

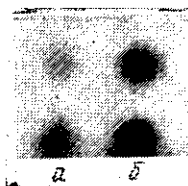
## РЕГУЛЯЦИЯ ЭКЗОГЕННЫМ АДЕНИНОМ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *ADE2* И *ADE1*, КОДИРУЮЩИХ СТРУКТУРУ ДВУХ ФЕРМЕНТОВ ПУРИНОВОГО БИОСИНТЕЗА У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

В. В. Аленин, В. Д. Домкин, А. А. Ковалева, М. Н. Смирнов

Известно, что активность некоторых ферментов, непосредственно участвующих в биосинтезе пуриновых нуклеотидов *de novo*, уменьшается при добавлении аденина в среду культивирования дрожжей [1]. К таким ферментам относятся ФРПФ-амидотрансфераза (КФ 2.4.2.14) [2], АИР-карбоксилаза (КФ 4.1.1.21) [3], САИКАР-синтетаза (6.3.2.6) [3] и аденилосукцинатлиаза (КФ 4.3.2.2) [4]. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* первичную структуру этих ферментов кодируют соответственно гены *ADE4*, *ADE2*, *ADE1* и *ADE13*.

В литературе не существует единого мнения относительно того, на каком из этапов реализации генетической информации осуществляется регуляция активностей указанных ферментов, вызванная экзогенным аденином. Авторы недавно опубликованной работы [5] считают, что в случае гена *ADE4* регуляция, вызванная экзогенным аденином, осуществляется на транскрипционном уровне, поскольку повышение концентрации аденина в культуральной среде приводит к одновременному уменьшению активности ФРПФ-амидотрансферазы и концентрации соответствующей ей мРНК. Авторы работ [3, 4, 6], в которых исследовалось влияние повышенных концентраций аденина в культуральной среде на активности ФРПФ-амидотрансферазы, АИР-карбоксилазы и САИКАР-синтетазы у прототрофного штамма дрожжей 15В-П4 и у полученных из него пуриновых ауксотрофов, полагают, что регуляция осуществляется на посттрансляционном уровне, хотя и не исключают возможности других механизмов регуляции.

Нами проведено изучение влияния экзогенного аденина на экспрессию генов *ADE2* и *ADE1*. Клетки прототрофного штамма 15В-П4 выращивали, как описано в работе [3], в нерепрессибельных (среда ПЕПФО) и репрессибельных (среда ПЕПФО, содержащая 0,5 г/л аденина) условиях до середины логарифмической фазы роста. Выделенную из дрожжевых клеток полиаденилированную мРНК [7] наносили на нитроцеллюлозные фильтры по методу [8]. В точку брали от 0,5 до 8 мкг полиаденилированной мРНК. Гибридизацию с радиоактивными зондами, имеющими удельную радиоактивность  $(1,5-3) \cdot 10^7$  имп/мин на мкг ДНК, проводили по описанным методикам [7]. В качестве зондов использовали фрагменты структурной части генов



Радиоавтограф дот-блот-гибридизации полиаденилированной мРНК, выделенной из клеток дрожжей, выращенных на средах ПЕПФО (П) и ПЕПФО, содержащей 0,5 г/л аденина (П+А). В точку наносили по 4 (а) и 8 мкг (б) полиаденилированной мРНК, выделенной с помощью хроматографии на олиго(dT)-целлюлозе. В качестве зонда использовали *HindIII-EcoRI*-фрагмент структурной части гена *ADE1* [9], меченный  $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{-dCTP}$

Dot-blot-hybridization of polyadenylated mRNA from the yeast cells grown on PEPP (P) and PEPP with 0.5 g/l of adenine (P+A) media. 4 µg (a) and 8 µg (b) of polyadenylated mRNA purified by the oligo(dT)-cellulose chromatography was applied to each dot. The  $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{-dCTP}$  labelled *HindIII-EcoRI* fragment of the structural part of the *ADE1* gene [9] was used as a probe

*ADE2* и *ADE1*, которые метили методом ник-трансляции, используя дезоксицитидин-5'- $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})$ трифосфат. Типичный радиоавтограф дот-блот-гибридизации мРНК, выделенной из клеток, выращенных в репрессибельных и нерепрессибельных условиях, представлен на рисунке.

Результаты гибридизации показали, что концентрация матриц, необходимых для трансляции как АИР-карбоксилазы, так и САИКАР-синтетазы в условиях репрессии примерно в два раза ниже, чем в нерепрессибельных условиях. При репрессии наблюдается также и уменьшение активностей АИР-карбоксилазы [3] и САИКАР-синтетазы [3] примерно в два раза. Поскольку концентрация матриц определяется соотноше-

нием скоростей их синтеза и распада, то одновременное уменьшение активностей указанных ферментов и концентраций соответствующих им мРНК является результатом предтрансляционных событий. Наиболее вероятно, что в условиях репрессии уменьшается количество матриц, транскрибирующихся с генов *ADE2* и *ADE1*. Однако нельзя исключить, что регуляция, вызванная экзогенным аденином, осуществляется на более поздних предтрансляционных этапах, связанных с созреванием и деградацией мРНК.

Следует отметить, что в использованных нами условиях репрессии наблюдается примерно двукратное уменьшение активностей ФРПФ-амидотрансферазы [6] и аденилосуцинатазы [4]. Полученные результаты дают основание предположить, что экспрессия четырех генов — *ADE4*, *ADE2*, *ADE1* и *ADE13* — а, возможно, и других генов пуринового биосинтеза одновременно регулируется экзогенным аденином на транскрипционном уровне.

Авторы признательны А. П. Перевозчикову и В. Н. Яковлеву за консультации и помощь в освоении ряда методик, а также А. Н. Мясникову за предоставленные штаммы бактерий *E. coli*, несущие гены *ADE2* и *ADE1* в составе мультимерных плазмид, и Ю. В. Андрейчуку за помощь в работе по получению зондов.

#### REGULATION OF EXPRESSION OF ADE2 AND ADE1 GENES CODING FOR THE STRUCTURE OF TWO YEAST SACCHAROMYCES CEREVISIAE PURINE BIOSYNTHESIS ENZYMES BY EXOGENOUS ADENINE

V. V. Alenin, V. D. Domkin, A. A. Kovaleva, M. N. Smirnov

Biological Institute of A. A. Zhdanov University, Leningrad

#### Summary

Exogenous adenine has been studied for its influence on the expression of *ADE2* and *ADE1* genes coding for the primary structure of enzymes: AIR-carboxylase (EC 4.1.1.21) and SAICAR-synthetase (EC 6.3.2.6) in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. It is shown that under the repression conditions (cultivation of yeasts on the complete PEPP medium containing 0.5 g/l of adenine, concentration of mRNAs necessary for translation of both AIR-carboxylase and SAICAR-synthetase is lower than under nonrepressed conditions (PEPP medium). The activities of the mentioned enzymes are observed to decrease under the repression. The data obtained permit supposing that expression of *ADE2* and *ADE1* genes as well as of two other purine biosynthesis genes — *ADE4* and *ADE13* is regulated simultaneously by exogenous adenine at the transcriptional level.

1. Jones E. W., Fink G. R. Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast // Mol. biology of the yeast *Saccharomyces* metabolism and gene expression / Eds J. M. Strathern, E. W. Jones, J. R. Broach.— New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982.— P. 171—287.
2. Gross T. S., Woods R. A. Regulation of *de novo* purine nucleotide synthesis by enzyme repression in *Saccharomyces cerevisiae* // Heredity.— 1972.— 28, pt 2.— P. 275.
3. Изучение регуляции биосинтеза пуринов у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Д. Э. Дрейлиня, А. Х. Фундули, Т. С. Тюлякова и др. // Вестн. Ленингр. ун-та.— 1981.— 2, № 9.— С. 93—97.
4. Регуляция экзогенным аденином активности ферментов биосинтеза пуриновых нуклеотидов *de novo* у дрожжей // В. В. Аленин, В. Д. Домкин, В. В. Спреенко, М. Н. Смирнов // Тез. докл. III Всесоюз. конф. «Биосинтез ферментов микроорганизмами».— Кобулетн, 1986.— С. 154.
5. Mantsala P., Zalkin H. Nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* *ADE4* encoding glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase // J. Biol. Chem.— 1984.— 259, N 13.— P. 8478—8484.
6. Влияние мутаций, затрагивающих биосинтез пуринов *de novo* на активность фермента ФРПФ-амидотрансферазы у дрожжей / Д. Э. Дрейлиня, Т. С. Тюлякова, Т. Р. Соидла и др. // Вестн. Ленингр. ун-та.— 1981.— 1, № 3.— С. 117—118.
7. Маннагис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 479 с.
8. Determination of tissue-type plasminogen-activator mRNA in human and non-human cell lines by dot-hybridization / G. Opdenakker, A. Billian, G. Volckaert, P. De Somer // Biochem. J.— 1985.— 231, N 2.— P. 309—313.
9. Нуклеотидная последовательность гена *ADE1* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / А. П. Мясников, Ю. А. Плавник, К. В. Саснаускас и др. // Биоорг. химия.— 1986.— 12, № 4.— С. 555—558.

ЛГУ им. А. А. Жданова

Получено 23.01.87