормальной температуры позволяет предположить, что данное проявление мутантного аллеля *sbr<sup>10</sup>* – следствие гаплонедостаточности аллеля *sbr<sup>10</sup>* в отношении расхождения хромосом. В то же время для самок *sbr<sup>10</sup>/0* не показано увеличения частоты исключительных потомков, возникающих в результате нерасхождения половых хромосом в условиях перmissive

ной температуры (не опубликовано). Следовательно, индуцированное ТШ нерасхождение половых хромосом у самок  $sbr^{10}/sbr^{10}$  трудно объяснить недостатком функционально активного продукта гена  $sbr$  из-за тепловой инактивации продукта мутантного аллеля  $sbr^{10}$ . Имеющиеся в нашем распоряжении экспериментальные данные не позволяют в настоящий момент разрешить это противоречие.

Таким образом, мы показали, что присутствие аллеля дикого типа гена  $sbr$  в одной дозе у самок +/-0 не сказывается существенно на их плодовитости, в то время как уменьшенная доза мутантного аллеля  $sbr^{10}$  оказывает на самок 0/ $sbr^{10}$  в условиях перmissive температуры сильный стерилизующий эффект. Причины стерилизующего эффекта могут заключаться, с одной стороны, в нарушении процессов развития, так как продукт гена  $sbr$  участвует в транспорте мРНК из ядра в цитоплазму [29], а нарушения транспорта мРНК могут повлечь за собой изменения в формировании позиционной информации, что, в свою очередь, приведет к нарушениям эмбриогенеза. С другой стороны, нельзя исключить, что гибель потомков (в особенности на ранних стадиях эмбриогенеза) может быть следствием нестабильности в расхождении хромосом как в мейозе у самок, так и в первых митозах у эмбрионов. Это неизбежно ставит вопрос о роли мутаций гена  $sbr$  в возникновении такой нестабильности. Известно, что у теплочувствительного мутанта  $sbr^{10}$  при тепловом воздействии нарушается как транспорт мРНК из ядра в цитоплазму, так и расхождение хромосом в мейозе у самок дрозофилы. Являются ли эти проявления мутантного аллеля  $sbr^{10}$  связанными причинно следственными отношениями или нарушение комплекса взаимодействующих макромолекул, участвующих в ядерном экспорте мРНК, может оказывать влияние на формирование аппарата расхождения хромосом [21].

Существуют данные о том, что процесс ядерного транспорта макромолекул и процесс расхождения хромосом могут осуществляться с участием одних и тех же факторов, например ГТФазы Rap [32–35]. И хотя ядерный экспорт мРНК не зависит от ГТФазы Rap [36], важно, что оба процесса – ядерный транспорт макромолекул и транспорт хромосом к полюсам веретена – могут использовать общие модули. Это позволяет высказать предположение о существовании полифункциональных факторов, чувствительных к недостатку функционально активного продукта гена  $sbr$  и участвующих как в транспорте мРНК, так и в транспорте хромосом к полюсам деления клетки. Тем более что оба эти процесса представляют собой сменяющие друг друга этапы функциональной активности ядра и могут осуществляться с участием одних и тех же факторов.

Работа была финансово поддержана грантом РФФИ (№ 00-04-48514-а).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Tan W., Zolotukhin A.S., Bear J. et al. The mRNA export in *Caenorhabditis elegans* is mediated by Ce-NXF-1, an ortholog of human TAP/NXF and *Saccharomyces cerevisiae* Mex67p // RNA. 2000. V. 6. № 12. P. 1762–1772.
2. Мамон Л.А., Бондаренко Л.В., Третьякова И.В. и др. Последствия клеточного стресса при нарушенном синтезе белков теплового шока у дрозофилы // Вестн. СПбГУ, 1999. Сер. 3. Вып. 4. № 24. С. 100–114.
3. Arking R. Temperature-sensitive cell-lethal mutants of *Drosophila*: isolation and characterization // Genetics. 1975. V. 80. № 3. P. 519–537.
4. Жимулёв И.Ф., Семешин В.Ф., Кочнева Г.В. и др. Цитогенетическое изучение района 9E–10A X-хромосомы *Drosophila melanogaster*. Сообщение IV. Получение и характеристики хромосомных перестроек в интервале *ras-dsh* // Генетика. 1982. Т. 18. № 4. С. 596–612.
5. Левин А.В., Лозовская Е.Р., Евгеньев М.Б. Влияние высокой температуры на экспрессию генов, индуцируемых тепловым шоком у *Drosophila melanogaster*. Сообщение II. Анализ действия *ts*-мутации // Генетика. 1984. Т. 20. № 6. С. 949–953.
6. Мамон Л.А., Барабанова Л.В., Костромина Н.Н. Частота нерасхождения и потерь половых хромосом в оогенезе у мутанта *l(1)ts403 D. melanogaster* с дефектом в системе белков теплового шока при действии аноксии и высокой температуры // Генетика. 1992. Т. 28. № 4. С. 64–71.
7. Мамон Л.А., Куцкова Ю.А. Роль белков теплового шока в восстановлении клеточной пролиферации после воздействия высокой температурой на личинок *D. melanogaster* // Генетика. 1993. Т. 29. № 5. С. 791–798.
8. Куцкова Ю.А., Мамон Л.А. Последствия экстремальных воздействий на соматические клетки *Drosophila melanogaster* в условиях нарушенного синтеза белков теплового шока // Генетика. 1996. Т. 32. № 10. С. 1406–1416. (Kutskova Yu.A., Mamon L.A. The Consequences of stress effects of *Drosophila melanogaster* somatic cells in conditions of disturbed synthesis of heat shock proteins // Rus. J. Genetics. 1996. V. 32. № 10. P. 1222–1231.)
9. Никитина Е.А. Плейотропный эффект мутации *l(1)ts403* с нарушенным ответом на тепловой шок у *Drosophila melanogaster*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург: СПбГУ, 1999. 17 с.
10. Wilkie G.S. *Drosophila melanogaster* mRNA for tip associating protein (*sbr* gene). GenBank/EMBL/DBJ 1999.12.21:AJ251947 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Search&db=Nucleotide&doptcmdl=GenBank&tool=FlyBase&term=AJ251947\[ACCN\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Search&db=Nucleotide&doptcmdl=GenBank&tool=FlyBase&term=AJ251947[ACCN])). 21 Dec. 1999.
11. Wilkie G. S., Zimyanin V., Kirby R. et al. *small bristles*, the *Drosophila* ortholog of NXF-1, is essential for mRNA export throughout development // RNA. 2001. V. 7. № 12. P. 1781–1792.

12. Третьякова И.В., Лёзин Г.Т., Маркова Е.Г. и др. Продукт гена *sbr* у *Drosophila melanogaster* и его ортологи у дрожжей и человека // Генетика. 2001. Т. 37. № 6. С. 725–736. (Tretyakova I.V., Lyozin G.T., Markova E.G. et al. The *sbr* gene product in *Drosophila melanogaster* and its orthologs in yeast (Mex67p) and human (TAP) // Rus. J. Genetics. 2001. V. 37. № 6. P. 593–603.)
13. Smith D.F., Whitesell L., Katsanis E. Molecular chaperones: biology and prospects for pharmacological intervention // Pharmacol. Rev. 1998. V. 50. № 4. P. 493–513.
14. Feder M.E., Hofmann G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response: evolutionary and ecological physiology // Annu. Rev. Physiol. 1999. V. 61. P. 242–282.
15. Lindsley D.L., Grell E.H. Genetic Variation of *Drosophila melanogaster*. Publ. Carnegie Inst., 1968. 469 p.
16. Foley K., Cooley L. Apoptosis in late stage *Drosophila* nurse cells does not require genes within the H99 deficiency // Development. 1998. V. 125. P. 1075–1082.
17. Abrams J.M., White K., Fessler L.I., Steller H. Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis // Development. 1993. V. 117. P. 29–43.
18. Foe V.E., Alberts B.M. Studies of nuclear and cytoplasmic behavior during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis // J. Cell Sci. 1983. V. 61. P. 31–70.
19. Мамон Л.А., Комарова А.В., Бондаренко Л.В. и др. Формирование термотолерантности у линии *Drosophila melanogaster* l(1)ts403 с нарушенным синтезом белков теплового шока // Генетика. 1998. Т. 34. № 7. С. 920–928. (Mamon L.A., Komarova A.V., Bondarenko L.V. et al. Development of thermotolerance in *Drosophila melanogaster* Line l(1)tsHO3 with a defect in heat-shock protein synthesis // Rus. J. Genetics. 1998. № 7. P. 761–768.)
20. Korey C.A., Wilkie G. S., Davis I., Van Vactor D. *small bristles*, DmNXF1, is required for the morphogenesis of multiple tissues during *Drosophila* development // Genetics. 2001. V. 159. № 4. P. 1659–1670.
21. Никитина Е.А., Комарова А.В., Голубкова Е.В. и др. Полудоминантное влияние мутации l(1)ts403 (*sbr*<sup>l0</sup>) на нерасхождение половых хромосом в мейозе у самок *Drosophila melanogaster* при тепловом воздействии // Генетика. 2003. Т. 39. № 3. С. 341–348. (Nikitina E.A., Komarova A.V., Golubkova E.V. et al. Semidominant effect of the l(1)ts403(*sbr*<sup>l0</sup>) mutation of sex chromosome nondisjunction in meiosis in *Drosophila melanogaster* females exposed to heat // Rus. J. Genetics. 2003. V. 33. № 3. P. 269–275.
22. Lieberfarb M.E., Chu T., Wreden C. et al. Mutations that perturb poly(A)-dependent maternal mRNA activation block the initiation of development // Development. 1996. V. 122. P. 579–588.
23. Wolpert L. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation // J. Theoret. Biol. 1969. V. 25. P. 1–47.
24. Nusslein-Volhard C. Determination of the embryonic axes of *Drosophila* // Development. 1991. V. 1 (Suppl.). P. 1–10.
25. Bashirullah A., Cooperstock R.L., Lipshitz H.D. RNA localization in development // Annu. Rev. Biochem. 1998. V. 67. P. 335–394.
26. Mahajam-Miklos S., Cooley L. Intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis (review) // Devel. Biol. 1994. V. 165. P. 336–351.
27. Theurkauf W.E. Microtubules and cytoplasm organization during *Drosophila* oogenesis (review) // Devel. Biol. 1994. V. 165. P. 352–360.
28. Herold A., Suyama M., Rodrigues J. P. et al. TAP (NXF1) belongs to a multigene family of putative RNA export factors with a conserved modular architecture // Mol. Cell. Biol. 2000. V. 20. № 23. P. 8996–9008.
29. Herold A., Klymenko T., Izaurralde E. NXF1 / p15 heterodimers are essential for mRNA nuclear export in *Drosophila* // RNA. 2001. V. 7. P. 1768–1780.
30. Pougatchova O.M., Shershabova A.N., Musorina A.S. et al. Some lethal alleles of *Drosophila melanogaster sbr* gene manifest their lethal effect during the late embryogenesis // 43th Ann. *Drosophila* Res. Conf. San Diego, California (April 10–14), 2002. P. 141.
31. Pougatchova O.M., Mamon L.A. Monosomy on chromosome 2 can be the reason of *Drosophila melanogaster* larvae with Malpighian tubules abnormalities // 17th Eur. *Drosophila* Res. Conf. Edinburgh, Scotland (September 1–5), 2001. P. 68.
32. Gruss O.J., Carazo-Salas R.E., Schatz C.A. et al. Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin  $\alpha$  on TPX2 activity // Cell. 2001. V. 104. P. 83–93.
33. Nachury M.V., Maresca T.J., Salmon W.C. et al. Importin  $\beta$  is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly // Cell. 2001. V. 104. P. 96–106.
34. Clarke P. R., Zhang C. Ran GTPase: a master regulator of nuclear structure and function during the eukaryotic cell division cycle? // Trends Cell Biol. 2001. V. 11. № 9. P. 366–371.
35. Hetzer M., Gruss O.J., Mattaj W. The Ran GTPase as a marker of chromosome position in spindle formation and nuclear envelope assembly (review) // Nature Cell Biol. 2002. V. 4. P. 177–184.
36. Komeili A., O'Shea E.K. New perspectives on nuclear transport (review) // Annu. Rev. Genet. 2001. V. 35. P. 341–364.