

УДК 577.218

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ГИБРИДНОГО ДИСГЕНЕЗА В ОНТОГЕНЕЗЕ *Drosophila virilis*

© 2010 г. М. И. Соколова, Е. С. Зеленцова, Н. В. Рожков, М. Б. Евгенийев

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

119991 Москва, ул. Вавилова, д. 32

E-mail: misha572001@yahoo.com

Поступила в редакцию 01.06.10 г.

Окончательный вариант получен 30.06.10 г.

Исследовали нарушения развития клеток зародышевого пути, наблюдаемые при скрещивании определенных линий *Drosophila virilis* и приводящие к синдрому гибридного дисгенеза (ГД). Полярные клетки и зародышевые клетки гонад детектировали с помощью специфических антител к белку Vasa. Показано, что нарушения нормального формирования первичных гонад начинаются уже на 11-12 стадии развития эмбриона, а последствия гибели зародышевых клеток проявляются в нарушении развития гонад на всех последующих стадиях онтогенеза дисгенных гибридов. Показано время начала гибели клеток зародышевого пути в эмбриогенезе, а также время начала транскрипции ретроэлемента *Penelope*, играющего, как предполагается, важную роль в развитии синдрома гибридного дисгенеза у *D. virilis*.

Ключевые слова: гибридный дисгенез, полярные клетки, *Penelope*, *D. virilis*.

Мобильные элементы (МЭ) составляют значительную часть ДНК всех изученных организмов. Однако спонтанные транспозиции МЭ в геноме детектируются крайне редко (Paquin, Williamson, 1984; Strand, McDonald, 1985). Поэтому особый интерес представляют случаи, когда МЭ выходят из под контроля генома хозяина, претерпевают транспозицию и “распрыгиваются” по геному. Явление гибридного дисгенеза (ГД), описанное впервые у *D. melanogaster*, относится именно к таким случаям (Kidwell et al., 1977).

В настоящее время описаны три независимые системы гибридного дисгенеза у *D. melanogaster* и одна система дисгенеза у *D. virilis* (Picard, 1976; Kidwell et al. 1977; Yannopoulos et al., 1987; Lozovskaya et al., 1990). В трех системах ГД у *D. melanogaster* активируется только один МЭ (*P*, *I* или *hobo*), в то время как у *D. virilis* происходит мобилизация нескольких неродственных МЭ, относящихся к разным классам (Evgen'ev et al., 1997). В последнее время повышенный интерес к МЭ связан с открытием явления РНК интерференции, а именно si- и piРНК, которые играют важную роль в регуляции транскрипции и подвижности МЭ в геноме (Aravin et al., 2007; Chung et al., 2008; Czech et al., 2008). Также показано, что малые интерферирующие РНК являются важным эпигенетическим фактором в супрессии ГД у *D. melanogaster* (Brennecke et al., 2008).

На основании генетических и молекулярных данных есть основания полагать, что важную роль в проявлении синдрома ГД у *D. virilis* играет ретроэлемент *Penelope* (Petrov et al., 1995; Evgen'ev et al., 1997). Данный МЭ образует собственное суперсемейство, представители которого распространены в весьма широком спектре организмов (Archirova et al., 2001). Ранее было показано, что атрофия гонад и стерильность гибридов обоего пола от дисгенных скрещиваний является одним из основных проявлений ГД у *D. virilis* (Lozovskaya et al., 1990). Целью нашей работы было установить стадию, на которой начинается гибель клеток зародышевого пути у эмбрионов от дисгенного скрещивания, а также исследовать время начала транскрипции МЭ *Penelope*, важная роль которого в ГД у *D. virilis* была показана нами ранее (Evgen'ev et al., 1997).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Мушки *D. virilis* содержались в стандартных условиях при 25°C. Линия 9 дикого типа была поймана в Батуми (Грузия) в 1970 году, линия 160 является старой лабораторной линией и несет серию рецессивных маркеров на всех аутосомах (Lozovskaya et al., 1990).

Иммуногистохимический анализ. Сбор 0–2-часовых и 2–5-часовых эмбрионов проводили на чашках с 4% агаром, промывали в фосфатно-солевом буфере, дехорионизировали в 5% гипохлорите натрия и

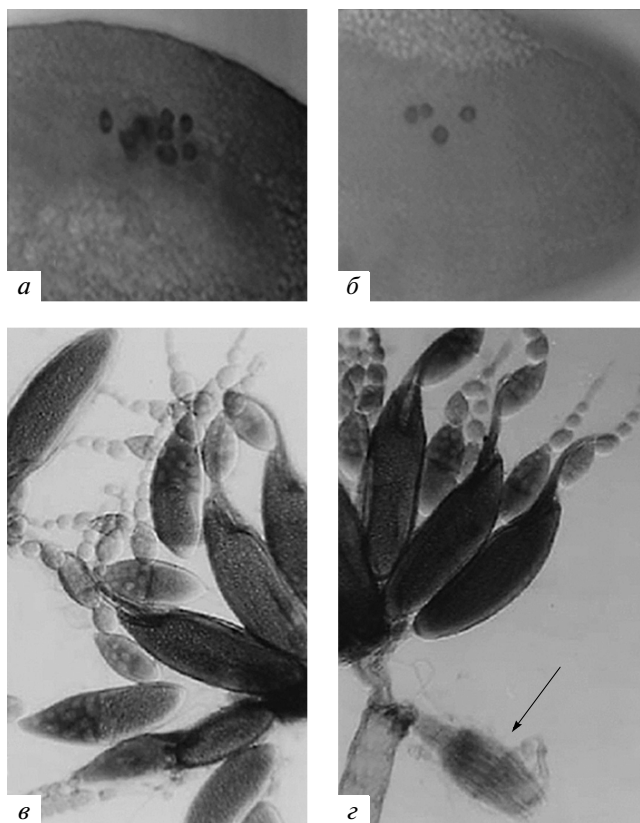


Рис. 1. Формирование первичных гонад в нормальных эмбрионах линии 9 (а) и дисгенных эмбрионах (б) *D. virilis*, приводящее к развитию нормальных (в) и редуцированных (з) яичников (стрелкой показан недоразвитый яичник).

фиксировали в 4% параформальдегиде. Эмбрионы инкубировали с поликлональными кроличьими антителами, специфическими к белку Vasa, при 4°C в течение ночи, используя разведение 1 : 1000. Вторичные биотинилированные козы антитела использовали в разведении 1 : 5000, инкубируя эмбрионы в течение 1 часа при комнатной температуре на ротаторе. Для усиления сигнала пользовались системой ABC Vector Kit (Vector Laboratories, США). Окрасивание в результате пероксидазной реакции развивалось 3–5 минут, его останавливали, отмывая эмбрионы фосфатным буфером. Эмбрионы сохраняли в 50% глицерине и фотографировали, используя микроскоп Olympus с иммерсионным объективом.

Анализ транскрипционной активности. Для анализа экспрессии МЭ *Penelope* выделяли тотальную РНК из 0–2-часовых и 2–5-часовых эмбрионов с использованием TRIzol (Sigma, США) реагента. Качество полученной РНК анализировали в 1.2% агарозном геле. Для синтеза кДНК использовали 1 мкг тотальной РНК после ее обработки ДНКазой (Fermentas, Литва). Обратную транскрипцию проводили с использованием стандартного набора для синтеза первой цепи кДНК на основе случайных шести-

нуклеотидных затравок (“random primers”) (Fermentas, Литва). ПЦР-анализ экспрессии МЭ *Penelope* был выполнен на амплификаторе MJ MINI (BioRad, США) по следующей программе: 95°C (3’); 35 циклов при 94°C (20’), 60°C (20’), 72°C (30’); 72°C (2’). Используемые праймеры: pen397-f 5’-GCCGACACGTGTAAAATAATGTAGT-3’; pen692-r 5’-CGTAGCTCATGTTGGTTGCTGT-3’. Продукты ПЦР-анализа фракционировали в 1.5% агарозном геле и регистрировали с помощью трансиллюминатора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С тех пор как впервые был открыт синдром гибридного дисгенеза у *D. virilis*, было показано, что в гибридах от дисгенных скрещиваний происходит мобилизация нескольких неродственных МЭ, таких как *Helena*, *Paris*, *Ulysses* и *Penelope* (Petrov et al., 1995). Один из МЭ, мобилизуемый в дисгенном скрещивании – *Penelope* – является уникальным в своем роде. Так, имея всего лишь одну ОРС, транспозон *Penelope* кодирует две белковые активности – обратную транскриптазу и эндонуклеазу. Несколькими группами исследователей было показано, что именно транспозон *Penelope* вносит важный вклад в развитие синдрома гибридного дисгенеза у *D. virilis*, проявляющийся при скрещивании самок дикого типа (линия 9) с самцами лабораторной линии 160 (Lozovskaya et al., 1990). Следует заметить, что транспозон *Penelope* асимметрично присутствует в изучаемых линиях – он есть в линии 160 и отсутствует в линии 9 (Petrov et al., 1995; Evgen’ev et al., 1997).

В данной работе мы продолжили описание нарушений гонадогенеза, наблюдаемых в гибридах от дисгенных скрещиваний на разных стадиях развития. Использование специфических для полярных клеток антител Vasa показало, что уже на 11–12 стадии, что соответствует 7–13 часам эмбриогенеза *D. virilis*, в дисгенных эмбрионах (30–50% в зависимости от эксперимента) число зародышевых клеток значительно меньше, чем в норме (рис. 1а, б). Пройдя через стенку зачатка средней кишки, полярные клетки по пути к месту формирования первичных гонад претерпевают деструктивные изменения и разрушаются. Важно отметить, что все полярные клетки количественно покидают карман зачатка средней кишки и располагаются дорзально между ним и мезодермальным слоем. Потеря клеток происходит при их продвижении и это может послужить ориентиром для дальнейшего изучения механизмов, лежащих в основе этого процесса. В первичной гонаде происходит ассоциация с соматическими мезодермальными клетками гонады лишь немногих, достигших ее, зародышевых клеток, дающих впоследствии начало немногим стволовым клеткам гонад с общей нарушенной морфологией у личинок, куколок и взрослых особей. У взрослых дисгенных гибридов в 40–50% случаев наблюдали атрофию одной

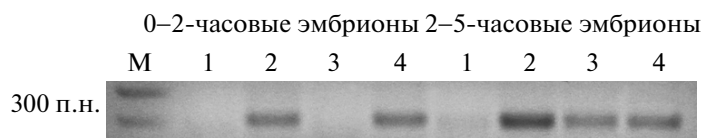


Рис. 2. Транскрипционный анализ МЭ *Penelope* в 0–2- и 2–5-часовых эмбрионах в линии 9 (1), линии 160 (2), дисгенных (3) и реципрокных (недисгенных) (4) эмбрионах.

или обеих гонад (рис. 1в, з). По своей морфологии наблюдаемые нарушения яичников (гонадная атрофия) весьма сходны с нарушениями, наблюдаемыми у *D. melanogaster* в системе Р-М дисгенеза (Losovskaya et al., 1990).

Интересно было установить, имеется ли временная корреляция между наблюдаемыми нарушениями формирования гонад у эмбрионов дисгенных гибридов и временем начала экспрессии мРНК *Penelope*. С помощью метода обратной транскрипции и последующего ПЦР-анализа мы детектировали транскрипты транспозона *Penelope* в 0–2-часовых эмбрионах линии 160 и эмбрионах, полученных от скрещивания самок линии 160 и самцов линии 9 (недисгенное или реципрокное скрещивание), тогда как соответствующие транскрипты отсутствовали на этой стадии в дисгенных гибридах (рис. 2). С другой стороны, мы обнаружили транскрипцию *Penelope* как в дисгенных, так и в реципрокных 2–5-часовых эмбрионах. Следует отметить, что 0–2-часовые эмбрионы у дрозофилы характеризуются полным отсутствием транскрипции, а ее начало соответствует более поздним стадиям. В этой связи можно предположить, что транскрипция МЭ *Penelope* начинается одновременно с началом общей транскрипции генома в 2–5-часовых эмбрионах, а детектируемые нами транскрипты на более ранней стадии (0–2-часовые эмбрионы) являются материнскими.

Несмотря на то, что мы обнаруживали транскрипты МЭ *Penelope* несколько раньше начала гибели зародышевых клеток, мы не исключаем, что в данном случае происходит экспрессия мРНК *Penelope* в соматических клетках, тогда как в клетках зародышевого пути она может начинаться позднее. Мы также не исключаем вклада экспрессии других мобильных элементов в развитие синдрома гибридного дисгенеза, транскрипция которых не изучалась в настоящем исследовании.

Таким образом, хотя полученные данные и являются еще одним подтверждением важной роли *Penelope* в развитии синдрома ГД у *D. virilis*, мы не исключаем как важного значения факторов хозяйского генома, так и важной роли других МЭ при определении этого синдрома.

Проводимые нами исследования генетико-молекулярных механизмов, обеспечивающих транспозиции различных МЭ в потомстве от дисгенных скрещиваний, имеют важное значение для понимания

роли МЭ в формировании структуры и контроле функционирования эукариотического генома.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Aravin A.A., Hannon G.J., Brennecke J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race // *Science*. 2007. V. 318. P. 761–764.

Arkhipova I.R., Pyatkov K.I., Meselson M. et al. Retroelements containing introns in diverse invertebrate taxa // *Nat. Genet.* 2003. V. 33. P. 123–124.

Brennecke J., Malone C.D., Aravin A.A. et al. An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing // *Science*. 2007. V. 322. P. 1387–1392.

Chung W.J., Okamura K., Martin R. et al. Endogenous RNA interference provides a somatic defense against *Drosophila* transposons // *Curr. Biol.* 2007. V. 18. P. 795–802.

Czech B., Malone C.D., Zhou R. et al. An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila* // *Nature*. 2008. V. 453. P. 798–802.

Evgen'ev M.B., Zelentsova H., Shostak N. et al. Penelope, a new family of transposable elements and its possible role in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 196–201.

Kidwell M.G., Kidwell J.F., Sved J.A. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: a syndrome of aberrant traits including mutation, sterility and male recombination // *Genetics*. 1977. V. 86. P. 813–833.

Lozovskaya E.R., Scheinker V.S., Evgen'ev M.B. A hybrid dysgenesis syndrome in *Drosophila virilis* // *Genetics*. 1990. V. 126. P. 619–623.

Petrov D.A., Schutzman J.L., Hartl D.L. et al. Diverse transposable elements are mobilized in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 8050–8054.

Paquin C.E., Williamson V.M. Temperature effects on the rate of Ty transposition // *Science*. 1984. V. 226. P. 53–55.

Picard G. Non-mendelian female sterility in *Drosophila melanogaster*: hereditary transmission of I factor // *Genetics*. 1976. V. 83. P. 107–123.

Strand D.J., McDonald J.F. Copia is transcriptionally responsive to environmental stress // *Nucleic Acids Res.* 1985. V. 13. P. 4401–4410.

Yannopoulos G., Stamatis N., Monastirioti M. et al. Hobo is responsible for the induction of hybrid dysgenesis by strains of *Drosophila melanogaster* bearing the male recombination factor 23.5MRF // *Cell*. 1987. V. 49. P. 487–495.

Morphologic and Molecular Manifestations of Hybrid Dysgenesis in Ontogenesis of *Drosophila virilis*

M. I. Sokolova, E. S. Zelentsova, N. V. Rozhkov, and M. B. Evgeniev

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia
e-mail: misha572001@yahoo.com

Abstract—Disorders of germ track cell development that take place in crossbreeding of certain lines of *Drosophila virilis* and lead to hybrid dysgenesis (HD) syndrome have been studied. Polar cells and germ line cells were identified with specific antibodies against Vasa protein. It has been shown that abnormalities of formation of primary gonads takes place already at the 11–12 stage of embryo development and the consequences of germ line cell death lead to disorders of gonad development at the following stages of ontogenesis of dysgenic hybrids. The start point of germ line cell death in embryogenesis as well as initiation of transcription of *Penelope* retroelement, which is supposed to play a significant role in HD syndrome development in *D. virilis*, were estimated.

Keywords: hybrid dysgenesis, polar cells, *Penelope*, *D. virilis*