

- 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 *AD₂* У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

Т. Р. Сойдла, С. Г. Инге-Вечтомов, 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-Вечтому за помощь в оформлении рукописи.

ных аллелей одного гена (идентичные субъединицы), при объединении испытывают взаимное влияние, иногда приводящее к «испразлению» мутационных дефектов на уровне четвертичной структуры фермента (Catcheside a. Overton, 1958; Brenner, 1959; Fincham, 1960). Это предположение было окончательно доказано в экспериментах с использованием меченых атомов (Coddington a. Fincham, 1965; Fan a. oth., 1966) и ныне является общепринятой теорией. Таким образом, обнаружение межаллельной комплементации для какого-либо гена является доказательством того, что в структуру соответствующего фермента входят идентичные субъединицы (см. обзор: Schlesinger a. Levinthal, 1965).

Межаллельная комплементация выявляется при попарных скрещиваниях независимо возможных мутантов по одному и тому же гену (желательно во всех возможных сочетаниях). При этом оказывается, что восстановление дикого фенотипа наблюдается только в некоторых скрещиваниях. Комплементарность или некомплементарность двух аллелей одного гена в данных условиях проведения эксперимента и на фоне данного генотипа является их константной характеристикой (Павленко, Сойдла, 1967; Сойдла, Инге-Вечтомоз, 1966; Inge-Vechtomoa a. oth., 1966). Наиболее распространенным способом документирования результатов теста на межаллельную комплементацию является построение карт комплементации. Для этого используют следующие правила: мутации (тонкие, соответствующие им функциональные повреждения) изображают в виде непрерывных отрезков прямой. Некомплементарность двух аллелей обозначают перекрывающимся проекций соответствующих отрезков, а комплементарность — неперекрывающимся отрезков прямой. Так как каждая линия описывает характер комплементации одной из нескольких сходных по своему поведению аллелей, то эти линии называют группами или типами комплементации. Если спроектировать концы групп комплементации на одну прямую, то получатся единицы комплементации или комплексы. Карты строят таким образом, чтобы число единиц комплементации было минимальным и все единицы имели равную длину. Количество комплексов и групп комплементации не отражает структурной и функциональной делимости гена и в общем зависит от количества скрещиваний, сделанных с использованием гетероаллельных мутантов. Характер карты комплементации скорее отражает характер взаимодействия субъединиц в ферментной молекуле, нежели функциональную делимость гена.

При построении достаточно подробных карт комплементации приходится в ряде случаев отступать от правил, изложенных ранее. Так, характер взаимодействия некоторых аллелей иногда не удается изобразить непрерывными отрезками прямой. Приходится соответствующие группы комплементации изображать несколькими отрезками. Такие случаи, не укладывающиеся в обычную линейную карту, называют отклонениями от линейности. Многие авторы пытались придавать своим картам комплементации форму круга или иные, порой замысловатые, формы с тем, чтобы не отступать от правила «одна аллель — один отрезок прямой». Однако и в эти карты не всегда удавалось «втиснуть» все встречающиеся типы комплементации. Как правило, характер «свертывания» карты не дает никакой дополнительной информации и самими авторами в дальнейшем не используется (Dorfman, 1964; Leupold a. Gutz, 1964; Woods a. Bevan, 1966; Gillie, 1966). Более полезной является линейная форма карты, построенная по возможности с наименьшим числом разрывов (отклонений от линейности).

При сопоставлении карты комплементации с генетической, т. е. с рекомбинационной, картой того же гена в ряде случаев обнаружена тенденция к коллинеарности (Fincham, 1966). Мутации, расположенные

в близких сайтах, как правило, некомплементарны друг другу. Расположение мутаций на рекомбинационной карте гена в общем совпадает с расположением соответствующих функциональных повреждений на карте комплементации. Подобное сравнение карт затрудняется тем, что приходится сопоставлять порядок точек (генетическая карта) и порядок отрезков (карта комплементации). Естественно, что для сравнения следует пользоваться мутациями, входящими в короткие группы комплементации. Наряду с общей тенденцией известно и значительное число исключений из коллинеарности рекомбинационных и комплементационных карт.

Более или менее хорошо разработанная теория межallelной комплементации была опубликована Ф. Криком и Л. Орджелом (Crick and Ogel, 1964). Мы изложим основные ее положения в интерпретации Дж. Финчема (Fincham, 1966), пользовавшегося некоторыми устными разъяснениями Крика. Следует отметить, что многие положения этой теории ранее были сформулированы А. Капулером и Г. Бернштейном (Kapuler and Bernstein, 1963).

Основываясь на общих свойствах карт комплементации, на сравнении карт комплементации с генетическими картами, а также на общих свойствах белковых молекул, Ф. Крик и Л. Орджел выдвинули следующую гипотезу.

Мутации, как правило, приводят через аминокислотные замены к изменению конформации белка. Изменение конформации сопровождается более или менее полной потерей активности белка. Если изменений конформации нет или если изменения конформации не приводят к изменению активности белка, то соответствующие мутации не проявляются фенотипически, а мутанты такого типа не регистрируются в эксперименте.

Если мутации блокируют трансляцию гена, что препятствует образованию полипептидной цепи, или выражаются в таком изменении структуры субъединиц, что они не могут объединяться в мультимер, то такие мутации оказываются некомплементирующими, т. е. аллели, несущие эти мутации, оказываются неспособными восстанавливать дикий или близкий к нему фенотип в комбинации с любыми другими аллелями данного гена.

Третья структура субъединиц фермента, видимо, достаточно жестко закреплена естественным отбором. Вновь возникающие мутации, вероятно, лишь локально нарушают эту структуру. Конформация мутантных субъединиц оказывается детерминированной менее строго. Благодаря этому локальные изменения конформации одной субъединицы могут исправляться под воздействием неспорченных участков другой субъединицы (или других субъединиц), с которыми они образуют связи при объединении в мультимере.

При объединении субъединиц (рис. 1) могут соприкоснуться как негомологичные (B), так и гомологичные (A_1, A_2, A_3, A_4, A_5) участки полипептидных цепей, образующих идентичные субъединицы. Необходимо отметить, что последний тип взаимодействия возможен только вблизи оси симметрии молекулы. По-видимому, мутации, затрагивающие эти гомологичные участки, и дают большинство положительных результатов в опытах по межallelной комплементации, определяя тем самым форму карты. Мутации, приводящие к аминокислотным заменам в участках $A_1 - A_5$, могут оказываться вообще не комплементируемыми по тем или иным причинам. Если же мутант, например по участку A_1 , способен к межallelной комплементации, это значит, что повреждение A_1 не мешает взаимодействовать в сочетании с другой субъединицей, имеющей поврежденный участок A_1 , и при этом может быть по-

поврежденной в любом другом участке. То же можно сказать и об участках A_2, A_3, A_4, A_5 .

Иначе говоря, комплементарность или некомплементарность двух аллелей определяется соответственно неперекрыванием или перекрыванием повреждений третичной структуры взаимодействующих субъединиц фермента. Это, конечно, относится только к комплементирующим аллелям.

В том случае, если мутации затрагивают те участки полипептидной цепи, которые в мультимере взаимодействуют с негомологичными им участками другой субъединицы (участок B на рис. 1), может происходить «самоисправление» мутационного дефекта на уровне гаплоида или в гомозиготе. Это возможно вследствие того, что измененный участок B окажется против негомологичного нормального участка. Следовательно, такие мутации не будут иметь фенотипического проявления или в лучшем случае будут обнаруживаться как частичные (*leaky*) мутанты, если самоисправление будет неполным. С другой стороны, если мутация по участку B не исправится под воздействием иного, негомологичного ему участка, с которым он соседствует в мультимере, то такая мутация попадает в группу некомплементирующих. Можно, правда, предположить, что мутация B могла бы исправляться в сочетании с мутацией по находящемуся рядом негомологичному участку второй субъединицы. Отвергнуть такое взаимодействие не представляется возможным, однако оно не может быть основой механизма межаллельной комплементации, поскольку при этом должны были бы возникать отклонения от линейности в картах комплементации на первых этапах построения, когда испытаны единичные мутанты (см.: Stick a. Orgei, 1964). Для большинства локусов, исследованных у различных организмов, этого не наблюдается. Исключение составляет ген *pxh-1* у *Neurospora crassa* (Radford, 1966).

Таким образом, основной механизм межаллельной комплементации заключается скорее в том, что «хорошее исправляет плохое», правда, не полностью, нежели в том, что «два черных дают белое». Исправление субъединиц происходит в тех участках, где сочетаются гомологичные мутантная и немутантная части полипептидных цепей.

Механизм, рассмотренный Ф. Криком и Л. Орджелом, объясняет отклонения к колинеарности карт комплементации и рекомбинационных карт, а также дает возможное объяснение отклонений от колинеарности. Действительно, если мутации на карте гена расположены друг от друга, то, учитывая колинеарность гена и полипептидной цепи (Yanofsky a. oth., 1964), следует ожидать, что изменены при удаленные друг от друга участки полипептидной цепи (на-

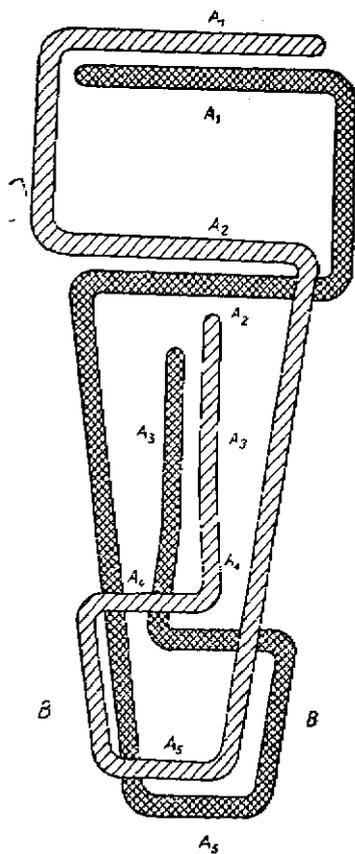


Рис. 1. Гипотетическая модель фермента, состоящего из двух субъединиц (Fincham, 1966). Пояснения в тексте.

пример, A_1 и A_5 на рис. 1), и тогда эти мутации будут комплементарны друг другу. Если одна мутация затрагивает несколько участков цепи, то ожидается, например, что некоторые мутации, имеющие аминокислотные замены в A_1 , будут изменять и конформацию соседнего участка A_2 и, таким образом, окажутся некомплементарными мутациям, приводящим к аминокислотным заменам в A_2 . Так же можно представить себе взаимоотношение между соседними участками A_3 , A_4 и A_5 . В то же время участки A_3 и A_4 , по-видимому, испытывают влияние изменений в участке A_2 , так как благодаря поворотам полипептидной цепи эти участки сближены. Исходя из этого, следует ожидать отклонения от коллинеарности карт (рекомбинационной и комплементации), предлагаемых нами для рассматриваемого гипотетического фермента.

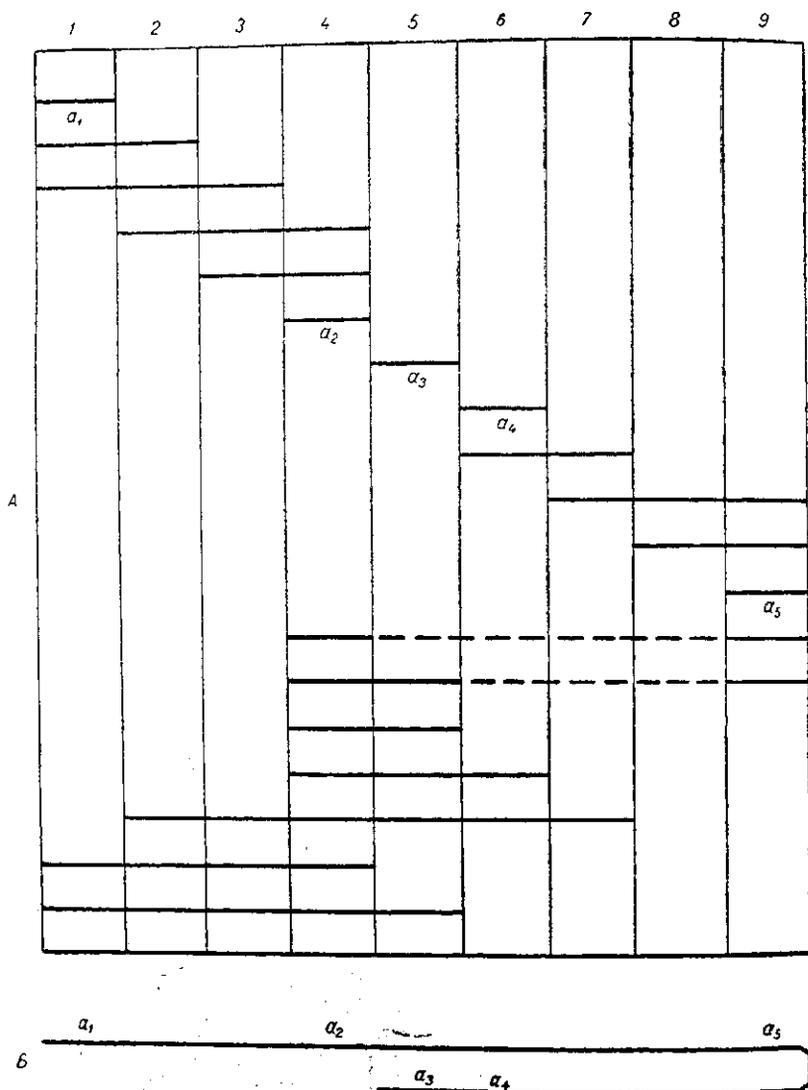


Рис. 2. Карты локуса, контролирующего структуру фермента, изображенного на рис. 1 (локус *Fic*).

A — одна из вероятных карт комплементации локуса *Fic*; $a_1 - a_5$ — мутации, приводящие к изменениям в участках $A_1 - A_5$ молекулы фермента. B — генетическая карта локуса *Fic* (однозначно определенная структурой на рис. 1 в силу коллинеарности гена и полипептидной цепи), свернутая таким образом, чтобы привести в соответствие порядок мутаций на обеих картах.

Изложенные здесь рассуждения можно проиллюстрировать, рассматривая гипотетическую карту комплементации и карту рекомбинации локуса *FiC* (фиктивного локуса Финчема-Крика), контролирующего рассматриваемый белок (рис. 1). Обе карты представлены на рис. 2. Мутации a_1 — a_5 на генетической карте соответственно приводят к аминокислотным заменам в участках полипептидной цепи A_1 — A_5 . Генетическую карту мы сложили, следуя некоторым авторам (Karuler a. Bernstein, 1963; Catcheside, 1964; Bernstein a. oth., 1965) так, чтобы привести в соответствие расположение мутаций на обеих картах. Интересно отметить, что такое складывание карты рекомбинации в общем правильно отражает общий ход полипептидной цепи по отношению к оси симметрии молекулы. Сопоставление карт, таким образом, может дать общее представление о третичной структуре белковой субъединицы.

Нам хотелось бы отметить два положения, которые следуют из теории Ф. Крика и Л. Орджела.

1. Для локусов, контролирующих мультимерные ферменты, должны существовать «вторичные» (по проявлению) частичные мутанты, фенотип которых обусловлен неполным самоисправлением некоторых мутаций (как, например, в участке *B* на рис. 1). Под термином «самоисправление» подразумевается способность идентичных субъединиц, несущих совершенно одинаковые изменения, образовать активную молекулу мультимера. Очевидно, что такого рода частичные мутанты не могут появиться при изменении генов, контролирующих белки, лишенные четвертичной структуры.

2. На картах комплементации и на генетических картах должны существовать «горячие» участки мутаций, приводящих к частично мутантному фенотипу. Так, в гипотетическом локусе *FiC* следует ожидать, что частичные мутанты должны чаще картироваться в участке гена, соответствующем участку *B* полипептидов (рис. 1).

При этом, учитывая, что конформационные повреждения участка *B* могут распространяться на смежные участки и если такие косвенные нарушения не доступны самонсправлению, можно ожидать на картах комплементации в районе «горячего» пятна (мутаций с частичным проявлением) частые отклонения от линейности в связи с тем, что исправление таких косвенных (распространившихся) нарушений и будет основным механизмом комплементации «вторичных» частичных мутантов.

В настоящем сообщении представлены данные о межаллельной комплементации в локусе ad_2 у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.^{*} Полученные результаты обсуждаются в свете теории Ф. Крика и Л. Орджела. Межаллельная комплементация в локусе ad_2 у *S. cerevisiae* исследуется также Р. Вудсом и Е. Бивеном (Bevan a. Woods, 1962; Woods a. Bevan, 1966).

В работе использованы штаммы *S. cerevisiae*, принадлежащие к Петергофским генетическим линиям дрожжей (Инге-Вечтомов, 1963), в частности 156 мутантов по локусу ad_2 и 4 мутанта по локусу ad_1 , относящиеся к типу спаривания *a*. Мутанты получены под действием ультрафиолетовых и рентгеновых лучей, а также азотистой кислоты на прототрофный гаплоид 15В-П4 (Инге-Вечтомов, Кожин, 1964; Райпулис и Кожин, 1966). В опыты включались 54 мутанта, вызванные ультрафиолетовыми, 50 — рентгеновыми лучами, 51 — азотистой кислотой и 1 — формальдегидом.

* Предварительные данные опубликованы ранее (Сойдла, 1965).

Гаплоиды 41Г-П142 и 18А-П158, имеющие соответственно генотипы $\alpha\text{-}rgh_{1-1}S_5$ и αrgh_{1-1} , где α — тип спаривания, S_5 — доминантный супрессор, который подавляет проявление мутации rgh_{1-1} , приводящей к изменению формы колонки (морщинистость). Эти гаплоиды использованы в скрещиваниях с мутантами $a ad_2$ для того, чтобы каждая мутация могла быть получена в комбинации с типом спаривания α . При скрещивании мутантов с 41Г-П142 отбирались только морщинистые гаплоиды, которые заведомо не несут супрессора S_5 .

Скрещивание в тесте на межallelную комплементацию производилось методом отпечатков на минимальной среде. На каждую чашку с минимальной средой делали отпечатки с полной среды, на которой исследуемые гаплоиды были посеяны параллельными штрихами. Отпечатки делали таким образом, чтобы на минимальной среде штрихи скрещивались под прямым углом (Сойдла, 1965). Этот метод дает возможность наблюдать за ростом гибрида, сравнивая его с обоими родителями. Данный метод отличается от метода Р. Вудса и Е. Бивена (Woods и Bevan, 1966), которые отпечатывали штрихи нескольких мутантов на минимальную среду, засеянную газом одной мутантеской культуры.

Вследствие того, что на межallelную комплементацию в локусе ad_2 влияют гены-модификаторы (Сойдла и Кинг-Вечтомов, 1966), каждую комбинацию аллелей испытывали в нескольких скрещиваниях: один и тот же мутант типа спаривания a скрещивали с несколькими (от 4 до 6) гаплоидами типа спаривания α , изоallelных по мутации локуса ad_2 . Такие изоallelные по ad_2 культуры могли быть изолированы в расщеплении гибрида от скрещивания данного мутанта $a ad_2$ например с гаплоидом 41Г-П142. Если хотя бы одна из изоallelных по ad_2 культур комплементировала в определенной комбинации аллелей, то на карте отмечалась комплементарность. Каждое скрещивание исследовано не менее чем в двух повторностях опыта. Культуры выращивались при 30°. Состав сред описан в предыдущих сообщениях (Инге-Вечтомов, 1963). Результаты теста на комплементацию учитывались на 20-й день.

На основе исследования 54×150 сочетаний аллелей в гетерозиготе составлен матрикс комплементации локуса ad_2 (рис. 3). Данные матрикса позволили построить карту комплементации локуса ad_2 (рис. 4), имеющую 36 единиц и 79 групп комплементации. Имеются исключения, которые не удалось изобразить на карте комплементации обычным способом. Некоторые аллели, изображенные на карте как некомплементарные (их функциональные повреждения перекрываются), тем не менее способны комплементировать друг с другом. Такая «исключительная» комплементация изображена на карте следующим образом: если аллель x исключительно комплементарна аллели y , то это показано в скобках рядом с номером x : $x(y^+)$. При этом исключительная комплементарность показана рядом с номером той аллели, которая имеет большее функциональное повреждение. Аналогично показана и исключительная некомплементарность $x(y^-)$, т. е. тот случай, когда две аллели некомплементарны, хотя их функциональные повреждения изображены на карте перекрывающимися. Положение мутационного дефекта таких аллелей по отношению к дефектам других аллелей, т. е. место мутации на карте комплементации, определено таким образом, чтобы число исключительных комплементарностей или некомплементарностей на карте было минимальным. Если учесть все исключения, внесенные в карту, то число групп комплементации возрастает до 91. Соответствующее число единиц комплементации можно определить (Giffie, 1966) по формуле: число групп комплементации, так же как

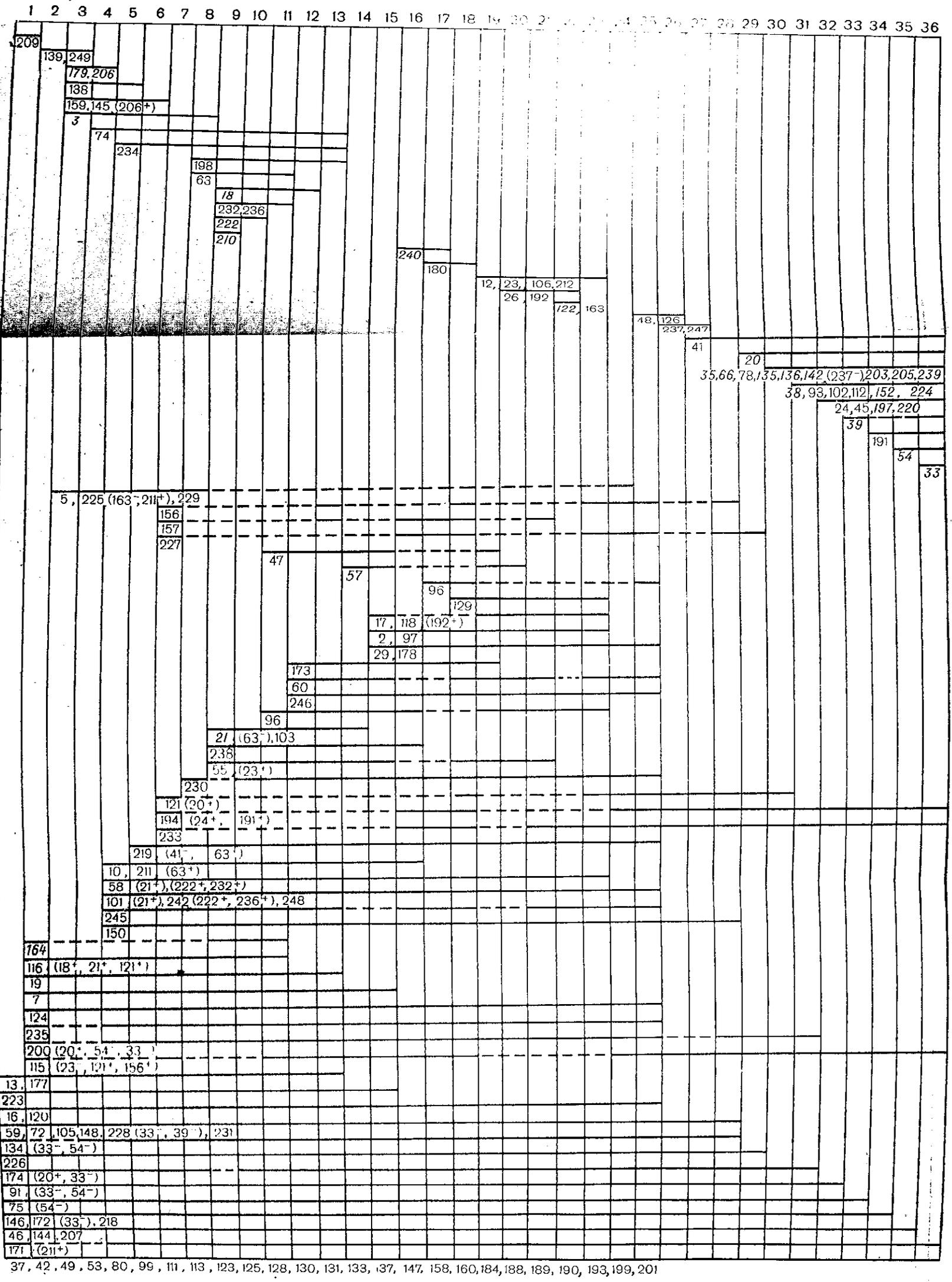


Рис. 4. Карта комплементации локуса ad_2 .

Каждая линия на карте изображает мутацию или группу мутаций (кодовые номера соответствующих мутаций указаны под линиями). Некомплементарность обозначается перекрыванием проекций этих линий. Пунктиром показаны разрывы в группах комплементации. Это введено для удобства чтения карты, чтобы не изображать некоторые мутации в виде несвязанных отрезков. Перекрывание пунктира какой-либо группой не указывает на некомплементарность соответствующих аллелей. В скобках указаны исключительная комплементарность (+) или исключительная некомплементарность (-), которые мы затруднились изображать в виде разрывов на карте. Номера частичных мутантов выделены курсивом.

не было сделано попыток изобразить карту иначе, чем в линейной форме.

38 групп комплементации из общего числа (91) — не линейны (42%), т. е. изображены с разрывом. В правой верхней части карты имеется «горячее» пятно, где расположены функциональные повреждения частичных мутантов. Номера этих мутантов выделены курсивом. Подобное «горячее» пятно есть и на карте комплементации, построенной для этого локуса Р. Вудсом и Е. Бивеном (Woods a. Bevan, 1966), а также в карте, построенной Ф. де Серресом (De Serres, 1966) для локуса *ad-3B Neurospora crassa*. Этот ген у *N. crassa* контролирует тот же этап биосинтеза пуринов, что и локус *ad₂* у *Saccharomyces cerevisiae*. К сожалению, частичные мутанты не исследованы при построении карты комплементации для аналогичного гена *ad₆* у *Schizosaccharomyces pombe* (Leupold a. Gutz, 1964).

Эти данные интересны в свете выводов из теории Ф. Крика и Л. Орджела. Во-первых, мы действительно обнаружили горячее пятно мутаций, имеющих частичное проявление. Во-вторых, косвенно можно доказать существование вторичных по проявлению частичных мутаций в локусе *ad₂*. А именно: мутационная система *ad₁-ad₂* представляет уникальные возможности для сравнения частоты появления частичных мутантов по локусу, контролирующему мультимерный (*ad₂*) и мономерный (*ad₁*) белки. Благодаря тому, что мутации по *ad₂* и *ad₁* имеют одинаковое фенотипическое проявление (а именно обуславливают потребность в аденине, сопровождающуюся накоплением красного пигмента), выделение мутантов можно проводить на полной среде по накоплению пигмента, независимо от степени выраженности потребности в аденине. В локусе *ad₂* чаще обнаруживаются мутации, имеющие частичное проявление, чем в локусе *ad₁* (Кожин, 1967). Аналогичные данные получены Ф. де Серресом для локусов *ad-3B* и *ad-3A* у *Neurospora crassa* и Льюпольдом для генов *ad₆* и *ad₇* у *Schizosaccharomyces pombe*, как нам сообщил д-р Н. Лоприно. Отсутствие четвертичной структуры у белка, контролируемого генами *ad₁* *Saccharomyces cerevisiae*, *ad₇* *Schizosaccharomyces pombe* и *ad-3A Neurospora crassa*, подтверждается отсутствием межэпителиальной комплементации в этих локусах. Кроме того, следует отметить сложный характер комплементации в группе частичных мутантов локуса *ad₂*.

Из теории Крика—Орджела следует, что длина линии на карте комплементации должна отражать степень повреждения белка вследствие мутаций. На представленной карте изображены мутации, имеющие как полное, так и частичное проявление. По-видимому, неполное проявление мутации должно соответствовать меньшему повреждению в белке, чем полное проявление. Действительно, видно, что мутации с частичным проявлением перекрывают не более 8 клонов на карте, в то время как мутации с полным проявлением, способные комплементировать, перекрывают до 35 клонов. Среди некомплементирующих мутаций нет ни одной с частичным проявлением. Сходные результаты были получены Р. Вудсом, Е. Бивеном и Ф. де Серресом. Все это косвенно доказывает справедливость теории Крика—Орджела и, в частности, то, что длина линии на карте комплементации отражает степень нарушения третичной структуры молекулы мутантного белка.

Из всех исследованных нами мутантов 25 отнесены к некомплементирующим (16% всех мутаций). Эти мутанты определяют принадлежность всех остальных (131) мутантов к гену *ad₂*.

На карте имеется несколько групп, комплементирующих полярно. Всего 21 мутация. Эти группы комплементации начинаются в различных клонах правой части карты и продолжаются до левой границы

карты. У правой границы карты таких групп комплементации нет. Можно считать, что эти группы комплементации составляют мутации типа «сдвиг считывания» или мутации-нонсенсы. Причем нонсенсы могут возникнуть как при мутации какого-либо значащего кодона, так и появиться вследствие мутации «сдвиг считывания» в некотором удалении от сайта вставки или выпадения нуклеотидов. В случае появления в гене нонсенса под контролем соответствующей аллели синтезируется лишь фрагмент полипептидной цепи. В результате сдвига считывания, не сопровождающегося появлением кодона-нонсенса, оказывается измененным аминокислотный состав части белка. В обоих случаях портятся только те участки полипептидной цепи, которые расположены дистально от точки мутации по отношению к направлению трансляции гена. Если возникающие при этом субъединицы или их фрагменты сохраняют способность образовывать мультимер в комбинации с субъединицами, несущими мутации иного типа, то указанные особенности мутантов должны выявиться в тесте на комплементацию именно в форме полярности соответствующих групп.

Предложенное объяснение представляется вероятным, так как именно среди аллелей, комплементирующих полярно (а также среди не комплементирующих вовсе), были обнаружены аллели, проявление которых подавляется в присутствии доминантных суперрепрессоров (Manney, 1964; De Serres, 1964; Inge-Vechterov et al., 1966). В таком случае, пользуясь нашей картой комплементации, можно предварительно определить направление трансляции гена ad_2 справа налево, от «горячего» пятна частичных мутантов в сторону мутации 209, крайней слева. Окончательный вывод о характере трансляции гена ad_2 может быть сделан после сопоставления карты комплементации ad_2 с рекомбинационной картой того же гена. Эта работа проводится в настоящее время. В нашем распоряжении имеются ограниченные по объему данные о картировании мутаций ad_2 . Так, путем использования мейотического кроссинговера были картированы три сайта в этом локусе: 47, 48, 24 (Райпулис и др., 1966). Расположение этих трех мутаций на карте гена и порядок их функциональных повреждений на карте комплементации совпадают.

Полярные группы нанесены на карту Р. Вудса и Е. Бивена (Woods a. Bevan, 1966). По данным этих авторов, можно также определить направление трансляции от «горячего» пятна частичных мутантов. Точно так же и в локусе $ad-3B$ считывание направлено от крайнего «горячего» пятна частичных мутантов. В локусе $ad-3B$ наблюдается четкая полярность ряда групп комплементации (De Serres, 1966). Сопоставление данных по комплементации говорит о близкой гомологии этих аналогичных генов. В локусе ad_6 у *Sch. pombe* не обнаружено четкой полярности (Leupold a. Gutz, 1964).

Для дальнейших рассуждений следует отметить, что на подробной карте комплементации локуса ad_2 трудно оценивать длину функциональных повреждений, так как: 1) часть исключений вынесена в скобки и не отражается на числе комплонов и 2) сами комплоны на карте явно неравноценны. Например, на нашей карте (рис. 4) в комплоне 1 существует мутация 209, перекрывающая только данный комплон, значит, он соответствует какому-то реальному участку в белке. Комплон 24, наоборот, существует на карте только для того, чтобы показывать характер взаимодействия мутации 5, 225 и 229 с мутацией 246. Еще яснее это видно на карте локуса FiC (см. рис. 2), где комплоны 2, 3, 7 и 8 отражают характер взаимодействия между мутациями в участках A_1-A_6 , комплоны 1, 4, 5, 6, 9 соответствуют самим участкам A_1, A_2, A_3, A_4, A_5 .

Независимо от конкретной интерпретации данных по комплементации очевидно, что тест на комплементацию выявляет не больше различных участков в белке, чем имеется мутаций, которые комплементарны между собой во всех возможных сочетаниях, как мы это показывали при обсуждении карты комплементации гипотетического локуса *FiC*.

Для выявления подобных участков реальных единиц измерения на карте комплементации была проделана следующая формальная процедура: из всех мутаций, внесенных в карту комплементации, выбирались все возможные наборы, содержащие максимальное число мутаций, комплементарных между собой. Из этих наборов был выбран набор, содержащий мутации, имеющие самые короткие повреждения (у длинного повреждения больше шансов покрывать два разных участка). Если повреждения имели более или менее одинаковую длину (различий не было или они касались одной — двух мутаций), выбор был продиктован удобством мутации для дальнейшей работы.

Этим самым были получены маркеры для всех участков в белке, различимых на данной карте. Таким образом, вся карта была разделена на единицы, реально отражающие взаимоотношения между некоторыми определенными мутациями ad_2 . Эти единицы мы условно назвали веронами (от латинского «veritas»), или истинными, реальными, единицами, выявляемыми на карте комплементации.

В дальнейшем мы пользовались правилом, которого придерживались при выборе истинных комплонов, — правилом, содержащимся в самом понятии верона, а именно — что все остальные мутации на карте должны быть некомплементарны хотя бы одному из этих маркеров. Поэтому мы изобразили маркеры в виде тестеров, с которыми скрещены все остальные мутации по гену ad_2 , и составили новую карту комплементации, где изображена комплементация всех мутаций по локусу ad_2 с этими тестерами — маркерами веронов. Это позволяет отвлекаться от взаимоотношений самих мутаций, входящих в вероны и перекрывающих их (кстати, если бы мы пытались изобразить эти взаимоотношения, получилась бы снова наша исходная карта (рис. 4)). Мы полагаем, что тем самым мы отвлекаемся от второстепенной детализации, оставляя основное — перекрывание или неперекрывание мутациями различных нами реальных участков на карте, а, возможно, и в белке, контролируемом ad_2 . При такого рода упрощении карты комплементации можно опасаться некоторых искажений реального взаимоотношения различных участков при исключительной комплементарности двух мутаций, возникающей вследствие исправления мутантной части одной субъединицы под воздействием тоже мутантной части другой субъединицы. Чтобы избавиться от эффекта такой исключительной комплементации, мы приняли следующее правило: если при разработке веронной карты два верона окажутся перекрытыми группой комплементации, распространяющейся только на эти два верона, а эта группа окажется более многочисленной, чем в сумме количество мутаций, перекрывающих только каждый из веронов, то рассматриваемые вероны следует объединить в один. Таким образом была построена карта, представленная на рис. 5. Эта карта нуждается в некоторых комментариях.

1. На веронной карте изображена мутация 6 (VI верон), которой не было на карте рис. 4. Соответствующий мутант накапливает незначительное количество пигмента и хорошо растет на минимальной среде. Трудно было отнести его к какой-либо группе комплементации рис. 4, однако при испытании с тестерами для разных веронов четкая комплементация была получена со всеми из них, кроме тестера для верона VI.

2. Верон V, хотя и соответствует по определению одному участку, тем не менее разделен надвое в соответствии с картой рис. 4. При всех

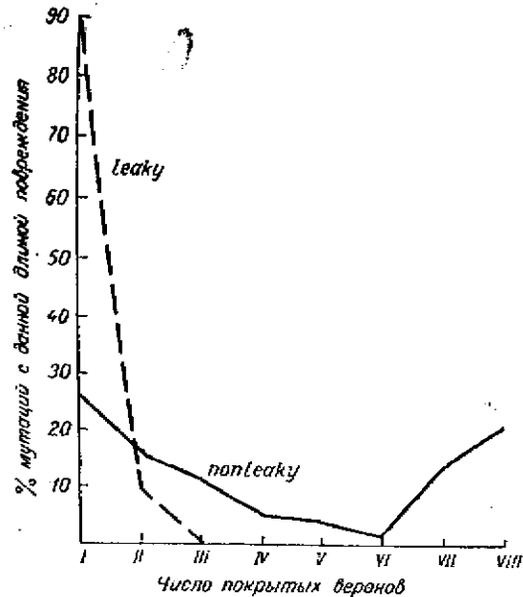


Рис. 6. Длина групп комплементации, соответствующих: *leaky*-мутациям (с неполным проявлением), *nonleaky*-мутациям (с полным проявлением), выраженная в числе верон.

Число мутаций, имеющих данную длину функционального повреждения, дано в % к общему числу мутаций этого типа (с частичным или с полным проявлением).

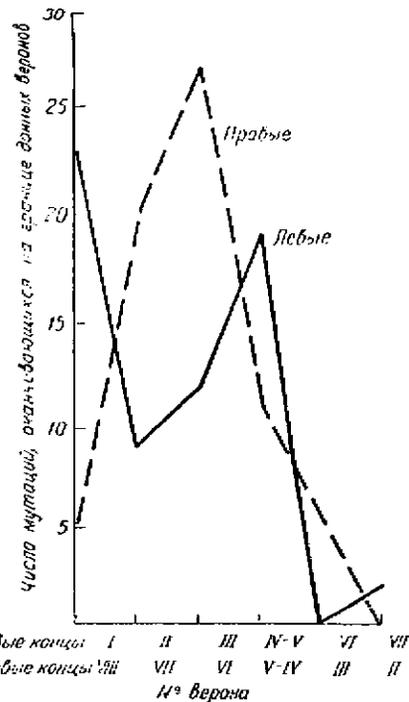


Рис. 7. Распределение левых и правых концов групп комплементации на веронной карте.

Для удобства сравнения левых и правых концов карты совмещены на графике.

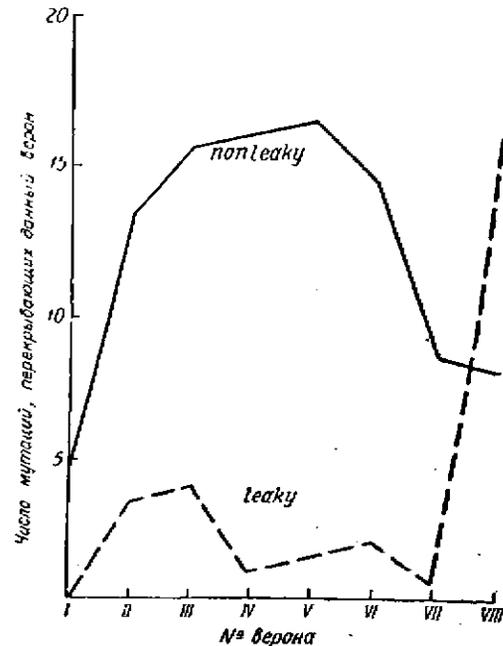


Рис. 8. Распределение функциональных повреждений *leaky*-мутаций (с частичным проявлением), *nonleaky*-мутаций (с полным проявлением) по веронной карте.

Если мутация перекрывает n верон, считается, что на каждый из перекрываемых верон приходится по $1/n$ данной мутации.

подсчетах он считается за один верон. Разделение V верона можно оправдать сложной геометрией белка, однако этот верон может быть и искусственным, так как комплементация между мутациями IV и V веронов очень слаба.

3. Тестером VIII верона является мутация 33. Однако мы взяли в качестве тестеров для этого верона еще две мутации, входящие в этот верон. Это было сделано для того, чтобы отделить друг от друга длинные полярные группы, оканчивающиеся в вероне VIII от все некомплементирующих мутаций. Таким образом, мы здесь несколько отступили от принятого нами правила и считали неспособными к комплементации (т. е. захватывающими VIII верон) только те мутации, которые не комплементировали со всеми тремя тестерами VIII верона. Те же мутации, которые комплементировали хотя бы с одним тестером VIII верона, мы считали не перекрывающимися этот верон. Нам пред-

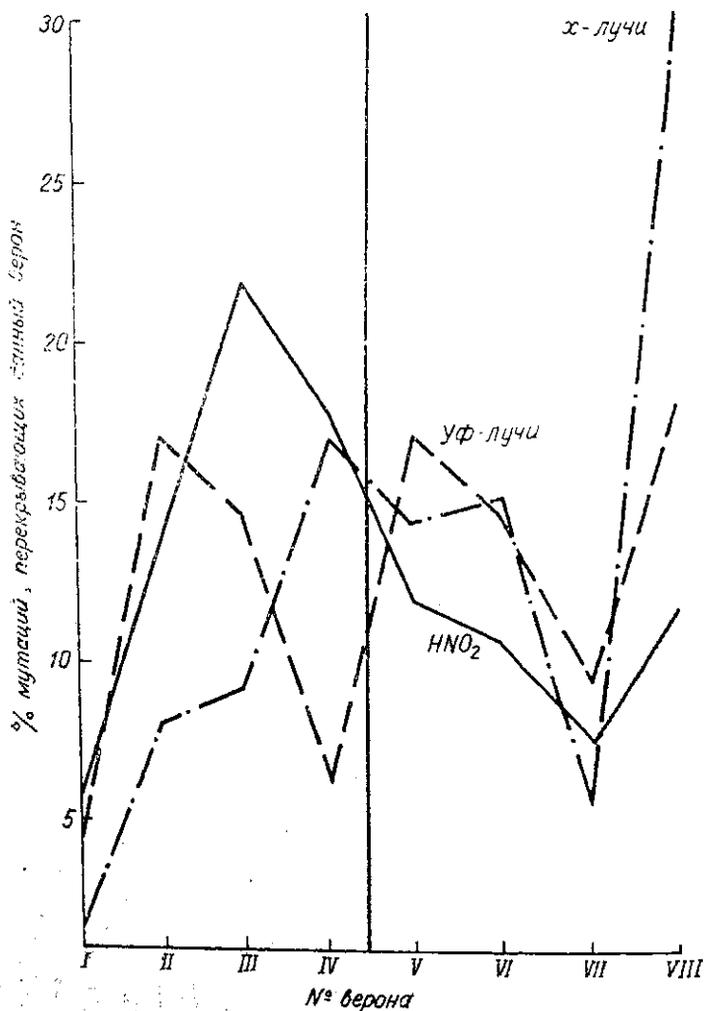


Рис. 9. Распределение мутаций, вызванных разными мутагенами по веронной карте.

Если мутация перекрывает л веронов, считается что в каждом из перекранных веронов имеется 1/л данной мутации. HNO₂ — мутации, вызванные азотистой кислотой; X — мутации, вызванные рентгеновыми лучами, УФ — мутации, вызванные ультрафиолетовыми лучами. Число мутаций в каждом вероне дано в % к общему числу мутаций, вызванных данным мутагеном.

ставляется это целесообразным для дальнейшего обсуждения комплементации в локусе *ad₂*.

Итак, построенная карта имеет 8 веронов (рис. 5) и 31 группу комплементации. Аналогичная обработка предварительной карты комплементации локуса *ad₂* (Сойдла, 1965) дала 7 веронов, хотя число единиц комплементации на предварительной карте было равно 20 (на новой подробной карте их 36, рис. 4). При проведении такой же обработки опубликованных карт локуса *ad₂* *Saccharomyces cerevisiae* и аналогичных локусов у других объектов нами были получены следующие результаты. Для карты Р. Вудса и Е. Бивена — 8 веронов (опубликовано 36 клонов), для карты У. Лемондита и Г. Гуца (*Saccharomyces roubaei*) — 7 веронов (15 клонов), для карты Ф. де Серреса (*Neurospora crassa*) — 11 веронов (20 клонов). Таким образом, наблюдается относительное единообразие данных о числе веронов в аналогичных локусах у дрожжей. Несколько отличаются в этом отношении данные для нейроспоры.

На полученной карте можно все расчеты на длину повреждения вести в более простых, видимо более реальных, единицах, чем клоны. Можно видеть, что мутации с частичным выражением перекрывают только 1—2 верона, в то время как мутации, имеющие полное проявление, — 1—7 (рис. 6). Видно, что «горячее» пятно частичных мутантов в правой части карты (рис. 5) перекрывает только один верон. Можно продемонстрировать распределение левых и правых концов групп комплементации по веронам (рис. 7). Ясно видна полярность. Было рассчитано число мутаций, перекрывающих тот или иной верон. Если мутация перекрывает *n* веронов, считалось, что имеется $1/n$ часть этой мутации на каждый верон. Исходя из этих расчетов, на рис. 8 показано распределение мутаций, имеющих частичное и полное проявление по разным функциональным участкам локуса *ad₂*. На рис. 8 отчетливо видно «горячее» пятно частичных мутантов в VIII вероне. Остальные мутации (*nonleaky*) дают почти плавную кривую распределения.

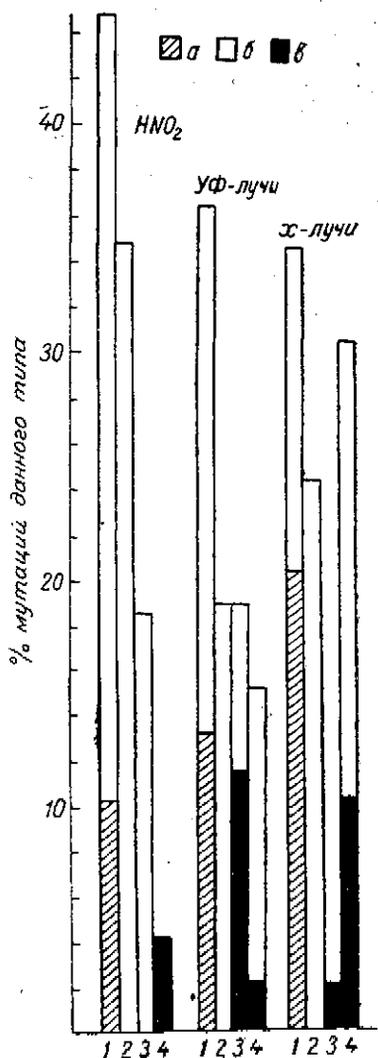


Рис. 10. Численность разных типов комплементации, характеризующих мутации, вызванные разными мута-

1-
вв'
Ф'
V
Z
H
T
M
D
C

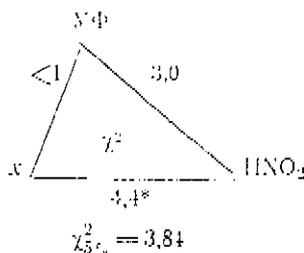
На картах (рис. 4 и 5) изображены мутации, индуцированные разными мутагенами. В опыт, как отмечено выше, были включены 54 мутации, вызванные ультрафиолетовыми, 50 — рентгеновыми лучами, 51 — азотистой кислотой и 1 — формальдегидом. 5 мутантов оказались слишком хорошо растущими на минимальной среде и поэтому на карте (рис. 5) изображены 52 мутации, вызванные ультрафиолетовыми, 49 — рентгеновыми лучами, 49 — азотистой кислотой и 1 — формальдегидом.

Если рассмотреть указанным выше образом распределение мутаций, вызванных разными мутагенами по длине карты (рис. 9), можно видеть, что специфичность азотистой кислоты сильно отличается от таковой рентгеновых лучей. В частности, азотистая кислота достоверно отличается от рентгеновых лучей по вызыванию мутаций в левой и правой половинах локуса (табл. 1) — рентгеновы лучи вызывают больше

Таблица 1

Распределение мутаций, вызванных разными мутагенами по левой и правой частям карты комплементации

Место мутации на карте комплементации	Мутаген		
	УФ-лучи	α-лучи	HNO ₂
Левая часть	18,2	12,1	27,8
Правая часть	25,8	21,9	19,2
Σ картированных комплементирующих мутаций	44	34	47



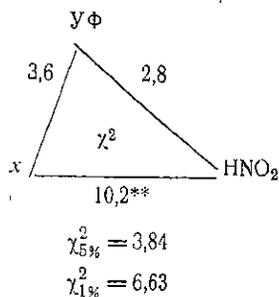
мутаций в правой, азотистая кислота — в левой частях локуса. Ультрафиолетовые лучи занимают при этом промежуточное положение. С другой стороны, рентгеновы лучи вызывают достоверно больше некомплементирующих мутаций, чем азотистая кислота (табл. 2). Это, по всей видимости, связано с тем, что рентгеновы лучи вызывают больше точечных мутаций (т. е. перестроек разного типа). Ультрафиолетовые лучи по этому критерию занимают также промежуточное положение, не отличаясь достоверно ни от рентгеновых лучей, ни от азотистой кислоты.

На гистограмме (рис. 10) изображены различия между мутагенами в индукции одновверонных повреждений, в том числе отдельно повреждений, перекрывающих только VIII верон, нелинейных (по карте рис. 4), полярных, некомплементирующих и мутаций, проявление которых подавляет доминантный супрессор S₇. Видна та же общая тенденция — азотистая кислота и рентгеновы лучи отличаются между собой контрастно, ультрафиолетовые лучи занимают промежуточное положение.

Результаты определения мутагенной специфичности показывают достаточно отчетливую «индивидуальность» каждого мутагена, но, кроме

Таблица 2
 число комплементирующих и некомплементирующих мутаций, вызванных
 разными мутагенами

Характер мутации	Мутаген		
	УФ-лучи	x-лучи	HNO ₂
Комплементирующие	46	35	49
Некомплементирующие	8	15	2
Σ исследованных мутаций	54	50	51



случая с некомплементирующими мутациями, у нас не было возможности строить гипотезы о механизмах, лежащих в основе обнаруженных различий. Более подробно вопрос о природе некоторых некомплементирующих и поллярных мутаций обсуждается в предыдущей статье (Инге-Вечтомов и Симаров, 1967).

ВЫВОДЫ

1. Построена карта комплементации локуса *ad₂* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, состоящая из 36 единиц и 79 групп комплементации. На карте имеется много отклонений от линейности. При учете всех случаев нелинейности число групп комплементации возрастает до 91.
2. Получены косвенные указания на то, что длина линии на карте комплементации локуса *ad₂* отражает степень повреждения в молекуле белка.
3. Предварительно определено направление трансляции генетической информации по локусу *ad₂*.
4. На карте можно различить 8 участков, которые, как предполагается, соответствуют реально различающимся участкам в молекуле белка. Дается строгое определение этих участков и впредь предлагается именовать их веронами.
5. Построена карта комплементации, состоящая из 8 веронов. На основании этой карты проанализирована мутагенная специфичность рентгеновых и ультрафиолетовых лучей, а также азотистой кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

Инге-Вечтомов С. Г. 1963. Вестник ЛГУ, 21: 117—125.
 Инге-Вечтомов С. Г. и Б. В. Симаров. 1967. См. настоящий сборник.
 Инге-Вечтомов С. Г. и С. А. Кожин. 1964. В сб.: Исследования по генетике. Изд. ЛГУ, 2: 77—85.
 Кожин С. А. 1967. «Генетика», 7.
 Райбулис Е. П. и С. А. Кожин. 1966. Тр. Московск. о-ва испыт. природы, 22: 135—139.

- Райпулис Е. П., С. Г. Инге-Вечтомов и С. А. Кожин. 1966. «Генетика», 10: 102—107.
- Сойдла Т. Р. 1965. «Генетика», 3: 128—131.
- Сойдла Т. Р. и С. Г. Инге-Вечтомов. 1966. «Генетика», 9: 141—150.
- Павленко В. В. и Т. Р. Сойдла. 1967. «Генетика», 1: 136—143.
- Bernstein H., R. S. Edgar a. G. H. Denhardt. 1965. «Genetics», 51, 6: 987—1002.
- Bevan E. A. a. R. A. Woods. 1962. «Heredity», 17, 1: 141.
- Brenner S. 1959. Intern. Symp. on Biochemistry of Human Genetics, 1: 304—321.
- Catcheside D. G. 1964. Brookhaven Symp. in Biol., 17: 1—14.
- Catcheside D. G. a. A. Overton. 1958. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 23: 137—140.
- Coddington A. a. J. R. S. Fincham. 1965. J. Mol. Biol., 12, 1: 152—161.
- Crick F. H. C. a. L. E. Orgel 1964. J. Mol. Biol., 8, 1: 161—165.
- Dorfman B. 1964. «Genetics», 50, 6: 1231—1243.
- Giles N. H., C. W. H. Partridge a. R. R. Nelson. 1957. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 43, 4: 305—317.
- Gillie O. J. 1966. Genet. Res. (Camb.), 8, 1: 9—31.
- Fan D. P., M. J. Schlesinger, A. Torriani, K. J. Barrett a. C. Levinthal. 1966. J. Mol. Biol., 15, 1: 32—48.
- Fincham J. R. S. 1966. «Heredity», 14, 1: 2—27.
- Fincham J. R. S. 1966. Genetic Complementation. N. Y., Amsterdam.
- Fincham J. R. S. a. A. Coddington. 1963. J. Mol. Biol., 6, 7: 361—373.
- Fincham J. R. S. a. J. A. Pateman. 1957. Nature, 179, 74: 742.
- Inge-Vechtomov S. G., B. V. Simarov, E. P. Soidla a. S. A. Kozin. 1966. Zs. Vererbungslehre, 98, 4: 575—584.
- Inge-Vechtomov S. G., T. R. Soidla, S. A. Kozin, B. V. Simarov. 1965. J. Mol. Biol., 19, 2: 583—585.
- Kapuler A. M. a. H. Bernstein. 1963. J. Mol. Biol., 6, 1: 44—47.
- Leopold U. a. H. Gutz. 1964. Genetics Today. Proc. XI Intern. Congr. Genet., 2: 31—35.
- Manney T. R. 1964. «Genetics», 50, 1: 109—121.
- Radford A. 1966. Canad. J. Genet. Cytol., 8, 4: 672—678.
- Schlesinger M. J. a. C. Levinthal. 1963. J. Mol. Biol., 7, 1: 1—12.
- Schlesinger M. J. a. C. Levinthal. 1965. Ann. Rev. Microbiol., 19: 267—284.
- De Serres F. J. 1964. J. Cell. Comp. Physiol., 64, 2, Suppl. 1: 33—42.
- De Serres F. J. 1966. Mut. Res., 3, 1: 3—12.
- Woods R. A. a. E. A. Bevan. 1966. «Heredity», 21, 1: 121—130.
- Woodward O. O. 1959. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 45, 6: 846—850.
- Yanofsky C., B. C. Carlton, J. R. Guest, D. R. Helinski, U. H. Henning. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 51, 2: 266—272.