

МОДИФИКАЦИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АЛКИЛТРАНСФЕРАЗ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГЛУТАПИРОНА У ДРОЗОФИЛЫ

О.В. Даливеля, Н.В. Савина

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

Ранее установлено, что производные 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты (1,4-ДГИНК) благодаря антиоксидантным свойствам эффективно снижают уровень спонтанных и химически индуцированных мутаций в половых клетках дрозофилы [1, 2]. По-видимому, при химическом мутагенезе эти препараты действуют опосредованным путем, влияя на системы детоксикации ксенобиотиков и/или репарационные процессы [2-4].

В рамках этой работы исследовано влияние одного из производных 1,4-ДГИНК (глутапирона), на функционирование репарационных систем, задействованных в становлении генных мутаций. Глутапирон (ГП) синтезирован в Латвийском институте органического синтеза и любезно предоставлен для исследований акад. Г. Дубуром. Обработывались личинки (препарат добавляли в питательную среду) или имаго (2-3-х суточное кормление раствором препарата) дрозофилы. В качестве модельного мутагена использован алкилирующий агент этилметансульфонат (ЭМС), обработку которым проводили методом кормления взрослых самцов [5]. Различные экспозиционные дозы мутагена получали за счет варьирования концентраций и продолжительности кормления. Мутагенный эффект ЭМС оценивали по частоте рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций (РСПЛМ), которые в основном представлены внутрилокусными изменениями [6] и отражают количество этилирований на нуклеотид [7]. Кроме одномоментного мутагенного воздействия применяли дополнительную обработку взрослых особей (самцов или самок) малыми дозами ЭМС (0.05-0.1mM x 12 ч) для выявления возможного адаптивного ответа у дрозофилы. В экспериментах использовали линии *Berlin wild* (дикого типа), *u ct v* и *Basc (In(1)sc^{s1L}sc^{8R} + S, sc^{s1}sc⁸ w^aB)*.

В двух повторностях обнаружена устойчивая тенденция к снижению частоты ЭМС-индуцированных РСПЛМ под влиянием обработки личинок глутапироном, которая доказана для концентрации 10 мМ при анализе данных по тесту Cochran. В последующих экспериментах ни пред-, ни постобработка взрослых самцов модификатором не снижала частоту ЭМС-индуцированных РСПЛМ, а в одном случае даже сенсibiliзировала действие мутагена.

Данные по влиянию глутапирона на системы материнской репарации при химическом мутагенезе представлены в таблице.

Обработка глутапином самок способствовала достоверному снижению частоты мутаций, индуцированных ЭМС в сперматозоидах дрозофилы, что указывает на модуляцию репарационных процессов, осуществляемых ферментными системами ооцитов. Известно, что репарация O⁶-алкилгуанинов, ответственных за мутагенный и канцерогенный эффект алкилирующих агентов, осуществляется с помощью O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераз [8, 9]. У *E. coli* этот фермент индуцируется минимальными дозами мутагена [10], но встречается и в конститутивной форме [11].

Показателем индуцибельной природы фермента является адаптивный ответ, который обнаружен у различных организмов при воздействии химических мутагенов и радиации [12]. Однако, проведя серию экспериментов, нам не удалось уменьшить мутагенный эффект этилметансульфоната, воздействуя малыми дозами этого алкилирующего агента как на самцов, так и самок дрозофилы [13]. Это согласуется с предположением Guzder et al. (1991), что выделенные ими алкилтрансферазные активности у дрозофилы не являются индуцибельными [14].

Таблица. Влияние глутапирона на материнские системы репарации

№ опыта	Обработка самок		Обработка самцов		Число хромосом	Частота РСЛМ (%)
	Вариант	Экспозиция (час)	Доза ЭМС (мМ)	Экспозиция (час)		
1	Сахароза 3%	48	6	24	405	20.00
	ГП 10 мМ	48	6	24	811	18.86
2	Сахароза 3%	48	6	24	510	20.00
	ГП 10 мМ	48	6	24	790	17.85 *
3	Сахароза 1%	72	10	8	1426	3.90
	ГП 10 мМ	72	10	8	1519	1.05 *

z-тест (Cochran) = 4.21*

* Различия достоверны при P<0.01

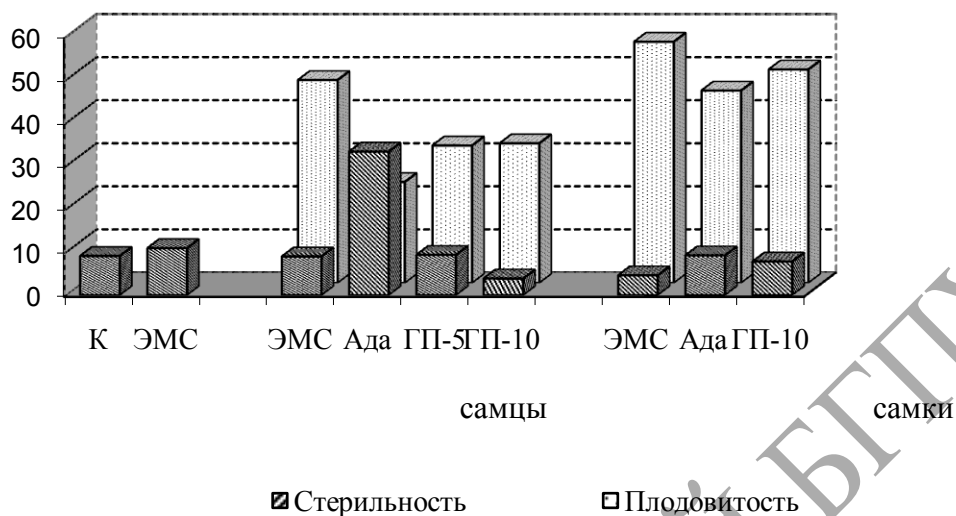


Рис. Влияние глутапирона на плодовитость родителей

Наряду с изучением влияния глутапирона на репарацию ДНК при химическом мутагенезе, анализировали плодовитость родителей. Частота стерильных культур после обработки мутагеном самцов дикого типа не отличалась от спонтанного уровня, составляя, соответственно 10.91 и 9.09%. Подсчет в последующих экспериментах не только стерильных культур, но и всего потомства F1 давал представление об участии мутагенизированных сперматозоидов в оплодотворении. Дополнительная обработка субмутагенной дозой ЭМС вызвала существенное снижение количества потомков по сравнению с положительным контролем. Глутапирон, наоборот, способствовал повышению этого показателя по сравнению с вариантом "адаптирующего" воздействия.

В вариантах с "адаптирующей" обработкой самцов и самок минимальными дозами ЭМС глутапирон не оказал влияния на частоту РСПЛМ, индуцированных ЭМС в сперматозоидах. Об этом свидетельствует и сравнение данных в отдельных экспериментах по критерию χ^2 , и анализ совокупных выборок с помощью теста Cochran.

Наблюдаемые особенности проявления защитного потенциала глутапином в зависимости от условий его применения позволяют предположить влияние этого препарата на функционирование алкилтрансфераз, удаляющих алкильный радикал из Об-алкилгуанина, ответственного за возникновение генных мутаций. Исходя из предполагаемой конститутивной

природы алкилтрансферазы у дрозофилы, отсутствие защитного действия глутапирона в вариантах с «адаптирующей» обработкой мутагеном можно объяснить следующими причинами: 1) истощением фермента, служащего мишенью для модификатора; 2) более полной реализацией мутагенизированной спермы, в том числе с генными мутациями, в связи с благоприятным влиянием глутапирона на плодовитость родителей.

Литература

1. Гончарова Р.И., Кужир Т.Д., Дубур Г.Я., Улдрикис Я.Р. Сравнительное изучение антимутагенного действия соединений дигидропиридинового ряда в связи с их антиоксидантной активностью// Доклады АН СССР.-1980.- Т.255, No.6.- С.1483-1486.
2. Goncharova R.I., Kuzhir T.D. A comparative study of the antimutagenic effects of antioxidants on chemical mutagenesis in *Drosophila melanogaster*// *Mutat. Res.*-1989.- Vol. 214.- P. 257-265.
3. Кужыр Т.Д. Уплыў антымутагенау на працэсы рэпарацыі пры хімічным мутагенэзе у даследаваннях на дразафіле // Весці АН Беларусі, сер. біял. навук.-1996.- No.1.- С. 80-88.
4. Kuzhir T.D., Goncharova R.I. Some effects of 1,4-dihydroisonicotinic acid derivatives on repair pathways involved in chemical mutagenesis// *Biochem. Society Transactions.*-1997.-Vol.25.- P.139.
5. Lewis E.B., Becher F. Method of feeding ethyl methanesulfonate (EMS) to *Drosophila* males// *Dros. Inform. Serv.*-1968.- Vol.43.- P.193.
6. Sega G.A. A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate// *Mutat. Res.*-1984.- Vol.134, No.2/3.- P.113-142.
7. Aaron C.S., Lee W.R. Molecular dosimetry of the mutagen ethyl methanesulfonate in *Drosophila melanogaster* spermatozoa linear relation of DNA alkylation per sperm cell (dose) to sex-linked recessive lethals // *Mutat. Res.*- 1978.-Vol.49, No.1.- P. 27-44.
8. Beranek D.T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents // *Mutat. Res.*- 1990.- Vol. 231.- P.11-30.
9. Day R.S.III, Sibhat-Ullah, Rasouili-Nia A. Damage reversal in human cells: cellular response to O6-methylguanine // *DNA Repair Mechanisms. Impact on Human Diseases and Cancer* (by edd. Jean-Michel H. Vos). N.Y., Berlin, Heidelberg, Paris: Springer-Verlag,-1995.-P. 67-97.
10. Samson L., Cairns J. A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli* // *Nature.*- 1977.- Vol.267.- P.281-283.
11. Takano K., Nakamura T., Sikiguchi M. Roles of two types of O6-methylguanine-DNA methyltransferases in DNA repair // *Mutat. Res.*- 1991.-Vol.254, No.1.- P.37-44.
12. Дубинин Н.П. Некоторые проблемы современной генетики. М.: Наука, 1994, 224 с.
13. Кужир Т.Д., Савина Н.В., Ровбель Н.М., Трус Т.М. Исследование адаптивного ответа у дрозофилы // Тез.докл. VII съезда БОГИС.-Горки.-1997.-С. 62-63.
14. Guzder S.N., Kelley M.R., Deutsch W.A. *Drosophila* methyltransferase activity and the repair of alkylated DNA // *Mutat. Res.*-1991.- Vol.255, No.2.- P. 143-153.