

КОНСТРУЮВАННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ МУТАНТНИХ АЛЕЛІВ ГЕНА *RIB1 PICHIA GUILLIERMONDII*, ЩО КОДУЄ ГТФ-ЦИКЛОГІДРОЛАЗУ II

Ю. Борецький, Л. Фаюра, В. Борецький, В. Маковецька, К. Капустяк, А. Сибірний

Інститут біології клітини НАН України
вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна
e-mail: institute@cellbiol.lviv.ua

Дріжджі *Pichia guilliermondii* є типовим представником групи дріжджових видів, що надсинтезують рибофлавін за умов дефіциту заліза. У положенні 207 ключового ферменту біосинтезу рибофлавіну ГТФ-циклогідролази II *P. guilliermondii* виявлено залишок цистеїну, що характерно тільки для всіх флавіногенних видів дріжджів. Переважна більшість дріжджових ГТФ-циклогідролаз II містить у цьому положенні залишок валіну. Заміна 207-го цистеїнового залишку ГТФ-циклогідролази II *P. guilliermondii* на залишки серину або валіну не інактивує фермент і не блокує надсинтез рибофлавіну дріжджами *P. guilliermondii* за умов дефіциту заліза.

Ключові слова: біосинтез рибофлавіну, *Pichia guilliermondii*, ГТФ-циклогідролаза II, залізо.

Біосинтез рибофлавіну (РФ) у дріжджів *P. guilliermondii* регулюється йонами заліза за негативним типом, тобто йони заліза гальмують утворення цього вітаміну. За умов дефіциту заліза відбувається дерепресія синтезу всіх ферментів флавіногенезу (за винятком редуктази), що веде до зростання продуктивності флавіногенезу майже на два порядки [2]. Таким чином, два життєво важливих процеси – флавіногенез і асиміляція заліза клітинами *P. guilliermondii* перебувають під спільним контролем, що дотепер не має задовільного фізіолого-біохімічного пояснення. Необхідно відзначити, що такий тип регуляції біосинтезу рибофлавіну характерний для представників роду *Candida* та для деяких рослин і бактерій [8, 13]. Завдяки виділенню штамів *P. guilliermondii*, що здатні до гібридизації та інтенсивного спорогенезу [1] і опрацюванню ряду методологій генетичної та метаболічної інженерії, цей вид дріжджів став зручним модельним об'єктом для вивчення генетичних механізмів регуляції біосинтезу РФ і його надсинтезу в еукаріотичних мікроорганізмів [12].

Раніше при вивченні спонтанних і індукованих ревертантів регуляторного мутанта – надсинтетика РФ *rib81*, які втратили здатність до надсинтезу рибофлавіну, була виявлена мутація *rib1-86*, котра призводить до відсутності активності ГТФ-циклогідролази II і, як наслідок, викликає аустрофність за рибофлавіном (фенотип Rib⁻) у штамів, що не містять регуляторних рибофлавінових мутацій [4]. Дослідження нуклеотидної послідовності алеля *rib1-86* виявило точкову мутацію G620A (всередині структурного гена), яка перетворює цистеїновий кодон TGT на тирозиновий TAT. Раніше Vacher зі співавторами показали, що до активного центру ГТФ-циклогідролази II *E. coli* входять три залишки цистеїну C54, C65 та C67 (у *P. guilliermondii* відповідно C175, C186 та C188), які задіяні у координаційному зв'язуванні атома цинку та гідролітичному розщепленні імідазольного кільця ГТФ [9]. Таким чином, виявлена заміна C207Y локалізується в ділянці поряд із активним центром ферменту. Очевидно, що заміна цистеїну на тирозин (значно об'ємніший і гідрофобніший бічний залишок) може призводити до зміни просторової конфігурації поліпептиду поряд із активним центром і, як наслідок, до інактивації або дестабілізації ферменту. Проте не включено, що залишок цистеїну саме у цьому положенні ферменту *P. guilliermondii* є необ-

хідним для каталітичної активності. Тому цікаво було дослідити, чи заміна цистеїнового залишку C207 на валіновий або сериновий – найближчий аналог цистеїнового, – вплине на біосинтез рибофлавіну у *P. guilliermondii*.

Як контроль при проведенні акумуляційних тестів у роботі використовували штам *P. guilliermondii* L2 hisX mat. Для конструювання рекомбінантних клонів використовували штам *P. guilliermondii* 9D303 *rib1-86* hisX mat⁺. Штами дріжджів вирощували при 28°C на багатому середовищі YPS: 0,5% дріжджовий екстракт, 1,5% пептон, 2% сахароза та на стандартному мінімальному середовищі YNB (0,67% Yeast Nitrogen Base, 2% глюкоза), або мінеральному середовищі Беркгольдера, як описано раніше [4]. Очищення середовища від заліза проводили за допомогою оксихіноліну [14]. Амінокислоти додавали до середовища у концентрації 40–50 мг/л, а рибофлавін – у концентрації 200 мг/л.

Виділення, всі маніпуляції з ДНК і трансформацію *E. coli* проводили відповідно до [10]. Трансформацію дріжджів здійснювали, як описано раніше [7]. Рибофлавін визначали флуориметрично. Для визначення продуктивності клітини випадково відібраних трансформантів інокулювали в середовище Беркгольдера, до $A_{590}=0,02$ та інкубували 3 доби при 28°C на качалці. Продуктивність флавіногенезу визначали як відношення кількості нагромадженого РФ до сухої маси клітин. Визначення активності ГТФ-циклогідролази II проводили, як описано раніше [3]. У роботі використано хімічні сполуки та ферменти виробництва фірм: “Sigma” (США), “Ferak” (Німеччина), “Reanal” (Угорщина), “Fermentas” (Литва), “NEB” (США), “Promega” (США), “Difco” (США). Кваліфікація хімічних реактивів вітчизняного виробництва – “хч” та “осч”.

На рис. 1 представлено результати порівняння амінокислотних послідовностей, що формують активний центр ГТФ-циклогідролази II із різних організмів. Виявилось, що залишок цистеїну у положенні, що відповідає C207 ферменту із *P. guilliermondii*, міститься тільки у циклогідролазах дріжджів *Candida albicans* та *Debaryomyces hansenii*, котрі, як і *P. guilliermondii*, надсинтезують РФ за умов дефіциту заліза [11]. Тому цікаво було також дослідити, чи збережеться здатність до надсинтезу рибофлавіну у штамів *P. guilliermondii*, у котрих цей цистеїновий залишок замінено на сериновий або валіновий.

Pgu (1-86)	171	IHSECYTGETAWSARCDGCEQFDEAG-----RLMGEAGHGCTIVYLR-QEGRGIG
Pgu (wt)	171	IHSECYTGETAWSARCDGCEQFDEAG-----RLMGEAGHGCTIVYLR-QEGRGIG
Cal	180	IHSECYTGETAWSARCDGCEQFDEAG-----RIMGEAGHGCMVYLR-QEGRGIG
Dha	158	IHSECYTGETAWSARCDGCEQFDEAG-----RIMGNDGHGCTIVYLR-QEGRGIG
Sce	144	IHSECYTGENAWSARCDGCEQFDRAGRLIACDHEPTSNIKCGNGHGCTIVYLR-QEGRGIG
Kla	75	IHSECYTGETAWSARCDGCEQFDRAGKLSVERE--GDI VGGNGHGCTIVYXR-QEGRGIG
Spo	167	IHSECYTGETAWSARCDGCEQLDAA-----LISEEGNGVITVYLR-QEGRGIG
Pfl	65	IHSECLTGDALFSQRCDGSOLEGALK-----ATAREGRVLLYLR-QEGRGIG
Vvu	216	IHSECLTGDALFSARCDCGEQLAKALQ-----NIVAEAGAVLLYLR-QEGRGIG
Eco	50	VHSECLTGDALFSLRCDGSOLEAALT-----QIAEEGRGILLYLHR-QEGRNIG
Abr	241	IHSECLTGDLLAGLRCDGQQLRGAIA-----EIAARHGSGVLLYLA-QEGRGIG
Ath	221	VHSECLTGDIFGSAKDCGNQLALSMQ-----QTEATGRGVIVYLRGHEGRGIG

Рис.1. Порівняння амінокислотних послідовностей ГТФ-циклогідролази II різних мікроорганізмів. Pgu, *Pichia guilliermondii*; Cal, *Candida albicans*; Dha, *Debaryomyces hansenii*; Sce, *Saccharomyces cerevisiae*; Kla, *Kluyveromyces lactis*; Spo, *Schizosaccharomyces pombe*; Pfl, *Pseudomonas fluorescens*; Vvu, *Vibrio vulnificus*; Eco, *Escherichia coli*; Abr, *Azospirillum brasilense*; Ath, *Arabidopsis thaliana*. * - положення мутації C207Y. Консервативні амінокислотні залишки позначено чорним кольором, подібні – сірим кольором.

Для отримання штамів *P. guilliermondii*, котрі несуть C207V та C207S алелі *RIB1* гена, спочатку сконструювали плазмиди, що несуть ці мутантні алелі. Схема конструюван-

ня представлена на рис. 2. Як матрицю для ампліфікації гена *RIB1* використали плазмиду p19R1-86, котра несе мутантну алель гена G620A, що призводить до синтезу неактивної (C207Y) ГТФ-циклогідролази II [6]. За допомогою двох пар праймерів P1 із 86VAL_Rev та 86VAL_Fw із P2 були ампліфіковані відповідно 5'- та 3'- фрагменти локуса *RIB1*. Праймери 86VAL_Fw (5'-GCACGGGGTTATCGTGTACC-3') та 86VAL_Rev (5'-TACACGATAACCCCGTGCCC-3'), у яких вищезгаданий цистеїновий кодон TGT замінено на валіновий GTT (виділено потовщеним шрифтом) забезпечили формування мутантних фрагментів локуса *RIB1* із ділянкою комплементарності завдовжки 20 нуклеотидів. Отримані фрагменти ДНК очищали, змішували і використовували для ампліфікації повної послідовності *RIB1* локуса із праймерами P1 і P2. Таким чином, у ході "двостадійної" полімеразної ланцюгової реакції з використанням плазмиди p19R1-86 як матриці нами було ампліфіковано фрагмент ДНК, що містить сайти впізнавання ендонуклеазами Xba1 та BamH1 і мутований ген *RIB1*, котрий кодує ГТФ-циклогідролазу II із заміною C207V. Далі отриманий фрагмент очищали, гідролізували ендонуклеазами рестрикції Xba1 та BamH1 і клонували у вектор pUC19. Селекцію трансформантів проводили на агаризованому LB, що містило ампіцилін 100 мг/л, 0,004% X-Gal, 0,05 мМ IPTG.

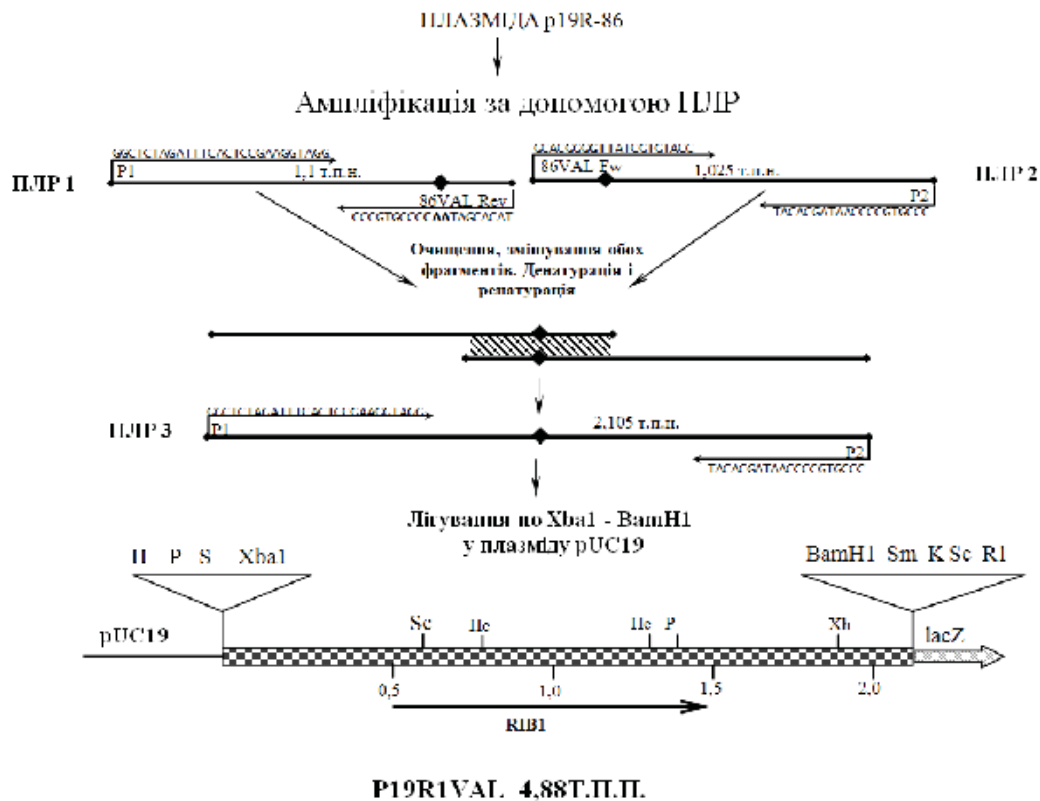


Рис. 2. Схема конструювання плазмиди P19R1VAL, що несе мутантний алель C207V гена *RIB1 P. guilliermondii*. Sc та P – сайти впізнавання рестриктазами SacI та PstI відповідно.

Типову рекомбінантну плазмиду, виділену із колонії одного з трансформантів, перевіряли за допомогою розщеплення ендонуклеазами Xba1 та BamH1 і секвенували. У резуль-

таті було сконструйовано плазмиду p19R1-Val, яка несла мутований ген *RIB1*, котрий кодує ГТФ-циклогідролазу II із заміною C207V.

Таким же чином із використанням праймерів Ser_for (5'-GGGCACGGGTCGATC-GTGTAC-3') та Ser_rev (5'-AGGTACACGATCGACCCGTGCC-3') було сконструйовано плазмиду p19R1-Ser, яка несла мутований ген *RIB1*, котрий кодує ГТФ-циклогідролазу II із заміною C207S. Із використанням праймерів Cys_for (5'-GGGCACGGG TGTATCGTG-TAC-3') та Cys_rev (5'-AGGTACACGAT ACACCCGTGCC-3') було сконструйовано плазмиду p19R1-Cys, яка несла алель гена *RIB1* дикого типу і була використана як контроль при проведенні трансформаційних експериментів.

На відміну від плазмиди p19R1-86, котра була використана як матриця, сконструйовані плазмиди ефективно комплементували ауксотрофність за рибофлавіном штаму *E. coli ribA802-81* мутантного по ГТФ-циклогідролази II (табл. 1), що свідчить про те, що заміна тирозину у положенні 207 на серин або валін відновлює активність ГТФ-циклогідролази II.

Таблиця 1

Ефективність трансформації штаму *E. coli ribA802-81* до прототрофності за рибофлавіном

Ефективність трансформації (колоній/μг ДНК)				
pUC19	p19R1-86	p19R1-Cys	p19R1-Val	p19R1-Ser
0	0	10 000 -20 000	10 000 -20 000	10 000 -20 000

Щоб знизити ймовірність негомологічної інтеграції у клітинах *P. guilliermondii*, було вирішено використати для трансформації SacI-PstI-фрагменти гена *RIB1* (і дикого типу, і мутовані), а не повну його послідовність. Тому далі SacI-PstI-фрагменти гена *RIB1*, розміром 0,63 т.п.н. були вищеплені із плазмід p19R1, p19R1-Val, p19R1-Ser та субклоновані у векторі pUC19. Отримані плазмиди pWS, pVAS і pSES (алелі C207, C207V та C207S відповідно) не комплементували ауксотрофність за рибофлавіном штаму *E. coli ribA802-81* мутантного по ГТФ-циклогідролази II, що свідчить про те, що видалення 5'- і 3'-фрагментів гена *RIB1* розміром 0,2 тпн призводить до синтезу неактивної ГТФ-циклогідролази II. Таким чином, при введенні в клітини відповідного мутанта дріжджів ці фрагменти можуть забезпечити комплементацию ауксотрофності за рибофлавіном за умови їх рекомбінації у геном тільки за механізмом гомологічної рекомбінації, що приводитиме до відновлення повної послідовності гена *RIB1*.

Плазмиди pWS, pVAS і pSES були гідролізовані ендонуклеазами SacI та PstI, а отримані фрагменти гена *RIB1* використані для трансформації клітин *P. guilliermondii* 9D303 (*rib1-86*); трансформанти відбирали на середовищі без РФ. Ефективність трансформації становила 8-10 колоній на мкг ДНК. У отриманих трансформантів аналізували продуктивність флавіногенезу. Як видно із даних, представлених у табл. 2, при вирощуванні в умовах достатнього забезпечення залізом, продуктивність флавіногенезу усіх проаналізованих рекомбінантних клонів була в середньому в кілька разів вищою від штаму дикого типу L2. В той же час, за умов дефіциту заліза, рекомбінантні клони поступалися в середньому у два рази штамові дикого типу за продуктивністю флавіногенезу. Така закономірність спостерігалась і у випадку рекомбінантних клонів, що містили ген *RIB1* дикого типу, і у випадку рекомбінантних клонів, що містили мутантні алелі.

Раніше подібний феномен було описано при введенні гена *RIB1* дикого типу в інший мутант *P. guilliermondii*, дефектний за цим геном [5]. Регуляція активності ГТФ-циклогідролази II у рекомбінантних клонів, що несли алелі C207, C207V та 207S, мала аналогічні закономірності (табл. 3).

Таким чином, отримані результати дають підстави стверджувати, що у *P. guilliermondii* регуляція флавіногенезу за участю йонів заліза не залежить від наявності залишка

Таблиця 2

Ріст і продукція РФ рекомбінантними штабами, отриманими після трансформації мутанта *P.guilliermondii* 9D303 SacI–PstI-фрагментами ДНК, що містять частину гена ГТФ-циклогідролази II

Штами	Концентрація заліза у середовищі 3,6 мкМ			Концентрація заліза у середовищі 0,18 мкМ		
	Біомаса, мг/мл	Концентр. РФ, мкг/мл	Продуктивність РФ, мкг/мг	Біомаса, мг/мл	Концентр. РФ, мкг/мл	Продуктивність РФ, мкг/мг
C1	3,3	7,20	2,2±0,1	1,9	19,3	10,2±0,2
C2	3,7	7,2	2,0±0,1	2,5	20,1	8,2±0,2
C3	3,7	7,3	2,0±0,1	2,0	21,2	10,8±0,2
C4	2,9	3,6	1,2±0,1	1,5	18,0	12,2±0,2
V11	3,7	6,8	1,8±0,1	2,3	22,7	9,7±0,2
V12	3,3	2,0	0,6±0,1	2,5	11,8	4,7±0,2
V13	3,2	6,9	2,1±0,1	2,0	17,3	8,5±0,2
V14	3,2	6,4	2,0±0,1	1,8	21,0	11,5±0,2
S21	3,4	6,3	1,8±0,1	2,0	19,8	9,8±0,2
S22	3,1	6,00	1,9±0,1	2,1	20,5	9,6±0,2
WT	6,7	3,5	0,5±0,1	3,0	54,6	18,2±0,3

Примітки: С – отримані при введенні SacI–PstI-фрагмента із рWS (дикий тип); V - отримані при введенні SacI–PstI-фрагмента із рVAS (C207V) ; S – отримані при введенні SacI–PstI-фрагмента із рSES (C207S); WT – штам дикого типу L2.

Таблиця 3

Активність ГТФ-циклогідролази II у рекомбінантних штамах *P.guilliermondii*

Штами	Активність ГТФ-циклогідролази II, мкмоль/мг·хв x 10 ⁻⁵	
	+Fe	-Fe
C3	0,45±0,04	1,62±0,02
V13	0,86±0,05	1,74±0,04
S22	0,26±0,01	1,80±0,00
WT	0,16±0,00	9,08±0,06

Примітки: C3 – отриманий при введенні SacI–PstI-фрагмента із рWS (дикий тип); V13 – отриманий при введенні SacI–PstI-фрагмента із рVAS (C207V) ; S22 – отриманий при введенні SacI–PstI-фрагмента із рSES (C207S); WT – штам дикого типу L2.

цистеїну у положенні 207 ГТФ-циклогідролази II, котрий може бути замінений на залишки валіну або серину без втрати ферментативної активності. Відкритим залишається питання про стабільність ізоформ C207V та C207S фермента, але вирішення даного питання є завданням подальших досліджень у цьому напрямі.

1. Сибирный А. А., Шавловский Г. М., Кушановская Б. В., Наумов Г. И. Гибридизация и мейотическое расщепление у парафинусваивающих дрожжей *Pichia guilliermondii* Wickerham // Генетика. 1977. Т. 13. С. 314–321.
2. Шавловский Г. М., Логвиненко Е. М. Роль железа в регуляции синтеза белков у микроорганизмов // Успехи биол. химии. 1988. Т. 29. С. 108–133.
3. Шавловский Г. М., Логвиненко Е. М., Закальский А. А. Очистка и некоторые свойства ГТФ-циклогідролазы дрожжей *Pichia guilliermondii* // Биохимия. 1983. Т. 48. С. 837–843.
4. Шавловский Г. М., Стенчук Н. Н., Кушановская Б. В. Влияние регуляторной мутации в локусе *RIB1* на биосинтез рибофлавина у *Pichia guilliermondii* // Биополимеры и клетка. 1991. Т. 7. С. 96–99.

5. European Patent Application N98107380. Overproduction of riboflavin in yeast. Van Loon., (Germany); filed April 23.1998, Ref.20071. EPO 967287.
6. Boretsky Y. R., Kapustyak K. Y., Fayura L. R. et al. Positive selection of mutants defective in transcriptional repression of riboflavin synthesis by iron in the flavinogenic yeast *Pichia guilliermondii* // FEMS Yeast Research. 2005. Vol. 5. P. 829–837.
7. Boretsky Y. R., Pynyaha Y. V., Boretsky V. Y. et al. Development of a transformation system for gene knock-out in the flavinogenic yeast *Pichia guilliermondii* // J. Microbiol. Methods. 2007. Vol. 70. P. 13–19.
8. Fassbinder F., van Vliet A.H., Gimmel V. et al. Identification of iron-regulated genes of *Helicobacter pylori* by a modified fur titration assay (FURTA-Hp) // FEMS Microbiological Letters. 2000. Vol. 184. P. 225–229.
9. Kaiser J., Schramek N., Eberhard S. et al. Biosynthesis of vitamin B2. An essential zinc ion at the catalytic site of GTP cyclohydrolase II // Eur. J. Biochem. 2002. Vol. 269. P. 5264–5270.
10. Sambrook J., Russell D. W. Molecular cloning, a laboratory manual. 3ed ed.- Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. 2001. 450 P.
11. Santos R., Buisson N., Knight S. et al. *Candida albicans* lacking the frataxin homologue: a relevant yeast model for studying role of frataxin // Mol. Microbiol. 2004. Vol. 54. P. 507–519.
12. Sibirny A. A., Boretsky Y. R. Chapter VI: *Pichia guilliermondii*. In: Yeast biotechnology: diversity and applications. Springer Science, 2009. 454 P.
13. Vorwieger A., Gryczka C., Cziala A. et al. Iron assimilation and transcription factor controlled synthesis of riboflavin in plants. Planta. 2007. DOI:10.1007/s0042500604769.
14. Waring W. S., Werkman G. H. Growth of bacteria in a iron-free medium // Arch. Biochem. 1943. Vol. 1. P. 303–310.

Стаття: надійшла до редакції 01.12.10

доопрацьована 03.12.10

прийнята до друку 06.12.10

CONSTRUCTION AND STUDYING OF MUTANT ALLELS OF *PICHIA GUILLIERMONDII RIB1* GENE CODING FOR GTP CYCLOHYDROLASE II

Y. Boretsky, L. Fayura, V. Boretsky, V. Makovetska, K. Kapustyak, A. Sibirny

*Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine
14/16, Dragomanov St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: boretsky@cellbiol.lviv.ua*

Yeast *Pichia guilliermondii* is a representative of a group of yeast species that overproduce riboflavin in response to iron limitation. Cystein residue was found in the position 207 of *P. guilliermondii* key enzyme of riboflavin biosynthesis, GTP cyclohydrolase II. This feature is specific for all flavinogenic yeast species only. The majority of yeast GTP cyclohydrolases possesses valine residue in this position but not cysteine. Substitution of Cys-207 with serine or valine residue did not inactivate the enzyme and did not abolish riboflavin oversynthesis by *P. guilliermondii* grown under iron deficiency conditions.

Key words: riboflavin biosynthesis, *Pichia guilliermondii*, GTP cyclohydrolase II, iron.

**КОНСТРУИРОВАНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАНТНЫХ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА
RIB1 PICHIA GUILLIERMONDII, КОТОРЫЙ КОДИРУЕТ
ГТФ-ЦИКЛОГИДРОЛАЗУ II**

Ю. Борецкий, Л. Фаюра, В. Борецкий, В. Маковецкая, К. Капустяк, А. Сибирный

*Институт биологии клетки НАН Украины
ул. Драгоманова, 14\16, Львов 79005, Украина
e-mail: institute@cellbiol.lviv.ua*

Дрожжи *Pichia guilliermondii* являются классическим представителем группы дрожжевых видов, которые сверхсинтезируют рибофлавин в условиях дефицита железа. В положении 207 ключевого фермента биосинтеза рибофлавина ГТФ-циклогидролазы II *P. guilliermondii* находится остаток цистеина, что характерно только для всех флавиногенных видов дрожжей. Подавляющее большинство дрожжевых ГТФ-циклогидролаз II имеют в этом положении остаток валина. Замена 207-го цистеинового остатка ГТФ-циклогидролазы II *P. guilliermondii* на остаток серина или валина не инактивирует фермент и не блокирует сверхсинтез рибофлавина дрожжами *P. guilliermondii* при выращивании в условиях дефицита железа.

Ключевые слова: биосинтез рибофлавина, *Pichia guilliermondii*, ГТФ-циклогидролаза II, железо.