

М. Г. ОГАНЕСЯН, Л. О. ДЖАНПОЛАДЯН

КОНВЕРСИЯ АМБЕРНОГО СУПРЕССОРА Su_{III} В ОХРОВЫЙ

Генетическая информация записана в непрерывной последовательности нуклеотидов, а реализуется она дискретно в виде отдельных молекул генопродукта. Очевидно, что в непрерывной записи генетической информации должны быть знаки препинания, указывающие начало и конец каждого гена. Из 64 триплетов генетического кода 5 играют роль таких знаков препинания. Из них 2 (УАГ и ГУГ) указывают на начало считывания информации с данного гена и получили название иницирующих триплетов или кодонов [11, 14]. Остальные 3 (УАА—охра, УАГ—амбер, УГА) указывают на место завершения считывания и получили название бессмысленных кодонов, поскольку они лишены аминокислотного смысла, т. е. не кодируют ни одну из известных аминокислот [13, 15].

В *in vitro* экспериментах в бесклеточной белоксинтезирующей системе все 3 бессмысленных триплета обрывают процесс считывания генетической информации [9, 13, 15, 16]. Однако остается неясным, все три триплета используются *in vivo* для естественного завершения процесса считывания генетической информации или в живых системах имеется предпочтительный терминирующий кодон, который используется чаще, чем два других. Ценную информацию по этому вопросу можно получить в экспериментах по супрессии мутаций, связанных с наличием в мутационном сайте одного из бессмысленных кодонов. Для этих экспериментов требуются изогенные штаммы, отличающиеся только по типу супрессора. Задача настоящей работы получить такие штаммы и провести их предварительное исследование.

Мы уже сообщали о получении конверсии амберного супрессора в охровый [4] и охрового супрессора в амберный [3]. Несколько позже конверсия первого типа (амбер→охра) была получена в двух американских лабораториях независимо друг от друга [17, 18]. В данном сообщении представлены данные по предварительному изучению мутантов, претерпевших конверсию амберного супрессора в охровый.

Материалы и методы. В работе использованы мутанты фагов и бактерий из Кембриджской и Стенфордской коллекций, а также полученные в Институте атомной энергии им. И. В. Курчатова и в нашей лаборатории [2, 3, 4]. Среды и методы, использованные в работе, описаны Адамсом [1].

Экспериментальная часть и обсуждение. Штамм *E. coli* CA265, который использован в настоящей работе, имеет генотип: *lac L₁₂₅ try^r*

$Su_{III}^+ Sm-s (\lambda)$ [6]. Иными словами, штамм генотипически лактозонебращивающий и не синтезирующий триптофан. Однако благодаря наличию амберного супрессора Su_{III} фенотипически штамм сбращивает лактозу и синтезирует триптофан, поскольку мутация $lac L_{125}$ это амберная мутация в β -галактозидазном гене (Z -ген) лактозного оперона. Мутация в триптофановом опероне тоже класса амбер.

У штамма SA265 получены лактозонебращивающие мутанты (лакт-мутанты 4), которые могут быть результатом следующего:

1. Получена новая лак⁻ мутация в любом из 3 структурных генов лак-оперона, которая не подавляется амберным супрессором Su_{III} .
2. Инактивирован (или утрачен) Su_{III} ген, подавляющий (супрессирующий) исходную мутацию $lac L_{125}$, и последняя проявляется.
3. Исходный амберный супрессор Su_{III} изменен так, что теперь «читает» не амберный, а другой (охра—или УГА) триплет, т. е. произошло превращение (конверсия) одного супрессора (амберного) в другой (например, в охровый).

Для выбора между этими возможностями мы использовали наличие второй амберной мутации в геноме бактерии (tryp⁻ мутация). Наличие или отсутствие супрессии по триптофансинтетазному гену определялось по росту мутантов на соответствующих лимитирующих средах. Результаты таких экспериментов представлены в табл. 1.

По характеру роста на лимитирующих средах проверенные мутанты можно разделить на две группы. В первой оказались мутанты, растущие на средах M9+a, M9+b, M9+a+г, M9+b+в и M9+b+г. Ко второй группе отнесены мутанты, не растущие на этих средах.

Очевидно, что мутанты первой группы (таких мутантов 26) сохранили активность супрессора. Это по волеет им подавлять действие амберных мутаций как в гене β -галактозидазном, так и в триптофансинтетазном.

Во второй группе оказались мутанты (всего 6), которые не росли на лимитирующих средах. Из этого можно было бы заключить, что они несут инактивированный супрессор. Однако в этой же группе могут оказаться мутанты, несущие конвертированный супрессор, который не подавляет (или подавляет с малой эффективностью) амберные мутации.

Для подтверждения того, что 26 мутантов сохранили амберный супрессор, а также для уточнения природы остальных 6 мутантов, проверялась способность всех мутантов подавлять амберные, охровые и УГА мутации у бактериофага T4. Результаты такой проверки представлены в табл. 2.

Сопоставление табл. 1 и 2 показывает, что 26 мутантов, которые в той или иной степени росли на лимитирующих средах, действительно сохранили амберный супрессор Su_{III} , так как они супрессируют соответствующие амберные мутации (H-17, H-37 и H3-54) и не супрессируют охровые и УГА мутации фага T4. (Эти мутанты не супрессируют амберный мутант H2-36, так как последний супрессируется только специфическим амберным супрессором Su_{III}). Остальные 6 мутантов, как

Таблица 1

Рост лак⁻ мутантов на лимитирующих синтетических средах и на индикаторной среде Эндо

Название мутанта	Характер роста на средах							
	Эндо	M9+a	M9+b	M9+a+b	M9+a+g	M9+v	M9+b+v	M9+b+g
УФ9-25/265	лак ⁻	+	-	++	-	-	-	-
ТФ19-22/265	лак ⁻	-	-	++	+	-	-	-
УФ12-14/267	лак ⁻	+	-	++	+	-	+	-
УФ19/265	лак ⁻	+	-	++	+	-	+	-
УФ11-4/265	лак ⁻	-	-	+	-	-	-	-
Сп10-31/265	мук	+++	++	+++	+++	-	+++	++
АК1-18/265	мук	+++	++	+++	+++	-	+++	+++
УФ3-22/265	мук	+++	-	+++	-	-	+	+
АК5-23a/265	мук	+	+	++	++	-	+	++
УФ 8/265	мук	+++	-	+++	+++	-	+++	+++
УФ 22/265	лак ⁻ /Л	++	++	++	+	-	++	+
Сп-31/265	лак ⁻ /Л	++	+	+++	+	-	++	+
ГА 13/265	лак ⁻	-	-	++	-	-	-	-
АК1-18a/265	лак ⁻ /Л	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++
УФ 10/265	мук	+++	+	+++	+++	-	+++	+
Сп7-31/265	лак ⁻ /Л	++	-	+++	+	-	++	+
УФ10-22/265	мук	+++	++	+++	+++	-	+++	+++
УФ 22б/265	лак ⁻ /Л	+	+	+++	+++	-	++	+
ГА15-60a/265	лак ⁻ /Л	+++	++	+++	+++	-	++	++
УФ32-29/265	мук	+	+	+++	+++	-	+++	+++
АК1-18/265	лак ⁻ /Л	+++	+	+++	+++	-	++	++
УФ2-/265	лак ⁻ /Л	+	+	+++	+++	-	++	++
УФ 6в/265	лак ⁻ /Л	+++	+	+++	+++	-	++	++
АК8-46/265	лак ⁻ /Л	+	++	+++	+++	-	++	+
ГА14-60/265	лак ⁻ /Л	+	+	+++	+++	-	++	++
ГА11-60a/265	лак ⁻ /Л	++	++	+++	+++	-	++	++
УФ 13/265	лак ⁻	+++	+++	+++	+++	-	лак ⁻	+
УФ 22а/265	лак ⁻ /Л	+++	++	+++	+++	-	++	+++
ГА 7/265	лак ⁻ /Л	+++	++	+++	+++	-	++	+++
АК11-4/265	лак ⁻ /Л	+++	+	+++	+++	-	++	+++
Сп1-18/265	лак ⁻ /Л	+++	+	+++	+++	-	++	+++
УФ5-22/265	лак ⁻	+++	++	+++	+++	-	+++	+

Обозначения: лак⁻ — не сбраживает лактозу, лак⁻/Л — слабое сбраживание лактозы, мук — обильное ослизнение колоний, +++ — обильный рост, ++ — рост, + — слабый рост, — — отсутствие роста, а — 0,4% глюкозы, б — 3,0% лактозы, в — 40 мкг/мл — триптофана, г — 40 мкг/мл — пролина, № 9 — синтетическая среда по Адамсу [1].

и ожидалось, разделились на 2 подгруппы. В первой подгруппе оказались мутанты УФ9-25/265, УФ19-22/265, УФ12-14/265, УФ19/265, которые не супрессируют или слабо супрессируют амберные мутации фага Т4, не супрессируют УГА и супрессируют охровые мутации. Во второй подгруппе оказалось 2 мутанта (УФ11-4/265 и ГА13/265), которые не супрессируют ни амберные, ни охровые, ни УГА мутации, хотя сохраняют фагопродуцирующую способность, о чем свидетельствует рост диких типов фагов Т2 и Т4 на тех же мутантах.

Отсюда был сделан вывод о том, что проверенные 32 лак⁻ мутанта штамма SA265 распределяются в три группы:

Таблица 2

Супрессия амберных, охровых и УГА мутаций бактериофага Т4 лак⁻ мутантами штамма СА265

Лак ⁻ мутанты штамма СА265	Супрессия мутантов фага						Дикие типы фагов			
	амберные			охровые		УГА		Т4	Т2	
	Н-17	Н-37	Н2-36	Н3-54	ОС-4	ОС-5	У-1			У-2
УФ9-125/265	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+++
УФ19-22/265	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+++
УФ12-14/267	+++	+	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+++
УФ 19/265	+	+	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+++
УФ11-4/265	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
Сп10-31/265	+++	+++	-	+++	+	-	-	-	+++	+++
АК1-18/265	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
УФ3-22/265	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
АК5-23а/265	+	+++	-	++	-	-	-	-	+++	+++
УФ8/265	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
УФ 22/265	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
Сп3-31/265	+++	++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
ГА 13/265	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
АК1-18а/265	+++	++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
УФ10/265	+	+	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
Сп7-31/265	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
УФ10-22/265	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
ИФ 226/265	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
ГА15-60а/265	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
УФ32-29/265	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
АК1-18/265	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
УФ2-4/265	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
УФ 6в/265	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
АК8-46/265	+	-	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
ГА14-60/265	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
ГА11-60а/265	-	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
УФ 13/265	+	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
УФ 22а/265	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
ГА 7/265	+++	+++	-	+++	+++	-	-	-	+++	+++
АК11-4/265	+++	-	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
Сп1-18/265	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++
УФ5-22/265	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	+++	+++

Обозначения: +++ — сильная супрессия, ++ — средняя супрессия, + — слабая супрессия, — — отсутствие супрессии.

1. Самая обширная группа (26 мутантов) является следствием новой мутации в лак-опероне, которая не супрессируется неизменным супрессором.

2. Группа из четырех мутантов, у которых произошла конверсия амберного супрессора в охровый, т. е. супрессор утратил способность «читать» амберный кодон УАГ, а «читает» охровый кодон УАА.

3. В этой группе оказалось всего 2 мутанта (УФ11-4/265 и ГА13/265), которые утратили способность супрессировать амберные, охровые и УГА мутации, т. е. несут инактивированный супрессор.

Наибольший интерес представляют мутанты второй группы (кон-

вертанта). У мутантов этой группы амберный супрессор Su_{III} конвертировал в Su -охра. Известно, что гены Su —это гены, под контролем которых синтезируются транспортные РНК [8, 10, 12]. Своеобразие этих т-РНК состоит в том, что они «осмысливают» (узнают) бессмысленные кодоны, для которых в клетке обычно нет соответствующей т-РНК, чем и определяется их терминирующая способность [5, 6, 7, 19]. Поскольку специфичность взаимодействия т-РНК с информационной РНК определяется комплементарным взаимодействием кодона и РНК с антикодоном т-РНК, то естественно предположить, что изменение этой специфичности связано с изменением кодон-антикодонового взаимодействия. Как выше указывалось, амберный (УАГ) и охровый (УАА) кодоны отличаются друг от друга только третьим нуклеотидом триплета Г в случае амбер и А—в случае охра. Из этого следует, что конверсия амберного супрессора в охровый связана с изменением одного нуклеотида в антикодоновом участке соответствующей т-РНК. В нашем случае это тирозин-специфическая т-РНК, поскольку Su —это ген, контролирующий биосинтез именно тирозиновой т-РНК.

Институт экспериментальной биологии
АН АрмССР, лаборатория молекуляр-
ной генетики

Поступило 5.1 1969 г.

Գ. Գ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Լ. Հ. ԶԱՆՓՈՒԱԿՅԱՆ

ԱՄԲԵՐ Su_{III} ՍՈՒԳՐԵՍՈՐԻ ԿՈՆՎԵՐՏԻԱՆ ՕԽՐԱՅԻ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Նկարագրված է ամբեր սուպրեսորի կոնվերսիան օխրայի, բերված են ստացված մուտանտների նախնական ուսումնասիրությունների արդյունքները:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адамс М. Бактериография. М.—Л., 1961.
2. Майсурян А. Н., Ломовская Н. Д. Мол. биология, 2, 389, 1968.
3. Оганесян М. Г. Биологический журнал Армении, XXII, 3, 24, 1969.
4. Оганесян М. Г., Джанполадян Л. О., Акопян Л. Г. Матер. II научн. конф. ИЭБ АН АрмССР, Ереван, 8, 1968.
5. Brenner S., Barnett L., Katz F. R., Crick F. H. C. Nature. 213, 449, 1967
6. Brenner S., Beckwith J. R. J. Mol. Biol., 13, 629, 1965.
7. Brenner S., Stertton A. O. W., Kaplan S. Nature, 206, 994, 1965.
8. Capechi M., Guissin G. Science 149, 417, 1965.
9. Garen A. Science 160, 149, 1968.
10. Gesteland R. F., Salser W., Bolle A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 59, 2036, 1967.
11. Ghosh H. P., Söll D., Khorana H. J. J. Mol. Biol., 25, 275, 1967.
12. Goodman H. M., Abelson J., Landy A., Brenner S., Smith J. D. Nature, 217, 1019, 1968.

13. Khorana H G., Buchi H., Ghosh H., Gupta N., Jacob T. M., Kossell H., Morgan R., Narang S. A., Ohtsuka E., Wells R. D. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 39, 1966.
14. Klark B. F. C. m. Marcker K. A. J. Mol. Biol. 17, 349, 1966.
15. Last J. A., Stanley W. M., Sals M., Hille M. B., Wahba A. J., Ochoa S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 57, 1062, 1967.
16. Nirenberg M., Leder R., Bernfield M., Brimacombe R., Trupin J., Rottman F., O'Neal C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA; 53, 1161, 1965.
17. Ohlson B. M., Strigini P. F., Becwith J. R. J. Mol. Biol. 36, 209, 1968.
18. Pirson S., Osborn M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 60, 1030, 1968.
19. Sarabhai A. S., Stretton A. O. W., Brenner S., Bolle A. Nature. 201, 13, 1964.