

ЭМБРИОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ
МИКРОЭВОЛЮЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ

К. Г. ГАЗАРЯН

Институт молекулярной генетики АН СССР, Москва

Аннотация — Рассматриваются теоретические и практические аспекты мутирования и переноса генетических элементов. Подробно рассмотрены судьбы ДНК никотинных вирусов, введенных в полярную плазму. На основе обширного экспериментального материала развивается концепция, согласно которой молекулярно-генетической основой микроэволюционных событий являются не только изменения структуры отдельных генов, но и, в большей мере, групповые изменения генов как следствие перемещения инсерционных элементов.

Վանագրիւմ — Զննարկում են գենետիկական էվոլյուցիոն մուտացիաների և տեղափոխման տեսակի և փոխանցման ապակետները: Մանրամասնորեն քննարկվում է օնկոգեն վիրուսների ԳՆԻ-ի համապատասխան օրենսդրման ընթացիկը ներմուծված հետո: Բնօրինակ փորձարարական նյութի հիման վրա զարգացվում է հետզնայրիւմ, որի համաձայն միկրոէվոլյուցիոն երևույթների համար մոլեկուլային-գենետիկական հիմք են ծառայում ոչ միայն առանձին գեների ստրուկտուրային փոփոխությունները, այլ ավելի համառոտ գենների խմբային փոփոխությունները՝ որպես ինտերցիոն էվոլյուցիոն տեղափոխումների արդյունք:

Abstract — A new approach of inducing the genotypic variability in *Drosophila melanogaster* is proposed. It consists in microinjection of oncoviruses or their DNAs into the polar plasma or embryos at the stage of primary germ cell formation. The method allows us to obtain large amounts of unstable mutant lines showing reversions and new mutations with a frequency of 10^{-2} — 10^{-3} . Blot-hybridization and Dot-hybridization analyses reveal egogenous DNA sequences in the genome of many mutant flies. Beside visible mutations, the mutants show more active transpositions of mobile elements in the genome (particularly in X-chromosome) and changes in activity and thermostability of enzymes (aldolase). The spectra of loci mutating as a result of microinjecting oncovirus DNAs depend both on the recipient's genotype and on the nature of the injected DNA. A concept is suggested that oncovirus DNA injected into the embryo polar plasma imitates the function of endogenous mutator factors regulating the activity of transpositions of the genomic mobile elements and generating genotypic variability which plays an important role in microevolution.

Ключевые слова: онковирусы, инсерционные элементы, перенос генов, микроэволюция.

В настоящее время еще не сформулировано общепринятой концепции генетических основ адаптации и эволюции, хотя в рамках синтетической теории эволюции [3] за последние десятилетия сделано многое для объединения достижений генетики и учений о микро-макроэволюции и адаптации. В связи с накоплением большого фактического материала в области молекулярной биологии (темы и характер эволюционной изменчивости и полиморфизма белков и т. д.) и молекулярной генетики (ге-

истический код и его врожденность, организация генов и формы их изменчивости) начался новый этап теоретического осмысления основ синтетической теории, ее обогащения результатами новейших исследований, критического анализа основных положений.

Одним из важнейших вопросов в этой связи является изучение механизма порождения в онтогенезе той изменчивости, которая становится объектом отбора и определяет направление и темпы адаптивного и микроэволюционного процессов. Традиционно рассматриваются две формы изменчивости: постепенное накопление небольших изменений в ряду многих поколений (градуализм); быстрое, скачкообразное возникновение новых генотипов с комплексом изменившихся признаков (пунктуализм). До недавнего времени подавляющее большинство эволюционных генетиков придерживались идеи градуализма, однако сейчас все больше высказывается мнение о важной роли непостепенной изменчивости, не отвергающих также и фундаментальной значимости градуальных изменений [1, 2].

Одним из ограничений на пути этих исследований в экспериментальной генетике является низкая частота мутационных и рекомбинационных событий у высших организмов. В последние годы в молекулярной генетике наметились новые подходы, позволяющие преодолевать эти ограничения. Наиболее перспективными из них являются: методы переноса генов в геном животных путем микроинъекции в зиготы и эмбрионы; исследование явления нестабильности генов, обусловленной перемещениями мобильных элементов. Оба подхода возникли в последние 7—8 лет. Так, до 1980 г. работ по переносу генов в клетки высших организмов как научного направления фактически не существовало, хотя отдельные попытки трансформации культивируемых клеток млекопитающих предпринимались [5, 8]. Лишь после зарождения генной инженерии, позволившей использовать для этих целей не суммарные препараты ДНК, а клонированные гены, эта проблема приобрела реальную научную основу. Сначала опыты по трансформации во все расширяющемся масштабе успешно стали проводиться с культивируемыми *in vitro* клетками млекопитающих. Вопрос о возможности переноса генов в организм животного до 1980—1981 гг. оставался проблематичным и большинству исследователей представлялся неразрешимым исходя как из теоретических, так и технических позиций. Представлялось маловероятным, что чужеродный ген можно внести в десятки и сотни миллиардов клеток организма, где он должен тканеспецифично экспрессироваться.

Наши поиски в этом направлении были начаты в 1978 г. Анализ проблемы, подытоженный в специальной статье программного характера [4], привел тогда к выводу, что «... именно яйцеклетка (в ряде случаев — ранний зародыш) станет центральной мишенью будущих генно-инженерных работ на высших организмах» (стр. 39). Мы исходили из мысли, что, если гены путем микроинъекций вводить непосредственно в яйцеклетки, то они могут попасть в формирующиеся генеративные клетки и стать достоянием всех клеток организма и его потомства. С

использованием этого подхода и у нас в стране [6—10, 16, 19, 22—24], и в зарубежных лабораториях [21, 26, 27] были получены животные (мышь, дрозофила) — носители чужеродных генов, введенных в зиготы (у мышей) или ранние эмбрионы (дрозофила). В настоящее время это направление приобрело всеобщее признание как путь к генетической инженерии животных для решения научных и прикладных задач.

Параллельно с этим в последние 5—7 лет интенсивно развивались работы по исследованию неустойчивости генов.

Мобильные гены, первоначально открытые еще Мак Клинтон в 1952 г. на кукурузе [29], но оставшиеся не признанными до 1970 г., были обнаружены в составе клонированных повторяющихся ДНК дрозофилы [22, 28]. В исследовании этих элементов и их биологической значимости у дрозофилы можно выделить 2 этапа: обнаружение факта варьирующей локализации в геноме разных линий мобильных элементов, их молекулярная характеристика, показавшая одноплановость устройства концевых повторов у этих элементов, у провирусов, ретровирусов и бактериальных транспозонов [30]; установление факта наличия прямой связи между поведением этих элементов и явлением неустойчивости генов, встречающимся иногда в природных популяциях [15, 30].

В последнее время удалось, помимо регистрации уже имевших место в линиях перемещений мобильных элементов, наблюдать их в ходе эксперимента в исследуемых линиях [13, 20]. В этих работах перемещения мобильных элементов происходили спонтанно, т. е. под влиянием эндогенных индукторов. Ясно, что для более интенсивного исследования этого явления и, главное, для практического использования результатов его изучения *необходимы методы искусственного индуцирования неустойчивости генов с помощью экзогенных факторов.*

Уже первые результаты наших исследований по микроинъекциям генов в яйцеклетки показали, что эта задача разрешима именно с помощью микроинъекций в яйцеклетки определенных видов ДНК. Последние, как оказалось, служат не только материалом для расширения спектра генных рекомбинаций, но и факторами, *индуцирующими неустойчивость генов и перемещения мобильных элементов.* В результате работ, проведенных с использованием этого подхода, оказалось возможным разработать высокоэффективный метод направленного индуцирования неустойчивости генома, основанного на активации мутагорных систем, приводящих в движение мобильные элементы. Ниже изложены основные результаты этих исследований.

ДНК онкогенных вирусов как факторы дестабилизации генома.

Физические и химические мутагены обладают достаточной мощностью, но в их структуре не может быть заложено свойства, которые бы позволяли им узнавать специфические участки генома, т. е. обладать избирательностью действия [2]. Но главный недостаток используемых сейчас мутагенов состоит в том, что их действие связано с разрушением структуры ДНК, прямым или опосредованным. В настоящее время для решения научных и прикладных задач требуются не столько факторы, разрушающие (рентген, химические мутагены) или модифицирующие

(УФ), сколько такие мутагены, которые бы имитировали действие естественных факторов изменчивости (рекомбинации, мутации), имеющих в генетическом аппарате. Таковыми могут быть только биополимеры, белки, РНК, ДНК. Возможно, со временем будут созданы наборы таких мутагенов, состоящих из регуляторных белков, генов и т. д. Очевидно, однако, что наиболее перспективно использование определенных видов ДНК, которые будучи введенными в клетку могут обеспечить синтез необходимых регуляторных факторов, индуцирующих мутации. О том, что ДНК обладает мутагенностью, известно из работ Гершензона и сотр. [14]. Добавляя различные ДНК в корм личинок, они показали, что у мух возникают летальные мутации. Однако при этом не обеспечивается сохранность ДНК, т. е. в гаметы могут попадать только продукты его расщепления. Не исключено, что в этих условиях мутации вызываются именно нуклеотидами, которые также могут вызывать мутации. Но это уже вариант химического мутагенеза, в котором не проявляются структурные особенности ДНК как носителя наследственной информации. Для обеспечения сохранности ДНК ее нужно вводить в зиготы или ранние эмбрионы. Целесообразно, кроме того, вводить материал, содержащий определенную, ограниченную и известную генетическую информацию. В качестве такого материала можно использовать либо клонированные структурные или регуляторные гены, либо препараты вирусных геномов. Такие эксперименты были начаты нашей лабораторией совместно с лабораторией Ф. Л. Киселева (Онкологический научный центр) и Т. Н. Тихоненко (Ин-т вирусологии им. Ивановского) в 1979 г. Работа проводилась на мышах и дрозофиле. В первом случае материал вводился в пронуклеус зигот, во втором — в эмбрионы на стадии 70—80 мин развития при 25°. Инъекция производится с помощью многодозовых микроинъекторов [18]. В каждую зиготу (или эмбрион) вводится порядка 10^2 — 10^3 молекул ДНК. Выживаемость составляет 10% в опытах с дрозофилой и 10—40% — с мышами. В результате проведенных исследований было показано, что как вирусные ДНК, так и клонированные клеточные гены, введенные в зиготу или эмбрион, большей частью деградируют. Однако в определенном проценте случаев (~20% от выживших особей) от 0,3—0,4 до нескольких десятков копий введенной ДНК сохраняется, реплицируется вместе с хромосомами ДНК и распределяется по половым и соматическим клеткам [8, 11]. Анализ потомства показывает, что экзогенный генетический материал передается по наследству иногда по Менделю, но нередко с нарушением правил менделевского наследования. Последнее обусловлено тем, что чужеродная ДНК часто ведет себя неустойчиво в геноме нового хозяина — перестраивается, выщепляется и т. д. [11, 24].

Наметилось два важных направления в использовании этой новой для молекулярной генетики методологии. Первое состоит в переносе генов животного происхождения в нормальных гомологичных генов мутантам, дефектным по этим генам, с целью «генотерапии» [27], другое — в направленных воздействиях с помощью введенных ДНК на генотип хозяина.

Второе направление исследований по микроинъекциям ДНК было инициировано в 1981 г. [6]. В этой и последующих работах [10—12, 16, 19, 22, 23] было показано, что: 1. если в эмбрионы дикой линии *D. melanogaster* (Oregon R) на стадии начала формирования половых клеток вводить ДНК онкогенных вирусов (или сами вирусы), то в потомстве развившихся из них мух с высокой частотой ($10^{-2} - 10^{-3}$) возникают видимые мутации; 2. подавляющее большинство получаемых при этом мутантных линий является нестабильным: в них спонтанно, с такой же частотой происходят реверсии возникшей мутации и появляются новые мутации. Если в эмбрион вводить суммарные препараты ДНК дрозофилы, печени крысы, бактериальную плазмиду pB R322, видимых мутаций с такой частотой не индуцируется. Онковиральные ДНК не только более эффективны, но и обладают локуспецифичностью. При сравнении мутагенности ДНК аденовируса Sa7 и вируса саркомы Рауса (RSV) оказалось, что они индуцируют мутации в разных группах локусов: ДНК RSV индуцирует мутации в локусах, преимущественно локализованных в хромосоме 2, а ДНК Sa7 — в X-хромосоме и хромосоме 2 (табл.). Более подробно изучено действие ДНК Sa7. Оказалось, что в повторных опытах обнаруживается один и тот же спектр мутаций, но так как частота их индукции различается примерно на порядок, то в каждом конкретном опыте может проявиться лишь часть этих мутаций. Однако если проследить за мутантами дальше, то в по-

Мутантные линии, полученные в результате введения в эмбрионы *D. melanogaster* ДНК онкогенных вирусов [6, 9, 15, 18, 22]

Иницииро- ванная ДНК; линия—ре- ципиент	Обозна- чение мутации	Характеристика мутации
1	2	3
ДНК Sa 7; Oregon R	Sa7 ¹	Вырезка на дистальном конце крыла, рецессивная; хромосома 2.
	Sa7 ²	Нарушено положение анальной пластинки, проявлялась* у самцов.
	Sa7 ³	Некрозы на брюшке, рецессивная; проявляется у самцов и самок; хромосома 3.
	Sa7 ⁴	На крыле появляются дополнительные жилки, доминантная; хромосома 2.
	Sa7 ⁵	Глаза уменьшаются в размерах, нарушается расположение фасеток, рецессивная; X-хромосома.
	Sa7 ⁶	Желтое тело, рецессивная; X-хромосома.
	Sa7 ⁷	Вырезки неправильной формы по внутреннему краю крыла, доминантная; X-хромосома.
	Sa7 ⁸	Последний тергит брюшка уменьшается в размерах, перераспределение пигмента на брюшке, рецессивная; X-хромосома.
	Sa7 ⁹	Кутикулярные выросты в области глазков, иногда глазки редуцируются.
	Sa7 ¹⁰	Вырезки на крыльях неправильной формы, рецессивная; X-хромосома.
	Sa7 ¹¹	Некротические пятна на крыльях, доминантная; хромосома 2.
	Sa7 ¹²	Тергиты неправильной формы, проявлялась у самок.
	Sa7 ¹³	Крылья загнуты вверх, доминантная; хромосома 2.

1	2	3
ДНК RSV; Oregon R	RSV ²	Тергиты уменьшены в размерах, края их неровные, рецессивная, проявляется у самок; хромосома 2.
	Prc ^{1a}	Нарушено жилкование крыла, сливаются жилки $M_1 + 2$ и R_{1+5} ; проявлялась у самцов +.
	Prc ²	Темная пигментация тела, рецессивная; хромосома 3.
	Prc ³	Крылья с блестящими овальными пятнами, рецессивная; хромосома 2.
	Prc ⁴	Крылья с пыростами темного цвета, доминантная; хромосома 2.
	fem	Редукция фасеточного поля на 30%, рецессивная, хромосома 2.
	edf	Редукция фасеточного поля на 15—20%, кутикулярные выросты в измененной части глаза, рецессивная; хромосома 2.
ДНК RSV; гибриды T-007/Oregon R***	fem	(см. выше)
	edf	(см. выше)
	fes	Редукция фасеточного поля на 50—60%; доминантная; хромосома 2.
	Er	Полная редукция фасеточного поля; доминантная; хромосома 2.
	pj	Редукция фасеточного поля на 70—80%, дупликация пальп; доминантная; хромосома 2.
	Ce	Редукция фасеточного поля на 70—80%, фасетки расположены на кутикулярных пыростах +.
	Ad	Редукция фасеточного поля на 90—100%, дупликация антенн +.
	Od	Редукция фасеточного поля на 90—100%, дополнительный глазок в измененной части глаза; доминантная; хромосома 2.
	Curly	Крылья загнуты вверх; доминантная; хромосома 2.
	Gwt	Локальное утолщение крыловых жилок; доминантная; хромосома 3.
	w	аллель мутации white
	sn	аллель мутации sn

• все остальные мутации проявляются у самок и самцов.

•• мутации серии Prc в работе [23] обозначены индексом PrcA, B, C, d.

••• в этой серии реципиентами служили гибриды 1-го поколения с синдромом гибридного дисгенеза, полученные скрещиванием самцов линии T-007 (MR-линия, содержит несколько десятков копий Р-элемента) и самок Oregon R (не содержит Р-элемента).

+ линия не сохранилась вследствие пониженной жизнеспособности.

следующем, в течение 15—20 генераций, появляются остальные мутации (рис. 1), охватывая в общей сложности группу из 13 локусов (табл.). Эти опыты показали, что в геноме дикой линии *D. melanogaster* данная группа локусов (их число, возможно, больше), во-первых, взаимосвязана общей системой мутабельности (т. е. представляет собой единую мутационную систему), во-вторых, подвергается дестабилизации под влиянием ДНК аденовируса Sa7, введенной в половые клетки эмбриона. Под влиянием ДНК RSV дестабилизируется другая группа локусов (табл.).

Из сказанного выше ясно, что после введения в полиарную плазму эмбрионов дрозофилы ДНК онкогенных вирусов сильно дестабилизирует геном, резко возрастает потенциальная мутабельность многих локусов: дестабилизирующиеся локусы не автономны, объединены в

группы, в которых локусы связаны друг с другом мутационными переходами (оказывают друг на друга дестабилизирующее влияние), при этом группы локусов, реагирующие на ДНК Sa7 и RSV, не перекрываются; наряду с возникновением новых мутаций с такой (или большей) частотой происходит реверсия мутаций к норме.

Известно, что нестабильность генома можно вызвать путем скрещивания самцов Р-цитотипа, содержащих Р-элемент (например, линии T-007, которую использовали мы [12, 16]) с самками линий М-цитотипа, (например, не содержащих Р-элемент, дикая линия, *Oregon R* [16]). Получающиеся гибриды характеризуются нестабильностью большого числа генов (гибридный дисгенез [30]). Если ДНК онкогенных вирусов вводить в эмбрионы таких гибридов, то их нестабильность многократно повышается, в них наблюдаются «всплески» нестабильности, т. е. массовые реверсии и возникновение и популяции многих новых мутаций (рис. 1).

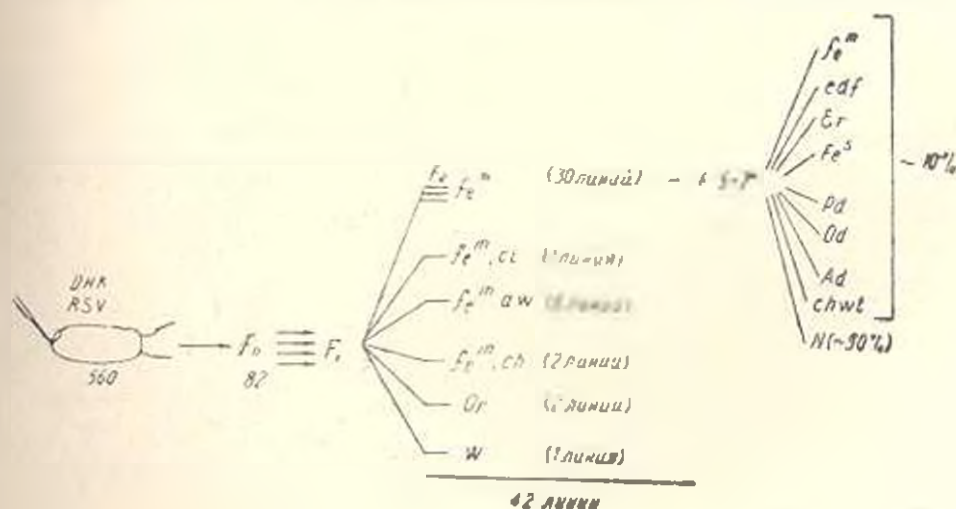
Все описанные выше свойства типичны для инсерционных мутаций. Из этого следует, что онкогенные ДНК индуцируют в основном или только инсерционные мутации. Возникает вопрос о природе IS-элементов, вызывающих эти мутации, и природе механизмов, ответственных за их столь активные перемещения в получаемых нами линиях.

Судьба ДНК онкогенных вирусов, введенных в полярную плазму.

Естественно предположить, что IS-элементами, индуцирующими мутации, являются сами вирусные ДНК. Анализ ДНК мутантов [6, 25—27] показал, что многие из них содержат вирусную ДНК в том или ином количестве (как правило, <1 копии на геном дрозофилы). В некоторых случаях линия в последующем теряет вирусную ДНК.

Чаще всего вирусная ДНК сильно перестроена и, судя по данным блот-гибридизации по Саузерну, расплывлена внутри ядра. Рис. 2 демонстрирует случай обнаружения в геноме дрозофилы полной, неперестроенной копии к ДНК RSV.

Эти наблюдения подтверждают предположение, согласно которому в роли IS-элементов, индуцирующих описанные мутации, выступают



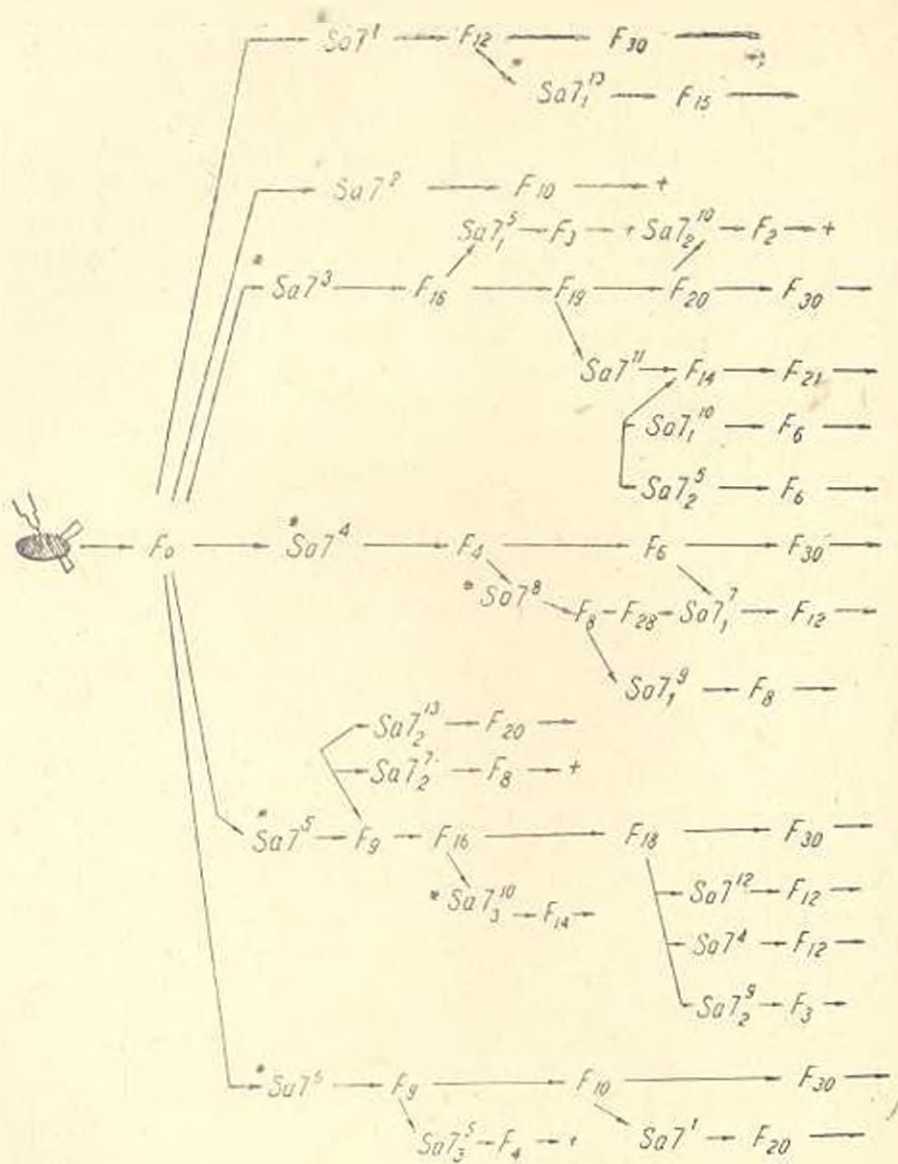
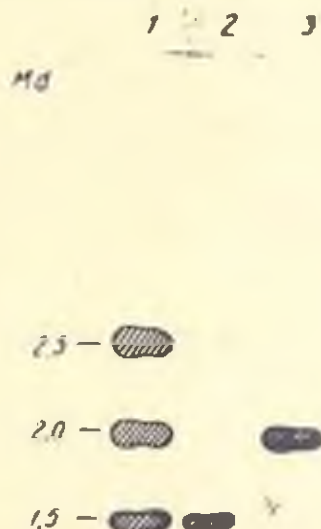


Рис. 1. Генетическая нестабильность, проявляемая мутантными линиями, полученными в результате инъекции ДНК вируса свинки Равелл (RSV (a)) и обезьяньего аденовируса Sa7 (б) в эмбрионы *D. melanogaster* Oregon R (б) и гибридов (а) от скрещивания самцов линии T 007 (MR-линия) с самками Oregon R. Звездочками указаны линии, в которых методом гибридизации обнаружены вирусная ДНК [10, 13, 17]. М-последующие изменения; + линия утеряна. Описание мутаций см. в таблице.

фрагменты выкопированных ДНК, способных интегрироваться в геном. Будучи не активными, они, по-видимому, не сохраняются в местах вставки, выщелачиваются и либо элиминируются, либо встраиваются в новые места. При этом, действительно, мутации могут ревертироваться, а вместо них могут возникать новые мутации. Это должно продолжаться до тех

пор, пока в ядрах полных клеток будут сохраняться фрагменты чужеродных ДНК. Однако ряд фактов говорит о том, что этот механизм не может обеспечить все наблюдаемые в опытах по инъекции ДНК явления. Во-первых, были случаи, когда мутация сохранялась несмотря на исчезновение (в пределах точности метода регистрации) вирусной ДНК. Нельзя, однако, исключить возможности, что у таких мутантов сохраняется небольшой, необнаруживаемый используемым методом фрагмент ви-

Рис. 2. Обнаружение с помощью блот-гибридизации по Саузерну в геноме мух мутантной линии RSV^a [24] последовательностей ДНК вируса саркомы Рауса. Мутантная линия была получена в результате инъекции частиц вируса в эмбрионы [6]. МД-мегадалтоны. ДНК мутантных мух переваривали рестриктазой *EcoRI* и после электрофореза в геле переносили на фильтры и гибридизовали с мечеными по фосфору препаратами (1) суммарной кДНК RSV (выявляются три характерных для вирусного генома фрагмента) [1, 34], либо с фрагментом ДНК RSV, содержащим гены *gag* (2) и *env* (3).
 Подробности см. в [1, 34].



русной ДНК или что при выщеплении вирусной ДНК удаляется небольшой участок мутантного гена. Во-вторых, маловероятно, чтобы фрагменты вирусных ДНК могли выщепляться из генома дрозофилы с точностью до одного нуклеотида в тех случаях, когда наблюдаются реверсии мутантного фенотипа к норме. Этой способностью обладают лишь эндогенные транспозоны [30]. Эти соображения вынуждают усомниться в том, что все феномены групповой нестабильности генов, описанные выше, имеют в своей основе только инсерции и выщепления микронтепированной в эмбрионы онковиральной ДНК. Мы предположили, что помимо этого предполагаемого механизма, который, возможно, ответствен за индукцию некоторых из мутаций, под действием онковиральных ДНК «запускается» и начинает активно функционировать *собственная система нестабильности генома дрозофилы*, которая, придя в движение, создает состояние массовой дестабилизации генов. Основными компонентами этой эндогенной мутаторной системы являются мобильные элементы генома (см. выше). Возник вопрос: не индуцируют ли онковиральные ДНК инъекцируемые нами в эмбрионы транспозиции мобильных элементов в геноме дрозофилы, а если индуцируют, можно ли их зарегистрировать.

ИНДУКЦИЯ ТРАНСПОЗИЦИИ *copia*-ЭЛЕМЕНТА ПРИ ИНЪЕКЦИИ ОНКОВИРУСНЫХ ДНК В ПОЛЯРНУЮ ПЛАЗМУ ЭМБРИОНОВ

Мы провели опыты по *in situ* гибридизации одного из хорошо охарактеризованных мобильных элементов (*copia*) для выяснения этого

вопроса. Сравнивали места расположения этого элемента в произвольно выбранном участке X-хромосомы (участок 1A—6A) контрольных и мутантных линий. Результаты показали, что как при индукции первичных мутаций, так и при спонтанном возникновении в них новых мутаций происходят транспозиции *coria*-элемента (рис. 3). Так, в коп-

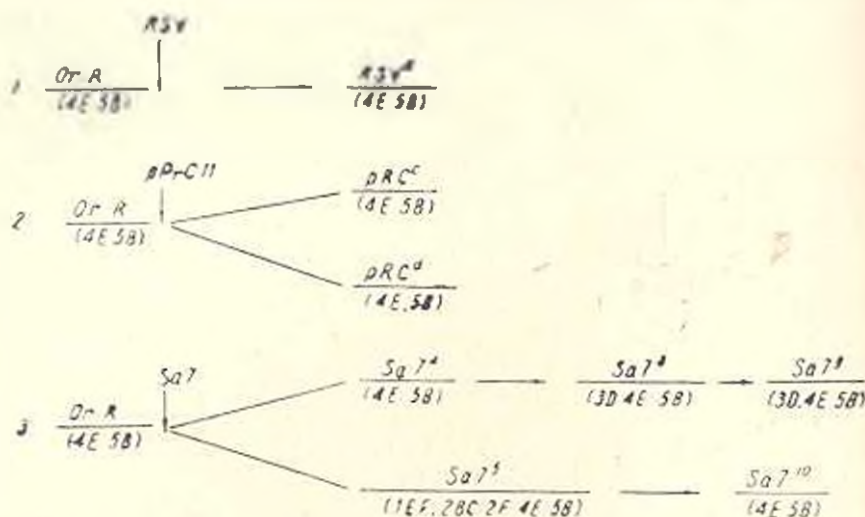


Рис. 3. Транспозиции мобильного элемента *coria* в 1A—6A районе. X-хромосомы, индуцированные инъекциями ДНК онкогенных вирусов. Гибридизацию *in situ* 3H-ДНК (плазмиды, содержащей клонированную последовательность *coria*-элемента) проводили с политемами хромосомами личинок мух контрольных и мутантных линий (см. рис. 1), полученных инъекцией ДНК RSV (плазмида pP-CII) [1] или аденовируса Sa7 (стрелки). Над горизонтальными линиями—сайты гибридизации *coria*-элемента в районе 1A—6A X-хромосомы.

трольных линиях, в эмбрионы которых инъектировали ДНК, в этом участке имелось 2 сайта локализации *coria*: 4E и 5B. Между тем у личинок мутантов Sa7¹, тем, полученных в результате инъекции в эмбрионы соответственно ДНК Sa7 и RSV, в этом же участке X-хромосомы обнаружались: в первом случае—3 дополнительных сайта локализации *coria* (1E, 2BC, 2F), во втором—один новый сайт (1A). Транспозиции *coria* элемента удалось зарегистрировать и у «вторичных» мутантов, спонтанно возникающих в первичных нестабильных линиях (рис. 3). Отметим, что участок X-хромосомы, в котором было зарегистрировано появление новых мест локализации *coria* или исчезновение уже имевшихся сайтов, далеки от местоположения мутировавшего гена—маркера полученной линии (например, мутация линии Sa7¹, в которой произошел «взрыв» мутагенеза, локализована во 2-й хромосоме, а перемещения *coria*-элемента мы зарегистрировали в X-хромосоме). Кроме того, в опытах по *in situ* гибридизации мы обследовали лишь небольшой участок X-хромосомы, составляющий ~1/1000 всех локусов генома дрозофилы (этим объясняется то, что мы не всегда обнаруживали изменения, так как в геноме имеется несколько десятков потенциальных мест локализации *coria*-элемента). Это означает, что при вве-

дении в эмбрион онковиральных ДНК (так же как и при активации перемещений мобильных элементов скрещиванием [13]) происходят массовые (когда скоро даже на небольшом участке одной хромосомы удалось зарегистрировать множество изменений в локализации произвольно выбранного мобильного элемента) перестановки подвижных элементов. Если это так, то наряду с одиночными морфологическими мутациями, которые нами «вылавливались» при обследовании мух, испытавших действие онковиральной ДНК, должно происходить множество изменений, оставшихся незамеченными. Изменения могут, в частности, происходить в генах, контролирующих физиолого-биохимические признаки, например, ферменты общего обмена.

ИЗМЕНЕНИЯ ТЕРМОУСТОЙЧИВОСТИ АЛЬДОЛАЗЫ У МУТАНТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИНЪЕКЦИЯМИ Sa7 ДНК

Мы решили проверить высказанное выше предположение на модели одного из ферментов энергетик — альдолазы. Ген альдолазы локализован в 3-х хромосоме, т. е. не имеет структурной связи с мутантными генами линий, которые анализировались, а именно Sa7⁴ (2-я хромосома), Sa7⁵ (X-хромосома) и Sa7¹⁵ (2-я хромосома). Определяли термоустойчивость альдолазы у личинок дикой линии *D. melanogaster Oregon R.* и у мутантов. Результаты опытов [18] показали (рис. 4), что термоустойчивость альдолазы у мутантов достоверно ниже, чем у личинок дикой линии, из которой они выведены. Существенно, что у ревертантов этих мутантных линий термоустойчивость альдолазы вновь возвращается к нормальному уровню (рис. 4 б).

Эти данные подтверждают высказанное выше предположение, что при индукции у дрозофилы нестабильности с помощью онковиральных ДНК изменения в геноме не ограничиваются обнаруживаемыми видимыми мутациями.

Приведенные выше экспериментальные данные дают основание считать, что разработанный метод мутагенеза с помощью онковиральных ДНК, инъецируемых в полярную плазму эмбрионов, открывает новые возможности для изучения механизмов стабилизации — дестабилизации генов, и, как нам кажется, в практике генетико-селекционных работ.

Важной особенностью его является «мягкость» действия мутагена. Хотя под действием ДНК могут возникать и летальные мутации [14], но, как показали наши эксперименты, выживаемость эмбрионов, которым вводится ДНК и буфер (в котором растворена инъецируемая ДНК), одинакова. Это означает, что в отличие от других мутагенов, которые индуцируют мутации на фоне гибели большого числа особей, данный мутаген не оказывает губительного действия (общее снижение выживаемости обусловлено травмой, наносимой эмбриону при инъекции [16]). Его действие не связано с разрушением хромосом, а обусловлено специфической активацией мутаторных систем, контролирующих стабильность генов. Иначе говоря, использованные ДНК-мутагены имитируют действие эндогенных факторов дестабилизации генома.

Молекулярный механизм индукции мутаций с помощью онковиральных ДНК находится в стадии исследования. Уже выяснено [12, 16],

что при использовании в качестве мутагена ДНК ретровируса мутагенность зависит от присутствия в ДНК длинных повторов (LTR), в которых сосредоточены регуляторные элементы. Сейчас выясняется, обязательно ли для проявления мутагенности экспрессия вирусной ДНК.

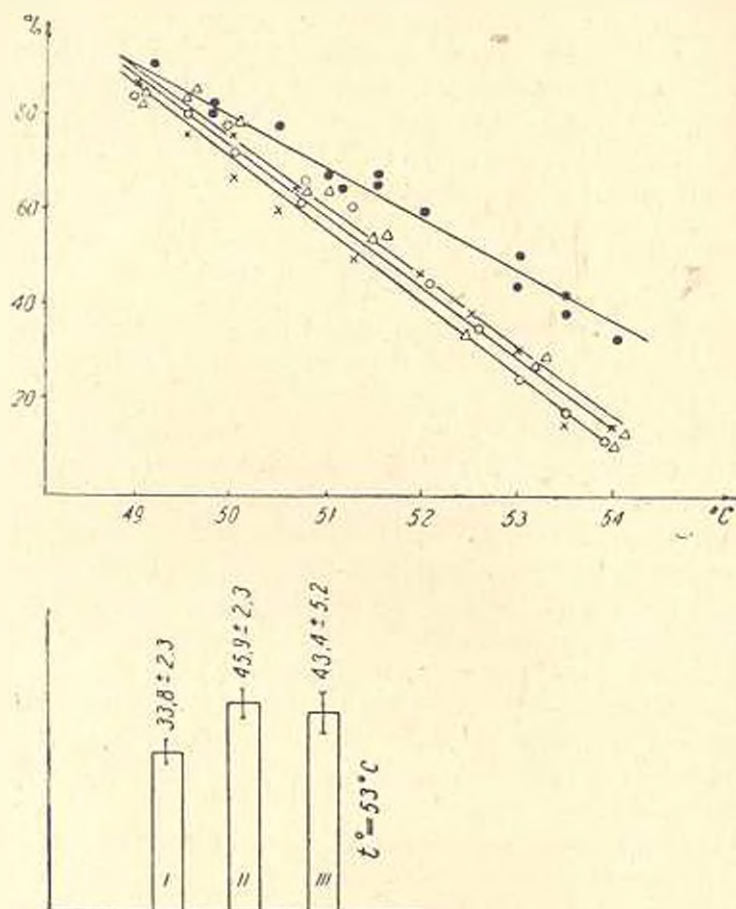


Рис. 4. Термочувствительность альдолазы А-личинки дикой линии Oregon R (●) и полученных из нее (рис 1) мутантных линий Sa74 (X), Sa75 (Δ) и Sa713 (○). Б — личинки ревертантов мутантной линии Sa74. Подробности см. в [18].

или ее действие обусловлено специфическим связыванием эндогенных факторов, например, репрессора транспозиций [30]. Принципиальным является вопрос, почему ДНК онкогенных вирусов теплокровных могут специфически взаимодействовать с системой нестабильности генов столь отдаленного вида, как дрозофила. Одно из возможных объяснений этого состоит в том, что онкогенные вирусы, в частности, ретровирусы теплокровных, произошли из транспозонов низших [32] и поэтому могли сохранить структурные элементы, типичные для мобильных элементов низших эукариот. Если это верно, то ДНК онкогенных вирусов, возможно, смогут индуцировать нестабильные мутации не только у дрозофилы, но и у других насекомых, представляющих, в частности, практический интерес, а также у представителей других классов животных.

Поскольку не весь геном вируса, а его определенные участки ответственны за мутагенность, то путем их субклонирования и дополнительных изменений можно сконструировать плазмиды с повышенной мутагенной эффективностью. Действительно, когда вместо плазмиды, содержащей почти весь геном RSV, в эмбрионы инъецировали плазмиду рРгС 11-LTR15, содержащую только LTR [1], мутагенная эффективность ДНК возрастала примерно в 10 раз [12, 16]. В настоящее время проводятся исследования с целью выяснения перспектив практического использования этих мутагенов в генетико-селекционных работах.

Другой аспект исследований нестабильности генов с использованием вышеуказанных подходов связан с проблемой микроэволюционной и адаптационной изменчивости организмов. Как уже говорилось, в настоящее время в литературе по эволюции и адаптации нет ясности в том, каким образом обеспечиваются быстрые темпы эволюции с коррелированным изменением больших групп генов.

Выше уже говорилось, что онковирусные ДНК активируют эндогенные механизмы дестабилизации генов. При этом мы видели, что под действием такого механизма в популяции гамет одной особи могут происходить групповые изменения генов. Следовательно, используемый подход является эффективным средством выявления скрытых эндогенных систем генотипической изменчивости, объединяющих большие группы генов. Маловероятно, чтобы наблюдаемые в этих условиях индуцированные групповые изменения генов не происходили в естественных условиях, когда под влиянием внутренних мутаторных факторов активизируется деятельность этих систем дестабилизации генов. Такие групповые изменения генов могут служить материалом для отбора в ходе микроэволюции и адаптации. Вышесказанное, а также анализ ряда других работ [3, 13, 15, 20, 25, 30, 31, 34] послужили основанием для формулирования концепции *эмбриогенетических механизмов микроэволюционной и адаптивной групповой изменчивости генов*. Суть концепции состоит в следующем.

1. Существует два типа (механизма) изменчивости генов: изменение структуры одиночных генов, происходящее как статистический процесс в результате случайных воздействий физических и химических факторов; системные, групповые изменения функционального состояния генов под влиянием инсерционных, т. е. мобильных, элементов, деятельность которых регулируется внутренними системами нестабильности.

2. Первый тип изменчивости подчиняется менделевским правилам наследования и не играет *первичной* роли в микроэволюционном процессе; молекулярно-генетической основой событий микроэволюционной значимости является 2-й тип изменчивости генов.

3. Материалом для отбора микроэволюционного значения служат групповые изменения генов, происходящие в результате изменений в изложении инсерционных элементов в половых клетках на предметных стадиях их развития.

4. Групповые перемещения и инсерции элементов призваны индуцировать не *мутации (поломки генов)*, а *уровни функционирования (нормы реакции)* генов; при этом в сферу такой изменчивости привлека-

ются в основном гены, контролирующие физиолого-биохимические процессы. Важно, что эти изменения являются обратимыми, ревертируют с высокой частотой, но могут закрепиться, если окажутся адекватными изменившимся условиям среды, и обеспечить селективные преимущества для особи и ее потомства.

Таким образом, эволюция базируется не только на постепенных, но и быстрых, скачкообразных изменениях геномина путем одновременных, скоррелированных изменений многих генов, контролирующих физиолого-биохимические признаки селективной значимости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амбарцумян Н. А., Татосян А. Г. Биол. ж. Армении, 37, 619—626, 1984.
2. Ауэрбах Ш. Проблемы мутагенеза. М., 1978.
3. Воронцов Н. Н. Теория эволюции: истоки, постулаты, проблемы 7, М., 1984.
4. Газарян К. Г., Языков А. А. Вестн. МГУ, 3, 34—42, 1978.
5. Газарян К. Г., Тарантул В. З. Успехи совр. биол., 92, 163—179, 1981.
6. Газарян К. Г., Шахбазян А. К., Незжанов Н. С., Смирнов С. Г., Киселев Ф. Л., Татосян А. Г., Спитковский Д. Д. ДАН СССР, 258, 1224—1227, 1981.
7. Газарян К. Г., Кузнецова Е. Д., Эшкинд Л. Г., Тихоненко Т. И., Языков А. А. Молекулярная генет., микробиол., вирусол., 9, 22—28, 1983.
8. Газарян К. Г., Тарантул В. З. Геном эукариот. М., 1984.
9. Газарян К. Г., Генинг Л. В., Незжанов Н. С., Андреева Л. Е., Макарова И. В., Кузнецова Е. Д., Баранов Ю. Н., Косиков А. И., Алексеева М. В., Кучерявый В. В., Тарантул В. З. Молекулы генет. микробиол., вирусол., 10, 22—28, 1981.
10. Газарян К. Г., Набировкин С. Д., Шахбазян А. К., Шибанова Е. И., Тихоненко Т. И., Генинг Л. В., Гольцов В. А. Генетика, 1237—1244, 1984.
11. Газарян К. Г., Гольцов В. А., Набировкин С. Д., Эшкинд Л. Г., Тарантул В. З., Генинг Л. В. Мол. биол., 19, 760—766, 1985.
12. Газарян К. Г. Усп. совр. генетики, 13, 75—88, 1985.
13. Герасимова Т. И., Матюшкин Л. В., Миррахли Л. Ю., Ильин Ю. В., Георгиев Г. П. Генетика, 20, 1434—1443, 1984.
14. Гершензон С. М., Александров Ю. И., Мамюта С. С. Мутагенное действие ДНК и вирусов у дрозофилы. 159, Кисн, 1975.
15. Голубовский М. Д., Захаров И. К. В кн.: Успехи теоретической и прикладной генетики. 180, Новосибирск, 1982.
16. Набировкин С. Д. Канд. дисс., 140, М., 1984.
17. Терещенко О. Д., Зуева Л. А., Газарян К. Г. Генетика, 22, 1, 46—57, 1986.
18. Шахбазян А. К., Афанасьева Л. А., Газарян К. Г. Онтогенез, 15, 97—100, 1984.
19. Шахбазян А. К. Канд. дисс., 136, М., 1982.
20. Belyaeva E. S., Pasyukova E. G., Guozdev V. A., Ilyin Yu. V., Kaldanov L. Z. Mol. Gen. Genet., 185, 324—328, 1982.
21. Erlinster R. L., Chen H. Y., Trumhauser M., Seneor A. W., Palmitt R. D. Cell, 27, 223—231, 1981.
22. Finnegan D. Y., Rubin G. M., Young M. W., Hogness D. S. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 42, 1053—1063, 1978.
23. Gazaryan K. G., Nabirochkin S. D., Tatossyan A. G., Shakhbazyan A. K., Shibanova E. N. Nature, 312, 392—394.
24. Gazaryan K. G., Kuznetsova E. D., Eshkind L. G., Tarantul V. Z., Tikhonenko T. I., Naroditsky B. S. Cell Differ., 257—276, 1984.
25. Chaline J. Modalities, rythmes, mecanismes de l'evolution biologique. Gradualisme phyletique ou equilibres ponctues? Paris, 1983.
26. Gledon J. W. J. of Exp. Zool., 228, 313—324, 1983.
27. Gehrting W. J. In: The Impact of Gene transfer techulques in eukaryotic cell biology. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 15—70, 1985.

26. Ilyin Yu. V., Tchurikov N. A., Ananiev E. V., Ryskov A. P., Yenikolopov G. N., Limborska S. A., Mateeva N. E., Gvozdev V. A., Georgiev G. P. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 42, 959—969, 1978.
29. McKilintock B. The control of gene action in maize. Brookhaven Sympos. Biol., 18, 145—152, 1965.
30. Rubin G. M. In: Mobile Genet. Elements (ed. Shapiro J. A.), N. Y. Acad. Press, 329—361, 1983.
31. Spradling A. G., Rubin G. M. Science, 218, 341—353, 1982.
32. Shimotohno K., Temin H. M. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 45, 719—731, 1981.
33. Tutosyan A. G., Nabirochkin S. D., Gazaryan K. G., Kisselev F. L. Nature, 311, 394—395, 1984.
34. Thompson J. N., Woodruff R. C. Heredity, 43(3), 327—335, 1981.

Поступило 12.11.1985 г.

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 10, с. 861—864, 1986

УДК 579.6:577.1

ОТБОР И ИЗУЧЕНИЕ АУКСОТРОФНЫХ МУТАНТОВ У *SERRATIA MARCESCENS* АМК-Р103, ПРОДУЦЕНТА L-ВАЛИНА

А. О. АРМАНДЖЯН, М. Г. ОГАНЕСЯН

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР, Ереван

Аннотация — У аналогрезистентного мутанта *Serratia marcescens* АМК-Р103 нитрозогуанидин-индуцированным мутагенозом были получены ауксотрофные мутанты с частотой 10^{-3} . Изучали влияние ауксотрофных мутаций на продуктивность L-валина исходного регуляторного АМК-Р103 штамма. Установлено, что потребность в изолейцине у двух мутантов приводит почти к двукратному увеличению накопления L-валина в культуральной жидкости.

Շնորհիվ — ներդրողների կողմից ձևակերպված մուտացիոնային պայմաններում *S. marcescens* АМК—Р 103 շտամի մոտ ստացվել են աուքսոտրոֆ մուտանտներ 10^{-3} հաճախականությամբ: Ուսումնասիրվել է աուքսոտրոֆ մուտացիաների ազդեցությունը АМК—Р 103 շտամի L-վալին արտադրելու ունակության վրա: Փարզվել է, որ երկու մուտանտների մոտ իզոլեյլինի նկատմամբ ունեցած պահանջը առաջ է բերել վալին սինթեզելու ունակության կրկնակի աճելազորում:

Abstract — Auxotroph mutants were selected with the frequency of 10^{-3} in analogue-resistant mutant of *S. marcescens* АМК—Р 103 of nitroso-guanidine-induced mutagenesis. The influence of auxotroph mutation on L-valine producing activity of АМК—Р 103 strain was investigated. It was detected that in the two mutants the isoleucine-auxotrophy led to two-fold increase of L-valine accumulation in the cultural medium.

Ключевые слова: мутант, нитрозогуанидин, валин, продуцент, аминокислота.

Вовлечение новых микроорганизмов в аминокислотное производство требует разработки методов селекции с учетом особенностей регуляции активности генов, контролирующих биосинтез аминокислот у данных микроорганизмов.

Валин — одна из незаменимых аминокислот. Биосинтез которой связан с метаболическими путями аминокислот семейства аспарагиновой