



УДК 575.24

С. М. Гершензон, Ю. Н. Александров, Т. В. Шандала,
М. Г. Айзензон, Р. П. Суббота

ЛОКУС-СПЕЦИФИЧНОСТЬ И НЕСТАБИЛЬНОСТЬ МУТАЦИЙ, ВОЗНИКАЮЩИХ В ПОТОМСТВЕ ПОЛУЧЕННЫХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК МУТАНТОВ ДРОЗОФИЛЫ

*Инъекция самцам *Drosophila melanogaster* ДНК вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) большой воцинной моли вызывала с большой частотой видимые мутации преимущественно в двух локусах: *Beaded* (Bd 3-93,8) и *thickened veins* (*thi*, 2-71,5). В потомстве этих мутантов повторно возникали многочисленные вторичные и третичные генные мутации, притом с особенно большой частотой снова в локусе *thi*, т. е. с высокой локус-специфичностью. В этом же локусе довольно часто возникающая мутация ревертировалась к норме. В ряде случаев две или несколько неаллельных мутаций одновременно возникали в одной зародышевой клетке. Такие же мультимутационные события характеризуют рецессивные летальные мутации, индуцированные разными экзогенными ДНК и синтетическими полинуклеотидами. Результаты опытов, проведенных молекулярно-генетическими методами, указывают на роль мобильных генетических элементов в индукции мутаций экзогенной ДНК. Обсуждаются возможные механизмы мутагенного действия ДНК и синтетических полинуклеотидов.*

Введение. Мутагенное действие экзогенных ДНК, обнаруженное и исследованное нами в опытах с дрозофилой [1—9], было подтверждено многими другими авторами разных стран как на дрозофиле, так и на различных других организмах (литературу см. в указанных выше публикациях). Нами было установлено, что в нескольких важных аспектах мутагенное действие экзогенных ДНК отличается от такового всех прочих известных до сих пор физических и химических мутагенов. Во-первых, ДНК не вызывает грубых поломок хромосом, а индуцирует только многочисленные генные мутации и, возможно, очень мелкие делеции, настолько малые, что их нельзя обнаружить даже в хромосомах слюнных желез. Во-вторых, между мутациями, индуцированными ДНК, часто наблюдаются необычные аллельные отношения: многие из них аллельны двум или нескольким другим индуцированным мутациям, не аллельным между собою. В-третьих, что особенно примечательно, спектр мутаций, индуцированных экзогенными ДНК, коренным образом отличается от такового для спонтанных генных мутаций или индуцированных обычными физическими или химическими мутагенами: мутации возникают преимущественно в относительно немногих определенных хромосомных локусах, различных при использовании в качестве мутагенов разных ДНК, иногда с очень высокой частотой в расчете на затронутый локус. Наконец, в-четвертых, ДНК обладает весьма продленным мутагенным действием, она вызывает мутации не только в половых клетках мух, которым она была инъецирована, но и в нескольких последующих поколениях мух, при этом чаще всего в тех же локусах, в которых возникали первичные мутации.

Локус-специфичность мутагенного действия характеризует не только природные ДНК, но также высокополимерные синтетические

© С. М. ГЕРШЕНЗОН, Ю. Н. АЛЕКСАНДРОВ, Т. В. ШАНДАЛА, М. Г. АЙЗЕНЗОН,
Р. П. СУББОТА, 1991

полинуклеотиды, мутагенность которых была изучена в нашей лаборатории [10, 11].

Контрольные опыты показали, что экзогенные ДНК теряют мутагенность после деградации их химической или ферментативной обработкой. Мононуклеотиды также не мутагенны, кроме тимидина, который слабомутагенен, но без проявления локус-специфичности. ДНК, выделенная из самой *D. melanogaster*, представляет собой довольно эффективный мутаген, при этом ее действие полностью лишено локус-специфичности.

Несмотря на большое число экспериментальных фактов, накопленных в процессе нашей работы по мутагенному действию экзогенных ДНК и синтетических полинуклеотидов, механизм этого действия пока неясен. Очевидно, требуются дополнительные данные. Здесь мы представляем результаты наших недавних опытов, имевших целью, во-первых, подтвердить, действительно ли вторичные мутации, вызываемые продленным действием экзогенной ДНК, обладают локус-специфичностью, характерной для первичных мутаций, индуцированных экзогенными ДНК; во-вторых, наблюдаются ли среди этих вторичных мутаций отмеченные выше необычные аллельные отношения и тогда попытаться выяснить природу этих отношений; в-третьих, установить стабильность или нестабильность таких вторичных мутаций. Мы включаем также некоторые новые данные об особенностях рецессивных летальных мутаций, индуцированных у *D. melanogaster* синтетическими полинуклеотидами. Эти данные, на наш взгляд, имеют значение для понимания механизма возникновения мутаций, вызванных экзогенными ДНК.

Материалы и методы. Линии *D. melanogaster*. Использовали стандартные мутантные линии и нормальную линию *D-18*. Немногие другие мутантные линии получены из Института общей генетики АН СССР и Института молекулярной генетики АН СССР (Москва).

Разведение мух. Мух воспитывали в пробирках на среде, состоящей из дрожжей, сахара, манной крупы, агара и воды. Культуры содержали при 23 °С; в некоторых случаях температура была выше или ниже, как указано при описании соответствующих опытов. Родительские мухи оставались в пробирках до начала вылупления потомства, т. е. около 11—12 дней.

Выявление мутаций. Видимые рецессивные и доминантные мутации, сцепленные с полом, и доминантные аутосомные мутации выявляли скрещиванием исследуемых самцов с самками, имеющими сцепленные X-хромосомы, маркированные геном *yellow*. Видимые рецессивные аутосомные мутации обнаруживали только в тех вариантах, когда в течение нескольких поколений инбридировали сибсов или когда аутосомы гомозиготизировали с помощью балансеров. Всех фенотипически измененных мух исследовали далее и только в случае наследования измененных признаков считали этих мух мутантами. Сцепленные с полом рецессивные летальные мутации выявляли общепринятыми методами *C1B* или *Basc*, рецессивные мутации во 2-й хромосоме — методом *Sy/L*, причем перед каждым таким опытом испытываемую линию очищали от рецессивных видимых и летальных мутаций, которые могли накопиться в течение предшествовавшего разведения линии. Во многих случаях мутанты возникали в виде пучков; каждый такой пучок регистрировали как единичную мутацию.

Молекулярно-генетические методы. ДНК выделяли фенольно-хлороформно-пропазным методом, как описано Зеленцовой и др. [12]. Блоттинг вели по Саузерну [13], используя фрагменты ДНК ВЯГ *G. mellonella*, полученные с помощью рестриктаз *EcoRI* и *HindIII* и меченные ³H (10⁶ имп/мин) по Ригби [14]. Мобильные генетические элементы класса мдг (включая *copia*), встроенные в плазмиду *pBR322*, метили ³H (10⁶ имп/мин); мдг1, 2, 3, 4 (*gypsy*) получены из лаборатории Г. П. Георгиева, а *copia* — от Д. Финнегана. Локализацию этих мобильных элементов в хромосомах слюнных желез вели гибридизаци-

ей *in situ* по Ананьеву [15]. Р-элемент, встроенный в фаг лямбда, предоставлен Дж. Рубином; этот элемент метили ^3H (10^6 имп/мин) и изучали его возможное присутствие в хромосомах гибридизацией *in situ*, а также с меткой ^{32}P (10^8 имп/мин) экспресс-методом по Ансолабехеру [16].

Результаты и обсуждение. Исходным материалом для настоящей работы служили линии дрозофилы, несущие доминантную (*Beaded*, *Bd*, 3-93,8) и рецессивную (*thickened veins*, *thi*, 2-71,5) мутации (рис. 1: изменчивость выражения мутаций *Bd* и *thi*), полученные в опыте по инъекции нормальным самцам линии *D-18* раствора ДНК ВЯП *G. mellonella*. Результаты этого опыта опубликованы [17, 18], поэтому здесь достаточно дать только их краткое резюме. Обработанных ДНК самцов скрещивали с самками, имеющими сцепленные X-хромосомы, маркированные геном *yellow*; их потомков размножали тесным инбридингом в течение трех поколений. Среди свыше 30 тыс.

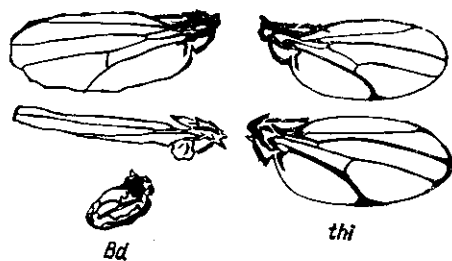


Рис. 1

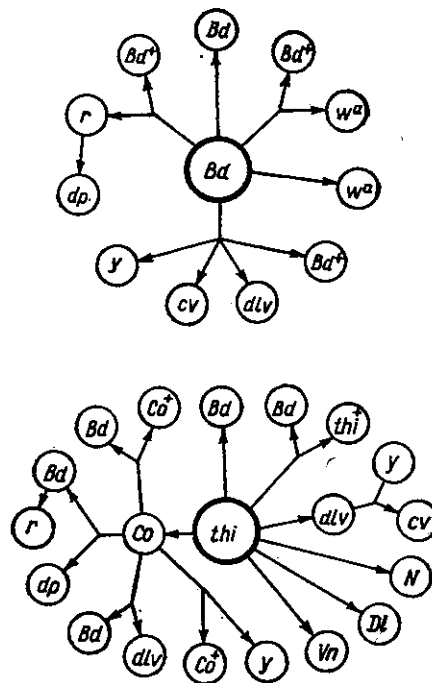


Рис. 2

полученных потомков было найдено 25 видимых мутаций, из них 12 мутаций *Bd*, независимо возникших в потомстве разных исходных самцов, и 7 независимо возникших мутаций *thi*, выщепившихся в F_3 от разных исходных самцов. Таким образом, здесь явно проявилась локус-специфичность, столь характерная для мутагенного действия и других ранее изученных нами экзогенных ДНК. Среди свыше 40 тыс. мух в поколениях контрольной серии не было обнаружено ни одной видимой мутации.

Мутантные линии *Bd* и *thi*, полученные от самцов, подвергнутых действию ДНК, поддерживались в массовых культурах в течение нескольких поколений пока производилось картирование и изучение пенетрантности этих мутаций; 12 линий *Bd* размножали в виде гетерозигот *Bd/TM1*, а 7 линий *thi* сохраняли в гомозиготном состоянии. Было установлено, что пенетрантность обеих мутаций сильно зависит от температуры [19]; для гетерозигот *Bd* она полная при 18°C и почти полная при 25°C , для гомозигот *thi*— она полная при обеих этих температурах, но при более высоких температурах пенетрантность той и другой мутаций быстро падает. Поэтому в дальнейшем опыте, требовавшие точного учета расщепления по этим мутациям, вели при 18°C .

Затем в течение нескольких поколений поиск новых мутаций производили в трех линиях *Bd* (№№ 1, 5 и 11) и двух линиях *thi* (№№ 1, 7), размножаемых индивидуальными скрещиваниями гетерозиготных самцов *Bd/ess* с самками *ess/ess* и самцов *thi/thi* или *Cy/thi* с самками *thi/thi*. Результаты приведены в табл. 1. Данные, включенные в эту таблицу, получены в скрещиваниях, позволяющих обнаруживать все

видимые мутации, сцепленные с полом, и доминантные аутосомные; рецессивные же аутосомные могли выявляться только в тех случаях, когда случайно оба родителя были по ним гетерозиготны. В эту таблицу включено также несколько третичных видимых мутаций, происходящих от вторичных мутаций. В опытах, результаты которых суммированы в табл. 1, изредка встречались единичные фенотипически нормальные мухи, которые в таблицу не включены, так как своим появлением они, несомненно, были обязаны неполной пенетрантности мутаций *Bd* и *thi* (опыт вели при температуре 23—25 °С). Однако не исключено, что в число этих единичных нормальных мух попали и некоторые ревертаны.

Как видно из табл. 1, из 12 локусов, где возникли мутации, шесть имеют частоту мутаций не выше $6 \cdot 10^{-6}$, т. е. типичную для спонтанных; в двух локусах (*w^a* и *cv*) она, возможно, слегка выше спонтанной; еще в трех (*y*, *dlv*, *r*) частота мутаций, вероятно, действительно выше спонтанной, хотя статистически разница не вполне достоверна. Но в локусе *Bd* мутации возникали с необычайно высокой частотой, превышающей примерно на два порядка среднюю частоту видимых мутаций; и эта частота мутации *Bd* характеризует потомков как *Bd*, так и *thi* предков.

Примечательно, что в 14 случаях появления новой мутации среди потомков исходных линий *Bd* эта мутация происходила в не-*Bd* 3-й хромосомы гетерозиготного самца, маркированной генами *e* и *ss*; т. е. она обнаруживалась появлением особи, фенотипически проявляющей все три мутации, т. е. имеющей генотип *essBd/essBd⁺*, что подтверждалось последующим генетическим анализом. Первоначально мы склонны были предполагать, что эти новые мутации были обязаны транспозиции *Bd* в оппозитную хромосому; но позже это предположение, хотя и не было опровергнуто, однако стало казаться сомнительным потому, что в потомстве исходных линий *thi* также было найдено много мутаций *Bd*, возникавших примерно с такой же частотой, как в потомстве исходных линий *thi*. Кроссинговер у гетерозиготных самцов *Bd/ess* исключается не только из-за того, что он, как правило, отсутствует у самцов дрозофилы, но также и потому, что эта возможность была нами исследована специально и мы не нашли ни одной кроссоверной особи среди более 1800 потомков самцов, гетерозиготных по *Bd* и хромосоме

Таблица 1
Видимые мутации у потомков мутантов *Bd* и *thi*

Мутация	Число независимых возникновений		Всего в потомстве обеих первичных мутантных линий (170 023 просмотренные мухи)	Приближительная частота мутаций
	у потомков <i>Bd</i> (81315 мух)	у потомков <i>thi</i> (88 708 мух)		
<i>Beaded</i> (<i>Bd</i> , 3-93,8)	14	18	32	$1,9 \cdot 10^{-4}$
<i>yellow</i> (<i>y</i> , 1-0,0)	1	3	4	$4,7 \cdot 10^{-5}$
<i>deltoid veins</i> (<i>dlv</i> , 1-25,9)	1	2	3	$3,5 \cdot 10^{-5}$
<i>rudimentary</i> (<i>r</i> , 1-54,5)	1	2	3	$3,5 \cdot 10^{-5}$
<i>crossveinless</i> (<i>cv</i> , 1-13,7)	1	1	2	$2,4 \cdot 10^{-5}$
<i>apricot</i> (<i>w^a</i> , 1-1,5)	2	—	2	$2,4 \cdot 10^{-5}$
<i>Confluens</i> (<i>Co</i> , 1-3,0)	—	1	1	$5,9 \cdot 10^{-6}$
<i>Notch</i> (<i>N</i> , 1-3,0)	—	1	1	$5,9 \cdot 10^{-6}$
<i>Vein</i> (<i>Vn</i> , 3-19,6)	—	1	1	$5,9 \cdot 10^{-6}$
<i>Delta</i> (<i>DI</i> , 3-66,2)	—	1	1	$5,9 \cdot 10^{-6}$
<i>dumpy</i> (<i>dp</i> , 2-13,2)	1	—	1	?
<i>thickened veins</i> (<i>thi</i> , 2-71,5)	—	1	1	?
Всего:	21	31	52	—

gusica, маркированной мутантными генами по всей ее длине. Таким образом, скорее всего в оппозитной хромосоме гетерозиготных самцов *Bd* просто возникали новые мутации *Bd*. Картирование мутаций *Bd*, возникших в не-*Bd* хромосоме гетерозиготных самцов, показало локализацию их в обычном месте. Новые мутации *Bd* происходили как в линии *Bd1* (11 случаев на 39 774 потомка), так и в линии *Bd5* (пять случаев на 28 890 потомков), но не наблюдались среди 12 978 потомков линии *Bd11*. Тот факт, что мутация *Bd* часто возникала не только среди потомков исходных линий *Bd*, но и среди потомков линии *thi*, притом примерно с такой же частотой, по-видимому, указывает на то, что в обоих случаях мутации вызываются одним и тем же мутагенным фактором. Эти новые мутации *Bd* наблюдались среди потомков линии *thi2* (15 случаев на 84 575 потомков), но не были найдены среди 4133 потомков линии *thi1*. В одном случае среди свыше 15 000 потомков самцов *Cy/thi* появился самец, где мутация *thi* возникла в хромосоме *Cy*; тут не исключена возможность транспозиции.

Примечательно, что среди потомков мутантов *Bd* и *thi* было четыре случая одновременного возникновения в одной зародышевой клетке мутаций двух или трех локализованных в разных местах генома неаллельных генов (*Bd-dlv*, *y-cv*, *Bd-dp*, *y-cv-dlv*). Такие мультимутационные события не могли быть случайными. Частота мутирования каждого из этих генов была в наших опытах (как показано в табл. 1) от $1,9 \cdot 10^{-4}$ (для *Bd*) до $(2,4-4,7) \cdot 10^{-5}$ (для других генов, кроме *dp*, частоту мутирования последнего гена установить не удалось). Вероятность спонтанного совместного возникновения таких событий очень низка. Случайное совпадение их в четырех случаях могло произойти лишь с ничтожно малой вероятностью, всего порядка $2 \cdot 10^{-15}$; иными словами, оно не могло бы иметь места среди приблизительно 170 000 мух, которые охвачены данными табл. 1. Как будет сказано ниже, подобные же случаи сопряженного мутирования в одной зародышевой клетке разных неаллельных генов наблюдались нами и при реверсиях, происшедших в линиях *Bd*, *thi* и выделенных из них мутантах. Эти мультимутационные события очень напоминают описанные Герасимовой и сотр. [20—27], установившими, что в нестабильной линии мутации *cut* они вызваны одновременными спонтанными транспозициями в мутировавший локус одного или нескольких разных мобильных генетических элементов.

Около трети видимых мутаций среди потомков мутантов *Bd* и *thi* появлялись в виде пучков, состоящих из двух или нескольких мутантных мух, что указывало на возникновение этих мутаций в премейотических зародышевых клетках.

Известно, что мутации, вызванные у дрозофилы спонтанными транспозициями мобильных генетических элементов разных классов, довольно часто ревертируют к дикому типу в результате происходящей экзизии такого элемента из ДНК хромосомы. Мы изучили на достаточно большом материале возможность реверсий в линиях *Bd11* и *thi1*. В этих опытах все мухи, не проявившие мутантного фенотипа, были тщательно генетически проанализированы, включая гомозиготизацию соответствующих хромосом с помощью балансиров, дабы отличить тех, у которых произошла истинная реверсия, от тех немногих, у которых мутантный фенотип не был выражен из-за неполной пенетрантности данной мутации даже при температуре, когда *Bd* и *thi* обладают почти 100% ной пенетрантностью. В линии *Bd11* (где скрещивались самки *Bd/TM1* с такими же самцами, а потомство воспитывалось при 18 °С) частота реверсии от *Bd* к *Bd*⁺ была 0,6 %, т. е. довольно высокой. В линии *thi* (где самцы *Cy/thi* скрещивались с самками *thi/thi*, а потомство воспитывалось при 23 °С) реверсии от *thi* к *thi*⁺ происходили редко, с частотой всего $4 \cdot 10^{-5}$; такая же частота реверсий наблюдалась и для упомянутой выше новой мутации *thi*, возникшей в хромосоме *Cy* гетерозиготного самца *Cy/thi*. В линии *thi2* частоту реверсий не изучали, но среди большого числа массовых культур этой линии в четырех пробир-

ках были найдены единичные фенотипически нормальные ревертанты *thi*⁺ или ревертанты, в которых одновременно с реверсией *thi*⁺ возникла мутация *Bd* (в обоих этих случаях реверсия *thi*⁺ была подтверждена последующим генетическим анализом).

На рис. 2 показано происхождение всех типов вторичных и третичных видимых мутаций (вилки стрелок — мультимутационные события в одной зародышевой клетке), отраженных в табл. 1, а также упомянутых выше реверсий *Bd* и *thi*.

Наши предыдущие работы по мутагенным свойствам ряда экзогенных ДНК показали, что они вызывают множество рецессивных леталей во 2-й хромосоме и очень мало — в X-хромосомах *D. melanogaster*, хотя часто индуцируют видимые мутации в нескольких определенных локусах этой хромосомы [6]. Мы изучили частоту сцепленных с

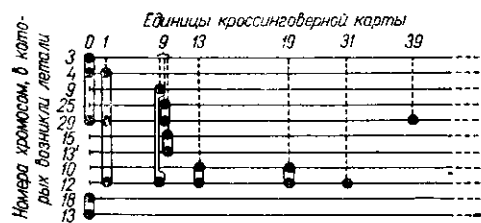


Рис. 3



Рис. 4

полом рецессивных летальных мутаций в некоторых полученных нами линиях *Bd* и *thi*. Результаты этих опытов показывают, что частота рецессивных летальных мутаций в X-хромосомах тестируемых мутантных линий низка и существенно не отличается от их частоты в контрольной линии дикого типа, что соответствует найденному нами ранее в упомянутых обширных опытах по индукции мутаций этого класса различными экзогенными ДНК.

Как отмечалось во «Введении», нами было показано, что мутации, индуцированные различными ДНК, нередко были аллельными двум или нескольким другим, не аллельным по отношению друг к другу. Особенно отчетливо это наблюдалось при изучении рецессивных аутосомных летальных мутаций, вызванных различными экзогенными ДНК или синтетическими полинуклеотидами [1, 3—6, 9, 11, 28]. Эта особенность аллелизма была обнаружена также Мэтью [29], повторившим нашу работу по индукции рецессивных аутосомных леталей во 2-й хромосоме.

Эти данные привели к предположению о том, что большинство леталей, индуцированных экзогенными ДНК или синтетическими полинуклеотидами, возникают в определенных участках хромосом, а каждый такой участок состоит из нескольких перекрывающихся друг друга субъединиц (сайтов, генов или соседствующих групп генов), могущих мутировать все вместе или по отдельности. Такое толкование необычного характера аллелизма было дано в наших только что перечисленных публикациях, но могло быть правильным и другое объяснение. Так, можно было предположить, что этот характер аллелизма обусловлен одновременным возникновением в хромосоме двух или нескольких различно локализованных неаллельных рецессивных летальных мутаций. Это предположение было выдвинуто несколько лет назад Александровым [9]; позже оно было поддержано Родиным [30] на основании его компьютерного анализа наших данных по индукции рецессивных летальных мутаций во 2-й хромосоме *D. melanogaster*. Теперь мы пришли к заключению, что последнее является истинной причиной особенностей аллельных отношений между летальными, индуцированными экзогенными ДНК и синтетическими полинуклеотидами. Это стало очевидным, когда Александров картировал эти мутации [11, 31].

В качестве примера на рис. 3 представлены результаты картирова-

ния рецессивных летальных мутаций, индуцированных во 2-й хромосоме *D. melanogaster* с помощью поли (dA), а на рис. 4 — с помощью телячьей тимусной ДНК; приведенные данные показывают одновременное возникновение до пяти разных леталей в одной хромосоме, в обоих случаях с высокой локус-специфичностью. Это полностью относится и к другим группам леталей (тут не представленных), вызванных разными экзогенными ДНК и синтетическими полинуклеотидами. Табл. 2 иллюстрирует результаты, полученные при картировании всех леталей, индуцированных во 2-й хромосоме синтетическими полинуклеотидами, использованными в наших опытах. Эти результаты согласуются также с описанными выше случаями одновременного возникновения видимых мутаций у потомков мух, на которых воздействовали ДНК ВЯП *G. mellonella*. Таким образом, становится ясно, что необычный характер аллельных отношений мутаций, индуцированных ДНК или синтетическими полинуклеотидами, определяется главным образом или исключительно мультимутационными событиями, происходящими в одной зародышевой клетке. Принимая во внимание данные Герасимовой по спонтанным мультимутационным событиям в нестабильной линии *cut* и наши результаты, а также данные Рейтера и др. [32], также наблюдавших мультимутационные события у *D. melanogaster*, это явление кажется гораздо более обычным, чем можно подумать на основании этих работ, рассматриваемых порознь.

Сравнение наших результатов по мультимутационным событиям с результатами Герасимовой свидетельствует в пользу предположения о том, что мутации в наших опытах с ДНК и синтетическими полинуклеотидами как-то связаны с транспозициями мобильных генетических элементов.

С любезной помощью Т. И. Герасимовой и при ее участии мы исследовали в ее лаборатории (Институт общей генетики АН СССР, Москва) гибридизацией *in situ* локализацию нескольких мобильных генетических элементов класса мдг в X-хромосомах двух наших мутантов *Bd11* и *Co* (чья X-хромосома не претерпела кроссинговера с другими), а также у двух их ревертантов; обе эти реверсии сопровождалась новыми сцепленными с полом мутациями: *yellow* — в случае реверсии *Co* и *rudimentary* — в случае реверсии *Bd11*. Использовали мобильные элементы, встроенные в плазмиду *pBR322* и меченные ³H. Местоположение этих элементов оставалось постоянным при размножении линий *Bd11* и *Co*, но при реверсиях к норме у обоих мутантов происходили многочисленные транспозиции мобильных элементов. Особенно следует отметить, что реверсия от *Co* к *Co*⁺ сопровождалась транспозицией мдг2 в район *yellow* (диск 1), где до реверсии этот элемент отсутствовал; ранее Герасимовой было показано [20], что такие

Таблица 2

Мультилокусные рецессивные летали, индуцированные синтетическими полинуклеотидами во 2-й хромосоме

Полинуклеотиды	Общее число леталей	Число леталей, аллельных другим	Число единичных леталей	Число (%) хромосом, в которых одновременно возникло несколько разных леталей
Рибозного типа				
поли (A)	21	12	9	9 (43)
поли (I)	28	25 (все в одном локусе)	3	0
поли (AC)	13	4	9	2 (15)
поли (U)	25	4	21	0
Дезоксирибозного типа				
поли (dA)	13	9	4	9 (69)
поли (dT)	17	2	15	0

транспозиции (мдг2) вызывают мутации в локусе *yellow*. Более подробно эти результаты описаны Шандалой и соавт. [33].

На первый взгляд, особенности мутаций, индуцируемых у дрозофилы экзогенными ДНК, до некоторой степени напоминают наблюдаемые в случаях дисгенеза в системах Р-М и I-R. Однако в действительности наши результаты очень существенно отличаются от того, что свойственно этим системам. Как упоминалось выше, специальными опытами было полностью доказано отсутствие кроссинговера у гетерозиготных по *Vd* самцов. Между тем кроссинговер у самцов представляет одну из отличительных черт Р-М-системы гибридного дисгенеза. Более того, отсутствие Р-элемента в линиях, с которыми мы работали, было двояко доказано прямым путем. Во-первых, это было сделано экспресс-методом по Анксолабехеру и др. [16], используя меченный ^{32}P Р-элемент, встроенный в фаг лямбда. В качестве положительного контроля служила линия *MRh12*, геном которой содержит около 30 копий Р-элемента, а отрицательным контролем была линия Кантон-S в хромосомах которой нет Р-элементов. Р-элементов не было найдено ни в нашей исходной нормальной линии *D-18*, ни в изучавшихся мутантных линиях *Bd11* и *Co* (последняя происходила от *thi*). Во-вторых, Р-элементы не были обнаружены в хромосомах слюнных желез этих линий при гибридизации *in situ* с меченым ^3H Р-элементом. В этих линиях не наблюдалось эмбриональной смертности, характерной для системы I-R. Не встречалось различий в результатах реципрокных скрещиваний, как это свойственно гибриднему дисгенезу. Никаких признаков гибридного дисгенеза не обнаружено и в многочисленных скрещиваниях наших мутантных линий с лабораторными линиями (и в пределах этих линий), использованными в работе. Наконец, гибридный дисгенез, конечно, полностью исключен в наших опытах по индукции мутаций синтетическими полинуклеотидами, чье мутагенное действие во всех главных аспектах тождественно с таковым экзогенных ДНК.

В своих предыдущих публикациях мы не раз высказывали предположение о том, что мутагенное действие экзогенных ДНК может быть основано на встройке в хромосомы реципиента фрагментов экзогенной ДНК, применявшейся в качестве мутагена. Для проверки этого в настоящей работе была сделана попытка обнаружить методом блоттинга по Саузерну возможное присутствие вирусной ДНК, использованной нами в качестве мутагена, в ДНК, выделенной из двух мутантов — *Bd11* и *thi3*. Контролем служила собственная ДНК вируса и ее фрагменты. В контроле происходила эффективная гибридизация, но ее не наблюдалось с ДНК из мутантных мух. Параллельно с нашей работой было показано [34, 35], что ДНК-копии генома вируса саркомы Рауса, использованной в качестве мутагена, сначала встраиваются в ДНК мутантных мух, но теряются через несколько поколений. Возможно, отрицательный результат наших опытов по блоттингу объясняется тем, что испытывавшиеся мутанты отстояли на много поколений от первоначально индуцированных.

Несмотря на то, что мутагенное действие экзогенных ДНК было открыто более 40 лет назад и с тех пор интенсивно изучалось нами и рядом других генетиков, его механизм все еще далеко не ясен.

В пользу высказанного нами предположения об инсерционной природе мутаций, вызываемых экзогенными ДНК [2, 5, 8], свидетельствует сходство ряда особенностей этих мутаций со спонтанными мутациями, обязанными инсерциям различных мобильных генетических элементов, присутствующих в геноме дрозофилы [21—23, 36, 37]. Подобно мутациям, индуцированным экзогенными ДНК, многие из спонтанных инсерционных мутаций неслучайно распределены в хромосомах, предпочтительно затрагивая определенные локусы; эти мутации часто нестабильны, ревертируя к норме, они появляются обычно в виде пучков, что указывает на их возникновение на премейотических стадиях гаметогенеза; как правило, они не вызывают грубых хромосомных пе-

реструктур, но могут индуцировать мелкие дупликации и делеции. Наблюдавшиеся нами реверсии некоторых мутаций, индуцированных экзогенными ДНК, могут быть обязаны вырезанию встроенного фрагмента чужеродной ДНК или изменению его ориентации в хромосоме. Продленный мутагенный эффект экзогенных ДНК может быть объяснен элисомоподобным поведением фрагментов введенных молекул ДНК. Можно добавить, что по крайней мере в некоторых случаях мутагенную роль могут играть инсерции не собственных, а чужеродных мобильных генетических элементов, присутствующих в ДНК, используемой в качестве мутагена. В опытах, описанных в этой статье, мы индуцировали у дрозофилы мутации с помощью ДНК, выделенной из ВЯП *G. mellonella*. Этот вирус не исследован с целью выявления в нем мобильных генетических элементов, но он родственен другим ВЯП, для которых показано, что они содержат такие элементы [38, 39].

Параллелизм особенностей мутагенного действия спонтанных инсерций и экзогенных ДНК едва ли может быть случайным. Кажется вероятным, что экзогенные ДНК действуют подобно мобильным генетическим элементам, избирательно изменяя или дестабилизируя индивидуальные гены. Локус-специфичность чужеродных ДНК может объясняться интегративными событиями, обусловленными случайной частичной комплементарностью некоторых фрагментов введенной ДНК определенным последовательностям хромосомной ДНК реципиента. В течение некоторого времени эти фрагменты, вероятно, циркуляризованные могут оставаться в клетках реципиента в свободном состоянии и в таком виде передаваться от клетки к клетке в последующих поколениях; или же они могут встраиваться в ДНК хромосом, повреждая либо изменяя соседние гены.

Характер мутагенного действия синтетических полинуклеотидов (высокая локус-специфичность, частые мультимутационные события) очень похож на присущий мутагенному действию экзогенных ДНК [10], что заставляет думать об общности механизма. Однако предложенная выше гипотетическая инсерционная модель требует серьезной поправки, чтобы стать пригодной для полинуклеотидов рибозного типа. Наша работа показала, что их мутагенное действие в принципе идентично таковому синтетических полинуклеотидов дезоксирибозного типа. Более того, наши опыты по мутагенности для дрозофилы РНК-содержащих вирусов подтвердили, что мутагенность этих вирусов во всех отношениях подобна действию ДНК-содержащих вирусов и что единственным мутагенным элементом вирусов является их нуклеиновая кислота, а вирусные белки полностью лишены их мутагенных свойств [6, 40]. Но теоретически невозможно, чтобы фрагменты рибозных синтетических полинуклеотидов или природные РНК встраивались в хромосомную ДНК реципиентов. Чтобы преодолеть эту трудность, мы предположили, что встраиваются не фрагменты этих молекул РНК-типа, а их ДНК-копии (кДНК), синтезируемые в клетках реципиента. Известно, что нужные для такого синтеза ферменты имеются в клетках насекомых [41—43]. К сожалению, наши данные об индукции рецессивных леталей у дрозофилы с помощью поли(А), поли(У), поли(dА) и поли(dТ) не подтверждают мысли о том, что мутагенное действие синтетических полинуклеотидов рибозного типа обязано инсерции фрагментов их кДНК. Согласно этому предположению, спектр мутаций, индуцируемых поли(А), должен был бы каким-то образом совпадать со спектром мутаций, индуцируемых поли(dТ); точно так же подобного соответствия можно было ожидать для спектров мутаций, индуцированных поли(У) и поли(dА), но в наших опытах не было обнаружено такой корреляции.

Другой гипотетический механизм мутагенного действия экзогенных ДНК и синтетических полинуклеотидов возможен на основе недавних данных о неслучайной локализации инсерций бактериального транспозона в эукариотической ДНК [44]. Этими авторами было найдено, что бактериальный транспозон *Tn5* предпочтительно встраивает-

ся в несколько определенных локусов большого фрагмента ДНК аденовируса человека, включенного в плазмиду. Эти локусы расположены вслед за промоторами аденовирусной ДНК и, по-видимому, транскрипция этой ДНК служит как для стимуляции, так и для ориентации инсерций, несмотря на отсутствие гомологии встроенного фрагмента и реципиентной ДНК. Если нечто подобное происходит в случае мутаций, индуцированных экзогенными ДНК и синтетическими полинуклеотидами, это хотя бы отчасти могло бы объяснить локус-специфичность их мутагенного действия.

Следует упомянуть еще и третий возможный механизм мутагенного действия экзогенных ДНК и синтетических полинуклеотидов. Можно предположить [8, 9], что эти мутагены способны как-то активировать мобильные генетические элементы, имеющиеся в геноме дрозофилы, что ведет к их транспозициям, вызывающим мутации в локусах, куда они перемещаются. В пользу этого свидетельствуют, хотя и косвенно, опубликованные данные о мутагенности мобильных генетических элементов, в особенности результаты, полученные Герасимовой [20, 22, 23] и показывающие, что изученные ею спонтанные мультимутационные события связаны и, по-видимому, вызываются одновременно происходящими транспозициями разных мобильных генетических элементов.

Обсужденные выше возможные механизмы действия экзогенных ДНК не обязательно взаимоисключают, но могут дополнять друг друга. Конечно, они только гипотетичны и их подтверждение, опровержение или изменение должны ожидать накопления дополнительных экспериментальных данных. До тех пор, вероятно, будет осторожнее ограничиться перефразировкой недавнего довольно расплывчатого высказывания Грина [45] о том, что экзогенные ДНК и синтетические полинуклеотиды действуют, вызывая геномный стресс, и этим повышают частоту генных мутаций.

Мы благодарим Т. И. Герасимову за помощь и участие в исследовании локализации мобильных генетических элементов в полученных нами мутантных линиях *Bd* и *thi*; М. Б. Евгеньеву (Ин-т молекуляр. биологии АН СССР) — за содействие в изучении возможного присутствия Р-элемента в этих линиях; А. М. Колчинского (тот же институт) — за помощь в опытах по блот-гибридизации; мы благодарны также М. М. Грину (Калифорнийский университет) и Э. Б. Льюису (Калифорнийский технологический институт), чьи советы помогли в подготовке этой статьи для публикации.

Резюме

Ін'єкція самцям *Drosophila melanogaster* ДНК вірусу ядерного полієдрозу великої вошиної молі викликала з більшою частотою видимі мутації переважно у двох локусах: *Beaded* (*Bd*, 3-938) і *thickened veins* (*thi*, 2-71,5). У нащадків цих мутантів повторно виникали численні вторинні та третинні генні мутації, причому з особливо великою частотою знову в локусі *thi*, тобто з високою локус-специфічністю. В цьому ж локусі досить часто мутація, що виникла, поверталась до норми. В ряді випадків дві чи декілька неалельних мутацій одночасно виникали в одній зародковій клітині. Такі ж мультимутаційні події характеризують рецесивні летальні мутації, індуковані різними екзогенними ДНК і синтетичними полінуклеотидами. Результати дослідів, проведених молекулярно-генетичними методами, свідчать про роль мобільних генетичних елементів в індукції мутацій екзогенної ДНК. Обговорюються можливі механізми мутагенної дії ДНК та синтетичних полінуклеотидів.

Summary

Injection of *Drosophila melanogaster* males with DNA from the nuclear polyhedrosis virus of *Calleria mellonella* induced visible mutations predominantly at two loci, *Beaded* (*Bd*, 3-93.8) and *thickened veins* (*thi*, 2-75.5). Both mutations arose recurrently with

a high frequency (locus specificity). Among the descendants of *Bd* and *thi* mutants many visible mutations appeared, also recurrently, in a few definite loci. In a number of cases two or several of these mutations arose simultaneously in a single germ cell (multimutational effect). Similar multimutational events characterize recessive lethal mutations induced by synthetic polynucleotides. Transpositions and putative transposition were observed of genes in which mutations were induced by exogenous DNA as well as frequent reversions to wild type of some of these mutations. Results of experiments conducted by molecular-genetical methods point to a role of mobile genetic elements in the induction of mutations by exogenous DNA. Possible mechanisms are discussed of the mutagenic action of DNA and synthetic polynucleotides.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gershenson S.* Induction of lethal mutations in *Drosophila* by DNA // *Genet. Res.*— 1965.— 6, N 2.— P. 157—162.
2. *Gershenson S.* Delayed mutagenic effect of DNA in *Drosophila* // *Mechanisms of mutation and inducing factors.*— Praha: Academia, 1965.— P. 231—233.
3. *Гершензон С. М.* Мутагенное действие ДНК и проблема направленных мутаций // *Генетика.*— 1966.— 2, № 5.— С. 3—13.
4. *Gershenson S.* Mutagenic action of some biopolymers in *Drosophila* // *Jap. J. Genet.*— 1969.— 44, Suppl. 1.— P. 114—119.
5. *Gershenson S.* Mutagenic action of DNA, insertions, transpositions and gene instability // *Proc. of the 14th Int. Congr. of genet.*— Moscow: Mir, 1980.— Vol. 1, pt 2.— P. 96—115.
6. *Гершензон С. М., Александров Ю. Н., Малюта С. С.* Мутагенное действие ДНК и вирусов у дрозофилы.— Киев: Наук. думка, 1975.— 159 с.
7. *Гершензон С. М., Александров Ю. Н.* Мутагенное действие природных и синтетических полинуклеотидов и проблема направленных мутаций // *Журн. общ. биологии.*— 1982.— 43, № 6.— С. 747—763.
8. *Александров Ю. Н.* Закономерности мутагенного действия ДНК у дрозофилы // *Цитология и генетика.*— 1986.— 20, № 1.— С. 26—30.
9. *Александров Ю. Н., Гершензон С. М., Малюта С. С.* Мутагенные свойства неинтервалентных для дрозофилы ДНК- и РНК-содержащих вирусов // *Генетика.*— 1971.— 7, № 9.— С. 102—112.
10. *Александров Ю. Н., Гершензон С. М.* Избирательное мутагенное действие синтетических полинуклеотидов // *Биополимеры и клетка.*— 1985.— 1, № 1.— С. 21—25.
11. *Александров Ю. Н.* Анализ сложных комплементарных отношений мутаций, индуцированных у дрозофилы синтетическими полинуклеотидами // *Докл. АН УССР. Сер. Б.*— 1987.— № 2.— С. 63—67.
12. *Рассеянные по геному повторяющиеся последовательности у видов Drosophila* группы *virilis* I. Рестрикционный анализ репликации и транскрипции // *Е. С. Зеленцова, Р. П. Вашакидзе, Н. И. Пеунова, М. Б. Львенева* // *Молекуляр. биология.*— 1985.— 19, № 5.— С. 1367—1377.
13. *Southern E. A.* Detection of specific sequences among DNA segments separated by gel electrophoresis // *J. Mol. Biol.*— 1975.— 98, N 3.— P. 503—517.
14. *Labelling* deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick-translation with DNA polymerase I / *R. W. Rigby, M. Dieckman, C. Rhodes, P. Berg.* // *Ibid.*— 1977.— 113, N 1.— P. 237—243.
15. *Reiterated genes with varying location in intercalary heterochromatin region of Drosophila melanogaster polytene chromosomes* / *E. V. Ananiev, V. A. Gvozdev, Y. V. Ilyin et al.* // *Chromosoma.*— 1978.— 70, N 1.— P. 1—9.
16. *P-element* distribution in Eurasien populations of *D. melanogaster*; a genetic and molecular analysis / *D. Anoxolabéhere, D. Noward, G. Periquet, P. Tchen* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1985.— 82, N 16.— P. 379—380.
17. *Шандала Т. В., Александров Ю. М., Гершензон С. М.* Высока локус-специфічність мутагенної дії вірусної ДНК при індукції видимих мутацій у дрозофіли // *Доп. АН УРСР. Сер. Б.*— 1983.— № 11.— С. 83—84.
18. *Шандала Т. В.* Генетический анализ видимых мутаций дрозофилы, индуцированных ДНК вируса ядерного полиэдрома большой вошинной моли // *Журн. общ. биологии.*— 1986.— 47, № 3.— С. 394—401.
19. *Шандала Т. В.* Температурная зависимость пенетрантности двух видимых мутаций дрозофилы, индуцированных ДНК вируса ядерного полиэдрома большой вошинной моли // *Цитология и генетика.*— 1985.— 19, № 3.— С. 179—183.
20. *Герасимова Т. И.* Транспозиции мобильных генетических элементов и их роль в инсерционном мутагенезе у дрозофилы // *Стабильность и изменчивость генома.*— М.: Наука, 1985.— С. 26—38.
21. *Прямая демонстрация подвижности мобильного элемента mdg 4 и его роль в возникновении нестабильных мутаций у дрозофилы* / *Т. И. Герасимова, Ю. В. Ильин, Л. Ю. Мизрохи и др.* // *Докл. АН СССР.*— 1983.— 271, № 4.— С. 977—980.
22. *Герасимова Т. И., Мизрохи Л. Ю., Георгиев Г. П.* «Транспозиционные взрывы» в отдельных зародышевых клетках при генетической дестабилизации у *Drosophila melanogaster* // *Там же.*— 1984.— 274, № 6.— С. 1473—1476.

23. Направленный мутагенез под действием мобильных элементов в нестабильных линиях *Drosophila melanogaster* / Т. И. Герасимова, Л. Ю. Мизрохи, Л. А. Оболенкова, Г. П. Георгиев // Там же.— 1985.— 280, № 5.— С. 1246—1250.
24. Successive transposition explosions in *Drosophila melanogaster* and reverse transposition of immobile dispersed genetic elements / Т. I. Gerasimova, S. V. Matjunina, L. J. Mizrokhi, G. P. Georgiev // EMBO J.— 1985.— 4, N 3.— P. 3772—3781.
25. Gerasimova T. I., Mizrokhi L. Y., Georgiev G. P. Transposition bursts in genetically unstable *Drosophila melanogaster* // Nature.— 1985.— 309, N 6078.— P. 714—716.
26. Транспозиционные взрывы в ряду мутационных переходов в дестабилизированных линиях *Drosophila melanogaster* / Л. В. Матюнина, Л. Ю. Мизрохи, Т. И. Герасимова, Г. П. Георгиев // Генетика.— 1985.— 21, № 10.— С. 1608—1618.
27. Кочнева Е. З., Герасимова Т. И. Транспозиционные взрывы при анализе повторных мутаций в нестабильных линиях *Drosophila melanogaster* // Там же.— 1988.— 24, № 4.— С. 613—621.
28. Гершензон С. М., Шандала Т. В. Транспозиции и реверсии мутаций дрозофилы, индуцированных вирусной ДНК // Цитология и генетика.— 1986.— 20, № 1.— С. 20—26.
29. Mathew C. The production of recessive lethals by calf thymus DNA in *Drosophila* // Genet. Res.— 1965.— 6, N 2.— P. 163—174.
30. Родик С. П. Анализ аллельных отношений рецессивных леталей, индуцированных у дрозофилы природными ДНК и некоторыми вирусами // Генетика.— 1974.— 10, № 9.— С. 94—105.
31. Александров Ю. Н., Голубовский М. Д. Роль вирусов и экзогенной ДНК в естественном мутационном процессе: экспериментальное исследование на дрозофиле // Генетика.— 1983.— 19, № 11.— С. 1818—1827.
32. Reuter G., Wolff J., Friede B. Functional properties of the heterochromatin sequences inducing w^{m1} position effect variegation in *Drosophila melanogaster* // Chromosoma.— 1985.— 93, N 1.— P. 132—139.
33. Транспозиции мобильных диспергированных генов в системе мутаций, индуцированных у дрозофилы введением ДНК / Т. В. Шандала, В. А. Могила, Т. И. Герасимова, С. М. Гершензон // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1987.— № 2.— С. 80—84.
34. Unstable visible mutations induced in *Drosophila melanogaster* by injections of oncogenic virus DNA into the polar plasma of early embryos / K. G. Gazaryan, S. D. Nabirochkin, E. N. Shibanova et al. // Mol. and Gen. Genet.— 1982.— 207, N 1.— P. 130—140.
35. Genetic effects of injection of Rous sarcoma virus DNA into polar plasma of early *Drosophila melanogaster* embryos / K. G. Gazaryan, S. D. Nabirochkin, A. K. Sachbasyan, E. N. Shibanova // Nature.— 1984.— 311, N 5984.— P. 382—384.
36. Green M. M. Genetic instability in *Drosophila melanogaster*: transpositions of the white gene and the role in the expression of Zesta gene // Mol. and Gen. Genet.— 1984.— 194.— P. 275—278.
37. Green M. M. Genetic instability in *Drosophila melanogaster*: the genetics of an MR element that makes complete P-insertion mutations // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1986.— 83, N 4.— P. 1036—1041.
38. Miller D. W., Miller H. K. A virus mutant with an insertion of a copia-like transposable element // Nature.— 1982.— 299, N 5883.— P. 562—564.
39. Transposon-mediated mutagenesis in baculovirus / M. J. Fraser, J. S. Brusca, G. E. Smith, M. D. Summers // Virology.— 1985.— 145, N 2.— P. 356—361.
40. Gershenson S. M. Viruses as environmental mutagens // Mutat. Res.— 1986.— 167, N 4.— P. 203—213.
41. Margulies L., Chargaff E. Survey of DNA polymerase activity during the early development of *Drosophila melanogaster* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1973.— 70, N 10.— P. 2946—2950.
42. Cohen L. H., Penner P. E., Loeb L. A. Multiple DNA polymerases displayed by isoelectric focusing // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1973.— 209, N 1.— P. 354—362.
43. Митрофанов В. Г., Кулывев П., Гаузе Г. Г. Выделение и некоторые свойства Р-ДНК полимеразы неплодотворенных яиц *Bombyx mori* // Молекуляр. биология.— 1977.— 11, № 1.— С. 124—133.
44. Non-random insertion of Tn5 into cloned human adenovirus DNA / R. D. McKinnon, J. S. Wayne, D. S. Bautista, F. L. Graham // Gene.— 1985.— 40, N 1.— P. 31—38.
45. Green M. M., Mobile DNA elements and spontaneous gene mutation // Banbury report 30: eukaryotic transposable elements as mutagenic agents.— New York: Cold Spring Harbor Lab., 1988.— P. 41—50.

Ин-т физиологии растений и генетики АН УССР, Киев

Получено 15.02.91