

nation codons in vitro by normal tRNAs. — Eur. J. Biochem., 1980, vol. 105, p. 445–451.

36. *One B.-J., Stewart J. W., Sherman F.* Serine insertion caused by a ribosomal suppressor SUP46 in yeast. — J. Mol. Biol., 1981, vol. 147, p. 373–379.

37. *Picard-Bennoun M.* Mutation affecting translational fidelity in the eucaryote *Podospira anserina*: Characterization of two ribosomal restrictive mutations. — Mol. Gen. Genet., 1981, vol. 173, p. 175–180.

38. *Picard-Bennoun M.* Does translational ambiguity increase during cell differentiation? — FEBS Lett., 1982, vol. 149, p. 167–170.

39. *Piepersberg W., Geyp D., Hummel H., Bock A.* Physiology and biochemistry of bacterial ribosomal mutants. — In: Genetics and evolution of RNA polymerase tRNA and ribosomes / Ed. S. Osawa e. a. Tokyo, 1980, p. 359–377.

40. *Piper P. W.* Characterization of nonsense suppressor tRNA from *Saccharomyces cerevisiae*: identification of the mutational alterations that give rise to the suppressor function. — In: Transfer RNA: Biological aspects. New York, 1980, p. 379–394.

41. *Sherman F.* Suppression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. — In: The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. II. Metabolism and gene expression / Eds. J. N. Strathern e. a., New York, 1982, p. 453–486.

42. *Steege D. A., Soll D. G.* Suppression. — In: Biological regulation and development / Ed. R. F. Goldberg. New York; London, 1979, vol. 1, p. 433–485.

43. *Surguchov A. P., Berestetskaya Yu. V., Fominykh E. S. e. a.* Recessive suppression in yeast *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a ribosomal mutation. — FEBS Letters, 1980, vol. 111, N 1, p. 175–178.

44. *Surguchov A. P., Fominykh E. S., Smirnov V. N. e. a.* Further characterization of recessive suppression in yeast. Isolation of the low temperature sensitive mutant of *S. cerevisiae* defective in the assembly of 60s ribosomal subunit. — Biochem. Biophys. Acta, 1981, vol. 654, p. 149–157.

45. *Surguchov A. P., Smirnov V. N., Ter-Avanesyan M. D., Inge-Vechtomov S. G.* Ribosomal suppression in eucaryotes. — Physicochem. biol. Rev., 1984, vol. 4, p. 67–126.

46. *Ter-Avanesyan M. D., Mironova L. N., Inge-Vechtomov S. G., Zlatkin I. V. e. a.* Drug-dependent mutants in yeast *S. cerevisiae*. — Current Genet., 1983, vol. 7, p. 357–362.

47. *Ter-Avanesyan M. D., Zimmermann J., Inge-Vechtomov S. G. e. a.* Ribosomal recessive suppressors cause a respiratory deficiency in yeast *S. cerevisiae*. — Mol. Gen. Genet., 1982, vol. 185, p. 319–353.

48. *Tuite M. F., McLaughlin C. S.* Polyamines enhance the efficiency of tRNA-mediated readthrough of amber and UGA termination codons in a yeast cell-free system. — Current Genet., 1983, vol. 7, p. 421–426.

49. *Yamaizumi Z., Kuchino Y., Harada F., Nichimura S., McCloskey J. A.* Primary structure of *E. coli* tRNA^{sup}_R. — J. Biol. Chem., 1980, vol. 255, p. 2220–2225.

ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА И МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА НА РИБОСОМНУЮ СУПРЕССИЮ В ЦИТОПЛАЗМЕ У ДРОЖЖЕЙ-САХАРОМИЦЕТОВ

С. Г. ИНГЕ-ВЕЧТОМОВ

Рецессивные супрессоры у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* sup1, sup2 [2, 5] контролируют белки большей субчастицы цитоплазматической рибосомы [9]. Эти супрессоры эффективны во взаимодействии с тремя nonsense-кодонами [19]. Исследованию рецессивной рибосомной супрессии способствовала селективная система отбора мутаций по двум унаследованным генам: одновременная реверсия к прототрофности по отношению к гистидину у штаммов, несущих мутации *ade1-14* и *his7-1*, достигается только благодаря супрессорным мутациям в генах *sup1* и *sup2* [4].

С использованием такой селективной системы удалось охарактеризовать большое число мутаций по их разнообразным плеiotропным проявлениям [8] и идентифицировать первичное изменение аппарата трансляции как нарушение структуры белков 60S-субчастицы цитоплазматических рибосом [9]. Таким образом, уровень неоднозначности трансляции у дрожжей оказался связанным с состоянием как малой [14], так и большой [19] субчастиц рибосом.

По-видимому, гены *sup1* и *sup2* кодируют белки, входящие в состав не только цитоплазматических, но и митохондриальных рибосом дрожжей [10].

В настоящей работе модель рибосомной супрессии использована для исследования влияния митохондрий и источников углерода на белковый синтез в цитоплазме дрожжей.

Материал и методика. Для получения рибосомных супрессоров индуцировали реверсии $Adel^+His^-$ у двух галландов Петергофских генетических линий дрожжей: 42Б-П3990 (MATA *adel-14 his7-1 lys2-A12*) и 29В-П2156 (MATA *adel-14, his7-1 metA1*) ультрафиолетовым светом в дозе 300 Дж/м² на чашках со средой YAPD [3] и отбирали ревертанты после перепечатаки на минимальную среду без аденина и гистидина, в которой глюкоза заменена на 2% этанола в качестве источника углерода — среда МС [1]. В дальнейшем супрессию исследовали на минимальной среде с глюкозой — среда М [1, 3] и на среде МС.

В работе использованы также галланды 1- и 5-ау16-31В-П3585 (*rho- MATα adel-6 his7-1 his4-B26 thr4-B15 leu2-1 sup2*) и цит1- и цит8-42Б-П3990, которые представляют собой мутанты, способные к цитодукции с повышенной частотой.*

Ряд маркеров, с которыми мы работали, идентифицированы как нонсенс-аллели: *adel-6, his7-1 (UAA); thr4-B15 (UGA); lys2-A12 (UAG)*. Природа остальных мутаций неизвестна.

Мутанты *rho-* выделяли после трехкратного пересева штаммов на среде с бромистым этидием и последующего рассева их на среде YAPD [18]. При этом все проверенные клоны оказались дицитодуциком-потентными. Спонтанные мутанты *rho-* отбирали в рассевах культур на YAPD после предварительного выращивания на той же среде.

Культуры выращивали при 30°C, за исключением тех случаев, которые будут оговорены особо.

Результаты. Мы исследовали супрессию нонсенс-аллели *his7-1*, перепечатывая суточные клоны ревертантов со среды YAPD на среды М и МС без гистидина. Некоторые мутанты как по гену *sup1*, так и по гену *sup2* не обнаруживали супрессии *his7-1* на среде с глюкозой, судя по отсутствию роста в течение шести суток, однако проявляли супрессорный эффект на среде с этанолом (табл., рис. 1). Мутация *adel-14* супрессировалась у всех ревертантов. Наличие в среде глицерина или галактозы в качестве единственного источника углерода приводило к такому же результату — стимуляция супрессии. Добавление 2 или 0,2% глюкозы в среды с этанолом, глицерином или галактозой нейтрализовано их стимулирующее влияние на супрессию *his7-1*.

Эффективность супрессии *his7-1* на среде с глюкозой возрастала также при понижении температуры культивирования с 30 до 20°C.

Стимуляция эффективности супрессии *his7-1* на среде с глюкозой была обнаружена также при получении митохондриальных мутаций дыхательной способности (*rho-*) у исходных ревертантов путем их пассирования на среде YAPD с бромистым этидием [18] (см. рис. 1).

Супрессия нонсенс-аллели *his7-1 (UAA)* на средах с глюкозой и этанолом у ревертантов, несущих рибосомные супрессоры.

Исходный штамм	Супрессор	Число ревертантов на средах			
		с глюкозой		с этанолом	
		His ⁺	His ⁻	His ⁺	His ⁻
42Б-П3990	<i>sup1</i>	3	8	6	5
	<i>sup2</i>	6	1	6	0
	Всего	8	9	12	5
29В-П2156	<i>sup</i>	4	1	4	1
	<i>sup2</i>	5	7	12	0
	Всего	9	8	16	1

* Автор благодарит Т. С. Карпову и О. Н. Гихомееву за помощь в работе и М. А. Ванякову за предоставление полученных ею мутантов цит1- и цит8-42Б-П3990.

Мы получили также спонтанные мутации ρho^- у ревертанта 12-29В-П2156. Этот ревертант нес мутацию в гене $\text{sup}2$ и имел фенотип $\text{Ade}^+ \text{His}^-$ на среде с глюкозой. Из 28 спонтанных мутантов ρho^- только 7 обнаружили повышение эффективности супрессии, а 5 выщепляли отдельные клоны с повышенной эффективностью супрессии $\text{his}7-1$.

Неядерная природа детерминанта, контролирующего эффективность рецессивной супрессии на среде с глюкозой, была подтверждена с использованием селективной системы цитодукции, разработанной нами ранее [6]. В качестве реципиента митохондрий и цитоплазмы при цитодукции мы использовали мутанты ρho^- : 1- и 5- $\text{ay}16-31\text{B}-\text{P}3585$, несущие мутацию $\text{sup}2$; донорами служили штаммы $\text{цит}1^-$ и $\text{цит}8-42\text{B}-\text{P}3990$.

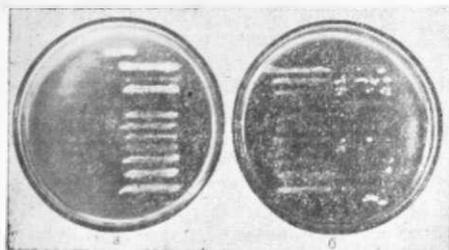


Рис. 1. Влияние источников углерода и мутаций ρho^- , индуцированных бромистым этидием, на эффективность рецессивной супрессии аллели $\text{his}7-1$ (UAA).

a — среда с этанолом, **б** — с глюкозой. Справа на каждой чашке — независимо полученные супрессорные мутанты штамма 42B-P3990, слева — полученные из них при цитодукции бромистого этидия мутанты ρho^- . Вторые сверху и нижний штрихи (нигде не растут) — исходный штамм, второй сверху — мутант $\text{sup}2$, остальные — мутанты $\text{sup}1$.

нормальные по дыханию. В каждой из четырех возможных комбинаций скрещивания между донорами и реципиентами было выделено по два независимых цитодуктанта. Все восемь цитодуктантов, получивших нормальные митохондрии, обнаружили снижение эффективности супрессии мутации $\text{thr}4-15$ на среде с глюкозой по сравнению с исходными мутантами ρho^- . Эффективность супрессии $\text{thr}4-15$ у цитодуктантов ρho^+ повышалась на среде с этанолом (рис. 2).

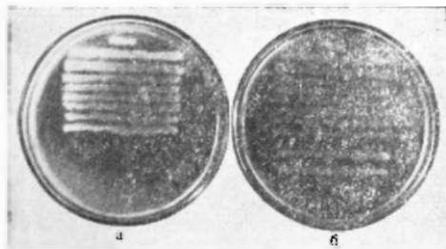


Рис. 2. Супрессия аллели $\text{thr}4-15$ (UGA) на среде с этанолом (**a**) и с глюкозой (**б**) у ρho мутантов 1- и 5- $\text{ay}16-31\text{B}-\text{P}3585$ (два нижних штриха), и их цитодуктантов ρho^+ (восемь верхних штрихов).

Обсуждение. Рибосомные белки, кодируемые генами *sup1* и *sup2*, контролируют уровень неоднозначности трансляции в цитоплазме дрожжей. Представленные здесь результаты указывают на возможность регуляции уровня неоднозначности в зависимости от используемого источника углерода. На глюкозе рибосома ошибается реже, чем на неферментируемых субстратах: этаноле, глицерине или галактозе, которую наши штаммы не сбраживают.

Маловероятно, что при этом регулируется синтез самих белков, кодируемых генами *sup1* и *sup2*. По-видимому, их присутствие необходимо для нормального функционирования рибосомы. Известны мутации по генам *sup1* и *sup2*, летальные при повышенной [4] или при пониженной [20] температуре. Такие мутации приводят к нарушению сборки рибосом [9] и подавлению белкового синтеза.

Более вероятно, что регуляция (по механизму глюкозной репрессии?) сказывается в подавлении или стимулировании модификации белков рибосом — продуктов *sup1* и *sup2*, и тем самым регулируется частота ошибок белкового синтеза. В то же время результаты, представленные в настоящем сборнике, указывают на то, что рибосомные супрессоры *sup1* и *sup2* не изменяют специфичность взаимодействия кодон-антикодон, а только повышают эффективность канонических взаимодействий [11].

Поэтому более вероятно, что обнаруженная нами зависимость эффективности нонсенс-супрессии у рибосомных мутантов от источника углерода и состояния митохондриального генома связана не столько с самими рибосомами, сколько с иными компонентами аппарата трансляции и, скорее всего, с тРНК. Известно, что многие события, связанные с дифференцировкой клеток, сопровождаются изменением фракционного состава тРНК [13].

В таком случае рибосоме отводится роль структуры, обладающей определенной селективностью в отношении различных классов тРНК. Селективность рибосомы может изменяться в результате мутационного изменения входящих в ее состав белков, в частности белков большой субчастицы, кодируемых генами *sup1* и *sup2*. Тогда рибосомная супрессия, строго говоря, осуществляется не столько самой рибосомой, сколько некоторыми тРНК, предсуществующими в клетке и имеющими антикодоны, комплементарные нонсенс-кодонам. Глюкозная репрессия может касаться только этого класса неканонических тРНК, имеющих слабое сродство к нормальной рибосоме, или более широкого набора тРНК, включающего и упомянутый класс тРНК. Снятие глюкозой репрессии в этом случае должно приводить к повышению эффективности супрессии, что мы и наблюдали на среде с неферментируемыми источниками углерода.

Аналогичное влияние источников углерода (а также пониженной температуры и мутаций ρ^0) на эффективность супрессии описано нами ранее для нового класса доминантных супрессоров, активных при пониженной температуре (SLT) у дрожжей. Механизм действия SLT исследован еще недостаточно, однако их доминантность и строгая специфичность по отношению к охр-нонсенсам позволяет предположить, что они относятся к типу тРНК-супрессоров [7].

Обнаруженное нами влияние мутаций ρ^0 , индуцированных бромистым этидием, на эффективность супрессии, так и SLT [7] может быть связано с элиминацией митохондриальной ДНК. Тогда в митохондриальной ДНК есть ген (гены), подавляющий неоднозначность трансляции в цитоплазме. Согласно высказанной гипотезе, этот ген или гены могут подавлять синтез тРНК, кодируемых ядром, и способных считывать нонсенс-кодона в цитоплазме.

Мы не исследовали содержание митохондриальной ДНК у наших

мутантов ρ^0 , индуцированных бромистым этидием, однако известно, что этот агент вызывает элиминацию ДНК митохондрий [18]. Митохондриальная природа мутаций, повышающих эффективность рибосомной супрессии, подтверждается и данными по влиянию на супрессию спонтанных мутаций ρ^0 . Так, известно, что спонтанные мутации ρ^0 представляют собой делеции митохондриальной ДНК различной протяженности. При этом первичные мутанты ρ^0 часто обладают нестабильностью и продолжают терять митохондриальную ДНК вплоть до ее полной утраты [16] и тем самым переходят в категорию мутантов ρ^0 , подобных тем, которые индуцирует бромистый этидий. Действительно, лишь некоторые из наших спонтанных мутантов ρ^0 обнаруживали повышение эффективности супрессии. Они могли утратить всю митохондриальную ДНК или ее часть, включая какую-либо часть, ответственную за низкий уровень неоднозначности трансляции в цитоплазме. Повышение эффективности супрессии лишь у некоторых субклонов первичных мутантов ρ^0 , по-видимому, отражает нестабильность их митохондриального генома.

Ранее Оно и др. [15] сообщили о влиянии мутации ρ^0 на эффективность супрессии нонсенса UAA, осуществляемой мутацией в ДНК ρ^0 . Авторы не уточнили, с какими мутациями ρ^0 они имели дело. Ядерную природу мутаций, повышающих эффективность супрессии, подтверждают и данные по цитодукции в случае супрессии нонсенса UGA (*trg4-B15*). У цитодуктантов эффективность супрессии оказалась сниженной по сравнению с таковой у мутантов-рецидивентов нормальных митохондрий.

Строго говоря, один этот результат еще не доказывает роль именно митохондрий в рассматриваемом процессе, поскольку известны и иные неядерные факторы, влияющие на нонсенс-супрессию, например пси-фактор [см 17] и эта-фактор [12]. Природа их в настоящее время неизвестна, однако эти факторы элиминируют иные агенты, нежели бромистый этидий [12]. Кроме того, при элиминации пси- и эта-факторов происходит понижение эффективности супрессии, т. е. эффект противоположен тому, который мы наблюдаем при элиминации митохондриальной ДНК. С учетом приведенных фактов роль митохондриальной ДНК в рассматриваемом эффекте наиболее вероятна.

В настоящее время мы не можем установить, действует ли глюкозный эффект непосредственно на экспрессию генов ядра или он опосредован через влияние на такие цитоплазматические структуры, как митохондрии.

Представленные здесь данные вместе с опубликованными ранее [10] указывают на возможность координации белкового синтеза в цитоплазме и митохондриях у дрожжей.

Вместе с тем повышение уровня неоднозначности трансляции при отклонении среды от физиологического оптимума служит указанием на возможное адаптивное значение неоднозначности трансляции.

Summary

Efficiency of ribosomal suppressors *sup1* and *sup2* is being elevated by substitution of ethanol, glycerol or galactose for glucose as a sole carbon source.

Mitochondrial mutations of respiration deficiency induced with ethidium bromide cause analogous effect on glucose media.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Захаров В. А., Кожина С. А., Кожина Т. Н., Федорова И. В. Сборник методов молекулярной генетики дрожжей. — Л., 1976, 125 с.

2. Захаров В. А., Кожина С. А., Федорова И. В. Реверсии к прототрофности у дрожжей, нуждающихся в галактозе. — Вестн. Ленинградского ун-та, 1964, вып. 2, с. 112—117.

3. Захаров В. А., Кожина С. А., Федорова И. В. Изменчивость некоторых групп сцепления у Петергофских дрожжей. — Генетика, 1971, т. 7, № 9, с. 114—124.

4. Инге-Вечтомов С. Г., Андрианова В. М. Новый тип суперсупрессоров у дрожжей. — В сб.: Молекулярные механизмы генетических процессов. М., 1972, с. 189—195.
5. Инге-Вечтомов С. Г., Андрианова В. М. Рecessивные суперсупрессоры дрожжей. — Генетика, 1970, т. 6, № 11, с. 103—115.
6. Инге-Вечтомов С. Г., Карпова Т. С. Селективная система цитодукции с использованием recessивных супрессоров у дрожжей-сахаромицетов. — Генетика, 1984, т. 20, № 3, с. 398—407.
7. Инге-Вечтомов С. Г., Карпова Т. С. Доминантные супрессоры, эффективные при пониженной температуре (SLT), у дрожжей-сахаромицетов. — Генетика, 1984, т. 20, № 10, с. 1620—1627.
8. Инге-Вечтомов С. Г., Тер-Аванесян М. Д. Ядерный и митохондриальный контроль трансляции у дрожжей. — В кн.: Молекулярные и клеточные аспекты биотехнологии. Л., 1986, с.
9. Сургучев А. П. Рибосомная супрессия и функционирование аппарата белкового синтеза у эукариот. — Автореф. докт. дис., 1984, 44 с.
10. Тер-Аванесян М. Д., Инге-Вечтомов С. Г., Сургучев А. М., Смирнов В. Н. О связи митохондриального и цитоплазматического синтеза белка у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. — Докл. АН СССР, 1982, т. 264, № 5, с. 1262—1265.
11. Тихомирова В. Л., Карпова Т. С., Инге-Вечтомов С. Г., Тер-Аванесян М. Д. Генетический анализ взаимодействия тРНК-рибосомы в информационной супрессии у дрожжей. — Наст. сборник, с. 52—60.
12. Liebman S. W., All-Robyn I. A. A non-mendelian element, that causes lethality of omnipotent suppressors. The molecular biology of yeast. Abstr. Cold Spring Harbor Lab., 1983, p. 336.
13. Littauer U. Z., Inouye H. Regulation of tRNA. — Ann. Rev. Biochem., 1973, vol. 42, p. 439.
14. Masurecar M., Palmer E., Ono B. E. e. a. Misreading of the ribosomal suppressor SUP46 due to an altered 40S subunit in yeast. — J. Mol. Biol., 1981, vol. 147, p. 381.
15. Ono B. J., Stewart J. W., Sherman F. Yeast UAA suppressors effective in strains. — Serine inserting suppressors. — J. Mol. Biol., 1979, vol. 128, N 1, p. 81.
16. Saunders G. W., Gringold E. B., Trembath M. K., Lukins H. B., Linnane A. W. Mitochondrial genetics in yeast: segregation of a cytoplasmic determinant in crosses and its loss or retention in the petite. — In: Autonomy and biogenesis of mitochondria and Chloroplasts / Ed. A. W. Linnane e. a. Amsterdam, 1970, p. 185.
17. Sherman F. Suppression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. — In: The molecular biology of yeast *Saccharomyces*, Monograph 11B / Ed. J. N. Strathern, E. W. Jones, J. R. Broach, 1982, Cold Spring Harbor Lab., p. 463—486.
18. Slonimsky P. P., Perrodin G., Croft J. N. Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: complete transformation of cells into respiratory deficient non-chromosomal petites. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1968, vol. 30, p. 232.
19. Surguchov A. P., Berestetskaya Yu. V., Fominykh E. S. e. a. Recessive suppression in yeast *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by ribosomal mutation. — FEBS Letters, 1980, vol. 111, N 1, p. 175—178.
20. Surguchov A. P., Fominykh E. S., Smirnov V. N., Ter-Avanesyan M. D., Mironova L. N., Inge-Vechtomov S. G. Further characterization of recessive suppression in yeast. Isolation of the low temperature sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective in the assembly of 60S ribosomal subunit. — Biochem. Biophys. Acta, 1981, vol. 654, N 1, p. 149.

ИНДУКЦИЯ СИНТЕЗА мРНК В ДЕЙСТВИИ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ

Н. П. МЕРТВЕЦОВ

Явление индукции и репрессии генов было открыто и подробно исследовано у микроорганизмов [90, 91]. Клетки бактерий быстро приспособляются к изменениям питательной среды благодаря синтезу адаптивных ферментов. При появлении в среде нового субстрата в клетках бактерий начинается (или ускоряется) синтез ферментов, обеспечивающих его использование в качестве источника углерода, азота и энергии. Обратная ситуация имеет место в случае репрессии адаптивных ферментов.

ИНДУЦИБЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ В КЛЕТКАХ-МИШЕНЯХ ЖИВОТНЫХ

У высших организмов регуляция экспрессии генов носит более сложный характер, что обусловлено особой организацией генетическо-