

# МЕХАНИЗМЫ МОДИФИКАЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ

УДК 579.258

© В. А. Савинов, А. Ю. Физикова,  
А. М. Румянцев, Е. В. Самбук

Санкт-Петербургский государственный университет, биолого-почвенный факультет, кафедра генетики и селекции, лаборатория биохимической генетики

✿ Тонкая регуляция экспрессии генов осуществляется посредством конкуренции транскрипционных факторов за промоторы, что обеспечивает своевременный ответ клетки на изменения условий среды. Ген *PHO3* дрожжей *S. cerevisiae* кодирует конститутивную кислотную фосфатазу. В данной работе изучали генетический контроль экспрессии гена *PHO3* в зависимости от источника азота. Показано, что уровень экспрессии гена снижается на среде с «бедным» источником азота, мочевиной. Выявлены возможные механизмы регуляции экспрессии гена *PHO3* при участии репрессора генов азотного метаболизма *Gzf3p* и убиквитин-лигазы *Rsp5p*.

✿ **Ключевые слова:** кислые фосфатазы; азотная катаболитная репрессия; GATA-факторы; тиамин; *PHO3*; *Rsp5*; *Gzf3*; *Saccharomyces cerevisiae*.

## ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ГЕНА *PHO3* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСТОЧНИКА АЗОТА В СРЕДЕ У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

### ВВЕДЕНИЕ

Физиология микроорганизмов, в том числе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, значительно зависит от условий изменчивой окружающей среды. Адаптивный ответ клетки заключается в коррекции метаболических процессов, изменении скорости роста и деления, переходе к споруляции, мицелиальному росту и т. д. Дефицит в среде одного из макроэлементов (углерода, азота или фосфора) в короткий срок приводит к истощению его внутриклеточных резервов и изменяет уровень экспрессии множества генов: некоторые активируются, другие репрессируются.

У дрожжей важную роль в передаче информации об условиях среды играют специфические сигнальные каскады: киназы *Tor1p* и *Tor2p* передают сигнал о типах источника азота в среде, киназа *Snf1p* — о качестве источников углерода, киназа *Pho85p* — об уровне неорганического фосфата (Cardenas et al., 1999; Gancedo, 1998; Johnston & Carlson, 1992). Мишенями для сигнальных молекул являются как регуляторные белки, так и гены, кодирующие ключевые ферменты метаболизма. В настоящее время известно, что многие гены ключевых метаболических ферментов могут иметь в промоторных областях сайты связывания для активаторов или репрессоров разных метаболических путей и воспринимать сигналы о наличии или отсутствии разных биогенных элементов. Кроме того, одни и те же регуляторы могут быть активаторами одних путей и репрессорами других (Попова и др., 2000; Pina et al., 2003).

У дрожжей изучена экспрессия более 6000 генов в ответ на недостаток в среде отдельных биогенных элементов, таких как азот, углерод или фосфор. Предложены модели интегрального ответа клетки на изменение количества того или иного компонента среды (Самбук, 2005; Bradley et al., 2009; Ogawa et al., 2000; Staschke et al., 2010). Несмотря на широкое применение современных технологий, особенности регуляции отдельных генов в ответ на различные сигналы среды часто изучены недостаточно. Можно предположить, что в дрожжевой клетке существует гораздо более разветвленная сеть регуляторных каскадов, чем известно сейчас. Для поиска новых точек пересечения таких каскадов необходимо использовать удобные генетические модели. В настоящей работе в качестве модели для изучения механизмов координированной регуляции был выбран ген *PHO3*, кодирующий конститутивную кислотную фосфатазу (далее — КФ) дрожжей. У дрожжей-сахаромицетов известны четыре изозима КФ: белки *Pho3p*, *Pho5p*, *Pho10p* и *Pho11p* (Johnston & Carlson, 1992). Гены *PHO10* и *PHO11* кодируют минорную фракцию репрессибельных КФ. Ген *PHO5* кодирует основную фракцию

Поступила в редакцию 28.09.2011  
Принята к публикации 11.11.2011

Таблица 1

Штаммы дрожжей *S. cerevisiae*, использованные в работе

Штамм	Генотип
УМ954	MATa ade2-101 ura3-52 his3-200 leu2-3,112 lys2-801 trp1-901 gal4-542
1,4,5,6-УМ954	MATa ade2-101 ura3-52 his3-200 leu2-3,112 lys2-801 trp1-901 gal4-542 gub1
7-УМ954	MATa ade2-101 ura3-52 his3-200 leu2-3,112 lys2-801 trp1-901 gal4-542 gub7
57-D579	MATa ade2-101 leu2-3,112 arg6 pho3-1
9Г-D580	MATa ade2-101 ura3-52 his3-200 lys2-801 trp1-901 arg6 gub1
203-D579	MATa his7-1 arg6 pho3-1

репрессибельных КФ (Bajwa et al., 1984). Гены *PHO5* и *PHO3* произошли в результате дупликации предкового гена. Кодрующие области обоих генов имеют высокий процент идентичности на нуклеотидном (82 %) и аминокислотном (87 %) уровнях. При этом в области промоторов наблюдается низкая степень сходства (Meuhack et al., 1982). Экспрессия гена *PHO3* имеет достаточно высокий уровень, но в отличие от гена *PHO5* не зависит от изменений концентрации фосфата в среде. Промотор гена *PHO3* может быть использован в биотехнологии (Okabayashi et al., 1990), однако в отличие от промотора *PHO5* его практически не используют, так как в некоторых случаях конститутивная экспрессия гетерологичного гена может быть токсична для клеток дрожжей (Парфенова и др., 2002; Matsuyama et al., 2008). Поиск механизмов регуляции экспрессии гена *PHO3* может существенно расширить возможности его применения в биотехнологии.

Ранее было показано, что экспрессия гена *PHO3* подавляется при добавлении в среду тиамин (Nosaka et al., 1993). Тиамин (витамин В<sub>1</sub>) необходим для синтеза тиаминпирофосфата, который является кофактором ферментов цикла трикарбоновых кислот и пентозофосфатного пути окисления углеводов. Дрожжи способны поглощать тиамин из среды с помощью специфического мембранного белка-транспортера, а также синтезировать его непосредственно в клетках (Singleton, 1997). КФ Pho3p имеет тиамин-связывающую активность при pH 5,0 и является растворимым ферментом периплазмы клеток *S. cerevisiae*. КФ гидролизует тиаминфосфаты в среде, что позволяет клетке усваивать данный класс фосфорорганических соединений (Nosaka, 1990). В репрессии генов «тиаминового» регулона при повышении концентрации тиамин в среде участвуют NAD<sup>+</sup>-зависимые деацетилазы гистонов (Li et al., 2010).

Данная работа посвящена изучению регуляции экспрессии гена *PHO3* в ответ на изменения источника азота в среде. В ходе работы показано, что экспрессия гена *PHO3* зависит от качества источника азота и снижается на среде с «бедным» источником, мочевиной. Были выявлены возможные механизмы регуляции экспрессии гена *PHO3* при участии репрессора генов азотного метаболизма Gzf3p и убиквитин-лигазы Rsp5p.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Штаммы дрожжей и бактерий.** Генотипы штаммов дрожжей *S. cerevisiae*, используемых в данной работе, приведены в таблице 1. Штамм УМ954 (Vignols et al., 2005) был использован в качестве исходного для трансформации плазмидами, содержащими ген *ADE2* под контролем промотора гена *PHO3*, а также для получения мутантов. Штамм 57-D579, любезно предоставленный научным сотрудником лаборатории биохимической генетики СПбГУ к. б. н. Физиковой А. Ю., был использован для анализа доминантности или рецессивности и выяснения моногенности полученных мутаций. Штамм 9Г-D580, полученный в споровом потомстве диплоида D580 от скрещивания 5-УМ954 и 57-D579, использовали в тесте на аллелизм. Штамм 203-D579 был использован для картирования мутаций с помощью гаплоидизации. Для определения типа спаривания использовали штаммы-тестеры *MATa his5* и *MATa his5*, любезно предоставленные лабораторией физиологической генетики кафедры генетики и селекции биолого-почвенного факультета СПбГУ. Для амплификации плазмид использовали бактериальный штамм *Escherichia coli* DH-5α (Meselson & Yuan, 1968).

**Плазмиды.** Для изучения влияния источников азота на экспрессию гена *PHO3* использовали мультикопийную плазмиду pTL1 [*PHO3p-ADE2 2μ LEU2*], содержащую промоторную область гена *PHO3* от -17 до -370 н., считая от кодона ATG (Останин и др., 1988). Плазмида pFL36 [*CEN LEU2*] (Vector NTI, Invitrogen Corporation) была использована для конструирования центральной плазмиды, несущей ген *ADE2* под контролем промотора *PHO3*. Для клонирования использовали библиотеку генов YSC4613 дрожжей *S. cerevisiae*, созданную на основе вектора pGP564 [*2μ LEU2*] (Yeast Genomic Tiling Collection, Open biosystems), предоставленную лабораторией физиологической генетики кафедры генетики и селекции биолого-почвенного факультета СПбГУ.

**Среды и условия культивирования.** Среды MD, YPD, LB, ПЕП имеют стандартные составы (Захаров и др., 1984; Guthrie & Fink, 1991). В отличие от среды ПЕП ПЕПФО содержит 1 г КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> на литр среды. Минимальная среда без азота (MD-N) содержит в 1 л

те же компоненты, что и MD, за исключением сульфата аммония. В качестве источника азота использовали сульфат аммония, мочевины и аминокислоты: пролин, глутамин и глутамат, которые добавляли в среду в конечной концентрации 0,46 % (Magasanik & Kaiser, 2002). Среда MD стандартного состава содержит 0,2 мкг/мл тиамин. Для отбора бактериальных трансформантов по признаку устойчивости к антибиотику в среду LB добавляли ампициллин или канамицин в концентрации 50 мкг/мл.

В работе были использованы стандартные методы работы с ДНК и штаммами бактерий (Маниатис и др., 1984).

**Мутагенез.** Для получения мутантов *S. cerevisiae* с восстановлением роста на среде с мочевиной колонии клеток трансформантов YM954 [pTL1] и YM954 [pSF28] облучали УФ (70 мВт/м<sup>2</sup>) в течение 1 минуты и инкубировали в течение недели в темноте при +30 °С.

**Индукция гаплоидизации и отбор клеток Ura<sup>-</sup>.** Для индукции гаплоидизации диплоидные клетки дрожжей, гетерозиготные по маркерным мутациям, высевали на среду с беномилом (30 мкл/мл среды), затем переносили на селективные среды, в том числе на среду с фтороротовой кислотой (1 г 5-FOA на 1 л среды) для отбора клонов с фенотипом Ura<sup>-</sup>. Выросшие анеуплоидные ауксотрофные колонии переносили методом реплик на чашки со средой, содержащей глутамат в качестве источника азота, и анализировали рост колоний (Guthrie & Fink, 1991).

**Методы статистической обработки результатов.** Для подсчета количества анеуплоидных клонов в опыте по гаплоидизации использовали стандартные методы вычисления доверительных интервалов. Расчет ошибки и доверительного интервала проводили с использованием параметрического критерия Стьюдента при вероятности  $p = 0,95$  и числе степеней свободы  $f = 3$  (Гланц, 1999).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Изучение экспрессии гена *PHO3* в зависимости от источника азота

Анализ экспрессии генов дрожжей с помощью метода биочипов показал, что уровень экспрессии гена *PHO3* зависит от доступности азота в среде (Bradley et al., 2009; Staschke et al., 2010). Для изучения механизмов регуляции гена *PHO3* нами был предложен следующий подход. Была использована созданная ранее мультикопийная плазмида pTL1, содержащая репортерный ген *ADE2* под контролем промотора гена *PHO3* (Останин и др., 1988). Однако ее использование для наших целей может затруднять интерпретацию результатов, так как известно, что количество белков-регуляторов, как правило, невелико в дрожжевых клетках. Поэтому для работы была сконструирована центромерная плазмида pSF28 (рис. 1). Уровень экспрессии репортерного гена *ADE2* оценивали по росту трансформантов на среде без аденина.

Штамм YM954 (фенотип Leu-Ade<sup>-</sup>) (табл. 1) трансформировали плазмидами pTL1 и pSF28 и отбирали трансформанты на среде без лейцина. Суспензии трансформантов в исходной концентрации примерно  $1 \times 10^4$  клеток/мл и в 10-кратном разведении ( $1 \times 10^3$  клеток/мл) высевали на твердые минеральные среды без аденина и лейцина и с разными источниками азота: глутамином, сульфатом аммония, глутаматом, пролином и мочевиной. В качестве контроля использовали исходный штамм YM954. Оказалось (рис. 2), что рост всех типов трансформантов замедляется на среде с бедным источником азота, мочевиной, а также с глутаматом, в то время как рост дрожжей на хороших источниках азота (глутамин, аммоний) не отличался от роста штамма YM954.

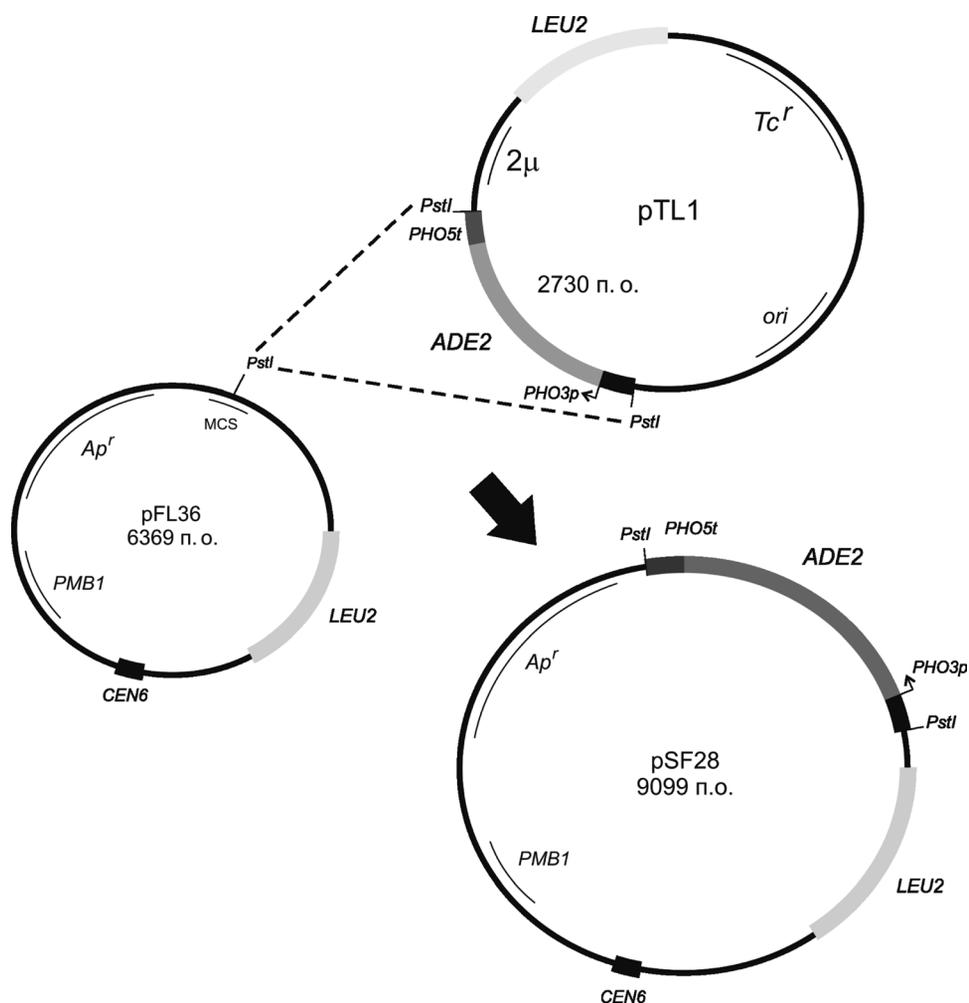
При росте на среде с пролином (рис. 2), плохим источником азота, трансформанты, содержащие мультикопийную плазмиду, и трансформанты, содержащие центромерную плазмиду, демонстрировали нормальный рост, сравнимый с исходным штаммом YM954. Однако колонии трансформантов с центромерной плазмидой pSF28 были окрашены в красный цвет. Это объясняется накоплением в клетках дрожжей красного пигмента, аминоконидазолрибозида, вследствие отсутствия активности АИР-карбоксилазы, продукта гена *ADE2*, что в случае трансформантов с плазмидой pSF28 обусловлено подавлением экспрессии гена *ADE2* с промотора гена *PHO3* (Останин и др., 1988). Трансформанты с плазмидой pTL1 не окрашены вследствие большого числа копий гена *ADE2* в клетке.

Таким образом, видно, что экспрессия гена *PHO3* зависит от типа источника азота. При этом она максимальна на средах с глутамином и сульфатом аммония и минимальна при росте на мочевины (Ure<sup>-</sup>). Такой ответ гена *PHO3* на изменение источника азота кардинально отличается от реакции генов, подверженных азотной катаболитной репрессии. В последнем случае на бедных источниках азота происходит активация соответствующих генов (Magasanik & Kaiser, 2002). Отсутствие роста трансформантов на среде с мочевиной позволило использовать эту среду для селекции мутантов по генам, продукты которых участвуют в регуляции гена *PHO3* в зависимости от источника азота.

### Получение и анализ мутантов Ure<sup>+</sup> у трансформантов YM954[pTL1] и [pSF28]

Мутантов, растущих на среде с мочевиной (фенотип Ure<sup>+</sup>), индуцировали при помощи УФ. Отбор мутантов проводили на среде без аденина и лейцина с мочевиной в качестве источника азота. В результате были отобраны пять мутантов Ure<sup>+</sup>: четыре (1-, 4-, 5-, 6-YM954) — у трансформанта YM954[pTL1] и один (7-YM954) — у YM954[pSF28].

Для изучения собственного фенотипического проявления мутаций, восстанавливающих рост трансформантов на мочевины, мутанты культивировали в полной



**Рис. 1.** Схема конструирования плазмиды pSF28 [*PHO3p-ADE2 CEN LEU2*]. *Ap<sup>r</sup>*, *Tc<sup>r</sup>* — гены устойчивости к ампициллину и тетрациклину соответственно; *ori* — область начала репликации; *2μ* — сайт инициации репликации 2-микронной плазмиды; *ADE2*, *LEU2* — гены дрожжей *S. cerevisiae*; *PHO3p*, *PHO5t* — промотор и терминатор генов КФ дрожжей *S. cerevisiae*; *MCS* — полилинкерная область; *PMB1* — область начала репликации; *CEN6* — центромера. Участок плазмиды pTL1, содержащий промотор гена *PHO3*, кодирующую область гена *ADE2* и терминатор гена *PHO5*, вырезали по сайту рестрикции *PstI* и встроили в вектор pFL36 по такому же сайту

	Источники азота в среде				
	глутамин	аммоний	глутамат	пролин	мочевина
YM954 [pTL1]					
YM954 [pSF28]					
YM954					

**Рис. 2.** Влияние различных источников азота на рост штамма YM954 *S. cerevisiae*, трансформированного плазмидой pTL1 [*PHO3p-ADE2 2μ LEU2*] или pSF28 [*PHO3p-ADE2 CEN LEU2*], в концентрации  $1 \times 10^4$  и  $1 \times 10^3$  клеток/мл высевали на минеральную среду MD без аденина и лейцина с разными источниками азота (глутамином, сульфатом аммония, глутаматом, пролином, мочевиной) в концентрации 0,46 % и инкубировали при температуре 30 °C в течение 5 дней. В качестве контроля использовали исходный штамм YM954



**Рис. 3.** Влияние различных источников азота на рост мутантов 1-, 4-, 5-, 7-*YM954* (А) и трансформантов 5-*YM954*[*GZF3*], 7-*YM954*[*GZF3*] (Б). А. Суспензии клеток мутантных штаммов 1-, 4-, 5-, 7-*YM954* в концентрации  $1 \times 10^4$  клеток/мл высевали на минеральную среду с разными источниками азота (глутамином, сульфатом аммония, глутаматом, мочевиной) в концентрации 0,46 % и инкубировали при температуре 30°C в течение 5 дней. В качестве контроля использовали исходный штамм *YM954*. Б. Суспензии клеток штаммов 5-*YM954* и 7-*YM954*, трансформированных плазмидой № 783 [*GZF3* 2μ *LEU2*] из библиотеки генов YSC4613 *S. cerevisiae*, в концентрации  $1 \times 10^4$  клеток/мл высевали на минеральную среду без лейцина с сульфатом аммония и глутаматом в качестве источника азота в концентрации 0,46 % и инкубировали при температуре 30°C в течение 5 дней

среде, затем рассеивали на чашки и отбирали клоны, потерявшие плазмиды (*Leu*<sup>-</sup>). Анализ роста таких клонов показал, что все мутанты не растут на средах с глутаматом и мочевиной в качестве источника азота (*Glu*<sup>-</sup>). При этом рост мутантов на средах с глутамином и сульфатом аммония не отличается от роста исходного штамма *YM954* (рис. 3А). Полученные мутации мы условно обозначили *gub1*, 4, 5, 6, 7 (**g**lutamate **u**t ilization **b**lockage) соответственно отобранным мутантам. Фенотип мутантов свидетельствует о нарушении регуляции генов метаболизма азота.

Для выяснения доминантности или рецессивности мутаций штаммы 1-, 4-, 5-, 6-, 7-*YM954* скрестили со штаммом 57-D579 (*Glu*<sup>+</sup>) и анализировали рост диплоидов на среде с глутаматом. Диплоиды росли, что свидетельствует о рецессивности мутаций *gub1*, 4, 5, 6, 7.

Серегант 9Г-D580 (*Glu*<sup>-</sup>), полученный от скрещивания штаммов 5-*YM954* и 57-D579 и несущий мутацию *gub5*, использовали для проведения теста на аллелизм с

мутациями *gub1*, 4, 5, 6, 7. В результате мутанты расщепились на две группы комплементации. В первую группу, обозначенную *gub1*, попали мутанты 1, 4, 5, 6-*YM954*; во вторую группу — только мутант 7-*YM954*. Эту группу обозначили *gub7*.

Для выяснения моногенности наследования признака *Glu*<sup>-</sup> проводили тетрадный анализ гибрида D580 (5-*YM954* × 57-D579). В связи с тем, что гибриды с мутантными штаммами 1-, 4-, 5-, 6-*YM954* демонстрировали низкий уровень споруляции, были проанализированы только 19 тетрад, из которых 10 оказались полными. Было выявлено расщепление в тетрадах по признаку *Glu*<sup>-</sup>/*Glu*<sup>+</sup> в соотношении 2:2. Следовательно, аллельные мутации *gub1*, 4, 5, 6 наследуются моногенно.

Таким образом, с использованием промотора гена *PHO3* в качестве мишени и гена *ADE2* в качестве репортерного гена нам удалось получить мутации в регуляторных генах, которые участвуют как в регуляции генов метаболизма азота, так и в регуляции *PHO3* на средах с бедными источниками азота.

#### Анализ последовательности промотора гена *PHO3*

Регуляция генов метаболизма азота у дрожжей *S. cerevisiae* осуществляется в результате совместной работы четырех транскрипционных факторов GATA-семейства: активаторов *Gln3p* и *Gat1p* (*Nil1p*), репрессоров *Dal80p* и *Gzf3p* (*Nil2p*, *Deh1p*) (Magasanik & Kaiser, 2002). Эти белки специфически распознают последовательности GATA в промоторах генов-мишеней. Активность регуляторных белков напрямую зависит от типа источника азота в среде и от внутриклеточного количества глутамина, необходимого метаболита для запуска азотной катаболитной репрессии.

Особенности роста трансформантов *YM954*[*pTL1*], *YM954*[*pSF28*] и мутантов 1-, 4-, 5-, 6-, 7-*YM954* на минеральных средах с разными источниками азота позволили предположить, что обнаруженные мутации могли возникнуть в одном или нескольких генах, кодирующих GATA-факторы.

Известно, что активатор *Gln3p* распознает сайты GAT(A/T)A(G), которые могут располагаться в обеих цепях ДНК и в разной ориентации (Coffman et al., 1995; Cooper et al., 1990; Scherens et al., 2006; Stanbrough et al., 1995), а также сайты GAT(A/T) (G/A). Кроме того, известны вспомогательные сайты активации TTG(G/T)T. Активатор *Gat1p* связывается с сайтами (A)GATAA(G), CTTATCG. Репрессор *Dal80p* — с (T/C)GATAA(G). Репрессор *Gzf3p* распознает последовательности C(T/C)GATAAG, GATAAG, (A/T)GATAA(G/C) (*Saccharomyces* Genome Database, URL: <http://www.yeastgenome.org>).

Используя базу данных «*Saccharomyces* Genome Database» (URL: <http://www.yeastgenome.org>), мы проанализировали последовательность промотора гена *PHO3* от -370 до -17 нуклеотида, использованную при конструировании плазмид *pTL1* и *pSF28*. Анализ после-

довательности выявил сайты в обеих цепях ДНК, с которыми, предположительно, могли бы связываться GATA-факторы: по одному сайту GATAA, GATTA, GATTG и по два сайта GATA, GATT. При поиске GATA-сайтов в обратной ориентации в обеих цепях ДНК были обнаружены дополнительные последовательности GATAA (1 сайт), GATTA (2 сайта), GATA (1 сайт) и GATT (2 сайта). Таким образом, в промоторе гена *PHO3* содержатся последовательности, с которыми теоретически возможно связывание GATA-факторов транскрипции дрожжей *S. cerevisiae*, а сам ген *PHO3* может быть мишенью для регуляторов азотного метаболизма.

#### Поиск генов, комплементирующих мутации *gub1* и *gub7*

На первом этапе поиска генов, соответствующих группам комплементации *gub1* и *gub7*, проверили, могли ли мутации затронуть гены *GLN3*, *GAT1*, *DAL80* или *GZF3* транскрипционных факторов азотной регуляции. Для этого трансформировали штаммы 5-*YM954* и 7-*YM954* плазмидами №№ 414, 470, 783, 924 из библиотеки генов «Yeast Genomic Tiling Collection» дрожжей *S. cerevisiae*, содержащими фрагменты генома с каждым из вышеперечисленных генов. Трансформанты отбирали на селективных средах и анализировали восстановление фенотипа *Glu+* на минеральной среде с глутаматом в качестве единственного источника азота. Было показано, что восстановление роста на глутамате происходит только у трансформанта 7-*YM954* с плазмидой № 783 (ген *GZF3*) (Рис. 3Б). Возможно, это является следствием увеличения количества белка-репрессора из-за мультикопийности вектора pGP564. Известно, что фактор *Gzf3p* обладает наибольшей активностью при росте дрожжей в среде с глутаматом, когда подавлен главный конкурент, активатор *Gat1p* (Deed et al., 2011).

Кроме гена *GZF3*, в плазмиде № 783 расположены гены *MDV1* и *CCT7*. Первый кодирует белок внешней мембраны митохондрий, необходимый для их деления. Второй — субъединицу комплекса шаперонинов, необходимую для сборки актина и тубулина. Эти белки не являются факторами транскрипции и не связаны с регуляцией азотного метаболизма (*Saccharomyces Genome Database*, URL: <http://www.yeastgenome.org>).

Таким образом, мутация *gub7*, приводящая к дерепрессии промотора гена *PHO3* у трансформантов при росте на среде с мочевиной в качестве единственного источника азота и к отсутствию роста дрожжей на среде с глутаматом, по всей видимости, возникла в гене *GZF3*, кодирующем белок-репрессор из семейства GATA-факторов.

#### ПОИСК ГЕНА, КОМПЛЕМЕНТИРУЮЩЕГО МУТАЦИЮ *GUB1*

Мутанты из комплементационной группы *gub1* не растут на среде с глутаматом, и это нарушение роста не компенсируется введением в клетки дополнительных ко-

пий генов транскрипционных факторов азотного метаболизма. С целью локализации мутации *gub1* в геноме дрожжей использовали метод гаплоидизации, который позволяет локализовать мутацию в хромосоме.

Штамм *YM954* дрожжей *S. cerevisiae*, как и мутанты 1, 4, 5, 6-*YM954*, несет ряд мутаций, которые являются удобными селективными маркерами, расположенными в разных хромосомах. Мутации *ade2* и *his3* расположены в хромосоме XV, *ura3* — в хромосоме V, *leu2* — в хромосоме III, *lys2* — в хромосоме II, *trp1* — в хромосоме IV. Чтобы проанализировать расположение мутации *gub1* в хромосомах дрожжей, мы провели скрещивание штаммов 1-, 4-, 5-, 6-*YM954* (*Glu-*) со штаммом 203-D579 (*Glu+*). У диплоидов, гетерозиготных по мутациям *gub1*, индуцировали гаплоидизацию с помощью беномила, и высевали их на селективные среды, чтобы отобрать ауксотрофные клоны, потерявшие какую-либо одну хромосому или весь гаплоидный набор хромосом. Анеуплоидные колонии отпечатывали на среду с глутаматом в качестве источника азота и анализировали частоту появления у анеуплоидов признака *Glu-* на фоне ауксотрофностей. Высокая частота совместного появления клонов *Ura-Glu-* ( $0,904 \pm 0,067$ ;  $p = 0,95$ ,  $f = 3$ ,  $tSt = 3,182$ ) свидетельствует о том, что мутация *gub1* локализована в одной хромосоме с мутацией *ura3* (в хромосоме V). Напротив, частота появления клонов *Ade-Glu-* ничтожно мала: из 124 отобранных клонов *Ade-* ни один не оказался *Glu-*, что указывает на отсутствие сцепления *gub1* и маркера *ADE2* (в хромосоме XV).

В дальнейшем мутант 5-*YM954* трансформировали плазмидами геновой библиотеки «Yeast Genomic Tiling Collection», покрывающими всю последовательность хромосомы V дрожжей *S. cerevisiae*. Были использованы 59 плазмид библиотеки: №№ 385, 387–391, 393–398, 401–412, 415, 418–420, 422–438, 440–446, 449, 452–457. Трансформанты отбирали на селективной среде без лейцина и анализировали восстановление фенотипа *Glu+* на минеральной среде с глутаматом в качестве единственного источника азота. Было показано, что восстановление роста на среде с глутаматом у штамма 5-*YM954* происходило при трансформации плазмидой № 434. Эта плазида содержит фрагмент хромосомы V с генами: *YCK3*, *DSE1*, *RSP5*, *NSA2*, *LCP5*, *YER128W*, *PAK1*.

Ген *YCK3* кодирует мембранную киназу, участвующую в регуляции слияния вакуолей. Ген *DSE1* кодирует белок, специфичный для дочерних клеток, делеция которого приводит к нарушениям цитокинеза после деления. Ген *NSA2* кодирует белок, участвующий в созревании молекул 27S пре-rРНК. Ген *LCP5* кодирует белок, необходимый для созревания 18S рРНК. Рамка считывания *YER128W* кодирует белок неизвестной функции. Ген *PAK1*, представленный на плазмиде без 3'-области, кодирует серин-треониновую киназу, участвующую в регуляции метаболизма углерода (*Saccharomyces Genome Database*, URL: <http://www.yeastgenome.org>).

Ген *RSP5* кодирует убиквитин-лигазу E3, участвующую в большом количестве внутриклеточных процессов: от модификации гистонов до убиквитин-опосредованного эндоцитоза и деградации белков. В этом ряду генов *RSP5* представляет для нас особый интерес, поскольку известно, что фактор Rsp5p вовлечен в передачу сигнала о типе источника азота транскрипционному GATA-фактору Gln3p (Tate et al., 2006). Rsp5p регулирует уровень мембранных пермеаз аммония и аминокислот в зависимости от типа источника азота в среде. Лишние белки убиквитинируются и удаляются из мембраны эндоцитозом. Известно, что убиквитин-лигазный комплекс Rsp5/Bul1/Bul2 участвует в активации белка Gln3p при его ядерной локализации (Crespo et al., 2004). Поэтому из всех перечисленных генов плазмиды № 434 наиболее вероятным местом локализации мутации *gub1* является ген *RSP5*, кодирующий убиквитин-лигазу дрожжей *S. cerevisiae*. Окончательным доказательством этого утверждения будут переклонирование гена-кандидата *RSP5* в отдельный вектор и трансформация мутантных штаммов, что будет выполнено в ходе дальнейшей работы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование модели, состоящей из репортерного гена *ADE2* под контролем промотора гена *PHO3*, позволило показать, что экспрессия гена конститутивной КФ регулируется в зависимости от типа источника азота в среде. Характер этой регуляции не соответствует регуляции генов азотного метаболизма, подверженных азотной катаболитной репрессии. В отличие от этих генов экспрессия *PHO3* усиливается при росте клеток на среде с хорошим источником азота (глутамин, сульфат аммония) и подавляется при росте на среде с мочевиной. Ранее было показано, что наличие в среде антибиотика рапамицина, моделирующего у дрожжей состояние азотного голодания за счет активации главного транскрипционного активатора генов азотного метаболизма Gln3p, приводит к значительному снижению уровня транскрипции гена *PHO3*. Следовательно, Gln3p может выступать в роли репрессора *PHO3*. У штаммов с делецией гена *GLN3* уровень репрессии снижается более чем втрое (Staschke et al., 2010), но механизм такой репрессии до сих пор не изучен.

В нашей работе показано, что мутации, приводящие к дерепрессии гена *PHO3* на среде с мочевиной в качестве источника азота, по всей видимости, затрагивают два гена, *GZF3* и *RSP5*, кодирующие транскрипционный репрессор и убиквитин-лигазу соответственно. На основании наших данных могут быть предложены следующие модели регуляции гена *PHO3* азотом. (1) На среде с мочевиной и глюкозой фактор Gzf3p связывается с промоторной областью гена *PHO3* и блокирует его транскрипцию, координируя уровень экспрессии этого гена с потребностями клетки. Таким образом, не только Gln3p

(Staschke et al., 2010), но и Gzf3p участвуют в репрессии гена *PHO3*. Особенно интересно, что для генов азотного метаболизма фактор Gln3p — это активатор транскрипции, тогда как фактор Gzf3p — репрессор, а для гена *PHO3* оба фактора выступают в роли репрессоров. (2) Rsp5p участвует в убиквитинировании РНК-полимеразы II и, таким образом, может опосредованно влиять на уровень базальной транскрипции *PHO3* (Hagremar et al., 2009). (3) Мутации *gsp5* могут приводить к нарушению транспорта аминокислот в клетку и влиять на активность фактора Gln3p (Tate et al., 2006) и, следовательно, Gzf3p. (4) По всей видимости, убиквитин-лигаза Rsp5p способна напрямую влиять на активность белка Gzf3p, который, в свою очередь, может воздействовать на промотор гена *PHO3*, поскольку в настоящее время показано, что Gzf3p имеет сайты убиквитинирования (Peng et al., 2003), а между генами *GZF3* и *RSP5* установлена косвенная регуляторная связь (Costanzo et al., 2010).

Таким образом, нам удалось показать, что экспрессия гена *PHO3* зависит от качества источника азота и выявить участников регуляторного каскада, координирующих метаболизм азота и фосфата у дрожжей-сахаромицетов.

Данная работа поддержана грантом «Молекулярно-генетические механизмы адаптации микроорганизмов к стрессовым воздействиям» (Ермилова Е. В., шифр: 1.38.65.2011) на проведение фундаментальных исследований по приоритетным направлениям Программы развития СПбГУ.

## Литература

1. Гланц С., 1999. Медико-биологическая статистика. М.: Практика. 460 с.
2. Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. Н., Федорова И. В., 1984. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л.: Наука. 144 с.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж., 1984. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 480 с.
4. Останин К. В., Смирнова Т. М., Мясников А. Н. и др., 1988. Векторы экспрессии на основе промоторов генов *PHO3* и *PHO5* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: конструирование, сравнительная оценка эффективности, использование для суперпродукции фосфорибозиламиноимидазолкарбоксилазы // Биополимеры и клетка. № 4. С. 259–266.
5. Парфенова Л. В., Смирнов М. Н., Самбук Е. В., Падкина М. В., 2002. Продукция β-интерферона человека в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* ведет к снижению активности цитохром-С-оксидазы // Биотехнология. № 6. С. 23–30.
6. Попова Ю. Г., Падкина М. В., Самбук Е. В., 2000. Влияние мутаций в генах *PHO85* и *PHO4* на утилиза-

- цию пролина у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. Т. 36. № 12. С. 1622–1628.
7. Самбук Е. В., 2005. Генетические механизмы реализации закона лимитирующего фактора у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Жур. общ. биол. Т. 66. № 4. С. 310–325.
  8. Bajwa W., Meyhack B., Rudolph H. et al., 1984. Structural of two tandemly repeated acid phosphatase genes in yeast // Nucleic Acids Res. Vol. 12. № 20. P. 7721–7739.
  9. Bradley P. H., Brauer M. J., Rabinowitz J. D., Troyanskaya O. G., 2009. Coordinated concentration changes of transcripts and metabolites in *Saccharomyces cerevisiae* // PLoS Comput Biol. Vol. 5. № 1. P. 1–15.
  10. Cardenas M. E., Cutler N. S., Lorenz M. C. et al., 1999. The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients // Genes Dev. Vol. 13. № 24. P. 3271–3279.
  11. Coffman J. A., Rai R., Cooper T. G. et al., 1995. Genetic evidence for Gln3p-independent, nitrogen catabolite repression-sensitive gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* // J. of Bacteriol. Vol. 177. № 23. P. 6910–6918.
  12. Cooper T. G., Ferguson D., Rai R. et al., 1990. The GLN3 gene product is required for transcriptional activation of allantoin system gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Bacteriol. Vol. 172, № 2. P. 1014–1018.
  13. Costanzo M., Baryshnikova A., Bellay J. et al., 2010. The genetic landscape of a cell // Science. V 327. № 5964. P. 425–431.
  14. Crespo J. L., Helliwell S. B., Wiederkehr C. et al., 2004. NPR1 kinase and RSP5-BUL1/2 ubiquitin ligase control GLN3-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. Vol. 279. № 36. P. 37512–37517.
  15. Deed N. K., van Vuuren H. J. J., Gardner R. C., 2011. Effects of nitrogen catabolite repression and di-ammonium phosphate addition during wine fermentation by a commercial strain of *S. Cerevisiae* // Appl. Microbiol. Biotechnol. № 89. P. 1537–1549.
  16. Gancedo J. M., 1998. Yeast carbon catabolite repression // Microbiol. Mol. Biol. Rev. Vol. 62. № 2. P. 334–361.
  17. Guthrie C., Fink G. R., 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. Academic Press. Vol. 194. 933 p.
  18. Harreman M., Taschner M., Sigurdsson S. et al., 2009. Distinct ubiquitin ligases act sequentially for RNA polymerase II polyubiquitylation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 06. № 49. P. 20705–20710.
  19. Johnston M., Carlson M., 1992. Regulation of carbon and phosphate utilization // Mol. Cell. Biol. of the Y. Sacch.: Gene Expression. Vol. 2. P. 193–255.
  20. Li M., Petteys B. J., McClure J. M. et al., 2010. Thiamine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by the NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase Hst1 // Mol. and Cell. Biol. Vol. 30. № 13. P. 3329–3341.
  21. Magasanik B., Kaiser C. A., 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae* // Gene. № 290. P. 1–18.
  22. Matsuyama A., Shirai A., Yoshida M., 2008. A series of promoters for constitutive expression of heterologous genes in fission yeast // Yeast. Vol. 25. № 5. P. 371–376.
  23. Meselson M., Yuan Y., 1968. DNA restriction enzyme from *E. coli* // Nature. Vol. 217. P. 1110–1114.
  24. Meyhack B., Bajwa W., Rudolph H. et al., 1982. Two yeast acid phosphatase structural genes are the result of a tandem duplication and show different degrees of homology in their promoter and coding sequences // EMBO J. Vol. 1, № 6. P. 675–680.
  25. Nosaka K., 1990. High affinity of acid phosphatase encoded by PHO3 gene in *Saccharomyces cerevisiae* for thiamin phosphates // Biochim. Biophys. Acta. № 1037. P. 147–154.
  26. Nosaka K., Kaneko Y., Nishimura H. et al., 1993. Isolation and characterization of a thiamin pyrophosphokinase gene, THI80, from *Saccharomyces cerevisiae* // J. of Biol. Chem. Vol. 268. № 23. P. 17440–17447.
  27. Ogawa N., DeRisi J., Brown P. O., 2000. New components of system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis // Mol. Biol. Cell. Vol. 11. № 12. P. 4309–4321.
  28. Okabayashi K., Oi H., Hirabayashi K. et al., 1990. Albumin gene-containing plasmid, transformant carrying same, production of such transformant and production of albumin. Green Cross. EP0399455.
  29. Peng J., Schwartz D., Elias J.E. et al., 2003. A proteomic approach to understanding protein ubiquitination // Nat. Biotechnol. Vol. 21. № 8. P. 921–926.
  30. Pina B., Fernandez-Larrea J., Garcia-Reyro N. et al., 2003. The different (sur)faces of Rap1p // Mol. Gen. Genomics. № 268. P. 791–798.
  31. *Saccharomyces* Genome Database, URL: <http://www.yeastgenome.org>
  32. Scherens B., Feller A., Vierendeels F. et al., 2006. Identification of direct and indirect targets of the Gln3 and Gat1 activators by transcriptional profiling in response to nitrogen availability in the short and long term // FEMS Yeast Res. № 6. P. 777–791.
  33. Singleton C. K., 1997. Identification and characterization of the thiamine transporter gene of *Saccharomyces cerevisiae* // Gene. № 199. P. 111–121.
  34. Stanbrough M., Rowen D. W., Magasanik B., 1995. Role of the GATA factors Gln3p and Nil1p of *Saccharomyces cerevisiae* in the expression of nitrogen-regulated genes // Biochem. Vol. 92. P. 9450–9454.
  35. Staschke K. A., Dey S., Zaborske J. M. et al., 2010. Integration of general amino acid control and target of rapamycin (TOR) regulatory pathways in nitrogen assimilation in yeast // The J. of Biol. Chem. Vol. 285. № 22. P. 16893–16911.

36. Tate J. J., Rai R., Cooper T. G., 2006. Ammonia-specific regulation of Gln3 localization in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase Nrp1 // J. Biol. Chem. Vol. 281. № 38. P. 28460–28469.
37. Vignols F., Brehelin C., Surdin-Kerjan Y. et al., 2005. A yeast two-hybrid knockout strain to explore thioredoxin-interacting proteins in vivo // PNAS. Vol. 102. № 46. P. 16729–16734.

**RESEARCHING THE MECHANISMS OF GENE *PHO3* REGULATION DEPENDING ON NITROGEN SOURCE IN MEDIUM IN YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Savinov V. A., Fizikova A. Y., Rumyantsev A. M., Sambuk E. V.

✿ **SUMMARY:** Delicate regulation of gene expression is performed through transcriptional factors' competition for promoters that provides punctual cell response to environmental changes. Gene *PHO3* of yeast *S. cerevisiae* encodes the constitutive acid phosphatase. In this work we researched genetic control of the gene *PHO3* expression in response to nitrogen source in medium. *PHO3* expression level was proved to decrease while yeast using poor nitrogen source like urea. Possible regulatory mechanisms for gene *PHO3* were revealed involving repressor of nitrogen regulated genes *Gzf3p* and ubiquitin ligase *Rsp5p*

✿ **KEY WORDS:** acid phosphatases; nitrogen catabolite repression; GATA factors; thiamine; *Saccharomyces cerevisiae*.

✿ Информация об авторах

**Савинов Владимир Александрович** — м. н. с. Кафедра генетики и селекции. Биолого-почвенный факультет. Санкт-Петербургский государственный университет. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9. E-mail: vova.savinoff@gmail.com.

**Физикова Анастасия Юрьевна** — кандидат биологических наук, младший научный сотрудник. Кафедра генетики и селекции. Биолого-почвенный факультет. Санкт-Петербургский государственный университет. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9. E-mail: vova.savinoff@gmail.com.

**Румянцев Андрей Михайлович** — лаборант. Кафедра генетики и селекции. Биолого-почвенный факультет. Санкт-Петербургский государственный университет. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9. E-mail: vova.savinoff@gmail.com.

**Самбук Елена Викторовна** — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник. Кафедра генетики и селекции. Биолого-почвенный факультет. Санкт-Петербургский государственный университет. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9. E-mail: vova.savinoff@gmail.com.

**Savinov Vladimir Alexandrovich** — junior research fellow. Department of genetics and breeding. Faculty of biological and soil sciences. St. Petersburg State University. 7-9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russia. E-mail: vova.savinoff@gmail.com.

**Fizikova Anastasia Iurievna** — PhD, junior research fellow. Department of genetics and breeding. Faculty of biological and soil sciences. St. Petersburg State University. 7-9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russia. E-mail: vova.savinoff@gmail.com.

**Rumyantsev Andrey Mihaylovich** — laboratory assistant. Department of genetics and breeding. Faculty of biological and soil sciences. St. Petersburg State University. 7-9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russia. E-mail: vova.savinoff@gmail.com.

**Sambuk Elena Viktorovna** — ScD, assistant professor, senior research fellow. Department of genetics and breeding. Faculty of biological and soil sciences. St. Petersburg State University. 7-9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russia. E-mail: vova.savinoff@gmail.com.