

И. А. РАПОПОРТ

РЕАКЦИЯ СВОБОДНЫХ АМИНОГРУПП В ГЕННЫХ БЕЛКАХ

(Представлено академиком Л. А. Орбели 12 XII 1946)

1. В предыдущем сообщении (14) нами было описано мутационное действие формальдегида и соединений, выделяющих при разложении формальдегид*. Специфическая реакция между аминами и формальдегидом, лежащая в основе метода титрования аминокислот и белков по Зеренсену, и метод приготовления анатоксинов, при котором также происходит сдвиг реакции в кислую сторону (12), были достаточным основанием для проверки способности формальдегида реагировать с белками в структуре гена. Галеотти (6) установил невозможность определения азота по Ван-Слайку после обработки формальдегидом, т. е. глубокие изменения свойств азота в аминокруппе. Подобные же данные существуют для значительной части аминного азота анатоксинов (5). Обермайер и Вильгейм (10) доказали, что в реакцию вступают в основном свободные аминокруппы белков. После дезаминирования свободных аминокрупп прекращается сдвиг реакции в кислую сторону.

Продолжительное время реакция изображалась по общей формуле $R \cdot NH_2 + HCHO \rightarrow R \cdot N : CH_2 + H_2$, однако после работ Леви и Зильберман (8) принимается, что в водном растворе формальдегид действует как метиленгликоль и реакция чаще протекает по типу: $R \cdot NH_2 + HCHO \rightarrow R \cdot NH \cdot CH_2OH$, $R \cdot NH_2 + 2HCHO \rightarrow R \cdot N(CH_2OH)_2$, т. е. с образованием гидроксиметильных, а не метиленовых производных.

Особый характер реакции формальдегида с химическими группами в структуре гена функционирующей клетки приводит к резким отличиям в закономерности мутационного процесса по сравнению с другими сильными физическими и химическими мутационными раздражителями.

2. Под влиянием формальдегида не возникают в массовом количестве доминантные летали, являющиеся главной причиной резкого и продолжительного понижения плодовитости после облучения. Облучение личинок сравнительно небольшой дозой X-лучей в опытах Мура (9) понижало плодовитость самцов на 70—74%, а значительно более сильное по количеству мутаций воздействие формальдегида почти не отражается на плодовитости. Количество потомков от насекомых, весь личиночный период метаморфоза которых прошел в среде с формальдегидом и скрещенных с контрольными, мало отличается от потомства контрольных насекомых, скрещенных между собой. Иногда скрещивания первой категории не удаются, но это связано с очень малым

* Высокая мутационная активность, которая в небольших предварительных опытах была установлена для одного из препаратов параформальдегида, не подтвердилась при изучении нескольких других препаратов. Это зависит, может быть, от химических различий между разными полимерами.

размером подопытных мух, недостатками в структуре копулятивного аппарата и ранней гибелью от интоксикации. В пошедших культурах плодовитость очень высокая в течение 8—10 дней.

Определение частоты доминантных леталей производилось путем подсчета яиц, отложенных на прямоугольные пластинки. При скрещивании самцов, развивавшихся на среде с формальдегидом, и самок из культур с нормальной средой не вылуплялись личинки из 10,9% яиц. При скрещивании самок из культур с формальдегидом и самцов из нормальных культур не развивалось 11,8% яиц. В контроле не вылуплялись личинки из 8,7% яиц. Всего в опыте исследовано около 3000, а в контроле более 500 яиц. Между тем, близкая по количеству вызванных рецессивных леталей доза X-лучей понижает выход личинок из яиц на 60—70% (4). Доминантные летали под влиянием физических факторов обычно связаны с нехватками участков хромосом и другими последствиями структурных хромосомных нарушений.

3. Следующим существенным различием является отсутствие фрагментации хромосом, источника многих вторичных структурных перестроек. Почти все виды коротковолновой энергии, а также дихлордидиэтилсульфид (1), побуждают разрыв хромосомных нитей. Механическое разъединение, временная разобщенность частей, а затем их соединение в первоначальном или ином порядке делают возможными химические реакции, которые затруднены для внутренних структур интактных нитей.

Фрагментационный эффект не является свойством формальдегида.

Яйца и молодые личинки из линии *yellow yellow* со сцепленными половыми хромосомами подвергались воздействию формальдегида в концентрации 1:150—1:200 и скрещивались с самцами *double infra Bar*.

Всего просмотрено около 3000 самок со сцепленными половыми хромосомами и установлено, что разъединение сцепленных хромосом происходит с частотой 1:998, т. е. в диапазоне спонтанных разрывов. При соответствующих (по летальным мутациям) дозах X-лучей разрывы происходят с частотой 1:50—100 хромосом. Полувековое применение очень высоких концентраций формальдегида в качестве одного из самых распространенных гистологических фиксаторов также не обнаружило фрагментации фиксируемых хромосом.

Отсутствие фрагментации указывает на строго химический характер мутаций, вызванных формальдегидом, без связи с механическими нарушениями хромосом даже в качестве вторичного явления.

4. Формальдегид не вызывает нехваток хромосомных блоков и отдельных генов. В обширном исследовании Паттерсона (11) при помощи генетических методов показано, что огромное большинство летальных мутаций, индуцированных при помощи физических раздражителей, возникает вследствие потери одного генного локуса или участка со многими генами. Демерек (3) изучил при помощи новейших цитологических методов индуцированные летали по 16 локусам половой хромосомы и установил, что все они связаны с *deficiency* по одному или нескольким дискам.

Исследование возможных нехваток под влиянием формальдегида производилось по следующей методике. Самцы и самки дикого типа после воздействия, при котором возникает 4—5% летальных мутаций, скрещивались с линиями X-*multiple* и *riscusa*. В первой из них имеется 8 рецессивных мутаций половой хромосомы (*yellow*, *white apricot*, *echinus*, *crossveinless*, *cut*, *vermillion*, *garnet*, *forked*), а во второй 8 рецессивных мутаций третьей хромосомы (*roughoid*, *hairy*, *thread*, *scorlet*, *curled*, *stripa*, *ebony*, *scoty*, *claret*). При просмотре гетерозигот не учитывались признаки *crossveinless* и *thread*.

Среди 3063 гетерозигот по X-*multiple* и 4189 гетерозигот по *riscusa*

не появились deficiency ни по одному из 7 генов, исследованных в каждой генной цепочке.

В этом опыте в потомстве самок, скрещенных с самцами X-multiple и gusca, возникли следующие рецессивные мутации среди 3447 половых хромосом: small bristless, forked (два случая), крылья типа vestigial, редуцированные крылья (стерильные), а также одна доминантная мутация. Таким образом, формальдегид не вызывает больших или точечных нехваток. Вопреки господствующему представлению, летали могут быть следствием изменения гена, которое не связано ни с deficiency, ни с эффектом положения.

Новый химический мутационный агент вызывает главные типы генных изменений, летальные и видимые мутации (последние относительно реже, чем X-лучи), но, в отличие от физических раздражителей, позволяет дифференцировать летальный эффект.

Индуктированные коротковолновой энергией летали в большинстве случаев одновременно сопровождаются рецессивным видимым действием. Летали, вызванные формальдегидом, не сопровождаются видимым действием. Создается впечатление, что в генах существуют особые компоненты, изменение которых побуждает леталь, но не затрагивает других составных частей генов. Мы предлагаем называть этот специфический компонент „летальным“ (л-компонентом). Данные о распространении реакций между формальдегидом и свободными аминокетильными группами гексоновых оснований позволяют утверждать, что гипотетический л-компонент является гистоном. Потеря л-компонента не лишает гены способности к репродукциям в хромосоме, но препятствует синтезу специфических морфогенных продуктов.

5. Эксперименты по определению зависимости количества летальных мутаций от дозы позволяют истолковать мутацию как мономолекулярное изменение.

В пробирках с яйцами и ранними личинками *Drosophila melanogaster* создавались концентрации формальдегида 1:150, 1:300 и 1:600. Анализировались летали в половых хромосомах самцов, все личиночное развитие которых прошло в такой среде. В потомстве каждого самца исследовались 5—12 хромосом. В случае возникновения нескольких леталей (без фенотипических различий) в одной выборке они принимались за одну леталь. В каждой серии было изучено от 447 до 1204 хромосом.

В концентрации 1:150 возникло 4,92% леталей, в концентрации 1:300 появилось 2,04% леталей и в концентрации 1:600—1,08% леталей. Хотя мы не считаем эти эксперименты достаточными и продолжаем их при помощи другой методики, все же имеются основания для вывода о пропорциональности количества мутаций дозе химического реагента и, следовательно, для отнесения этого процесса к мономолекулярным химическим реакциям. Следует сравнить приведенные воздействия с методом получения анаэнзимов. Для приготовления анапаина (13) 1% раствор папаина обрабатывался 0,7% формальдегида и в течение месяца выдерживался при температуре 40° С. При этих условиях в реакцию вступали все молекулы папаина.

Количество летальных мутаций под влиянием коротковолнового излучения также находится в линейной зависимости от дозы, однако в той же зависимости находится возникновение первичных разрывов хромосом под действием лучей. Последнее давало основание расценивать как первичный именно механический процесс разрыва нитей и его линейную зависимость от ионизации, а процесс мутаций считать вторичным.

Полученные данные исключают гипотезу о хромосоме, как молекулярной единице наследственности. Отдельные же гены в хромосоме

в общем реагируют с формальдегидом стехиометрически, таким же образом как диссоциированные протеиновые молекулы.

6. Некоторые авторы, в частности Гербст (7), отстаивают взгляд, что белки представляют гомогенный субстрат хромосомы, а индивидуальные особенности разных генов зависят от нуклеиновокислотных компонентов. Однако подобным воззрениям противоречат данные о сложной структуре и разнообразии хромосомных белков. Кроме гистонов и протаминов (по Шульцу (15), испытывавшему комбинации окрасок, гистоны преобладают), в состав хромосомы входят, повидимому, более сложные белки типа хромозомина. По Стедман и Стедман (16), в хромосомине преобладают кислые аминокислоты, но содержится также до 25% основных аминокислот. Несмотря на значение нуклеиновых кислот для процессов хромосомной репродукции и как части структурного остова нити, они не отличаются таким разнообразием внутреннего строения, как хромосомные белки. Энзимологические эксперименты не подтверждают старой гипотезы, что непрерывность нити зависит лишь от нуклеиновых, а не белковых соединений в хромосоме.

Скачкообразные изменения генов после реакции с формальдегидом являются опровержением теории Гербета и прямым доказательством наличия белков непосредственно в генах, а не только в межгенном веществе.

Формальдегид, как очень реакционноспособное и проникаемое соединение, может реагировать и, несомненно, взаимодействует с разнообразными составными частями протоплазмы. Однако высокая специфичность его реакции с аминокислотными группами белков позволяет утверждать, что вызванные им мутации — результат воздействия на свободные аминокислотные группы в структуре гена.

Хотя аминокислотные и дикетопиперазины в состоянии давать метиленовые и гидроксиметильные производные при реакции с формальдегидом, но присоединение формальдегида по пептидной связи затруднено, а порой невозможно (2). Между тем, по данным многочисленных авторов, формальдегид активно связывается белками с высоким содержанием диаминокислот. Именно в гистонах, играющих большую роль в процессах размножения, содержится особенно много гексоновых оснований и именно с ними, вероятно, сравнительно легко реагирует простейший альдегид.

Поскольку такие изменения генов имеют летальный и, следовательно, деструктивный характер, можно думать, что в результате блокировки определенных свободных аминокислотных групп (порой концевых) происходит нарушение репродукции в одной из частей сложной белковой структуры гена с выпадением одной или ряда аминокислот. Однако это нарушение не лишает гены репродукционной способности и не вызывает deficiency.

Институт цитологии, гистологии и эмбриологии
Академии Наук СССР

Поступило
18 XII 1946

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Ch. Auerbach, Proc. Roy. Soc. Edinburgh, 62, 211 (1946). ² L. C. Carpenter, Arch. Bioch., 9, 159 (1946). ³ M. Demerec, Cytologia, Jubilee Volume, 1125 (1937). ⁴ M. Demerec and U. Fano, Genetics, 29, 348 (1944). ⁵ M. D. Eaton, J. Immun., 33, 33, 419 (1937). ⁶ G. Galeotti, Bioch. Z., 53, 474 (1913). ⁷ C. Herbst, Arch. Entw.-Mech., 142, 319 (1943). ⁸ M. Levy, D. F. Silberman, J. Biol. Chem., 118, 723 (1937). ⁹ W. G. Moore, Am. Nat., 68, 508 (1934). ¹⁰ F. Obermeyer u. R. Willheim, Bioch. Z., 38, 331 (1912). ¹¹ J. T. Patterson, Am. Nat., 66, 193 (1932). ¹² L. Pillemer, J. of Inheredity, 53, 137 (1946). ¹³ G. Ramon, C. R., 217, 562 (1943). ¹⁴ И. А. Рапопорт, ДАН, 53, № 1 (1946); 54, № 1. ¹⁵ J. Schultz, Cold Spring Harbor Symp., 9, 55 (1941). ¹⁶ E. Stedman and E. Stedman, Nat., 152, 267 (1943).