

Регуляция изменчивости генома соматических клеток млекопитающих под влиянием экзогенных биологических факторов

Л. Л. Лукаш

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

Рассмотрены результаты исследований, демонстрирующие, что биологические факторы окружающей среды индуцируют повреждения ДНК, оказывая регуляторно-информационное воздействие на клеточные системы поддержания генетической стабильности: репликацию, рекомбинацию, репарацию. Среди биологических факторов, дестабилизирующих клеточный геном, особо можно выделить мобильные генетические элементы и онкогенные вирусы, вызывающие злокачественную трансформацию клеток. Высказано предположение о том, что смена программ генной экспрессии при дифференцировке стволовых клеток в специализированные сопровождается запуском процессов мутационной и рекомбинационной изменчивости.

Введение. Определенный уровень генетической стабильности и изменчивости закодирован в структуре самого клеточного генома и зависит от слаженной координированной работы генов-мутаторов и антимутаторов, регуляторных генетических элементов, ответственных за протекание основных матричных процессов — репликации, рекомбинации, репарации [1—5].

Поскольку мутации являются источником генетического разнообразия популяций как необходимого условия их развития и адаптации, эволюционно закрепился относительно постоянный темп спонтанного мутирования, характерный для данного вида или типа клеток [1—5]. Этот генетически закрепленный темп мутирования поддерживается защитными системами на клеточном и организменном уровнях. Например, при формировании антителобразующих клеток генетическая нестабильность поддерживается в течение всей жизни организма, но она строго ограничена определенными участками соответствующих генов.

Как правило, спонтанное мутирование у про- и эукариотических организмов характеризуется низкой частотой благодаря эффективной работе

ферментов с корректорскими и репаративными функциями и является наследственно закрепленным признаком. В то же время величина, обратная частоте спонтанных мутаций, по-видимому, отражает уровень генетической стабильности биосистем [1].

Антропогенное загрязнение окружающей среды привело к неконтролируемому естественным отбором накоплению мутаций в геноме человека, что, по некоторым прогнозам, может стать причиной значительного повышения частоты наследственных и соматических болезней, уменьшения длительности жизни и вероятности оставления потомства [6]. В качестве примера можно привести следующие данные: если мутационный темп в СА-повторах разных сублиний фибробластов человека в норме составляет от 3,1 до $45 \cdot 10^{-8}$ на одну клетку на одно клеточное деление, то в условиях мутагенного окружения частота мутаций может повышаться в десятки и сотни раз [7].

Генетическая нестабильность, индуцированная факторами различной природы, рассматривается как основной механизм в сложном многоэтапном процессе злокачественного перерождения соматических клеток человека [2, 8, 9].

Использование генетически модифицирован-

ных продуктов питания в повседневной жизни, а также рекомбинантных ДНК на основе вирусных векторов в качестве новых фармакологических препаратов в генной терапии поставило вопрос о генетических последствиях введения в организм человека чужеродных биологических факторов [10, 11].

Повышенную спонтанную мутабельность объясняют нарушениями: 1) структуры или функций ферментов репликативного комплекса, например, ДНК-полимеразы, корректаз и синтеза предшественников (дисбаланс нормальных предшественников, синтез аномальных аналогов оснований); 2) механизмов рекомбинации; 3) механизмов репарации ДНК [1]. Ферментные комплексы, обеспечивающие реализацию основных матричных процессов, изучены довольно подробно у бактерий и фагов и в гораздо меньшей степени — у высших организмов.

Генетические исследования вирусов, вирусных вакцин, вирусных ДНК, вносящих, вероятно, существенный вклад в естественный мутационный процесс, дали основной материал для разработки представлений о биологическом мутагенезе и его особенностях [12—31]. При изложении материала обзора автор использует термин «биологический» по отношению к мутагенезу в широком смысле, подразумевая под ним различные генетические изменения, вызываемые биогенными факторами. В то же время некоторые авторы под «биологическим» подразумевают только инсерционно-делеционный мутагенез [32], являющийся одним из источников спонтанного мутагенеза.

На основании анализа литературных и собственных данных [12—32] можно высказать некоторые соображения относительно возможных механизмов мутагенного действия биологических факторов на соматические клетки млекопитающих. В отличие от мутагенов другой природы, макромолекулы не могут вызывать физико-химических изменений нуклеотидов, так называемых аддуктов, в трансфицированных клетках. Представляется наиболее вероятным то, что биологические факторы индуцируют мутации, оказывая при этом регуляторно-информационное воздействие на клеточные системы, ответственные за поддержание генетической стабильности [25].

В обзоре рассматривается генетическая изменчивость популяций соматических клеток млекопитающих под влиянием некоторых биологических факторов в контролируемых условиях *in vitro*.

Факторы биологического мутагенеза. К биологическим факторам, влияющим на мутационный процесс, относятся вирусы, нуклеиновые кислоты, мобильные генетические элементы (МГЭ), различ-

ные клеточные метаболиты, гормоны, ферменты, витамины и др. [28]. Среди биологических факторов, дестабилизирующих клеточный геном, особо выделяются МГЭ и онкогенные вирусы. Последние недаром называют «молекулярными роботами», способными дестабилизировать клеточный геном и осуществить полное перепрограммирование клеточного генома в сторону злокачественной трансформации [3, 27]. Перемещения МГЭ, по-видимому, играют существенную роль как в процессах нормального развития и дифференцировки стволовых клеток в специализированные, так и в злокачественном перерождении тканей [32—35].

Отправным предположением наших исследований было то, что ранние гены онкогенного аденовируса, стимулирующие репликацию клеточной ДНК и другие матричные процессы, являются также индуктором мутационных повреждений. Если это так, то индуцированный мутагенез в системе онковирус—клетка зависит от уровня экспрессии трансформирующих вирусных генов, и с помощью одних и тех же факторов можно однонаправленно влиять на мутагенез и злокачественную трансформацию. В 1981 г. в статье, опубликованной в журнале «Somatic Cell Genetics», были обобщены результаты, свидетельствующие в пользу этого предположения [16]. Аналогичные данные получены другими исследователями при работе с онковирусами разных групп, рассмотренные подробно в обзоре [17, 28].

Итак, работами нескольких групп исследователей установлено, что индукция генных мутаций под влиянием вирусов и вирусных ДНК в соматических клетках млекопитающих — явление универсальное [15—21]. При этом обнаружены и существенные отличия по сравнению с закономерностями биологического мутагенеза, установленными на дрозофиле [12—14, 22]. Какие это особенности?

Как правило, в клетках млекопитающих наблюдалось повышение общей мутабельности, т. е. мутации отмечались практически во всех исследуемых генах. Спектр же мутаций был иным: возникали, главным образом, разрывы хромосом и замены пар оснований, что указывало на возможную роль репликации и репарации в наблюдаемом эффекте.

Инсерции экзогенных нуклеотидных последовательностей у мутантов, индуцированных ДНК-содержащими вирусами, совсем не были обнаружены [13, 17, 28, 36]. В случае ретровирусов они не превышали 4 % [37, 38]. Даже у трансгенных животных инсерции составляли лишь 8 % [20, 21].

Инактивация вирусных частиц и вирусной ДНК УФ-светом, повышенной температурой и дру-

гими воздействиями приводила к снижению и потере мутагенного эффекта [39].

Мутагенез в непермиссивных клетках млекопитающих, где отсутствуют условия для размножения вируса, выявлялся в первые сутки после обработки, что свидетельствовало о роли экспрессии ранних вирусных генов [15—18].

Поскольку эксперименты в области мутагенеза с прямым введением отдельных клонированных генов до появления наших работ не проводились, мы разработали и апробировали новый методический подход: конструирование специальных модельных систем экзогенная ДНК—клетка с использованием регуляторных факторов (генетические элементы, опухолевый промотор ТРА, нуклеотидтрифосфаты). Это позволило установить эффект повышения частоты мутантов при введении в клетки ранних оперонов E1A, E1B и E4 аденовируса BAV3, ответственных за его трансформирующие свойства, а также зависимость величины этого эффекта от уровня экспрессии вирусных онкогенов [19, 23—30].

Частота индуцированных мутантов в ранние сроки после трансфекции клеток (неинтегрированные молекулы вирусной ДНК) в 10—20 раз превышала контрольный уровень, что сопоставимо с действием химического супермутагена нитрозогуанидина. Добавление нуклеотидтрифосфатов в систему приводило к снижению частоты мутантов. Повышение уровня экспрессии раннего аденовирусного оперона E1B под влиянием генетических регуляторных элементов и опухолевого промотора ТРА вызывало соответствующее усиление трансформирующего и мутагенного эффектов в системе [19, 23, 25—27]. Эта работа была отмечена в литературе как первая попытка регуляции мутагенеза с помощью трансформирующего гена [40]. Таким образом, можно было рекомендовать рассмотренный подход для изучения механизмов регуляции мутационного процесса в клетках высших организмов [41].

Всего нами изучено более 30 биологических препаратов с разным уровнем активности: среди них аденовирусы, являющиеся прекрасной моделью для изучения регуляции основных матричных процессов, вирусные ДНК, рестрикционные фрагменты вирусного и клеточного генома, линейные и клонированные в составе бактериальных плазмид, некоторые клеточные белки различной структуры и функций [23—31].

Активация клеточных генов и генетических элементов может иметь двоякое значение. С одной стороны, действие клеточных продуктов может усиливать мутагенный эффект вируса, с другой —

ослаблять его. Нам удалось показать, что генетическая активность гена препроинсулина человека, который, согласно литературным данным, индуцируется под влиянием аденовирусной инфекции, зависит от уровня его экспрессии в культивируемых клетках млекопитающих. Введение в фибробласты млекопитающих гена препроинсулина с делецией части промоторной области, ответственной за тканеспецифичность экспрессии, вызывало повышение частоты хромосомных и генных мутаций [25—27, 42, 43]. Мутагенный эффект исследуемого гена препроинсулина был сопоставим с действием активированных клеточных онкогенов [19, 23, 25—27]. Путь индукции мутаций под регуляторным влиянием белка-митогена может реализоваться по схеме, представленной на рис. 1 (см. вклейку).

Введение в клетки рекомбинантной плазмиды *pGins*, в составе которой отсутствие указанных нуклеотидных последовательностей компенсировалось наличием сильных регуляторных элементов вируса гепатита В, снимало мутагенный эффект как на хромосомном, так и на генном уровне [42, 43]. Более того, в этих условиях не реализовался и мутагенный эффект векторной плазмиды *pBR322*, содержащей так называемую «токсическую» нуклеотидную последовательность. Данные, полученные с инсулином, показали, что влияние его на мутагенез принципиально зависит от концентрации белка. При концентрациях порядка 0,2—2,0 мкг/мл может происходить индукция мутаций, при дальнейшем ее увеличении до 10—20 мкг/мл наблюдается снижение частоты мутаций до контрольного уровня. Аналогично действуют, например, тиоловые соединения [44]. Мутагенный эффект этих соединений связан с индукцией нестабильного продукта, перекиси водорода, который при определенных концентрациях проявляет мутагенную активность. Когда концентрация перекиси водорода в клетке превышает определенный уровень, то это соединение быстро расщепляется и наблюдается снижение частоты мутаций.

Наши данные о мутагенной активности трансформирующих генов, введенных в клетки в виде линейных фрагментов или в составе рекомбинантных плазмид, согласуются с результатами, полученными другими авторами с использованием фрагментов генома разных ДНК-содержащих вирусов [45—48] и онкогенов клеточного происхождения [49—51]. Для высокоонкогенного аденовируса человека типа 12 [45, 46] показана характерная для этого вируса индукция хромосомных aberrаций в специфических сайтах под влиянием белка 19K, кодируемого опероном E1B. В случае вируса герпеса простого 1-го типа обнаружена связь индуциро-

ванного мутагенеза с белком, присутствующим в капсидах [48]. Этот мутагенно активный белок кодируется минимальной трансформирующей областью вирусного генома [47]. Аналогичные данные получены при изучении температурочувствительного мутанта вируса SV40, причем в этом случае выявлено наличие мутагенных свойств у вирусспецифического Т-антигена, кодируемого геном А [52]. Не исключено, что мутагенез, индуцированный клеточными онкогенами, также связан с их белковыми продуктами, поскольку инсерции экзогенной ДНК у мутантов не были обнаружены [51].

Вероятно, мутагенез в системе экзогенная ДНК—клетка в ответ на экспрессию введенных генов реализуется при условии, что кодируемые ими продукты активно вмешиваются в работу систем поддержания генетической стабильности через механизмы белково-нуклеинового узнавания [53]. Тогда с помощью одних и тех же регуляторных генетических элементов можно контролировать как экспрессию введенных генов, так и уровень мутаций. Экзогенные нуклеотидные последовательности, не экспрессирующиеся в клеточной системе из-за отсутствия специальных регуляторных элементов или значительного повреждения матричных свойств, например, в результате алкилирования, не проявляют и генетической активности [25—27]. Те последовательности, которые распознаются как «свои» и экспрессируются в клетках, могут изменять метаболизм клеточной ДНК и проявлять генетическую активность (критическим фактором является концентрация биологически активного продукта). И, наконец, «чужеродные» нуклеотидные последовательности, экспрессирующиеся в клетках млекопитающих и влияющие на основные матричные процессы, могут существенно повышать уровень повреждений в клеточной ДНК.

До начала нашей работы уже имелись данные, демонстрирующие регуляторное влияние вирусов и вирусных генов на основные матричные процессы. Именно с этим регуляторным эффектом мы связываем индуцированный мутагенез в системе экзогенная ДНК—клетка, что подтверждается результатами экспериментов по инактивации вирусных генов. Инактивированные вирусные ДНК, способные встраиваться в клеточную ДНК [17] и быть субстратом для репаративных ферментов, тем не менее, не проявляли мутагенной активности. Таким образом, ни интеграция, ни конкуренция с клеточной ДНК за ДНК-связывающие ферменты сами по себе не могли объяснить наблюдаемых мутагенных эффектов. Несмотря на это, ингибирование репаративных ферментов под влиянием молекул экзогенной ДНК могло способствовать становлению

мутаций, индуцированных как внешними, так и внутриклеточными факторами [25—27].

Рассмотрим представления о механизмах мутагенного действия экзогенных нуклеиновых кислот через призму их регуляторного влияния на процессы репликации, рекомбинации и репарации.

Регуляторное влияние на репликацию клеточной ДНК и синтез предшественников. Для всех ДНК- и РНК-геномных онковирусов характерна стимуляция репликации клеточной ДНК [54]. Здесь представлены два наиболее типичных случая мутагенных эффектов, связанных с влиянием на репликативный процесс.

Стимуляция репликации клеточной ДНК под влиянием ранних вирусных генов совпадает во времени с индукцией хромосомных aberrаций и повреждений, вызывающих генные мутации. Онкогенные вирусы выключают контроль размножения клеток, действуя на критическую точку R (restriction) в фазе G₁ клеточного цикла или на продолжительность фазы S [55]. Клетки, трансформированные онковирусами, не способны переходить в состояние покоя (G₀) даже при очень высоких плотностях насыщения. С этого момента клетка приобретает способность к неограниченному размножению, постепенно развиваются и другие признаки злокачественной трансформации.

Стимуляция синтеза клеточной ДНК является одной из многочисленных функций Т-антигенов ДНК-геномных вирусов [55]. Лучше всех в этом смысле изучен продукт гена А вируса SV40. В работах Шапиро и соавт. высказана и экспериментально подтверждена гипотеза о влиянии раннего гена А на мутационный процесс в пермиссивных клетках млекопитающих через посредство соответствующего белкового продукта [17, 53]. В прямых экспериментах было показано мутагенное действие очищенного Т-антигена SV40 [52].

Возникает вопрос, каким образом сокращение периода деления клеток может привести к снижению точности репликации и увеличению вероятности появления мутаций? Известно, что существует гомология между точками начала репликации ДНК-содержащих онкогенных вирусов и репликатором *Alu*-повтора человека [33, 35]. Т-антиген SV40, появляющийся в клетках сразу же после инфицирования, как и другие регуляторные белки такого типа, связывается с точкой начала репликации, вызывая образование разрыва. Методом электронной микроскопии показано, что размер репликона в трансформированных клетках в 2 раза меньше, чем в нормальных. Известно также, что вирусспецифический Т-антиген может стимулировать неравномерную репликацию в местах скопле-

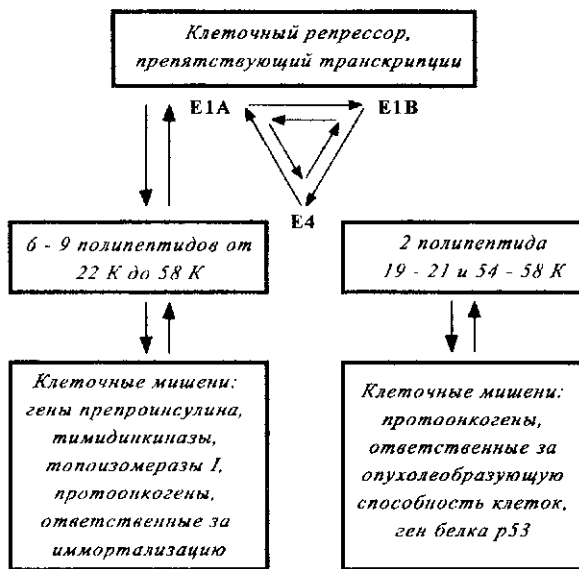


Рис. 2. Взаимодействие ранних оперонов аденовируса между собой и с клеточными генами при запуске злокачественной трансформации клеток

ния *Alu*-повторов, приводящую к амплификации участков клеточной ДНК (по современной терминологии, динамические мутации) [33, 35]. Таким образом, могут создаваться нестабильные участки генома, где с высокой вероятностью возникают мутации. Нами показана индукция генных мутаций при введении в клетки китайского хомячка *Alu*-повтора человека в составе рекомбинантной плазмиды [25—27].

Мутагенная активность самого *Alu*-повтора, который не кодирует белковых продуктов, но является активно экспрессирующимся генетическим элементом, свидетельствует о возможной роли РНК-транскриптов в мутационном процессе с включением механизма обратной транскрипции и транспозиции [3, 32, 35, 55]. Известно, что обратная транскриптаза, как и ДНК-полимераза, способны индуцировать мутагенные эффекты [33, 56].

Ранние опероны аденовирусов взаимодействуют между собой и активируют многие клеточные гены-мишени, ответственные за стимуляцию репликации клеточной ДНК, как это показано на рис. 2. За стимуляцию вхождения клеток в фазу S и злокачественную трансформацию отвечает ранняя область E1 [31, 55—57], которая, по нашим данным, обладает высокой мутагенной активностью. Область E1 состоит из двух оперонов: E1A и E1B. Функция белков — продуктов оперона E1A заключается, главным образом, в иммортализации первичных клеток млекопитающих, а белки, кодируемые E1B, необходимы как для индукции, так и

для поддержания трансформированного состояния клеток [57]. Белковый продукт 58К, кодируемый опероном E1B, непосредственно связывается с клеточным белком p53, имеющим ключевое значение в регуляции клеточного цикла [58]. Роль продуктов раннего оперона E4 в трансформации роста клеток неясна, но известно, что кодируемый им белок связывается с белком 58К и может влиять на его активность [59].

Повышение содержания белка p53 из-за его включения в комплекс с вирусспецифическим белком служит сигналом для перехода клеток в фазу S клеточного цикла. В норме этот белок постоянно синтезируется клетками, но быстро деградирует. Когда в клетках повреждается ДНК, то деградация прекращается, и он начинает функционировать. В том случае, если нарушение ДНК незначительное, индуцируется синтез специального белка, который блокирует действие белков-циклинов и останавливает клеточный цикл. В это время происходит репарация клеточной ДНК. В случае масштабного повреждения структуры клеточной ДНК p53 индуцирует синтез белков, способствующих разрушению клетки путем апоптоза. Таким образом, через посредство белка p53 аденовирус может регулировать переключение клетки на путь репарации или апоптоза [34].

Одно из предположений в отношении механизмов мутагенного действия ДНК-содержащих вирусов состоит в следующем. В клетках с укороченной S-фазой под влиянием T-антигенов инициируется больше репликаторов и соответственно больше одностранных разрывов по сравнению с клетками, имеющими длительный период репликации [25, 55]. Появление большего числа точек начала репликации может привести к повышению частоты ошибок при синтезе ДНК и индукции хромосомных разрывов и генных мутаций. Но существует и другая возможность: снижение точности биосинтеза ДНК из-за ингибирования ферментов с корректорскими функциями под влиянием экзогенной ДНК [60]. Степень влияния на процесс репликации клеточной ДНК зависит от особенностей интегрированного состояния вирусного генома, его экспрессии и микроокружения.

Другой, весьма характерный эффект пульверизации хромосом под действием миксовирусов является результатом стимуляции деления клеток в критической точке G₂-периода. Впервые этот эффект был выявлен при введении в клетки вируса кори [61]. Индукцию пульверизации вызывает очищенный белок капсидов нейроминидаза. Впоследствии было показано, что не только миксовирусы, но и вирусы других групп [18], а также

некоторые химические агенты (блеомицин и цитохалазин В) способны вызывать пульверизацию. Более того, пульверизация хромосом обнаруживается не только в инфицированных клетках, но и полиплоидных эндоредуплицированных ядрах, многоядерных клетках и синцитиях.

Мосолов и соавт. объяснили эффект пульверизации хромосом под действием миксовирусов ферментативным разрушением связей между стартовыми точками репликации и ядерной мембраной. Отрыв репликаонов от мембраны и их независимая конденсация могут обусловить появление в метафазе пульверизованных хромосом. В случае других вирусов этот эффект встречается при цитопатической форме инфекции, но выражен слабее [62].

Таким образом, гипотезы, связывающие мутагенез с нарушением процесса репликации клеточной ДНК под влиянием вирусов, позволяют объяснить наблюдаемые мутагенные эффекты, хотя экспериментальных данных на сегодня недостаточно. Появление дополнительных репликаторов, неравномерная репликация и отрыв репликаторов от ядерной мембраны могут быть причинами повышения частоты генетических повреждений. Вирусы не вызывают каких-то специфических мутаций, не возникающих спонтанным путем. Поэтому вполне естественно предположить, что мутации при «насиленной» стимуляции репликации под влиянием ранних вирусных генов являются результатом односторонних разрывов и ошибок включения.

Фахми и Фахми, рассматривая мутагенное действие вирусов и экзогенных нуклеиновых кислот у дрозофилы, предположили, что экзогенная ДНК или продукты ее деградации угнетают ферменты, участвующие в синтезе нуклеотидов при репликации ДНК [63]. Это ингибирование, по их мнению, должно приводить к потере одного или нескольких нуклеотидов и к появлению видимой рецессивной мутации. При сильном ингибировании синтеза предшественников может происходить потеря большого числа нуклеотидов и блокироваться полимеризация ДНК, что ведет к делеции участка хромосомы и появлению летальной мутации типа *Minute*. Хотя предлагаемая гипотеза удовлетворительно объясняла механизм возникновения леталей у дрозофилы, она все же не могла дать объяснение таким особенностям мутагенного действия экзогенной ДНК у дрозофилы, как локуспецифичность и задержанный мутагенный эффект.

Активность вирусной тимидинкиназы и рибонуклеотидредуктазы вызывает дисбаланс нуклеотидов в клетке [64] и в результате — повышение частоты мутаций [65—67]. В случае мутагенной активности гена тимидинкиназы вируса герпеса

1-го типа, введенного в клетки в составе рекомбинантной плазмиды, можно предположить нарушение механизма, связанного с предшественниками дезоксирибонуклеотидов [66]. Согласно нашим данным, определенный вклад в мутагенез, индуцированный вирусными и клеточными ДНК, вносит энергетический дефицит при чрезмерной интенсификации матричных процессов, который частично может быть устранен при добавлении АТФ и ГТФ [23, 25].

Регуляторное влияние на рекомбинационные процессы. В клетках млекопитающих экзогенная трансформирующая ДНК претерпевает довольно длительную эволюцию во времени [55, 68—74]. Различают следующие стадии в развитии генетической трансформации клеток: 1) временная экспрессия; 2) становление интегрированного состояния, характеризующегося структурной нестабильностью; 3) стабильная трансформация. Описаны случаи, когда происходит инволюция чужеродных нуклеотидных последовательностей: они подвергаются метилированию и элиминируются.

При исследовании динамики мутагенного действия трансформирующей области аденовируса обнаружены два подъема частоты появления мутантов: в ранние сроки после обработки, что соответствует стадии временной экспрессии (неинтегрированные вирусные последовательности), и в более отдаленные сроки, отвечающие периоду структурной нестабильности [23, 25—27]. Отдаленный мутагенный эффект совпадает во времени с максимальным количеством опухолей, индуцированных аденовирусом. Затем происходит снижение мутагенного эффекта, но статистически достоверные различия по частоте мутантов между опытными и контрольными пробами еще долго сохраняются.

В капсидах ДНК-геномных онкогенных вирусов — SV40, полиомы, аденовирусов обнаружены ферменты, способные участвовать в рекомбинации [55]. В клетках через 1—3 дня после заражения вирусами, как раз в то время, когда начинается формирование высокомолекулярных комплексов из экзогенных нуклеотидных последовательностей, возрастает эндонуклеазная и лигазная активность. Активация рекомбинационных событий увеличивает вероятность разрывов клеточной ДНК. В ранние сроки после инфицирования мутагенез может быть связан с активацией вирусспецифических ферментов, необходимых для рекомбинации и других матричных процессов.

Отличие экзогенной ДНК как «живого» мутагена от физических и химических мутагенов состоит в удивительной способности «приживляться», что значительно увеличивает время ее присутствия

в клетке. Процесс своеобразного «изучения и выбраковки» чужеродного генетического материала завершается конструированием новых высокомолекулярных генетических структур, пекеласом, вступающих в рекомбинационные акты с хромосомной ДНК [68]. Иногда на основе пекеласом формируются новые микрохромосомы, которые интегрируются с хозяйскими хромосомами и становятся частью клеточного генома. В некоторых случаях чужеродная ДНК остается автономно реплицирующейся структурой.

Результирующий мутагенный эффект экзогенного мутагена определяется как силой его воздействия, так и возможностями защитных механизмов клетки, особенностями внутриклеточной среды, метаболизма. Очевидно, снижение частоты индуцированных мутантов в клеточных популяциях при отсутствии селективных условий со временем отражает динамику выведения из клеток мутагена и действие репаративных и других защитных механизмов.

Свободные вирусные ДНК фрагментируются и разрушаются довольно быстро [68], что, по-видимому, определяет краткосрочность раннего мутагенного эффекта. Функциональная инактивация (путем метилирования) и выведение встроенных молекул экзогенных ДНК происходят медленнее и во многом определяются их структурно-функциональными особенностями и репаративными возможностями клеточной системы [69, 70]. Снижение уровня индуцированных мутантов в отдаленные сроки после трансфекции (4—7 недель), по-видимому, отражает динамику инактивации и выведения встроенных вирусных нуклеотидных последовательностей и гибель мутабельных клеток, «перегруженных» мутациями по различным генам. Известно, что со временем в клетках остается все меньше и меньше вирусных нуклеотидных последовательностей, вначале элиминируются фрагменты поздней, а затем и ранней областей генома онковирусов [71—73]. В некоторых злокачественно трансформированных клетках полностью отсутствуют вирусные нуклеотидные последовательности [74]. Аналогичные эффекты наблюдаются и на трансгенных животных [20—22, 67].

Представляется обоснованным сравнение фрагментов экзогенных ДНК, введенных в клетки тем или иным методом, с мобильными генетическими элементами, открытыми Мак-Клинтон в 1956 году и интенсивно исследуемыми в последнее десятилетие. Хесин считал, что практически любая нуклеотидная последовательность, окруженная ДНК-повторами, может стать мобильным элементом [3]. При этом следует учитывать, что различные типы

МГЭ могут привноситься экзогенной ДНК в клеточную систему, а также активироваться в клеточном геноме в результате трансфекции и геномного стресса [32—35]. Мутации в нестабильных клеточных системах могут возникать не только в сайтах встраивания МГЭ, но и в других сайтах под влиянием ферментов, обеспечивающих транспозиции [3, 32]. Для ответа на этот вопрос необходимо проведение специальных исследований.

Возможность индукции мутаций при встраивании чужеродных нуклеотидных последовательностей в клеточный геном была подтверждена как в экспериментах на дрозофиле, так и на мышах *in vivo* [20—22]. В цикле работ Газаряна и соавт. на трансгенных мышах с рекомбинантной конструкцией *pBR322*, содержащей провирус саркомы Рауса, показано встраивание в нескольких случаях плазмидной нуклеотидной последовательности в геном мыши [20, 21]. Но не всегда выявлялась прямая связь инсерции с мутацией. Кроме того, потеря вирусных нуклеотидных последовательностей не приводила к изменению мутантного фенотипа. Авторы также пришли к выводу о том, что трансфекция индуцирует транспозиции клеточных МГЭ, вызывающие локуспецифические мутации.

Клеточные системы отвечают транспозициями МГЭ на изменение внешних условий. Такие эффекты зарегистрированы в естественных популяциях и в экспериментальных условиях под влиянием стрессовых воздействий [12—14]. Но остается открытым вопрос, почему в ответ на введение различных природных и синтетических полинуклеотидов в половые клетки дрозофилы возникают специфические мутации в определенных локусах? Можно предположить, что после введения экзогенных нуклеотидных последовательностей разной структуры и функций индуцируются транспозиции различных мобильных элементов в соответствующие чувствительные сайты клеточной ДНК. Так, на дрозофиле показано, что некоторые видимые мутации связаны с транспозицией нескольких МГЭ класса *copia* [13].

При изучении биологического мутагенеза на соматических клетках млекопитающих локуспецифичность не выявлена. Но установлено наличие областей на хромосомах (в местах сосредоточения *Alu*-повторов), чувствительных к действию мутагенов различной природы [32, 33, 35]. Анализ всей совокупности данных указывает на то, что *Alu*-элементы могут выступать в качестве «горячих точек» рекомбинационных и мутационных событий, а также медиаторов гомологических и негомологических рекомбинаций. С этой точки зрения выбранный нами для исследований ген *hprt*, имеющий 49

копий *Alu*-элемента в своем составе, размещенных в сенс- и антисенс-направлениях, является перспективным модельным локусом для мутационных исследований [78].

Большинство исследователей склоняются к тому, что к функциям Т-антигенов ДНК-геномных вирусов относится не только стимуляция синтеза вирусной и клеточной ДНК, но и содействие интеграции вирусной ДНК в клеточный геном [55]. Предполагают, что полная трансформация клеток наступает в том случае, когда ген А вируса SV40, кодирующий Т-антиген, встраивается в участки клеточного генома, активные в G₁-периоде клеточного цикла. В таких клетках ген А максимально активен, и Т-антиген, синтез которого зависит от фаз клеточного цикла, продуцируется наиболее эффективно. Увеличение синтеза начинается в G₁-, нарастает в S- и достигает максимума в G₂-фазе. Поскольку Т-антиген вызывает образование множественных разрывов, это в свою очередь увеличивает вероятность интеграции.

Способность Т-антигена узнавать нуклеотидную последовательность *Alu*-повтора, вероятно, определяет преимущественное образование разрывов и максимальное включение вирусной ДНК в местах перехода эухроматина в гетерохроматин, где сосредоточены эти генетические элементы [35]. Здесь же обнаруживается большинство спонтанных и индуцированных хромосомных aberrаций [28], а также локализуются точки синапсиса хромосом при митотическом кроссинговере [35]. Так что мутагенез, индуцированный ДНК-геномными онковирусами, может быть связан со стимуляцией не только репликации клеточной ДНК, но и рекомбинационных событий под влиянием ранних вирусных генов. При этом следует учитывать, что собственно интеграция вирусных нуклеотидных последовательностей в клеточную ДНК начинается спустя несколько дней после реализации их сложных структурных преобразований.

Молекулярные механизмы интеграции ДНК-геномных онкогенных вирусов в хромосомы млекопитающих изучены недостаточно. Не установлено, какие конкретно ферментные системы участвуют в этом процессе, происходит ли включение вирусных геномов в клеточную ДНК в момент ее синтеза с помощью ферментов репликативного комплекса или рекомбинационным путем с помощью ферментов, осуществляющих разрывы и сшивки интактной ДНК.

При изучении интеграции адено- и паповавирусов было показано, что их геномы встраиваются в обе нити клеточной ДНК — как во вновь синтезированную, так и в матричную [55]. Этот процесс

в ряде случаев может происходить по типу гомологичной рекомбинации с разрезанием нитей клеточной ДНК и последующей инсерцией экзогенных нуклеотидных последовательностей. В случае аденовирусов интеграция осуществляется с помощью коротких участков гомологии между вирусными и клеточными последовательностями по типу сайт-специфической рекомбинации [55, 69—74], но детали этого процесса не изучены. Встраивание может также происходить с помощью негомологичной рекомбинации, обеспечивающей интеграцию МГЭ (для ретровирусов это основной механизм) [3, 32]. В потомстве опухолевых и трансформированных клеток, полученных под действием онковирусов, выявлены перестройки, возникающие в результате последовательных рекомбинационных актов при становлении интегрированного состояния вирусных ДНК [55, 74].

Недостаток знаний о количественных закономерностях и механизмах этих процессов создает впечатление, что взаимоотношения между экзогенной и клеточной ДНК зависят от случайных и в значительной степени непредсказуемых событий. В каких-то случаях это может привести к стабильному изменению и даже перепрограммированию всего клеточного генома, в других, — к полной элиминации чужеродных нуклеотидных последовательностей. В действительности же эволюция экзогенного генетического материала в клетке зависит от конкретных параметров, характеризующих как воздействующий фактор, так и клеточную систему. Степень и длительность дестабилизирующего действия экзогенной ДНК на геном дрозифилы и млекопитающих, вероятно, различается и зависит от особенностей структурно-функциональной организации объекта.

На основании полученных данных было проведено математическое моделирование индуцированного мутагенеза, которое помогло выделить факторы, детерминирующие мутационный процесс в системе аденовирус—клетка [75—77].

Мутагенный эффект ДНК-содержащих онковирусов в ранние сроки после инфицирования, скорее всего, связан не с самим встраиванием вирусных нуклеотидных последовательностей, а с активацией ферментов, осуществляющих репликацию, рекомбинацию и репарацию. А это, в свою очередь, может активировать клеточные гены, регуляторные последовательности, МГЭ.

Регуляторное влияние на репаративные процессы. Становление мутаций, индуцированных агентом любой природы, происходит через репаративные механизмы клетки [1]. Существуют три этапа закрепления мутаций: 1) образование пер-

вичных молекулярных повреждений в хромосоме; 2) возникновение предмутационного состояния (потенциального изменения) в результате изменения структуры ДНК; 3) фиксация потенциального изменения в мутацию.

В обзоре [79] проанализированы все возможные варианты регуляторного влияния вирусов на репарацию повреждений: ингибирование, стимуляция и отсутствие эффекта. В действительности все гораздо сложнее, так как вирус может влиять на одну репаративную систему, исправляющую какой-то определенный тип повреждений, и никак не влиять на другую. Особенности вирусов, с одной стороны, и тип инфекционного процесса, — с другой, могут влиять на способность клетки к репарации повреждений ДНК, индуцированных биологическими факторами.

Был проведен четкий водораздел между инфекционными и онкогенными вирусами: первые либо стимулировали, либо не действовали на процесс УФ-репарации, вторые вызывали ингибирование эксцизионной системы в опытах с УФ-облучением и мутагенами УФ-типа. Ингибирование эксцизионной репарации под влиянием онковирусов отмечали во всех типах клеточных систем, особенно в комбинации с другими мутагенами, например, нитрозогуанидином. Это приводило к усилению мутагенных эффектов на хромосомном и геномных уровнях и злокачественной трансформации. На первых этапах превращения нормальных клеток в злокачественные (в течение первых 15—20 дней после обработки) всегда наблюдалось ингибирование репаративной активности независимо от этиологии заболевания. Но затем (скорее всего, компенсаторно) происходила активация «ошибочной» пострепликативной репарации под влиянием онковирусов и канцерогенов, с которой связана малигнизация клеток.

Засухина и соавт. считают, что вирусы подобно интерферону можно рассматривать как биологические регуляторы репаративной активности клеток [80]. Изучение влияния вирусов на репарацию приобретает особое значение, так как вирусы постоянно циркулируют в окружающей среде и в зависимости от генетических особенностей клеток могут вызывать различные типы инфекционного процесса, изменяя таким образом их чувствительность к различным экзогенным воздействиям. С помощью воздействия на клетки тех или иных вирусов можно «выключать» или «включать» отдельные этапы репарации, имитируя тем самым фенотипический дефект соответствующих генов. Регуляция репаративной активности клеток с помощью биологических факторов является эффек-

тивным подходом к исследованию механизмов повышения устойчивости клеток к экзогенным воздействиям разной природы.

Мы предположили, что присутствие в клетках молекул экзогенной ДНК-матрицы вирусного или клеточного происхождения отвлекает каким-то образом значительную часть корректирующих и репаративных ферментов и тем самым способствует становлению индуцированных мутаций. Наше внимание привлек уникальный репаративный фермент алкилгуанинтрансфераза (АГТ), восстанавливающая наиболее мутагенно опасное повреждение (O^6 -метилгуанин), индуцируемое алкилирующим агентом нитрозогуанидином [81, 82].

Нам удалось показать, что в присутствии вирусных частиц, активной или инактивированной алкилированием двунитчатой ДНК, которая, по данным Пэга и соавт., является хорошим субстратом для фермента АГТ [81, 82], происходит значительное усиление мутагенного эффекта нитрозогуанидина в клетках млекопитающих [25]. Одно лишь модифицированное основание O^6 -метилгуанин практически полностью ингибирует АГТ и вызывает максимальное повышение частоты мутантов по локусу *hprt* [25, 83—85]. По нашим данным, регуляция спонтанного и индуцированного алкилирующим агентом мутагенеза возможна при использовании белков-митогенов, которые активируют ферментные системы, осуществляющие синтез ДНК и ее репарацию [86]. Молекулярный анализ мутаций, индуцированных нитрозогуанидином в условиях активной и подавленной репаративной активности, позволил выявить особенности работы фермента АГТ, что принципиально отличает его от ферментов эксцизионной репарации [87].

Все вышесказанное о способности алкилированной ДНК и O^6 -бензилгуанина ингибировать специфический репаративный фермент АГТ открывают перспективу изучения механизмов репарации повреждений при введении в клетки экзогенных нуклеотидных последовательностей, несущих специфические первичные повреждения, или белков с регуляторными функциями.

Экзогенные ДНК вирусного и клеточного происхождения являются распространенными биологическими факторами, обладающими матричными свойствами и оказывающими регуляторно-информационное влияние на мутационный процесс через системы поддержания генетической стабильности. То есть путь индукции мутаций вирусными онкогенами принципиально тот же, что и при спонтанном мутагенезе, но с участием чужеродного генетического материала.

Подводя итоги, можно выделить три основных

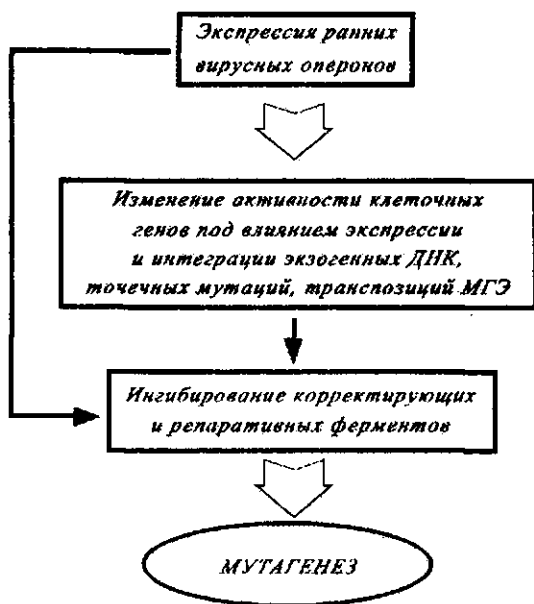


Рис. 3. Факторы биологического мутагенеза при смене программ генной экспрессии в ходе злокачественной трансформации клеток под влиянием ранних оперонов аденовируса

фактора дестабилизации в системе онковирус—клетка (рис. 3). Первичным фактором дестабилизации является экспрессия ранних регуляторных генов, ответственных за стимуляцию и злокачественную трансформацию клеток. Вторичный фактор дестабилизации — это перепрограммирование клеточного генома (изменение активности и мутации клеточных генов и регуляторных элементов, транспозиции МГЭ) под влиянием экспрессии вирусных генов и интеграции их с клеточной ДНК. Дополнительным фактором, повышающим вероятность проявления мутаций, служит отвлечение репаративных и других ДНК-связывающих ферментов на взаимодействие с молекулами генетической матрицы экзогенного происхождения.

Как уже отмечалось, в процессе злокачественной трансформации под влиянием онковирусов и химических канцерогенов всегда имеет место нарастание генетической нестабильности клеточных популяций [2, 3, 8, 9]. Однако в большинстве случаев мутации сами по себе не определяют конечного результата, а лишь обеспечивают генетическое разнообразие для отбора на клеточно-популяционном и организменном уровнях. Очевидно, все решает сбой генетического программирования или запуск неверной программы генной экспрессии, например, индуцированной вирусом, в клеточных популяциях организма в данное время и в данном месте, что приводит к появлению бесконтрольно делящихся измененных клеток.

Можно предположить, что смена программ генной экспрессии, как правило, сопровождается запуском регулируемых процессов мутационной и рекомбинационной изменчивости, в частности, как это происходит при образовании антителобразующих клеток [88].

Тогда генетические повреждения могут индуцироваться и при перепрограммировании клеток, наблюдающемся при дифференцировке стволовых клеток в специализированные ткани под влиянием соответствующих регуляторных сигналов, таких как ростовые факторы, цитокины и др. Ведь при этом происходит резкая смена программ генной экспрессии, что приводит к увеличению генетической вариабельности дифференцирующихся клеточных популяций и возникновению ошибок, в том числе и на генетическом уровне, а также к выбраковке клеток, не соответствующих новой программе, путем апоптоза. При дифференцировке клеточных популяций отмечаются транспозиции МГЭ [3, 32—35]. В пользу этого свидетельствуют единичные пока данные о том, что стволовые клетки (эмбриональные и региональные) гораздо более устойчивы к воздействию внешних мутагенов по сравнению с дифференцированными и мутируют с более низкой частотой [88, 89]. Эти работы открывают новые страницы в исследовании регуляции мутационного процесса и понимании его истинной роли в развитии и адаптации организма в быстро меняющихся условиях современного мира.

L. L. Lukash

The regulation of a variability of somatic mammalian cell genome under the influence of exogeneous biological factors

Summary

The investigations are reviewed here demonstrate that biological factors of the environment induce mutations through the regulatoric informational influence on cellular systems maintaining genetic stability: replication, recombination, reparation. Among the biological factors which become the genome unstable mobile genetic elements and oncogenic viruses which induce tumorigenic transformation are distinguished. It is supposed that change of the programs of gene expression during the differentiation of stem cells to specialized ones is accompanied by the inclusion the mutation and the recombination processes.

Л. Л. Лукаш

Регуляція мінливості геному соматичних клітин ссавців під впливом екзогенних біологічних чинників

Резюме

Проаналізовано результати досліджень, які демонструють, що біологічні чинники довкілля здатні індукувати мутації, здійснюючи при цьому регуляторно-інформаційний вплив на клітинні системи підтримання генетичної стабільності: ре-

плікацію, рекомбінацію, репарацію. Серед біологічних факторів, що дестабілізують клітинний геном, особливо виокремлюються мобільні генетичні елементи та онкогенні віруси, які спричиняють злоякісну трансформацію клітин. Висловлено припущення стосовно того, що зміна програм генної експресії при диференціюванні стовбурових клітин у спеціалізовані супроводжується запуском процесів мутаційної і рекомбінаційної мінливості.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Жестяников В. Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение.—Ленинград: Наука, 1979.—286 с.
2. Шапиро Н. И. Генетические механизмы канцерогенеза // Вестн. АН СССР.—1981.—№ 12.—С. 69—75.
3. Хесин Р. Б. Непостоянство генома.—М.: Наука, 1984.—472 с.
4. Алекперов У. К. Антимутагенез.—М.: Наука, 1984.—100 с.
5. Дубинин Н. П. Новое в современной генетике.—М.: Наука, 1986.—206 с.
6. Бариляк І. Р., Гаврилюк Ю. Й. Навколишнє середовище і генетика // Довкілля та здоров'я.—1996.—№ 1.—С. 30—33.
7. Boyer J. C., Farber R. A. Mutation rate of a microsatellite sequence in normal human fibroblasts // *Cancer Res.*—1998.—58, N 17.—Р. 3946—3949.
8. Поліщук Л. З., Налєскіна Л. А., Бучинська Л. Г., Несіна І. П. Роль генетичної нестабільності у розвитку злоякісних новоутворень // Шляхи та перспективи розвитку експериментальної онкології в Україні.—Київ: ДІА, 2001.—С. 35—45.
9. Кордюм В. А. Опухоль — как она видится сегодня с позиций молекулярной генетики // Биополимеры і клітина.—2001.—17, №2.—С. 109—139.
10. Kordyum V. F., Frolkiv V. V., Lukash L. L., Shulzhenko V. N., Shpilevaya S. P., Kostetsky I. E., Titok T. G., Varsanova I. S., Likhacheva L. I., Irodov D. M. Gene therapy of mass pathologies // Биополимеры и клетка.—1993.—27, № 4.—С. 63—104.
11. Глазко В. И. Генетически модифицированные организмы: от бактерий до человека.—Київ: Изд-во Мин-ва образования и науки Украины, 2002.—210 с.
12. Гершензон С. М., Александров Ю. Н., Малюта С. С. Мутагенное действие ДНК и вирусов у дрозофилы.—Київ: Наук. думка, 1975.—160 с.
13. Gershenson S. M., Alexandrov Yu. N. Molecular mechanisms of mutagenicity of DNA and other natural and synthetic polynucleotides.—Київ: Nauk. Dumka, 1997.—262 p.
14. Гершензон С. М., Александров Ю. М., Малюта С. С., Бужиевська Т. І., Карпова І. С., Ларченко К. А. Мутагенна дія нуклеїнових кислот і вірусів.—Київ: Знання, 1999.—29 с.
15. Лукаш Л. Л., Бужиевская Т. И., Варшавер Н. Б., Шапиро Н. И. Индукция аденовирусом генных мутаций в клетках млекопитающих // Докл. АН СССР.—1979.—245, № 4.—С. 970—973.
16. Lukash L. L., Buzhievskaya T. I., Varshaver N. B., Shapiro N. I. Oncogenic adenovirus as mutagen for Chinese hamster cells *in vitro* // *Somat. Cell. Genet.*—1981.—7, N 2.—Р. 133—146.
17. Shapiro N. I., Marshak M. I., Varshaver N. B. Mutagenic effects of DNA-containing oncogenic viruses and malignant transformation of mammalian cells // *Cancer Genet. and Cytogenet.*—1984.—13, N 1.—Р. 167—179.
18. Бужиевская Т. И. Вирусиндуцированный мутагенез в клетках млекопитающих.—Київ: Наук. думка, 1984.—134 с.
19. Lukash L. L., Varshaver N. B., Buzhievskaya T. I., Shapiro N. I. Oncogene BAV3 as a mutagen // *J. Cell. Sci.*—1985.—78.—Р. 97—103.
20. Газарян К. Г. Микроинъекции генов в зиготы и эмбрионы: интеграция в геном и генетические эффекты // Успехи соврем. генетики.—1985.—№ 13.—С. 75—88.
21. Тарантул В. З., Кузнецова Е. Д., Газарян К. Г. Характеристика участков генома трансгенных животных, прилегающих к интегрированным последовательностям чужеродной ДНК // Молекуляр. биология.—1989.—23, № 4.—С. 1036—1040.
22. Набировичи С. Д., Габитова А. Б., Бегетова Т. С., Газарян К. Г. Индукция нестабильных мутаций у *Drosophila melanogaster* микроинъекцией ДНК онкогенных вирусов в полярную плазму эмбрионов. Малигнизующий эффект онковирусных ДНК // Молекуляр. биология.—1991.—24, № 5.—С. 783—789.
23. Lukash L. L., Buzhievskaya T. I. Role of early viral genes in mutagenesis // *Biotechnology. Current progress.*—Lancaster: Technomic Publ. Co. Inc., 1991.—Р. 119—132.
24. Лукаш Л. Л. Мутагенез і антимутагенез — протилежно спрямовані процеси, що визначають рівень генетичної мінливості та стабільності // Биополимеры и клетка.—1998.—14, № 6.—С. 500—511.
25. Лукаш Л. Л. Вплив екзогенних вірусів і ДНК на спонтанний та індукований мутагенез в соматичних клітинах ссавців: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук.—Київ, 1999.—34 с.
26. Лукаш Л. Л. Регуляція мутаційного процесу під впливом екзогенних нуклеотидних послідовностей в соматичних клітинах ссавців // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть.—Київ: Логос, 2001.—Т. 1.—С. 120—130.
27. Лукаш Л. Л. Дестабилізація клітинного геному під впливом експресії раних регуляторних генів онковирусів // Цитология и генетика.—2002.—36, № 2.—С. 68—80.
28. Лукаш Л. Л. Биологические мутагены: их влияние на стабильность эукариотических клеточных систем // Вісн. укр. тов-ва генетиків та селекціонерів.—2003.—№ 1.—С. 62—81.
29. Лукаш Л. Л., Коваленко О. А., Підпала О. В. Влияние фрагментов ДНК аденовируса, содержащих ранние регуляторные гены, на мутационный процесс в клетках млекопитающих *in vitro* // Фактори експерим. еволюції організмів.—Київ: Аграрна наука, 2003.—С. 85—90.
30. Мацевич Л. Л., Коваленко О. А., Сухорада О. М., Лукаш Л. Л. Дослідження впливу білків на генетичну мінливість клітинних популяцій *in vitro* // Фактори експерим. еволюції організмів.—Київ: Аграрна наука, 2003.—С. 91—97.
31. Лукаш Л. Л., Коваленко О. А. Картирование трансформирующей и мутагенной активности аденовирусов // Вісн. укр. тов-ва генетиків та селекціонерів.—2004.—№ 2.—С. 56—68.
32. Акифьев А. П., Худолий Г. А. Мутагенез и генетический гомеостаз у высших организмов // Вестн. РАМН.—1993.—№ 1.—С. 3—9.
33. Шахмурадов И. А., Капитонов В. В., Колчанов Н. А., Омелянчук Л. В. Эволюция повторов *Alu*: динамика распространения в геноме // Генетика.—1989.—25, № 9.—С. 1682—1689.
34. Фильченков А. А., Стойка Р. С. Апоптоз (физиологическая гибель клетки).—Київ: ВИТУС, 1995.—24 с.
35. Лукаш Л. Л., Швачко Л. П., Костецкая Е. В. Мобильные генетические элементы в процессах мутагенеза, рекомбинации и злокачественной трансформации клеток человека // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 2.—С. 7—19.
36. Pilon L., Langelier L., Royal A. Herpes simplex virus type 2

- mutagenesis: characterization of mutants induced at the *hprt* locus of nonpermissive XC cells // *Mol. and Cell. Biol.*—1986.—6, N 8.—P. 2977—2983.
37. Jenkins N., Copeland N., Taylor B., Lee B. Dilute(d) coat colour mutation of DBA/2J mice is associated with the site of integration of an ecotropic MuLV genome // *Nature.*—1981.—293.—P. 370—374.
 38. Varmus H. E., Quintrell N., Ortiz S. Retroviruses as mutagens: insertion and excision of a nontransforming provirus after expression of a resident transforming provirus // *Cell.*—1981.—25, N 1.—P. 23—26.
 39. Schlehofer I. R., zur Hausen H. Induction of mutations within the host genome by partially inactivated Herpes simplex virus type 1 // *Virology.*—1982.—122, N 3.—P. 471—475.
 40. Sassone-Corsi P. Mutagenic activity of transforming genes // *Trends Genet.*—1986.—N 1.—P. 6.
 41. Manuilova E. S., Lukash L. L., Shapiro N. I. The action of the tumour promoter, TPA, on mutagenesis induced by different agents (UV light, chemical and viral mutagenesis) // *Mutat. Res.*—1987.—179.—P. 231—236.
 42. Лукаш Л. Л., Подольская С. В., Евсеев А. А., Неборачко Л. Н., Варзанова И. С., Кочубей Т. П. Рекомбинантная ДНК *pCins*, содержащая экспрессирующий ген препроинсулина человека, не проявляет мутагенной активности // *Биополимеры и клетка.*—1999.—15, № 2.—С. 28—37.
 43. Евсеев А. О., Лукаш Л. Л., Кочубей Т. П., Сухорада О. М., Рубан Т. О., Топорова О. К. Генетичні ефекти рекомбінантних ДНК, що містять ген препроінсуліну людини // *Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть.*—Київ: Логос, 2001.—Т. 1.—С. 410—417.
 44. Ранчалис В. П., Бальчунге Л. С. «Парадоксальное» действие тиоловых соединений // *Вестн. РАМН.*—1993.—№ 1.—С. 44—49.
 45. Durnam D. M., Smith P. P., Menninger Y. C., McDougall J. K. The E1 region of human adenovirus type 12 determines the sites of virally induced chromosomal damage // *Cancer Cells.*—1986.—4.—P. 349—354.
 46. Schramayr S., Caporossi D., Mak I. Chromosomal damage induced by human adenovirus type 12 requires expression of the E1B 55-kilodalton viral protein // *J. Virol.*—1990.—64, N 5.—P. 2090—2095.
 47. Shillitoe E. J., Zhang S., Wang G., Wang C. B. Functions and proteins of herpes simplex virus type-1 that are involved in raising the mutation frequency of infected cells // *Virus Res.*—1993.—27, N 3.—P. 239—251.
 48. Das C. M., Zhang S., Shillitoe E. J. Expression of the mutagenic peptide of herpes simplex virus type 1 in virus infected cells // *Virus Res.*—1994.—34, N 2.—P. 97—114.
 49. Baron H. M., Bobrisheva I. V., Varshaver N. B. The activated human *c-Ha-ras-1* oncogene as a mutagen // *Cancer Genet. and Cytogenet.*—1992.—62.—P. 15—20.
 50. Бобрышева И. В., Барон Е. М., Варшавер Н. Б. Плазмида *pSVc-тус-1* индуцирует генные мутации и хромосомные aberrации в культивируемых клетках китайского хомячка // *Цитология и генетика.*—1993.—27, № 4.—P. 51—56.
 51. Бобрышева И. В., Варшавер Н. Б. Характеристика мутантов, индуцированных онкогеном *c-Ha-ras1*, и природа мутагенного действия онкогена // *Генетика.*—1995.—31, № 12.—С. 1598—1604.
 52. Дризе О. В., Сокова О. И., Никашина Е. Б., Шлякневич М. А., Шапот В. С. Возможная роль Т-антигена в индукции хромосомных aberrаций в клетках, трансформированных вирусом // *Цитология.*—1985.—27, № 1.—С. 76—82.
 53. Travers A. DNA-protein interactions.—Suffolk: St. Edmundsbury press, 1993.—180 p.
 54. Мойер М. П., Мойер Р. С. Вирус-индуцированная трансформация // *Трансформированная клетка.*—Киев: Наук. думка, 1985.—С. 176—220.
 55. Агеенко А. И. Онкогены и канцерогенез.—М.: Медицина, 1986.—256 с.
 56. Hoffman J. S., Pillaire M. J., Garcia-Estefania D. In vitro bypass replication of the cisplatin-d(GpG) lesion by calf thymus DNA polymerase beta and human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase is highly mutagenic // *J. Biochem. Chem.*—1996.—271, N 26.—P. 15386—15392.
 57. Levin A. J. The adenovirus early proteins // *Curr. Top. Microbiol. and Immunol.*—1984.—110.—P. 143—167.
 58. Zhao L. Y., Colosimo A. L., Liu Y., Wan Y., Liao D. Adenovirus E1B 55-kilodalton oncoprotein binds to Daxx and eliminates enhancement of p53-dependent transcription by Daxx // *J. Virol.*—2003.—77, N 21.—P. 11809—11821.
 59. Дяченко Н. С., Нас И., Беренчи Д., Носач Л. Н., Ванцак Н. П., Тарасишин Л. А., Адам Е. Аденовирус, клетка, организм.—Киев: Наук. думка, 1988.—232 с.
 60. Крутяков В. М. Точность биосинтеза ДНК: корректорская роль автономных 3-5-эндонуклеаз млекопитающих // *Усп. соврем. биологии.*—1997.—117, № 6.—С. 660—667.
 61. Norrby E., Levan A., Nicols W. W. The correlation between the chromosome pulverization effect and other biologic activities of measles virus preparations // *Exp. Cell. Res.*—1966.—41, N 3.—P. 283—491.
 62. Мосолов А. Н., Белая А. Н., Груздей А. Д. Влияние ферментов миксовирусов на изолированные полнотелные хромосомы // *Цитология.*—1971.—13, № 1.—С. 104—107.
 63. Fahmy O. G., Fahmy M. J. Mutagenicity of ionic polymers and leukaemogenic viruses relative to nucleic acids in *Drosophila melanogaster* // *Nature.*—1964.—204, N 4953.—P. 46—49.
 64. Baybutt H. M., Murray B. A., Pearson C. K. Aspects of thymidine metabolism and function in cultured mammalian cells infected with Herpes simplex virus type 1 // *J. Gen. Virol.*—1982.—59.—P. 223—234.
 65. Kunkel T. A., Silber J. R., Loeb J. A. The mutagenic effect of deoxynucleotide substrate imbalances during DNA synthesis with mammalian DNA polymerases // *Mutat. Res.*—1982.—94.—P. 413—419.
 66. Рубашевский Е. Л., Лукаш Л. Л., Бужиевская Т. И., Ландау С. М., Сасина Л. К., Стецяк Т. И. Мутагенность ДНК вируса простого герпеса и плазмиды в культивируемых клетках млекопитающих // *Докл. АН СССР.*—1984.—279, № 3.—С. 752—754.
 67. Gordon J. W. A foreign dihydrofolate reductase gene in transgenic mice acts as dominant mutation // *Mol. and Cell. Biol.*—1986.—6.—P. 2158—2167.
 68. Попов Л. С., Горбунова Л. В., Варшавер Н. Б., Шапиро Н. И. Интеграция ДНК ОВ40 в геном клеток и вирусный мутагенез // *Генетика.*—1986.—22, № 9.—С. 2213—2219.
 69. Stabel S., Doerfler W., Friss R. R. Integration sites of adenovirus type 12 DNA in transformed hamster cells and hamster tumor cells // *J. Virol.*—1980.—36.—P. 22—40.
 70. Doerfler W. Uptake, fixation and expression of foreign DNA in mammalian cells: the organization of integrated adenovirus DNA sequences // *Curr. Top. Microbiol. and Immunol.*—1982.—101.—P. 128—188.
 71. Kuhlmann I., Achten S., Rudolph R., Doerfler W. Tumor induction by human adenovirus type 12 in hamsters: loss of the viral genome from adenovirus type 12-induced tumor cells is compatible with tumor formation // *EMBO J.*—1982.—1.—P. 79—86.
 72. Gahlman R., Doerfler W. Integration of viral DNA into the genome of the adenovirus type 2-transformed hamster cell line

- HE5 without loss or alteration of cellular nucleotides // *Nucl. Acids Res.*—1983.—11.—P. 7347—7361.
73. *Kuhlmann J., Doerfler W.* Loss of viral genomes from hamster tumor cells and nonrandom alterations in patterns of methylation of integrated adenovirus type 12 DNA // *J. Virol.*—1983.—147.—P. 631—636.
74. *Schultz H. M., Doerfler W.* Detection of cellular DNA at site of viral DNA insertion in the adenovirus type 12-induced mouse tumor CBA-12-1-T // *Nucl. Acids Res.*—1984.—12.—P. 4959—4976.
75. Лукаш Л. Л., Лукаш С. И., Задорожный В. Ф. Математическая модель динамики мутагенеза, индуцированного фрагментом ДНК аденовируса, в клетках млекопитающих // *Биополимеры и клетка.*—1996.—12, № 3.—С. 7—16.
76. Лукаш Л. Л., Лукаш С. И. Влияние гетерогенности системы соматических клеток млекопитающих на проявление мутагенеза, индуцированного трансформирующими генами аденовируса // *Биополимеры и клетка.*—1996.—12, № 6.—С. 25—35.
77. Лукаш Л. Л., Лукаш С. И., Коваленко О. О. Математичне моделювання прояву мутагенезу в енергетично гетерогенній біологічній системі // *Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка.*—2001.—№ 5.—С. 108—112.
78. *Edwards A., Voss H., Rice P. et al.* Automated DNA sequencing of the human *hprt* locus // *Genomics.*—1990.—6, N 3.—P. 593—608.
79. Засухина Г. Д. Репаративные механизмы клеток и проблемы окружающей среды.—М.: Наука, 1979.—184 с.
80. Синельщикова Т. А., Чекова В. В., Засухина Г. Д. Механизмы нарушений репарации ДНК в клетках человека. Интерферон стимулирует репаративный синтез в клетках пигментной ксеродермы // *Генетика.*—1989.—24, № 9.—С. 1658—1663.
81. *Pegg A. E., Dolan M. E., Moschel R. C.* Structure, function, and inhibition of O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase // *Progr. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.*—1995.—51.—P. 167—223.
82. *Pegg A. E.* Repair of O⁶-alkylguanine by alkyltransferases // *Mutat. Res.*—2000.—462.—P. 83—100.
83. *Lukash L. L., Boldt J., Pegg A. E., Dolan M. E., Maher V. M., McCormick J. J.* Effect of O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase on the frequency and spectrum of mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the *HPRT* gene of diploid human fibroblasts // *Mutat. Res.*—1991.—250.—P. 397—409.
84. Лукаш Л. Л., Подольская С. В., Сухорада Е. М., Костецкая Е. В., Костецкий И. Е., Варзанова И. С., Пацковский Ю. И., Вавилина И. В., Дейс С. В. Влияние алкилирующего агента МННГ на мутагенный эффект экзогенной рекомбинантной ДНК // *Биополимеры и клетка.*—1995.—11, № 1.—С. 87—91.
85. Лукаш Л. Л., Лыло В. В., Манько В. Г., Терентьев А. Г. Усиление мутагенного эффекта нитрозогуанидина под влиянием модифицированных оснований при ингибировании репаративного фермента АГТ в соматических клетках млекопитающих // *Цитология и генетика.*—2002.—36, № 3.—С. 41—50.
86. Лукаш Л. Л., Карпова И. С., Мирошниченко О. С., Тихонова Т. Н., Лыло В. В., Манько В. Г., Сухорада Е. М., Гольнская Е. Л. Влияние лектина соцветий *Sambucus nigra* на индуцированный алкилирующим агентом мутагенез в соматических клетках млекопитающих // *Цитология и генетика.*—1997.—31, № 5.—С. 52—60.
87. *McGregor W. G., Chen R.-H., Lukash L. L., Maher V. M., McCormick J. J.* Cell-cycle-dependent strand bias for UV-induced mutations in the transcribed strand of excision repair-proficient human fibroblasts but not in repair-deficient cells // *Mol. and Cell. Biol.*—1991.—11.—P. 1927—1934.
88. Глузман Д. Ф., Абраменко И. В., Склярченко Л. М., Надгорная В. А. Клеточные основы кроветворной и иммунной системы // *Лаб. диагностика онкогематологических заболеваний.*—Киев: Морион, 1998.—С. 1—89.
89. *Cervantes R. B., Stringer J. R., Shao C., Tischfield J. A., Stambrook P. J.* Embryonic stem cells and somatic cells differ in mutation frequency and type // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2002.—99, N 6.—P. 3586—3590.

УДК 575.224.6:577.152.2
Надійшла до редакції 15.03.04