

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ МУТАГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

Ю. Н. Александров, С. М. Гершензон

Введение. Мутагенное действие ДНК, ДНК- и РНК-содержащих вирусов убедительно доказано [1]. Казалось вероятным, что не только природные, но и искусственно синтезированные полинуклеотиды смогут вызывать мутагенный эффект при условии, что их молекулы будут иметь молекулярную массу не менее нескольких сотен дальтонов (олиго- и мононуклеотиды, как правило, не мутагенны). Первую попытку оценить мутагенную активность некоторых синтетических полинуклеотидов сделали Фахми и Фахми [2]. Однако в их опытах полирибонуклеотиды (поли(А), поли(У), поли(У—С)) оказались слабо мутагенными, что, возможно, объяснялось использованием сравнительно низкополимерных препаратов. Кроме того, работа велась с мутациями типа «Minute» (утонченные щетинки), признаком очень ненадежным, часто мало отличающимся от нормы; учет числа несущих его особей субъективен.

Наши первые опыты с двумя синтетическими полирибонуклеотидами полностью подтвердили предположения относительно их возможной высокой мутагенной активности [3]. Более того, оказалось, что эти полимеры обладали таким же избирательным мутагенным действием, которое свойственно природным полинуклеотидам. Это побудило нас расширить работу по изучению мутагенных свойств синтетических полинуклеотидов, изучить частоту вызываемых ими мутаций, комплементарные взаимоотношения мутаций, их локализацию на хромосоме.

Материалы и методы. Опыты проводили с двумя полидезоксирибонуклеотидами поли(дА) и поли(дТ) и четырьмя полирибонуклеотидами поли(А), поли(І), поли(У) и поли(А, С). Препарат поли(А, С) — производства фирмы «Serva» ФРГ, остальные препараты синтезированы в Сибирском отделении АН СССР в Новосибирске и любезно переданы нам проф. Р. И. Салгаником. Все препараты полинуклеотидов состояли из смеси молекул с молекулярной массой 10^5 — 10^6 , примесь белка — менее 1%. Эти вещества в физиологическом растворе инъецировали взрослым самцам *Drosophila melanogaster* нормальной линии Д-18, стандартно используемой в нашей лаборатории. Мухи получали в среднем по 0,25—0,30 мкг каждого из изучаемых полимеров. Поиск рецессивных леталей, индуцированных полинуклеотидами во второй хромосоме дрозофилы, вели общепринятым методом Су/Л². Самцы линии Д-18 были предварительно проверены на отсутствие летальных мутаций во второй хромосоме. Для этой цели самок тестерной линии Су/Л² индивидуально скрещивали с самцами Д-18, и в последующих скрещиваниях в F₂ изогабирозировали отдельные вторые хромосомы линии Д-18; затем этим же методом оценивали частоту возникновения мутаций под влиянием мутагенов.

Все хромосомы, содержащие летали, происходили от разных подвергавшихся воздействию самцов. Это исключало возможность появления «пучков», т. е. нескольких тождественных леталей вследствие митотической пролиферации гонимальной хромосомы. Каждая летальная мутация была далее генетически подтверждена. В контроле самцы получали инъекции физиологического раствора (0,9% NaCl).

Была проведена локализация ряда рецессивных летальных мутаций, возникших в хромосомах мух, обработанных поли(А)- и поли(І)-мутагенами. Для этого осуществляли скрещивания типа ВІ/Су×Су/І, где ВІ, L, Су — известные доминантные маркеры, а І — анализируемая летальная мутация. В потомстве мух F₂ вели учет расщепления среди мух «не-Су».

Результаты и обсуждение. Изучаемые полинуклеотиды оказались высокоэффективными мутагенами: частота рецессивных леталей, индуцированных ими во второй хромосоме дрозофилы, была во много раз выше, чем в контроле и колебалась от 2,4 до 6,4% (табл. 1).

Специфичность мутагенного действия полинуклеотидов изучали в так называемом тесте на аллелизм. Для этого скрещивали между со-

бой мух, гетерозиготных по рецессивным леталем, и таким образом определяли частоту аллелизма в пределах каждой группы леталей, индуцированных одним и тем же мутагеном. В качестве контроля служили частоты аллелизма леталей, возникших спонтанно или индуцированных другими мутагенами. Результаты аллельных взаимоотношений летальных мутаций иллюстрирует табл. 2. Среди леталей, индуцированных четырьмя полинуклеотидами, была выявлена очень высокая степень аллелизма, во много раз превышающая наблюдаемую при спонтанном возникновении леталей во второй хромосоме или при индуцировании их обычными физическими либо химическими мутагенами — γ -лучами, этиленмином. Особо высокая частота аллелизма была обнаружена среди леталей, индуцированных поли(dA) и поли(dI), соответственно 37,2 и 79,4 %, другие частоты аллелизма были менее высокими, а поли(U) и поли(dT) оказались в десятки раз менее специфичными по своему мутагенному действию, чем все остальные полинуклеотиды.

Таблица 1

Частота рецессивных леталей, индуцированных полинуклеотидами во второй хромосоме

Frequency of Recessive Lethals Induced by Polynucleotides in the Second Chromosome

Препарат	Число изученных хромосом	Частота леталей, % $\pm m$	Превышение над контролем, кол-во раз
Поли(A)	865	2,4 \pm 0,52	6,0
Поли(I)	747	3,9 \pm 0,71	9,8
Поли(U)	460	5,4 \pm 1,06	13,6
Поли(A, C)	248	6,4 \pm 1,56	16,2
Поли(dA)	481	2,7 \pm 0,74	6,2
Поли(dT)	470	3,6 \pm 0,86	9,1
Контроль	2000	0,4 \pm 0,13	—

Таблица 2

Аллелизм рецессивных леталей, индуцированных полинуклеотидами во второй хромосоме

Allelism of Recessive Lethals Induced in the Second Chromosome by Polynucleotides

Препарат	Число изученных леталей	Аллелизм, %	Препарат	Число изученных леталей	Аллелизм, %
Поли(U)	25	0,7 \pm 0,46	Контроли		
Поли(A, C)	16	6,4 \pm 2,77			
Поли(A)	21	15,2 \pm 2,42	Спонтанные летали	14	0,0 \pm 4,10
Поли(I)	28	79,4 \pm 2,08	Спонтанные летали [4]	102	0,2 \pm 0,10*
Поли(dT)	17	0,7 \pm 0,72	Этиленмин	42	0,0 \pm 0,20
Поли(dA)	13	37,2 \pm 5,47	γ -лучи [5]	100	0,3 \pm 0,10*

* Обе цифры, вероятно, значительно преувеличены. Один из авторов [4] изучал летали, найденные в природных популяциях, где тождественные рецессивные мутации обычно часты вследствие дрейфа генов; другой автор [5] работал с мутациями, индуцированными радиацией, вызывающей большое число делений, многие из которых могут включать по несколько локусов.

Высокая частота аллелизма леталей в пределах каждой из четырех групп леталей, индуцированных полинуклеотидами, показывает, что действие этих мутагенов характеризуется сильной внутривидовой специфичностью. Очевидно каждый из этих мутагенов затрагивает предпочтительно определенные гены или определенные ограниченные участки подвергавшейся воздействию хромосомы.

Мутагенное действие большинства исследованных синтетических полинуклеотидов столь же высокоизбирательно, как и мутагенное действие экзогенных ДНК или вирусов. Это видно из следующего. Известно, что минимальное число генов, способных мутировать к рецес-

сивному летальному состоянию, представляет собой величину, обратную вероятности того, что некоторые из возникших мутаций аллельны, т. е. затрагивают один и тот же локус. На основе этих вычислений можно приблизительно определить число локусов во второй хромосоме, которые могут мутировать к рецессивному летальному состоянию под влиянием испытанных полинуклеотидов. Для сравнения было принято, что во второй хромосоме существует около 1600 локусов, могущих спонтанно мутировать к рецессивной летальности (по разным данным их от 1400 до 2000 [6, 7]). Результаты расчетов приведены в табл. 3, из которой видно, что число локусов, мутирующих под влиянием синтетических полинуклеотидов в десятки и даже сотни раз меньше, чем число локусов, в которых происходят спонтанные мутации. В большинстве случаев число локусов, где возникают мутации под воздействием ДНК или синтетических полинуклеотидов, не превышает 10—15, в то время, когда спонтанно к рецессивному летальному состоянию мутирует, как уже говорилось, около 1600 локусов. Вследствие этого частота мутаций, вызываемых в каждом из немногих генов природными или синтетическими полинуклеотидами, в сотни и даже тысячи раз выше, чем спонтанная частота мутирования на один ген. Ничего даже отдаленно сравнимого с этой поразительной избирательностью не существует в действии всех известных до сих пор физических и химических мутагенов, и ни один из них не вызывает такого огромного возрастания частоты мутаций индивидуальных генов.

Таблица 3

Частота на один локус рецессивных летальных мутаций, индуцированных полинуклеотидами во второй хромосоме

Approximate Frequency per Locus of Recessive Lethals Induced by Polynucleotides in the Second Chromosome

Препарат	Среднее число локусов, затронутых мутациями	Частота мутаций на один локус, %	Превышение над спонтанной частотой, кол-во раз
Поли(И)	1,3	3,00	1500
Поли(А)	6,6	0,36	1800
Поли(А, С)	15,5	0,42	2100
Поли(У)	151,5	0,04	179
Поли(dT)	137,0	0,03	175
Поли(dA)	2,7	0,73	3650
Спонтанные мутации	1600	0,0002	—

Высокая специфичность мутагенного действия большинства синтетических полинуклеотидов получает дальнейшее подтверждение в своеобразной особенности аллелизма вызываемых ими мутаций, напоминающей таковую при изучении мутаций, индуцированных природными полинуклеотидами. Она выявляется, например, когда летальная мутация в хромосоме А аллельна мутациям в хромосомах В и С, последние же мутации между собой не аллельны. Этот факт проще истолковать таким образом, что в хромосоме А есть летали, расположенные в разных локусах и возникшие одновременно.

Проведенный Родиным [8] математический анализ сложных аллельных отношений привел к выводу, что лишь гипотеза множественных дефектов (полилетальности) дает возможность единым образом истолковать результаты комплементационного теста. Для окончательного установления полилетальности хромосом был поставлен и прямой опыт, в котором комплементационные данные были сопоставлены с данными рекомбинационного анализа. Оба теста хорошо соответствовали друг другу [9]. Таким образом, обнаружение полилетальности хромосом отражает еще одну особенность мутагенного действия большинства природных и искусственно синтезированных полинуклеотидов. Табл. 4 иллюстрирует это положение.

Ранее нами было установлено, что, хотя вызываемые разными ДНК или вирусами спектры мутаций в основном различны, эти различия не абсолютны [1]. Частота межгруппового аллелизма леталей, индуцированных разными естественными полинуклеотидами, всегда гораздо ниже, чем частота аллелизма в пределах каждой группы, но несколько выше, чем в контроле, и это превышение статистически достоверно. Это явление свойственно и изученным леталем, вызванным синтетическими полинуклеотидами, причем в некоторых случаях спектры мутаций, индуцированных разными полинуклеотидами, обнаруживают даже более значительное сходство, чем спектры мутаций, вызванных разными экзогенными ДНК. Так, например, 25 из 28 леталей, индуцированных поли(1) идентичны и расположены в правом плече второй хромосомы, несколько правее гена *Lobe*, примерно на 78-й единице кроссоверной карты; остальные три леталей не аллельны и лежат приблизительно на 6-, 15- и 32-й единицах карты. Среди 21 леталей, возникших под действием поли(А), 8 оказались аллельными той же большой группе леталей в серии поли(1), которая расположена правее гена *Lobe*, и локализованы в том же месте хромосомы; прочие же 13 леталей лежат в других местах. Таким образом, спектры мутаций, индуцированных поли(1) и поли(А), явно имеют много общего. Эти наблюдения показывают, что своеобразное необычное внутрихромосомное распределение мутаций, индуцированных экзогенными ДНК и синтетическими полинуклеотидами, т. е. избирательность действия каждого из этих мутагенов, определяется двумя составляющими. Главная из них — это специфичность действия данного мутагена, а вторая, имеющая подчиненное значение, характеризует гены или участки хромосом, особенно чувствительные к действию этих мутагенов.

Таблица 4
Полилетальные мутации, индуцированные полинуклеотидами
The Multisite Mutations Induced by Polynucleotides

Препарат	Число изученных леталей			Общее число и % полилетальных хромосом
	всего	связанных аллельными отношениями	одиночных	
Поли(А)	21	12	9	9 (42,8)
Поли(1)	28	25	3	0
Поли(А, С)	13	4	9	2 (15,4)
Поли(У)	25	4	21	0
Поли(dА)	13	9	4	9 (69,2)
Поли(dТ)	17	2	15	0

Истинные механизмы мутагенного действия естественных и искусственных полинуклеотидов не известны. Предполагается, например, что ДНК вызывает мутации инсерционной природы, включаясь в отдельные места генома по участкам неполной гомологии [10]. Возможны и другие варианты взаимодействия экзогенной ДНК с геномом, скажем, путем активации определенных мобильных элементов (МЭ) [11] без встраивания фрагментов ДНК в хромосому; МЭ в свою очередь вызвали бы полярные мутации или способствовали возникновению мутаций своими перемещениями. Подобным образом могли бы действовать и синтетические полидезоксирибонуклеотиды. Что касается мутагенного действия полирибонуклеотидов, то предполагался синтез ДНК-овых копий этих полимеров в клетке путем обратной транскрипции, а затем уже взаимодействие этих копий с геномом [3]. Однако последние косвенные данные по индукции летальных мутаций у дрозофилы с помощью поли(А), поли(У), поли(dТ) и поли(dА) не свидетельствуют в пользу этого довода. Действительно, поскольку вызываемый природными и искусственными полимерами мутагенез у дрозофилы, как правило, отличается высокой избирательностью дей-

ствия, спектры мутаций, вызываемых поли(А) и поли(dТ), поли(У) и поли(dА), должны до некоторой степени совпадать, однако такого явления не обнаружено. Более того, поли(dТ) и поли(У) оказались сравнительно малоспецифичными мутагенами. Не исключено, что синтетическим полинуклеотидам могут быть свойственны и иные механизмы мутагенного действия, в частности, по типу конкуренции за хромосомные белки [12].

Подводя итоги всему сказанному, мы думаем, что обнаружение высокоспецифического мутагенного действия экзогенных ДНК и синтетических полинуклеотидов открывает реальный путь к достижению давней мечты генетиков — научиться избирательно вызывать у вышших организмов мутации определенных генов, что имело бы большое значение для практической селекции. Тот важный факт, что один из испытанных синтетических полинуклеотидов по своему селективному действию намного превосходит аналогичный эффект других изученных полимеров искусственного и естественного происхождения, обнадеживает в плане принципиальной возможности подбора таких препаратов, которые будут вызывать мутации определенного нужного нам фенотипа у полезных организмов.

SELECTIVITY OF MUTAGENIC ACTION OF SYNTHETIC POLYNUCLEOTIDES

Yu. N. Alexandrov, S. M. Gershenson

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Solutions of high molecular weight synthetic polyriboadenylic, polyriboinosylic, polyribo-uridylic, polyriboadenylic-cytidylic, polydeoxyadenylic and polydeoxythymidylic acids injected into *Drosophila melanogaster* males caused a 6-16 time increase of the overall frequency of recessive lethals in the 2nd chromosome. Complementation analysis of the induced lethals showed an extremely high locus-specificity for some of these mutagens. Distribution along the chromosome of induced lethals is different for different polynucleotides. Possible mechanisms of the mutagenic action of synthetic polynucleotides are discussed.

1. Гершензон С. М., Александров Ю. Н., Малуца С. С. Мутагенное действие ДНК и вирусов у дрозофилы. — Киев: Наук. думка, 1975. — 160 с.
2. Fahmy O. G., Fahmy M. J. Differential induction of chromosome deletions by natural and synthetic macromolecules in *Drosophila melanogaster*. — *Genetics*, 1965, 52, N 5, p. 861—873.
3. Александров Ю. Н., Гершензон С. М. Мутагенное действие двух синтетических полирибонуклеотидов и его высокая специфичность. — *Молекуляр. биология*, 1982, вып. 30, с. 16—19.
4. Ives P. T. The genetic structure of American populations of *Drosophila melanogaster*. — *Genetics*, 1945, 30, N 1, p. 167—196.
5. Wallace B. Allelism of second chromosome lethals in *Drosophila melanogaster*. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1950, 36, N 2, p. 645—657.
6. Simmons M. S., Crow J. F. Mutations affecting fitness in *Drosophila* populations. — *Ann. Rev. Genet.*, 1977, 11, p. 49—78.
7. How many loci on the X-chromosome of *Drosophila melanogaster* commute to recessive lethals? / S. Abrahamson, F. E. Würgler, C. Dejongh, H. U. Meyer. — *Environ. Mutagens*, 1980, 2, p. 447—553.
8. Родин С. Н. Анализ аллельных отношений рецессивных леталей, индуцированных у дрозофилы чужеродными ДНК и некоторыми вирусами. — *Генетика*, 1974, 10, № 9, с. 94—105.
9. Alexandrov Y. N., Golubovsky M. D. The multisite mutations induced by viruses and forcing DNA can spread in natural populations of *Drosophila*. — *Drosophila Inform. Serv.*, 1983, 59, N 1, p. 10—11.
10. Александров Ю. Н., Гершензон С. М. Специфичность мутагенного действия ДНК разного происхождения. — В кн.: Молекулярные механизмы генетических процессов: Тез. докл. III Всесоюз. симпоз. М., 1976, с. 14—15.
11. Хесин Р. Б. Непостоянство генома. — М.: Наука, 1984. — 472 с.
12. Хесин Р. Б., Лейбович Б. А. Структура хромосом, гистоны и активность генов у дрозофилы. — *Молекуляр. биология*, 1976, 10, № 1, с. 3—33.

Ин-т молекулярной биологии
и генетики АН УССР, Киев

Получено 20.08.84