

ЯСІНСЬКИЙ Я.С.^{1✉}, ОМЕЛЬЯНЧУК Л.В.², ЖУК О.В.¹, КОЗЕРЕЦЬКА І.А.¹

¹ ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет ім. Т. Шевченка, Україна, 03022, м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, e-mail: decanat_bf@univ.kiev.ua

² Інститут молекулярної та клітинної біології, СБ РАН,

Росія, 630090, м. Новосибірськ, пр. Ак. Лаврентьєва, 8/2, e-mail: info@mcb.nsc.ru

✉ yasins.yar@gmail.com, (099) 951-17-96

ВИЗНАЧЕННЯ ЛІНІЙ *DROSOPHILA MELANOGASTER*, РЕПОРТЕРНА СИСТЕМА ЯКИХ ЧУТЛИВА ДО НИЗЬКИХ ДОЗ МУТАГЕНА

Наразі велику увагу приділяють вивченню впливу радіації на біологічні системи, але дослідження низькодозових ефектів залишається без достатньої уваги [1]. Існує велика кількість систем визначення впливу мутагенів на біологічні об'єкти, але всі вони мають низку обмежень. Серед поширених методів оцінки мутагенезу тест Еймса з *Salmonella typhimurium* [2], Аліум-тест із використанням насіння цибулі [3], метод доміантних летальних мутацій [4], тести на мутагенез із використанням ссавців [2], FISH-гібридизація [5] та кометний форец [6].

Одним із найбільших обмежень є мінімальна доза мутагена для позитивної відповіді тест-системи [7]. У роботі запропонований шлях підвищення чутливості тест-системи – детекція індукції репараційних систем, які спрацьовують внаслідок виникнення мутацій. Проаналізовані енхансерні пастки з геном бета-галактозидази, яка спрацьовує внаслідок активації генів індукованої репараційної системи різних ліній *D. melanogaster* [8].

Матеріали і методи

Проаналізовано такі лінії дрозофіли, отримані з Bloomington stock center:

- y[1] w[67c23]; P {w[+mC]=lacW} mei-W68 [k05603] par-1 [k05603]/CyO (#10574),
- y [1] w [67c23]; P {w [+ mC] = lacW} mus209 [k00704] / CyO (#10361),
- cn [1] P {ry [+ t7.2] = PZ} mus209 [#02448] / CyO; ry [506] (#11192),
- P {Maе-UAS.6.11} mus81 [GG01201] (#13285).

Опромінення личинок відбувалося за допомогою апарата рентгенівського терапевтичного «РУМ-17» з енергією рентгенівських променів 180 кеВ та експозицією 5 хвилин. Для дослідження

використовувалися личинки третього віку. Після опромінення личинки інкубувалися за нормальних умов протягом 2–24 годин з метою достатнього напрацювання бета-галактозидази активованої репортерної системи.

Гістохімічний стан активності LacZ-репортерної системи визначався таким чином: проводилася екстракція слинних залоз разом із передньою частиною личинки в модифікованому розчині PBS (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄*H₂O, 3 mM NaH₂PO₄*2H₂O), рН якого доводився до 7.2. Препарати фіксувалися 20 хвилин 0,75 % розчином глютарового альдегіду в 0,1 М натрію какоділаті ((GH₃)₂AsO₂Na*3H₂O). Після відмивання фіксатора до препарату додавався синтетичний субстрат бета-галактозидази – 5-бромо-4-хлоро-3-індоіл-бета-D-галактопіранозид (*X-gal*) у складі розчину для забарвлення (10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ * 6H₂O, 0,3 % Triton X-100, 3,1 mM K₄ [FeII (CN)₆], 3,1 mM K₃ [FeIII (CN)₆], 0,2 % *X-gal*). Інкубація з розчином для забарвлення відбувалася за температури 37°C, 12 годин, за відсутності сонячних променів. Після етапу фарбування готувалися постійні препарати слинних залоз на предметних скельцях у розчині з 80 % гліцеролу та 20 % 5-х модифікованого PBS.

Мікроскопічне дослідження проводилося на мікроскопі *Leika DM 2000* з використанням збільшення x400. Знімки були зроблені камерою *Canon PowerShot G5* за допомогою програмного забезпечення *RemoteCapture 2.7.4R2*.

Результати та обговорення

Лінія P{Maе-UAS.6.11} mus81 [GG01201] (13285) не мала P[LacW] репортерного гена та використовувалася як контроль інтактності *X-gal* за відсутності бета-галактозидази. Препарати органів личинок цієї лінії були

незабарвлені як в досліді з опроміненням личинок, так і без опромінення (рис. 1).

Лінія *sn* [1] *P* {*gy* [+ *t7.2*] = *PZ*} *mus209* [#02448] / *SuO*; *gy* [506] (11192) мала репортерний ген, індукція якого залежала від гена ферредоксин-зв'язуючого домену. Була показана підвищена радіочутливість ліній з мутаціями в цьому гені, тому припустили зміну його активації при опроміненні клітин іонізуючою радіацією.

Експресія репортерного гена виявилася стабільно високою як в контрольних умовах, так і в різних умовах досліду (не залежно від терміну інкубації личинок після опромінення). Забарвлення проявлялось як у передбачуваних тканинах, зокрема таких як імагінальні диски (рис. 2 (1)), провентрикулус (рис. 2 (2)), слинні залози (рис. 2 (3)), так і в неочікуваних – дорзальні проторакальні диски (рис. 2 (4)), центральний ганглії (рис. 2 (5)) та кишківник (рис. 2 (6)).

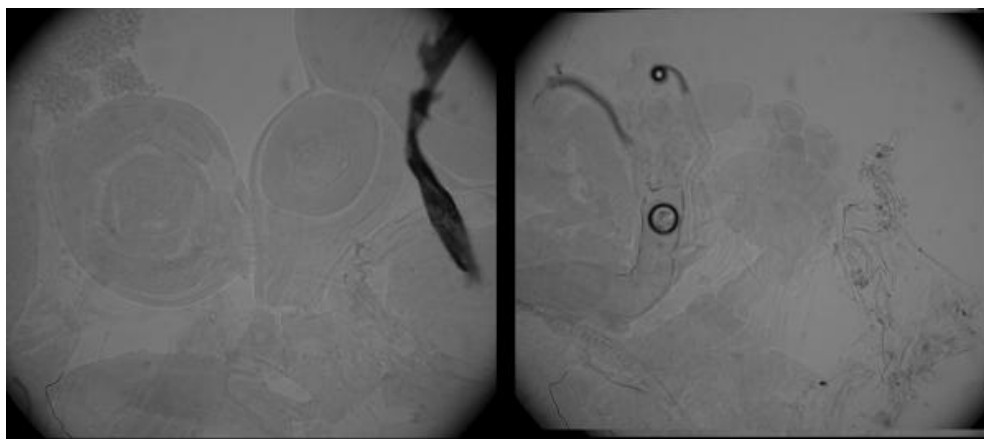


Рис. 1. Знімки цитологічних препаратів тканин личинок *D. melanogaster*, лінія 13285. Зліва – контрольні умови, справа – опромінення дозою 100 р.

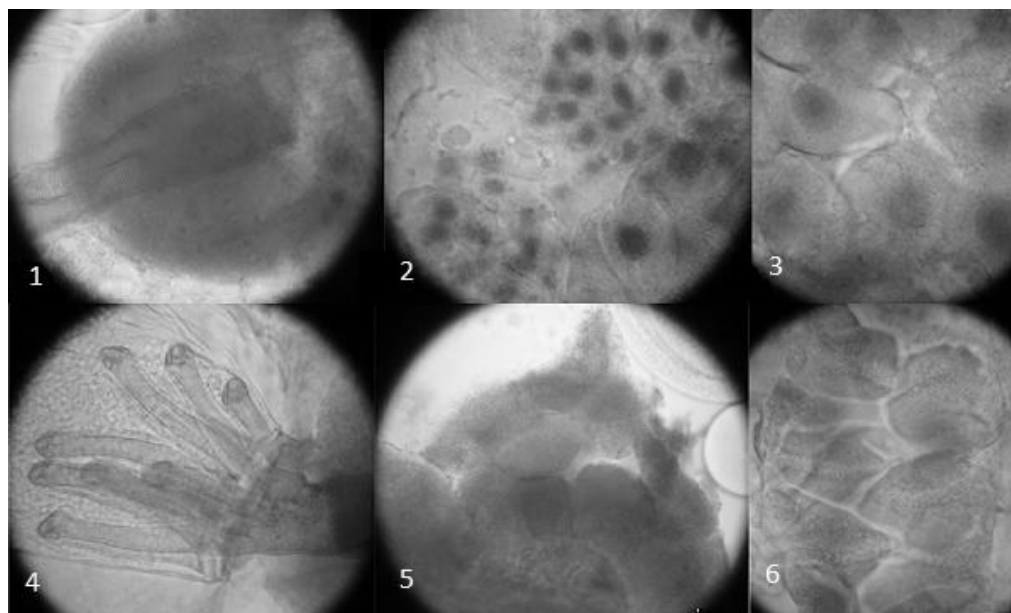


Рис. 2. Знімки цитологічних препаратів тканин личинок третього віку *D. melanogaster*, лінія 11192. Контрольні умови та опромінення дозою 100 р. Інкубація 24 години за кімнатної температури. Збільшення $\times 400$.

У лінії 10574 була використана стандартна репортерна система, але замість *mus209* на енхансерні пастки мав діяти ген *Dmel\mei-W68*. Очікувалася висока експресія репортерного гена. Забарвлення проявлялося в проторакальних дисках (рис. 3 (1)), слинних залозах (рис. 3 (2)), очних імагінальних дисках (рис. 3 (3, 6)) та глотковому апараті (рис. 3 (4, 5)).

У лініях 11192 та 10574 відбулося перетворення X-gal в яскраво-синій продукт як в специфічних тканинах, так і поза ними, як в препаратах личинок, що зазнали радіаційного впливу, так і в препаратах личинок, які інкубувалися в нормальних умовах. Отже, ці лінії недоцільно використовувати для створення тест-системи.

Перші прояви залежного від опромінення забарвлення ядер клітин слинних залоз були помічені в лінії 10361.

У контрольних умовах (без опромінення) забарвлення слинних залоз не відбувалося в жодному з варіантів інкубації личинок, що свідчить про відсутність активації репортерних генів.

Після опромінення дозою в 100 Р та інкубації личинок 24 години за кімнатної температури в слинних залозах деякі ядра клітин почали демонструвати забарвлення в темно-синій колір, що свідчить про наявність бета-галактозидази, активність репортерної системи, а отже, активацію індукованих репараційних систем у клітинах (рис. 4)

Наступне калібрування умов проведення дослідження показало, що оптимальним терміном інкубування личинок за нормальних умов після опромінення є 2 години. Збільшення дози радіації до 200 Р і вище призвело до зафарбовування всіх ядер клітин слинної залози в препараті

У нашому дослідженні індукована репараційна система клітини сприймалася як маркер пошкодження. Транскрипція генів індукованої репараційної системи свідчить, що рівень мутацій у клітині виходить за межі спонтанної, і конститутивно активних елементів репараційної системи недостатньо для підтримання сталості геному. Контроль моменту індукції додаткових репараційних систем дозволяє визначати ймовірність мутації ще до появи стійкої зміни ДНК.

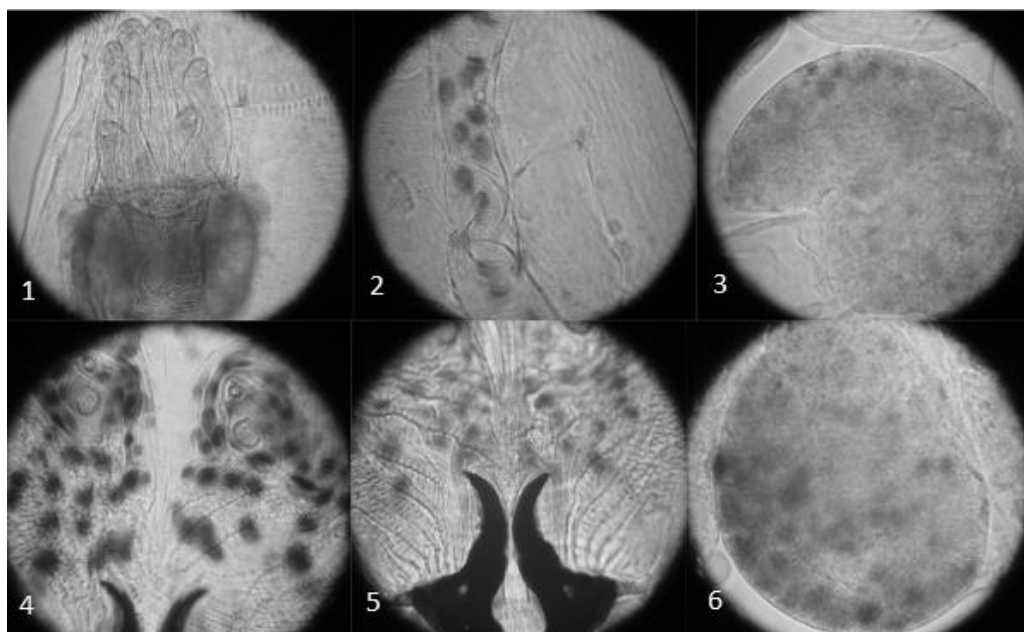


Рис 3. Знімки цитологічних препаратів тканин личинок третього віку *D. melanogaster*, лінія 10574. Контрольні умови та опромінення дозою 100 р. Інкубація 24 години за кімнатної температури. Збільшення х400.

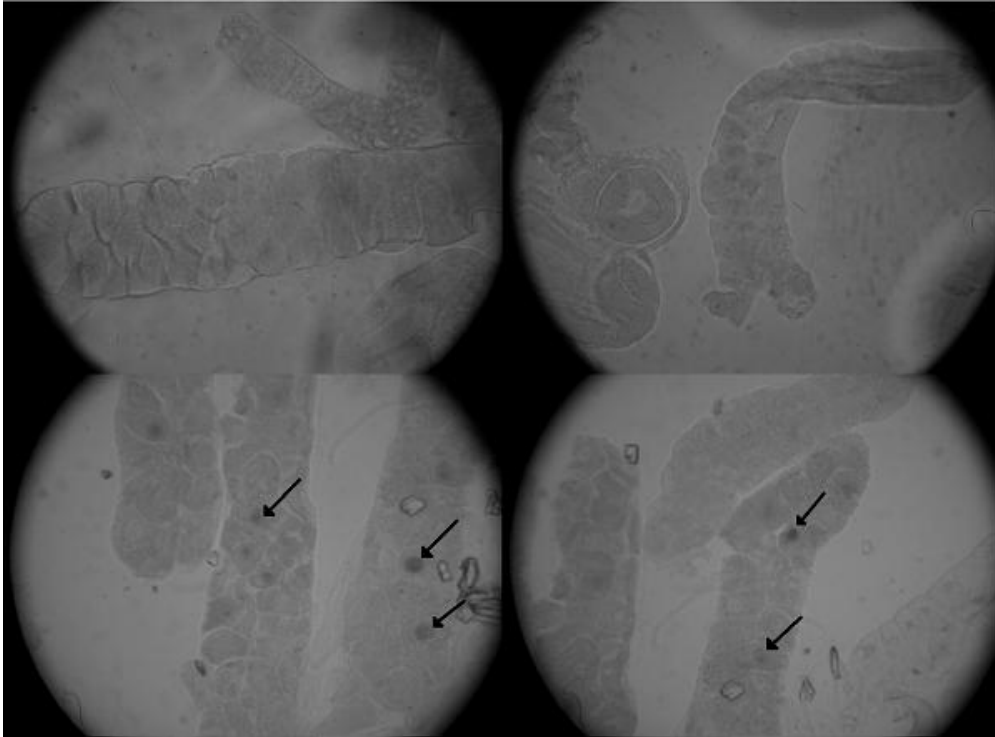


Рис 4. Знімки цитологічних препаратів тканин личинок третього віку *D. melanogaster*, лінія 10361. Інкубація 24 години за кімнатної температури. Збільшення x 400. На верхніх зображеннях препарати личинок за контрольних умов, на нижніх – після опромінення дозою 100 р. Стрілками вказані ядра, у яких безбарвний субстрат X-gal перетворився на яскраво-синій нерозчинний 5,5'-дибромо-4,4'-дихлоро-індіго.

Висновки

Доведена можливість використання репортерної системи *mus209-P[LacW]* для детекції мутагенів. Визначена лінія

D. melanogaster, репортерні гени якої є чутливими до низьких доз мутагену у вигляді іонізуючого опромінення – у [1] w [67c23]; P {w [+ mC] = lacW} *mus209* [k00704] / CyO (#10361).

Література

1. Kakinuma S, Yamauchi K, Amasaki Y, Nishimura M, Shimada Y. Low-dose radiation attenuates chemical mutagenesis *in vivo* // *J Radiat Res.* – 2009. – Sep. – V. 50 (5). – P. 401–405.
2. Seifried H.E., Seifried R.M., Clarke J.J., Junghans T.B., San R.H. A compilation of two decades of mutagenicity test results with the Ames Salmonella typhimurium and L5178Y mouse lymphoma cell mutation assays // *Chem Res Toxicol.* – 2006. – May. – V. 19 (5). – P. 627–644.
3. Leme D.M., Marin-Morales M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application // *Mutat Res.* – 2009. – Jul-Aug. – V. 682 (1). – P. 71–81. doi: 10.1016/j.mrrev.2009.06.002.
4. Anderson D. Genetic and reproductive toxicity of butadiene and isoprene // *Chem Biol Interact.* – 2001. – Jun. – V. 135–136. – P. 65–80.
5. Au W.W., Badary O.A., Heo M.Y. Cytogenetic assays for monitoring populations exposed to environmental mutagens // *Occup Med.* – 2001. – Apr-Jun. – V. 16 (2). – P. 345–357.
6. Frenzilli G., Nigro M., Lyons B.P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments // *Mutat Res.* – 2009. – Jan-Feb. – V. 681 (1). – P. 80–92. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.03.001.
7. Klapacz J., Pottenger L.H., Engelward B.P., Heinen C.D., Johnson G.E., Clewell R.A., Carmichael P.L., Adeleye Y., Andersen M.E. Contributions of DNA repair and damage response pathways to the non-linear genotoxic responses of alkylating agents // *Mutat Res Rev Mutat Res.* – 2016. – Jan-Mar. – P. 767:77–91. doi: 10.1016/j.mrrev.2015.11.001.
8. Faucheux M., Netter S., Bloyer S., Moussa M., Boissonneau E., Lemeunier F., Wegnez M., Théodore L. Advantages of a P-element construct containing MtnA sequences for the identification of patterning and cell determination genes in *Drosophila melanogaster* // *Mol Genet Genomics* – 2001. – Mar. – V. 265 (1). – P. 14–22.

YASINSKIY Y.¹, OMELYANCHUK L.V.², ZHUK O.V.¹, KOZERETSKA I.A.¹

¹ ESC "The Institute of Biology and Medicine", National Taras Shevchenko University of Kyiv, Ukraine, 03022, Kiev, Acad. Glushkov Ave., 2, e-mail: decanat_bf@univ.kiev.ua

² Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Russia, 630090, Novosibirsk, Acad. Lavrentiev Ave., 8/2, e-mail: info@mcb.nsc.ru

CHOICE LINES OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* WITH REPORTER SYSTEM SENSITIVE TO LOW DOSES OF MUTAGENS

Aim. There are many methods of assessment of mutagens, but the effects of low-dose mutagens have been overlooked. In this study we try to select lines of *Drosophila melanogaster* with high-sensitive to mutagen reporter gene. We used *D. melanogaster* lines with enhancer trap P {lacW} which produces beta-galactosidase gene in response to activation induced reparation. **Methods.** Ionizing radiation in dose of 100 roentgens were used as a mutagen. We extracted salivary glands of the third instar of the fruit fly larvae. The sample was fixed with 0.75 % glutaraldehyde and stained by 12-hour incubation with 0.2 % X-Gal at 37°C. Activity of the reporter gene was determined by microscope. **Results.** Two of the three lines are not shown according to the activation of the reporter gene from the resulting dose of ionizing radiation. In line y [1] w [67c23]; P {w [+ mC] = lacW} mus209 [k00704] / CyO (#10361) activation of the reporter gene occurred in some nuclei salivary gland after radiation. **Conclusions.** The reporter gene P{lacW} may be used for the detection of small doses of mutagens. Larvae of line #10361 has reporter gene activation in response to ionizing radiation.

Keywords: mutagenic factors, *Drosophila melanogaster*, LacZ reporter, radiation.