

В. И. Титоренко, А. А. Сибирный

УГЛЕРОДНАЯ КАТАБОЛИТНАЯ ИНАКТИВАЦИЯ У ДРОЖЖЕЙ — ВАЖНЫЙ СПОСОБ РЕГУЛЯЦИИ НА ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОМ УРОВНЕ

В обзоре обобщены основные закономерности функционирования в дрожжевых клетках углеродной катаболитной инактивации. Предложена новая интерпретация физиологического смысла этого регуляторного механизма. Представлены данные о роли сАМР, протеинкиназ и вакуолярных протеиназ в регуляции углеродной катаболитной инактивации у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и метилотрофных дрожжей. Описан уникальный механизм деградативной инактивации, действующий у метилотрофных дрожжей и связанный со «слиянием» пероксисом с вакуолями с последующей деградацией пероксисомальных ферментов. Отмечается, что генетический контроль углеродной катаболитной инактивации, а также молекулярные механизмы этого процесса для большинства ферментов не изучены.

В ответ на изменение состава питательной среды в клетках микроорганизмов регулируются как скорость синтеза ферментов (медленнodelствующий контроль), так и посттрансляционные события (быстродействующий контроль) [1, 2]. Быстродействующий контроль может обеспечиваться: 1) модуляцией активностей ферментов при нековалентном обратимом связывании низкомолекулярных лигандов-эффекторов, в том числе субстратов и продуктов регулируемой ферментативной реакции и метаболитов-индикаторов физиологического состояния клетки [3—6]; 2) ковалентной обратимой или необратимой модификацией ферментов [3, 7]; 3) ограниченным или тотальным протеолизом ферментов-мишеней, который часто следует за контролируемой модификацией структуры этих ферментов [8—10]; 4) белок-белковым взаимодействием, подробно изученным на примере «эпиаргиназной регуляции» [4].

Частный случай изменения состава питательной среды — появление в ней быстро усваиваемого источника углерода вместо медленно утилизируемого субстрата. В микробных клетках функционирует ряд адаптационных механизмов, позволяющих в этих условиях предотвратить метаболизм медленно усваиваемого соединения и действующих, следовательно, в целях клеточной экономии [2, 11, 12]. Одним из таких механизмов адаптации является очень быстрое и (как правило) необратимое уменьшение активностей ферментов. Этот механизм получил название «селективная инактивация» и, по определению, включает два типа инактивации: модификационную (уменьшение активности фермента в результате изменения его нативной конформации или ковалентной модификации, что в ряде случаев сопровождается диссоциацией кофакторов этого фермента) и деградативную (утрата ферментативной активности при ограниченном или тотальном протеолизе фермента-мишени) [13—15].

Классический пример селективной инактивации — быстрое уменьшение активностей ряда ферментов глюконеогенеза при переносе клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* из среды с неферментируемыми источниками углерода в среду с глюкозой (или другим ферментируемым сахаром). Подобный тип селективной инактивации получил название «катаболитная инактивация» [12]. Со времени написания единственного обзора, посвященного углеродной катаболитной инактивации у дрожжей [12], прошло уже 13 лет. Накоплен значительный экспериментальный материал о молекулярных механизмах этого регуляторного феномена и особенностях его проявления у дрожжей разных видов. Поэтому основная задача настоящего обзора заключается в критическом обобщении накопленных за более чем десятилетний период экспериментальных данных и попытке сформулировать основные закономерности функционирования углеродной катаболитной инактивации в клетках дрожжей.

Ферменты-мишени катаболитной инактивации и ее физиологический смысл. По определению, физиологический смысл катаболитной инактивации глюкозой у дрожжей *S. cerevisiae* состоит в избирательной инактивации ферментов, не являющихся в присутствии этого сахара необходимыми для роста, поскольку такие ферменты катализируют образование метаболитов, независимо и очень быстро образующихся также из глюкозы [12]. Действительно, мишенями катаболитной инактивации у *S. cerevisiae* являются: 1) ферменты глюконеогенеза (инактивация которых предотвращает «футильный цикл» адениловых нуклеотидов, приводящий к превращению АТФ в АДФ и Р_i в реакциях, катализируемых фосфофруктокиназой и фруктозо-1,6-бисфосфатазой) — фруктозо-1,6-бисфосфатаза [16, 17] и фосфоенолпируваткарбоксикиназа [18—20]; 2) анаэробный фермент цитоплазматическая (но не митохондриальная) малатдегидрогеназа [21—24]; 3) локализованный в глиоксисомах ключевой фермент анаэробного глиоксилатного цикла, изоцитратлиаза [25]; 4) некоторые митохондриальные ферменты цикла трикарбоновых кислот и дыхательной цепи переноса электронов — сукцинатдегидрогеназа и цитохром *c* оксидаза [26]; 5) системы транспорта в клетку галактозы и мальтозы [27—30]. Интересно отметить, что в отличие от изоцитратлиазы другой локализованный в глиоксисомах фермент глиоксилатного цикла, малатсинтаза, не подвержен катаболитной инактивации [31]. Невыясненным остается физиологический смысл вызываемой глюкозой катаболитной инактивации некоторых ферментов *S. cerevisiae*, которые не катализируют реакции центральных путей углеродного метаболизма, — уридиннуклеозидазы [32], аминоклепептидазы *ysc1* [33], одной из изоформ α -изопропилмалатсинтазы [34].

Глюкоза (и некоторые другие ферментируемые сахара) вызывают катаболитную инактивацию не только у *S. cerevisiae*, но и у других дрожжей: инактивации подвержены фруктозо-1,6-бисфосфатаза *Kluyveromyces fragilis* [35], а также локализованные в пероксисомах ферменты метилотрофных дрожжей (алкогольоксидаза, каталаза, дигидроксиацетонсинтаза, оксидаза *L*- α -гидроксикислот и оксидаза *D*-аминокислот) [15, 36—40]. Напротив, фруктозо-1,6-бисфосфатаза дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* не инактивируется [41].

Глюкоза, вызывающая катаболитную инактивацию, обеспечивает большую скорость роста дрожжей по сравнению с субстратами, ферменты утилизации которых подвержены такой инактивации [2, 12]. У метилотрофных дрожжей *Pichia pinus* этанол вызывает катаболитную инактивацию пероксисомальных ферментов окисления метанола, алкогольоксидазы и каталазы [42, 43], хотя скорость роста этих дрожжей в среде с этиловым спиртом ниже, чем в среде с метиловым спиртом. Интересно, что катаболитной инактивации в среде с этанолом подвержены алкогольоксидаза и каталаза и других видов метилотрофных дрожжей, *Candida boidinii* и *Hansenula polymorpha*, у которых этанол обеспечивает большую скорость роста по сравнению с метанолом [15, 44, 45]. Не исключено, что у метанолусваивающих дрожжей физиологический смысл вызываемой этиловым спиртом инактивации алкогольоксидазы и каталазы состоит в недопущении одновременного присутствия в клетке микротелец двух типов: глиоксисом (где локализованы ключевые ферменты утилизации этанола) и пероксисом (в которых находятся некоторые ферменты окисления и ассимиляции метанола) [43, 46].

Почему у дрожжей катаболитной инактивации подвержены только некоторые ферменты катаболизма углеродных соединений, тогда как посредством катаболитной репрессии регулируется синтез значительно большего числа ферментов, в том числе и тех из них, которые инактивируются [47, 48]? По крайней мере в случае ферментов глюконеогенеза у *S. cerevisiae* дело, по-видимому, в том, что простого угнетения синтеза этих ферментов в среде с глюкозой недостаточно для быстрого нарушения «футильного цикла» превращения АТФ в АДФ и Р_i в связи с чем и требуется их инактивация [12, 49]. В случае же вызываемой

этанолом инактивации только пероксисомальных (но не цитозольных) ферментов утилизации метанола у метилотрофных дрожжей необходимость подобной инактивации обусловлена, возможно, потребностью в быстрой замене одного типа микротелец (пероксисом) другим типом этих органелл (глиоксисомами), в которых локализованы ключевые ферменты усвоения этилового спирта [42, 43]. В случае других ферментов, подверженных катаболической инактивации, пока не совсем ясны причины, по которым репрессия этих ферментов недостаточна для осуществления эффективной регуляции углеродного метаболизма. Можно, однако, думать, что именно эти ферменты являются ключевыми в тех путях метаболизма, функционирование которых угнетается в условиях катаболической репрессии и инактивации, поэтому быстрое уменьшение их активностей посредством инактивации позволяет столь же быстро изменить направление потока углеродных соединений в дрожжевой клетке.

Является ли катаболическая инактивация у дрожжей действительно «катаболической»? Термин «катаболическая инактивация» был предложен, чтобы отразить природу пускового механизма этого процесса: предполагалось, что у дрожжей *S. cerevisiae* при усвоении глюкозы образуются интермедиаты катаболизма этого сахара, инициирующие инактивацию [12]. Оказалось, однако, что у *S. cerevisiae* некоторые неметаболизируемые аналоги глюкозы (из которых не могут образовываться интермедиаты катаболизма этого сахара) вызывают инактивацию фруктозо-1,6-бисфосфатазы *in vivo* [50]. Изучение характера катаболической инактивации у мутантов с блоками различных гликолитических реакций [51, 52], а также определение внутриклеточных пулов интермедиатов гликолиза в условиях катаболической инактивации [53--55] позволили сделать вывод о том, что пусковым сигналом вызываемой глюкозой катаболической инактивации ряда ферментов у *S. cerevisiae* служит не накопление в клетке продуктов катаболизма глюкозы: «включение» инактивации обеспечивают, по-видимому, сами гексозы и/или их монофосфорные эфиры [51, 56].

Напротив, вызываемая этанолом катаболическая инактивация алкогольоксидазы и каталазы у дрожжей *P. pinus* инициируется, вероятно, при появлении в клетке специфических интермедиатов катаболизма этилового спирта; анализ не усваивающих этанол мутантов *P. pinus* позволил предположить, что таким интермедиатом-эффектором является, возможно, глиоксилат [43].

Таким образом, только некоторые типы углеродной катаболической инактивации у дрожжей инициируются специфическими интермедиатами катаболизма соединений, вызывающих такую инактивацию. Тем не менее термин «катаболическая инактивация» по-прежнему широко используется при описании различных типов селективной инактивации ферментов углеродного метаболизма у дрожжей (вне зависимости от того, требуется ли образование в клетке специфических интермедиатов катаболизма для «включения» подобной инактивации). В связи с вышеизложенным, по-видимому, термину «катаболическая инактивация» может быть придано иное по сравнению с исходным трактование: поскольку, как отмечалось ранее, такой инактивации подвержены (за очень небольшими исключениями) ферменты катаболизма углеродных соединений, термин «катаболическая» указывает природу ферментов-мишеней, подлежащих инактивации в дрожжевой клетке.

Кинетика катаболической инактивации ферментов. У дрожжей *S. cerevisiae* кинетика вызываемой глюкозой инактивации *in vivo* фруктозо-1,6-бисфосфатазы имеет двухфазный характер: на первой (быстрой) стадии активность этого фермента уменьшается на 50—70 % в течение 3 мин после добавления глюкозы, затем следует медленная стадия — уменьшение остаточной активности фермента в течение 50—60 мин [57]. Первая стадия такой инактивации является обратимой (т. е. реактивация фермента, вызываемая переносом клеток из среды с глюкозой в среду с ацетатом или этанолом, не ингибируется циклогексими-

дом, а значит не требует биосинтеза белка *de novo*), вторая — необратимой [17, 57]. Подобный двухфазный характер имеет вызываемая глюкозой инактивация изоцитратлиазы у *S. cerevisiae* [58]. Катаболитная инактивация цитоплазматической малатдегидрогеназы в среде с глюкозой на любой стадии является необратимой у *S. cerevisiae* [52]. Также необратимый характер носят поздние стадии вызываемой глюкозой инактивации фосфоенолпируваткарбоксикиназы у *S. cerevisiae* и катаболитной инактивации алкогольоксидазы и каталазы в среде с этанолом у *C. boidinii* [44]; открытым, однако, остается вопрос о наличии обратимой стадии инактивации этих ферментов.

Конкретные молекулярные механизмы быстрой обратимой и необратимой катаболитной инактивации у дрожжей будут обсуждаться далее. Здесь же отметим, что изучение вызываемой глюкозой инактивации глюконеогенетических ферментов у мутантов *S. cerevisiae* с энзиматическими блоками различных реакций гликолиза позволило сделать следующий вывод: для протекания быстрой обратимой фазы инактивации фруктозо-1,6-бисфосфатазы не требуется энергии, получаемой при сбраживании глюкозы и/или дыхания, тогда как необратимая инактивация цитоплазматической малатдегидрогеназы и необратимая стадия инактивации фруктозо-1,6-бисфосфатазы энергозависимы и могут, следовательно, иметь общий механизм [51, 52, 55].

Генетический контроль катаболитной инактивации. Генетический аппарат, контролирующей катаболитную инактивацию у дрожжей, изучен лишь в незначительной степени. По-видимому, это объясняется отсутствием эффективных методов селекции мутантов с блоком такой инактивации. Высказано предположение, что у дрожжей *S. cerevisiae* нарушение катаболитной инактивации ферментов глюконеогенеза должно вести к интенсивному функционированию «футильного цикла» адениловых нуклеотидов, приводящего к превращению АТФ в АДФ и P_i в средах с ферментируемыми сахарами, вызывающими такую инактивацию [12]. Поэтому рост подобных мутантов в среде с глюкозой (и другими ферментируемыми сахарами) должен быть нарушен [59]. Были идентифицированы три таких мутанта *S. cerevisiae*: *fdp* [60], *cif* [61] и *hex1* [31]. Рост их в среде с глюкозой и некоторыми другими ферментируемыми сахарами был частично или полностью нарушен, а инактивация фруктозо-1,6-бисфосфатазы (мутации *fdp*, *cif*, *hex1*) и изоцитратлиазы (мутация *hex1*) блокирована. Биохимический анализ, однако, показал, что первичным процессом, нарушаемым мутациями *fdp* и *cif*, является, по-видимому, не катаболитная инактивация фруктозо-1,6-бисфосфатазы; эти мутации угнетают поглощение и/или метаболизм глюкозы и синтез АТФ в клетке, что в конечном счете ведет к блоку катаболитной инактивации [62—64]. Анализ мутанта *S. cerevisiae hex1* (продуктами гена *HEX1* являются изоэномеры *PII* и *PIIM* гексокиназы) [65—67] позволил предложить предварительную модель участия гексокиназы *PII* в инициации катаболитной инактивации: при наличии своих субстратов и/или продуктов конформация или степень агрегации гексокиназы *PII* изменяется таким образом, что этот белок вызывает инактивацию фруктозо-1,6-бисфосфатазы и изоцитратлиазы, прямо или опосредованно активируя их протеолиз [31]. Интересно отметить, что мутация *hex1* не нарушает вызываемую глюкозой репрессию синтеза фруктозо-1,6-бисфосфатазы и изоцитратлиазы; таким образом, у *S. cerevisiae* пусковые механизмы катаболитной репрессии и инактивации этих двух ферментов неидентичны [31]. В то же время гексокиназа *PII* и/или *PIIM* является регуляторным белком, контролирующим катаболитную репрессию ряда ферментов, не подверженных катаболитной инактивации [68, 69].

Недавно среди коллекции не усваивающих этиловый спирт штаммов метилотрофных дрожжей *P. pinus* выявлены мутанты *acs1*, *acs2*, *acs3* и *icl1*, у которых нарушена вызываемая этанолом катаболитная инактивация алкогольоксидазы и каталазы [42, 43]. Угнетение инактивации пероксисомальных ферментов окисления метанола у этих мутан-

тов обусловлено, вероятнее всего, нарушением образования интермедиата C_2 -метаболизма, инициирующего такую инактивацию (по-видимому, глиоксилата), вследствие энзиматических блоков ацетил-КоА-синтетазы (мутации *acs1*, *acs2*, *acs3*) и изоцитратлиазы (мутация *icl1*). Высказано также предположение о том, что у *P. pinus* изоцитратлиаза (ключевой фермент глиоксилатного цикла) представляет собой регуляторный белок, контролирующей инактивацию алкогольоксидазы и каталазы в среде с этанолом [42, 43] подобно тому, как у *S. cerevisiae* гексокиназа *PII* и/или *PIIM* (ключевой фермент гликолиза) каким-то образом контролирует инактивацию фруктозо-1,6-бисфосфатазы и изоцитратлиазы в среде с глюкозой.

«Алармоны», инициирующие катаболитную инактивацию, и белки, адаптирующие этот сигнал. Поскольку катаболитной инактивации у дрожжей подвержен целый ряд ферментов, катализирующих самые разнообразные реакции, можно ожидать, что одним из элементов пускового механизма такой инактивации является какой-либо универсальный внутриклеточный регулятор спектра физиологических функций (подобные низкомолекулярные регуляторы получили название «знаков» [70] или «алармонов» [71]). Весьма вероятно, что таким вызывающим инактивацию «алармоном» является сАМР, так как известно, что, по-видимому, главной функцией этого циклического нуклеотида в клетках всех эукариотических (но не прокариотических) организмов является активация гликолиза и угнетение глюконеогенеза [72]. Действительно, после добавления глюкозы к выросшим в среде с неферментируемым источником углерода клеткам *S. cerevisiae* наблюдается быстрое 3–4-кратное увеличение внутриклеточного пула сАМР (транзистентная фаза, наблюдаемая через 30 с — 2 мин после добавления глюкозы), после которого следует уменьшение пула сАМР или до начальной концентрации [73–76], или до уровня в 2 раза большего, чем исходный (перманентная фаза) [50, 77]. Подобное увеличение внутриклеточной концентрации сАМР обусловлено, по-видимому, возрастанием активности аденилатциклазы [75, 78, 79]. Установлено, что экзогенный сАМР у штаммов с повышенной проницаемостью этого нуклеотида значительно стимулирует катаболитную инактивацию фруктозо-1,6-бисфосфатазы у *S. cerevisiae* [75, 80]. Наконец, прямым указанием важной роли сАМР во «включении» катаболитной инактивации у *S. cerevisiae* является тот факт, что у мутантов *cyr1* по структурному гену аденилатциклазы глюкоза не вызывает инактивации *in vivo* фруктозо-1,6-бисфосфатазы, цитоплазматической малатдегидрогеназы и фосфоенолпируваткарбоккиназы [75].

Какие регуляторные механизмы обеспечивают резкое увеличение пула сАМР в клетке дрожжей *S. cerevisiae* после добавления глюкозы?

Предложена модель, согласно которой глюкозо- и галактозопермеазы, связываясь со своими субстратами, взаимодействуют с аденилатциклазой и вызывают ее транзистентное активирование, причем степень такого активирования определяется сродством транспортной системы к субстрату [50]. Высказано также предположение о том, что сахара активируют аденилатциклазу, вызывая деполяризацию цитоплазматической мембраны [49]: известно, что у *S. cerevisiae* не только глюкоза, но и протонофоры (СССР, FCCP, 2,4-динитрофенол) и полиеновый антибиотик (нистатин) обуславливают деполяризацию плазматической мембраны, транзистентное увеличение внутриклеточного пула сАМР и инактивацию *in vivo* фруктозо-1,6-бисфосфатазы и изоцитратлиазы [58, 81, 82]. Получены, однако, экспериментальные данные, ставящие под сомнение справедливость этого предположения; действительно, при некоторых способах деполяризации не наблюдается увеличения пула сАМР в клетке, тогда как при одновременном добавлении глюкозы, валиномицина и ионов K^+ мембранный потенциал не меняется, а пул сАМР в клетках дрожжей *S. cerevisiae* возрастает [83]. В то же время в условиях, вызывающих быстрое внутриклеточное закисление, наблюдается значительное увеличение пула сАМР в клетке *S. cerevisiae* [74,

83—85]. Вот почему было предположено, что быстрое увеличение концентрации сАМР в клетке при добавлении глюкозы обусловлено, в первую очередь, внутриклеточным закислением; при этом активируется дрожжевая аденилатциклаза и угнетается фосфодиэстераза с низким K_m для субстрата [83]. Впрочем, не исключено, что глюкоза параллельно «включает» и какие-либо другие процессы, ведущие к резкому увеличению пула сАМР в клетках дрожжей.

Какие процессы, ведущие к катаболитной инактивации, инициируются при быстром увеличении пула сАМР в дрожжевой клетке после добавления глюкозы?

Установлено, что у *S. cerevisiae* в фазе быстрой обратимой инактивации фруктозо-1,6-бисфосфатазы происходит фосфорилирование одного остатка серина в 11-м (с N-конца) положении полипептидной цепи этого фермента [86—88]. Фосфорилируются все молекулы фруктозо-1,6-бисфосфатазы в клетке и фосфорилированная форма обладает более низкой активностью, чем нефосфорилированная, а также отличается от последней по ряду кинетических свойств [57, 89—91].

Важно отметить, что фосфорилирование глюконеогенетических ферментов не является универсальным способом их катаболитной инактивации. Действительно, фосфорилирование фруктозо-1,6-бисфосфатазы дрожжей *Kl. fragilis* (как *in vivo*, так и *in vitro*) не вызывает, тем не менее, утраты активности этого фермента [35, 92]. Весьма вероятно поэтому, что вызванное добавлением глюкозы фосфорилирование фруктозо-1,6-бисфосфатазы у дрожжей служит в первую очередь сигналом для протекания последующей необратимой катаболитной инактивации этого фермента, но не всегда используется для очень быстрой частичной его инактивации *in vivo*.

Другой инактивируемый *in vivo* глюконеогенетический фермент, фосфоенолпируваткарбоксикиназа, вовсе не фосфорилируется в ходе его необратимой катаболитной инактивации у *S. cerevisiae* [75]. Тем не менее вызываемая глюкозой инактивация этого фермента нарушена у мутанта *cyr1* по структурному гену аденилатциклазы. В связи с этим предполагают, что фосфорилированию сАМР-зависимой протеинкиназой подвержена не сама фосфоенолпируваткарбоксикиназа, а какой-то белок, вызывающий необратимую инактивацию этого фермента *in vivo* [75]. Катаболитная инактивация цитоплазматической малатдегидрогеназы также блокирована у мутанта *cyr1* (хотя вопрос о фосфорилировании этого фермента в ходе инактивации не исследовался), что предполагает участие сАМР-зависимой протеинкиназы в подобной необратимой инактивации [75].

Не исключено, однако, что «включение» катаболитной инактивации цитоплазматической малатдегидрогеназы у *S. cerevisiae* обеспечивается также какими-то другими, не зависящими от сАМР, процессами; действительно, добавление протонофоров и полиеновых антибиотиков к клеткам (ведущее к резкому увеличению пула сАМР) не вызывает инактивации этого фермента *in vivo*, хотя фруктозо-1,6-бисфосфатаза и изоцитратлиаза в таких условиях инактивируются [58].

Какие протеинкиназы принимают участие в осуществлении катаболитной инактивации глюконеогенетических ферментов у дрожжей? Фосфорилирование фруктозо-1,6-бисфосфатазы *S. cerevisiae* в бесклеточных экстрактах катализируют как сАМР-зависимая (ые), так и сАМР-независимая (ые) протеинкиназа (ы); при этом наблюдается частичная инактивация фермента-мишени, причем по некоторым свойствам такая инактивация *in vitro* очень напоминает катаболитную инактивацию фруктозо-1,6-бисфосфатазы в интактных клетках [77, 93]. Фосфорилирование гомогенного препарата фруктозо-1,6-бисфосфатазы *S. cerevisiae* и *Kl. fragilis in vitro* катализирует только сАМР-зависимая протеинкиназа, но не, как минимум, два сАМР-независимых фермента (дрожжевые киназы гликогенфосфорилазы и казеина) [88, 92, 94, 95]. Вопрос о роли сАМР-зависимых и сАМР-независимых протеинкиназ в фосфорилировании и обратимой инактивации фруктозо-1,6-бисфосфата-

зы, по-видимому, может быть решен уже в ближайшее время, поскольку препараты нескольких таких дрожжевых протеинкиназ, а также мутанты *S. cerevisiae* по структурным и регуляторным генам каталитической и регуляторной субъединиц сАМР-зависимой протеинкиназы широко используются для изучения регуляции активностей ряда подверженных фосфорилированию ферментов [96—105]. Уже сейчас использование двойного мутанта *S. cerevisiae* *cyr1 bcy1* (с блоком аденилатциклазы и активной даже в отсутствие сАМР каталитической субъединицей сАМР-зависимой протеинкиназы) позволило установить, что у такого мутанта катаболитная инактивация фруктозо-1,6-бисфосфатазы *in vivo* нарушена [80]. Из этого следует важный вывод о том, что стимулирующее влияние сАМР на инактивацию фруктозо-1,6-бисфосфатазы у *S. cerevisiae* опосредовано активацией не только сАМР-зависимой протеинкиназы, но и каких-то других (не связанных с сАМР-зависимым фосфорилированием) процессов в клетке, нормальное протекание которых совершенно необходимо для такой инактивации. Этот же вывод справедлив, по-видимому, и для цитоплазматической малатдегидрогеназы *S. cerevisiae*, поскольку, как уже отмечалось выше, добавление вызывающих резкое увеличение пула сАМР агентов (протонофоров и полиеновых антибиотиков) не ведет к инактивации этого фермента *in vivo* [58].

Известно, что в клетках высших эукариотических организмов четыре фосфопроteinфосфатазы (1, 2A, 2B и 2C) контролируют активности подверженных фосфорилированию/дефосфорилированию ферментов метаболизма гликогена, гликолиза, глюконеогенеза, синтеза жирных кислот и холестерина, биосинтеза белка [106]. Имеются указания на то, что в регуляции степени фосфорилирования и катаболитной инактивации фруктозо-1,6-бисфосфатазы у *S. cerevisiae* участвует фосфопроteinфосфатаза(ы) [49, 82, 87]. Реактивирующий *in vitro* фосфорилированную фруктозо-1,6-бисфосфатазу фермент частично очищен, однако отсутствуют строгие доказательства того, что он представляет собой фосфопроteinфосфатазу [49]. Дальнейшему прогрессу в понимании роли фосфопроteinфосфатаз(ы) в реактивации *in vivo* фосфорилированной фруктозо-1,6-бисфосфатазы может способствовать то обстоятельство, что три фосфопроteinфосфатазы *S. cerevisiae* частично очищены [106, 107], и выделен мутант *pdd1* с блоком одной из этих фосфатаз, катализирующей дефосфорилирование NAD-зависимой глутаматдегидрогеназы и трегалазы *in vitro* и *in vivo* [107].

Необходимо отметить, что в клетках *S. cerevisiae* имеются, кроме сАМР, другие «алармоны», один из физиологических эффектов которых — модулирование степени фосфорилирования (а, значит, и обратной инактивации) фруктозо-1,6-бисфосфатазы. Такими «алармонами» являются фруктозо-2,6-бисфосфат и АМР: фруктозо-2,6-бисфосфат стимулирует, а АМР угнетает фосфорилирование фруктозо-1,6-бисфосфатазы [94, 95, 101, 108]. Кроме того, фруктозо-2,6-бисфосфат угнетает реактивацию фосфорилированной формы фруктозо-1,6-бисфосфатазы в клетках *S. cerevisiae* [49]. На возможный механизм резкого увеличения пула фруктозо-2,6-бисфосфата в клетках после добавления глюкозы указывают данные о том, что 6-фосфофрукто-2-киназа активируется *in vitro* и *in vivo* при фосфорилировании этого фермента сАМР-зависимой протеинкиназой [98]. Следует отметить, что *in vivo* фруктозо-2,6-бисфосфат и АМР регулируют активность фруктозо-1,6-бисфосфатазы *S. cerevisiae* не только модулируя степень ее фосфорилирования, но и конкурентно (фруктозо-2,6-бисфосфат) или аллостерически (АМР) ингибируя активность этого фермента [109, 110].

Таким образом, регуляция активности фруктозо-1,6-бисфосфатазы *S. cerevisiae* определяется, по-видимому, комбинированным действием всех указанных выше регуляторных механизмов, «включаемых» сАМР, АМР и фруктозо-2,6-бисфосфатом.

Роль протеолитических ферментов в катаболитной инактивации у дрожжей. Имеются веские доказательства того, что одним из механиз-

мов катаболитной инактивации у дрожжей является селективный протеолиз инактивируемых ферментов. Действительно, для реактивации глюконеогенетических ферментов у *S. cerevisiae*, вызванной переносом клеток из среды с глюкозой в среды с этанолом или ацетатом, как и для реактивации алкогольоксидазы и каталазы у *C. boidinii* после переноса клеток из среды с этиловым спиртом в среду с метанолом, необходим биосинтез белка *de novo* [17, 18, 21, 27, 32, 34, 44, 52, 57, 111, 112]. Катаболитная инактивация ряда ферментов у *S. cerevisiae* угнетается как ингибиторами протеиназ [26, 32, 34], так и высокими концентрациями экзогенных источников азотного питания, сульфата аммония и аминокислот (которые, по-видимому, вызывают ингибирование протеолиза по типу отрицательной обратной связи) [12]. Для самых разнообразных ферментов дрожжей утрата их активности при катаболитной инактивации сопровождается параллельным уменьшением количества материала, перекрестно реагирующего с антителами к гомогенным препаратам этих ферментов, что также свидетельствует о протеолитической деградации ферментов в ходе катаболитной инактивации [6, 20, 22, 33, 45, 91, 113].

Были предприняты попытки идентификации протеиназ, участвующих в катаболитной инактивации у дрожжей, биохимическими методами. Частично очищен белок, инактивирующий уридиннуклеозидазу *S. cerevisiae*: он представляет собой сериновую протеиназу [32]. Установлено также, что ферменты, подверженные катаболитной инактивации *in vivo* у *S. cerevisiae* и *C. boidinii*, инактивируются также *in vitro* под действием одной из (или обеих) вакуолярных эндопротеиназ (*yscA* и *yscB*) *S. cerevisiae* [12, 15, 114—116]. Результаты подобных экспериментов, однако, не являются прямым указанием на то, что эти две эндопротеиназы участвуют в катаболитной инактивации *in vivo* [10, 117].

Наличие коллекции мутантов *S. cerevisiae* по структурным генам эндопротеиназы *yscA* [118, 119], эндопротеиназы *yscB* [120—124], карбоксипептидазы *yscY* [125—127], карбоксипептидазы *yscS* [122], а также мутантов с плейотропными нарушениями синтеза, электрофоретической подвижности и/или процессинга всех или некоторых из указанных вакуолярных протеиназ [9, 124, 128—132] позволило установить, что ни одна из этих вакуолярных протеиназ не принимает участия в катаболитной инактивации фруктозо-1,6-бисфосфатазы, цитоплазматической малатдегидрогеназы и фосфоенолпируваткарбоксикиназы [20, 118, 122—124, 133]. Был сделан вывод о том, что вакуолярные протеиназы *S. cerevisiae* не участвуют в селективном протеолизе белков (в частности, при катаболитной инактивации), а осуществляют лишь неспецифическую деградацию белков при голодании по азоту или усвоении экзогенных и эндогенных пептидов [9, 10, 117]. Справедливость такого вывода, однако, поставлена под сомнение работой Фунагумы и др. [134], показавших, что плейотропная мутация *per4-3* (блокирующая процессинг и активность пяти вакуолярных гидролаз, в том числе протеиназ *yscA*, *yscB* и *yscY* [9, 130, 135, 136]) нарушает вторую, необратимую фазу катаболитной инактивации фруктозо-1,6-бисфосфатазы (но не цитоплазматической малатдегидрогеназы). Не исключено, что либо мутация *per4-3* блокирует активность каких-либо других (возможно, вакуолярных) протеиназ, участвующих в протеолизе фруктозо-1,6-бисфосфатазы при катаболитной инактивации этого фермента, либо для нарушения протеолиза фруктозо-1,6-бисфосфатазы необходим одновременный блок нескольких вакуолярных протеиназ, а не только одной из них. Впрочем, следует отметить недавно полученные данные, не согласующиеся с результатами Фунагумы и др.: использование антител к фруктозо-1,6-бисфосфатазе позволило показать, что у мутанта *S. cerevisiae per4-3* деградативная катаболитная инактивация этого фермента протекает столь же быстро, как и у штамма дикого типа [137].

Интересно, что у метилотрофных дрожжей *H. polymorpha* и *C. boidinii* вакуолярные протеиназы, по-видимому, участвуют в вызываемой глюкозой и этанолом катаболитной инактивации пероксисомальных

ферментов метаболизма метанола (алкогольоксидазы, каталазы и дигидроксиацетонсинтазы). Как следует из электронно-микроскопических исследований, вакуоли при этом «сливаются» с пероксисомами, после чего наблюдается быстрая деградация указанных ферментов [39, 138]. По-видимому, описанный тип деградативной инактивации уникален, причем его существование может не противоречить тезису о роли вакуолярных протеиназ только в неспецифическом протеолизе, поскольку белки пероксисом метилотрофных дрожжей составляют 20—30 % всего растворимого белка клетки [14, 15], а специфичность протеолиза в данной системе обеспечивается «слиянием» вакуолей и пероксисом.

Каскад актов инактивации у дрожжей. Добавление глюкозы к клеткам дрожжей может вызвать целый каскад инактивационных процессов, когда завершение инактивации одного фермента «включает» инактивацию другого. Например, после добавления глюкозы к выросшим в среде с метанолом клеткам метилотрофных дрожжей *H. polymorpha* происходит деградативная инактивация локализованной в пероксисомах FAD-содержащей алкогольоксидазы; в результате значительно увеличивается концентрация свободного (не связанного с алкогольоксидазой) FAD, который в свою очередь инициирует инактивацию цитозольных ферментов биосинтеза этого кофактора — рибофлавинсинтазы, рибофлавинкиназы и FMN-аденилилтрансферазы [139].

Заключение. Углеродная катаболитная инактивация не описана у прокариот; регуляция процессов катаболизма у бактерий осуществляется с использованием механизмов индукции и катаболитной репрессии. В то же время у одноклеточных эукариот, дрожжей, наряду с сохранением принципов регуляции количества ферментов путем индукции и катаболитной репрессии появляется механизм катаболитной инактивации. Сложно дать вполне определенный ответ на вопрос о причинах возникновения указанного регуляторного феномена лишь у эукариот. Возможно, это связано с меньшей, как правило, скоростью оборота, т. е. большей стабильностью ферментов у дрожжей по сравнению с бактериями. Появление органельной организации клетки у дрожжей вряд ли могло явиться причиной возникновения феномена катаболитной инактивации.

Как явствует из приведенного в обзоре материала, сам термин «катаболитная инактивация» требует сегодня переосмысления. Мы предлагаем использовать его для обозначения любого процесса (вне зависимости от конкретного механизма) — специфического, селективного, быстрого по сравнению со скоростью роста, но не мгновенного уменьшения активности фермента или транспортной системы, участвующих в процессе катаболизма какого-либо соединения в ответ на добавление альтернативного субстрата. При рассмотрении утилизации источников углеродного питания можно говорить об углеродной катаболитной инактивации, если речь идет об усвоении источников азота — об азотной катаболитной инактивации [140] и т. д. Катаболитной инактивацией является не потому, что она зависит от накопления каких-то определенных продуктов катаболизма, а поскольку участвует в регуляции катаболических процессов.

Термин «инактивация» указывает на его отличия и от репрессии, и от ингибирования. Последний процесс (будь то алло- или изостерическое ингибирование) происходит практически мгновенно. Репрессия же, в том числе и катаболитная, затрагивает процесс образования ферментов, но не их активность или время полужизни.

Поскольку катаболитная инактивация может включать как ковалентную модификацию (модификационная инактивация), так и селективную деградацию (деградативная инактивация) ферментов, а также последовательное протекание обоих типов инактивации, становится понятным, что сам термин «катаболитная инактивация» ничего не говорит о конкретном механизме процесса. Конкретный механизм должен зависеть от природы белка-мишени, его физиологической роли и локализации в клетке. Действительно, сложно представить себе участие

вакуолярных протеиназ в специфической деградации белков плазмалеммы (пермеаз галактозы и мальтозы) или строго определенных митохондриальных белков, хотя указанные протеиназы вполне могут участвовать в деградации ряда растворимых ферментов.

Среди белков, активность и/или количество которых регулируется катаболитной инактивацией, известны транспортные системы (пермеазы), а также ферменты, локализованные в цитозоле, митохондриях и микротельцах (глиоксисомы и пероксисомы). Как правило, белки, подвергаемые катаболитной инактивации, катализируют первый, ключевой этап катаболизма того или иного соединения. Остальные ферменты рассматриваемого пути могут при этом регулироваться при помощи более медленного механизма катаболитной репрессии либо вообще синтезироваться конститутивно. Так, катаболитная инактивация в среде с глюкозой пермеаз галактозы или мальтозы очень быстро останавливает процесс катаболизма последних соединений. Внутриклеточные ферменты катаболизма галактозы и мальтозы регулируются катаболитной репрессией. Катаболитная инактивация ферментов глюконеогенеза затрагивает лишь те из них, которые катализируют необратимые реакции (фосфоенолпируваткарбоксикиназа и фруктозо-1,6-бисфосфатаза), в то время как остальные ферменты, катализирующие обратимые реакции, синтезируются конститутивно.

Иногда, как в случае катаболитной инактивации пероксисомальных ферментов метаболизма метанола, регуляции подвержен не только фермент начального этапа, но и последующих реакций утилизации C_1 -соединений. Такая инактивация сопровождается полной деградацией микротелец. Интересно провести электронно-микроскопические наблюдения другого типа микротелец, глиоксисом, в ответ на добавление к клеткам глюкозы, поскольку, как указывалось выше, имеются данные лишь об инактивации ключевого глиоксисомального фермента, изоцитратлиазы, но не других ферментов, локализованных в этой органелле.

Физиологический смысл катаболитной инактивации, по-видимому, часто заключается в быстром прекращении усвоения углеродного субстрата, обеспечивающего более низкую скорость роста либо меньший выход биомассы, в ответ на добавление в среду более легко усваиваемого субстрата. Преимущества, даваемые организму наличием катаболитной инактивации, не вполне очевидны. Так, отсутствие у *S. pombe* катаболитной инактивации фруктозо-1,6-бисфосфатазы заставляет либо сомневаться в селективной роли катаболитной инактивации, либо предполагать, что у *S. pombe* физиологическое значение последней может иметь какой-то дополнительный, помимо репрессии, регуляторный механизм. Не совсем ясны также как физиологический смысл селективной катаболитной инактивации лишь некоторых митохондриальных белков, так и функции митохондрий с разобренным после инактивации сукцинатдегидрогеназы циклом трикарбоновых кислот и заблокированной цитохром *c* оксидазой.

В последнее время наблюдается некоторое уменьшение количества публикаций по исследованию углеродной катаболитной инактивации у дрожжей. В то же время пока ни для одного фермента не выяснены молекулярные механизмы катаболитной инактивации и неизвестна природа эффекторов, инициирующих этот процесс. По-видимому, застой в данной области можно будет преодолеть, сосредоточив большее внимание на получении мутантов, у которых специфически повреждены последовательные этапы инактивации того или иного фермента. К настоящему времени таких мутантов известно очень мало. В основном исследования ведутся на мутантах с повреждениями метаболизма сАМР или с заблокированными протеиназами. Настоятельно необходимо разработать методы селективного отбора мутантов с поврежденной катаболитной инактивацией, которые на сегодняшний день отсутствуют. Анализ таких мутантов может помочь в исследовании интересной проблемы о взаимосвязи в механизмах катаболитной репрессии и катаболитной инактивации.

Важность подавления катаболитной репрессии для сверхсинтеза многих ферментов, первичных и вторичных метаболитов у микроорганизмов вполне очевидна [141, 142]. В то же время вопрос о роли катаболитной инактивации, участвующей в регуляции активности ключевых ферментов многих путей катаболизма у дрожжей, для сверхсинтеза биологически активных соединений, как нам кажется, пока никем не рассматривался. Возможно, при некоторых условиях осуществления биотехнологических процессов, особенно когда речь идет о смене углеродных субстратов в питании продуцента, возможность катаболитной инактивации следует учитывать и, если это необходимо, генетически блокировать данный процесс.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fincham J. R. S., Day P. R., Radford A.* Fungal genetics.—Oxford: Blackwell sci. publ., 1979.—636 p.
2. *Harder W., Dijkhuizen L., Veldkamp H.* Environmental regulation of microbial metabolism // The microbe 1984 / Eds D. P. Kelly, N. G. Carr.—Cambridge: Univ. press, 1984.—P. 51—95.
3. *Козн Ф.* Регуляция ферментативной активности.—М.: Мир, 1986.—44 с.
4. *Jones E. W., Fink G. R.* Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast // Mol. biol. of the yeast *Saccharomyces*: metabolism and gene expression.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982.—P. 181—299.
5. *Umbarger H. E.* Amino acid biosynthesis and its regulation // Ann. Rev. Biochem.—1978.—47.—P. 533—606.
6. *Baumberg S.* The evolution of metabolic regulation // Mol. and cell. aspects of microbial evolution / Eds M. J. Carlile, J. F. Collins, B. E. B. Moseley.—Cambridge: Univ. press, 1981.—P. 229—272.
7. *Boon Chock P., Rhee S. G., Stadtman E. R.* Interconvertible enzyme cascades in cellular regulation // Ann. Rev. Biochem.—1980.—49.—P. 813—843.
8. *Holzer H., Heinrich P. C.* Control of proteolysis // Ibid.—P. 63—91.
9. *Jones E. W.* The synthesis and function of proteases in *Saccharomyces*: genetic approaches // Ann. Rev. Genet.—1984.—18.—P. 233—270.
10. *Achstetter T., Wolf D. H.* Proteinases, proteolysis and biological control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast.—1985.—1, N 1.—P. 139—157.
11. *Magasanik B.* Catabolite repression // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.—1961.—26.—P. 249—256.
12. *Holzer H.* Catabolite inactivation in yeast // Trends Biochem. Sci.—1976.—1, N 2.—P. 178—181.
13. *Switzer R. L.* The inactivation of microbial enzymes *in vivo* // Ann. Rev. Microbiol.—1977.—31.—P. 135—157.
14. *Harder W., Veenhuis M.* Physiological significance and biogenesis of yeast microbodies // Biol. Res. Industr. Yeasts.—1988.—111.—P. 125—157.
15. *Veenhuis M., van Dijken J. P., Harder W.* The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts // Adv. Microbiol. Physiol.—1983.—24.—P. 1—82.
16. *Funayama S., Gancedo J. M., Gancedo C.* Turnover of yeast fructose-bisphosphatase in different metabolic condition // Eur. J. Biochem.—1980.—109, N 1.—P. 61—66.
17. *Gancedo C.* Inactivation of fructose-1,6-diphosphatase by glucose in yeast // J. Bacteriol.—1971.—107, N 2.—P. 401—405.
18. *Gancedo C., Schwerzmann N.* Inactivation by glucose of phosphoenolpyruvate-carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae* // Arch. Microbiol.—1976.—109, N 3.—P. 221—225.
19. *Haarasilta S., Oura E.* On the activity and regulation of anaplerotic and gluconeogenic enzymes during the growth process of baker's yeast // Eur. J. Biochem.—1975.—52, N 1.—P. 1—7.
20. *Muller M., Muller H., Holzer H.* Immunochemical studies on catabolite inactivation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem.—1981.—256, N 2.—P. 723—727.
21. *Ferguson J. J., Jr., Boil M., Holzer H.* Yeast malate dehydrogenase: enzyme inactivation in catabolite repression // Eur. J. Biochem.—1967.—1, N 1.—P. 21—25.
22. *Evidence for catabolite degradation in the glucose-dependent inactivation of yeast cytoplasmic malate dehydrogenase / J. Neef, E. Hadele, J. Nauhaus et al. // Ibid.—1978.—87, N 3.—P. 489—495.*
23. *Witt I., Kronau R., Holzer H.* Repression von Alkoholdehydrogenase, Malatedehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthase in Hefe durch Glucose // Biochim. et biophys. acta.—1966.—118, N 3.—P. 522—537.
24. *Witt I., Kronau R., Holzer H.* Isoenzyme der Malatedehydrogenase und ihre Regulation in *Saccharomyces cerevisiae* // Ibid.—128, N 1.—P. 63—73.
25. *Studies of the regulation and localization of the glyoxylate cycle enzymes in Saccharomyces cerevisiae / W. Duntze, D. Neumann, J. M. Gancedo et al. // Eur. J. Biochem.—1969.—10, N 1.—P. 83—89.*

26. Takeda M. Glucose-induced inactivation of mitochondrial enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Biochem. J.—1981.—198, N 2.—P. 281—287.
27. Gortls C. P. M. Effect of glucose on the activity and the kinetics of the maltose uptake system and of α -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae* // Biochim. et biophys. acta.—1969.—184, N 2.—P. 299—305.
28. Matern H., Holzer H. Catabolite inactivation of galactose uptake system in yeast // J. Biol. Chem.—1977.—252, N 9.—P. 6399—6402.
29. Robertson J. J., Halvorson J. O. The components of maltozymase in yeast, and their behaviour during deadaptation // J. Bacteriol.—1957.—121, N 1.—P. 186—198.
30. Spiegelman S., Reiner J. M. The formation and the stabilization of an adaptive enzyme in the absence of its substrate // J. Gen. Physiol.—1947.—31, N 2.—P. 175—193.
31. Entian K.-D. Lack of carbon catabolite inactivation in a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* with reduced hexokinase activity // Mol. and Gen. Genet.—1977.—158, N 2.—P. 201—210.
32. Catabolite inactivation of baker's yeast uridine nucleosidase. Isolation and partial purification of a specific proteolytic inactivase / G. Magni, I. Santarelli, P. Natalini et al. // Eur. J. Biochem.—1977.—75, N 1.—P. 77—82.
33. Frey J., Rohm K. H. The glucose-induced inactivation of aminopeptidase I in *Saccharomyces cerevisiae* // FEBS Lett.—1979.—100, N 2.—P. 261—264.
34. Brown H. D., Salyanarayana T., Umbarger H. E. Inactivation of α -isopropylmalate synthase after the addition of glucose // J. Bacteriol.—1975.—121, N 4.—P. 959—969.
35. Toyoda Y., Sy J. Catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase in *Klyuveromyces fragilis* // Curr. Microbiol.—1985.—12, N 4.—P. 241—244.
36. О возникновении и деградации пероксисом у дрожжевых организмов / М. Н. Мейсель, Г. А. Медведева, Т. М. Козлова и др. // Микробиология.—1978.—47, № 6.—С. 1030—1036.
37. Veenhuis M., Zwart K. B., Harder W. Degradation of peroxisomes after transfer of methanol-grown *Hansenula polymorpha* into glucose-containing media // FEMS Microbiol. Lett.—1978.—4, N 2.—P. 283—286.
38. Veenhuis M., Zwart K. B., Harder W. Biogenesis and turnover of peroxisomes involved in the concurrent oxidation of methanol and methylamine in *Hansenula polymorpha* // Arch. Microbiol.—1981.—129, N 1.—P. 35—41.
39. Degradation and turnover of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha* induced by selective inactivation of peroxisomal enzymes / M. Veenhuis, A. Douma, W. Harder et al. // Ibid.—1983.—134, N 2.—P. 193—203.
40. Dihydroxyacetone synthase is localized in the peroxisomal matrix of methanol-grown *Hansenula polymorpha* / A. C. Douma, M. Veenhuis, W. de Koning et al. // Ibid.—1985.—143, N 2.—P. 237—243.
41. Vassarotti A., Boutry M., Colson A.-M. Fructose-bisphosphatase-deficient mutants of the yeast *Schizosaccharomyces pombe* // Ibid.—1982.—133, N 1.—P. 131—136.
42. О регуляции метаболизма метанола у мутанта дрожжей *Pichia pinus* с дефектной изоцитратлиазой / А. А. Сибирный, В. И. Титоренко, С. В. Беневоленский и др. // Биохимия.—1986.—51, № 1.—С. 16—22.
43. Genetic control of methanol utilization in yeasts / А. А. Сибирный, В. И. Титоренко, М. В. Гончар et al. // J. Basic Microbiol.—1988.—28, N 5.—P. 293—319.
44. Bormann C., Sahn H. Degradation of microbodies in relation to activities of alcohol oxidase and catalase in *Candida boidinii* // Arch. Microbiol.—1978.—117, N 1.—P. 67—72.
45. Hill D. J., Hann A. C., Lloyd D. Degradative inactivation of the peroxisomal enzyme, alcohol oxidase, during adaptation of methanol-grown *Candida boidinii* to ethanol // Biochem. J.—1985.—232, N 4.—P. 743—750.
46. Сибирный А. А., Титоренко В. И. Подавление метанолом индукции изоцитратлиазы и малатситазы у дрожжей *Pichia pinus* // Биотехнология.—1988.—4, № 2.—С. 194—196.
47. Entian K.-D. Glucose repression: a complex regulatory system in yeast // Microbiol. Sci.—1986.—3, N 12.—P. 366—371.
48. Gancedo J. M., Gancedo C. Catabolite repression mutants of yeast // FEMS Microbiol. Lett.—1986.—32, N 1.—P. 179—187.
49. Holzer H. Mechanism and function of reversible phosphorylation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast // Enzyme regulation by reversible phosphorylation — further advances / Ed. P. Kohen.—Amsterdam: Elsevier, 1984.—P. 143—154.
50. Eraso P., Gancedo J. M. Use of glucose analogues to study the mechanism of glucose-mediated cAMP increase in yeast // FEBS Lett.—1985.—191, N 1.—P. 51—54.
51. Ciriacy M., Breitenbach I. Physiological effects of seven different blocks in glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Bacteriol.—1979.—139, N 1.—P. 152—160.
52. Entian K.-D., Droll L., Mecke D. Studies on rapid reversible and non-reversible inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase and malate dehydrogenase in wild-type and glycolytic block mutants of *Saccharomyces cerevisiae* // Arch. Microbiol.—1983.—134, N 3.—P. 187—192.
53. Entian K.-D. Lack of carbon catabolite inactivation in a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* with reduced hexokinase activity // Mol. and Gen. Genet.—1977.—158, N 2.—P. 201—210.

54. Entian K.-D., Zimmermann F. K. Glycolytic enzymes and intermediates in carbon catabolite repression mutants of *Saccharomyces cerevisiae* // *Ibid.*—1980.—177, N 3.—P. 344—350.
55. Gancedo J. M., Gancedo C. Inactivation of gluconeogenic enzymes in glycolytic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* // *Eur. J. Biochem.*—1979.—101, N 2.—P. 455—460.
56. Entian K.-D., Zimmermann F. K., Scheel I. A partial defect in carbon catabolite repression in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with reduced hexose phosphorylation // *Mol. and Gen. Genet.*—1977.—156, N 1.—P. 99—105.
57. Lenz A. G., Holzer H. Rapid reversible inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* by glucose // *FEBS Lett.*—1980.—109, N 2.—P. 271—274.
58. Catabolite inactivation of isocitrate lyase from *Saccharomyces cerevisiae* / Y. S. Lopez-Boado, P. Herrero, S. Gascon et al. // *Arch. Microbiol.*—1987.—147, N 2.—P. 231—234.
59. Fraenkel D. G. Carbohydrate metabolism // *Molecular biology of the yeast Saccharomyces.*—New York: Cold Spring Harbor Lab, 1982.—P. 1—37.
60. Van de Poll K. W., Kerkenaar A., Schamhart D. H. J. Isolation of a regulatory mutant of fructose-1,6-bisphosphatase in *Saccharomyces carlsbergensis* // *J. Bacteriol.*—1974.—117, N 3.—P. 965—970.
61. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of wild type and glycolytic pathway mutants of *Saccharomyces cerevisiae* / G. Navon, R. G. Shulman, T. Yamane et al. // *Biochemistry.*—1979.—18, N 11.—P. 4487—4495.
62. Van de Poll K. W., Schamhart D. H. J. Characterization of a regulatory mutant of fructose-1,6-bisphosphatase in *Saccharomyces carlsbergensis* // *Mol. and Gen. Genet.*—1977.—154, N 1.—P. 61—66.
63. Schamhart D. H. J., van de Heijktart M. P. M., van de Poll K. W. Inactivation of fructose diphosphatase by sucrose in yeast // *J. Bacteriol.*—1977.—130, N 3.—P. 526—534.
64. Banuelos M., Gancedo C. *In situ* study of the glycolytic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* // *Arch. Microbiol.*—1978.—117, N 2.—P. 197—203.
65. Entian K.-D. Genetic and biochemical evidence for hexokinase *P11* as a key enzyme involved in carbon catabolite repression in yeast // *Mol. and Gen. Genet.*—1980.—178, N 5.—P. 633—637.
66. Entian K.-D., Mecke D. Genetic evidence for a role of hexokinase isoenzyme *P11* in carbon catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol. Chem.*—1982.—257, N 2.—P. 870—874.
67. Kopetzki E., Entian K.-D. Glucose repression and hexokinase isoenzymes in yeast. Isolation and characterization of a modified hexokinase *P11* isoenzyme // *Eur. J. Biochem.*—1985.—146, N 3.—P. 657—662.
68. Cloning of hexokinase structural genes from *Saccharomyces cerevisiae* mutants with regulatory mutations responsible for glucose repression / K.-D. Entian, F. Hilberg, H. Opitz et al. // *Mol. Cell. Biol.*—1985.—5, N 11.—P. 3035—3040.
69. Entian K.-D., Frohlich K.-U. *Saccharomyces cerevisiae* mutants provide evidence for hexokinase *P11* as a bifunctional enzyme with catalytic and regulatory domains for triggering carbon catabolite repression // *J. Bacteriol.*—1984.—158, N 1.—P. 29—35.
70. Tomkins G. M. The metabolic code // *Science.*—1975.—189, N 4173.—P. 760—763.
71. Pall M. L. GTP: a central regulator of cellular anabolism // *Curr. Top. Cell. Regul.*—1985.—25.—P. 1—20.
72. Pall M. L. Is there a general paradigm of cyclic AMP action in eukaryotes? // *Mol. and Cell. Biochem.*—1984.—58, N 2.—P. 187—191.
73. Siro M.-R., Lougren T. Influence of glucose on the α -glucosidase permease activity of yeast // *Eur. J. Appl. Microbiol. and Biotechnol.*—1979.—7, N 1.—P. 59—66.
74. Effect of caffeine on glucose-induced inactivation of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. A possible role of cyclic AMP / P. Tortora, N. Burlini, N. Hanozet et al. // *Eur. J. Biochem.*—1982.—126, N 3.—P. 617—622.
75. Dependence on cyclic AMP of glucose-induced inactivation of yeast gluconeogenic enzymes / P. Tortora, N. Burlini, F. Leoni et al. // *FEBS Lett.*—1983.—155, N 1.—P. 39—42.
76. Van der Plaats J. V., van Solingen P. Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate stimulates trehalase degradation in baker's yeast // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1974.—56, N 2.—P. 580—587.
77. Purwin C., Leidig E., Holzer H. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast // *Ibid.*—1982.—107, N 4.—P. 1482—1489.
78. Cyclic AMP may not be involved in catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence from mutants capable of utilizing it as an adenine source / K. Matsumoto, I. Uno, A. Toh-e et al. // *J. Bacteriol.*—1982.—150, N 1.—P. 277—285.
79. Regulation of the cAMP level in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. II. The glucose-induced cAMP signal / J. M. Thevelein, M. Beullens, F. Houshoven et al. // *J. Gen. Microbiol.*—1987.—133, N 9.—P. 2197—2205.
80. Cyclic AMP may not be involved in catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence from mutant unable to synthesize it / K. Matsumoto, I. Uno, T. Ishikawa et al. // *J. Bacteriol.*—1983.—156, N 2.—P. 898—900.
81. Trevillyan J. M., Pall M. L. Isolation and properties of a cyclic AMP-binding protein from *Neurospora*. Evidence for its role as the regulatory subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase // *J. Biol. Chem.*—1982.—257, N 10.—P. 3978—3986.

82. Mazon M. J., Gancedo J. M., Gancedo C. Phosphorylation and inactivation of yeast fructose-bisphosphatase *in vivo* by glucose and by proton ionophores. A possible role for cAMP // Eur. J. Biochem.—1982.—127, N 3.— P. 605—608.
83. Glucose-stimulated cAMP increase may be mediated by intracellular acidification in *Saccharomyces cerevisiae* / G. Caspani, P. Tortora, G. M. Hanozet et al. // FEBS Lett.—1985.—186, N 1.— P. 75—79.
84. Mechanism of control of adenylate cyclase activity in yeast by fermentable sugars and carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone / C. Purwin, K. Nicolay, W. A. Schefers et al. // J. Biol. Chem.—1986.—261, N 20.— P. 8744—8749.
85. Trehalase activation in yeasts is mediated by an internal acidification / E. Valle, L. Bergillos, S. Gascon et al. // Eur. J. Biochem.—1986.—154, N 2.— P. 247—251.
86. Muller D., Holzer H. Regulation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast by phosphorylation/dephosphorylation // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1981.—103, N 3.— P. 926—933.
87. Mazon M., Gancedo J. M., Gancedo C. Inactivation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase. *In vivo* phosphorylation of the enzyme // J. Biol. Chem.—1982.—257, N 3.— P. 1128—1130.
88. Amino acid sequence of the phosphorylation site of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) fructose-1,6-bisphosphatase / J. Rittenhouse, P. B. Harsch, J. N. Kim et al. // Ibid.—1986.—261, N 9.— P. 3939—3943.
89. Gancedo J. M., Mazon M. J., Gancedo C. Inactivation and phosphorylation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase // Biochem. Soc. Trans.—1982.—10, N 3.— P. 326—327.
90. Gancedo J. M., Mazon M. G., Gancedo C. Kinetic differences between two interconvertible forms of fructose-1,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* // Arch. Biochem. and Biophys.—1982.—218, N 2.— P. 478—482.
91. Glucose-dependent metabolic interconversion of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast / P. Tortora, M. Britel, A.-G. Lenz et al. // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1981.—100, N 2.— P. 688—695.
92. Toyoda Y., Sy J. Purification and phosphorylation of fructose 1,6-bisphosphatase from *K. fragilis* // J. Biol. Chem.—1984.—259, N 14.— P. 8718—8723.
93. Londesborough J. Cyclic nucleotide-dependent inactivation of yeast fructose 1,6-bisphosphatase by ATP // FEBS Lett.—1982.—144, N 2.— P. 269—272.
94. Gancedo J. M., Mazon M. J., Gancedo C. Fructose 2,6-bisphosphate activates the cAMP-dependent phosphorylation of yeast fructose 1,6-bisphosphatase *in vitro* // J. Biol. Chem.—1983.—258, N 10.— P. 5998—5999.
95. Cyclic AMP and fructose-2,6-bisphosphate stimulated *in vitro* phosphorylation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase / G. Pohlig, R. Wingerder-Drissen, T. Noda // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1983.—115, N 1.— P. 317—324.
96. Behrens M. M., Mazon M. J. Yeast cAMP-dependent protein kinase can be associated to the plasma membrane // Ibid.—1988.—151, N 1.— P. 561—567.
97. Cannon J. F., Tatchell K. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase // Mol. Cell. Biol.—1987.—7, N 8.— P. 2653—2663.
98. Francois J., van Schaftingen E., Hers H.-G. The mechanism by which glucose increases fructose 2,6-bisphosphate concentration in *Saccharomyces cerevisiae* // Eur. J. Biochem.—1984.—145, N 1.— P. 187—193.
99. Hemmings B. A. The mechanism, role and control of the inactivation of glutamate dehydrogenases in yeast // Biochem. Soc. Trans.—1982.—10, N 2.— P. 328—329.
100. Regulation of yeast trehalase by a monocyclic, cyclic AMP-dependent phosphorylation-dephosphorylation cascade system / C. H. Ortiz, J. C. Maia, M. N. Tenan et al. // J. Bacteriol.—1983.—153, N 2.— P. 644—651.
101. Pohlig G., Wingerder-Drissen R., Becker J. U. Characterization of phosphorylase kinase activities in yeast // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1983.—114, N 2.— P. 331—338.
102. Genetic and biochemical evidence that trehalase is a substrate of cAMP-dependent protein kinase in yeast / I. Uno, K. Matsumoto, K. Adachi et al. // J. Biol. Chem.—1983.—258, N 18.— P. 10867—10872.
103. Regulation of NAD-dependent glutamate dehydrogenase by protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae* / I. Uno, K. Matsumoto, K. Adachi et al. // Ibid.—1984.—259, N 2.— P. 1288—1293.
104. Van Solingen P., van der Plaats J. B. Partial purification of the protein system controlling the breakdown of trehalase in baker's yeast // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1975.—62, N 2.— P. 553—559.
105. Wingerder-Drissen R. Yeast cyclic AMP-dependent protein kinase // FEBS Lett.—1983.—163, N 1.— P. 28—32.
106. Wingerder-Drissen R., Becker J. U. Regulation of yeast phosphorylase by phosphorylase kinase and cAMP-dependent protein kinase // Ibid.— P. 33—36.
107. Isolation and characterization of a phosphoprotein phosphatase-deficient mutant in yeast / K. Matsumoto, I. Uno, K. Kato et al. // Yeast.—1985.—1, N 1.— P. 25—38.
108. Tejwani G. A. Regulation of fructose-bisphosphatase activity // Advances in enzymology / Ed. F. F. Nord.— New York: John Wiley and Sons, 1983.— Vol. 54.— P. 121—194.
109. Francois J., van Schaftingen E., Hers H.-G. Effect of benzoate on the metabolism of fructose 2,6-bisphosphate in yeast // Eur. J. Biochem.—1986.—154, N 1.— P. 141—145.

110. Yoshino M., Murakami K. Role of AMP deaminase reaction in the control of fructose 1,6-bisphosphatase activity in yeast // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1985.—128, N 2.—P. 1020—1024.
111. Mazon M. J. Effect of glucose starvation on the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase in yeast // J. Bacteriol.—1978.—133, N 3.—P. 780—785.
112. Duntze W., Neumann D., Holzer H. Glucose induced inactivation of malate dehydrogenase // Eur. J. Biochem.—1968.—3, N 2.—P. 326—331.
113. Mazon M. J., Hemmings B. A. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase by proteolysis during carbon starvation // J. Bacteriol.—1979.—139, N 3.—P. 686—689.
114. Beck J., Fink G., Wolf D. The intracellular proteinases and their inhibitors in yeast. A mutant with altered regulation of proteinase A inhibitor activity // J. Biol. Chem.—1980.—255, N 5.—P. 4821—4828.
115. Jusic M., Hinze H., Holzer H. Inactivation of yeast enzymes by proteinase A and B and carboxypeptidase Y from yeast // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.—1976.—357, N 5.—P. 735—740.
116. Molano J., Gancedo C. Specific inactivation of fructose 1,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* by a yeast protease // Eur. J. Biochem.—1974.—44, N 1.—P. 213—217.
117. Wolf D. H. Proteinase action *in vitro* versus proteinase function *in vivo*: mutants shed light on intracellular proteolysis in yeast // Trends Biochem. Sci.—1982.—7, N 1.—P. 35—37.
118. Mechtler B., Wolf D. Analysis of proteinase A function in yeast // Eur. J. Biochem.—1981.—121, N 1.—P. 47—52.
119. *In vivo* biosynthesis of vacuolar proteinases in proteinase mutants of *Saccharomyces cerevisiae* / B. Mechtler, M. Muller, H. Muller et al. // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1982.—107, N 3.—P. 770—778.
120. Wolf D. H., Ehmman C. Isolation of yeast mutants lacking proteinase B activity // FEBS Lett.—1978.—92, N 2.—P. 121—124.
121. Wolf D. H., Ehmman C. Studies on a proteinase B mutant of yeast // Eur. J. Biochem.—1979.—98, N 2.—P. 375—384.
122. Wolf D. H., Ehmman C. Carboxypeptidase S- and carboxypeptidase Y-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* // J. Bacteriol.—1981.—147, N 2.—P. 418—426.
123. Zubenko G., Mitchell A., Jones E. Septum formation, cell division and sporulation in mutants of yeast deficient in proteinase B // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.—76, N 5.—P. 2395—2399.
124. Zubenko G., Mitchell A., Jones E. Cell division, catabolite inactivation, and sporulation in protease B deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* // Limited proteolysis in microorganisms / Eds H. Holzer, G. Cohen.—Washington: DHEW publ., 1979.—P. 49—53.
125. Mutant defective in processing of the enzyme located in the lysosome-like vacuole of *Saccharomyces cerevisiae* / B. Hemmings, G. Zubenko, A. Hasilik et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1981.—78, N 2.—P. 435—439.
126. Wolf D. H., Weiser U. Studies on a carboxypeptidase Y mutant of yeast and evidence for a second carboxypeptidase activity // Eur. J. Biochem.—1977.—73, N 3.—P. 553—556.
127. Wolf D. H., Fink G. Proteinase C / carboxypeptidase Y / mutant of yeast // J. Bacteriol.—1975.—123, N 5.—P. 1150—1156.
128. Jones E. Proteinase mutants of *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics.—1977.—85, N 1.—P. 23—33.
129. Pleiotropic mutations of *Saccharomyces cerevisiae* which cause deficiency for proteinases and other vacuole enzymes / E. Jones, G. Zubenko, R. Parker et al. // Alfred Benzon symp. / Eds D. von Wettstein et al. // Copenhagen: Munksgaard, 1981.—P. 183—198.
130. Jones E., Zubenko G., Parker R. *PEP4* gene functions is required for expression of several vacuolar hydrolases in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics.—1982.—102, N 3.—P. 665—677.
131. Zubenko G. A genetic approach to the study of intracellular proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae* // Ph. D. Thesis.—Pittsburgh: Carnegie-Mellon Univ., 1981.—231 p.
132. Zubenko G., Park F., Jones E. Mutations in the *PEP4* locus of *Saccharomyces cerevisiae* block the final step in the maturation of two vacuolar hydrolases // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1983.—80.—P. 510—514.
133. Zubenko G., Jones E. Catabolite inactivation of gluconeogenic enzymes in mutants of yeast deficient in proteinase B // Ibid.—1979.—76, N 10.—P. 4581—4585.
134. Funaguma T., Toyoda Y. Catabolite inactivation of fructose 1,6-bisphosphatase and cytoplasmic malate dehydrogenase in yeast // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1985.—130, N 1.—P. 467—471.
135. *PEP4* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors / G. Ammerer, C. P. Hunter, J. H. Rothman et al. // Mol. Cell. Biol.—1986.—6, N 7.—P. 2490—2499.
136. The *PEP4* gene encodes an aspartyl protease implicated in the posttranslational regulation of *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar hydrolases / C. A. Woolford, L. B. Daniels, F. J. Park et al. // Ibid.—P. 2500—2510.

137. *Rendueles P. S., Wolf D. H.* Proteinase function in yeast: biochemical and genetic approaches to a central mechanism of post-translational control in the eukaryotic cell // *FEMS Microbiol. Rev.*—1988.—54.—P. 17—46.
138. *Changes in proteinase activities and subcellular distribution during inactivation of alcohol oxidase in Candida boidinii* / D. J. Hill, R. O. Jenkins, T. G. Cartledge et al. // *Biochem. J.*—1986.—238, N 2.—P. 255—261.
139. *Brooke A. G., Dijkhuizen L., Harder H.* Regulation of flavin biosynthesis in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // *Arch. Microbiol.*—1986.—145, N 1.—P. 62—70.
140. *Cooper T. G.* Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* // *Molecular biology of the yeast Saccharomyces: metabolism and gene expression.*—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982.—P. 39—99.
141. *Demain A. L.* Catabolite regulation in industrial microbiology // *Overproduction of microbial products* / Eds V. Krumphanzl, B. Sikyta, Z. Vanek.—London: Acad. press, 1982.—P. 3—20.
142. *Vining L. C., Chatterjee S.* Catabolite repression and the control of secondary metabolism // *Ibid.*—P. 35—46.

Львов. отд-ние Ин-та биохимии
им. А. В. Палладина АН УССР

Получено 03.01.88

CARBON CATABOLITE INACTIVATION IN YEAST AS AN IMPORTANT WAY OF REGULATION AT THE POSTTRANSLATIONAL LEVEL

V. I. Titorenko, A. A. Sibirny

Lvov Branch of A. V. Palladin Institute of Biochemistry,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Lvov

Summary

The main characteristics of the carbon catabolite inactivation in the yeast cells are considered. A new interpretation of the physiological significance of this regulatory mechanism is suggested. Data are presented concerning the role of cAMP, protein kinases and vacuolar proteinases in the realization of carbon catabolite inactivation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and in methylotrophic yeasts. A special way of inactivation which functions in methylotrophic yeast and is connected with the «fusion» of peroxisomes and vacuoles and subsequent degradation of peroxisomal enzymes, is described. It is pointed out that genetic control of carbon catabolite inactivation as well as molecular mechanisms of such inactivation for majority of enzymes are not studied yet.