

О ПРИРОДЕ ГЕННЫХ МУТАЦИЙ И СТРУКТУРЕ ГЕНА

ПРЕДИСЛОВИЕ

В этой работе будут подвергнуты анализу основания экспериментальных исследований мутационного процесса на дрозофиле, а также будет дан физический анализ предпосылок, положенных в основу представлений о природе генов и мутационного процесса. В отличие от прежних гипотез о природе генов и генных мутаций, поскольку мы хотим сделать здесь шаг вперед, будем основывать наши представления только на анализе материала, полученного при изучении мутаций, т.е. событий, затрагивающих собственно гены. Мы будем избегать переносить на проблему структуры и мутирования генов представления, базирующиеся на работах в соседних областях; таких, например, как фенотипика и физиология развития.

Мы надеемся, таким образом, построить теорию мутагенеза и структуры гена, опираясь только на анализ экспериментальных данных во всех деталях, а также следующих из них выводов. Мы постараемся развить наши представления возможно полнее, тем более, что ценность их мы видим в том, что с позиций этих физических представлений получает объяснение также целый ряд ранее известных факторов и положений.

Эта работа представляет собой кооперацию между генетикой и физикой. Она возникла из лекций и дискуссий в тесном неформальном кругу представителей генетики, биохимии, физической химии и физики. За обсуждение вопросов кинетики химических реакций мы благодарим господина доктора К. Воля. Часть работы была выполнена при поддержке Общества содействия немецкой науке в рамках программы изучения генетических последствий действия излучений.

Некоторые результаты изучения мутаций

Отдел генетики Института мозга имени Кайзера Вильгельма, Берлин-Бух

1. ВВЕДЕНИЕ

Первоначальная формулировка понятия гена, основанная на генетических экспериментах, была достаточно формальной. В соответствии с классическим исследованием Г. Менделя и затем его «переоткрытием», использовавшим большой материал экспериментальной генетики, ген можно определить как «единицу расщепления» или как «нечто», что остается после расщепления менделирующих признаков. Это позволяет нам: 1) заключать о существовании генов из результатов опытов по скрещиванию; 2) использовать только те гены, которые имеются в нашем распоряжении по меньшей мере в виде двух разных аллелей или, другими словами, для которых известны мутации. Итак, ген, с одной стороны, представлен менделирующими признаками, с другой — связан с мутациями.

Первые исследования, дающие некоторые представления о том, что такое мутации, обращают наше внимание на нормальные и мутантные наследственные признаки. Так, известную гипотезу «присутствия — отсутствия», предложенную В. Бэтсоном, можно описать, представляя себе в доминантных (лучше сказать «нормальных») аллелях материальное «нечто», которое утрачивается при рецессивных мутациях. Бэтсон исходил при этом из представления, отражающего лишь часть фактов, о том, что признак рецессивной мутации часто представляет собой в некоторой степени отсутствие свойств нормального аллеля. По сходным путям (заклучения о природе гена и генных мутаций по их проявлениям) развиваются и некоторые современные теории, в том числе такие, как чисто «морфологическая» теория А.С. Серебровского [1] и «физиологическая» Р. Гольдшмидта [2].

В предвоенные годы были, вероятно, окончательно доказаны представления о локализации и линейном расположении генов в хромосомах, интенсивно развивающиеся и сегодня, которые внесли существенный вклад в теорию гена. Теперь мы знаем, что геном имеет постоянный объем, определяемый расположением материальной системы, в которой отдельные материальные частицы, гены, занимают определенные места.

С накоплением различного фактического материала в области генетики становится все более ясно, что из рассмотрения проявлений генов и генных мутации узнать можно лишь очень мало

определенного. Действительно: 1) мы недостаточно знаем о действии генов; 2) то, что мы об этом знаем, распространяется не на изолированное действие отдельных генов, а на видоизмененные отдельными генными мутациями системы, в которых в качестве элементарной единицы мы вынуждены рассматривать не ген, а клетку в целом, со всеми ее функциями; 3) такое конструирование гена из феноменов его проявления логически недопустимо, так как это означало бы воссоздание «индивидуумов», в которых разыгрываются действия генов, принципиально различающихся по строению в соответствии с различиями в каждом гене. В то же время сейчас происходит столь быстрое накопление наших знаний о мутагенезе, что сегодня по крайней мере для нескольких генетически хорошо изученных объектов мы можем количественно описать и проанализировать процесс мутирования отдельных генов. По-видимому, именно на этом пути мы можем надеяться быстрее всего приблизиться к уточнению природы генов и генных мутаций, о чем уже неоднократно упоминали представители школы Моргана и прежде всего Г. Дж. Меллер [3—8].

2. АНАЛИЗ МУТАЦИОННОГО ПРОЦЕССА

В этом разделе будут рассмотрены важнейшие факты, относящиеся к мутационному процессу, в том числе результаты изучения возникновения мутаций, на основании которых можно попытаться построить теорию генных мутаций и структуры гена. Здесь прежде всего будет использован материал, полученный на дрозофиле, так как, во-первых, дрозофила — объект наших исследований; во-вторых, дрозофила представляет собой лучший объект для точного количественного изучения мутационного процесса.

2.1. Спонтанный мутагенез

Среди громадного материала, накопленного генетиками-дрозофилистами в течение 25 лет, имеются и данные по спонтанному возникновению многих мутаций. Можно считать, что спонтанное мутирование у дрозофилы имеет ряд свойств, всеобщих для мутационного процесса. Прежде всего установлено, что среди наследственных вариаций можно выделить существенно различные типы. Не углубляясь особенно в этот вопрос, можно дать следующую классификацию наследуемых вариаций:

А. Плазматические наследственные изменения.

1. Изменения органелл цитоплазмы (например, наследуемые изменения хлоропластов, Корренс).

2. Приспособление цитоплазмы к новому генотипу (например, изменения цитоплазмы у межвидовых гибридов, Миаэлис).
 3. Длительные модификации (Иоллос).
- Б. Генотипические наследственные изменения (мутации).**
1. Генные мутации (мутации в узком смысле).
 2. Хромосомные мутации:
 - а) поломки и фрагментация;
 - б) выпадения из хромосом (нехватки и делеции);
 - в) инверсии;
 - г) дупликации и простые транслокации;
 - д) взаимные транслокации (обмены);
 - е) слипание хромосом.
 3. Ядерные мутации:
 - а) гетероплоидность,
 - б) полиплоидность.
- В. Комбинации.**

На рис. 1 представлены важнейшие типы генетических наследственных изменений.

Далее вас будут интересовать только генные мутации. О этих мутациях из исследований по спонтанному мутационному процессу мы знаем следующее. Показано, что генные мутации возникают всегда как гетерозиготы, т.е. что в диплоидном организме в момент мутирования изменяется всегда только один из двух аллелей данного гена. Показано, что благодаря мутациям могут возникать как доминантные, так и рецессивные свойства, различные морфологические признаки и физиологические изменения, очень сильные или совсем слабые отклонения от нормы или исходного состояния; в отношении биологической ценности — жизнеспособности мутантных форм — мы имеем все переходы (конечно относительно редко) от мутаций с повышенной жизнеспособностью до сильно пониженной, вплоть до (особенно часто) летальных мутаций, которые в гомозиготном состоянии приводят к нежизнеспособности. Благодаря повторным мутациям многие гены имеют ряд аллелей; можно наблюдать повторение точно таких же мутаций; число генов в ряду множественных аллелей ограничено. У разных генов бывают различные частоты возникновения мутаций. Наконец, можно наблюдать обратные мутации, из чего можно заключить, что по крайней мере некоторая часть мутаций способна к реверсии.

Таким образом, спонтанный мутагенез у дрожжей проявляется многосторонностью и хорошо отражает качественную картину процесса мутирования. Но для анализа из этого многое

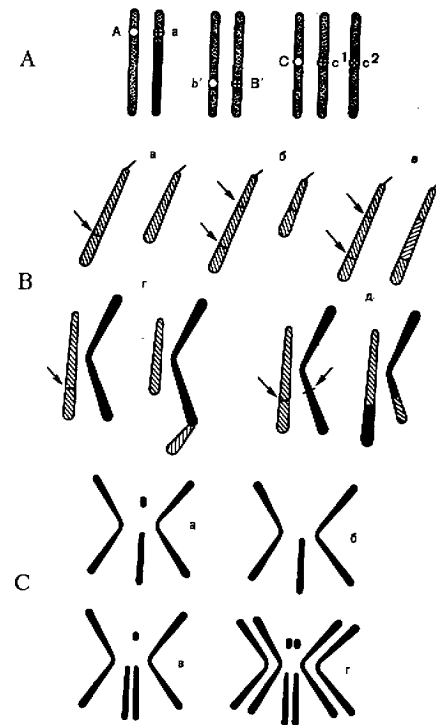


Рис. 1. Различные типы мутаций.

А. Генные мутации: доминантный «нормальный» аллель А мутирует к а; рецессивный аллель b^1 мутирует к B^1 ; доминантный аллель С становится мутацией c^1 или c^2 (множественные аллели).

В. Хромосомные мутации: а — дефишниси (терминальная делеция); б — делеция; в — инверсия; г — простая транслокация; д — реципрокная транслокация.

С. Геномные мутации: а — нормальный гаплоидный набор хромосом; б — нуллисомия; в — трисомия; г — полиплоидия.

нельзя использовать, поскольку существуют две причины: 1) частота спонтанных мутаций столь незначительна, что точный количественный анализ здесь практически невозможно проводить; 2) мы не знаем причин, вызывающих спонтанные мутации, а для плодотворного анализа необходимым является знание не только реакции, но и причины, ее порождающей. Это заставляет нас обратиться к экспериментальным результатам изучения индуцированного мутагенеза. Особые преимущества имеет при этом радиационная генетика: во-первых, рентгеновские лучи и излучение радия оказывают сильное и точно воспроизводимое действие на частоту мутирования; во-вторых, излучения легко и точно дозируются; и, в-третьих, что особенно важно, потому, что, в противоположность многим другим причинам (например, температуре и химикалиям), которые мы также можем точно дозировать, но о которых мы, как правило, не знаем, по какому пути и в какой форме они дойдут до генов, коротковолновое излучение, вероятно, доходит до генов в хорошо определяемой форме, при этом хорошо поставлен экспериментальный биофизический анализ его непосредственного воздействия.

2.2. Качественная картина мутационного процесса, индуцированного облучением

Начиная с первых успешных исследований по радиационной генетике дрозофилы, выполненных Г. Дж. Меллером [7, 9, 10], в этой области к настоящему времени накоплен столь обширный материал, что сегодня мы можем разносторонне и полно обрисовать общую картину осуществления индуцированного облучением мутационного процесса. Кроме пригодности дрозофилы как объекта для таких исследований, работе с ней существенно способствовало то, что для обнаружения мутаций у *Drosophila melanogaster* имеется ряд специальных методов скрещивания. Два наиболее употребительных (предложенный Меллером метод CIB и предложенный Л. Морганом метод «сцепленных X-хромосом») показаны на рис. 2.

Общие качественные свойства мутационного процесса, индуцированного облучением, коротко можно описать следующим образом.

Все виды излучений (от ультрафиолетового до жестких γ -лучей) могут повышать частоту возникновения мутаций. В дальнейшем мы ограничимся результатами, полученными для рентгеновских и γ -лучей, так как радиобиологические исследования с ультрафиолетовыми лучами из-за технических трудностей (сильная абсорбция в тканях) дают скудные и ненадежные результаты, и для них а priori можно ожидать, что физическое

действие ультрафиолета на гены должно отличаться от действия коротковолнового излучения.

Генетическое действие излучений можно считать всеобщим, так как во всех объектах и тканях, для которых и в которых можно установить возникновение мутаций, действительно с высокой частотой могут быть выявлены мутации, индуцированные облучением [11 — 15]. При этом все типы мутаций, известные прежде для спонтанного мутационного процесса, приведенные на рис. 1, с высокой частотой возникают и в результате облучения. В опытах с облучением были также получены все типы генных мутаций. Это позволяет провести качественную параллель между спонтанными и радиационными мутациями. Эту параллель можно вести и дальше: в обоих случаях наблюдается сходство типов мутаций с низкими частотами («большие», сильно отличающиеся от нормы, особенно доминантные мутации; мутации с повышенной жизне-

Таблица 1. Индукция рентгеновским облучением (4800 и соответственно 3900 Р) обратных мутаций рецессивных мутантных аллелей у *Drosophila melanogaster*. Облучались P- $\sigma\sigma$ [16,17]

Аллель и его локус	Тимофеев-Ресовский		Джонстон и Винчестер	
	число гамет	число обратных мутаций	число гамет	число обратных мутаций
X-хромосома, 0 y	21 894	0	69 923	1
» 0 + sc	17 676	3	101 042	5
» 1,5 w	29 233	2	—	—
» 1,5 w ^c	23 472	2	—	—
» 1,5 w ^a	—	—	69 302	0
» 5,5 ec	17 676	0	57 323	0
» 14 cv	16 460	2	—	—
» 20 ct	12 914	0	57 323	1
» 33 v	29 384	2	61 119	1
» 36 m	—	—	39 923	2
» 44 g	12 914	0	57 323	4
» 56 f	34 811	8	130421	15
» 62 car	—	—	69 302	1
II хромосома 0 ru	27 155	0	—	—
» 26 h	27 155	1	—	—
» 42 th	5681	0	—	—
» 44 st	27 155	1	—	—
» 48 p ^p	21 474	4	—	—
» 50 cu	5681	0	—	—
» 59 ss	21 474	0	—	—
III хромосома 62 sr	5681	0	—	—
» 71 e ^s	27 155	1	—	—
» 101 ca	5681	0	—	—
Всего:	390 709	26 (0,0066 %)	713 001	36 (0,0051 %)
Контроль:	152 352	0	700 000	0

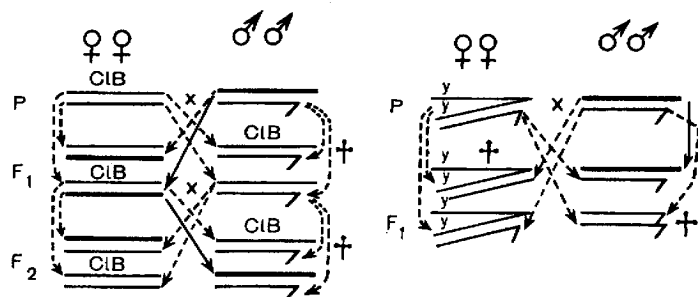


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая методы скрещивания CIB (слева) и «сцепленные X-хромосомы» (справа).

Самки линии CIB содержат в одной из X-хромосом запирающий кроссинговера (C), один рецессивный летальный фактор (l) и доминантный ген Bar (B); половина их сыновей, которые получают CIB-хромосомы, не развивается; в F₂ после скрещивания облученных родительских самцов с самками CIB выживающая половина самцов содержит облученные X-хромосомы; культура F₂, которая содержит облученную X-хромосому с вновь возникшим летальным фактором, оказывается вообще без самцов. Самки со «сцепленными X-хромосомами» содержат по две неразделенные X-хромосомы (с аллелем yellow) и нормальную Y-хромосому. Их сыновья получают X-хромосому от отцов; в случае скрещивания самцов с самками со сцепленными X-хромосомами все мутации, сцепленные с полом, в том числе рецессивные, проявляются у самцов F₁. Здесь четко выявляются все изменения, возникающие в облученных X-хромосомах.

способностью) и с высокими частотами («малые» мутации; мутации с пониженной жизнеспособностью и летальные мутации). Для каждого объекта типичный характер спонтанного мутационного процесса совпадает с индуцированным обучением. Поэтому мы не имеем оснований для того, чтобы делать принципиальные различия между «спонтанными» и «радиационными» мутациями.

Было установлено, что при облучении могут появляться обратные мутации. В табл. 1 представлены обширные результаты исследований; они показывают, что для различных генов X-хромосомы и III хромосомы *Drosophila melanogaster* рентгеновское облучение может индуцировать обратные мутации от ре-

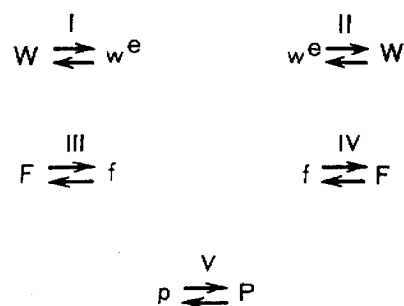


Рис. 3. Пары аллелей *Dr.melanogaster*, в которых при рентгеновском облучении возникают мутации в обоих направлениях, непосредственно одна из другой.

I. Из нормального аллеля возник аллель eosin, а из этого eosin при последующем облучении опять возникает нормальный аллель.

II. Из спонтанно возникшей мутации eosin образуется нормальный аллель, а из него — опять аллель eosin;

III. Из нормального аллеля возник forked, а из этого — forked, опять нормальный.

IV. Из спонтанно возникшего forked образовался нормальный аллель, а из него при дальнейшем облучении — опять forked.

V. Из нормального аллеля возник pink, из pink — обратная мутация к нормальному аллелю, а из него опять появился pink.

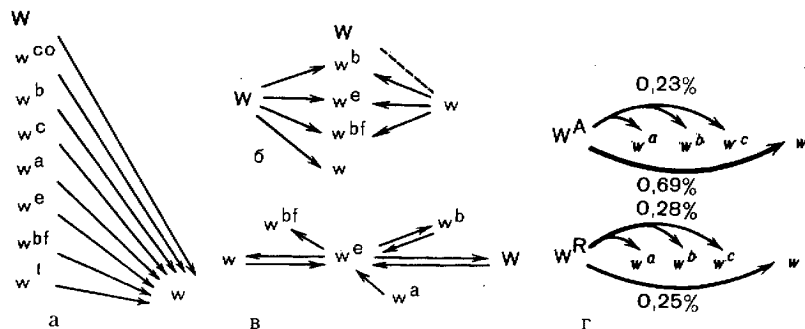


Рис. 4. Рентгениндуцированный мутагенез ряда множественных W-аллелей *Dr.melanogaster*.

а. Аллель white может возникать из всех других тестируемых аллелей.

б. Нормальный аллель (W) мутирует к blood (W^b), eosin (W^e) и buff (W^{bf}), которые также образовались из white (w) через обратные мутации; нормальный аллель мутирует также прямо к white, но теоретически допустимый переход от w к W никогда не наблюдался.

в. Различные мутации от eosin и к нему.

г. Мутабельность двух различных «нормальных» аллелей (W^A и W^R) серии white к white (w) и к промежуточным аллелям (w^a , w^b , w^c).

цессивных летальных аллелей к нормальным исходным доминантным аллелям. На рис. 3 схематически изображены пары аллелей, в которых в моих исследованиях прямые и обратные мутации возникали одни из других, т.е. случаи, когда при подобных лучевых воздействиях мутации могут происходить в двух противоположных направлениях. В группах множественных аллелей при облучении могут возникать различные мутации в разных направлениях, как это показано на рис. 4 для лучше всего изученного к настоящему времени аллеля white дрозофилы. Из этих результатов исследований следует, что воздействия облучения, проявляющиеся через мутации, как и сам мутационный процесс, не могут быть чисто «разрушительными», так как они способны к ревертированию (см. табл. 1).

2.3. Количественный анализ мутационного процесса

После того как в предыдущем разделе была дана общая, качественная, картина мутационного процесса, индуцируемого облучением, перейдем к исследованиям, цель которых — анализ закономерностей генетического действия излучений.

Безусловной предпосылкой для проведения таких исследований является возможность достоверно знать экспериментально определяемые частоты возникновения мутаций. Для *Drosophila melanogaster*, как показано на рис. 2, пользуясь определенными методами скрещиваний, можно оценить мутабельность определенной части генома, а именно X-хромосомы. Поскольку мутации, которые мы наблюдаем, имеют очень широкое фенотипическое проявление (от альтернативных признаков до едва заметных свойств), необходимо работать с легко и надежно регистрируемой частью возникающих мутаций. Таковой можно считать летальные и большие морфологические мутации в X-хромосоме. Можно, разумеется, а priori принять, что мутабельность X-хромосомы будет неверно отражать среднюю общую мутабельность дрозофилы; специальные исследования Р.Л. Берг [18] и Н.И. Шапиро, Р.И. Серебровской [19], а также неопубликованные результаты наших исследований показывают, что частота мутирования разных хромосом дрозофилы пропорциональна длинам их генетически активных частей; иначе говоря, различные отрезки генома большей длины обнаруживают одинаковые средние значения частот возникновения мутаций. Частоту мутирования X-хромосомы можно использовать в качестве точной характеристики мутабельности дрозофилы, а частоту возникновения мутаций в X-хромосоме можно объективно и точно определять с помощью СВ-метода.

Прямое действие облучения и его независимость от биологического материала. Можно предположить, что облучение не прямо воздействует на гены, а по какому-либо косвенному пути,

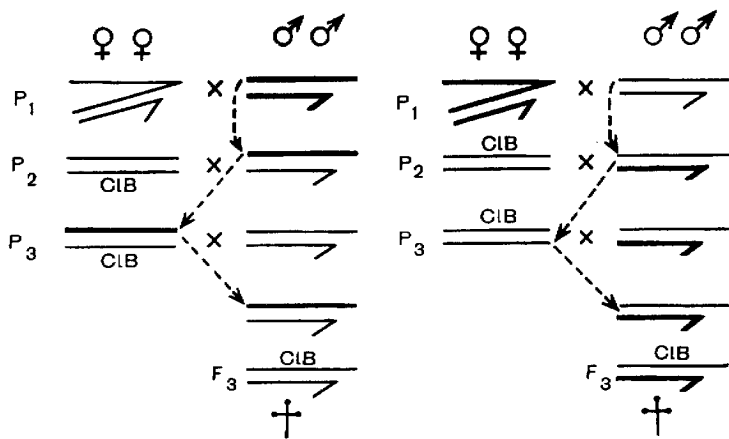


Рис. 5. Слева: схема скрещивания для выяснения мутабельности ранее облученной, но сразу после облучения не содержащей мутаций X-хромосомы; P₁ — самцы были облучены и скрещены с самками со сцепленными X-хромосомами; самцы F₁, не имеющие мутаций, были скрещены с CIB-самками; анализ F₃ позволяет установить частоту мутирования ранее облученной X-хромосомы (P-самцов).

Справа: схема скрещивания для выяснения мутабельности необлученной X-хромосомы в облученных яйцах; P₁-самки, несущих сцепленные X-хромосомы, облучали и скрещивали с необлученными самцами. Самцы — F₁ (самцы-P₂) содержали необлученные X-хромосомы, которые были введены в облученные яйца; эти самцы были скрещены с самками CIB (P₂) и в F₃ можно было установить частоту мутирования необлученной X-хромосомы (самцов P₂), которая находилась в плазме облученных яиц. Облученные хромосомы четко выявляются.

оказывающему влияние на мутирование. Это предположение можно экспериментально проверить так, как показывает схема скрещивания, приведенная на рис. 5: 1) определить мутабельность ранее облученных, но сразу после облучения не содержащих мутаций хромосом; 2) определить мутабельность необлученных хромосом, помещенных в облученные яйца. Скрещивания первого типа были проведены Меллером [11], Тимофеевым-Ресовским [20, 21] и Грюнебергом [22], а скрещивания второго типа — Тимофеевым-Ресовским [21]. Все эти исследования дали отрицательный результат: не было установлено ни «последствия» облучения, ни влияния на необлученные хромосомы облученной протоплазмы. Результаты исследования Тимофеева-Ресовского представлены в табл. 2.

Можно показать, что как у дрозофилы, так и у растений [23] возникновение мутаций не обязательно связано с делением хромосом и генов, но может происходить при состоянии полного покоя хромосом.

При действии рентгеновских лучей и лучей радия мутирование может происходить у дрозофилы обоих полов на разных

Таблица 2. Частота возникновения сцепленных с полом мутаций у *Drosophila melanogaster*: 1) в необлученной контрольной культуре; 2) в культуре, несущей X-хромосомы облученных спермиев, которые сразу после облучения не содержали мутаций (P₂ на рис. 5, слева); 3) в X-хромосомах, находящихся в яйцеклетках, облученных перед скрещиванием (P₂ на рис. 5, справа); 4) в непосредственно облученных рентгеновскими лучами X-хромосомах спермиев (3000 P) P-♂♂ были скрещены с CIB-♀♀

Группа опыта	Число		Процент сцепленных с полом летелей
	культур	мутаций	
1. Необлученный контроль	3708	7	0,19 ± 0,07
2. Облученные X-хромосомы, оставшиеся без мутаций	1431	3	0,21 ± 0,12
3. Необлученные X-хромосомы в облученных яйцеклетках	1212	2	0,16 ± 0,12
4. Непосредственно облученные X-хромосомы (доза 3000 P)	2239	198	8,84 ± 0,59

стадиях развития и в различных тканях. Вопрос, вызывает ли одинаковое облучение повсюду одинаковое мутирование, не может быть точно и однозначно решен, так как наталкивается на ряд технических трудностей. Некоторые различия в частотах мутирования (зрелых и незрелых спермиев, женских и мужских гамет), по свидетельству большинства авторов, работающих над этим вопросом [21, 24–28], обуславливаются гаметическим отбором (или, по-другому, на выявление наблюдаемых мутаций оказывают влияние различные привходящие факторы), а не различной физиологически обусловленной мутабельностью генов. Вероятности возникновения мутаций, индуцированных облучением, для разных особей дрозофилы одинаковы [29]; особей, особенно предрасположенных к возникновению мутаций, не существует. Оказывает ли влияние генотипическая среда (или раса), в которой находится определенный ген, на индуцированную облучением мутабельность этого гена, решить трудно. Единственный до сих пор исследованный случай (мутабельность нормального аллеля серии white) показал, что генотипическая среда не оказывает влияния на мутабельность определенных генов и что различия в этом случае могут быть обусловлены тем, что в двух расах были использованы разные аллели. Определение частоты возникновения индуцированных облучением соматических мутаций глаза у самцов чистой линии *Drosophila simulans* и гибридов *Drosophila melanogaster* × *Drosophila simulans* (т.е. в X-хромосоме от *Drosophila simulans* один раз в чистом геноме *simulans*, второй раз в гибридном геноме) дали лишь незначительные и статистически недостоверные различия [30]. Вообще было замечено, что различия в мутабельности родственных видов и рас могут проявляться через различные типы «маскировки» некоторой части мутаций, а не

быть обусловленными различиями собственно частот мутирования генов [14, 15], что всегда необходимо учитывать при обсуждении этой проблемы.

Частота возникновения мутаций и доза облучения. Еще первые исследования, проведенные Г. Дж. Меллером [9, 10], показали, что частота возникновения индуцированных облучением мутаций прямо пропорциональна использованной дозе. Специальные исследования, выполненные разными авторами [14, 15, 31–39], имели своей целью установить форму связи между частотой возникновения мутаций и дозой облучения. В табл. 3 приведены полученные мною данные, а на рис. 6 представлен соответствующий график. Исследования всех вышеупомянутых авторов охватывают очень большой интервал доз (350–9000 Р). Отклонение при большом числе мутаций в сторону минуса от ожидаемой прямой пропорциональности объясняется наступлением явления насыщения, которое обусловлено тем, что при использовании СВ-метода появление двух (или большего числа) летальных мутаций в одной X-хромосоме, которая выступает как единый носитель летальных факторов, в большинстве случаев различить не удастся. Поэтому эмпирически следует ожидать лучшего согласия результатов экспериментов с кривой насыщения, чем с кривой линейной пропорциональности, что и наблюдается в действительности [38, 40].

Так как в вышеупомянутых исследованиях облучение дозировалось в Р-единицах, то можно констатировать, что в изученном широком диапазоне доз индуцированная частота мутаций прямо и линейно пропорциональна ионизационной дозе облучения.

Наконец, можно отметить, что такие же закономерности присущи не только общей частоте возникновения мутаций в X-хромосомах, которые на 90 % состоят из летальных факторов, но, по-видимому, как позволяют предполагать еще не завершённые исследования, также для «видимых» сцепленных с полом мутаций, а также для некоторых отдельных генов.

Частота мутаций и длина волны излучения. Столь же успешные исследования индуцированного мутагенеза были проведены на дрозофиле с разными видами облучения, от мягких рентгеновских лучей до жесткого γ -излучения радия [14, 15, 33,

Таблица 3. Пропорциональность между частотой возникновения сцепленных с полом мутаций и дозой рентгеновского облучения у *Drosophila melanogaster* (50 кВ, 1 мм А1)

Доза рентгеновского облучения, Р	Число		Мутации, %
	культур	мутаций	
Контроль	3058	4	0,13 ± 0,07
750	988	21	2,12 ± 0,46
1200	718	27	3,76 ± 0,71
1500	803	34	4,23 ± 0,71
2400	518	39	7,53 ± 1,16
3000	619	53	8,56 ± 1,12
3600	430	46	10,69 ± 1,49
4800	392	54	13,77 ± 1,74
6000	416	65	15,62 ± 1,78

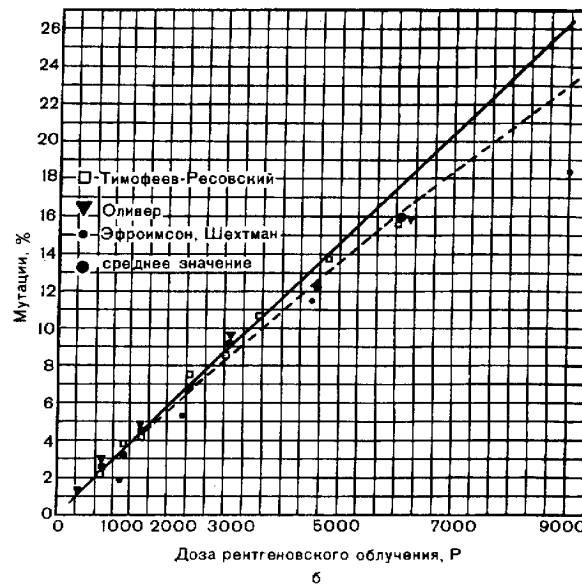
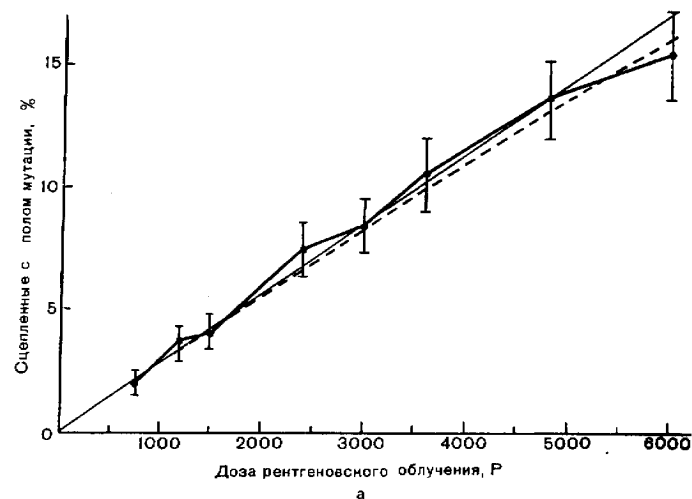


Рис. 6. Зависимость частоты возникновения сцепленных с полом мутаций от дозы облучения *Dr. melanogaster*.

а — результаты исследований, проведенных Тимофеевым-Ресовским. б — сопоставление результатов, полученных Эфроимсоном и Шехтманом, Оливером и Тимофеевым-Ресовским; приведены также средние значения. Непрерывная прямая линия соответствует прямой пропорциональности, пунктирная линия соответствует кривой насыщения; вертикальные линии на верхнем рисунке показывают границы ошибок, допущенных в отдельных экспериментах.

37—39, 41, 42]. Исследования, проведенные Хансоном, Хейсом и Стантоном [42], Шехтманом [37] и Тимофеевым-Ресовским [38], показали, что в области изменения длины волны рентгеновского излучения (от порогового излучения до жестких рентгеновских лучей) у дрозофилы не существует зависимости частоты возникновения мутаций от длины волны. Напротив, в исследованиях Хансона и Хейса [34] есть указания, что излучение радия (Р) оказывает на мутации большее влияние, чем эквивалентные дозы рентгеновских лучей. Так как дозирование γ -лучей (Р) было до последнего времени технически трудно осуществимо, то эти указания следует еще проверить. Последующие опыты [43] показали, что равные эквивалентные дозы рентгеновского и γ -излучения (Р) вызывают одинаковую частоту возникновения мутаций. В табл. 4 приведены результаты исследований, проведенных Тимофеевым-Ресовским с разными рентгеновскими лучами и Пикханом с рентгеновскими и γ -лучами. Одинаковые дозы (Р) всех

Таблица 4. Действие эквивалентных доз: 1) мягких и жестких рентгеновских лучей; 2) достаточно мягких рентгеновских и жестких γ -лучей на частоту возникновения сцепленных с полом мутаций у *Drosophila melanogaster*. Р- σ σ скрещивались с самками СВВ- φ φ

Доза, Р	Качество излучения	Число		Мутаций, %
		культур	мутаций	
3750	Рентген, 25 кВ 0,5 мм Al	486	54	11,11 \pm 1,42
3750	Рентген, 160 кВ 0,25 мм меди+3 мм Al	516	53	10,25 \pm 1,33
4500	Рентген, 50 кВ 1 мм Al	591	72	12,19 \pm 1,29
4500	γ -Лучи радия	508	59	11,61 \pm 1,35
Необлученный контроль		1827	2	0,11 \pm 0,10

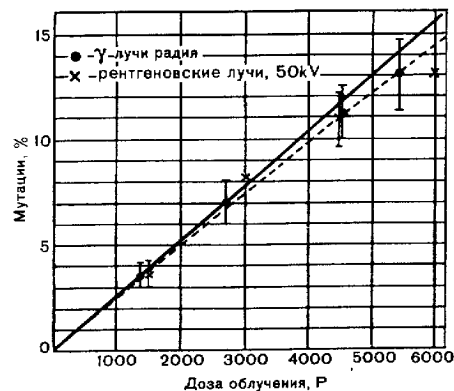


Рис. 7. Пропорциональная зависимость частоты возникновения мутаций от дозы облучения по результатам опытов с рентгеновскими и жесткими γ -лучами.

рентгеновских и γ -лучей оказывают одинаковое мутагенное действие. Между тем исследования А. Пикхана различных доз рентгеновских и γ -лучей показывают (рис. 7), что излучения различного качества дают одинаковую прямую линейную пропорциональность (к дозе Р) числа возникающих мутаций.

Можно считать, что у дрозофилы частота возникновения мутаций во всей области изменения длины волны рентгеновских и γ -лучей не зависит от длины волны и является функцией только величины дозы.

Частота мутирования и фактор времени. Многие радиобиологические реакции проявляют известную зависимость от того, сконцентрирована или «разбавлена» полная (единовременная) и фракционированная (т.е. разделенная некоторыми промежутками времени) доза облучения. Поэтому говорят о воздействии «фактора времени» или неправильности так называемого закона $I \cdot t = \text{const}$. Так как утверждение, что фактор времени оказывает влияние на регистрируемый эффект, имеет громадное аналитическое значение, многими авторами были проведены специальные исследования на дрозофиле, в которых доза облучения варьировала во времени.

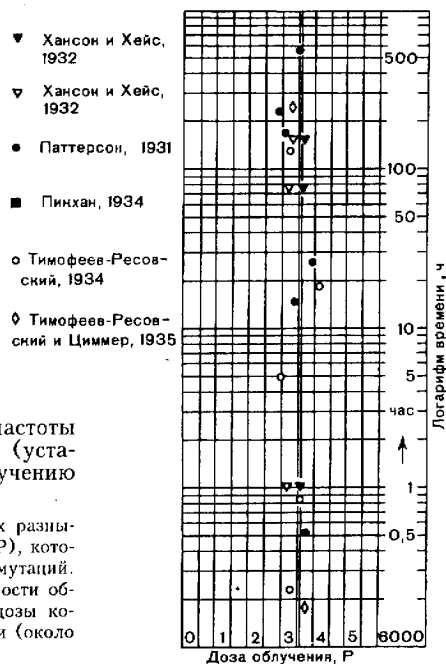
Паттерсон [44] облучал самцов дрозофилы рентгеновскими лучами (1250 Р) одновременно в течение 10 мин, а также в виде 8 фракций, разделенных промежутками времени от 4 ч до 8 дней: во всех случаях частота мутирования была одинаковой. Хансон и Хейс [34] облучали дрозофилу одинаковой дозой лучей радия, задаваемой в течение 30 мин и 1 ч или растянутой на 75 и 150 ч и не установили никакого влияния «разбавления» дозы на частоту мутирования. В исследованиях Тимофеева-Ре-

Таблица 5. Частота возникновения сцепленных с полом мутаций у *Drosophila melanogaster*, вызванных эквивалентными дозами рентгеновских лучей при остром, протрагированном и фракционированном облучении. Р- σ σ скрещивали с СВВ- φ φ . Облучение: 1—3. 3600 Р (5 кВ, 1 мм Al) в течение 15 мин (240 Р/мин), 6 час (10 Р/мин) и 6 дней по 5 мин (120 Р/мин); 4—5. 3000 Р (50 кВ, 1 мм Al) в течение 10 мин (300 Р/мин) и 10 дней по 5 час (1 Р/мин). Различия в мощности дозы: 1—3=1:25; 4—5=1:300. Различия в продолжительности облучения: 1—3=1:576; 4—5=1:1440.

№ п/п	Доза, Р	Опыт	Число		Мутации, %
			культур	мутаций	
1	3600	Острое облучение, 15 мин	493	54	1,95 \pm 1,41
2	3600	Протрагированное облучение, 6 ч	521	60	11,51 \pm 1,39
3	3600	Фракционированное облучение, 6 дней — 5 мин	423	47	11,11 \pm 1,52
4	3000	Острое облучение, 10 мин	531	43	8,09 \pm 1,18
5	3000	Протр. — фракционированное облучение, 10 дней — 5 ч	573	52	9,07 \pm 1,18
6	Необлученный контроль		1827	2	0,11 \pm 0,10

Рис. 8. Отсутствие зависимости частоты возникновения мутаций от времени (установлено в исследованиях по облучению *Dr. melanogaster*).

По результатам исследований, проведенных разными авторами, рассчитаны дозы облучения (Р), которые вызывают 10 % сцепленных с полом мутаций. Эти дозы отложены против продолжительности облучения (в логарифмическом масштабе); дозы колеблются в пределах статистической ошибки (около 3600 Р).



совского и Циммера [38, 45] одинаковые дозы рентгеновских лучей были сконцентрированы во времени (300 Р/мин, 240 Р/мин); растянуты (10 Р/мин, 1 Р/мин), фракционированы (6–10 фракций в течение 6–10 дней) и растянуто фракционированы (табл. 5). В этих опытах процент выявившихся мутаций также был прямо пропорционален величине дозы и не зависел от фактора времени, несмотря на то что общее время облучения варьировалось в соотношении 1:1440. В исследованиях Пикхана [43] мощность рентгеновского облучения варьировалась в соотношении 1:19 (70,5 Р/мин и 3,7 Р/мин), но влияния на частоту возникновения мутаций также не было обнаружено. Результаты всех исследований по фактору времени представлены на рис. 8.

Итак, исследования на дрозофиле показали, что индуцированный излучениями мутагенез не зависит от фактора времени и пропорционален только общей дозе облучения. Это позволяет сделать несколько важных следствий. Во-первых, это дополнительное доказательство прямого и пропорционального дозе действия облучения на гены. Во-вторых, это основание для того, что нельзя ожидать минимальной или «пороговой» дозы облучения и что кривая прямой пропорциональности может быть экстраполирована сверху до нуля. И, в-третьих, из этого можно

заключить, что процесс мутирования в противоположность многим другим радиобиологическим реакциям на облучение осуществляется без восстановления, т.е. что при облучении гены из одного стабильного состояния непосредственно переходят в другое.

Комбинированное действие облучения и других повреждений. Стадлер [23] смог показать на семенах растений, что пропитывание семян солями тяжелых металлов, само по себе не вызывающее мутаций, повышает эффективность последующего облучения, что, вероятно, основывается на лучшей абсорбции излучений в таких тканях. В последнее время это было подтверждено на дрозофиле [46]; насекомые, получавшие корм с добавкой 1 % Рb (СН₃СОО)₂, давали после рентгеновского облучения больше мутаций, чем интактные насекомые после такого же облучения.

Кроме воздействия солей тяжелых металлов, на дрозофиле испытывали воздействие температурой во время облучения. Меллер [11] облучал мух в одной и той же дозе рентгеновских лучей при температурах 8 и 34 °С и не получил статистически значимых различий. В наших исследованиях [38] рентгеновскими лучами (3000 Р) облучали самцов дрозофилы при температуре 10 и 35 °С; статистически значимого различия также не обнаружено (табл. 6).

Таблица 6. Частота возникновения сцепленных с полом мутаций у *Dr. melanogaster* после облучения в одинаковых дозах рентгеновских лучей при различных температурах (качество лучей: 50 кВ, 1 мм алюминиевого фильтра)

Условия облучения	Число		Мутации, %
	культур	мутаций	
Контроль	1827	2	0,11 ± 0,10
Около 3000 Р, 10 °С	401	37	9,22 ± 1,14
Около 3000 Р, 35 °С	368	30	8,15 ± 1,45

Исследования, описанные в этом разделе, показывают, что облучение оказывает прямое действие (а не через физиологический косвенный путь) на мутирование генов. Число выявляемых мутаций прямо пропорционально использованной дозе и не зависит ни от длины волны, ни от распределения дозы во времени, ни от температуры во время облучения. На рис. 9 приведены результаты всех наших исследований с различными дозами рентгеновских лучей, различными распределениями дозы во времени, различной длиной волн использованного излучения и разной температурой во время облучения. Результаты нормированы на частоту мутирования при 1000 Р. Во всех этих экспериментах выход мутаций (на 1000 Р) распределяется случайно около среднего значения часто-

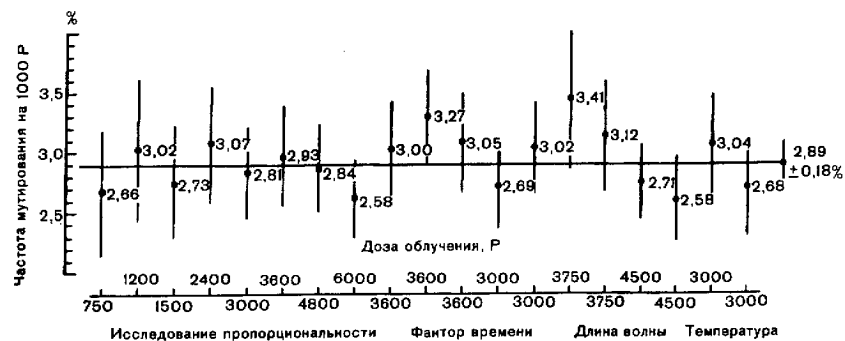


Рис. 9. Частота возникновения мутаций (в X-хромосоме) на 1000 Р, рассчитанная по результатам различных опытов с облучением *Dr. melanogaster*.

Слева направо: дозы (750—6000 Р) одинаковых рентгеновских лучей (см. табл.3). Влияние фактора времени с острым, протрагированным, фракционированным и протрагированно-фракционированным облучениями рентгеновскими лучами (см. табл.5); влияние длины волны при одинаковых дозах мягких и жестких рентгеновских лучей и одинаковых дозах рентгеновских и γ -лучей (см. табл.4); облучение в одинаковых дозах рентгеновскими лучами при низкой и высокой температурах (см. табл.6). Частота сопоставляется с горизонтальной прямой, соответствующей общей средней для всех данных и равной 2,89 % на 1000 Р; вертикальные линии обозначают границы ошибок, допущенных в отдельных опытах.

ты, без статистически значимых отклонений. На рис. 9 показано, что индуцированное облучением мутирование у дрозофилы линейно пропорционально дозе, выраженной в Р, и не зависит от других испытанных сопутствующих факторов. Оказалось, что единственный существенный сопутствующий фактор — это примесь к облучаемым тканям солей тяжелых металлов; что ясно из физических соображений и находится в согласии с остальными результатами исследований.

2.4. Связь частоты спонтанного мутирования генов с временем и температурой

Существуют два вопроса, которые следует выяснить в связи со спонтанной мутабельностью генов: какова зависимость мутабельности от времени и температуры.

Вопрос о зависимости мутабельности от времени сразу же распадается на два отдельных вопроса. Сначала необходимо выяснить, не зависит ли от времени мутационный процесс как таковой, т.е. не зависит ли частота мутирования от «возраста» гена (т.е. от промежутка времени, в течение которого он существует, не мутируя). Следует также решить, что если мы будем удалять все появляющиеся мутации, то оставшиеся еще не мутировавшие гены будут со временем проявлять все более высокую мутабельность или же их мутабельность останется постоянной. Едва ли можно решить этот вопрос эксперименталь-

но, но прояснить указанную ситуацию можно. Вышеупомянутый эксперимент — удаление уже мутировавших генов — постоянно осуществляется как в природных условиях, так и при непрерывном культивировании в лаборатории. Пусть «продолжительность жизни» аллеля ограничена и мутационный процесс зависит от времени. Тогда в природе (ввиду относительно очень больших возрастов современных видов) мутирование должно быть очень высоким, а в стареющих культурах должно постоянно увеличиваться. Мы, однако, не имеем никаких указаний на то, что это действительно так, и можем поэтому установить, что мутационный процесс как таковой от времени не зависит.

Второй вопрос, касающийся связи мутирования генов и фактора времени, можно сформулировать так: следует ли определять мутабельность как процент мутаций на единицу времени или же — на биологическую единицу, например число генераций? На практике мутирование у дрозофилы определяют в расчете на генерацию, но для самцов известного возраста и при постоянных условиях частоту мутирования можно определять и по отношению к абсолютному времени. В этом случае интересующий нас вопрос можно решить, сравнивая через различные промежутки времени содержание мутаций в клетках, находящихся в стадии покоя. У дрозофилы для этого подходят зрелые спермии, еще не использованные для оплодотворения, у которых не произошел зародышевый отбор [21, 47]. В табл. 7 приведены результаты наших определений спонтанной доли сцепленных с полом летальных факторов в зрелых спермиях только что вылупившихся и 20-дневных самцов дрозофилы. Эти данные как будто означают, что мутабельность следует определять как процент мутирования в единицу времени, хотя материал еще недостаточен, чтобы быть статистически достоверным. Это предположение согласуется с тем, что мы уже знаем о мутационном процессе.

Вопрос о связи спонтанного мутагенеза с температурой обсуждался уже в первой работе Г. Дж. Меллера об определении регистрируемой частоты мутирования у дрозофилы [48]. Во 2-й

Таблица 7. Спонтанная частота содержания сцепленных с полом летальных факторов в свежих (только что вылупившиеся самцы) и постаревших (самцы через 15—20 дней после вылупления) спермиях самцов *Dr. melanogaster*

Методика	Возраст спермиев	Число		Летальные факторы, %
		культур	мутаций	
Метод СВ Культивирование при 24 °С	1. Самцы сразу после вылупления	6831	7	0,102 ± 0,038
	2. Самцы через 15—20 дней после вылупления	5957	14	0,234 ± 0,062

Разность $2-1 = 0,132 \pm 0,072$

Таблица 8. Определение зависимости от температуры (в области нормальных температур) частоты спонтанного возникновения летальных факторов, сцепленных с полом, у самцов *Drosophila melanogaster*

Методика	Опыт	Число культур	Число сцепленных с полом летальных факторов	Летальные факторы, %
Метод ClB	1 Самцы при 4 °C	6871	6	0,087 ± 0,035
	2 » » 24 °C	3708	7	0,188 ± 0,071
	3 » » 28 °C	6158	20	0,325 ± 0,072

Разность 1-3 = 0,24 ± 0,08 %

Продолжительность исследования: 14 °C — 22 дня, 24 °C — 14 дней, 28 °C — 11,5 дней.
 Поправки на частоту мутирования: 14 °C — 0,056 %, 24 °C — 0,188 %;
 28 °C — 0,396 %. $t^*_{Q_{10}} = 2,6$; с поправкой $t^*_{Q_{10}} = 5,1$.

работе Меллер [49] привел дополнительный материал о спонтанном мутагенезе при различных температурах. В обеих работах было показано, что при повышении температуры мутабельность увеличивается. Приблизительно такие же результаты приведены в табл. 8, содержащей итоги исследования влияния температуры. Спонтанное мутирование при повышении температуры тоже повышается. Температурный коэффициент ($t^*_{Q_{10}}$) составляет приблизительно 2, 5; но в таком случае, принимая во внимание представления о связи мутирования со временем, следует ввести поправку на ускорение развития и при более высоких температурах, и тогда $t^*_{Q_{10}} \approx 5$. Из этого следует, как уже писал Меллер, что мутагенез подчиняется правилу Вант-Гоффа.

Из приведенных результатов и соображений следует, что спонтанную мутабельность следует определять как процент мутаций на единицу времени, что частота мутирования, как таковая, не зависит от времени, но зависит от температуры, подчиняясь правилу Вант-Гоффа.

2.5. Частота возникновения отдельных генных мутаций

Во всех до сих пор приводившихся исследованиях речь шла об оценке некоторой доли общего мутационного процесса *Drosophila melanogaster*, о сумме различных генных мутаций. Однако с помощью радиобиологических методов можно количественно оценивать мутабельность отдельного гена, а также вклад в общий мутагенез отдельных, определенных мутационных событий. Для этого требуется обработка очень большого фактического материала: к настоящему времени имеются лишь ограниченные данные.

В табл. 9 приведены результаты изучения индуцированной рентгеновским облучением мутабельности локуса white у *Dr. melanogaster* [16, 50]. Видно, что внутри этого ряда множест-

Таблица 9. Сравнение различных, полученных при одинаковом рентгеновском облучении (около 5000 P) частот мутирования внутри серии множественных аллелей white у *Dr. melanogaster*

Мутации	Число		Частота мутирования, %	Разница в частоте мутирования, %
	гамет	мутаций		
Прямые мутации	136 000	63	0,463 ± 0,061	0,432 ± 0,062
Обратные мутации	190 000	6	0,031 ± 0,013	
W → w ^x	48 500	37	0,763 ± 0,125	0,708 ± 0,128
w → w ^x	54 000	3	0,055 ± 0,032	0,264 ± 0,106
W → w	48 500	25	0,515 ± 0,102	
w ^x → w	87 500	22	0,251 ± 0,056	0,266 ± 0,069
w ^e → w ^{te}	72 000	22	0,306 ± 0,064	
w ^e → w ^{te}	72 000	3	0,040 ± 0,024	0,393 ± 0,136
W → w ^x	48 500	37	0,763 ± 0,125	
w ^{e-co} → w ^x	73 000	27	0,370 ± 0,071	0,297 ± 0,078
w ^{-bf} → w ^x	68 500	5	0,073 ± 0,032	

Таблица 10. Сравнение частоты возникновения мутаций в 2 противоположных направлениях у 5 различных пар аллелей *Drosophila melanogaster* под влиянием рентгеновского облучения (4800—6000 P). Исследования Тимофеева-Ресовского и Г. Меллера, Д. Паттерсона

Генные мутации	Число прямых мутаций		Число обратных мутаций	
	гамет	мутаций	гамет	мутаций
W ⇌ w	69 500	28	54 000	0
W ⇌ w ^e	69 500	9	72 000	3
F ⇌ f	43 000	11	44 000	15
P ⇌ p ^p	52 000	1	58 000	9
B ⇌ b	69 500	0	9000	8

Таблица 11. Сравнение частот возникновения спонтанных и индуцированных рентгеновскими лучами мутаций от W (нормальный аллель) к w (white) и от bb^x (летальный аллель, от «bobbed») к Bb (нормальный аллель) у *Drosophila melanogaster*

Генные мутации	Частота спонтанного возникновения мутаций	Частота рентгениндуцированного возникновения мутаций
W → w	1:около 300 000 (3:1 000 000)	1:около 2500 (28:69 500)
bb ^x → Bb	1:около 12 000 (3:35 000)	1:около 1800 (10:18 000)

венных аллелей возникают различные типы мутаций, имеющие различную частоту. Из этого можно сделать вывод, что частота мутирования обуславливается структурой аллеля.

В табл. 10 — частота возникновения индуцированных облучением прямых и обратных мутаций у одного из генов *Drosophila melanogaster* [16, 50–52]. Немногие позже проводившиеся исследования показали, что существуют все переходы от случаев, в которых имеют место только прямые мутации, через такие, в которых прямые и обратные мутации происходят с равными частотами, до случаев, в которых обратные мутации возникают чаще, чем более редко встречающиеся или одиночные прямые мутации (от нормального к мутантному аллелю).

Наконец, в табл. 11 приведены результаты исследований, в которых сравнивали частоту спонтанного и рентгениндукцированного мутирования двух разных генов (Тимофеев-Ресовский, не опубликовано). Частоты спонтанного мутирования обоих генов очень различны. Одна мутация от нормальной к белой окраске глаза ($W \rightarrow w$), так же как и большинство мутаций у нормальной *Drosophila melanogaster*, встречается очень редко, так что их вклад составляет не более 1 на 300 000. Другая мутация, от $bobbed^{lx}$ к нормальному аллелю ($bb^{lx} \rightarrow Bb$), возникает спонтанно относительно очень часто: приблизительно 1 на 12 000. При равных дозах рентгеновского облучения обе мутации, столь различающиеся по частоте спонтанного возникновения, образуются приблизительно с одинаковой частотой (1:2500 и 1:1800).

Заканчивая анализ табл. 11, следует коротко упомянуть результаты, полученные Демерцем [53, 54] и Штуббе [55] на так называемых «мутабильных» или «лабильных» генах, т.е. генах, часто мутирующих. М. Демерец подробно и детально изучил «мутабильный» аллель гена *miniature Dr. virilis*. Мутабильный мутантный аллель резко и сильно отличался от всех аллелей нормального типа необычно высокой мутабильностью, которая большей частью выражалась в появлении мутаций обратных к нормальному, стабильному аллелю. Нормальные аллели имели мутабильность 0,001–0,0001 %, а мутабильный аллель мутировал с частотой около 1 %. Мутабильность «мутабильного» аллеля, правда, не будет так резко выделяться, если мы будем ее сравнивать не только с мутабильностью нормального аллеля, но и с мутантными аллелями. Последнее известно лишь в немногих случаях, но, как показано в табл. 11, для спонтанной мутабильности мутантного bb^{lx} -аллеля, для различных мутантных аллелей можно найти различные переходы от «стабильных» к «лабильным» генам. Мы должны предположить, что аллели нормального типа высоко стабильны: тогда лабильные аллели с течением времени в результате естественно-го отбора должны исчезнуть, если они не определяют признак с

очень высоким селективным преимуществом: правда, в последнем случае постепенно будут возникать стабильные гены, определяющие эквивалентный признак. Поэтому не только «мутабильные», но и вообще лабильные аллели мы постоянно находим в мутантных линиях, а не в «диком» типе дрозофилы.

М. Демерец [54, 56–60] провел серию превосходных исследований мутабильности лабильного аллеля. Нас особенно интересуют два обнаруженных им явления. В одном специальном исследовании Демерец [58] смог показать, что мутабильность «мутабильного» 3-аллеля *miniature-3* очевидно не зависит от температуры: в каждом случае мутабильность этого аллеля при повышении температуры увеличивалась не более чем ускорение общего развития мух. В первом кратком сообщении Демерец [60] показал, что частота мутирования этих самых «мутабильных» аллелей *Dr. virilis* при рентгеновском облучении также мало изменяется: частота других мутаций у этих же облученных мух возрастает в несколько раз, а в «мутабильном» аллеле *miniature* наибольшее, чем можно наблюдать после облучения, это совсем небольшое, статистически недостоверное увеличение мутабильности. Этот факт особенно интересен в сопоставлении с результатами, приведенными в табл. 11, и опять показывает, что действие облучения совсем необязательно пропорционально спонтанной мутабильности.

Как показывают приведенные в этом разделе данные, структура разных аллелей и их мутабильность взаимосвязаны, но особенно лабильным генам не соответствует особенно высокая частота мутирования при облучении. Кроме того, можно считать, что мутабильность в двух противоположных направлениях у разных аллелей должна изменяться по-разному, причем существуют переходы от случаев с одинаковыми вероятностями возникновения обеих противоположных мутаций до крайних ситуаций, в которых реализуется только одно направление мутирования.

3. ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

3.1. Общие итоги опытов

Из всех до сих пор проведенных наблюдений и исследований, посвященных мутационному процессу у *Drosophila melanogaster*, можно сделать следующие выводы.

1. Спонтанно возникают самые различные мутации, но частоты этих мутаций незначительны, и для суммы летальных и «хороших» видимых мутаций в X-хромосоме равны приблизительно 0,1–0,2 %.

2. Спонтанная мутабильность не зависит от времени; это означает, что «готовность» мутировать еще не мутировавших генов со временем не повышается, но остается постоянной.