

16. Thiele C. J., Reynolds C. P., Israel M. A. Decreased expression of *N-myc* precedes retinoid-acid induced morphological differentiation of human neuroblastoma // *Nature*.— 1985.—313, N 6001.— P. 406—409.

Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва
Центр. н.-и. кожно-венеролог. ин-т МЗ СССР, Москва

Получено 12.01.86

УДК 577.152

ГЕНЫ ПУРИНОВОГО БИОСИНТЕЗА ДРОЖЖЕЙ СОДЕРЖАТ РЕГУЛЯТОРНЫЕ СИГНАЛЫ СИСТЕМЫ ОБЩЕГО КОНТРОЛЯ БИОСИНТЕЗА АМИНОКИСЛОТ

А. Н. Мясников, М. Н. Смирнов

В последние годы значительный интерес привлекает исследование механизмов регуляции биосинтеза ферментов анаболизма аминокислот в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* [1]. Для нескольких групп ферментов, каждая из которых обеспечивает синтез одной или двух-трех метаболически тесно связанных аминокислот, показано наличие двух систем такой регуляции: специфической, заключающейся в усилении биосинтеза ферментов анаболизма определенной аминокислоты в ответ на голодание по этой аминокислоте, а также неспецифического регуляторного механизма, при посредстве которого недостаток одной аминокислоты приводит к усилению продукции ферментов биосинтеза большой группы аминокислот. В литературе этот механизм получил название «общего контроля биосинтеза аминокислот» [1]. Идентифицирован ряд генов, участвующих в этой регуляторной системе, причем ключевым среди них оказался ген *GCN4*. Этот ген транскрибируется в мРНК необычного строения, скорость трансляции которой усиливается в условиях аминокислотного голодания [2, 3]. Белок — продукт гена *GCN4* — непосредственно связывается с регуляторными участками промоторов многих генов аминокислотного анаболизма, узнавая в них короткую последовательность нуклеотидов TGACTC, и активирует транскрипцию этих генов [4, 5].

Значительно слабее изучена регуляция экспрессии генов, обеспечивающих биосинтез пуриновых нуклеотидов в дрожжах [1]. Только для одного гена пуринового биосинтеза — гена *ADE4* показано, что уровень его транскрипции регулируется концентрацией аденина в питательной среде [6]. Предположив, что гены пуринового биосинтеза также могут иметь общую систему координированной регуляции, мы провели сравнение нуклеотидных последовательностей промоторных областей этих генов для выделения в них повторяющихся участков — кандидатов на роль сайтов узнавания гипотетического регуляторного белка.

В настоящее время известна нуклеотидная последовательность трех генов пуринового биосинтеза: *ADE4* [6], *ADE2* [7], а также *ADE1*. Структура последнего установлена нами и полностью публикуется отдельно. Нуклеотидная последовательность промоторной области гена *ADE1* приведена на схеме 1. Представлена кодирующая нить ДНК. Нумерация нуклеотидных остатков от предполагаемого АТГ-кодона. Фрагмент, повторяющийся в промоторах генов пуринового биосинтеза, выделен.

```
ТАТТС АСГАГТСАГТ СТГАСТСТТГ СГАГАГАТГА — 20
GGATGTAATA АТАСТААТСТ СГААГАТGCC АТСТААТАСА ТАТАГАСАТА —151
ТАТАТАТАТА ТАТАТАТАСА ТТСТАТАТАТ ТСТТАСССАГ АТТСТТТГАГ —101
GTAAGACGGT TGGGTTTTAT СТТТТГСАГТ ТGGТАСТАТТ ААГААСААТС —51
GAATCATAAG САТТГСТТАС АААГААТАСА САТАСГАААТ АТТААСГАТА АТГ
```

Поиск совпадающих фрагментов в промоторных областях трех перечисленных генов позволил выделить консервативный фрагмент TGACTCTT, встречающийся во всех трех промоторах (в гене *ADE2* он повторяется дважды), причем этот фрагмент всегда обнаруживается на расстоянии от 150 до 350 п. о. от АТГ-кодона, т. е. как раз в том районе, где обычно обнаруживаются регуляторные участки дрожжевых промоторов. На схеме 2 представлены консервативные участки в промоторах генов пуринового биосинтеза. Приведены также участок промотора гена *HIS1*, содержащий идентичный

фрагмент последовательности, и консенсус регуляторного участка генов, входящих в систему общего контроля биосинтеза аминокислот. Нуклеотидные остатки пронумерованы от АТГ-кодона. Как показывает несложный расчет, вероятность того, что отмеченные совпадения носят случайный характер, весьма мала. Наиболее интересным и неожиданным оказалось то, что повторяющаяся в генах пуринового биосинтеза последовательность включает в себя консенсус регуляторной последовательности генов биосинтеза аминокислот TGACTC, причем в промоторах генов *HIS1* и *HIS3* — типичных представителей генов, регулируемых общей системой контроля биосинтеза аминокислот — присутствует точный повтор октануклеотидного консервативного фрагмента пуриновых генов [1, 4]. Более того, для гена *HIS3* экспериментально было показано, что именно этот фрагмент последовательности отвечает за регуляцию его транскрипции [1].

—230	—220	—210	—200	
»	»	»	»	
TTCACGAGTCAGTCTGACTCTTGCAGAGATGAGGA				<i>ADE 1</i>
	—200	—190	—180	
	»	»	»	
GCTATGCCGACAAATGACTCTTGTTCAGGGCTACG				<i>ADE 2</i>
	—150	—140	—130	—120
	»	»	»	»
TAATATTAAGTGATTGACTCTTGCTGACSTTTTATT				<i>ADE 2</i>
—370	—360	—350	—340	
»	»	»	»	
ATGACCCGATGTATTGACTCTTCCTGACCGAAAATA				<i>ADE 4</i>
	—280	—270	—260	—250
	»	»	»	»
CATTGATAACAGCGTGACTCTTCCCGGAAATTCTTT				<i>HIS 1</i>
TGACTC				

Перечисленные выше факты дают веское основание для предположения, что в сферу действия системы общего контроля биосинтеза аминокислот попадают также и гены пуринового биосинтеза. Это предположение вполне поддается экспериментальной проверке, и в том случае, если оно подтвердится, можно будет говорить уже не о системе общего контроля биосинтеза аминокислот, а как о системе регуляции биосинтеза ферментов по крайней мере двух анаболических путей.

Авторы выражают признательность М. А. Рахману за составление программы для ЭВМ, использованной в настоящей работе; В. Д. Домкину, Д. А. Горденину, А. П. Перевозчикову и К. В. Останину — за плодотворные советы и дружескую критику.

THE YEAST PURINE BIOSYNTHESIS GENES CONTAIN REGULATORY SIGNALS OF THE GENERAL AMINO ACID CONTROL

A. N. Myasnikov, M. N. Smirnov

Department of Genetics of the A. A. Zhdanov State University, Leningrad

Summary

The promoters of three genes coding for enzymes of purine biosynthesis pathway — *ADE1*, *ADE2* and *ADE4* contain a conservative octanucleotide fragment of sequence TGACTCTT. This fragment includes a perfect copy of a consensus sequence for the regulatory site at which the GCN4 gene product binds to the promoters of genes regulated by the general amino acid control — TGACTC.

1. Jones E. W., Fink G. R. Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast // *Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces* / Eds S. N. Strathern, B. W. Jones, S. R. Broach. — New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982. — P. 181—299.
2. Thireos G., Penn M. D., Greer H. 5'-untranslated sequences are required for the translational control of a yeast regulatory gene // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1984. — 81, N 16. — P. 5096—5100.
3. Hinnebusch A. Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast // *Ibid.* — N 20. — P. 6442—6446.

4. Hinnebusch A. G., Fink G. R. Repeated DNA sequences upstream from *HIS1* also occur at several other co-regulated genes in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem.—1983.—258, N 8.—P. 5238—5247.
5. Struhl K. Constitutive and regulatory promoter: evidence for two distinct molecular mechanisms // Molecular biology of yeast / Ed. J. Hicks.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1985.—P. 361.
6. Manisala P., Zalkin H. Nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae ADE4* gene encoding glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase // J. Biol. Chem.—1984.—259, N 13.—P. 8478—8484.
7. Ген *ADE2* дрожжей: первичная структура и рекомбинационное картирование / А. С. Краев, М. В. Миронова, К. В. Саснаускас и др. // 16-я Конф. ФЕБО: Тез. докл.—М., 1984.—С. 382.

ЛГУ им. А. А. Жданова

Получено 2.01.85

УДК 577.214.622

ПРИСУТСТВИЕ ДВУХ СИЛЬНЫХ ПРОМОТОРОВ ОПРЕДЕЛЯЕТ ОРИЕНТАЦИЮ ФРАГМЕНТА ДНК ПРИ ВСТРАИВАНИИ В ПЛАЗМИДУ *pUC19*

Е. Б. Патон, А. Н. Живолуп, Л. А. Вараница

В предыдущих сообщениях [1, 2] мы показали, что встраивание гена *groB* *E. coli* при клонировании в нитевидных фагах (производные фага *M13*) происходит однонаправленно и приводит к образованию нестабильных рекомбинантных фагов. Было также установлено, что стабильность фагов увеличивается при удалении сильного промотора P_{β} , содержащегося во встроеном фрагменте ДНК. Для выяснения причин, вызывающих однонаправленную ориентацию данного фрагмента и нестабильность рекомбинантных фагов, нам представлялась целесообразной попытка клонирования данного фрагмента ДНК, включающего гены *groB*, *rplI* и *rplL* вместе с промоторами P_{β} и $P_{\beta'}$, направляющими транскрипцию этих генов, в плазмиде *pUC19*, сочетающей в себе свойства *pBR322* и фага *M13mp19*.

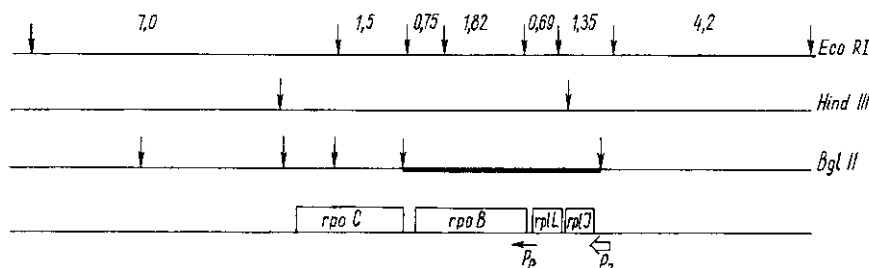


Рис. 1. Физико-генетическая карта космиды *pJC703*. *groB*, *groC*, *rplI*, *rplL* — гены, кодирующие синтез β - и β' -субъединиц РНК-полимеразы *E. coli* и рибосомных белков *L10* и *L7/L12* соответственно. Стрелками обозначены сайты узнавания рестриктазами *EcoRI*, *HindIII* и *BamHI*. Клонированный в *pUC19* *BglIII*-фрагмент выделен жирной линией. Цифрами обозначены величины фрагментов в Мдальтонах.

Fig. 1. A physico-genetic map of the cosmid *pJC703*. *groB*, *groC*, *rplI*, *rplL* — genes encoding β and β' subunits of *E. coli* rRNA polymerase and ribosomal proteins *L10* and *L7/L12*, respectively. P_{β} and $P_{\beta'}$ — promoters. Arrows mark recognition sites for *EcoRI*, *HindIII* and *BamHI*. The cloned *BglIII* fragment is given in bold line. Figures designate fragments' length (MDalton).

Источником клонируемого *BglIII*-фрагмента ДНК послужила космида *pJC703* [3], физико-генетическая карта которой приведена на рис. 1. 0,8 мкг плазмиды *pJC703*, расщепленной рестриктазой *BglIII*, лигировали с 0,3 мкг расщепленной *BamHI* ДНК *pUC19* и использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli JM101* [4]. Реакции рестрикции, лигирования, получение компетентных клеток и трансформацию их проводили по стандартным методикам, описанным в [5]. Для отбора рекомбинантных клонов *E. coli* мы воспользовались тем обстоятельством, что клонируемый ген