

Diss. ETH No. 8815

*TR Hütter*  
*31. Jan 1989*

**THE ISOGENES ARO3 AND ARO4  
OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

A dissertation submitted to the  
**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
ZURICH**  
for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by  
**GERHARD PARAVICINI**  
dipl. Natw. ETH  
born November 28, 1958  
citizen of Glarus (GL)

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. R. Hütter, examiner  
Prof. Dr. H. Hennecke, co-examiner

ADAG Administration & Druck AG  
Zurich 1989

## SUMMARY

Structure, gene expression and regulation of the two isogenes ARO3 and ARO4 of Saccharomyces cerevisiae which encode DAHP synthases inhibited by phenylalanine and tyrosine, respectively, were analysed.

The ARO3 gene was sequenced. It encodes a predicted protein of 370 amino acids with a calculated molecular weight of 42'137 d. The upstream activation sequence 'UAS' (consensus TGACTC) for the regulation under the general control is present in the ARO3 promoter as TGACTA in inverse orientation. The increase of ARO3 transcript levels under derepressing conditions was established by Northern blot analysis.

The ARO4 gene was cloned by functional complementation. Sequencing of the complementing fragment showed an open reading frame coding for a predicted polypeptide of 367 amino acids with a calculated molecular weight of 39'481 d. As UAS element the ARO4 promoter has a TGACTC sequence in normal orientation.

The phenylalanine-sensitive DAHP synthase (ARO3 gene product) was purified from an overproducing strain carrying the cloned gene on a high copy number plasmid. The kinetic parameters of the pure enzyme were compared with those of DAHP synthases from other organisms and of two yeast enzymes of the tryptophan biosynthetic pathway. The inhibition of the enzyme by phenylalanine was shown to be competitive with respect to erythrose 4-phosphate and non-competitive for phospho-enolpyruvate.

The GCN4 protein, previously known as general control activator, was shown to contribute to the basal level of ARO3 gene expression. Eliminating the transcriptional stimulation conferred by GCN4 by either introducing a gcn4 mutation or by mutating the GCN4 recognition element resulted in reduced ARO3 enzyme levels also in the presence of amino acids. Moreover, an ARO3 aro4 gcn4 mutant strain had a slow growing phenotype on MV minimal medium. The ARO4 basal level of gene expression is not affected by GCN4, and aro3 ARO4 gcn4 mutant strains grow at wildtype speed on MV minimal medium.

## ZUSAMMENFASSUNG

Struktur, Genexpression und Regulation der zwei Isogene ARO3 und ARO4 von Saccharomyces cerevisiae wurden analysiert. Jedes der Gene kodiert für eine DAHP-Synthase. Das ARO3-Genprodukt wird von Phenylalanin und das ARO4-Genprodukt von Tyrosin inhibiert .

Das ARO3-Gen wurde sequenziert. Es kodiert für ein Polypeptid von 370 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 42'137 d. Die Konsensussequenz TGACTC für die Regulation unter der 'Allgemeinen Kontrolle der Aminosäurebiosynthese' ist im ARO3-Promotor vorhanden als TGACTA-Element in umgekehrter Orientierung. Mittels einer Northern Blot Analyse wurde gezeigt, dass die ARO3 mRNA-Niveaus unter dereprimierenden Bedingungen erhöht sind.

Das ARO4-Gen wurde durch funktionelle Komplementation der entsprechenden Mutation in Hefe kloniert. Das Gen enthält einen offenen Leseraster für 367 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 39'481d. Als 'UAS'-Element ('upstream activation sequence') der 'Allgemeinen Kontrolle' wurde im ARO4 Promoter die Sequenz TGACTC in normaler Orientierung gefunden.

Das ARO3-Genprodukt, die Phenylalanin-inhibierbare DAHP-Synthase, wurde von einem überproduzierenden Hefestamm gereinigt, welcher das klonierte Gen auf einem Plasmid mit hoher Kopienzahl trug. Die kinetischen Parameter des gereinigten Enzyms wurden mit denjenigen von DAHP-Synthasen aus andern Organismen und von zwei Hefeenzymen aus dem Tryptophanbiosyntheseweg verglichen. Die Inhibition des Enzyms durch Phenylalanin ist kompetitiv für Erythrose 4-Phosphat und nicht-kompetitiv für Phosphoenolpyruvat.

Das GCN4 Protein ist nicht nur unerlässlich für die Derepression des ARO3-Gens unter der 'Allgemeinen Kontrolle', sondern es trägt auch zum Basalniveau der ARO3-Genexpression bei. Wurde die transkriptionelle Aktivierung durch GCN4 durch eine gcn4-Mutation oder durch Mutieren der GCN4-Erkennungssequenz im Promoter verhindert, so verringerten sich die ARO3- Enzymniveaus selbst unter nicht-dereprimierenden Bedingungen. Ein

Mutantenstamm ARO3 aro4 gcn4 zeigte darüber hinaus verlangsamtes Wachstum auf MV Minimalmedium. Im Gegensatz dazu ist das Basalniveau der ARO4-Genexpression von GCN4 unabhängig , und aro3 ARO4 gcn4 Mutanten wachsen auf Minimalmedium mit normaler Geschwindigkeit.