

УДК 575.224.4:595.773.4

## МЕХАНИЗМЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ УСТОЙЧИВОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА КЛЕТКИ К СТРЕССОВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

© 1994 г. М. М. Тихомирова, К. В. Ватти, Л. А. Мамон, Л. В. Барабанова, Ю. А. Куцкова

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и селекции,  
Санкт-Петербург 199034

Поступила в редакцию 10.03.94 г.

Представлен краткий обзор научных исследований по проблеме механизмов мутационного процесса, выполненных на кафедре генетики Санкт-Петербургского госуниверситета под руководством М.Е. Лобашева его учениками, доказывающих то, что становление мутаций – многоэтапный процесс. В нем принимают участие многие клеточные и организменные системы (в том числе репарационные, системы, определяющие половой диморфизм, и другие), на работу которых оказывают влияние факторы среды (например, экстремальные температуры). Они могут затруднять или ускорять мутационный процесс, обеспечивая тем самым как сверхаддитивный эффект, так и адаптивный ответ. Исследования последнего времени посвящены универсальной системе белков теплового шока, которая участвует в обеспечении устойчивости генетического материала и генетических процессов, протекающих в клетке.

После открытия кафедры генетики в 1919 г. одним из основных направлений научных исследований становится изучение изменчивости [1].

В первые годы работы кафедры под руководством Ю.А. Филипченко изучали проблему индивидуальной (модификационной) изменчивости организмов с использованием статистических методов [2, 3].

С 1930 г. работы, проводимые под руководством А.П. Владимирского, были уже в большей степени посвящены изучению индуцированного мутагенеза. Основным объектом изучения становится *Drosophila melanogaster*, которая использовалась на кафедре с 1922 г. Одно из первых исследований в 1932 г. в этой области было посвящено изучению влияния асфиксии и химических веществ (аммиака и уксусной кислоты) на мутационный процесс у дрозофилы (М. Лобашев).

Для объяснения механизма мутаций в то время господствовала теория мишени и гипотеза попадания ("физические" гипотезы), сформулированные на основе изучения закономерностей доза-эффект в радиационном мутагенезе такими авторитетами, как Н.В. Тимофеев-Ресовский и К. Циммер [4]. В противовес "физическим" гипотезам М.Е. Лобашев в 1947 г. опубликовал свою физиологическую гипотезу мутационного процесса [5].

Для проверки гипотезы М.Е. Лобашев предложил в высшей степени плодотворный метод изучения мутационного процесса – метод последовательного действия двух факторов. Теперь по прошествии длительного периода времени можно говорить о том, что его идея мутационного про-

цесса общепризнана учеными, хотя ее и не связывают с его именем (см., например, Ш. Ауэрбах, 1978 [6]), а метод последовательного действия двух или нескольких факторов наиболее часто используемым.

Исследования мутационного процесса, прерванные в 1948 г., вновь возобновились на кафедре в 1957 г. в связи с возвращением М.Е. Лобашева. На дрозофиле были продолжены исследования закономерностей мутационного процесса при действии радиации и высокой температуры (К.В. Ватти, М.М. Тихомирова, И.М. Януш), изучение рентгеноморфозов (Ю.А. Волчков). Химический мутагенез (эффект фракционированного действия) и его закономерности (доза-эффект) изучал П.Я. Шварцман.

Широкий фронт работ по индуцированному мутагенезу был осуществлен на новых модельных объектах, внедряемых в научные лаборатории: на *Chlorella vulgaris* и *Saccharomyces cerevisiae* (И.А. Захаров, К.В. Квитко, В.И. Хропова, С.Г. Инге-Вечтомов, В.В. Тугаринов, Т.Р. Сойдла, В.В. Симаров и мн. др.). В ходе этих работ были не только описаны новые явления и закономерности мутагенеза (например, зависимость интенсивности мутагенеза от адаптации к нему клеток), но, что еще более важно, для дальнейшей плодотворной работы созданы богатые генетические коллекции этих организмов [7].

Не менее важным в это время были и работы по изучению системного контроля не только на уровне клетки, но и целого организма в мутационном процессе. В частности, был показан контроль цитогенетических процессов в соматичес-

ких клетках мышей и человека посредством ней-роактивных веществ (М.Н. Пименова), влияние симпатикотомии на цитогенетические процессы у мышей (Г.Г. Полянская). Успешно использовали метод условного рефлекса для изучения мутагенеза у мышей (Р.И. Цапыгина).

Большая серия работ под руководством К.В. Ватти была посвящена изучению дифференциальной чувствительности полов у дрозофилы как модели системного контроля мутационного процесса (Л.Е. Анисимова, Л.В. Барабанова, О.Я. Беляцкая, В.Г. Зайнуллин, Л.А. Джапаридзе, Н.В. Кузенкова, Н.В. Зимица, Л.А. Мамон, В.С. Михеев).

Исходной посылкой служило представление о том, что любой процесс в многоклеточном организме регулируется как организмом в целом, так и отдельными его системами и что мутационный процесс не является исключением. Изучали мутационный процесс и кроссинговер в половых и соматических клетках, морфозы и чувствительность организма в целом. Было показано, что дифференциальную чувствительность и мутабельность полов нельзя характеризовать однозначно. Она проявляется по-разному в зависимости от типа изучаемых мутаций и особенностей стадий гаметогенеза, в которых эти мутации возникают. Например, гонии у особей обоих полов в отличие от мейотических и постмейотических стадий гаметогенеза являются нечувствительными к действию использованных мутагенов при анализе частоты транслокаций, рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций (РСПЛМ) и потерь половых хромосом [8, 9].

Дифференциальная чувствительность самок и самцов и стадий сперматогенеза у особей линии  $uw/Y \cdot sc^8$  показана Л.А. Мамон при учете транслокаций (очень низкая частота на всех стадиях оогенеза). По данным В.С. Михеева индуцированные облучением в гаметоцитах аутосомные рецессивные летальные мутации (АРЛМ) также возникают с меньшей частотой у самок в линии Кантон С. Однако при последовательном действии облучения и высокой температуры частота АРЛМ в ооцитах увеличивалась по сравнению с одним облучением, а в сперматоцитах оставалась неизменной. При учете АРЛМ у особей линии дикого типа  $rad^+$  (а также у радиочувствительной линии  $rad$ ), как показал В.Г. Зайнуллин, самцы оказались более мутабельными по сравнению с самками. По данным Л.Е. Анисимовой, при учете индуцированных радиацией потерь X-хромосом и РСПЛМ в линии  $uw/Y \cdot sc^8$  более мутабельными оказались сперматоциты. Как показала Л.А. Джапаридзе, при действии нитрозомочевинной у особей линии  $uw/Y \cdot sc^8$  частота нерасхождения X-хромосом увеличивается в ооцитах, оставаясь неизменной в сперматоцитах, а частота потерь возрастает только у самцов. Авторы обсуждают полученные результаты с привлечением гипотез: различий в

истинной чувствительности хромосом, в степени зачаткового отбора, интенсивности репарации предмутацйнных повреждений, различной способности к перекombинации разрывов хромосом.

Одновременно с этой серией работ проводили исследования под руководством М.М. Тихомировой по вкладу систем репарации ДНК в становление мутаций (О.Я. Беляцкая, Л.Г. Петрова, Г.А. Петухова, Л.С. Тупицина, В.И. Рашева, В.Ф. Шакарнис).

Для того, чтобы изучать закономерности мутационного процесса и роль клеточных и организменных систем на отдельных его этапах, необходимо иметь точные количественные оценки повреждений генетического материала на каждом из этапов.

Потенциальные повреждения хромосом в мутационном процессе, индуцированном радиацией, были изучены методом последовательного действия двух факторов (радиация и высокая температура) в оогенезе дрозофилы М.М. Тихомировой [10]. Было показано, что метод последовательного действия радиации и экстремальных температур (от  $+33^\circ$  до  $+38^\circ\text{C}$  и  $0^\circ\text{C}$ ) очень удобен для вычленения (определения) потенциальных повреждений, индуцированных радиацией, так как сами температуры (в исследуемых режимах), как правило, не мутагенны, но способны увеличить эффект радиации иногда в 2 - 3 раза.

Потенциальные повреждения хромосом могут иметь разные сроки метастабильного состояния: очень коротко живущие – менее 30 мин (их стабилизация заканчивается, как правило, еще в период облучения); короткоживущие – более 30 мин (выявление которых возможно только при немедленном после облучения действии экстремальных температур); долгоживущие – более 60 мин (но не более 90 мин, выявление возможно при действии температуры даже через 1 ч после облучения).

Была изучена кинетика потенциальных повреждений, т.е. восстановление хромосом в зрелых ооцитах. Репарация начинается в период облучения, а затем продолжается неравномерно после прекращения облучения; наиболее интенсивно в первые 30 мин, затем пропорционально предшествующему уровню и заканчивается между 60 - 120 мин после облучения. Экспериментальные данные по частоте исключительных особей в зависимости от режима действия температур (через 0, 30, 60, 90, 120 мин) на облученных самок хорошо аппроксимируются экспоненциальной кривой. В молодых ооцитах (7-я стадия) процесс восстановления также носит экспоненциальный характер, но с менее выраженной неравномерностью.

Потенциальные повреждения в период действия экстремальных температур (до 8 ч) сохраняют лабильное состояние (консервируются). В то же время происходит их равномерная репарация.

что видно из прямой пропорциональной зависимости между длительностью действия температуры (2, 4, 8 ч) и ее эффектом.

При экстраполяции экспериментальных кривых, отражающих кинетику восстановления потенциальных повреждений хромосом, можно заключить, что в условиях нормальной температуры тождественная репарация после облучения происходит приблизительно в 25 - 30 раз чаще, чем нетождественная.

Количество возникающих потенциальных повреждений зависит от свойств линии дрозофилы, пола, стадии онтогенеза и гаметогенеза, что является выражением существования системного (организменного) контроля мутационного процесса.

В оогенезе дрозофилы дифференцированы три стадии по характеристике потенциальных повреждений, индуцированных радиацией: ооциты 14-й стадии – самые чувствительные, возникает много потенциальных повреждений, особенно короткоживущих; ооциты 7-ой стадии – менее чувствительные, возникает относительно меньшее количество потенциальных повреждений, которые модифицируются только при длительном 8-часовом прогревании; оогонии – при учете потерь X-хромосом практически не чувствительны, что может быть следствием гаметического отбора. Потенциальные повреждения регистрируются только при учете рецессивных, сцепленных с полом летальных мутаций при облучении в больших дозах и при немедленном действии высокой температуры, что говорит о большой устойчивости их систем репарации.

На основании изучения потенциальных повреждений хромосом сделано заключение о невозможности оценки радиочувствительности организма или гамет безотносительно к среде и о справедливости оценки радиочувствительности только для конкретных условий. Радиочувствительность гамет определяется как устойчивость материала, так и активностью и устойчивостью репарационных систем.

Изучение собственно радиочувствительности особей (гамет) и интенсивности восстановительных процессов показало, что эти признаки относительно независимы и могут сочетаться в разных комбинациях, за исключением одного “запрещенного” сочетания. Не встречаются линии, чувствительные к радиации и имеющие высокую интенсивность процессов репарации (репарация в таких линиях бывает низкой относительно общего количества возникающих повреждений). Эта закономерность имеет, по-видимому, общебиологический характер. Исследовали значение в определении частоты индуцированных мутаций адаптации особей к индуцирующему мутагенез фактору. Показано, что генетическая преадаптация в сочетании с онтогенетической адаптацией организма к высокой температуре (способность

теплоустойчивой линии дрозофилы жить и размножаться при температуре +32°C, т.е. выше пороговой для вида) приводит к тому, что температура +33 и +35°C не модифицирует эффект радиации, т.е. не влияет на нормальный ход процессов репарации. Однако более высокая температура (+37 и +38°C) увеличивает эффект радиации, что говорит о том, что потенциальные повреждения образуются.

Показано, что онтогенетическая адаптация дрозофил к высокой температуре (развитие при +32°C) определяет мутагенность факторов среды (т.е. делая температуру +33 и +35°C немутагенной).

Полученные данные убедительно показали, что модификационные изменения одного из признаков (теплоустойчивость) организма определяют мутагенность факторов среды (экстремальных температур), т.е. что модификационная изменчивость (онтогенетическая адаптация) и наследственная (интенсивность мутагенеза) тесно связаны между собой.

В основе разного типа мутаций лежат разные потенциальные повреждения хромосом. Так, рецессивные, сцепленные с полом мутации связаны с короткоживущими потенциальными повреждениями, а хромосомные aberrации – как с коротко-, так и с долгоживущими повреждениями.

Зарегистрировано не только повреждающее (усугубляющее) действие двух мутагенных факторов, но и защитное, когда эффект действия радиации и высокой температуры бывает ниже аддитивного, что наблюдается при учете доминантных летальных мутаций (по современной терминологии – адаптивный ответ).

На основании полученных данных сформулирована гипотеза многоэтапного мутационного процесса у дрозофилы, в котором потенциальные повреждения хромосом в процессе репарации в среднем в течение около 40 мин после облучения стабилизируются: они либо реализуются в предмутационные повреждения, либо восстанавливаются исходное состояние. Предмутационные повреждения подвергаются репарации еще раз после оплодотворения, перед делением зиготы и из них либо формируются мутации, либо они восстанавливаются до исходного состояния. Проверка этой гипотезы с применением того же метода последовательного действия двух факторов (облучение ооцитов и действие экстремальных температур после оплодотворения) доказала ее правоту [11].

Вопрос о том, каков же механизм действия высокой температуры, усугубляющей действие радиации, остается открытым. Прежде всего высказывалось предположение, что высокая температура инактивирует ферменты репарации [12].

Однако в экспериментах со смешанной культурой тканей (нативной и облученной с последующим прогреванием) было показано отсутствие репарации. Это позволило автору предположить,

что действие высокой температуры связано не только с инактивацией ферментов репарации [13]. Высказываются гипотезы о том, что гипертермия может изменить клеточные структуры (мембраны, цитоскелет) и вызвать перераспределение протеинов в ядре, что делает повреждения ДНК менее доступными для ферментов репарации [14, 15].

Нами в 1986 г. [16] высказано предположение, что белки теплового шока (БТШ), индуцируемые экстремальными температурами, связываясь с хроматином, могут механически препятствовать работе ферментов репарации. Сохранение потенциальных повреждений хромосом в течение действия высокой температуры также можно объяснить наличием БТШ, которые связываются с хроматином и консервируют потенциальные повреждения, предохраняя их от репарации, и от превращения их в мутации [17]. Сопоставление экспериментальных данных по мутационному процессу (потери X-хромосом), с одной стороны, и результатов количественного анализа синтеза БТШ в тех же условиях (в тканях яичников) – с другой, показывает, что существует четкий параллелизм. Экстремальные температуры увеличивают эффект радиации (независимо от того, действуют ли они до или после облучения) только в тех вариантах опыта (разные линии дрозофилы, в том числе с нарушениями в системе БТШ), где высокая температура индуцирует синтез БТШ в достаточном количестве [18]. Причем при подборе условий воздействия (низкие дозы облучения – 100 Р и экстремальные температуры) и при учете доминантных летальных мутаций удается зафиксировать эффект ниже аддитивного, т.е. адаптивный ответ. И его появление также можно объяснить действием БТШ, только здесь механизм их действия иной: они защищают клетку от действия другого фактора и тем обеспечивают более низкий эффект.

Более широко можно прогнозировать, что БТШ наряду с системами репарации участвуют в обеспечении устойчивости генетического материала клетки к стрессовым воздействиям.

В настоящий момент интенсивно изучаются функции этих белков [19, 20]. Наибольший прогресс достигнут в понимании функции БТШ и родственных им белков в качестве молекулярных шаперонов. Эти белки в нормальных условиях обеспечивают формирование третичной и четвертичной структуры белковой молекулы, участвуют в образовании олигомерных комплексов, являются компонентами системы, обеспечивающей транспорт макромолекул через мембраны [19 - 22]. Они входят в состав макромолекулярных комплексов, и их возможная функция состоит в стабилизации рецепторов стероидных гормонов [23] и транскрипционного фактора HSF [24, 25]. При тепловом шоке (ТШ), вызывающем денатурацию белков и разрушение олигомерных комплексов, синтез БТШ возрастает в десятки раз. Предпола-

гают, что эти белки (в частности, белки из семейства БТШ70) вовлекаются в восстановление нормальной структуры белковых молекул [20, 25, 26].

Интерес к изучению функции и регуляции защитной системы БТШ связан с широким практическим использованием гипертермии в терапии раковых заболеваний. Основной проблемой, с которой столкнулись врачи, использующие этот метод лечения, – выработка устойчивости, или термотолерантности, к последующим температурным воздействиям. Существует мнение, что в формировании термотолерантности принимают участие БТШ [27]. Поиск путей временного локального включения или задержки включения защитной системы БТШ может способствовать решению данной проблемы.

Таким образом, изучение функции и регуляции системы БТШ имеет не только большое теоретическое значение, но также важное прикладное значение, так как поможет понять закономерности формирования адаптации к стрессовым воздействиям и механизмы защиты клетки и организма от неблагоприятных воздействий.

Подходом для решения подобных вопросов является использование мутантов с измененным ответом системы БТШ на стрессовые воздействия. В нашей работе используется линия *Drosophila melanogaster* с *ts*-мутацией (l(1)ts403). Мутация была получена Аркингом [28] и охарактеризована как клеточная леталь. Исследованиями группы Евгеньева [29] показано, что у мутантных особей нарушена реакция на ТШ, что выражается в изменении количества и спектра БТШ сразу после температурного воздействия. Через некоторое время после прекращения действия ТШ синтез БТШ у мутантных особей становится таким же, как у особей контрольной линии непосредственно после ТШ [30]. Эта мутация не затрагивает гены БТШ, а является регуляторной и влияет на функционирование всей защитной системы БТШ. Предполагают, что блок наступает на уровне процессинга мРНК для БТШ. Нарушенным оказывается и транспорт БТШ из цитоплазмы в ядро [31].

Нами было показано [32], что линия l(1)ts403 отличается от ранее исследованных линий дрозофилы тем, что при действии ТШ (37°C) на самок, несущих *ts*-мутацию, с высокой частотой индуцируются нерасхождения и потери половых хромосом. Частота исключительных самок (ХХУ) самцов (Х0) в потомстве обработанных самок зависит от стадии оогенеза, подвергавшейся действию ТШ, и может достигать 6% [33]. В отличие от рентгеновых лучей, действие которых приводит к появлению в потомстве главным образом исключительных самцов в результате потерь половых хромосом, действие ТШ (37°C) на самок l(1)ts403 вызывает появление среди их потомства как исключительных самцов, так и самок в равных соотношениях. Это свидетельствует о том, что ТШ

(37°C) индуцирует именно нерасхождение половых хромосом в мейозе у самок l(1)ts403.

Каков же механизм столь значительного эффекта ТШ на самок l(1)ts403 с нарушенной функцией БТШ на ТШ и какова при этом функция БТШ? Показано [31], что предварительное действие аноксии на личинок дрозофилы, несущих мутацию l(1)ts403, приводит к тому, что при последующем действии ТШ синтез БТШ у мутантных особей сразу после действия ТШ частично восстанавливается и оказывается лишь в 3 раза ниже, чем у контрольной линии. В то же время при действии одного ТШ (без предварительного действия аноксии) синтез БТШ у мутантных особей сразу после воздействия в 15 раз ниже, чем у контрольной линии. Мы использовали этот же подход для доказательства роли БТШ в восстановлении повреждений, способных нарушать нормальное расхождение хромосом в мейозе у самок дрозофилы после действия ТШ [33]. Оказалось, что у мутантных самок, которые предварительно подвергались анаэробному воздействию, а затем через определенный промежуток времени (1.5 ч) действию ТШ (37°C), частота исключительных особей в потомстве, полученном из ооцитов, которые реализуются на 2-й и 3-й день после воздействия, снижается по сравнению с соответствующими показателями у самок, подвергшихся действию одного ТШ. Эти результаты свидетельствовали в пользу предположения о роли БТШ в обеспечении нормального расхождения половых хромосом в мейозе у самок, подвергнутых действию ТШ, но все же не были тому доказательством.

Во-первых, снижение частоты исключительных особей при последовательном анаэробном воздействии и действии ТШ могло быть следствием зачаткового отбора, т.е. гибели наиболее чувствительной к нерасхождению фракции половых клеток самок, или, наоборот, следствием повышения выживаемости (термотолерантности) ооцитов, которые являются нечувствительными к индукции нерасхождения хромосом. Кроме того, от характера воздействия могла зависеть динамика последовательной реализации различных стадий оогенеза.

Во-вторых, вопрос о стадиях оогенеза, наиболее чувствительных к действию ТШ, и об особенностях синтеза и транспорта в ооциты индуцированных на этих стадиях БТШ у самок с ts-мутацией оставался нерешенным.

В-третьих, неизвестная природа продукта гена с мутацией l(1)ts403, приводящей к нарушению ответа всей системы БТШ на ТШ, оставляла открытым вопрос о том, какова функция этого продукта, так как он может быть вовлечен не только в регуляцию ответа на ТШ системы БТШ, но также может участвовать и в других важнейших клеточных процессах, в том числе обеспечивающих нормальное расхождение хромосом в мейозе.

К нарушению расхождения хромосом в мейозе могут приводить повреждения аппарата клеточного деления и структуры хроматина, так как ТШ может вызывать денатурацию хромосомных белков, что в свою очередь может стать причиной слипания хромосом и хроматид. Цитологический анализ этих повреждений у дрозофилы лучше проводить в митотических клетках из-за трудностей цитологического анализа мейоза. Мы анализировали повреждения митотических хромосом в клетках нервных ганглиев личинок дрозофилы сразу после ТШ и в процессе восстановления после него, сравнивая две линии: l(1)ts403 и линию дикого типа Кантон С. Параллельно в этой же ткани в те же сроки после воздействия исследовали синтез БТШ методом белкового гель-электрофореза [34].

Показали, что основными повреждениями, индуцированными при ТШ у обеих линий, являются слипания хромосом и хроматид и пульверизация хромосом. При анализе митотических клеток сразу после ТШ лишь около 3% метафазных пластинок выглядят нормальными у личинок Кантон С, а у личинок l(1)ts403 таковых вообще нет. Но если в линии Кантон С через 1 ч после воздействия наблюдается картина, не отличимая по распределению различных типов метафазных пластинок от контроля, то в линии l(1)ts403 уровень метафазных пластинок с повреждениями остается высоким и отличается от контрольного еще в течение нескольких часов после прекращения температурного воздействия. Это коррелирует с особенностями динамики синтеза БТШ в процессе восстановления после ТШ. Максимальный синтез БТШ в нервных ганглиях личинок l(1)ts403 наблюдается не сразу после ТШ, как в линии Кантон С, а спустя 1 ч после прекращения воздействия и не снижается до контрольного в течение более продолжительного, чем в линии дикого типа, времени в процессе восстановления после ТШ. Таким образом, особей с ts-мутацией характеризует как более продолжительный период восстановления до контрольного уровня частоты нормальных метафазных пластинок в клетках нервных ганглиев, так и более продолжительный период синтеза БТШ в процессе восстановления после ТШ.

Полученные результаты позволили высказать предположение о роли БТШ в восстановлении индуцированных ТШ повреждений, приводящих к слипанию хромосом, и о возможном участии БТШ в обеспечении нормальной конденсации хромосом. Это предположение согласуется с представлением о функциях БТШ в качестве молекулярных шаперонов, способных восстанавливать поврежденную структуру макромолекул и осуществлять сборку олигомерных комплексов [20, 26], к которым можно отнести и такой сложный макромолекулярный комплекс, как метафазная хромосома. В условиях нарушения синтеза БТШ повреждающий эффект ТШ будет более значительным и соот-

ветственно потребует более продолжительного периода функционирования системы БТШ в клетке, исходя из представления об авторегуляции данной системы у живых организмов [25, 35]. Это согласуется с литературными [30] и полученными нами данными о более продолжительном периоде функционирования данной системы при одинаковом воздействии как на транскрипционном (более длительная активность пуфов ТШ), так и на трансляционном уровне (увеличение продолжительности синтеза БТШ [31]) у мутантной линии по сравнению с линией дикого типа.

Известно, что стрессовые воздействия, в том числе и ТШ, временно блокируют клеточные деления [36]. В наших экспериментах мы также наблюдали резкое снижение среднего числа метафазных пластинок в нервных ганглиях одной личинки сразу после ТШ для обеих исследованных линий [37]. Но если в линии Кантон С уже через 1 ч после воздействия уровень пролиферативной активности не отличался от контрольного, то у мутантной линии восстановление уровня пролиферативной активности до контрольного значения происходило значительно позднее (через 4 ч после воздействия). Наблюдали параллелизм между динамикой синтеза БТШ и восстановлением уровня пролиферативной активности после температурного воздействия у личинок обеих линий. Это позволило высказать предположение об участии БТШ в регуляции клеточной пролиферации.

Нами был предложен еще один подход, приводящий к временному блоку включения системы БТШ в клетке. Это воздействие ТШ в анаэробных условиях: погружение личинок в физиологический раствор. Такое воздействие *in vivo* на личинок дикого типа без нарушения в системе БТШ приводит к задержке включения данной системы: у личинок дрозофилы в политенных хромосомах слюнных желез пуфы ТШ индуцируются лишь спустя 5 - 10 мин после прекращения стрессового воздействия в процессе восстановления в аэробных условиях [38]. В то же время известно, что индукция данных пуфов при действии ТШ в аэробных условиях происходит уже через 1 мин после начала воздействия [39]. В качестве критерия повреждающего эффекта стрессовых факторов можно использовать время регрессии пуфов ТШ, т.е. промежуток времени от момента окончания воздействия до момента их регрессии.

При одновременном действии анаэробных условий и ТШ на личинок дрозофилы дикого типа наблюдали сверхаддитивный эффект на длительность существования пуфов ТШ по сравнению с суммой эффектов ТШ и анаэробных условий, примененных порознь [38]. Таким образом, действие ТШ в анаэробных условиях приводит к более тяжелым последствиям в клетке, чем суммарный эффект этих факторов, действующих по отдельности. Предположили, что задержка включения системы БТШ усугубляет поврежда-

ющее действие стрессовых факторов на клетку и поэтому требуется более длительное функционирование этой системы после прекращения действия стрессового фактора.

Использование времени регрессии пуфов ТШ в качестве критерия повреждающего эффекта различных стрессовых факторов позволяет уравновешивать действие различных стрессовых факторов в зависимости от особенностей функционирования защитной системы БТШ [36]. Используя такой подход, мы можем подобрать длительность температурного воздействия в анаэробных условиях, оказывающую на личинок дрозофилы дикого типа эффект, аналогичный таковому при действии ТШ (37°C, 30 мин) на мутант l(1)ts403, исследованный ранее. Тем самым мы сможем смоделировать ситуацию с задержкой включения системы БТШ, аналогичную той, которая имеется у особей, несущих *ts*-мутацию.

Анализ возникающих повреждений и динамика их восстановления после стрессовых воздействий в условиях физиологической задержки включения защитной системы БТШ (ТШ в анаэробных условиях) у особей дикого типа в сравнении с эффектом ТШ на мутант l(1)ts403 позволит проверить предположение о роли БТШ в восстановлении митотических хромосом и клеточной пролиферации.

Понимание механизмов регуляции универсальной защитной клеточной системы БТШ и выделение и изучение генов, участвующих в ее регуляции, открывает возможности для изучения механизмов, обеспечивающих устойчивость генетического материала и генетических процессов к неблагоприятным воздействиям среды.

Таким образом, на основании результатов исследований механизмов генетической изменчивости М.Е. Лобашевым была сформулирована физиологическая (паранекротическая) гипотеза мутационного процесса и предложен адекватный метод последовательного действия двух факторов для ее проверки. Было показано, что стрессовые воздействия, не являющиеся, как правило, мутагенными, эффективно модифицируют повреждающий эффект мутагенных факторов. Предложенный метод открывал новые перспективы в управлении генетической изменчивостью. Изучение механизмов модификации мутационного процесса привело к заключению, что стрессовые воздействия способны влиять на систему репарации генетического материала непосредственно или опосредованно через систему БТШ. В условиях же генетического дефекта системы БТШ стрессовые воздействия превращаются в мутагенный фактор, приводя к нарушению стабильности генетического материала.

Работы, проводимые в 1991 - 1993 гг., финансировались ГНТП "Приоритетные направления генетики".

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лобашев М.Е. 50 лет кафедре генетики и селекции Ленинградского университета // Генетика. 1969. Т. 5. № 10. С. 182 - 189.
2. Филипченко Ю.А. Этюды по изменчивости. 2. Изменчивость у самцов и самок низших ракообразных // Тр. Петроградск. о-ва естеств. 1921. Т. 52. Вып. 1 - 8. С. 1 - 10.
3. Филипченко Ю.А. Collenbola, собранные экспедицией В.А. Догеля и И.И. Соколова в Британской Восточной Африке // Русск. энтомол. обозр. 1926. Т. 20. С. 180 - 196.
4. Timofeeff-Ressovsky N.W., Zimmer K.G. Das Trefferprinzip in der Biologie. S. Hirscl Verlag. Leipzig. Biophysik. 1947. В. 1. 138 S.
5. Лобашев М.Е. Физиологическая (паранекротическая) гипотеза мутационного процесса // Вестн. Ленингр. ун-та, 1947. № 8. С. 10 - 29.
6. Ауэрбах Ш. Проблемы мутагенеза. М.: Мир, 1978. 463 с.
7. Лобашев М.Е. Генетика в Ленинградском университете // Исследования по генетике. 1967. Сб. 3. С. 3 - 18.
8. Ватти К.В., Мамон Л.А., Джапаридзе Л.А., Барабанова Л.В. Сравнительное изучение мутагенеза у особей разных полов. Анализ частоты индуцированных транслокаций // Генетика. 1979. Т. 15. № 11. С. 1989 - 1995.
9. Ватти К.В., Джапаридзе Л.А., Мамон Л.А. Сравнительное изучение мутабельности особей разных полов: рецессивные сцепленные с полом и доминантные летальные мутации у *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1980. Т. 16. № 8. С. 1389 - 1396.
10. Тихомирова М.М. Потенциальные повреждения хромосом в мутационном процессе, индуцированном радиацией. Дис. д-ра биол. наук. Л.: ЛГУ, 1979. 516 с.
11. Тихомирова М.М., Тупицина Л.С. Судьба потенциальных повреждений хромосом в мутационном процессе // Генетика. 1983. Т. 19. № 5. С. 789 - 795.
12. Witkin E.M. DNA repair and mutagenesis // Méc. altération et répar. DNA, relat. mutagenèse et cancérogenèse chim. Collog. int. CNRS. Menton. 1976. Paris, 1977. P. 203 - 220.
13. Виленчик М.М. Нестабильность ДНК и отдаленные последствия воздействия излучений. М.: Энергоатомиздат, 1987. 192 с.
14. Konings A.W.T. Hyperthermia and repair of radiation damage // Int. J. Radiat. Biol. 1986. V. 50. № 2. P. 363 - 370.
15. Kampinga H.H., Keij J.F., Van Der Kruk G., Konings A.W. Interaction of hyperthermia and radiation in tolerant and nontolerant HeLa 53 cells: role of DNA polymerase inactivation // Int. J. Radiat. Biol. 1989. V. 55. P. 423 - 433.
16. Тихомирова М.М. Белки теплового шока и мутагенез // Вестн. Ленингр. ун-та. Сер. 3. 1989. Вып. 2. С. 90 - 94.
17. Тихомирова М.М. Адаптивный ответ и система белков теплового шока // Вестн. Ленингр. ун-та. Сер. 3. 1991. Вып. 3. (№ 17) С. 113 - 120.
18. Тихомирова М.М., Мазур Е.Л., Барабанова Л.В., Мамон Л.А. Температурная модификация мутационного процесса и белки теплового шока // Генетика. 1993. Т. 29. № 2. С. 280 - 287.
19. Ellis J. Proteins as a molecular chaperones // Nature. 1987. V. 328. № 6129. P. 378 - 379.
20. Hightower L.E. Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity // Cell. 1991. V. 66. P. 191 - 197.
21. Иванюшина В.А., Марлин А.В., Киселев О.И. Молекулярные шапероны: новые белки - новые функции // Молек. биология. 1991. Т. 25. Вып. 4. С. 869 - 882.
22. Welch W.J. The role of heat-shock proteins as molecular chaperones // Cur. Opin. Cell Biol. 1991. V. 3. № 6. P. 1033 - 1038.
23. Underson R.L., Kraft P.E., Bensaude O., Hahn G.M. Binding activity of glucocorticoid receptors after heat shock // Exptl Cell Res. 1991. V. 197. № 1. P. 100 - 106.
24. Abravaya K., Myers M.P., Murphy S.P., Morimoto R.T. The human heat shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression // Genes and Develop. 1992. V. 6. № 7. P. 1153 - 1164.
25. Baler R., Welch W.J., Voellmy R. Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: hsp70 as a potential autoregulatory factor // J. Cell Biol. 1992. V. 6. № 117. P. 1151 - 1159.
26. Hendrick J.P., Hartl F.U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins // Annu. Rev. Biochem. 1993. V. 62. P. 349 - 384.
27. Hahn G.M., Li G.C. Thermotolerance and heat shock proteins in mammalian cells // Radiat. Res. 1982. V. 92. № 3. P. 452 - 457.
28. Arking R. Temperature-sensitive cell-lethal mutants of *Drosophila*: isolation and characterization // Genetics. 1975. V. 80. № 3. P. 519 - 537.
29. Евгенийев М.Б., Левин А.В. Влияние *ts*-мутации на экспрессию генов, индуцируемых тепловым шоком у *Drosophila melanogaster*. I. Анализ синтеза белков // Генетика. 1980. Т. 16. С. 1026 - 1029.
30. Evgen'ev M.B., Zatssepina O.L., Titarenko H. Autoregulation of heat-shock system in *Drosophila melanogaster*. Analysis of heat-shock response in a temperature-sensitive cell-lethal mutant // FEBS Lett. 1985. V. 188. № 2. P. 286 - 290.
31. Левин А.В., Лозовская Е.Р., Евгенийев М.Б. Влияние *ts*-мутации на экспрессию генов, индуцируемых тепловым шоком у *Drosophila melanogaster*. II. Анализ действия *ts*-мутации // Генетика. 1984. Т. 20. № 6. С. 949 - 953.
32. Мамон Л.А., Мазур Е.Л., Чуркина И.В., Барабанова Л.В. Влияние высокой температуры на частоту нерасхождения и потерь половых хромосом у самок *Drosophila melanogaster* линии I(1)*ts*403 с дефектом в системе белков теплового шока // Генетика. 1990. Т. 26. № 3. С. 554 - 556.
33. Мамон Л.А., Барабанова Л.В., Костромина Н.Н. Частота нерасхождения и потерь половых хромосом в оогенезе у мутанта I(1)*ts*403 *Drosophila melanogaster* с дефектом в системе белков теплового шока при действии аноксии и высокой температуры // Генетика. 1992. Т. 28. № 4. С. 64 - 71.

34. Мамон Л.А., Куцкова Ю.А. Роль белков теплового шока в восстановлении индуцированных высокой температурой поврежденных митотических хромосом у *D. melanogaster* // Генетика. 1993. Т. 29. № 4. С. 604 - 612.
35. Di Domenico B.J., Bugaisky G.E., Lindquist S. The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels // Cell. 1982. V. 31. № 3. P. 593 - 603.
36. Roti Roti J.L., Mackey M.A., Higasikubo R. The effect of heat shock on cell proliferation // Cell Prolif. 1992. V. 25. № 2. P. 89 - 99.
37. Мамон Л.А., Куцкова Ю.А. Роль белков теплового шока в восстановлении клеточной пролиферации после воздействия высокой температурой на личинок *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1993. Т. 29. № 5. С. 791 - 798.
38. Мамон Л.А., Куцкова Ю.А. Динамика индукции и регрессии пухов 87А, 87С и 93D в политенных хромосомах дрозофилы при действии аноксии и высокой температуры // Цитология. 1991. Т. 33. № 12. С. 99 - 105.
39. Ashburner M., Bonner J.J. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock // Cell. 1979. V. 17. № 2. P. 241 - 254.

## Mechanisms Underlying the Resistance of Genetic Material of the Animal Cell to Stress Treatment

M. M. Tikhomirova, K. V. Vatti, L. A. Mamon, L. V. Barabanova, and Yu. A. Kutsikova

*Department of Genetics and Breeding, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia*

A brief review of studies performed in the Department of Genetics of St. Petersburg University by M.E. Lobashev and his disciples is presented. The results of these studies prove that the formation of a mutation is a multistage process involving many cell and organism systems (including repair systems, systems that determine sexual dimorphism, etc.), which are affected by environmental factors (e.g., extreme temperatures). They can hinder or accelerate the mutational process, in this way providing both a superadditive effect and adaptive response. Recent studies deal with a universal system of heat shock proteins, which is involved in the maintenance of resistance of genetic material and genetic processes in the cell.