

УДК 595.7:576.315/316

©1997г. О.В. ГОРЕНСКАЯ, В.Ю. СТРАШНЮК, В.Г. ШАХБАЗОВ, В.Т. КАКПАКОВ

ДИНАМИКА БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР *DROSOPHILA MELANOGASTER* MEIG. В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO* И ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭКДИЗОНА

Как известно, гормон линьки экдизон (экдистерон) играет важную роль в регуляции генетической программы развития насекомых (Буров, 1983; Richards, Ashburner, 1984). В исследованиях на дрозофиле показаны закономерные изменения генной активности в онтогенезе личинок и предкуколок, коррелирующие с увеличением титра экдизона в гемолимфе в периоды, предшествующие линькам и метаморфозу (Ashburner, 1967; Richards, 1981). Роль экдизона в последовательных изменениях картины пуфов политенных хромосом была подтверждена в опытах *in vitro*, в которых было показано значительное сходство в наборе активных пуфов у личинок соответствующего возраста *in vivo* (Ashburner, 1973; Полуэктова и др., 1986).

В наших исследованиях было установлено, что скорость ответа ядерных генов на действие экдизона зависит от генотипа. Она различается у инбредных, селективируемых и гибридных особей дрозофилы (Страшнюк и др., 1991).

Роль биоэлектрических свойств клеточных ядер в механизме действия гормона линьки экдизона на ядерной геном насекомых была показана в ряде работ. Ряд авторов изучали онтогенетические изменения биопотенциалов клеточных и ядерных мембран в клетках слюнных желез хирономуса (Ito, Louvenstein, 1965; Kroeger, 1966). Отмечен определенный параллелизм в изменениях пуффинга политенных хромосом с одной стороны, ионной проводимости, электрического сопротивления мембран и трансмембранного потенциала, с другой стороны. Авторы высказывают мнение, что гормональная регуляция генной активности и репликации ДНК в онтогенезе опосредуется изменениями мембранного потенциала и содержанием катионов в цитоплазме и ядре. Действие экдизона и ювенильного гормона в этих процессах противоположно, т.е. эти гормоны функционируют как неполные антагонисты.

Ранее мы исследовали динамику изменений электрокинетических свойств (ЭКС) клеточных ядер в онтогенезе личинок и предкуколок дрозофилы (Шахбазов и др., 1986). Было установлено увеличение содержания электроотрицательных ядер в слюнных железах дрозофилы в конце 3-его личиночного возраста и у поздней предкуколки, коррелирующие по времени с возрастанием уровня экдизона в гемолимфе, со сменой пуфовой картины и увеличением количества активных генов. В межличиночные периоды онтогенеза, когда количество пуфов сравнительно невелико, процент ядер с отрицательным электрокинетическим (ζ -) потенциалом снижается.

Целью данной работы было изучение динамики изменений ЭКС клеточных ядер в слюнных железах *Drosophila melanogaster* Meig. под влиянием гормона экдизона *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Материалом для исследования служили личинки инбредной линии Домодедовская-32 (Д-32) со степенью инбридинга 60 - 75 поколений. Использовали синхронизированные культуры, полученные из яиц, отложенных за 2 ч. Личинки развивались в стандартной сахарно-дрожжевой среде при температуре 23 - 24°C. Формирование пупария наблюдали через 122 - 125 ч развития. В опыты брали самок личинок 3-го возраста через 112 - 115 ч развития, в межличиночный период. У личинок извлекали слюнные железы в физиологическом растворе Эфрусси-Бидла и переносили их в питательную среду для культивирования. В опыте 1 использовали среду C46+10%FBS (бычья эмбриональная сыворотка), (Gibco, США) (Какпаков, 1989). В опыте 2 использовали эту же среду с добавлением экдистерона (фирмы Calbiochem, США) в концентрации 1мкг/мл. Слюнные железы культивировали *in vitro* при температуре 24°C. Время культивирования составляло 5, 10, 20, 30 и 60 мин.

Биоэлектрические свойства клеточных ядер в слюнных железах дрозофилы исследовали с помощью оригинального метода внутриклеточного микроэлектрофореза (Шахбазов, Лобынцева, 1971).

Слюнные железы вместе с каплей питательной среды помещали в камеру для микроэлектрофореза. Напряженность поля в камере составляла 15 В/см, сила тока - 0,7 мА. При внутриклеточном микроэлектрофорезе ядра клеток слюнных желез дрозофилы смещаются в сторону анода, т.е. имеют отрицательный ζ -потенциал. Часть клеточных ядер остается неподвижной в электрическом поле. Основным показателем служил процент электроотрицательных ядер - ЭОЯ, %.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Полученные результаты приведены в таблице. Как было показано ранее (Шахбазов и др., 1986), в межличиночный период развития личинок дрозофилы значение ЭОЯ, % в клетках слюнных желез невысоко. Это подтвердилось и в данном исследовании. Показатель ЭОЯ, % в контроле, у личинок 112 - 115 ч развития, составлял 16,8%.

Таблица

Динамика показателя ЭОЯ, % в слюнных железах дрозофилы в условиях культивирования *in vitro* и при действии экдизона.

Экспозиция, мин	0 контроль	5	10	20	30	60
опыт 1	16,8±0,8	18,9±1,1	17,4±0,8	21,4±1,9	13,2±1,6	5,1±0,7
опыт 2	16,8±0,8	18,0±0,8	34,2±2,0	41,7±0,9	33,4±2,2	28,2±3,3

При культивировании слюнных желез в питательной среде C46+10%FBS (опыт 1) в течение 5 - 10 мин показатель ЭОЯ, % не отличался от контроля. Можно отметить некоторое увеличение исследуемого показателя через 20 мин инкубирования - на 27,4% по отношению к контролю. В дальнейшем, однако, показатель ЭОЯ, % начинает снижаться, что особенно проявилось через 60 мин культивирования слюнных желез, когда этот показатель составлял всего 30,6% от контроля.

При культивировании слюнных желез личинок дрозофилы в среде с экдистероном (опыт 2) обнаружено значительное влияние гормона на ЭКС клеточных ядер. В первые 5 мин культивирования это влияние еще не обнаруживалось. Но уже через 10 мин величина ЭОЯ, % была более, чем в 2 раза выше по сравнению с контролем и на 96,6% выше, чем в опыте 1. Через 20 мин культивирования в среде с экдистероном значение ЭОЯ, % было максимальным и превосходило контроль на 141,2%, а опыт 1 - на 94,9%. В дальнейшем, как и в опыте 1, исследуемый показатель постепенно снижался. Однако и через 30 мин, и через 60 мин культивирования он был значительно выше, чем в контроле, а в сравнении с опытом 1 относительные различия все более возрастали. Через 60 мин культивирования показатель ЭОЯ, % в опыте 2 был в 5,5 раза выше, чем в опыте 1.

Полученные результаты убедительно свидетельствуют об увеличении отрицательного электрического заряда клеточных ядер слюнных желез дрозофилы под влиянием гормона линьки. Эти данные согласуются с результатами изучения динамики ЭОЯ, % в онтогенезе личинок и предкуколок дрозофилы (Шахбазов и др., 1986), в которых возрастание данного показателя по времени коррелировало с увеличением уровня гормона экдизона в гемолимфе.

В настоящее время нет единого мнения по вопросу о молекулярных механизмах взаимодействия гормонов развития насекомых с генетическим аппаратом клетки (Буров, 1983; Ashburner, Cherbas, 1976; Kroeger, 1977). В целом, можно выделить две основные группы гипотез - прямого и опосредованного действия гормонов. Первые предполагают непосредственное участие гормонов в процессах транскрипции, трансляции и репликации генетического кода (Richards, Ashburner, 1984; Полуэктова и др., 1985). Вторые связывают роль гормонов развития с влиянием на деятельность других эндокринных факторов или созданием физиологических условий, изменяющих ход этих процессов (Kroeger, 1966, 1977; Lezzi, Gilbert, 1969).

В соответствии с триггерной схемой Эшбернера (Ashburner, 1973, Richards, Ashburner, 1984), экдизон-рецепторный комплекс связывается с "ранними" и "поздними" хромосомными локусами, активируя первые и оставляя неактивными вторые. Продукты активности ранних пухов ингибируют их собственную активность и, кроме того, вступают в конкурентные взаимодействия с гормонами за места связывания в локусах поздних пухов, освобождают последние от ингибирующего действия гормона и, таким образом, индуцируют их активность. Эту схему

существенно дополняют данные Е.С. Беляевой о генетическом контроле онтогенетических изменений пуффинга политенных хромосом дрозофилы (Беляева, 1982).

Согласно гипотезам косвенного влияния гормонов на регуляцию развития насекомых, их первичный эффект заключается в изменении потенциала покоя и ионной проводимости клеточных мембран (Kroeger, 1966, 1977; Baumann, 1969; Lezzi, Gilbert, 1969). Действие ювенильного гормона приводит к деполяризации мембран и увеличению их проницаемости для ионов Na^+ . В результате внутриклеточное и внутриядерное содержание Na^+ возрастает. Действие экдизона противоположно: он вызывает увеличение мембранного потенциала и проницаемости мембран для ионов K^+ . В результате концентрация этого катиона в цитоплазме и ядре повышается. В соответствии с характером действия гормонов на ионную проницаемость мембран в онтогенезе двукрылых, параллельно с изменениями гормональной ситуации (соотношения ювенильного гормона и экдизона) изменяется соотношение Na^+/K^+ . Установлено, что конденсированные и деконденсированные участки хромосом различаются по ионному составу и, прежде всего, по содержанию ионов Na^+ и K^+ (Trosch, 1977). По мнению ряда авторов (Kroeger, 1977; Lezzi, Gilbert, 1969), изменение натрий-калиевого баланса в клетке и в ядре вызывает изменения пуффинга политенных хромосом.

Обе группы гипотез - прямого и опосредованного влияния гормонов на генетический аппарат клеток насекомых имеют логические и экспериментальные обоснования. Однако, возможно, справедливой является точка зрения некоторых авторов, которые используют элементы обоих подходов и считают, что взаимодействие гормонов с генетическим аппаратом клетки может в значительной степени модулироваться другими агентами, в частности, ионами натрия, калия, магния, циклической АМФ и др. Эти агенты могут изменять активность белков, участвующих в контроле генной активности (Rensing, Fisher, 1975; Leenders, Wullems, Bercudes, 1970).

Существование гипотез прямого и опосредованного действия гормонов на генетический аппарат клеток насекомых может быть вполне объяснимо, если учесть, что существует несколько уровней регуляции генной активности. Один из них связан с конформационным состоянием хроматина, со степенью его диффузности. Согласно Наглу (Nagl, 1985), конформация хроматина есть результат организации генома плюс электростатическое окружение. Локальные изменения конформации хроматина во время развития происходят в соответствии с термодинамическими, электродинамическими, наконец, квантово-механическими законами и зависят от положения клетки внутри различных физических и химических градиентов. Изменения структуры хроматина затем позволяют включить в действие тонкие механизмы регуляции генной активности, осуществляемой ферментами и регуляторными белками.

Наряду с этим, по-видимому, существует системный уровень регуляции генетических функций клеточного ядра, обусловленный его интегральными свойствами. Наши данные (Шахбазов и др., 1986, 1974; Шкорбатов, Шахбазов, 1982; Страшнюк и др., 1990) и результаты других авторов (Ito, Louvenstein, 1965; Shaer, Whytock, Emmines, 1976) свидетельствуют о том, что биоэлектрические свойства клеточных ядер могут играть важную роль в неспецифической регуляции уровня функциональной активности ядерного генома. Теоретические расчеты (Лемешко и др., 1981) и экспериментальные данные (Шахбазов, 1974) показывают, что величина отрицательного поверхностного заряда клеточных ядер коррелирует с величиной трансмембранного потенциала. Оба показателя характеризуют энергетическое состояние клеточного ядра.

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что заряд ядра зависит от генотипа, связан с уровнем его функциональной активности и гомеостазом клеток (Шахбазов и др., 1986, 1971, 1974). Суммарный заряд клеточного ядра образован его поверхностным и объемным зарядами (Аракелян, 1976). Последний обусловлен внутриядерными структурами и, в первую очередь, зарядом хроматина. Показан вклад молекул РНК и ДНК в образование отрицательного электрического заряда клеточных ядер (Шкорбатов, Шахбазов, 1982). У дрозофилы показана тесная корреляция между содержанием электроотрицательных ядер в клетках слюнных желез и степенью политении гигантских хромосом (Страшнюк и др., 1997). Изменения показателя ЭОЯ, % в онтогенезе и при действии теплового шока коррелируют с пуфовой активностью политенных хромосом (Шахбазов и др., 1986; Страшнюк и др., 1990).

Полученные в данном исследовании результаты показали, что действие гормона экдистерона сопровождается существенным увеличением отрицательного заряда клеточных ядер. Эти данные свидетельствуют о важной роли интегральных биоэлектрических свойств клеточных ядер в механизме экдизоновой индукции изменений генной активности в онтогенезе дрозофилы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аракелян В.Б. О вкладе объемного заряда в подвижность ядер при внутриклеточном микроэлектрофорезе // Биофизика. - 1976. - Т.21, №5. - С.35 - 38.
- Беляева Е.С. Транскрипционно активные районы хромосом: Автореф. дис... д-ра биол. наук. - Новосибирск, 1982. - 32с.
- Буров Н.В. Механизмы гормональной регуляции линьки и метаморфоза // Тр. Всесоюз. энтомол. о-ва. - Л.: Наука, 1983. - Т.64. - С.44 - 63.
- Какпаков В.Т. Получение и характеристика культур соматических клеток дрозофилы: Автореф. дис... д-ра биол. наук. - М., 1989. - 47с.
- Лемешко В.В., Товстяк В.В., Ковган Л.Н. Связь между электрокинетическим и трансмембранным потенциалом замкнутых мембранных структур // Докл. АН УССР. Серия Б. - 1981. - №11. - С.75 - 77.
- Полуэктова Е.В., Митрофанов В.Г., Муховатова Л.М., Какпаков В.Т. Экспрессия экдистероновых пухов в хромосомах слюнных желез личинок *Drosophila virilis* Sturt. // Онтогенез. - 1986. - Т.17, №5. - С.478 - 486.
- Полуэктова Е.В., Поликарпова С.И., Кожанова Н.И., Какпаков В.Т., Митрофанов В.Г. Включение ³H-ювенильного гормона¹ в клетки слюнных желез личинок *Drosophila virilis* Sturt. // Онтогенез. - 1985. - Т.16, №1. - С.60 - 66.
- Страшнюк В.Ю., Таглина О.В., Шахбазов В.Г. Параллельные изменения пухфинга политенных хромосом и биоэлектрических свойств клеточных ядер в слюнных железах *Drosophila melanogaster* после теплового шока // Генетика. - 1990. - Т.26, №5. - С.874 - 878.
- Страшнюк В.Ю., Таглина О.В., Шахбазов В.Г. Экдизонзависимые изменения активности пухов онтогенеза в слюнных железах дрозофилы, культивируемых *in vitro*, в связи с эффектом гетерозиса и отбором по адаптивно важным признакам // Генетика. - 1991. - Т.27, №9. - С.1512 - 1518.
- Страшнюк В.Ю., Аль-Хамед С., Непейвода С.Н., Шахбазов В.Г. Цитогенетическое и цитобиофизическое исследование механизмов температурных адаптаций и эффекта гетерозиса у *Drosophila melanogaster* Meig. // Генетика. - 1997. - Т.33, №6. - С.793 - 799.
- Шахбазов В.Г., Лобынцева Г.С. Биоэлектрические свойства ядра и ядрышка в клетках растений в связи с генотипом, физиологическим состоянием и действием высокой температуры // Биофизика. - 1971. - Т.16, вып.3. - С.457 - 461.
- Шахбазов В.Г. О физико-химических механизмах инбредной депрессии гетерозиса // Генетика. - 1974. - Т.10, №4. - С.153 - 164.
- Шахбазов В.Г., Шкорбатов Ю.Г., Страшнюк В.Ю. Регуляция активности ядерного генома и биоэлектрические свойства хроматина и клеточного ядра // Докл. АН СССР. - 1986. - Т. 290, №5. - С.1255 - 1258.
- Шкорбатов Ю.Г., Шахбазов В.Г. О роли нуклеиновых кислот и других биополимеров в образовании электрического заряда клеточного ядра // Молекул. генетика и биофизика. - 1982. - Вып. 7. - С.35 - 38.
- Ashburner M., Cherbas P. The control of puffing by ions - the Kroeger hypothesis: a critical review // *Molecul. and Cell. Endocrin.* - 1976. - V.5. - P. 89 - 107.
- Ashburner M. Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. 1. Autosomal puffing patterns in a laboratory stock of *Drosophila melanogaster*. // *Chromosoma*. - 1967. - V.21. - P. 398 - 428.
- Ashburner M. Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* 1. Dependence upon ecdysone concentration // *Develop. Biol.* - 1973. - V.5. - P.47 - 61.
- Baumann G. Juvenile hormone: Effect on bimolecular lipid membranes // *Nature*. - 1969. - V.223. - P. 316 - 317.
- Bonner J.J. An assesment of the ecdysteroid receptor of *Drosophila* // *Cell*. - 1982. - V.30. - P. 7 - 8.
- Ito S., Louvenstein W.R. Permeability of a nuclear membrane: changes during normal development and change induced by growth hormone // *Science*. - 1965. - V.150. - P. 909 - 910.
- Kroeger H. Potentialdiferenz und Puff-Muster. Electrophysiologische und cytologische Untersuchungen an den Speicheldrusen von *Chironomus thummi* // *Exp. Cell. Res.* - 1966. - V.41. - P. 64 - 80.
- Kroeger H. The control of puffing by ions: a reply // *Molecul. and Cell Endocrin.* - 1977. - V.7. - P.105 - 110.
- Leenders H.J., Wullems G.G., Bercudes H.D. Competitive interaction of adenosine 3', 5' - monophosphate on gene activation by ecdysterone // *Exp. Cell Res.* - 1970. - V.63. - P.159 - 164.
- Lezzi M., Gilbert L.J. Control of gene activities in the polytene chromosomes of *Chironomus tentans* by

- ecdysone and juvenile hormone // Proc. Nat. Acad. Sci. USA . - 1969. - V.64. - P. 438 - 503.
- Nagl W. Chromatin organization and the control of gene activity // Int. Rev. Cytology. - 1985. - V.94. - P.21 - 56.
- Rensing L., Fisher M. The effect of sodium, potassium and ATP on a development puff sequence in *Drosophila* salivary glands in vitro // Cell. Differentiation. - 1975. - V.4. - P. 209 - 217.
- Richards G., Ashburner M. Insect hormones and the regulation of genetic activity // Biol. Regulat. and Develop. - 1984. - V. 348. - P. 215 - 253.
- Richards G. The radioimmune assay of ecdysteroid titres in *Drosophila melanogaster* // Molecul. and Cell. Endocrin. - 1981. - V. 21. - P. 181 - 197.
- Skaer R.J. Whytosk S., Emmines J.P. Intranuclear electroforesis of the chromatin of living cells // J. Cell Sci. - 1976. - V. 21. - P. 479 - 496.
- Tosch W. Condensation states of giant chromosomes studied by electron beam X- ray microanalysis // Europ. J. Cell. Biol. - 1977. - V. 15. - P. 335 - 356.
- Харьковский государственный университет , Украина,
Институт общей генетики РАН (Москва), Россия*

O.V.GORENSKAYA, V.Yu.STRASHNYUK, V.G.SHAKHBAZOV, V.T.KAKPAKOV

**DYNAMICS OF BIOELECTRICAL PROPERTIES OF CELL NUCLEI OF DROSOPHILA
MELANOGASTER MEIG. UNDER CONDITIONS OF CULTIVATING IN VITRO AND AFFECTED BY
ECDYSONE**

*The Kharkov State University, Ukraine
The Institute of General Genetics under RAS (Moscow), Russia*

S U M M A R Y

It has been found, that the effect of the ecdysterone hormone results in a considerable increase of the cell nuclei negative charge.