

И. А. РАПОПОРТ, М. Н. САХАРОВА, Ю. Л. НИКИФОРОВ, М. М. БЕКНАЗАРЬЯНЦ

ИНДУКЦИЯ НОВЫХ И СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПУФОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПЕРХЛОРАТА

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 6 V 1970)

В (1) был описан первый пример сопряжения в виде новых пуфов фенкопии с проявлением функциональной геной активности на внутривромо-сомном уровне. Хотя мы пока не имеем возможности точно указать, какой из пуфов связан с фенкопией, но можно предположить что это какой-нибудь один из новых, наиболее морфологически выраженных пуфов. Для выявления степени общности и распространения нового генетического эффекта было изучено на дрозофиле действие другого ферментативного яда — перхлората натрия, вызывающего фенкопию с более высокой частотой проявления. Перхлорат в концентрации 1 : 100, 1 : 250 вызывал стерильность у 25% самцов и самок *D. melanogaster* (2). Морфологически стерильность определялась полным отсутствием наружного полового аппарата в результате отщиповки последнего сегмента. Иногда у стерильных самцов имелись наружные гениталии, но они были или частично «отщипованы» или повернуты на 60—180° в сравнении с нормой. У стерильных самок брюшко было укорочено. Половые железы у обоих полов заметно уменьшены. Стерильные насекомые были очень недолговечны из-за атрезии. Другие вторичные половые признаки (окраска брюшка и половые гребешки) были развиты нормально. Сходное отклонение встречается в виде мутации, для которой также характерно неполное проявление. Для изучения действия перхлората натрия на пуфообразование у *D. melanogaster* нами был взят ряд концентраций, от сублетальных 3,3 М и 1,3 М, которые в цитируемой работе давали фенкопии, до микродоз $2,5 \cdot 10^{-5}$ М.

Частота фенкопий, вызываемых перхлоратом, оказалась пропорциональной количеству вещества и достигала своего максимума при сублетальной концентрации. Все приведенные ниже результаты были получены на личинках дикой Батумской линии Д-32, достигших возраста 120 час., весь цикл развития которых проходил в пробирках с питательной средой, содержащей $2,5 \cdot 10^{-5}$ М перхлората натрия. Методика приготовления давленных временных и постоянных препаратов из слюнных желез описана в (1). Там же указаны оценки пуфов по четырем типам и графический способ их изображения. Результаты эксперимента по аутосомам — левым и правым плечам 2 и 3 хромосом приведены на гистограммах (рис. 1).

2L-хромосома. В нормальном развитии 17 пуфов являются постоянными маркерами этого плеча в хромосомах личинок в конце 3 стадии для используемой нами линии Д-32. В эксперименте абсолютное число пуфов сохранилось, но в наборе их произошли некоторые изменения. Появился небольшой новый пуф I типа — 34D, встречающийся у 10% личинок, и редко встречающийся — с частотой около 2% — пуф 39F. Пуфы 25B и 25D сливаются в один мощный пуф 25BCD. В локусе 27CD отмечается спадение размеров пуфа до 27C.

2R-хромосома. В норме имеет 21 пуф, а в эксперименте — 24 пуфа. Для перхлората специфичен новый пуф II типа 49A (около 25%). Кроме этого в хромосомах личинок, подвергавшихся воздействию перхлората, регулярно присутствуют еще два пуфа — 60B и 60E, которые в нормальном

развитии также встречаются, но редко (с частотой 1,5%), поэтому на гистограмме контроля они не отражены. Под влиянием перхлората оба эти пуфа достигают максимума своего развития на 110—115 час. у 30% личинок, к 120 час. их активность падает и они регистрируются уже как пуфы I типа. Стимуляция активности наблюдается в районе 42BC и 54B, но спадает размер пуфа 57E.

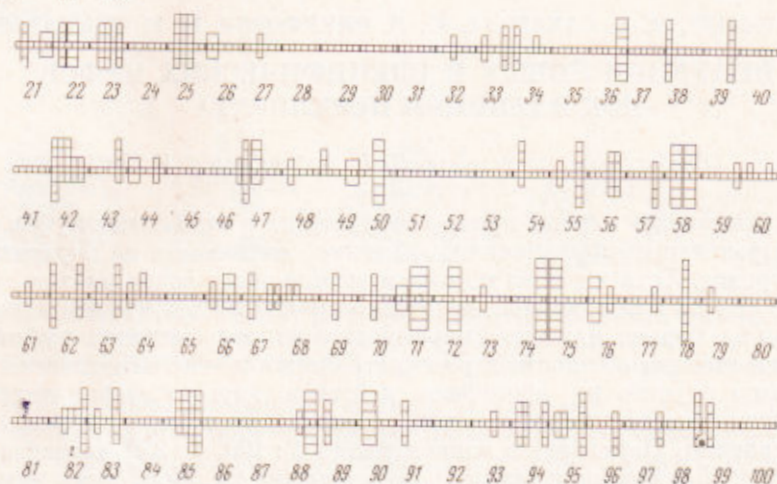


Рис. 1. Влияние NaClO_4 в концентрации $2,5 \cdot 10^{-5} M$ на пуфы у личинок *D. melanogaster* 120-час. возраста

3L-хромосома. В контроле это плечо хромосомы имеет 24 пуфа, в эксперименте 27. С частотой 20—40% появляются три новых пуфа: — 64C (II — III типа), 68E (I типа) и 68C (I типа). Пуф 79EF тоже новый, но наблюдается довольно редко (около 3%). Размеры пуфов 62E, 63E и 66DE в эксперименте увеличиваются, что связано, очевидно, с ростом их активности.

3R-хромосома. Число пуфов в контроле и в эксперименте 24. Новых пуфов на этом плече хромосомы не обнаружено. В локусах 83E, 85CDEF, 90BC и 98F происходит значительное увеличение размеров нормальных пуфов. Снижение синтетической активности и вследствие этого сокращение размеров пуфов наблюдается в локусах 96E и 97F, которые в норме проявляются как пуфы III и II типа, а в эксперименте выражены как пуфы I типа.

В структуре 4 хромосом никаких изменений обнаружено не было.

Таким образом, в результатах эксперимента по воздействию перхлората натрия на формирование пуфов у *D. melanogaster* можно четко разграничить следующие явления.

1) Возникновение новых пуфов, неизвестных в норме, и являющихся, очевидно, специфическим ответом на перхлорат. В нашем эксперименте таких пуфов семь: 34D, 49A, 60B, 60E, 64C, 68B, 68C. Помимо перечисленных статистически достоверных пуфов, было обнаружено еще два новых, но редко встречающихся (с частотой 2—3%) пуфа: 39F и 79 EF.

2) Стимуляция активности нормальных пуфов, в результате которой происходит увеличение их размеров. Анализ аутосом выявил 10 таких пуфов; 25BCD, 42BC, 54B, 62E, 63E, 66DE, 83E, 85CDEF, 90BC, 98F, что составляет около 11% от общего числа нормальных пуфов всех аутосом.

4) Депрессия активности четырех нормальных пуфов: 27C, 57E, 96E, 97F, т. е. 4% всех аутосомных пуфов, выражающаяся в уменьшении их размеров по сравнению с нормой.

Приведенные результаты показывают, что политенные хромосомы личинок, выросших на питательной среде, содержащей даже микроколичест-

ва перхлората натрия, проявляют сильную реакцию на анион ClO_4^- . В этом отношении действие его сходно с хлористым хромом, вызывающим в принципе те же явления, но при ином наборе затронутых пуфов (¹).

Согласно исследованиям ряда авторов, описавших нормальный геном слюнных желез в различных линиях *D. melanogaster*, набор аутосом слюнной железы имеет 80—85 пуфов, к моменту их наибольшего выражения с четким стандартом для каждой линии (возраст — предкуколка) (²⁻⁶). Подобный ограниченный «спектр» пуфов, отражающих генную активность, кажется странным, так как в это время в организме насекомого огромная метаболическая активность сочетается с интенсивными процессами формообразования. Поэтому уже и раньше можно было предположить, что целый ряд синтезов протекает в политенной хромосоме, но не получает морфологического выражения, однако это не было доказано в эксперименте. Если ферментные яды действуют, как мы предполагаем, в основном по принципу обратной связи, то они могут «проявить» такие скрытые, т. е. ненапряженные синтезы, при которых не образуются пуфы. Иллюстрацией этому могут служить два пуфа 60В и 60Е, которые в норме регистрируются редко и поэтому не были занесены в карту хромосом, а под воздействием перхлората у личинок 110 и 115-час. возраста хорошо развиты и встречаются регулярно. Эти пуфы были отнесены к категории новых, хотя ясно, что они не могут считаться специфическими для воздействия перхлората, но только «проявляются» им.

Появление множественных пуфов, являющееся основной чертой воздействия ферментных ядов, каким бы способом оно ни осуществлялось, бросает свет на важный автоматизм генетической природы. Во всех случаях этим методом демонстрируется фундаментальная зависимость образования фермента от гена, чему не мешает наличие ряда промежуточных звеньев (информационных нуклеиновых кислот, рибосом и т. д.). Специфика появления множественных пуфов указывает на безупречный автоматизм генной реакции ресинтеза информации, необходимой для образования фермента после отключения ингибитором имевшегося фермента. Тем самым показано сохранение автоматизма не только при положительных, но и при отрицательных обстоятельствах синтеза, связывающих генный уровень с протоплазматическим ферментативным. Такая страховка составляет заметный биологический выигрыш при вмешательстве тормозящих агентов различных видов и способов действия.

Образование специфических пуфов с частотой 10—40% при использовании микродоз ($2,5 \cdot 10^{-5} M$) иллюстрирует заметное преимущество модели политенных хромосом по «непротрантности» над фенкопиями у личинок и имаго, частота появления которых была такой лишь при более высоких дозах, близких к сублетальным. Вместе с аналогичными данными в (¹), это указывает на высокую чувствительность хромосом слюнных желез к химическим агентам, вызывающим фенкопии. Для проявления новых пуфов характерно их присутствие в большинстве исследованных ядер дистальной части железы (см. описание методики в (¹)). Рассмотрим наиболее распространенные механизмы, объясняющие одновременное появление нескольких или многих отсутствующих в норме специфических пуфов.

Во-первых, одновременная уязвимость нескольких ферментов к действию ферментативного ингибитора, взятого в одной концентрации, скорее всего объясняется наличием в разных ферментах сходных или тождественных «горячих точек», т. е. простых группировок, важных для разрешения основного ферментативного действия и в то же время структурно сходных. Это не противоречит наличию в группе ферментов, поражаемых одним ингибитором, значительных расхождений по составу и функциональной каталитической характеристике. В случае поражения коферментов также возможно выведение из строя нескольких ферментативных реакций одним ядом, в частности, под действием ионов, если коферментами являются один и тот же или близкие элементы.

Во-вторых, одновременное отравление нескольких ферментов может наступить в результате торможения системы оперона, куда входят: а) несколько синтетических генов; б) ген-оперон; в) ген-индуктор (¹). В норме ген-индуктор задерживает работу оперона с помощью специального вещества — репрессора. Если ферментативный яд ингибирует индуктор, то не образуется или исчезает репрессор, и оперон включает в действие зависящие от него синтетические гены. В таком случае возможно появление пуфов по оперону и нескольким синтетическим генам. Такой механизм вероятен, в частности, для индукции фенокопирующим агентом нескольких расположенных по соседству пуфов. (Если ферментативный яд затормозит оперон в условиях, когда физиологически отсутствует репрессор и должны функционировать синтетические гены, то вместо появления нескольких пуфов наступит выключение сразу нескольких синтетических генов. Последний аппарат, возможно, важен для объяснения депрессии пуфов.)

В-третьих, торможение фермента, связанного с появлением очень большого количества ожидающих каталитического преобразования сырых продуктов, делает возможным включение побочной или запасной ферментативной системы. Одновременно с возникновением новых пуфов может сохраниться первый специфический пуф, если новый путь ферментативного преобразования по интенсивности уступает нормальному. Поскольку накапливающиеся продукты низкомолекулярны, то могут даже мигрировать из одних органов в другие. Поэтому нельзя исключить появления пуфа в данном органе за счет остановки синтеза в другом.

В-четвертых, увеличивается вероятность появления адаптивных ферментов при торможении нормального синтеза, что делает также возможным образование специфических пуфов в хромосомах.

В-пятых, существование генов, обозначаемых как плюс-модификаторы и минус-модификаторы, не исключает, что некоторые из них в случае перемены нормального уровня синтеза, который они модифицируют, способны включиться за счет своих собственных ресурсов и действовать в направлении нормировки генетического феномена. Это должно вызывать дополнительный пуф или систему пуфов, если модификатор включает синтетическую цепь из нескольких генов. Однако большинство генов-модификаторов в этом не участвуют.

Все упомянутые выше механизмы подчинены единой схеме обратной связи (²). При появлении одновременно нескольких или многих специфических пуфов нельзя, однако, исключить еще один механизм, в котором обратная связь не участвует. Имеется в виду стимулирующее влияние химического вещества в малой или умеренной концентрации, встречающееся также при действии ферментативных ингибиторов.

Указанные механизмы бросают свет не только на систематическое появление большого числа новых пуфов под влиянием агентов, вызывающих фенокопии, но и на механизм активации и депрессии существующих в норме пуфов. Активация может представлять собой результат частичного ингибирования связи между геном и ферментом под влиянием модификационного агента или следствие избирательной стимуляции одного гена. Депрессия может вызываться, в частности, полным или частичным ингибированием гена-оперона. Вслед за этим следует ожидать снижения активности пуфообразования генов, связанных с этим опероном.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
5 V 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Ю. Л. Никифоров, М. Н. Сахарова, М. М. Бекназарьянц, И. А. Рапопорт, ДАН, 194, № 2 (1970). ² И. А. Рапопорт, Тр. Инст. цитол., гистол., эмбриол., 2, в. 2, 1 (1948). ³ H. J. Becker, Chromosoma (Berl.), 10, 654 (1959); 13, 341 (1962). ⁴ M. Aschburner, Chromosoma (Berl.), 21, 398 (1967). ⁵ M. Aschburner, Chromosoma (Berl.), 27, 47 (1969). ⁶ В. А. Лычев, Цитология, 3, 325 (1965). ⁷ F. Jacob, J. Monod, J. Mol. Biol., 3, 318 (1961).