

## СВЯЗЬ СУПЕРСУПРЕССИИ И МЕЖАЛЛЕЛЬНОЙ КОМПЛЕМЕНТАЦИИ В ЛОКУСЕ *AD<sub>2</sub>* У *SACCHAROMYCES* *CEREVISIAE*

С. Г. Инге-Вечтомов, Б. В. Симаров

Принято рассматривать два направления мутационного процесса: 1) прямые мутации, приводящие к отклонению от «дикого типа» и, как правило, выключающие функцию гена, и 2) реверсии, приводящие к частичному или полному восстановлению «дикого типа».

Реверсии мутантов могут происходить как за счет истинных обратных мутаций, т. е. за счет мутаций, восстанавливающих нормальную (дикого типа) структуру мутантного гена, так и за счет супрессорных мутаций. В последнем случае в генотипе ревертанта сохраняется прямая мутация, а восстановление «дикого типа» происходит за счет возникновения второй мутации, нейтрализующей проявление первой. Подобное подавление фенотипического выражения одной мутации под влиянием другой мутации называется супрессией.

Супрессия может быть результатом взаимодействия двух измененных одного гена (внутригенная супрессия) или результатом взаимодействия двух мутантных генов (генная супрессия). В настоящем сообщении мы обратимся именно к генной супрессии.

Один и тот же супрессор может по-разному взаимодействовать с мутантными аллелями одного гена или с мутантными аллелями разных генов. Для описания характера такого рода взаимодействий приняты термины «специфичность супрессора»; при этом различают аллельную и генную специфичность. Аллельная специфичность супрессора характеризует его способность подавлять проявление некоторых аллелей данного гена. Генная специфичность супрессора характеризует его способность подавлять проявление всех мутаций одного или нескольких генов. По-видимому, наличие аллельной или генной специфичности супрессора являются взаимоисключающими свойствами. Так, супрессоры, обладающие генной специфичностью, лишены, как правило, аллельной специфичности, а супрессоры, обладающие аллельной специфичностью лишены генной специфичности. Последний тип супрессоров наиболее интенсивно исследуется в настоящее время.

Специфичность супрессора, выявляемая методом генетического анализа, представляет собой основную характеристику супрессора и находится в непосредственной связи с механизмом его действия. В настоящее время известно три типа механизмов генной супрессии: 1) установление альтернативного пути биосинтеза, блокированного прямой мутацией; 2) активация мутантного белка, синтезируемого под контролем супрессируемой аллели; 3) супрессия на уровне трансляции генетического кода.

Для супрессоров, действующих по принципу установления альтернативных путей биосинтеза, характерно наличие генной, но не аллельной специфичности. В то же время два других упомянутых механизма супрессии связаны с наличием строгой аллельной специфичности. В настоящее время наиболее широко исследуются супрессоры, действующие на уровне трансляции кода.

Характер проявления мутаций, так же как и аллелей «дикого типа», зависит от точности, с которой происходит транскрипция и трансляция генетического кода. Только строгая зависимость между наличием того или иного кодона в ДНК гена и включением определенного

аминокислотного остатка в полипептид — продукт гена может быть гарантией проявления данного фенотипа. Очевидно, что такая гарантия является необходимой, но не является достаточной, ибо известно, что белки-ферменты клетки допускают некоторую «подвижность аминокислотного состава» (Yanofsky, 1963; Rifkin a. oth., 1966). Если при считывании кода возникают ошибки, то тем самым создается условие для исправления некоторых мутационных изменений. В качестве источников «спасительных» ошибок такого рода, приводящих к супрессии, можно рассматривать неточность в работе различных клеточных компонентов, участвующих в белковом синтезе (Apirion, 1966). Например, ошибаться может РНК-полимераза при транскрипции; транспортные РНК, рибосомы или аминоацил-т-РНК синтетазы при трансляции и т. д.

При соответствующем совпадении характера ошибок белкового синтеза с характером мутационных изменений мы будем иметь дело с супрессией на уровне считывания кода. Таким образом, мутации в генах, контролирующих компоненты белоксинтезирующего аппарата могут служить супрессорами. Достаточно определенно установлено, что супрессия может происходить за счет изменения структуры транспортных РНК (Caracchi a. Gussin, 1965; Carbon a. oth., 1966; Gupta a. Khorana, 1966), а также за счет изменения структуры рибосом (Gorini a. Kataja, 1964a, Davies a. oth., 1964).

Мутации генов, контролирующих структуру т-РНК или структуру рибосом, могут служить супрессорами по меньшей мере двух типов прямых мутаций. Эти супрессоры могут осмысливать бессмысленные кодоны (нонсенсы) (Benzer a. Champe, 1962; Garen a. Siddiqui, 1962; Beckwith, 1964; Gorini a. Kataja, 1964a) и переосмысливать «мутантные» аминокислотные кодоны (Gorini a. Kataja, 1964b; Carbon a. oth., 1966; Gupta a. Khorana, 1966). Супрессия нонсенов и переосмысление значащих кодонов, хотя и происходят в результате работы близких механизмов, тем не менее имеют некоторые существенные различия.

Сейчас известно значение всех 64 триплетов кодовой таблицы (Morgan a. oth., 1966). Три из них являются бессмысленными или терминальными, так как возникновение любого из них — UAG, UAA, UGA — (в т-РНК) является сигналом к прекращению трансляции. Возможно, именно эти кодоны являются своего рода знаками препинания на границах генов. Если такой кодон возникнет мутационным путем на месте какого-либо аминокислотного кодона в гене, то это будет приводить к преждевременному прекращению роста полипептидной цепи на рибосомах, т. е. продуктом данного гена будет только начальный фрагмент соответствующего полипептида (Brenner a. Stretton, 1964).

Для всех трех терминальных кодонов известны супрессоры (Brenner a. oth., 1955; Weigert a. Garen, 1965; Brenner a. oth., 1967). Один из механизмов супрессии этих триплетов заключается в том, что какая-то т-РНК начинает ошибаться и принимает нонсенс за кодон для своей аминокислоты. В результате этого на месте кодируемого нонсеном, встает аминокислота, и трансляция может быть продолжена за точку, обозначенную терминальным кодоном. При этом аминокислотный остаток, оказавшийся в белке в результате супрессии, может быть отличным от того, который стоял в белке «дикого типа». Наиболее вероятное объяснение причины таких ошибок — это мутация, приводящая к изменению антикодона т-РНК таким образом, что эта т-РНК «признает» терминальный кодон за кодон для своей аминокислоты (Lengyel, 1966). Аналогично можно представить себе и супрессию за счет переосмысления значащих кодонов.

Механизм рибосомной супрессии исследован менее подробно, однако, по-видимому, одна мутация гена, контролирующего субъединицу рибосомы 30 S, является одновременно супрессором как терминальных, так и значащих кодонов (Gorini a. Kataja, 1964). Супрессоры, действующие через ошибки белкового синтеза, обладают аллельной специфичностью при взаимодействии с различными генами, так как лишь некоторые мутантные аллели различных генов могут нести кодон, трансляция которого изменена.

Супрессия на уровне трансляции кода подробно исследуется для системы фаг—бактерия. У дрожжей—микроорганизмов эукариотического типа—также известны супрессоры, проявляющие аллельную специфичность при действии на многие гены. Такие супрессоры у дрожжей были названы суперсупрессорами (Hawthorne a. Mortimer, 1963).

Большим преимуществом бактериальных объектов для исследования механизмов супрессии является возможность использования бесклеточной системы в решающих экспериментах. К сожалению, бесклеточная система пока не получила широкого распространения в работе с дрожжами. Это обусловило некоторые специфические подходы и методы исследования супрессии у этого объекта. Так, весьма плодотворным было составление суперсупрессии а межаллельной комплементации в некоторых локусах (Mappey, 1964), а затем прямое исследование влияния суперсупрессоров на процесс межаллельной комплементации\* (Inge-Vechtomov a. oth., 1966).

Учитывая то, что тест на межаллельную комплементацию отражает структурные и функциональные изменения, происходящие в белке в результате мутации, составление тестов на супрессируемость и на межаллельную комплементацию позволяет выдвигать проверяемые гипотезы о молекулярных механизмах суперсупрессии. Так, в настоящее время очевидно, что суперсупрессоры действуют только на те мутации, которые приводят к весьма ощутимым изменениям в структуре белка. Соответствующие аллели, несущие супрессируемые мутации (например, аллели локусов  $ir_5$  и  $ad_2$ ), вообще лишены способности комплементировать или комплементируют полярно и при этом несут большие функциональные повреждения. Друг с другом суперсупрессируемые аллели не комплементарны вовсе (Mappey, 1964; Сойдла и др., 1967). Это позволило выдвинуть предположение о том, что суперсупрессоры у дрожжей тоже действуют на уровне трансляции кода, а суперсупрессируемые мутации представляют собой мутации—нонсенсы. К такому же выводу пришли и мы на основании исследования влияния суперсупрессоров на межаллельную комплементацию (Inge-Vechtomov a. oth., 1966). Более подробно этот вопрос будет рассмотрен в дальнейшем. Данные относительно специфичности, количества генов суперсупрессоров, а также обнаружение двусупрессорного эффекта, выражающегося в снижении жизнеспособности гаплоидной клетки при комбинировании в ней двух суперсупрессоров, позволили Р. Джилмору и Р. Мортимеру (Gilmore a. Mortimer, 1966) выдвинуть предположение, что суперсупрессия у дрожжей происходит за счет изменения т-РНК, так же как у бактерий и фагов. Наряду с доминантными суперсупрессорами, подобными тем, которые описали Д. Хауторн и Р. Мортимер, мы обнаружили полудоминантные и рецессивные суперсупрессоры (Инге-Вечтомов, 1966). В настоящей работе показано, что все три типа суперсупрессоров различаются по своей специфичности и по влиянию на межаллельную комплементацию.

\* Механизмы межаллельной комплементации обсуждаются в следующей статье.

## Материал и методы

В качестве материала в настоящей работе были использованы следующие гаплоидные штаммы Петергофских генетических линий дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (рис. 1).

Серия из 150 мутантов по локусу  $ad_2$ , полученных под действием ультрафиолетовых и рентгеновых лучей, а также под действием азотистой кислоты на прототрофный штамм 15В-П4, принадлежащий к типу спаривания  $a$ . Мутанты  $ad_2$  накапливают красный пигмент при выращивании в аэробных условиях.

41Г-П142 с генотипом  $\alpha rgh_{1-1} S_5$ , где  $\alpha$  — тип спаривания,  $rg h_{1-1}$  — мутация в локусе  $rg h_1$  (морщинистая колония), подавляемая доминантным суперсупрессором  $S_5$ .

21Б-П136 с генотипом  $\alpha rgh_{1-1} S_1$ . Этот штамм отличается от предыдущего тем, что вместо суперсупрессора  $S_5$  в его генотип входит суперсупрессор  $S_1$ , который также подавляет фенотипическое проявление мутации  $rg h_{1-1}$ .

Супрессоры  $S_5$  и  $S_1$  не сцеплены между собой.

$R_{53}$  с генотипом  $\alpha ad_{1-6} \bar{S}_{53}$  несет мутацию локуса  $ad_1$ , проявление которой подавлено полудоминантным супрессором  $S_{53}$ .

$R_{71}$  с генотипом  $\alpha ad_{1-6} \bar{S}_{71}$ . Полудоминантный суперсупрессор  $\bar{S}_{71}$ , так же как и  $\bar{S}_{53}$ , подавляет проявление мутации  $ad_1$ .

Гаплоиды  $R_{53}$  и  $R_{71}$ , а также  $R_1$ ,  $R_5$ ,  $R_{13}$ , упомянутые в схеме рис. 1, получены в качестве ревертантов штамма 6-П3, несущего мутацию  $ad_{1-6}$ .

54В-П137 с генотипом  $\alpha rgh_{1-1} \bar{S}_{53}$  образует морщинистые колонии, так как  $\bar{S}_{53}$  не подавляет проявление мутации  $rg h_{1-1}$ .

26Б-П164 с генотипом  $\alpha rgh_{1-1} aux_2 \bar{S}_{53}$ , где  $aux_2$  — пока неидентифицированная мутация ауксотрофности. Этот гаплоид образует морщинистые прототрофные колонии, так как мутация  $aux_2$  супрессируется  $\bar{S}_{53}$ .

29Б-П138 с генотипом  $\alpha rgh_{1-1} s_{48}$  также образует морщинистые колонии, поскольку рецессивный суперсупрессор  $s_{48}$  не подавляет проявление мутации  $rg h_{1-1}$ .

Гаплоиды 41Г-П142,  $R_{53}$ ,  $R_{71}$  использованы в скрещиваниях в виде цитоплазматических дыхательных мутантов. Аллельная специфичность суперсупрессоров  $S_5$ ,  $\bar{S}_{53}$ ,  $\bar{S}_{71}$ ,  $s_{48}$  определена путем тетрадного анализа гибридов между соответствующими мутантами по локусу  $ad_2$  и тестерами 41Г-П142, 21Б-П136, 54В-П137 и 29Б-П138. Отклонения от нормального ( $2ad : 2ad^+$ ) расщепления в тетрадах указывают на то, что исследуемый супрессор подавляет проявление той или иной мутации по локусу  $ad_2$ . При тетрадном анализе скрещиваний мутантов  $ad_2$  со штаммами  $R_{53}$  и  $R_{71}$ , несущих мутацию  $ad_{1-6}$ , подавленную супрессором, мы исходили из следующих положений: если диплоид, имеющий генотип

$$\frac{ad_{1-6} + \bar{S}}{+ ad_{2-x} +},$$

несет мутацию  $ad_{2-x}$ , подавляемую супрессором, то в тетрадах такого гибрида всегда должно быть не меньше двух прототрофных аскоспор, кроме того, появится тетрада с расщеплением 1  $ad : 3ad^+$  и 0  $ad : 4ad^+$ . Если же мутация  $ad_{2-x}$  не супрессируется  $S$  (в отличие от  $ad_{1-6}$ ), то в каждой тетраде должно быть не больше двух прототрофных аскоспор, и в то же время возможны соотношения  $3ad : 1ad^+$  и  $4ad : 0ad^+$  (Ингер-Раннев, 1966).

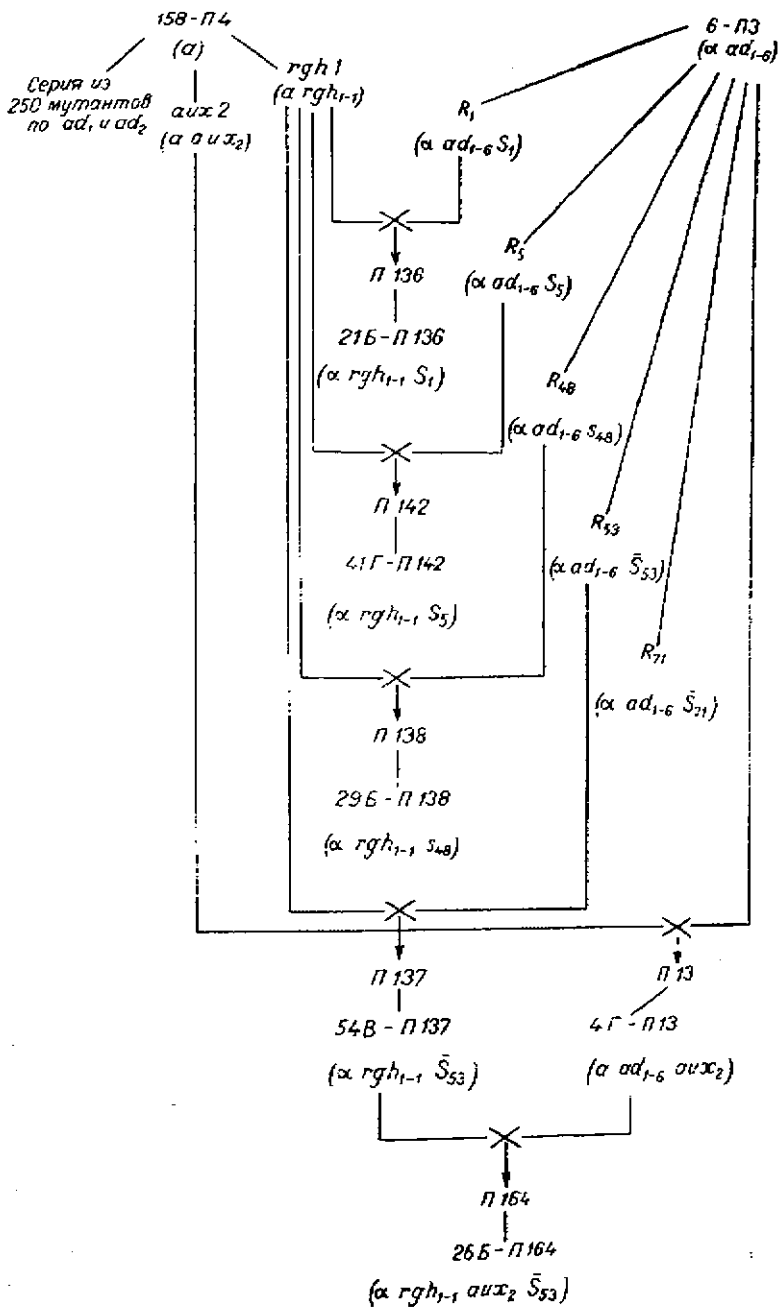


Рис. 1. Родословная штаммов, использованных в работе.

Для изучения влияния супрессоров на межallelную комплементарность в локусе  $ad_2$  мы использовали гаплоиды, несущие аллели, не подавляемые тем или иным супрессором, в комбинации с этим супрессором. Такие гаплоиды при необходимости скрещивались друг с другом и со всеми мутантами по локусу  $ad_2$ .

В случае доминантных и полудоминантных суперсупрессоров только некоторые гаплоиды, несущие не супрессируемые аллели в комбинации с супрессором, были получены в ходе исследования специфичности супрессоров методом тетрадного анализа.

В дальнейшем для той же цели был разработан более простой метод получения интересующих нас гаплоидов. В частности, в опытах с доминантными супрессорами исследуемый мутант скрещивался с гаплоидом 41Г-П142. В случайной выборке гаплоидов полученного гибрида мы выделяли красные морщинистые клоны генотипа  $a ad_2 rgh_{1-1}$ . Эти клоны вновь скрещивали с 41Г-П142. Таким образом получали диплоиды:

$$\frac{a ad_{2-x} rgh_{1-1}}{a} + \frac{rgh_{1-1}}{S_5}$$

Если аллель  $ad_{2-x}$  была не супрессируемой, то в расщеплении такого гибрида появлялись красные колонии двух типов: гладкие ( $ad_2 rgh_{1-1} S_5$ ), несущие супрессор, подавляющий проявление  $rgh_{1-1}$ , и морщинистые ( $ad_{2-x} rgh_{1-1} +$ ) без супрессора. Красные гладкие клоны были использованы далее для изучения влияния супрессора  $S_5$  на межallelную комплементарность. Если в гибриде указанного генотипа аллель  $ad_{2-x}$  оказывалась супрессируемой, то в расщеплении гибрида появлялся только один тип красных гаплоидов — красные морщинистые, так как гаплоиды  $ad_{2-x} rgh_{1-1} S_5$  оказывались гладкими и белыми. Таким образом, данный метод является и методом изучения аллельной специфичности супрессора. Тот же способ с применением штамма 21Б-П136 был использован и для получения гаплоидов, не подавляемых супрессором  $S_1$  в комбинации с этим супрессором.

Для аналогичной цели в случае полудоминантного супрессора был использован штамм 26Б-П164. В этом случае скрещивания проводили также в два этапа. Сначала исследуемый гаплоид скрещивали с 26Б-П164 и в потомстве гибрида отбирали клоны  $a ad_2 aux_2$ , а затем их вновь скрещивали с 26Б-П164, получая гибриды генотипа:

$$\frac{a ad_2 aux_2}{a} + \frac{aux_2}{S_{33}}$$

В расщеплении этого диплоида отбирали клоны по фенотипу  $ad_2+$ . Они несли одновременно мутацию  $aux_2$ , проявление которой было подавлено  $S_{33}$ .

Гаплоиды, несущие аллели  $ad_2$ , не подавляемые  $s_{48}$  в комбинации с этим супрессором, мы выделяли при тетрадном анализе благодаря тому, что рецессивные суперсупрессоры, исследованные нами, имели самостоятельное фенотипическое проявление, выражающееся в снижении скорости роста несущих их штаммов, и поэтому достаточно было отобрать «красные мелкие» гаплоиды.

Тест на межallelную комплементарность мы проводили методом отпечатков, подобно тому как это описано в статье Т. Сойдла и др. (1967). Каждый опыт ставили не менее двух раз. Результаты теста на межallelную комплементарность учитывали на двадцатый день. Культуры выращивали при 30°. В работе использованы полная и минимальная среды, а также минимальная среда с добавкой аденина в концентрации 10 мг/л. Для индуцирования споруляции применяли сре-

ду с ацетатом натрия. Состав сред описан в предыдущих сообщениях. Каждая комбинация аллелей испытана в скрещивании мутанта типа спаривания  $\alpha$  с несколькими изоаллельными по  $ad_2$  гаплоидами типа спаривания  $\alpha$ , несущими супрессор. Такие изоаллельные по  $ad_2$  гаплоиды — производные одного и того же мутанта были отобраны в расщеплении соответствующего гибрида, полученного для выделения мутации  $ad_2$  в комбинации с тем или иным супрессором и типом спаривания  $\alpha$ .

## Экспериментальная часть

### 1. Суперсупрессоры у дрожжей

Три типа суперсупрессоров: доминантные ( $S$ ), полудоминантные ( $\bar{S}$ ) и рецессивные ( $s$ ) были выделены нами при генетическом анализе ревертантов, возникших спонтанно в культуре 6-ПЗ, мутантной по локусу  $ad_1$ . Все три типа исследованных нами суперсупрессоров действуют на мутации разных генов, проявляя при этом аллельную специфичность. Так, доминантный супрессор  $S_5$  действует на локусы  $ad_1$ ,  $ad_2$ ,  $rgh_1$ ,  $rgh_3$ ,  $aux_2$ ; полудоминантный  $\bar{S}_{53}$  — на  $ad_1$ ,  $ad_2$ ,  $aux_2$ ; рецессивный супрессор  $s_{48}$  подавляет проявление некоторых мутаций в локусах  $ad_1$ ,  $ad_2$ ,  $ad_4$  и других генах пуринового биосинтеза у дрожжей.

Специфичность этих супрессоров по отношению к некоторым аллелям локуса  $ad_2$ , т. е. способность супрессоров подавлять проявление некоторых аллелей  $ad_2$ , представлена в табл. 1. Для каждой аллели этого локуса в таблице указана протяженность соответствующего функционального повреждения, выраженная в числе верхов (Сойдла и др., 1967).

Основная часть данных получена с использованием супрессоров  $S_5$ ,  $\bar{S}_{53}$  и  $s_{48}$ . Проявление некоторых аллелей исследовано в сочетании с двумя доминантными супрессорами ( $S_1$  и  $S_5$ ) и двумя полудоминантными ( $\bar{S}_{53}$  и  $\bar{S}_{71}$ ). Во всех случаях оба доминантных и оба полудоминантных супрессора проявили одинаковую аллельную специфичность. При исследовании доминантного супрессора  $S_5$  было обнаружено, что он восстанавливает дикий тип в разной степени в комбинации с различными аллелями локуса  $ad_2$ . Так, гаплоиды, несущие  $S_5$  в комбинации с аллелями № 16, 75, 91, 120, 128, 144, 148, 190, 199, 201, не накапливают красного пигмента. В то же время гаплоиды, несущие  $S_5$  с аллелями № 37, 99, 105, 113 и 133, накапливают различные количества красного пигмента. При этом, например, гаплоиды генотипа  $ad_{2-105}S_5$  по скорости роста на минимальной среде неотличимы от дикого типа, а гаплоиды  $ad_{2-133}S_5$  растут значительно хуже, чем дикий тип. Еще слабее супрессия выражена у гаплоидов генотипа  $ad_{2-99}S_5$  и  $ad_{2-113}S_5$ . Неполная супрессия наблюдалась также и для супрессора  $S_1$  при действии на аллели  $ad_{2-99}$  и  $ad_{2-113}$ .

Данные табл. 1 указывают на то, что специфичность рецессивного супрессора  $s_{48}$  при действии на  $ad_2$  неотличима от специфичности доминантных супрессоров. Во всяком случае до настоящего времени мы не обнаружили ни одной аллели, которая была бы супрессорируема либо только доминантным, либо только рецессивным супрессором. Правда, проанализирован небольшой материал для рецессивного супрессора. Работа в этом направлении продолжается.

Для полудоминантных супрессоров нам удалось выявить достаточно четкую супрессию только трех аллелей: № 120, 128 и 148, т. е. только среди тех аллелей, проявление которых подавляли доминантные

Таблица 1

Специфичность доминантных, полудоминантных и рецессивных суперсупрессоров по отношению к аллелям локуса  $ad_2$

№	Вероны	S	$\bar{S}$	s	№	Вероны	S	$\bar{S}$	s	№	Вероны	S	$\bar{S}$	s
3	II	-	-	-	80	I-VIII	-	-	-	158	I-VIII	-	-	-
5	II	-	-	-	91	I-VII	+*	-*	+	160	I-VIII	-	-	-
7	II, III, V	-	-	-	93	VIII	-	-	-	163	VI	-*	-	-
12	V-VI	-*	-	-	96	V-VI	-	-	-	172	I-VII	-	-	-
16	I-VI	+*	-*	+	98	IV	-	-	-	174	I-VII	-	-	-
19	II-III	-	-	-	99	I-VIII	+*	-*	-	177	I-III	-	-	-
20	VIII	-	-	-	101	III-VI	-	-	-	180	IV	-	-	-
21	III-V	-	-	-	102	VIII	-	-	-	188	I-VIII	-	-	-
23	V-VI	-	-	-	103	III-V	-	-	-	189	I-VIII	-	-	-
24	VIII	-	-	-	105	I-VII	+*	-*	-	190	I-VIII	+*	-*	+
35	VIII	-	-	-	111	I-VIII	-	-	-	191	VIII	-	-	-
37	I-VIII	+*	-*	+	112	VIII	-	-	-	192	V-VI	-	-	-
38	VIII	-	-	-	113	I-VIII	+*	-*	-	199	I-VIII	+*	-*	+
39	VIII	-	-	-	120	I-VI	+*	+*	-	201	I-VIII	+*	-*	+
41	VII-VIII	-	-	-	121	IV, VII	-*	-	-	205	VIII	-	-	-
42	I-VIII	-	-	-	123	I-VIII	-	-	-	206	II	-	-	-
45	VIII	-	-	-	125	I-VIII	-	-	-	207	I	-*	-	-
46	I-VII	-	-	-	128	I-VIII	+*	+*	+	210	III	-	-	-
47	V	-*	-	-	129	V-VI	-	-	-	211	III-V	-	-	-
48	VII	-*	-	-	130	I-VIII	-	-	-	212	V-VI	-*	-	-
49	I-VIII	-	-	-	131	I-VIII	-	-	-	219	III-VI	-*	-	-
53	I-VIII	-	-	-	133	I-VIII	+*	-*	+	200	VIII	-	-	-
54	VIII	-	-	-	134	I, III-VIII	-	-	-	222	III	-	-	-
55	III-V	-	-	-	137	I-VIII	-	-	-	223	I-V	-	-	-
58	V-VI	-	-	-	139	II	-	-	-	226	I-VII	-	-	-
59	I-VII	-	-	-	142	VII-VIII	-	-	-	232	III	-	-	-
63	III	-	-	-	144	I-VII	+*	-*	+	235	IV, VI-VIII	-	-	-
66	VIII	-	-	-	146	I-VII	-	-	-	236	III	-	-	-
72	I-VII	-	-	-	147	I-VIII	-	-	-	237	VII	-	-	-
74	III	-	-	-	148	I-VII	+*	+*	+	242	V-VI	-	-	-
75	I-VII	+*	-*	+	152	VIII	-	-	-	246	V-VI	-	-	-
78	VIII	-	-	-	156	IV	-*	-	-	247	VII	-*	-	-

Примечание. Знаком «плюс» (+) обозначены аллели, супрессируемые тем или иным супрессором; знаком «минус» (-) — аллели, не супрессируемые данным супрессором; звездочка (\*) показывает, что аллель исследована в комбинации с двумя супрессорами: доминантными ( $S_1$  и  $S_5$ ) или полудоминантными ( $\bar{S}_5$  и  $\bar{S}_{71}$ ).



суперсупрессоры. Ни одна из мутаций, которые не подавляли доминантные супрессоры, не была подавляема и полудоминантными супрессорами. В то же время данные таблицы показывают, что и большинство аллелей, супрессируемых  $S_5$  и  $S_1$ , не супрессируется  $\bar{S}_{53}$  и  $\bar{S}_{71}$ . Однако на некоторые из этих аллелей полудоминантные супрессоры действовали таким образом, что фенотип соответствующих гаплоидов  $ad_2 \bar{S}_{53}$  или  $ad_2 \bar{S}_{71}$  был неотличим от фенотипа частичных (Кожин, 1967) мутантов по локусу  $ad_2$ . Следует сказать, что при анализе тех скрещиваний, в которых не использовались суперсупрессоры, но использовались те или иные супрессируемые аллели, мы не наблюдали выщепления гаплоидов, имевших частично мутантный фенотип, т. е. для этих аллелей характерно полное выражение потребности в аденине. Частично мутантный фенотип возникал в результате взаимодействия аллелей № 99, 113, 133, 190, 199, 201 и полудоминантных супрессоров.

Анализ специфичности суперсупрессоров в наших экспериментах затруднялся эффектом антисупрессии, заключающемся в ослаблении влияния суперсупрессоров на те или иные супрессируемые аллели под действием некоторых генетических факторов. При этом эффект антисупрессии выражался тем сильнее, чем слабее осуществлялась супрессия.

## 2. Влияние суперсупрессоров на межаллельную комплементацию в локусе $ad_2$

Ранее мы сообщали о том, что доминантные суперсупрессоры в гетерозиготе изменяют характер межаллельной комплементации в локусе  $ad_2$  (Inge-Vechtomov a. oth., 1966; Inge-Vechtomov a. oth., 1967).

Таблица 2

### Влияние доминантного суперсупрессора на комплементацию в локусе $ad_2$

Число комплементирующих комбинации	Число комплементирующих комбинаций		
	всего	среди n/n	среди n/p
без $S_5$	1777 (47,4%)	1740 (46,4%)	37 (1,0%)
с $S_5$	1883 (50,2%)	1740 (46,4%)	143 (3,8%)
Число комбинации, проявивших индуцированную комплементацию	106 (2,8%)	0	106 (2,8%)

Примечание. Общее число комбинаций аллелей  $25 \times 150 = 3750$ . Приняты обозначения: n — аллели, не подавляемые  $S_5$ , p — аллели, подавляемые  $S_5$ .

При этом доминантный суперсупрессор  $S_5$  изменяет характер комплементации только в тех комбинациях аллелей, из которых одна является супрессируемой. Изменение комплементации выражается в том, что некоторые аллели, не комплементарные без супрессора, становятся комплементарными в его присутствии. Сравнение тестов на комплементацию без доминантного супрессора и с доминантным супрессором в гетерозиготе представлено в табл. 2 и 3 и на рис. 2. Эти результаты показывают, что различные доминантные супрессоры  $S_5$  и  $S_1$  оказывают одинаковое влияние на межаллельную комплементацию.

Карта межаллельной комплементации, индуцированной доминантными суперсупрессорами (рис. 2), построена на основании карты веронов (Сойдла и др., 1967). В нее включены только те комбинации алле-

Матрица межallelной комплементации локуса  $ad_2$  в присутствии гетерозиготных доминантных супрессоров

Алели, использованные в составе генотипа $a ad_2 +$	Алели, использованные в составе генотипа $ad_2 S$																									
	209 (6; 4*)	206 (2)	3 (6)	232 (3)	236 (1)	47 (4; 3*)	246 (2)	163 (6)	48 (3; 3*)	12 (3; 2*)	212 (3; 3*)	247 (3; 3*)	156 (3; 3*)	211 (2)	134 (3)	219 (6; 6*)	121 (2)	20 (1)	35 (6)	38 (1)	54 (1)	223 (1)	39 (6)	24 (1)	191 (1)	
15	⊕	⊕	—	—	—	—	—	⊕	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
120	⊕	⊕	—	—	—	—	—	⊕	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
148	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
105	⊕	⊕	⊕	⊕	—	—	—	⊕	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
75	⊕	⊕	—	—	—	—	—	⊕	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
91	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
123	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
130	—	⊕	—	—	—	—	—	⊕	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
133	⊕	⊕	—	—	—	—	—	⊕	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
144	—	⊕	—	—	—	—	—	⊕	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
199	⊕	⊕	—	—	—	—	—	⊕	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
201	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
99	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
113	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
37	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	⊕	—	—	—	—	—	—	⊕	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Примечание. В скобках рядом с номерами аллелей указано количество изоаллельных по  $ad_2$  культур, несущих супрессор  $S_2$ ; в тех случаях, где был использован и супрессор  $S_1$ , количество изоаллельных по  $ad_2$  культур с этим супрессором отмечено звездочкой (\*); знак «минус» (—) — отсутствие комплементации; знак «плюс» (+) — комплементация вне зависимости от наличия супрессора; знак «плюс» в кружке (⊕) — комплементация, индуцированная супрессором

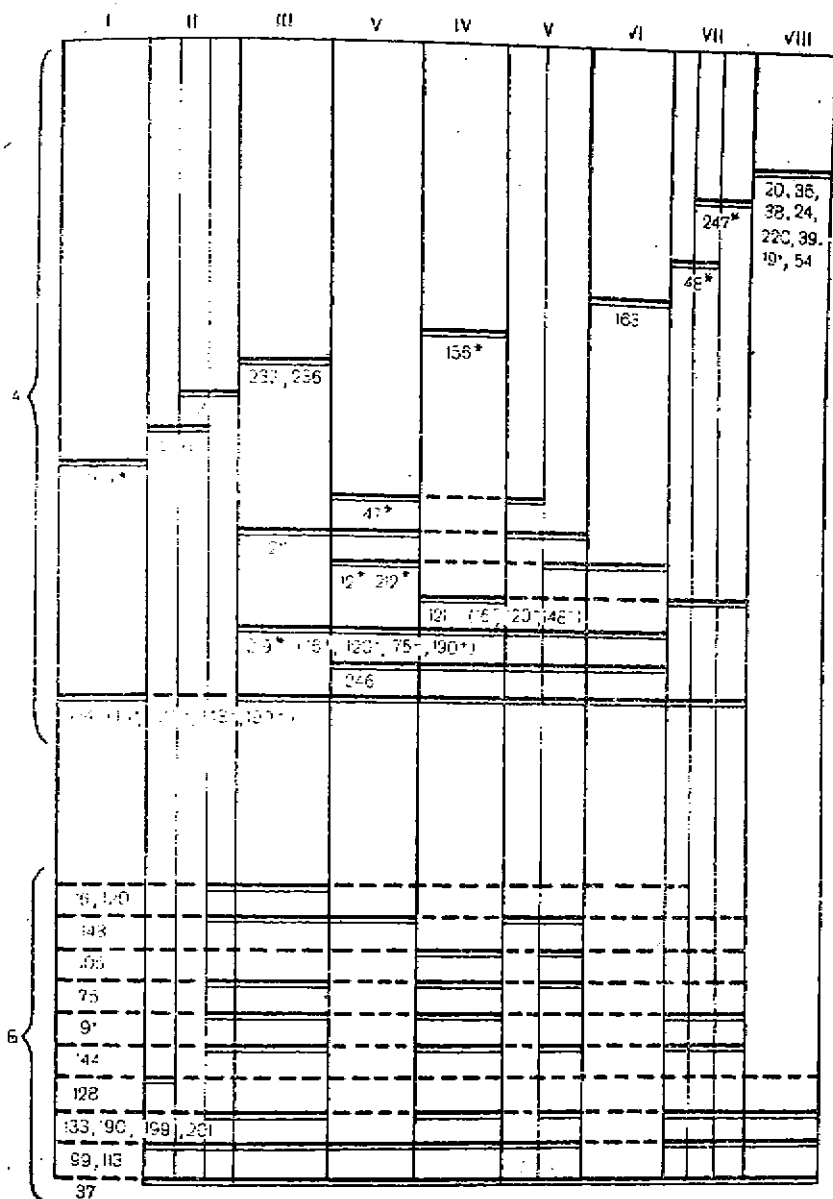


Рис. 2. Карта межаллельной комплементации, индуцированной доминантными суперсупрессорами в локусе *ad<sub>2</sub>*.

**A** — мутации-тестеры, использованные в составе генотипа *ad<sub>2</sub>S*. Разрыв (пунктир) групп комплементации отражает характер комплементарности аллелей-тестеров друг другу без супрессора. **B** — мутации, которые по-разному комплементируются с тестерами в зависимости от наличия доминантного суперсупрессора. Эти аллели использованы в скрещиваниях в составе генотипа *a ad<sub>2</sub>+*. Сплошная линия изображает функциональные дефекты аллелей в присутствии супрессоров, а пунктирная — функциональные дефекты аллелей в отсутствие супрессора. Арабские цифры — номера аллелей, римские — номера горохов. Рядом с номерами некоторых аллелей обозначена знаком «плюс» их исключительная комплементарность, а знаком «минус» — исключительная некомплементарность с соответствующими аллелями, номера которых указаны в скобках. Карта построена для доминантного суперсупрессора *S<sub>2</sub>*, однако некоторые тестеры были использованы в скрещиваниях также и с супрессором *S<sub>1</sub>* (отмечено звездочкой).

лей, в которых характер комплементации зависел от присутствия супрессоров. Характер межallelной комплементации, индуцированной доминантными супрессорами  $S_1$  и  $S_5$ , показывает, что функциональные повреждения соответствующих супрессируемых аллелей не исчезают полностью, а лишь в общем сокращаются по длине. Данные о количестве комбинаций, в которых обнаружена индуцированная супрессором межallelная комплементация, представлены в табл. 2.

Мы исследовали влияние рецессивного супрессора на межallelную комплементацию при гетерозиготном и при гомозиготном состоянии. На фоне гетерозиготного супрессора исследовано  $10 \times 150$  комбинаций аллелей. В опыте проводилось скрещивание гаплоидов, несущих аллели № 46, 53, 72, 139, 163, 191, 209, 210, 222, 240 в присутствии  $s_{48}$ , со всеми мутантами по локусу  $ad_2$ , которые были в нашем распоряжении.

Указанные мутанты, как видно из табл. 1, имеют функциональные повреждения разной длины (от одного до восьми вероносов), расположенные в разных частях карты комплементации. Характер комплементации в этих скрещиваниях был таким же, как и без супрессора.

На фоне гомозиготного супрессора  $s_{48}$  была исследована способность комплементировать для 19 аллелей почти в двух третях от всех возможных сочетаний (всего 228 скрещиваний). Кроме десяти указанных выше мутантов, были исследованы мутанты № 5, 7, 12, 20, 137, 177, 223, 226, 19, 134.

Таблица 4

Влияние рецессивного суперсупрессора  $s_{48}$  на комплементацию в локусе  $ad_2$

Состояние рецессивного супрессора	Число комбинации		
	всего проверенных	комплементирующихся	проявивших индуцированную комплементацию
$+/+$	162	53	—
$+/s_{48}$	1500	601	0
$s_{48}/s_{48}$	162	65	12

Результаты этих экспериментов, представленные в табл. 4 и 5, показывают, что рецессивный суперсупрессор индуцирует межallelную комплементацию в тех комбинациях, где присутствуют аллели, на которые он не оказывает действия, обнаружимого на гаплоидном уровне. Обращает на себя внимание и тот факт, что  $s_{48}$  индуцирует межallelную комплементацию в тех сочетаниях, где без супрессора одна из аллелей комплементирует полярно или не способна комплементировать вовсе.

В нашем распоряжении имеются ограниченные пока данные по влиянию полудоминантных супрессоров  $\bar{S}_{53}$  и  $\bar{S}_{71}$  на межallelную комплементацию в локусе  $ad_2$ . Опыты проводились с гетерозиготными, а также в некоторых случаях с гомозиготными супрессорами. В основном исследовалось влияние  $\bar{S}_{53}$  и  $\bar{S}_{71}$  на комплементацию при скрещивании гаплоидов, несущих супрессор и те аллели, которые подавляются доминантными (и рецессивными) супрессорами со всеми мутантами по локусу  $ad_2$ . Исключение составляет аллель № 209, которая не подавляется ни одним из супрессоров, но весьма удобна для выявления межallelной комплементации, индуцированной по крайней мере

Таблица 5

Матрикс межallelной комплементации локуса  $ad_2$  в присутствии гомозиготного рецессивного суперсупрессора  $s_{48}$

Аллели, использованные в составе генотипа $aad_2s_{48}$	Аллели, использованные в составе генотипа $aad_2s_{48}$														
	46 (3)	53 (3)	72 (3)	7 (1)	12 (2)	20 (2)	137 (3)	177 (2)	191 (3)	209 (3)	210 (3)	222 (2)	223 (2)	226 (2)	240 (2)
131 (5)		и	е	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
21 ( )	ис	сл	е-	-	+	+	⊕	⊕	+	+	-	-	⊕	⊕	+
19 (5)	до	ва	ны	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+
5 (3)				-	+	+	⊕	-	+	+	+	+	⊕	-	+
240 (3)	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
226 (3)	-	-	-	-	-	+	-	-	+	⊕	-	-	-	-	-
213 (3)	-	-	-	-	+	+	⊕	-	+	⊕	-	-	-	-	-
222 (1)	-	-	-	-	+	+	⊕	-	+	+	-	-	-	-	-
210 (3)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
209 (3)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
191 (3)	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
177 (2)	-	-	-	-	-	+	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-
137 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20 (2)	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12 (2)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. Обозначения те же, что в таблице 3.

минантными супрессорами. Она также была использована в комбинации с  $\bar{S}_{53}$  для скрещивания со всеми мутантами по  $ad_2$ . В присутствии полудоминантных супрессоров межallelная комплементация была обнаружена до настоящего времени в тех комбинациях аллелей, где по крайней мере одна из них является супрессируемой  $S$ , кроме одного случая — комплементация аллелей № 209 и 105 в присутствии  $\bar{S}_{53}$  и № 16 и 133, 99, 75 в присутствии  $\bar{S}_{71}$ . Эти аллели не супрессируются ни  $\bar{S}_{53}$  ни  $S_{71}$ , хотя и супрессируются  $S_1$ ,  $S_5$  и  $s_{48}$ . Результаты этих опытов представлены в табл. 6 и 7. Мы испытали влияние полудоминантных супрессоров в гомозиготе и двух полудоминантных супрессоров в дигетерозиготе

$$\frac{\bar{S}_{53}}{+} + \frac{+}{\bar{S}_{71}}$$

Влияние гетерозиготных полудоминантных суперсупрессоров на комплементарность в локусе  $ad_2$ 

Число комплементирующих комбинаций	Число комплементирующих комбинаций			Число комплементирующих комбинаций	Число комплементирующих комбинаций		
	всего	среди а/п	среди п/п		всего	среди а/п	среди п/п
Без $\bar{S}_{71}$	3	3	0	Без $\bar{S}_{33}$	102	102	0
С $\bar{S}_{71}$	20	6	14	С $\bar{S}_{33}$	103	103	0
Число комбинаций, проявивших индуцированную комплементарность с $\bar{S}_{71}$	17	3	14	Число комбинаций, проявивших индуцированную комплементарность с $\bar{S}_{33}$	1	1	0

Примечание. Общее количество комбинаций аллелей, исследованных в присутствии супрессора  $\bar{S}_{71}$ , равно  $7 \times 150 = 1050$ , в присутствии супрессора  $\bar{S}_{33}$   $3 \times 150 = 450$  (см. табл. 7). Знаком  $\oplus$  помечены аллели, не поддающиеся воздействию соответствующими полудоминантными суперсупрессорами;  $-$  — поддающиеся аллели.

Таблица 7

Матрица межаллельной комплементарности локуса  $ad_2$  в присутствии гетерозиготных суперсупрессоров  $\bar{S}_{33}$  и  $\bar{S}_{71}$ 

Аллели, использованные в составе генотипа $a ad_2 +$	Аллели, использованные в составе генотипа $a ad_2 \bar{S}$									
	$\bar{S}_{71}$						$\bar{S}_{33}$			
	138 (2)	99 (1)	76 (1)	113 (1)	190 (1)	199 (1)	44 (1)	190 (3)	201 (2)	209 (3)
16	$\oplus$	$\oplus$	$\oplus$	-	-	-	-	-	-	-
106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$\oplus$
120	$\oplus$	$\oplus$	$\oplus$	-	$\oplus$	$\oplus$	$\oplus$	-	-	-
128	$\oplus$	$\oplus$	$\oplus$	$\oplus$	$\oplus$	$\oplus$	$\oplus$	-	-	-
148	-	$\oplus$	$\oplus$	-	-	-	-	-	-	-

Примечание.  $\oplus$  — аллели, не поддающиеся воздействию  $\bar{S}$ .

Матрикс, полученный при скрещивании мутантов  $ad_2$  в присутствии полудоминантных супрессоров  $\bar{S}_3$  и  $\bar{S}_{71}$

Аллели, использованные в составе генотипа $a ad_2 \bar{S}$		Аллели, использованные в составе генотипа $a ad_2 \bar{S}$							
		$ad_2 \bar{S}_{71}$						$ad_2 \bar{S}_3$	
		75 (1)	99 (1)	113 (1)	144 (1)	119 (1)	133 (2)	201 (2)	190 (3)
$\bar{S}_{71}$	99 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-
	144 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-
	201 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
$\bar{S}_3$	201 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-
	190 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
	113 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-
	91 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-
	99 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. Обозначения те же, что в таблице 3.

на комплементацию некоторых аллелей, подавляемых доминантными супрессорами. В этих опытах были получены те же результаты, что и при использовании каждого из супрессоров  $\bar{S}_{53}$  и  $\bar{S}_{71}$  в гетерозиготе (табл. 8).

### Обсуждение

Наши современные представления о механизме действия гена, сведения об участии различных структур клетки в реализации генетической информации делают возможным применение генетического анализа для выяснения некоторых особенностей строения и функционирования макромолекул клетки, а также делают необходимым обсуждение механизмов взаимодействия генов на молекулярном уровне.

Данные о специфичности трех типов супрессоров, приведенные в табл. 1, несколько неравнозначны для разных супрессоров. Не все внесенные в таблицу мутанты были проанализированы в скрещивании с тремя тестерами, несущими различные типы супрессоров, описанными в разделе «Материал и методы» (41Г-П142, 54В-П137, 29Б-П138). Тем не менее эти данные охватывают различные типы мутантов, охарактеризованные по их способности к межаллельной комплементации. По супрессруемости проанализированы аллели, несущие функциональные повреждения различной протяженности (входящие в группы комплементации разной длины), в том числе некоторые полярные и некомплементирующие.

Результат действия доминантных суперсупрессоров на межаллельную комплементацию оформлен в виде карты. Как видно, влияние супрессоров на комплементацию выражается в общем в сокращении функ-

циональных повреждений. При этом на карте показано сокращение только супрессируемых функциональных повреждений. Мы приняли, что продукты остальных аллелей не изменяются под действием супрессоров. Это предположение основано на данных табл. 2, которые показывают, что межаллельная комплементация, индуцированная доминантными супрессорами, проявляется только в тех комбинациях, в которых присутствуют супрессируемые аллели.

Тест на межаллельную комплементацию является косвенным методом изучения структуры белка, контролируемого данным геном (Fincham, 1966). Наличие межаллельной комплементации в том или ином локусе прежде всего указывает на то, что фермент — продукт данного гена обладает четвертичной структурой и в него входит не менее двух идентичных субъединиц. Характер карты комплементации позволяет делать предположение о природе мутации, используемых в скрещиваниях, и о направлении трансляции гена. Составление карты межаллельной комплементации и генетической карты локуса является в настоящее время основным методом в исследовании структуры и функции гена. Составление аллельной специфичности супрессоров, характера комплементации супрессируемых аллелей и картирование супрессируемых мутаций позволяют делать выводы о механизмах супрессии. Обнаруженное нами явление межаллельной комплементации, индуцированной супрессорами, представляет собой существенное дополнение к тесту на специфичность супрессоров.

Суперсупрессируемые аллели, выявленные в настоящей работе, не комплементарны друг другу. 8 из 15 супрессируемых аллелей не способны к межаллельной комплементации, 7 комплементируют полариз, что указывает на возможность того, что они несут мутации — нонсенсы. Их мутационные дефекты картируются в разных сайтах локуса  $ad_2$ , как было показано Е. Райнулисом и Ле Динь Лимонгом (готовится к печати). Аналогичные данные по рекомбинации суперсупрессируемых мутаций для локуса  $ad_1$  получены Н. А. Поповой и С. Г. Инте Вечтомозым (1966).

Как можно судить по результатам влияния доминантных супрессоров на межаллельную комплементацию в локусе  $ad_2$ , данный тип супрессоров индуцирует комплементацию только в том случае, если одна из пары аллелей оказывается супрессируемой. Можно сказать, что супрессоры  $S_3$  и  $S_1$  действуют на продукты только тех аллелей, которые они супрессируют. Как показало изучение полудоминантных и рецессивных суперсупрессоров, эти два эффекта — супрессия и изменение продукта аллели, не приводящее к восстановлению прототрофности, — следует различать. Так, например,  $s_{48}$  не супрессирует аллель 72, однако индуцирует межаллельную комплементацию при сочетании ее с некоторыми другими аллелями. Тот факт, что  $S_1$  и  $S_3$  меняют характер комплементации только супрессируемых ими аллелей, подтверждает, что мы имеем дело именно с супрессией нонсенсов. В противном случае можно было ожидать частого проявления индуцированной комплементации и между несупрессируемыми аллелями. Правда, следовало бы ждать этого и при супрессии нонсенсов в том случае, например, если нонсенс осмысливается как водон для аминокислоты, не совместимой с нормальной работой фермента, контролируемого геном  $ad_2$ .

Возможно,  $S_1$  и  $S_3$  при супрессии обеспечивают осмысление нонсенсов за счет аминокислоты, не существенно отличающейся от той, которая стояла в соответствующем месте в белке дикого типа. Тем не менее, если считать рассматриваемую гипотезу правильной, то осмысление нонсенса происходит за счет иной аминокислоты, по сравнению с использованной в белке дикого типа, так как эффективность супрес-



сии разных аллелей, несущих один и тот же кодон-нонсенс (все эти аллели подавляются одним супрессором), различна. На это указывает разная степень восстановления прототрофности (способность расти без аденина и пигментация колоний) при сугрессии. На это же указывают некоторые предварительные данные, полученные Т. Сойдла по меж-аллельной комплементации супрессируемых аллелей в присутствии  $S_5$ . В этих опытах была показана негативная комплементация супрессируемых аллелей, несмотря на наличие супрессора. Следовательно, «супрессированные» субъединицы фермента, контролируемого геном  $ad_2$ , отличаются от субъединиц дикого типа, и при агрегации они могут давать снижение ферментативной активности.

Обращает на себя внимание сложный характер карты комплементации, индуцированной  $S_5$ . По всей вероятности фенотипическое проявление комплементации пары аллелей (супрессируемая/несупрессируемая) в присутствии супрессора зависит по меньшей мере от трех типов взаимодействия субъединиц фермента  $ad_2$ . В цитоплазме должны одновременно синтезироваться три типа полипептидов, контролируемых locusом  $ad_2$ : 1) мутантный полипептид, контролируемый не супрессируемой аллелью; 2) фрагмент полипептидной цепи, синтезируемой под контролем супрессируемой аллели (если она несет нонсенс), и 3) полипептид — продукт супрессируемой аллели, «исправленный» или достроенный вследствие сугрессии. Взаимодействие между субъединицами всех трех типов, которое может в каждом случае выражаться в позитивной или негативной комплементации, и обуславливает регистрируемый нами эффект: наличие комплементации или ее отсутствие.

Обсуждаемые взаимодействия могут зависеть от ряда факторов, таких, как: 1) соотношение трех типов субъединиц, что в свою очередь определяется эффективностью сугрессии, 2) характером осмысления нонсенса, 3) расположением мутационных дефектов, 4) количеством субъединиц в нормальной молекуле фермента, контролируемого геном  $ad_2$ , и т. д. В настоящее время трудно учесть все эти факторы при интерпретации карты индуцированной комплементации. Одинаковый характер межаллельной комплементации, индуцированной  $S_1$  и  $S_5$ , отражает одинаковую специфичность этих супрессоров и указывает на то, что эти суперсупрессоры одинаково осмысливают нонсенс. Если считать, что доминантная суперсугрессия осуществляется за счет изменения т-РНК (Gilmore a. Mortimer, 1966), то это согласуется с представлениями Р. Джизмора и Р. Мортимера и прямыми биохимическими данными о существовании нескольких генов, кодирующих т-РНК с одинаковыми антикодонами. В наших экспериментах, так же как и в экспериментах указанных авторов, было показано, что может существовать шесть разных генов, мутации которых приводят к появлению доминантных суперсупрессоров, имеющих одинаковую аллельную специфичность. Тогда все эти шесть суперсупрессоров могут осмысливать нонсенс совершенно одинаково, обеспечивая рост полипептидной цепи за счет одной и той же аминокислоты.

Если мы принимаем, что доминантные суперсупрессоры действуют по принципу осмысления нонсенсов, то, видимо, так же действуют и полудоминантные суперсупрессоры, так как они супрессируют только те аллели, которые супрессируют и доминантные супрессоры. Кроме того, межаллельную комплементацию  $\bar{S}_{53}$  и  $\bar{S}_7$  индуцируют только в тех комбинациях аллелей, где имеется хотя бы одна аллель, супрессируемая  $S_1$  и  $S_5$ . Обнаруженная разница в аллельной специфичности доминантных супрессоров ( $S$ ) и полудоминантных супрессоров ( $\bar{S}$ ) может быть объяснена двояко — либо полудоминантные суперсупрессоры ос-

мысливают нонсенс менее эффективно, чем доминантные, т. е. образуется меньше белка — продукта супрессии, чем в случае доминантной супрессии, либо при полудоминантной супрессии нонсенс осмысливается иначе, чем при доминантной супрессии, т. е. эти два типа супрессоров ставят в растущую полипептидную цепь разные аминокислотные остатки. Можно также предположить, что эти два типа супрессии отличаются и по эффективности и по характеру осмысления нонсенса. Сама полудоминантность  $\bar{S}_{33}$  и  $\bar{S}_{71}$  могла бы говорить о том, что эти супрессоры менее эффективны, чем  $S_5$  и  $S_1$ . Ранее нами было показано (Инге-Вечтомов, 1966), что разные полудоминантные гены — супрессоры не комплементарны друг другу в гетерозиготе, т. е. две мутации как бы производят тот же эффект, что и одна (по характеру поведения в гетерозиготе). В таком случае, если мы объединим два полудоминантных супрессора, то они должны дать тот же результат, что один доминантный, например по влиянию на межклеточную комплементацию. Как показано ранее, при действии двух полудоминантных супрессоров результат оказался таким же, как и при действии каждого из них. По-видимому, более правильное предположение о том, что полудоминантные супрессоры иначе осмысливают нонсенс, чем доминантные супрессоры. На это же указывает и то, что эффективность полудоминантной супрессии достаточна для супрессии одних аллелей, несущих нонсенс, но недостаточна для супрессии других аллелей. Видимо, это явление связано скорее с тем, что один и тот же аминокислотный остаток, находясь в одной точке полипептидной цепи, совместим с функцией фермента, а в других точках полипептида этот же аминокислотный остаток «не работает».

Такое объяснение представляется нам более вероятным, чем предположение о том, что мы имеем дело с супрессией двух разных кодонов-нонсенсов, как предполагалось ранее (Инге-Вечтомов а. о.к., 1967). Как уже указывалось, у бактерий и фагов продемонстрировано существование «супрессарируемых» бессмысленных триплетов: УАА и УАГ в и-РНК. При этом супрессоры для УАА являются супрессорами и для УАГ. В то же время некоторые супрессоры подавляют нонсенс УАГ, но не действуют на УАА. В рассматриваемом нами случае хотя и наблюдается различие в специфичности доминантных и полудоминантных суперсупрессоров, тем не менее аллели, не подавляемые  $S_{33}$  и  $\bar{S}_{71}$ , все же несколько изменяют свое проявление под действием этих супрессоров. Это выражается в появлении частично мутантного фенотипа, а также в характере индуцированной комплементации. Следовательно, мы не можем предполагать здесь разницу в кодоновой специфичности доминантных и полудоминантных суперсупрессоров.

Сравнение данных супрессоров указывает на необходимость введения каких-то дополнительных критериев специфичности для описания тех случаев, когда, например, супрессор, действующий на уровне трансляции, изменяет характер считывания кодонов, но тем не менее не супрессирует проявление соответствующей аллели. Для обозначения таких случаев мы и пользуемся понятием кодоновой специфичности. Кодоновая специфичность подразумевает способность супрессора только изменять трансляцию некоторых кодонов. Это понятие не совпадает с понятием аллельной специфичности и специфичности, выражающейся в способности супрессора осмысливать нонсенсы или переосмысливать значения кодонов. Так, супрессоры, действующие через изменение т-РНК, должны обладать узкой кодоновой специфичностью, изменяя трансляцию некоторых кодонов, видимо, в соответствии с «wobbles-гипотезой» Ф. Крика (Срик, 1966). В то же время супрессоры, действу-

шие через изменение рибосом, должны иметь более широкую кодоновую специфичность. Известно, что рибосомная супрессия, являющаяся следствием мутаций генов, контролирующих структуру рибосом, может выражаться в перекодировках, при которых, например, У может читаться как А. Это приводит к изменению трансляции многих кодонов и-РНК. Супрессоры, обладающие широкой кодоновой специфичностью, должны часто индуцировать комплементацию между теми аллелями, которые они не супрессируют.

Исходя из этих положений, интересно рассмотреть результаты, полученные при исследовании рецессивного супрессора  $s_{48}$ . В локусе  $ad_2$  аллельная специфичность этого супрессора не совпадает с его кодоновой специфичностью. По аллельной специфичности  $s_{48}$  не отличается от  $S_1$  и  $S_5$  при действии на этот ген. Данные по влиянию  $s_{48}$  на межаллельную комплементацию показывают, что кодоновая специфичность  $s_{48}$  шире, чем кодоновая специфичность  $S_5$  и  $S_1$ . Об этом мы судим на основании следующих фактов, полученных при сравнении аллельной специфичности и влияния на комплементацию всех трех типов супрессоров.

Полудоминантные супрессоры имеют более узкую аллельную специфичность, чем доминантные (см. табл. 1), т. е.  $\bar{S}$  супрессирует только некоторые из тех аллелей, которые супрессируют  $S$  (№ 120, 128, 148). Аллели, супрессируемые только  $S$  (№ 16, 37, 75, 91, 99, 105, 113, 133, 144, 190, 199, 201), тем не менее в комбинации с  $\bar{S}$  изменяют характер своего проявления. В результате этого в некоторых случаях возникает частично мутантный фенотип, а также оказывается возможной комплементация этих аллелей в тех сочетаниях, где они не комплементировали без супрессора ( $S$ ).

Как показывают данные табл. 3 и 7, все случаи комплементации, индуцированной  $S$  и  $\bar{S}$ , ограничиваются теми сочетаниями, где имеются аллели из числа тех пятнадцати, которые супрессируются доминантными супрессорами. Следовательно, оба типа суперсупрессоров изменяют продукты одних и тех же аллелей, т. е. влияют на трансляцию одних и тех же кодонов. Это, правда, выявляется по двум разным эффектам — полная супрессия под действием  $S$  и частичная супрессия, а также индуцированная комплементация под действием  $\bar{S}$ .

Рецессивный супрессор  $s_{48}$  подавляет фенотипическое проявление указанных пятнадцати аллелей, на которые действуют доминантные и полудоминантные супрессоры, а кроме того, он изменяет характер комплементации некоторых аллелей, проявление которых не изменяется ни под действием  $S$ , ни под действием  $\bar{S}$  (см. табл. 3, 5, 7). Следовательно,  $s_{48}$  изменяет продукты тех аллелей, на которые не влияют  $S$  и  $\bar{S}$ . Таким образом, трансляция некоторых кодонов изменяется под действием  $s$ , но не  $S$  и  $\bar{S}$ . Отсюда мы и делаем вывод о том, что рецессивный суперсупрессор имеет более широкую кодоновую специфичность, нежели доминантные и полудоминантные.

Эти различия могут быть связаны с тем, что некоторые перекодировки, вызываемые  $s_{48}$ , в гаплоиде нивелируются за счет негативной комплементации между супрессированными и несупрессированными субъединицами фермента  $ad_2$ . Это возможно в том случае, если  $s_{48}$  действует с эффективностью много ниже 100%, что обычно характерно для супрессоров, работающих на уровне трансляции (Brenner a. Stretton, 1964). Низкая эффективность должна быть характерным признаком супрессоров, обладающих широкой кодоновой специфичностью, так как значительные перекодировки выразятся в инактивации многих бел-

ков клетки. Одновременно с повышением эффективности супрессии должен возрастать летальный эффект таких перекодировок (Gorini a. Kataja, 1964 b). Интересно, что рецессивные суперсупрессоры, исследуемые нами, резко снижают жизнеспособность несущих их клеток. Так, при гомозиготности по  $s_{48}$  в митотически размножающемся клоне значительная часть клеток (до 85%) оказывается нежизнеспособной. Гаплоиды, несущие рецессивные суперсупрессоры, образуют более мелкие колонии по сравнению с гаплоидами дикого типа. Интересно отметить, что гаплоиды, несущие доминантные суперсупрессоры, не отличаются по скорости роста от гаплоидов дикого типа. Подробные данные, полученные при изучении рецессивных суперсупрессоров, будут опубликованы в отдельном сообщении.

Следует указать и на то, что  $s_{48}$  при действии на локус  $ad_1$  имеет более широкую аллельную специфичность по сравнению с  $S_5$ . Это может быть связано с тем, что фермент, контролируемый геном  $ad_1$ , по-видимому, не имеет четвертичной структуры (в этом локусе не обнаружена межаллельная комплементация), и, таким образом, продукты супрессии имеют большую возможность для фенотипического выражения. Именно супрессируемость многих аллелей локуса  $ad_1$  является причиной того, что мы не обнаружили аллельной специфичности  $s_{48}$  при действии на  $ad_1$  в первоначальных экспериментах и высказали ошибочное предположение о том, что этот супрессор вовсе лишен специфичности по отношению к аллелям  $ad_1$  и якобы открывает альтернативный путь биосинтеза аденина (Инге-Вечтомов, 1964).

В настоящее время мы не можем говорить об уровне действия  $s_{48}$ . Во всяком случае он обладает более широкой кодоновой специфичностью, чем  $S_{25}$ ,  $S_{71}$ ,  $S_1$  и  $S_5$ . При этом необходимо отметить, что  $s_{48}$  индуцировал комплементацию только в тех случаях, когда одна из аллелей несла полярное функциональное повреждение или вовсе не была способна комплементировать без супрессора, хотя и не была подавляемой для всех исследованных нами супрессоров. Возможно, что  $s_{48}$  действует на некоторые аллели, несущие нонсенсы. Эти нонсенсы могут супрессироваться какими-то иными супрессорами. Так, по неопубликованным данным В. Андриановой, мутант № 72 (см. табл. 5), характер комплементации которого изменяет  $s_{48}$ , способен ревертировать к прототрофности за счет рецессивных и доминантных супрессоров. Способность к реверсиям и их природа исследуются в настоящее время для других мутантов, характер комплементации которых изменяет рецессивный супрессор  $s_{48}$ , хотя он и не супрессирует соответствующие аллели  $ad_2$ .

Возникновение супрессоров, имеющих разную кодоновую специфичность, показывает возможные пути эволюционирования системы трансляции генетического кода, которая приводит к различной функциональной «нагрузке» кодонов-синонимов на разных уровнях биологической организации, что было показано в работе М. Ниренберга с соавторами (Marshall a. oth., 1967).

## ВЫВОДЫ

1. Исследованы три типа суперсупрессоров у дрожжей: доминантные, полудоминантные и рецессивные.
2. Аллельная специфичность доминантных супрессоров совпадает со специфичностью рецессивных супрессоров при действии на локус  $ad_2$ . Аллельная специфичность полудоминантных супрессоров уже, чем специфичность доминантных и рецессивных супрессоров.

3. Все три типа суперсупрессоров индуцируют межallelльную комплементацию в локусе  $ad_2$ , при этом рецессивный супрессор эффективен только в гомозиготе, а доминантные и полудоминантные супрессоры эффективны и в гетерозиготе.

4. Все три типа супрессоров подавляют проявление или изменяют характер комплементации только тех аллелей, которые комплементируют полярно или не комплементируют вовсе.

5. Наиболее вероятный механизм действия описанных суперсупрессоров — осмысление бессмысленных кодонов на уровне трансляции.

6. Доминантные супрессоры индуцируют межallelльную комплементацию только в тех сочетаниях аллелей, где по крайней мере одна из аллелей  $ad_2$  является супрессируемой доминантными супрессорами.

Полудоминантные супрессоры индуцируют межallelльную комплементацию только в тех сочетаниях аллелей, где присутствует по крайней мере одна аллель, подавляемая доминантными супрессорами, при этом обе аллели могут быть не подавляемыми под действием полудоминантных супрессоров.

Рецессивные супрессоры индуцируют комплементацию тех аллелей, на которые не действуют все три типа супрессоров, описанных в настоящем сообщении.

7. Сравнение аллельной специфичности супрессоров и их влияния на межallelльную комплементацию позволяет говорить о наличии кодоновой специфичности супрессоров, действующих на уровне трансляции. Доминантные и полудоминантные суперсупрессоры имеют одинаковую или близкую кодоновую специфичность, которая отличается от кодоновой специфичности рецессивного суперсупрессора. Рецессивный суперсупрессор имеет более широкую кодоновую специфичность, чем доминантные и полудоминантные.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Инге-Вецтомов С. Г. 1964. Вестник ЛГУ, 9: 112—117.  
Инге-Вецтомов С. Г. 1965. «Генетика», 2: 22—26.  
Инге-Вецтомов С. Г. 1966. «Генетика», 7: 142—147.  
Хожин С. А. 1967. «Генетика», 7: 1—76.  
Погова И. А., С. Г. Инге-Вецтомов. 1966. Тез. докл. IX международного конгресса по микробиологии в Москве. 48.  
Сойдла Т. Р., С. Г. Инге-Вецтомов, В. В. Симаров. 1967. См. настоящей сборник.  
Ardison D. 1966. J. Mol. Biol., 16, 2: 285—301.  
Beckwith J. R. 1964. Struktur und Funktion des genetischen materials Erwin-Baur-Gedächtnis-Vorlesungen (Acad. Verlag, Berlin). 111: 117—124.  
Benzer S. a. S. Champre. 1962. Proc. Nat. Acad. Sci. N. Y., 48, 7: 1114—1121.  
Brenner S., L. Varnei, E. R. Katz. 1967. «Nature», 213, 5075: 449—450.  
Brenner S. a. A. O. Stretton. 1964. J. Cell. a. Comp. Physiol., suppl. 1, 64, 2: 43—49.  
Brenner S., A. O. Stretton a. S. Kaplan. 1965. «Nature», 206, 4988: 994—998.  
Carpicchi M. R. a. G. N. Gussin. 1965. «Science», 49, 3682: 417—422.  
Carbon J., P. Berg a. Ch. Yanofsky. 1966. Proc. Nat. Acad. Sci. N. Y., 56, 2: 764—771.  
Crick F. 1966. J. Mol. Biol., 19, 2: 548—555.  
Davies J., W. Gilbert a. L. Gorini. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. N. Y., 51, 5: 883—896.  
Fincham J. R. S. 1966. Genetic Complementation. Amsterdam.  
Gillmore R. a. R. K. Mortimer. 1966. J. Mol. Biol., 20, 2: 307—312.  
Garen A. a. O. Siddiqui. 1962. Proc. Nat. Acad. Sci. N. Y., 48, 7: 1121—1127.  
Gorini L. a. E. Kataja. 1964a. Proc. Nat. Acad. Sci. N. Y., 51, 3: 487—493.  
Gorini L. a. E. Kataja. 1964b. Proc. Nat. Acad. Sci. N. Y., 51, 6: 995—1001.  
Grest J. R. a. Ch. Yanofsky. 1965. J. Mol. Biol., 19, 2: 703—804.  
Gupta N. K. a. H. G. Khorana. 1966. Proc. Nat. Acad. Sci. N. Y., 53, 12: 2303—2308.

- Hawthorne D. a. R. K. Mortimer. 1963. «Genetics», 48, 4: 618—620.  
 Inge-Vechtomov S. G., B. V. Simarov, T. R. Soidla, S. A. Kozin.  
 1966. Zs. Vererbungslehre, 98, 4: 375—384.  
 Inge-Vechtomov S. G., B. V. Simarov, T. R. Soidla. 1967. Proc. II Intern.  
 Symp. on Yeast. Bratislava (in press).  
 Lengyel P. 1966. J. Gener. Physiol., 49, 6, 2: 305—330.  
 Manney T. 1964. «Genetics», 50, 1: 109—121.  
 Marshall R. E., C. T. Caskey, M. Nirenberg. 1967. «Science», 155, 3764:  
 820—826.  
 Morgan A. R., R. D. Wells, H. G. Khorana. 1966. Proc. Nat. Acad. Sci. N. Y.,  
 56, 6: 1899—1906.  
 Rifkin D. B., M. R. Rifkin, W. Konigsberg. 1966. Proc. Nat. Acad. Sci.  
 N. Y., 55, 3: 586—592.  
 Weigert B. a. A. Garen. 1965. «Nature», 206, 4988: 992—994.  
 Yanofsky Ch. 1963. Symp. on Informational Macromolecules. A. P. N. Y.: 195—204.

## МЕЖАЛЛЕЛЬНАЯ КОМПЛЕМЕНТАЦИЯ В ЛОКУСЕ *AD<sub>2</sub>* У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*\*

Т. Р. Сойдла, С. Г. Инге-Вечтомова, Б. В. Симаров

Бурное развитие классической генетики обязано всеобщности и непреложности некоторых простых биологических закономерностей, установленных Г. Менделем. Современное развитие и дальнейшие успехи молекулярной генетики, для которой характерна конкретизация основных понятий классической генетики, также определяется выявлением некоторых элементарных и основных закономерностей хранения, передачи и реализации генетической информации. Ряд представлений, опирающихся на эти закономерности, взят на вооружение современной биологией: например, представление о сложной линейной структуре гена и основных свойствах генетического кода; о роли генов в синтезе белков, о коллинеарности структуры гена и контролируемой им полипептидной цепи, об определяющей роли первичной структуры белка в формировании вторичной, третичной и четвертичной структур, которые в конечном счете определяют активность фермента, и т. д. Представление о некоторых простых закономерностях формируется в настоящее время. Так, пристальное внимание биологов привлекает вопрос о связи четвертичной (субъединичной) структуры и строения отдельных субъединиц фермента. Одним из методов решения этой проблемы является применение генетического анализа и, в частности, исследование явления межallelельной комплементации, чему и посвящается настоящее сообщение.

Межаллельной комплементацией называется частичное (или полное) восстановление дикого фенотипа в первом поколении, полученном от скрещивания двух мутантов, несущих изменения в одном и том же гене (Giles a. oth., 1957; Fincham a. Pateman, 1957). Данное явление воспроизведено *in vitro*. При этом было доказано, что механизм его следует искать на уровне взаимодействия мутантных белков (Woodward, 1959; Schlesinger a. Levinthal, 1963; Fincham a. Coddington, 1963). Более того, было выдвинуто предположение о том, что межallelельная комплементация является результатом объединения по-разному мутантных субъединиц в молекуле-мультимере. При этом мутантные субъединицы в мультимере, являющиеся продуктами двух раз-

\* Авторы этой и предыдущей статей благодарят С. А. Кожина за помощь в работе, Н. Н. Хромова-Борисова за участие в обсуждении полученных результатов и Н. И. Инге-Вечтомова за помощь в оформлении рукописи.