

М. Г. ОГАНЕСЯН

КОНВЕРСИЯ ОХРОВОГО СУПРЕССОРА В АМБЕРНЫЙ

Из 64 триплетов генетического кода 3 не кодируют ни одну из известных аминокислот. Эти триплеты следующие: УАА (назван «охра»), УАГ (назван «амбер») и УГА. Эти три кодона чрезвычайно важны для клетки и играют роль терминирующих кодонов, т. е. указывают место завершения биосинтеза данного белка [7, 8, 9, 10, 11]. Однако остается невыясненным, который из трех возможных терминирующих кодонов чаще всего используется живыми системами для естественной терминации, что вызывает повышенный интерес к этим кодонам. Как выяснилось, наиболее ценную информацию по этому вопросу удастся получить при изучении супрессии мутаций, обусловленных переходом какого-либо из оставшихся 61 триплета в один из терминирующих [7, 8, 9, 10, 12, 13].

Мы уже сообщали [5], что нам удалось получить у *E. coli* мутации в генах-супрессорах охровых и амберных мутантов, которые приводят к такому изменению супрессора, что последний начинает считывать другой триплет (изучались амберный супрессор Su_{III} и охровый Su_c). Несколько позже С. Пирсон и М. Озборн [13] из Пенсильванского университета сообщили о том, что им удалось получить такие же изменения в генах амберных супрессоров (изучались амберные супрессоры Su_I , Su_{II} , Su_{III}). Недавно группа Беквиза [12] из Гарварда также сообщила о получении такой конверсии у другого амберного супрессора (изучались амберные супрессоры Su_{II} , $Su-U. Mel$). Конверсия охрового супрессора в амберный, кроме нас [5], никем не описана.

В настоящей работе впервые приводятся данные по характеристике полученных нами конвертантов охрового супрессора в амберный.

Материалы и методы. В работе использованы бактериальные и фаговые мутанты из международных коллекций и полученные в нашей лаборатории [2, 5, 8, 9]. Среды и некоторые методы описывались ранее [6]. В дополнение к уже описанным, применялась индикаторная среда Эндо, а также синтетическая среда М9 с добавками. Другие использованные методы и среды описаны Адамсом [1].

Экспериментальная часть и обсуждение. Нами получены амберные мутанты фагов, а также спонтанные и индуцированные мутанты супрессоров [2, 5] у штамма, несущего охровую мутацию в Z-гене лак-оперона и охровый супрессор Su_c . Мы получали лактозонесбраживающие (лак⁻) мутанты. Такие мутанты могут быть следствием двух событий:

1) возникает новая, не подавляемая Su_c супрессором, мутация в лак-опероне;

2) получена мутация в самом Su_c гене.

В первом случае могут возникнуть любого рода «миссенс» (переосмысленные) мутации либо не подавляемые Su_c супрессором амберные или УГА мутации в лак-опероне. Но так или иначе исход будет одним и тем же: Su_c будет подавлять исходную охровую мутацию Z-гена, и при этом проявится новая мутация лак-оперона.

Во втором случае возможны два исхода:

а) мутация в Su_c гене инактивирует супрессор;

б) мутация в Su_c гене изменяет его так, что он теперь подавляет мутации другой природы (например, амберные или УГА).

Для выбора между этими возможностями было решено использовать амберные мутации у бактериофагов. Результаты такой проверки для одного из лак⁻ мутантов представлены в табл. 1.

Таблица 1
Рост амберных фагов на Su^- , Su^+ и лак⁻ бактериях

Амберные мутанты фагов	Рост фагов на штаммах		
	Su^-	Su^+	мутант УФ лак ⁻ 1/167
T2 am1	—	+	—
T2 am2	—	+	—
T4B am1	—	+	—
T4Д am B22	—	+	—

Представленные результаты показывают, что такой метод пригоден для предварительной характеристики мутантов. Очевидно УФлак⁻ 1/167 м мутант вследствие мутации утратил активность Su гена, поскольку на нем рост амберных мутантов фага также отсутствует, как и в случае Su^- штамма.

Этим же методом были проверены лак⁻ мутанты. Результаты такой проверки представлены в табл. 2.

Из данных табл. 2 видно, что 12 лак⁻ мутантов перестали супрессировать амберные мутации у бактериофагов. Для исключения возможности того, что это явление не связано с утратой клетками способности адсорбировать фаг, была определена степень адсорбции амберного мутанта T4amB22 на лак⁻ мутантах. Результаты такой проверки представлены в табл. 3.

Испытанные лак⁻ мутанты адсорбируют фаг, и, очевидно, отсутствие роста амберных мутантов на них связано с внутриклеточным этапом развития фагов (табл. 3).

Остальные 12 лак⁻ мутанты, представленные в табл. 2, продолжают супрессировать амберные мутации бактериофагов. Такие мутанты несут либо новую мутацию в лак-опероне, либо мутации в Su гене, которые не

Таблица 2

Анализ лак⁻ мутантов при помощи амберных фагов

Проверенный мутант	Рост амберных мутантов фагов			
	T2 ам 1	T2 ам 2	T4 В ам 1	T4 Д ам 22
УФлак ⁻ 1/167	+	+	+	+
УФлак ⁻ 2/167	+	+	+	+
УФлак ⁻ 3/167	+	+	+	+
УФлак ⁻ 5/167	+	+	+	+
УФлак ⁻ 6/167	—	—	—	—
УФлак ⁻ 7/167	—	—	—	—
УФлак ⁻ 8/167	—	—	—	—
УФлак ⁻ 9/167	—	—	—	—
УФлак ⁻ 10/167	+	+	+	+
УФлак ⁻ 11/167	—	—	—	—
УФлак ⁻ 13/167	—	—	—	—
УФлак ⁻ 14/167	+	+	+	+
УФлак ⁻ 15/167	+	+	+	+
УФлак ⁻ 16/167	—	—	—	—
УФлак ⁻ 17/167	+	+	+	+
УФлак ⁻ 18/167	—	—	—	—
УФлак ⁻ 20/167	+	+	+	+
УФлак ⁻ 21/167	+	+	+	+
УФлак ⁻ 22/167	+	+	+	+
УФлак ⁻ 23/167	+	+	+	+
УФлак ⁻ 26/167	—	—	—	—
УФлак ⁻ 28/167	—	—	—	—
УФлак ⁻ 31/167	—	—	—	—
УФлак ⁻ 1/167 м	—	—	—	—

Таблица 3

Адсорбция амберного фага ам В22 на лак⁻ мутантах

Использованный мутант	Количество негативных колоний	Адсорбция фага (%)
УФлак ⁻ 6/167	30	85
УФлак ⁻ 7/167	55	73
УФлак ⁻ 8/167	60	70
УФлак ⁻ 9/167	51	75
УФлак ⁻ 11/167	41	80
УФлак ⁻ 13/167	23	88
УФлак ⁻ 16/167	33	84
УФлак ⁻ 1/167 м	57	72

инактивируют супрессор, а изменяют его супрессирующие способности. Для выбора между этими двумя возможностями была проверена картина супрессии охровых мутантов бактериофага T2.

Результаты проверки представлены в табл. 4.

Из этих данных был сделан вывод, что мутанты УФлак⁻ 22/167 и УФлак⁻ 23/167 сохранили охровый супрессор и, по-видимому, несут новую мутацию в лак-опероне. Нас больше интересовали остальные 10 мутантов, которые, как можно заключить из представленных данных, являются как раз мутантами, претерпевшими конверсию охрового супрессора в амберный. Такие мутанты не супрессируют охровую мутацию в

Таблица 4

Супрессия охровых мутантов фага T2 лак⁻ бактериями

Использованный мутант	Супрессия охровых мутантов фага T2		
	Сп ⁻ OC1	УФ—OC2	УФ—OC3
УФлак ⁻ 1/167	—	—	—
УФлак ⁻ 2/167	—	—	—
УФлак ⁻ 3/167	—	—	—
УФлак ⁻ 5/167	—	—	—
УФлак ⁻ 10/167	—	—	—
УФлак ⁻ 14/167	—	—	—
УФлак ⁻ 15/167	—	—	—
УФлак ⁻ 17/167	—	—	—
УФлак ⁻ 20/167	—	—	—
УФлак ⁻ 21/167	—	—	—
УФлак ⁻ 22/167	+	±	±
УФлак ⁻ 23/167	+	+	+

лак-опероне самих бактерий, не супрессируют охровые мутации у фага T2, но супрессируют амберные мутанты у фага.

Так как амберные супрессоры эффективнее охровых иногда более чем в 10 раз [5, 8], то увеличение эффективности супрессора подтвердило бы сделанный вывод. В таблице 5 представлены данные об эффективности амберной супрессии разными лак⁻ мутантами, определенной по урожаю амберного фага в экспериментах по одиночному циклу размножения.

Таблица 5

Эксперименты по одиночному циклу размножения амберного фага на лак⁻ мутантах

Использованный мутант	Выход фага в расчете на 1 зараженную клетку	Эффективность супрессии*	Относительная активность супрессора**
УФлак ⁻ 1/167 м	0	0	0
УФлак ⁻ 6/167	0	0	0
УФлак ⁻ 7/167	0	0	0
УФлак ⁻ 8/167	0	0	0
УФлак ⁻ 9/167	0	0	0
УФлак ⁻ 11/167	0	0	0
УФлак ⁻ 13/167	0	0	0
УФлак ⁻ 16/167	0	0	0
УФлак ⁻ 18/167	0	0	0
УФлак ⁻ 31/167	0	0	0
УФлак ⁻ 22/167	16	0,01	0,9
УФлак ⁻ 23/167	17	0,01	0,9
УФлак ⁻ 2/167	65	0,65	3,6
УФлак ⁻ 3/167	85	0,85	4,9
УФлак ⁻ 5/167	100	1,40	5,5
УФлак ⁻ 15/167	170	0,68	9,4
УФлак ⁻ 20/167	160	0,90	8,9
УФлак ⁻ 21/167	200	1,00	11,1

* Отношение урожая амберного мутанта фага на данном штамме к урожаю дикого типа на том же штамме.

** Отношение урожая фага на данном лак⁻ мутанте к урожаю этого же фага на исходном Su_c-содержащем штамме.

Представленные в таблице данные показывают, что, действительно, полученные нами мутанты распределяются в три группы:

1. Мутанты с инактивированным супрессором.
2. Мутанты, несущие вторую мутацию в лак-опероне, которая не супрессируется исходным охровым супрессором.
3. Мутанты, у которых в результате одноступенчатой мутации охровый супрессор перешел в амберный.

Известно, что когда мутация завершается переходом любого из 61 осмысленных триплетов в один из терминирующих (УАА, УАГ или УГА), это приводит к прерыванию синтеза белка в точке возникновения такой мутации [7, 8, 9, 10]. Это связано с отсутствием в клетке соответствующей транспортной РНК (Т-РНК), которая, «узнавала» бы терминирующие кодоны. Однако в некоторых клетках синтез белка восстанавливается благодаря супрессорным мутациям, возникающим в этих штаммах. Как выяснилось, роль супрессорных генов играют гены, контролирующие биосинтез транспортных РНК. Сущность супрессорных мутаций заключается в мутировании одного из генов Т-РНК. При этом Т-РНК сохраняет свою аминокислотную специфичность, но благодаря мутации (скорее всего в антикодоновом участке) приобретает сродство с терминирующим кодоном. Поэтому такая Т-РНК, «по-ошибке», будет «узнавать» терминирующий кодон, как осмысленный, и включит активированную аминокислоту в синтезируемую цепь белка, что восстановит синтез завершенных белковых молекул [7, 8, 9, 10, 11].

Как выяснилось, амберные супрессоры подавляют только амберные мутации, тогда как охровые супрессоры менее специфичны и узнают как охровый триплет, так и амберный. При этом активность охровых супрессоров очень низка (меньше 10% от нормы), в отличие от амберных супрессоров, активность которых нередко выше 70% [2, 8, 10].

Исходя из сказанного, полученные нами данные можно интерпретировать следующим образом: при мутагенной обработке клеток, содержащих охровый супрессор, возникают с определенной частотой мутации и в супрессорном гене. Такие мутации нередко приводят к полной утрате клеткой ее супрессорной активности (табл. 5). Такая клетка не супрессирует ни охровые, ни амберные мутации, несмотря на наличие адсорбционной и фагопродуцирующей способности. Это проверялось определением адсорбции амберного фага (табл. 3) и проведением эксперимента по одиночному циклу размножения диких типов фагов Т2 и Т4. По имеющимся у нас данным, такие клетки не супрессируют и УГА мутации.

В некоторых случаях мутация может затронуть антикодоновый участок гена Т-РНК. Иногда такая одноступенчатая мутация может привести к замене охрового триплета УАА в амберный УАГ. Возникшие конвертанты должны утратить охра-супрессирующую активность и приобрести более высокую амбер-супрессирующую активность, как это отмечалось для 10 полученных нами мутантов (табл. 4 и 5).

Такая конверсия охрового триплета в амберный в антикодоне

Т-РНК, по-видимому, приводит к изменению сродства Т-РНК и информационной РНК на рибосомах, как об этом свидетельствуют наши данные по анализу стрептомициновой супрессии для наших мутантов и ряда супрессорнесущих бактериальных штаммов [4].

Представленные здесь дополнительные данные о конверсии охрового супрессора в амберный [5], а также по характеристике стрептомициновой супрессии [4] могут пролить свет на механизмы естественной терминации биосинтеза белка.

Институт экспериментальной биологии
АН АрмССР, лаборатория молекулярной
генетики

Поступило 30.I 1969 г

Մ. Գ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

ՕԽՐԱ ՍՈՒՊՐԵՍՍՈՐԻ ԿՈՆՎԵՐՍԻԱՆ ԱՄԲԵՐԻ

Ա. մ. փ. n. փ. n. ւ. մ

Առաջին անգամ նկարագրված է օխրա սուպրեսորի կոնվերսիան ամբերի: Տրված է ստացված կոնվերտանտների առաջնային բնութագրերը: Ստացված արդյունքները բնարկում են սպիրտակուցների սինթեզի բնական տերմինացիայի տեսանկյան տակ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адамс М. Бактериофаги, М., ИЛ, 1961.
2. Аракелов Г. М., Шахназарян А. С., Оганесян М. Г. Материалы первой научной конференции, посвященной 50-летию Великой Октябрьской Социалистической революции, АН АрмССР, стр. 23, 1967.
3. Оганесян М. Г. Там же, стр. 29.
4. Оганесян М. Г., Джанполадян Л. О. Материалы второй научной конференции АН АрмССР, стр. 6, 1968.
5. Оганесян М. Г., Джанполадян Л. О., Акопян Л. Г. Там же, стр. 8.
6. Оганесян М. Г., Мугнecян Э. Г. Биологический журнал Армении, т. 20, 11, стр. 72, 1967.
7. Brenner S., Barnett L., Katz E. R., Crick F. H. C. Nature, V. 213, 5075, p. 449, 1967.
8. Brenner S. and Beckwith J. R. J. Mol. Biol., V. 13, p. 629, 1965.
9. Brenner S., Stretton A. O. W. and Kaplan S. Nature, V. 206, 4988, p. 994-1965.
10. Garen A. Science, V. 160, № 3824, p. 149, 1968.
11. Goodman H. M., Abelson J., Landy A., Brenner S. and Smith J. T. Nature, V. 217, № 5133, p. 1019, 1968.
12. Ohlson B. M., Strigini P. F., Beckwith J. R. J. Mol. Biol., V. 36, № 2, p. 209, 1968.
13. Pirson S. and Osborn M. Proc. Nat. Acad. Sci. US, V. 60, 3, p. 1030, 1968.