



УДК 631.52+632.954.576.7

Е. И. Черепенко

АМПЛИФИКАЦИЯ ГЕНОВ И ГЕРБИЦИДОУСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ

В обзоре кратко описаны основные черты процесса амплификации генов и охарактеризованы экспериментальные системы изучения этого процесса как у эукариот, так и прокариот. Суммированы последние данные по обнаружению генной амплификации у растений, в результате чего последние приобрели устойчивость к антиметаболитам, используемым как гербициды. Показано, что при исследовании механизма этого явления выделяются два направления: одно из них связано с изучением области от replication ДНК на отдельных участках генома, другое — с анализом рекомбинантных структур амплифицированных участков ДНК.

Введение. Получение растений, устойчивых к гербицидам, составляет важную задачу сельскохозяйственного производства. В последнее время в решении этой проблемы большое внимание стало уделяться изучению фундаментальных механизмов жизнедеятельности клетки. Одним из таких механизмов является генная амплификация, заключающаяся в резком увеличении количества ДНК на определенных участках генома, составляющих 10^2 — 10^4 тыс. п. н. [57]. В результате этого число копий того или иного гена и его продукта увеличивается и, следовательно, в статусе клетки возможны изменения, позволяющие ей приспосабливаться к конкретным условиям. Таким образом, генная амплификация — это один из регуляторных механизмов клетки. Впервые она была выявлена в клетках развивающегося организма низших эукариот [30, 55]. Обнаружена она также при действии на клетки различных цитотоксических веществ. Оказалось, что с помощью изменения содержания в клетке молекул — мишеней действия агента или молекулы, ответственных за его транспорт, клетка может защищаться и выживать [21]. При злокачественном перерождении клеток также найдены амплификация клеточных онкогенов и резко выраженные аномальные перестройки хромосом [6, 54].

В настоящее время работы, посвященные изучению генной амплификации, ведутся в двух направлениях. Первое развивается в плане изучения механизмов данного явления. Полученные в этой области результаты суммированы в ряде обзоров [6, 8, 21, 23, 50—52, 56, 57, 61]. Второе составляют исследования, цель которых состоит в получении повышенного содержания в клетке того или иного продукта на основе амплифицирующих векторов, а также вследствие коампликации [9, 11, 29, 59].

Генная амплификация привлекла также внимание как механизм, лежащий в основе проявления различными видами организмов устойчивости к пестицидам и антимикробным веществам. Так, оказалось, что устойчивость комара *Culex mosquito* к органофосфорным инсектицидам связана с амплификацией гена эстеразы, гидролизующей эти соединения [37]. Амплификация генов обнаружена у стойких к антимикробным веществам клеток дрожжей [70], лейшманий [18, 40], малярийного плазмодия [71], а также у организмов, устойчивых к тяжелым металлам [24, 28].

© Е. И. Черепенко, 1993

При воздействии на клетки растений гербицидов, представленных аналогами аминокислот, также обнаружена амплификация генов, кодирующих ферменты, являющиеся мишенью для данных ингибиторов [13, 53]. Происходит ли такое в условиях действия подобных ингибиторов на клетки прокариот, устойчивость которых к аналогам аминокислот возникает достаточно легко? Изучение этого вопроса представляет интерес не только в связи с обнаружением параллелизма и отличий процесса амплификации генов у прокариот и эукариот, но и с простотой подхода к выявлению генов, амплификация которых может привести к фенотипу устойчивости клеток к антиметаболиту, обладающему, в частности, гербицидным действием. Целью настоящего обзора явилось рассмотрение известных к середине 1990 г. результатов изучения генной амплификации у прокариот и эукариот.

Краткая история изучения генной амплификации. Об амплификации генов в клетках животных. В ранних обзорах, указанных во введении, описано обнаружение амплификации генов рРНК в развивающихся яйцах лягушки и приведены таблицы эукариотических генов, амплифицирующихся при развитии организма и дифференциации клеток, под действием цитотоксических агентов и при злокачественных перерождениях клеток. Кратко перечислим здесь наиболее исследуемые гены.

Помимо генов рРНК к первой группе амплифицирующихся генов относятся идентифицированные у дрозофилы кластеры генов белка оболочки яйца — хориона. При работе с зондом, представленным сДНК гена α -актина, отмечены большие вариации в содержании продукта этого гена в процессе миогенеза, но полные доказательства его амплификации отсутствуют [61].

Ко второй группе амплифицирующихся генов, позволяющих клеткам селективно выживать в условиях действия токсического агента, относятся следующие гены. Ген *dhfr*, кодирующий дигидрофолатредуктазу — DHFR, — необходим для синтеза *de novo* пуринов, тимидилата и глицина. Амплификация его обнаруживается при действии на клетки ингибитора этого фермента — метотрексата (MTX). Далее это — ген, кодирующий полифункциональный белок *CAD*, участвующий в трех реакциях, приводящих к синтезу UMP *de novo*. Амплификация этого гена видна на фоне воздействия такого аналога аминокислоты, как N-фосфоноацетил-L-аспартат (PALA), являющегося ингибитором аспартат-транскарбамилазной активности белка *CAD*. Влияние аналога метионина — метионинсульфоксимиона (MSX) способствует проявлению амплификации гена глутамин синтетазы, синтезирующей глутамин из глутамата и аммония, а под действием дезоксиформина выявляется амплификация гена аденозиндеаминазы, катализирующей превращение адениновых нуклеотидов в их инозинные аналоги. При изучении клеток, устойчивых к целому ряду лекарственных веществ, обнаружена амплификация специального локуса — *mdr*. В таких клетках резко увеличивается содержание мембранного белка — P-гликопротеина, функционирующего как АТФ-зависимый «насос», выводящий лекарства из клеток [16]. Возможно, что P-гликопротеин — это лишь один из компонентов общего механизма лекарственной устойчивости, поскольку обнаружено, что наряду с амплификацией гена *mdr-1* происходит амплификация еще каких-то пяти генов [65].

При действии тяжелых металлов установлена амплификация генов, кодирующих специальные цистеин-богатые белки — металлотионеины, связывающие ионы этих металлов. В настоящее время наиболее изучены гены MT-I и MT-II. При работе с клетками слизистой плесени обнаружены автономные последовательности хромосомного происхождения, присутствие которых в клетках в селективных условиях обуславливает устойчивость таких клеток к кобальту [28]. Характерно, что эта последовательность отличалась от известного ранее гена устойчивости к кобальту, следовательно, существуют по крайней мере два гена, отвечающих за этот признак.

Отличительной особенностью генов второй группы является то, что они могут быть использованы в качестве удобных амплификационных векторов. Таким образом, введение в клетки гена в составе генетической конструкции, способной к амплификации, открывает возможность синтеза в клетке повышенных количеств продукта введенного гена. Результаты исследований такого типа суммированы в работе [9].

Следует отметить, что получение клеток, устойчивых к тому или иному ингибитору, не свидетельствует однозначно об амплификации гена, кодирующего мишень этого ингибитора. В основе наблюдаемого явления могут лежать разные механизмы. Один из них — интенсификация экспрессии гена за счет подключения его к более сильному промотору [17]. Другой — мутационное изменение мишени, утрачивающей чувствительность к ингибитору [44, 60]. Возможны также изменения в процессах транспорта внутрь клеток и выведение веществ из клеток [16, 45, 46, 64]. И лишь увеличение копий исследуемого гена подтверждает истинность его амплификации.

Третью группу амплифицирующихся генов составляет многочисленные клеточные онкогены. Данные по их изучению суммированы в обзорах [6, 23, 56]. Здесь отметим, что анализ амплификации этих генов позволил показать возможность прохождения этого процесса в подавляющем числе мест клеточного генома, поскольку онкогены располагаются в самых разнообразных местах генома. При исследовании различных амплифицированных генов выявлен ряд общих черт, присущих процессу амплификации. Число копий генов варьирует в широких пределах — от нескольких десятков до нескольких сотен. Амплификация бывает нестабильной и стабильной. В первом случае выявляются специальные структуры (double minutes — DMs), которыми могут быть катенированные молекулы экстрахромосомной ДНК, выявляющейся в субмикроскопической форме [48]. Лишенная центромерных последовательностей такая структура нерегулярно наследуется в клеточных делениях, что объясняет нестабильность амплификации. Если DMs интегрирует в хромосомы, вызывая образование специфических областей ECR (expanded chromosomal regions), сохраняемых при митозах, то такой тип амплификации будет стабильным. Обычно в устойчивых клетках наблюдаются либо DMs-структуры, либо ECR. Однако описан случай и совместного присутствия этих элементов в одной клетке [20], при этом нестабильность наблюдалась не только для DMs, но и для ECR-структур.

Для получения клонов с амплифицированными генами, отвечающими за устойчивость клеток к цитотоксическим веществам, как правило, проводится ступенчатая селекция. В многочисленных опытах удалось измерить вероятность процесса амплификации, которая составила величину 10^{-3} на одно клеточное деление. Вещества, влияющие на синтез ДНК, способствуют возрастанию этой величины на порядок [51]. Более того, удалось отобрать мутантные линии клеток, у которых вероятность генной амплификации резко увеличена [57]. Механизм мутаций, вызывающих такой фенотип, еще неясен, и чисто условно для таких клеток вводится понятие об амплификаторе.

Многочисленные примеры и самый разнообразный характер генов, подвергающихся амплификации, указывают на существование специального механизма (или механизмов), осуществляющего этот процесс. В основе его, очевидно, лежат различные процессы. Амплифицирующие гены могут возникать в геноме либо в результате излишней репликации на локальных участках генома, либо в результате рекомбинации, происходящей между сестринскими хроматидами с помощью неравного кроссинговера. При изучении механизмов амплификации генов у эукариот большое внимание привлекли данные, показывающие возможность амплификации генов в геномах бактерий, более доступных для изучения на генетическом уровне. Кратко рассмотрим эти данные.

Об амплификации генов у прокариот. В обзорах [8, 56] суммированы результаты генетического анализа штаммов бак-

терий, полученных в условиях действия увеличивающихся количеств различных селективных агентов. В таких штаммах, как правило, обнаруживались дубликации соответствующих генов. Учитывая данные о вероятности возникновения генных дубликаций в различных условиях роста бактерий, Андерсон и Рот подсчитали, что примерно 3% бактериального генома представлено дублицированными генами [8]. Если дубликации обеспечивают селективное преимущество клеток, то должен существовать специальный механизм (или механизмы), поддерживающий это состояние.

При изучении таких механизмов внимание привлекла работа, в которой показана важность коротких гомологичных участков в бактериальном репликоне, являющихся местом рекомбинационных процессов, приводящих к делениям и объясняющих спонтанный характер образования последних [1, 5]. Однако эти же последовательности могут определять и обратный процесс — дубликацию гена, которая может происходить в результате неравного кроссинговера. Если это так, то особенностью дублицированного участка бактериального генома является наличие повторяющейся последовательности, которая была обнаружена в работе [15]. Изучая область *ampC* *Escherichia coli*, удалось показать амплификацию участка генома размером 10—20 тыс. п. н., и число копий генетического материала, включающего данную область, варьировало в пределах 30—50. Характерно, что это явление наблюдалось лишь в *recA*⁺-штаммах. При секвенировании фрагмента ДНК, содержащего область *ampC*, найден короткий повтор последовательности, состоящий из 12 п. н. Эти короткие гомологичные последовательности отстоят друг от друга на 10 тыс. п. н. Большой интерес вызвала также работа, в которой роль прямого повтора, фланкирующего участок амплификации, изучали с помощью различных манипуляций *in vitro*, а также исследовали влияние текста этой последовательности на процесс амплификации генов у бактерий [22]. При анализе механизма амплификации генов лекарственной устойчивости, передаваемых с помощью плазмиды, были обнаружены короткие повторяющиеся последовательности, совершенно отличные от IS-элементов [43].

При изучении фрагмента ДНК из области генома клеток *E. coli*, содержащего маркеры *pit-glyS-xyl*, в котором ген *glyS*, кодирующий глицил-тРНК синтетазу, часто обнаруживается в дублицированном состоянии, было найдено новое семейство повторяющихся последовательностей, фланкирующих этот участок бактериального генома. Эти последовательности получили название *ghs* — reorganization hot spot [34]. Они также отличаются от IS-элементов и представляют собой достаточно большие молекулы порядка 5500 п. н. Из них молекулы 3800 п. н. — это текст кора всего семейства. Остальная часть текста варьирует в зависимости от участка его обнаружения в геноме. Охарактеризованы *ghsA* и *ghsB*. Первая расположена между маркерами *xyl* и *mtl*, вторая отстоит от этих маркеров на 140 тыс. п. н. в направлении движения часовой стрелки. Возможно, что прохождение неравного кроссинговера между *ghsA* и *ghsB* неизбежно приводит к дубликации гена *glyS*. Оказалось, что дубликация этого гена осуществляется только в *recA*⁺-штаммах.

Для исследования механизмов амплификации генов у прокариот была сконструирована специальная система на модели лактозного оперона [63]. Особенность ее заключается в том, что регуляторная область гена β-галактозидазы, считывающегося с промотора гена репрессорного белка, содержит мутацию X, обеспечивающую лишь 8% эффективности трансляции. Клетки, содержащие такую конструкцию, имели фенотип *Lac*⁻. При увеличении количества копий такой конструкции, что может происходить в результате процесса амплификации, становится возможным проявление фенотипа *Lac*⁺, легко наблюдаемое в эксперименте. В условиях работы с этой системой было показано, что амплификация изучаемой генетической конструкции происходила в составе фрагмента ДНК, размер которого составлял от 7 до 37 тыс. п. н. и чис-

ло копий такого фрагмента варьировало в пределах 40—200. При этом в местах стыковки амплифицированной ДНК с флангами короткие повторяющиеся последовательности не обнаружены: либо они вообще отсутствуют, либо слишком короткие [63]. Действительно, оказалось, что на флангах амплифицированного участка, представленных негомологичными последовательностями, можно выделить специальный рекомбинационный сайт, состоящий из 3—5 п. н. [71]. Возможно, амплификация тех или иных генетических локусов является результатом работы достаточно различных механизмов. Следует отметить, что все описанные случаи амплификации генов в клетках *E. coli* происходили в рекомбинационно активных клетках, однако в рекомбинационно дефектных клетках амплифицированные привнесенные гены наследовались более стабильно [8].

Описаны случаи амплификации генов и в клетках *Bacillus subtilis*, также хорошо изученные генетически. В этих клетках данный процесс мог проходить как в зависимости от основного фермента рекомбинации, кодируемого геном *recE74*, так и независимо от функции этого гена [2]. В обоих случаях наблюдаемая генная амплификация носила нестабильный характер. С другой стороны, в рекомбинационно активных клетках *B. subtilis* удалось наблюдать совершенно стабильную амплификацию генов, введенных в хромосому этих клеток при использовании специальных генетических конструкций [38]. В подобных конструкциях гены разных генетических маркеров фенотипа антибиотикоустойчивости окружены различными прямыми повторами протяженностью от 2 до 4 тыс. п. н. В отдельных вариантах амплификация маркерного гена происходила неодинаково, и особенно сильно она проявлялась тогда, когда маркерный ген был окружен прямым повтором, представленным последовательностью плазмиды *pBR322*. Во всех случаях амплификация оказывалась очень стабильной и еще неясно, с чем это связано. Более того, было показано, что каждая копия амплифицированного маркерного гена полностью активна в штаммах, сконструированных таким образом. Размер амплифицированного участка при этом остался неизменным.

Обнаружение генной амплификации у растений. В опытах с культурами клеток растений было замечено, что при ступенчатой селекции можно получить клетки, устойчивые к широко используемому гербициду — глифосату. Поскольку установлено, что этот гербицид является ингибитором одного из ферментов на пути синтеза ароматических аминокислот — 5-снолпирувил-шикимат-3-фосфат синтазы (EPSP) [58] (см. обзоры [2, 31]), представляло интерес проверить, связана ли устойчивость таких клеток с повышением содержания EPSP. В результате показано, что в устойчивой линии культуры клеток *Petunia hybrida* активность данного фермента была в 15—20 раз выше, чем в чувствительных к глифосату клетках. Объясняется ли этот факт амплификацией гена EPSP в таких клетках? Чтобы ответить на этот вопрос, необходимо было выделить ген из клеток петунии и, применяя его как зонд, определить число копий гена EPSP в чувствительных и устойчивых клетках. Для этого использовали олигонуклеотидные зонды, синтезированные по аминокислотной последовательности с 8-го по 13-е положение молекулы EPSP, выделенной из линии клеток — сверхпродуцентов данного белка и частично секвенированной с N-конца [53]. Из этих же клеток-сверхпродуцентов выделяли поли(A⁺)РНК, получали сДНК, которую затем встраивали в векторный фаг. С помощью олигонуклеотидных зондов выявлено вставку в фаге клеточной последовательности ДНК размером не более 330 п. н., хотя размер полного гена EPSP, представленного сДНК, составляет 1,9 тыс. п. н. Секвенирование 330 п. н. показало, что данный фрагмент содержит начало гена EPSP, включающее, как и ожидалось, транзиторную последовательность, кодирующую пептид, необходимый для транспорта этого фермента из цитозоля в хлоропласты. При использовании этого секвенированного фрагмента как зонда для скрининга геномной библиотеки клеток

петунии идентифицирован клон, несущий вставку размером 20 тыс. п. н. Рестриктивное картирование и субклонирование такого клона позволили выделить фрагмент размером 4,6 тыс. п. н., который оказался продолжением текста 330 п. н. Благодаря этому удалось выявить в библиотеке сДНК клеток петунии, полученной на основе поли(A⁺) ДНК, выделенной из устойчивых к глифосату клеток, последовательности размером 900 и 1600 п. н. Оказалось, что фрагменты размером 1600 и 330 п. н. являются частями единого целого и их можно соединить по *EcoRI*-сайту. Так из частей был собран целый ген EPSP, включающий 27 н. 5'-нетранслируемой лидерной части гена, затем 72 кодона, кодирующих сигнальный пептид, 444 кодона, кодирующих зрелый белок, и 400 н. 3'-нетранслируемой области.

При гибридизации зонда, представленного геном EPSP с *EcoRI*- и *HindIII*-фрагментами ДНК, выделенными из чувствительных и устойчивых клеток соответственно, было показано, что если в первых содержится лишь одна копия гена EPSP, то в устойчивых клетках таких копий имеется около 20. Все они транскрипционно активны, так как результаты анализа количества мРНК данного фермента также показали 20-кратное его превышение над количеством, имеющимся в чувствительных клетках [53]. Итак, повышение содержания в клетках растения лишь одного вида молекул может привести к фенотипу гербицидоустойчивости, что еще раз подтверждает строго направленное мишенное действие глифосата.

В клетках растений, так же как и в клетках животных, концентрация того или иного генного продукта может быть увеличена не только за счет возрастания числа копий гена этого продукта, но и вследствие интенсификации экспрессии данного гена, наблюдаемой в том случае, если ген выражается под контролем более сильного промотора. Для растений сильным является промотор 35S транскрипта вируса мозаики цветной капусты. Воспользовавшись вектором на основе *Ti*-плазмиды, подсоединив к этому промотору клонированный ген EPSP и снабдив его взятой от гена нопалинсинтазы сигнальной последовательностью для полиаденилирования, удалось поднять концентрацию EPSP более чем в 30 раз в экстрактах клеток, устойчивых к глифосату. В полевых условиях данные трансгенные растения выдерживали полив с применением глифосата в дозах 0,5 кг на 1 га, что в 2—4 раза выше доз, применяемых на практике.

В связи с вышеизложенным ген EPSP растений привлек большое внимание, и в настоящее время он изучен у таких растений, как петуния и помидоры [19], а также у арабидопсиса [32]. В последнем случае было показано также, что подсоединение этого гена к 35S-промотору приводило к повышению количества фермента в клетках арабидопсиса и гербицидоустойчивости этого растения. Так, подключение гена EPSP к сильному промотору, обеспечивающему высокий уровень его экспрессии в растительной клетке, явилось надежным методом получения растений, устойчивых к такому гербициду, как глифосат. Однако установленная возможность амплификации в условиях ступенчатой селекции клеток под действием глифосата сделали ген EPSP новой моделью при изучении механизмов генной амплификации, происходящих в растительной клетке.

Генная амплификация в растениях обнаружена и в случае такого гена, как глутаминсинтетаза (GS), участвующая в азотном обмене клеток прокариот и эукариот. Данные об этом гене суммированы в работе [62]. В экспериментах с суспензионными культурами клеток люцерны удалось отобрать линии, устойчивые к концентрациям избирательного ингибитора GS — фосфинотрицину (PPT), которые 20—100 раз превышают концентрацию, используемую для полного подавления роста клеток. Активность GS в таких клетках была повышена в 3—7 раз по сравнению с контролем [13]. Используя описанную выше стратегию, авторами идентифицирован клон сДНК, кодирующий часть гена, и с помощью такого зонда было обнаружено, что в хромосомной

ДНК устойчивых линий клеток люцерны число копий GS составляет 4—11. Это коррелирует с данными по измерению активности указанного белка в исследуемых клетках. Позже удалось клонировать и секвенировать ген GS полностью. В результате показано, что величина амплифицированного участка в линиях клеток люцерны, устойчивой к PPT, составляет ~35 тыс. п. н., в то время как размер гена GS — 4 тыс. п. н. [62]. Итак, в клетках растений, очевидно, так же широко, как и в клетках животных, происходит амплификация генов, которая может служить приспособительным целям, а обнаруженные амплифицирующиеся гены растений — выступать в роли новой экспериментальной модели при изучении этого процесса.

Современное состояние изучения проблемы генной амплификации.

Как отмечалось выше, работы по этой проблеме ведутся в двух направлениях — биотехнологическом и фундаментальном. При использовании генов описываемого типа в качестве амплификационных векторов для получения повышенных количеств продукта того или иного гена, включенного в систему амплификации, наилучшие результаты в настоящее время удалось получить при экспрессии в клетках яичников китайского хомячка гена, кодирующего тканевый ингибитор металлопротеиназ [11]. Этот ген выбран в качестве модели для анализа максимальных возможностей процесса амплификации по той причине, что данный белок выводится из клеток и может быть точно измерен с помощью высокочувствительных иммунологических реакций. Оказалось, что в случае такого вектора, как GS, амплификация гена которой видна на фоне действия метионинсульфоксимидина, высокий уровень экспрессии репортерного гена наблюдался при его включении в единую систему транскрипции с векторным геном и подключении первого гена к отдельному промотору, представленному промотором цитомегаловируса человека, содержащим энхансер.

Так как при амплификации гена в процесс вовлекается участок генома значительной протяженности, способный кодировать не один, а большое число генов, становится возможной коамплификация гена, сцепленного с амплифицирующимся маркером, и это также можно использовать в практических целях. Наиболее подробное изучение коамплификации проведено в работе [47]. Здесь на примере гена АМР-деаминазы, амплифицирующегося при действии на клетки кофорицидина, с помощью техники «прогулки по хромосоме» обнаружена коамплификация нуклеотидных последовательностей, отличных от последовательности изучаемого гена. Одна из таких последовательностей обладала кодирующей способностью, и предполагаемый ген условно назвали *YI*. Используя банк данных, удалось показать, что текст сДНК гена *YI* соответствует тексту гена, кодирующего глутатион-S-трансферазу (GST), относящуюся к классу μ . (Известно, что этот белок кодируется семейством негибридирующихся между собой генов, относящихся к классу α , μ и π [16].) Действительно, в клетках, устойчивых к кофорицидину за счет амплификации гена АМР-деаминазы, выявлена повышенная активность GST. Соответствия между числом копий гена *YI* и уровнем активности GST в данном случае не наблюдалось. Случайно это или закономерно? Биологическая роль амплифицированных генов заключается в передаче клеткам селективных преимуществ. Отражается ли на судьбе клетки факт коампликации *YI*-гена, не являющегося селективным маркером? Возможно, что коамплификация GST — особый случай, поскольку это специальный белок, проявляющий активность в отношении многих электрофильных и липофильных субстратов, возрастающую в клетках с множественной лекарственной устойчивостью. Возможно, также, что GST служит одним из компонентов общего механизма устойчивости клеток к различным воздействиям. В последнее время интерес к этому белку возрастает (см. обзор [3]), и своего решения ждут вопросы о связи между уровнями активности GST в растениях, устойчивости к гербицидам, амплификацией генов-мишеней и коамплификацией сцепленных генов в системах амплификации. В на-

стоящее время проведение таких исследований на растениях возможно.

В изучении механизма геной амплификации также сложились два направления. Одно из них составляют работы по исследованию процессов репликации на участках генома, содержащих амплифицированные гены. Другое посвящено анализу структуры амплифицированных последовательностей ДНК. Кратко изложим имеющиеся данные.

При рассмотрении инициации синтеза ДНК на участке генома, где осуществляется амплификация, важно установить, существуют ли жестко фиксированные сайты инициации этого процесса или такие сайты могут формироваться в каких-то конкретных условиях жизнедеятельности клетки. В случае амплификации гена *dhfr* показано, что инициация синтеза ДНК на участке, включающем этот ген, всегда начинается в пределах одного и того же рестриктоного фрагмента, составляющего 28 тыс. п. н. и расположенного недалеко от 3'-конца этого гена [26]. В непосредственной близости от него обнаружена последовательность ДНК, ответственная за постоянное связывание хромосомной ДНК с матриком ядра [12], в то время как связь движущейся репликативной вилки с матриком является временной [68]. Таким образом, последовательности ДНК на участке расположения гена *dhfr*, подвергающегося амплификации, организованы особым способом, который, возможно, и определяет процесс амплификации этого участка генома. Более того, с применением метода сшивки ДНК *in vivo* и блокирования элонгации репликации (но не инициации синтеза) изучение новосинтезированных фрагментов ДНК в таких условиях позволило выявить еще одну область начала репликации, расположенную неподалеку от известной ранее. Этот новый элемент относится к классу повторяющейся ДНК генома клеток млекопитающих [7]. Области *ori* в районе 3'-конца гена, кодирующего DHFR в клетках китайского хомячка, выявлены авторами [25] при использовании недавно разработанной высоконадежной техники картирования границ репликаонов, подробно описанной в этой же работе. Обнаруженные здесь области *ori* данного ампликона сохраняли свою функцию при перенесении с помощью трансфекции в несвойственные им места. Однако детальное изучение *ori*, расположенной в районе 3'-конца гена *dhfr*, проведенное с помощью метода двумерного электрофореза, показало, что в пределах известного фрагмента размером 28 тыс. п. н. инициация синтеза ДНК может проходить в самых различных местах, и такой жесткой структуры, как *ori* бактерий, плазмид и вирусов [4], очевидно, не существует.

Аргументы «за» и «против» существования фиксированных областей начала репликации в различных ампликонах суммированы в работе [51]. Примерами данных «за» является то, что амплификация последовательностей ДНК, примыкающих к геному вируса SV-40, у которого нарушена область *ori*, не происходит, а также то, что существует строго фиксированная *ori* в случае амплификации кластера генов хронного белка яиц дрозофилы. В последнее время интенсивно изучается роль *cis*-элементов, регулирующих активность этого *ori*, и среди них охарактеризована последовательность ACE3 (Amplification Control Element), расположенная, так же как и один из кластеров этих генов, в 3-й хромосоме [39].

Об отсутствии фиксированных сайтов инициации синтеза ДНК в ампликонах свидетельствует, как уже отмечалось, резко возрастающая в случае действия ингибиторов синтеза ДНК вероятность амплификации генов, выявляемая в селективных условиях. Особо значимым оказался тот факт, что после удаления ингибитора наблюдается повторная репликация той части генома, в которой была остановлена вилка репликации [73].

Большой привлекательной силой обладала гипотеза, объясняющая такое явление возможностью отличного от стандартного способа инициации синтеза ДНК в экспериментальных условиях. Это связано с участием молекул особого типа, получивших название алармонов [66, 67].

Согласно гипотезе, остановившаяся вилка репликации каким-то образом служит сигналом для синтеза специальных молекул, получивших свое название из-за того, что они синтезируются в клетке в условиях стресса. Эти молекулы выполняют роль затравки при синтезе ДНК.

В качестве алармонов особое внимание привлекли такие соединения, как динуклеотидполифосфаты, среди которых Ar_4A был обнаружен первым как продукт синтеза *in vitro*, осуществляемого аминоксил-ТРИК синтазой [74]. При сверхпродукции многих ферментов этого типа в клетках *E. coli*, возникающей за счет экспрессии их генов, клонированных на основе мульткопийных плазмид, показана возможность синтеза соединений с общей формулой Ar_4N и *in vivo* [10]. Во многих работах выявляется связь между метаболическим состоянием клетки и уровнем содержания в ней динуклеотидов [74]. Тем не менее данная гипотеза остается недоказанной и в последнее время не рассматривается. Очевидно, это связано с тем, что факт реинициации синтеза ДНК в S-фазе подвергается сомнению. Последнее является предметом обсуждения в работе [57]. Для окончательного решения этого вопроса, очевидно, потребуются более чувствительные методы.

Другое заключение о нестандартности процесса инициации синтеза ДНК в экспериментальных условиях связано с представлением об увеличении концентрации белков, причастных к регуляции репликации. Основанием для него послужило то, что при остановке синтеза ДНК концентрация DHFR увеличилась в 10 раз [51]. Очевидно, ингибитор «замораживает» прохождение клеткой цикла, но не влиял на транскрипционную активность. Наряду с DHFR возрастала концентрация и еще каких-то белков, возможно, и инициаторных. При этом в случае бактериального репликона было показано, что с превышением содержания белка-инициатора над неким значением нормы размер области *ori* этого репликона, необходимый и достаточный для процесса инициации синтеза ДНК, резко сокращался [14]. Данные работы [33] указывают на то, что в процессе амплификации могут участвовать продукты генов, индуцируемых в клетках под влиянием стресса. Роль таких продуктов в описываемом процессе обсуждается также в обзоре [57].

Помимо важности повышенной концентрации белков, способных регулировать процесс репликации, обратил на себя внимание и тот факт, что амплификация генов хорионного белка осуществляется в том случае, если в клетке наблюдается временная экспрессия, и мРНК каким-то образом влияет на процесс амплификации данных генов (см. обзор [51]). Действительно, в упомянутой выше области ACE3 обнаружены канонические последовательности, определяющие процесс транскрипции.

При изучении вопроса об обязательном наличии в ампликоне области *ori* или возможности ее формирования в специфических условиях вызывают интерес данные об изучении влияния на процесс амплификации эффекта положения амплифицируемого гена в хромосомном аппарате клетки и на роль фланкирующих последовательностей [36, 41, 73]. Они изучены еще не так подробно, как последовательность ACE3.

Второе направление в изучении механизмов генной амплификации включает работы, исследующие структуру последовательностей ДНК амплифицированных участков генома. Основу его составили методы, позволяющие клонировать сверхбольшие фрагменты ДНК и гибридизовать их с различными геномными зондами. Это дало возможность выявить такую черту процесса амплификации, как образование участков ДНК, отсутствующих в соответствующих локусах исходных клеток и представленных новым сочетанием последовательностей ДНК. Подобное сочетание может быть как полностью произвольным, так и иметь «горячие точки» соединений [57]. Такие участки являются отпечатками прохождения в процессе амплификации реакций разрыва и неревоссоединения различных последовательностей ДНК клеток, находящихся в условиях стресса. Они получили название «новых соединений» (*novel joint*), или рекомбинационных соединений. Биологическое

значение этих реакций заключается, очевидно, в том, что хромосомные перестройки, являющиеся результатом разрывов и пересоединений нитей ДНК, могут обеспечить селективный ген определенными *cis*-элементами, ответственными за процесс амплификации [57].

Оказалось, что «новые соединения» представлены инвертированными дупликациями, способными образовывать палиндромы огромного размера. Это позволило выявить такие структуры по устойчивости ренатурированных продуктов амплифицированных последовательностей к нуклеазе S1. Ясно, что сайт, в котором происходит соединение плечей палиндрома, представляет большой интерес. Он был клонирован и амплифицирован. В связи с этим возникло представление о том, что самым первым шагом в процессе амплификации является образование инвертированного повтора, который затем также подвергается амплификации. Один из путей формирования такого повтора показан в работе [42]. При использовании маркерной генетической конструкции, не содержащей последовательностей крысиной ДНК и амплифицирующейся в клетках крысы, выявлены инвертированные последовательности крысиной ДНК в составе изучаемого ампликона. Следовательно, инвертированный повтор образуется в составе хромосомы, а не экстрахромосомно. Изучение сайта, соединяющего плечи палиндрома, свидетельствует об участии механизмов «незаконной» рекомбинации, не требующей гомологии рекомбинирующих структур. В этой работе дается объяснение и биологического значения возникновения инвертированных дупликаций в системах амплифицирующихся генов. Оно может состоять в возможности получения множества копий данного генетического материала, несмотря на то, что инициация синтеза ДНК при репликации может проходить в S-фазе только единожды. Примером увеличения копий репликона при однократной инициации области *ori* является 2 μ плаزمид пекарских дрожжей. Последняя представлена кольцевой ДНК, содержащей обратный повтор, асимметрично которому расположена область *ori*. В процессе репликации этого репликона вилки репликации движутся навстречу друг другу. Если произойдет рекомбинация между реплицированным плечом обратного повтора, расположенного ближе к области *ori*, и тем плечом, который еще не реплицирован, то вилки репликации начнут двигаться в одном и том же направлении, как бы догоняя друг друга. Репликация и увеличение копий репликона возможны до тех пор, пока не пройдет второй акт рекомбинации между обратными повторами или пока такая структура, образуемая по модели двойного катящегося кольца, не интегрирует в хромосому.

Принципиально другой способ образования обратного повтора предлагает модель, описанная в работе [27] и рассмотренная в обзоре [57]. Здесь кратко укажем, что данная модель создана в результате изучения «нового соединения» в ампликоне АМР-деаминазы, представленном также инвертированной дупликацией. Модель предполагает образование петли из палиндромной последовательности на одной из матриц дуплекса ДНК в глазке репликации. Как только вилка репликации окажется в месте образования данной петли, становится возможной переброска нити репликации на противоположную. Используя новосинтезированную ДНК второй неразорвавшейся родительской нити как матрицу, вилка репликации движется в сторону уже дуплицированной ДНК, образуя обратный повтор в ориентации голова-к-голове. Если на другом конце репликативного глазка происходят аналогичные события, то образуется обращенная структура в ориентации хвост-к-хвосту. Количество циклов репликации сформировавшейся таким образом структуры, позволяющей осуществлять синтез на основе модели двойного катящегося кольца, предложенной для объяснения механизма репликации 2 μ плазмиды дрожжей, определяет число копий нуклеотидных последовательностей того или иного ампликона. Модель амплификации генов получила название хромосомной спирали. Согласно ей, вырезание из состава хромосомы инвертированной дупликации, содержащей реплика-

тивный глазок, приведет к появлению в клетке автономно реплицирующейся структуры — эписомы.

Понятие об эписоме как промежуточном продукте процесса генной амплификации является основополагающим не только для объяснения механизма образования в клетке структур типа DMs, но и тех случаев, когда амплификация обнаруживается в местах генома, которые отличаются от естественного расположения данного гена в хромосомном аппарате. Как образуется эписома? Принципиально возможны два способа. Один из них связан с формированием новосинтезированного материала с последующим его лигированием. Такой материал должен включать область *ori*, обеспечивающую его автономную репликацию. Другой способ образования эписомы, являющейся промежуточным продуктом процесса амплификации, состоит в рекомбинационном вырезании данного участка из состава хромосомы, что приводит к появлению хромосомных делеций. Подобное представление отражено в модели процесса генной амплификации, получившей название делеция-плюс-эписома. Как может автономно реплицироваться такой продукт рекомбинации? Осуществление этого возможно в силу того, что либо в процесс рекомбинации вовлечен целый репликон, края которого сближены в структуре петли и по которым происходит рекомбинация так, что все функционально активные элементы репликона сохраняются, либо рекомбинация происходит в репликативном глазке. В таком случае вероятно образование структуры, способной реплицироваться без реинициации синтеза ДНК подобно тому, как это, очевидно, происходит при репликации 2 μ плазмиды дрожжей. Как происходит рекомбинация при возникновении делеции? При анализе этого вопроса большой интерес представляют данные, показывающие, что наиболее ранним промежуточным продуктом, доступным для экспериментального изучения (25 клеточных делеций), является инвертированная дупликация [48] в виде нестабильных экстрахромосомных элементов, составляющих нуклеотидные последовательности большой протяженности. Таким образом, возможно, что рекомбинация, приводящая к делеции, осуществляется на основе палиндромных последовательностей огромного размера, способных к репликации не только на основе областей *ori*, но и за счет введения вилки репликации в двойное катящееся кольцо.

Недавно предпринятое исследование судьбы эписом как ранних промежуточных продуктов процесса амплификации генов показало, что в случае ампликона гена *CAD*, изученного на примере одной из устойчивых к PABA линий клеток, экстрахромосомные молекулы, как правило, быстро интегрируют в самые различные хромосомы, причем в их теломерные участки или в участки, прилегающие к теломерам [49]. Повидному, с этим связаны наблюдаемые хромосомные аномалии, характерные для клеток, претерпевших генную амплификацию.

Существование большого числа самых разнообразных генов, способных к амплификации, и такого разнообразия условий, в которых она может протекать, свидетельствуют в пользу возможности участия различных механизмов, осуществляющих этот процесс. Одним из таких механизмов является неравный кроссинговер между сестринскими хроматидами, вследствие чего число копий гена в одной из хроматид увеличивается за счет материала другой хроматиды. Такой результат амплификации выявлен при делении клеток и в селективных условиях. Модель, основанная на представлении о прохождении неравного кроссинговера между двумя хроматидами, предсказывает однокопийность участка соединения разных копий данного гена и организацию копий гена в ампликоне в ориентации голова-к-хвосту. Схема и описание данной модели приведены в обзоре [57].

Итак, одним из механизмов, способных обусловить гербицидоустойчивость растений, является амплификация участка генома растительной клетки, содержащего ген, который кодирует молекулу — мишень данного гербицида. Исследования подобного явления у растений только начаты, и, безусловно, анализ этого процесса в клетках животных и бак-

терий представляет интерес. В настоящем обзоре сделана попытка кратко описания широкой панорамы данных лидирующего изучения этого явления в клетках животных и прокариот, а также суммированы первые результаты, демонстрирующие генную амплификацию в клетках растений.

Summary. General features of the amplification process in eukaryotes as well as prokaryotes and the known examples of the amplified genes are briefly reviewed. The discovery of amplified genes in plants resulting in their herbicide resistance is described. The dominant directions in the study of mechanism of gene amplification cover the study of *ori* regions and the recombinant structures of amplified DNA.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Колчанов Н. А., Соловьев В. В. Перестройки ДНК по участкам повторов и эволюция генов // Итоги науки и техники.— М.: ВИННИТИ.— 1985.— С. 81—122.— (Сер. Молекуляр. биология; Т. 21).
2. Хасанов Ф. К., Бакиров В. И., Прозоров А. А. Амплификация плазмидной ДНК, встроенной в хромосому *V. subtilis* // Генетика.— 1987.— 23.— С. 14—20.
3. Черепенко Е. И., Малюга С. С. О новых возможностях детоксикации гербицидов в растениях и окружающей среде // Успехи соврем. биологии.— 1990.— 110.— С. 461—474.
4. Черепенко Е. И., Галкин А. П. Проблема репликации ДНК и генетические манипуляции с растениями.— Киев: Наук. думка, 1987.— 161 с.
5. Albertini A. M., Hoffer M., Callas M. P., Miller J. H. On the formation of spontaneous deletion: importance of short sequence homologies in the generation of large deletions // Cell.— 1982.— 29.— P. 319—321.
6. Alitalo K., Schwab M. Oncogene amplification in tumor // Adv. Cancer. Res.— 1986.— 47.— P. 235—281.
7. Anachkova B., Hamlin J. Replication in the amplified dehydrofolate reductase domain in CHO cells may initiate at two distinct sites one of which is a repetitive sequence element // Mol. and Cell. Biol.— 1989.— 9.— P. 532—540.
8. Anderson R. P., Roth J. K. Tandem genetic duplications in phages and bacteria // Ann. Rev. Microbiol.— 1977.— 31.— P. 473—509.
9. Bebbington C., Hentshell C. The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells // DNA cloning.— New York: Acad. press, 1987.— Vol. 3.— P. 163—188.
10. Brevet A., Chen J., Leveque F. et al. *In vivo* synthesis of adenylated bis 8(5'-nucleotidyl)tetrathosphates Ap₄N by *Escherichia coli* aminoacyl-tRNA synthetases // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1989.— 86.— P. 8275—8279.
11. Cockett M., Bebbington C., Yarranton G. High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in chinese hamster ovary cells using glutamine synthetase gene amplification // Biotechnol.— 1990.— 8.— P. 662—667.
12. Dijkwel P., Hamlin J. Matrix attachment regions are positioned near replication initiation sites // Mol. and Cell. Biol.— 1988.— 8.— P. 5268—5279.
13. Donn G., Tischer E., Smith J., Goodman H. M. Clutamine synthetase gene amplification in alpha alpha // J. Mol. and Appl. Genet.— 1984.— 2.— P. 621—625.
14. Dotto I. C., Zinder N. Increased intracellular concentration of an initiator protein markedly reduces the minimal sequences required for initiation of DNA synthesis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1984.— 81.— P. 1336—1340.
15. Edlund T., Normark S. Recombination between short DNA homologies causes tandem duplication // Nature.— 1981.— 292.— P. 269—271.
16. Endicott J. A., Ling V. Cluthatione-S-transferase // Ann. Rev. Biochem.— 1989.— 58.— P. 137—171.
17. Friedman J. S., Coffey C. L., Anderson C. L. et al. High expression in mammalian cells without amplification // Biotechnol.— 1989.— 7.— P. 359—362.
18. Carvey E. P., Santi D. V. Stable amplified DNA in drug-resistant *Leishmania* exists as extrachromosomal circles // Science.— 1986.— 233.— P. 535—540.
19. Gasser Ch., Winter J., Hironaka C., Shah D. Structure, expression and evolution of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase gene in petunia and tomato cells // J. Biol. Chem.— 1988.— 263.— P. 4280—4289.
20. Gudkov A. V., Chernova O. V., Kazarov A. L., Koptin B. B. Cloning and characterization of DNA sequence amplified in multi-drug resistant Djungarian hamster and mouse cells // Somat. Cell. Mol. Genet.— 1987.— 13.— P. 609—619.
21. Gudkov A. V., Koptin B. P. Gene amplification and multi-drug resistance // Sov. Sci. Rev. D. Physicochem. Biol.— 1987.— 7.— P. 95—136.
22. Guttererson N. I., Koshland Jr. D. E. Replacement and amplification of bacterial genes with sequences altered *in vitro* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1983.— 80.— P. 4894—4898.
23. Hamlin J., Milbrand D., Heitnz N. H., Azikhun J. DNA sequence amplification in mammalian cells // Int. Rev. Cytol.— 1984.— 90.— P. 31—82.

24. Hamer D. M. Metallothionein // Ann. Rev. Biochem.—1986.—55.—P. 913—951.
25. Handeli S., Klaw A., Meuth M., Cedar H. Mapping replication unit in animal cells // Cell.—1989.—57.—P. 909—920.
26. Heintz N. N., Hamlin J. An amplified chromosome sequence that includes the gene for DHFR initiates replication within restriction fragment // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1982.—79.—P. 4085—4091.
27. Hyrien O., Debatisse M., Buttin, Robert de Saint Vincent C. The multicopy appearance of a large inverted duplication and the sequence at the inversion joint suggest a new model for gene amplification // EMBO J.—1987.—7.—P. 407—417.
28. Jensen S., Ashkoh H., Hughes J., Welker D. Gene amplification association with the dominant cob-354 cobalt resistance trait in *Dictyostelium discoideum* // Mol. and Gen. Genet.—1989.—220.—P. 25—32.
29. Israeli N., Chenciner N., Struck R. E. Amplified expression vectors for mammalian cells // Gene.—1987.—51.—P. 197—207.
30. Kafatos F., Orr W., Delidakis C. Developmentally regulated gene amplification // Trends Genet.—1985.—1.—P. 301—306.
31. Kishore G., Shah D. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides // Ann. Rev. Biochem.—1988.—57.—P. 437—442.
32. Klee M., Muskopf Y., Gasser Ch. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding EPSP: sequence analysis and manipulation to obtain tolerant plants // Mol. and Gen. Genet.—1987.—210.—P. 432—442.
33. Kleinberger T., Flint Y., Blank M. et al. Carcinogene-induced trans activation of gene expression // Mol. and Cell. Biol.—1989.—8.—P. 1366—1370.
34. Ling B.-Jang, Capege M., Hill C. A repetitive DNA sequence *rhs* responsible for duplications with *E. coli* K12 chromosome // J. Mol. Biol.—1984.—177.—P. 1—18.
35. Looney J., Chi-Ma, Tsen-Hoon Ley et al. DHFR amplicons in different MTX-resistant chinese hamster cell lines // Mol. and Cell. Biol.—1988.—8.—P. 5268—5279.
36. Meinkoth J., Killary A., Fournier R., Wahl G. Unstable and stable CAD gene amplification: importance of flanking sequence and nuclear environment in gene amplification // Ibid.—1987.—7.—P. 1415—1424.
37. Mouches C., Pasteur N., Berge J. et al. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in *California cullex mosquito* // Science.—1986.—233.—P. 778—780.
38. Niaudel J., Pierre E., Ehrlich S. Stable gene amplification in the chromosome of *Bac. subtilis* // Gene.—1985.—40.—P. 47—55.
39. Orr-Weaver T., Johnston C., Spradling A. The role of *Ace-3* in *Drosophila* chorion gene amplification // EMBO J.—1989.—8.—P. 4153—4162.
40. Quelle M., Fase-Fowler F., Borst P. H-circle of methotrexate resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene // Ibid.—1990.—9.—P. 1027—1033.
41. Pasion S., Hartigan J., Kumar V., Biswas D. DNA sequence responsible for the amplification of adjacent genes // DNA.—1987.—6.—P. 419—428.
42. Possananti C., Davies B., Ford M., Fried M. Structure of an inverted duplication formed as a first step in a gene amplification event: implication for a model of gene amplification // EMBO J.—1987.—6.—P. 1697—1703.
43. Peterson B. C., Rowand R. H. Homologous sequence other than insertion elements can serve as recombinant sites in plasmid drug resistance gene amplification // J. Bacteriol.—1983.—156.—P. 177—185.
44. Peterson D. S., Walliker D., Williams T. E. Evidence that point mutations in dihydrofolate reductase thymidilate synthetase confer resistance to pyrimethamine in *Falciparum malaria* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85.—P. 9114—9118.
45. Rice G., Hoy C., Schimke R. Transient hypoxia enhances the frequency of dihydrofolate reductase gene amplification in Chinese hamster ovary cells // Ibid.—1986.—83.—P. 5978—5982.
46. Rice G., Ling V., Schimke R. Frequencies of independent and simultaneous selection of Chinese hamster cells for methotrexate and doxorubicin resistance // Ibid.—1987.—84.—P. 9261—9264.
47. Robert de Saint Vincent B., Hyrien O., Debatisse M., Buttin G. Coamplification of μ -class glutathion-S-transferase genes and adenylate deaminase gene in coformycin-resistant chinese hamster fibroblasts // Eur. J. Biochem.—1990.—193.—P. 19—24.
48. Ruiz J., Wahl G. Formation of an inverted duplication can be an initial step in gene amplification // Mol. and Cell. Biol.—1988.—8.—P. 4302—4313.
49. Ruiz J., Wahl G. Chromosomal destabilization during gene amplification // Ibid.—1990.—10.—P. 3056—3066.
50. Schimke R. Gene amplification in cultured animal cells // Cell.—1984.—37.—P. 705—713.
51. Schimke R., Sherwood S., Hill A., Johnston R. Overreplication and recombination of DNA in higher eukaryotes: Potential consequences and biological implications // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83.—P. 2757—2761.
52. Schimke R. T. Gene amplification in cultured cells // J. Biol. Chem.—1988.—263.—P. 5989—5992.
53. Shah D., Horsch R., Klee M. et al. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants // Science.—1986.—233.—P. 478—481.
54. Slamon D., Goddphin W., Jones L. A. et al. Studies of the HER-2/neuprotocogene in human breast and ovarian cancer // Science.—1989.—244.—P. 707—712.

55. Spradling A., Orr-Weaver T. Gene amplification // Ann. Rev. Genet.—1987.—21.— P. 373—403.
56. Stark G. R., Wahl G. Gene amplification // Ann. Rev. Biochem.—1984.—53.— P. 447—449.
57. Stark G. R., Debatisse M., Giulotto E., Wahl G. Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification // Cell.—1989.—57.— P. 901—908.
58. Steinrücken H., Schults A., Amrhein N. et al. Glyphosate-tolerant plant tissue culture // Arch. Biochem. and Biophys.—1986.—244.— P. 169—172.
59. Stephens B., Cockett M. The construction of highly efficient and versatile set of mammalian expression vectors // Nucl. Acids. Res.—1989.—17.— P. 7110—7119.
60. Siritmakandada S., Schwetzen B., Morrison B. et al. Amplification of polymorphic dhfr gene expressing an enzyme with decrease binding to methotrexate in a human colon carcinoma cells line HCF-8 R4 resistant to this drug // J. Biol. Chem.—1989.—264.— P. 3524—3528.
61. Taira M., Koike K. Gene amplification // Tampakushitsu, kakusan koso — Protein, Nucl. Acids, Enzymes.—1984.—29.— P. 152—163.
62. Tischer E., Das Sarma S., Goodman M. Nucleotide sequence of an alfa alfa glutamine synthetase gene // Mol. and Gen. Genet.—1986.—203.— P. 221—229.
63. Tlsty T., Albertini A., Müller J. Gene amplification in the *Lac* region of *E. coli* chromosome // Cell.—1984.—37.— P. 217—224.
64. Tlsty T., Brown A., Schimke R. Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of *c-fos*, *c-myc* and actin gene transcription // Mol. and Cell. Biol.—1984.—4.— P. 100—105.
65. Van der Bliek A., Van der Velde-Koerts T., Ling V., Borst P. Overexpression and amplification of five genes in a multidrug resistant CHO // Ibid.—1986.—6.— P. 1671—1678.
66. Varshavski A. Do stalled replication forks synthesize a specific alarmone? // J. Theor. Biol.—1983.—105.— P. 707—714.
67. Varshavski A. Ap₄A-A pleiotropic acting alarmone // Cell.—1983.—34.— P. 711—712.
68. Vaughn J., Dijkwel P., Mullengers M., Hamlin J. Replication forks are associated with the nuclear matrix // Nucl. Acids Res.—1990.—18.— P. 1965—1975.
69. Vaughn J., Dijkwel P., Hamlin J. Replication initiates in a broad zone in the amplified DHFR domain // Cell.—1990.—61.— P. 1075—1080.
70. Walton J., Raquin C. E., Kaneko K., Williamson V. H. Resistance in yeast to antimycin A // Ibid.—1986.—46.— P. 857—863.
71. Whoriskey S. R., Ngheim V., Leon P. et al. Genetic rearrangements of gene amplification in *E. coli*: DNA sequence at functions of amplified genes // Genes and Develop.—1986.—1.— P. 227—237.
72. Wilson C., Serrano A., Wasley A. et al. Amplification of a gene related to mammalian *mdr* gene in drug-resistant *Plasmodium falciparum* // Science.—1989.—244.— P. 1184—1186.
73. Wahl G., Robert de Saint Vincent B., Deroose M. Effect of chromosomal position on amplification and transfection of genes in animal cells // Nature.—1984.—307.— P. 516—520.
74. Woodcock D. M., Cooper I. A. Gene amplification // Cancer Res.—1981.—41.— P. 2483—2490.
75. Zamecnik P. Diadenosine 5'5''p₁p₄-tetraphosphate (Ap₄A): Its role in cellular metabolism // Anal. Biochem.—1983.—134.— P. 1—10.
76. Young M. Gene amplification in *Bacillus subtilis* // J. Gen. Microbiol.—1984.—130.— P. 1613—1618.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев

Получено 09.11.92