

УДК 575.23:576.312.32

ГЕНЕТИКА

Академик Н. П. ДУБИНИН, А. П. АКИФЬЕВ, Л. Г. ДУБИНИНА, А.-К. ЭРГАШЕВ

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС В ПРЕДМИТОТИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ И ОБРАЗОВАНИЕ ХИМИЧЕСКИ ИНДУЦИРОВАННЫХ АБЕРРАЦИЙ ХРОМОСОМ

Доказано ⁽¹⁾, что при образовании обменных перестроек сохраняется непрерывность ДНК по длине хромосомы. Это означает, что на конечных этапах формирования структурных мутаций хромосом происходят разрывы и воссоединения молекул ДНК, подобно тому, как это имеет место при некоторых элементарных генетических процессах. Ионизирующая радиация и алкилирующие мутагены индуцируют различные типы предмутационных потенциальных изменений ⁽²⁾. Реализация потенциальных изменений в конечные мутации, т. е. разрывы и воссоединения молекул ДНК, может рассматриваться как следствие искажения нормальных внутрихромосомальных процессов в участках, содержащих потенциальные изменения.

В связи с этим большой интерес имеет установление времени реализации предмутационных потенциальных изменений, а также природа генетических процессов, протекающих в те отрезки цикла, когда имеет место формирование структурных мутаций.

Алкилирующие соединения, как правило, индуцируют хроматидные мутации ^(3, 4). Обработывали клетки первого митоза корешков *Speris capillaris* ⁽⁴⁾ на 30-м часу роста сначала в течение 40 мин. этиленимином (0,01%), а затем через 18 и 30 час. в течение 40 мин. гипосульфитом (1%) (стадия постсинтеза — G₂). Материал фиксировали через один час после

Таблица 1

Влияние гипосульфита на число
мутаций хромосом

Вариант	Время введения гипосульфита после обработки этиленимином, час.	Число			Перестройки, %
		мета-фаз	клеток	перестроек	
Опыт	18	5750	352	355	6,17±0,09
Контроль		2308	153	159	6,88±0,28
Опыт	30	2193	138	143	6,52±0,26
Контроль		1747	123	129	7,38±0,37

введения гипосульфита. Так как рост корешков проходил на среде с колхицином, анализировали только клетки в первом митозе. Обнаружилось, что введение гипосульфита за один час до наступления митоза приводило хотя и к небольшому, но определенному уменьшению числа мутаций хромосом (табл. 1). Это отчетливо видно при введении гипосульфита через 30 час. после обработки мутагеном.

Статистическая обработка показала, что разница между опытным (этиленимин+гипосульфит) и контрольным (этиленимин) вариантами недо-

Варианты опыта *	Плоидность	Число изученных метафаз	Клетки с абберациями		Всего аббераций		Изолюкусные разрывы			
							без воссоединения		с воссоединением	
			число	%	число	на 100 клеток	число	%	число	%
I	Диплоиды	1000	9	0,90	9	$0,90 \pm 0,30$	—	—	2	$0,20 \pm 0,14$
II		1000	21	2,10	22	$2,20 \pm 0,47$	8	$0,80 \pm 0,28$	1	$0,10 \pm 0,1$
III		1310	312	$23,82 \pm 1,47$	432	$33,00 \pm 50$	64	$4,88 \pm 0,55$	173	$13,20 \pm 0,32$
IV		570	219	$38,42 \pm 2,04$	300	$52,63 \pm 1,6$	89	$15,61 \pm 1,6$	53	$9,26 \pm 1,3$
V		1800	264	$14,66 \pm 0,8$	296	$16,44 \pm 0,30$	45	$2,50 \pm 0,37$	116	$6,67 \pm 0,6$
VI		910	122	$13,41 \pm 1,13$	150	$16,48 \pm 1,34$	28	$3,08 \pm 0,58$	37	$4,07 \pm 0,67$

* I — контроль; II — контроль + ФУДР в G_2 ($5 \cdot 10^{-5}$ M); III — обработка семян ипритом (HN_2) VI — как в III +

стоверна. Это, возможно связано с тем, что в условиях колхицинового роста большая часть регистрируемых для анализа аббераций клеток во время действия гипосульфита находилась в стадии метафазы, где модификация не может быть обнаружена из-за сильной спирализации хромосом. Однако сама возможность уменьшения цитогенетического эффекта при действии модификаторов в конце предмитотического периода для нас уже перестала быть неожиданностью и вскоре получила подтверждение в опытах, проведенных для модификации дополнительного синтеза ДНК в G_2 -профазе.

Мы изучали эффект ингибиторов синтеза ДНК на вероятность реализации в G_2 -периоде предмутационных потенциальных изменений, индуцированных в G_1 -периоде в сухих семенах *Crepis capillaris* алкилирующими агентами.

Для проверки специфичности модифицирующего эффекта 5-фтор-2-деоксиуридина (ФУДР), т. е. для доказательства того, что реализация скрытых потенциальных изменений связана с торможением дополнительного синтеза ДНК в постсинтетическом периоде, мы комбинировали ФУДР с дефицитным предшественником, в данном случае с тимидином. Ранее было показано (⁵, ⁶), что введение ФУДР в стадии G_2 увеличивает выход хромосомных мутаций. Это подтвердилось в наших опытах. Однако наряду с этим было обнаружено, что при инкубации клеток проростков *Crepis*, обработанных бифункциональным азотистым аналогом иприта (HN_2) в G_1 -фазе, в смеси ФУДР+тимидин в эквимолярных соотношениях в G_2 -профазе, количество аббераций хромосом уменьшилось приблизительно в 1,5—2 раза по отношению к тому, что давал сам мутаген. Эксперимент был поставлен следующим образом. Воздушно-сухие семена *Crepis capillaris* обрабатывали водным раствором азотистого иприта в концентрации $7,5 \cdot 10^{-5}$ M в течение одного часа; отмытые от мутагена семена проращивали в термостате в чашках Петри на увлажненной фильтровальной бумаге при температуре 25°. Через 36 час. после обработки проростки переносили на 3 часа в растворы ФУДР $5 \cdot 10^{-5}$ M, ФУДР+тимидин, тимидин $5 \cdot 10^{-5}$ M в смеси с 0,01% колхицином. Фиксацию производили в смеси спирта и уксусной кислоты в соотношении 3:1. Абберации хромосом анализировали на временных ацетокарминовых препаратах.

В табл. 2 приведен суммарный результат по данным 4 опытов, в которых воздействие тимидином было проведено за 3 часа до фиксации корешков. В каждом из этих опытов количество аббераций при обработке клеток в G_2 -профазе тимидином уменьшалось примерно на половину по сравнению с эффектом азотистого иприта.

мутаций хромосом

Хроматидные делеции		Хроматидные обмены		Хромосомные aberrации		Gaps		Клетки с неразобранными aberrациями	
число	%	число	%	число	%	число	%	число	%
3	$0,30 \pm 0,17$	3	$0,30 \pm 0,17$	1	$0,10 \pm 0,10$	16	$1,60 \pm 0,40$	—	—
13	$1,30 \pm 0,36$	—	—	—	—	30	$3,0 \pm 0,55$	—	—
105	$8,00 \pm 0,75$	73	$5,57 \pm 0,65$	15	$1,14 \pm 0,29$	29	$2,21 \pm 0,41$	42	$3,20 \pm 0,49$
90	$15,80 \pm 1,7$	27	$4,74 \pm 0,9$	6	$1,05 \pm 0,43$	19	$3,33 \pm 0,76$	35	$6,14 \pm 1,04$
55	$3,05 \pm 0,41$	59	$3,27 \pm 0,43$	17	$0,94 \pm 0,23$	32	$1,80 \pm 0,32$	27	$1,50 \pm 0,29$
51	$5,60 \pm 0,78$	11	$1,21 \pm 0,37$	2	$0,22 \pm 0,16$	12	$1,32 \pm 0,38$	21	$2,31 \pm 0,5$

в концентрации $7,5 \cdot 10^{-5}$ М; IV — как в III + ФУДР в G_2 ; V — как в III + тимидин в G_2 ($5 \cdot 10^{-6}$ М); (ФУДР + тимидин) в G_2 .

Анализ спектра структурных мутаций, индуцированных ипритом в клетках *Speris*, показывает, что делеции и обменные перестройки (хроматидного типа) встречаются с неодинаковой частотой. Среди изолюкусных перестроек явно преобладают aberrации с воссоединением. Сенсибилизирующий эффект ФУДР связан с резким увеличением числа простых и изолюкусных разрывов, тогда как количество обменных aberrаций остается без существенного изменения. Уменьшение выхода структурных мутаций при добавлении в среду тимидина в предмитотическом периоде достигается в основном за счет хроматидных делеций, хроматидных обменов, изолюкусных разрывов с воссоединением; изолюкусы без воссоединений уменьшаются в незначительном количестве. «Защитный» эффект тимидина наблюдается также в том случае, если он присутствовал в среде в течение 2, 1,5 и 1 час. до фиксации. Однако инкубирование клеток в течение 6 и 10 час. до фиксации (с последующим отмыванием от тимидина и проращиванием в колхицине) не приводит к резко выраженному эффекту уменьшения aberrаций хромосом.

Таким образом, в настоящей работе впервые установлена возможность модификации цитогенетического эффекта иприта в сторону уменьшения выхода структурных мутаций хромосом, спустя длительное время после мутагенного воздействия. Полученные результаты показывают, что в клетках *Speris capillaris* предмутационные потенциальные изменения, индуцированные азотистым ипритом в G_1 -периоде, реализуются в окончательные мутации хромосом в предмитотическом периоде в течение короткого отрезка времени, не превышающего 1—3 час. до стадии метафазы, т. е. в конце G_2 -периода и профазе. Формирование aberrаций в это время связано с протеканием нормального внутрихромосомального процесса, одним из этапов которого является, по-видимому, синтез ДНК, необходимый для ликвидации временных одонитевых дефектов. Возможно, что это связано с генетическими рекомбинациями при сестринских межхроматидных обменах (⁷). Воссоединение ДНК, как конечный этап формирования хромосомных обменов, осуществляется на базе комплементарного взаимодействия дефектных участков, содержащих повторяющиеся нуклеотидные последовательности подобно тому, как это имело место в опытах Томаса (⁸), показавшего образование кольцевых структур в популяции молекул ДНК эукариотов. Вероятно, избыток экзогенного тимидина приводит к интенсификации дополнительного синтеза и, таким образом, к сокращению времени существования дефектов в ДНК, и, в конечном счете, к уменьшению выхода структурных мутаций.

Закключение о том, что формирование химически индуцированных хромосомных aberrаций, имеющее место спустя длительное время после

воздействия, находится в связи с процессом генетической рекомбинации, сделанное на основании настоящих экспериментов, находится в соответствии с ранее высказанным нами предположением ⁽⁶⁾ о том, что длительноживущие предмутационные потенциальные изменения по существу являются изменениями нуклеотидной последовательности в специфических (участвующих в генетической рекомбинации) участках ДНК.

Институт общей генетики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
10 VIII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ R. Kavenoff, B. H. Zimm, *Chromosoma (Berl.)*, 41, 1 (1973). ² Н. П. Дубинин, А. П. Акифьев, *Усп. совр. биол.*, 69, в. 2, 272 (1970). ³ B. A. Kihlman, *Hereditas*, 49, 353 (1963). ⁴ Н. П. Дубинин, Л. Г. Дубинина, *Генетика*, 4, № 9, 5 (1968). ⁵ B. Kihlman, B. Hartley, *Hereditas*, 59, 2-3, 439 (1968). ⁶ Н. П. Дубинин, Г. П. Македонов и др., *Генетика*, 8, № 4, 38 (1972). ⁷ А. П. Акифьев, В. Б. Макаров, *Усп. соврем. биол.*, 74, в. 3 (6) (1973). ⁸ C. A. Thomas. *J. Ann. Rev. Gen., California*, 5, 237 (1971).