

УДК 577.21.579.842.11

Ю.Р. БОРЕЦКИЙ, А.В. ПЕТРИШИН, К. КРИГЕР,
Г. РИХТЕР, Д.В. ФЕДОРОВИЧ, А. БАХЕР

**КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА
РИБОФЛАВИНСИНТАЗЫ ДРОЖЖЕЙ
*PICHIA GUILLIERMONDII***



Ген *RIB7 Pichia guilliermondii*, кодирующий рибофлаксинсинтазу, клонирован на векторе *pBR322* в составе *HindIII* и *EcoRI* фрагментов хромосомной ДНК размером 3,7 и 12 т.п.н. соответственно. Структурный ген локализован в центральной части клонированного *EcoRI* фрагмента. Введение сконструированных плазмид в клетки дрожжей с блокированной рибофлаксинсинтазой комплементирует ауксотрофность по рибофлавину, но полное восстановление фенотипа дикого типа наблюдается только при использовании линейных фрагментов ДНК, несущих ген *RIB7*. Обсуждаются особенности рекомбинации гибридных плазмид в клетках *P. guilliermondii*.

© Ю.Р. БОРЕЦКИЙ, А.В. ПЕТРИШИН, К. КРИГЕР,
Г. РИХТЕР, Д.В. ФЕДОРОВИЧ, А. БАХЕР, 2002

Введение. Почти все штаммы *Pichia guilliermondii* обладают способностью к синтезу больших количеств рибофлавина (РФ) при выращивании в средах с низким содержанием железа [1]. В этих условиях происходит дерепрессия большинства ферментов флавиногенеза, кроме редуктазы. Степени дерепрессии отдельных ферментов различны [2]. Показано, что у *P. guilliermondii* в регуляции биосинтеза РФ принимают участие, как минимум, три регуляторных гена негативного типа действия (*RIB80*, *RIB81*, *HIT1*) и два (*RIB83*, *RIB84*) — позитивного типа действия [3–5]. Однако продукты этих генов не идентифицированы, механизм их влияния на экспрессию структурных генов флавиногенеза не известен.

Изучение промоторных и регуляторных областей структурных генов, кодирующих ферменты биосинтеза РФ, является необходимым этапом в исследовании молекулярных механизмов регуляции флавиногенеза. Ген ГТФ-циклогидролазы *P. guilliermondii* клонирован в составе *Sau3A* фрагмента хромосомной ДНК размером 9 т.п.н. [6]. Структурный ген фермента представляет собой открытую рамку трансляции, кодирующую пептид массой 38,7 кДа. Регуляторная область гена содержит две TATAT-последовательности на расстоянии 237 и 216 нуклеотидов от стартового кодона, которые, очевидно, являются составными промотора этого гена [7]. В положении –787 от стартового кодона локализован ARE-элемент (сайт связывания белка – активатора транскрипции) [8].

Ген РФ-синтазы *P. guilliermondii* был также клонирован в составе *Sau3A* фрагмента хромосомной ДНК размером 4,0 т.п.н. [9]. Полученная плазида комплементировала ауксотрофность по РФ штаммов *Escherichia coli* и *P. guilliermondii* с блокированной РФ-синтазой. В отличие от штаммов дикого типа дрожжевые трансформанты накапливали в культуральной среде смесь РФ и его предшественника — 6,7-диметил-8-рибитилглюкозамина (ДМРЛ). Данные рестрикционного картирования позволяют предположить, что клонированный фрагмент содержит либо неполный структурный ген РФ-синтазы, либо структурный ген без промотора.

В настоящей работе описано клонирование гена РФ-синтазы *P. guilliermondii* в составе различных по размеру фрагментов хромосомной ДНК. Исследованы закономерности флавиногенеза рекомбинантными клонами, полученными при введении линейных и кольцевых форм сконструированных плазмид в клетки штамма *P. guilliermondii* с блокированной РФ-синтазой.

Материалы и методы. В работе использовали дрожжи *Pichia guilliermondii* генетической линии L2 (ATCC 201911) и полученный из этого штамма с помощью УФ-мутагенеза РФ-зависимый мутант РГ-162 с блокированной РФ-синтазой (тип мутации не определяли) [10]. Дрожжи выращивали в синтетической среде Беркгольдера и YEPD, а бактерии – в L-бульоне (L.V). Состав сред и условия культивирования описаны ранее [1, 10, 11].

Общую дрожжевую ДНК выделяли из 200 мл ночной культуры *P. guilliermondii* L2, как описано Закальским и др. [6]. Выделение, расщепление, лигирование и электрофорез ДНК в агарозном геле проводили по Манниатису и др. [11]. В качестве векторов использовали плазмиды pBR322 и pUC19.

Трансформацию клеток бактерий осуществляли при помощи электропорации [12]. Для анализа банка генов использовали ауксотрофный по РФ штамм *E. coli* rib45 F c14 (MetA) lacY1 supE44 galK2 galT22 rfbD1 metB1 metC1 hsdS3(r_m⁺) rfb- с блокированной РФ-синтазой [13].

Биомассу дрожжей определяли турбидиметрически на фотоэлектроколориметре ФЭК-56М (светофильтр 6, кювета 1 см). Активность флавиногенеза у рекомбинантных штаммов оценивали по интенсивности флуоресценции культуральной жидкости, которую определяли на флюориметре ЭФ-3М, применяя наборы светофильтров для витамина В₂. В качестве стандарта использовали РФ. Активность РФ-синтазы измеряли в бесклеточных экстрактах, как описано ранее [9]. Идентификацию флуоресцирующих веществ проводили при помощи восходящей хроматографии на бумаге в системе 2,5 % Na₂HPO₄ или 0,5 % NH₄Cl.

Результаты исследования и их обсуждение. Для создания библиотеки генов *P. guilliermondii* хромосомную ДНК обрабатывали эндонуклеазой EcoRI либо HindIII в условиях полного гидролиза. После препаративного электрофореза из агарозного геля экстрагировали фрагменты ДНК размером 2–15 т.п.н. Для клонирования использовали вектор pBR322. Векторную ДНК гидролизировали по EcoRI либо HindIII сайту, обрабатывали щелочной фосфатазой, экстрагировали фенолом и после электрофореза элюировали из агарозного геля. Полученные препараты векторной ДНК смешивали соответственно с EcoRI или HindIII фрагментами хромосомной ДНК в соотношении 1 : 3 и лигировали в течение 14 ч при +4 °С. Лигиро-

ванные смеси ДНК использовали для трансформации клеток мутанта *E. coli* rib45 с блокированной РФ-синтазой. Трансформацию проводили при помощи электропорации. Трансформанты отбирали по способности расти без РФ на агаризованном L.V. содержащем 100 мг/л ампициллина. В обоих случаях было получено более 50 трансформантов. Выделенные гибридные плазмиды с высокой эффективностью (~1·10⁷ колоний/мкг ДНК) трансформировали исходный штамм-реципиент к прототрофности по РФ.

Результаты рестрикционного анализа плазмидной ДНК, полученной из этих трансформантов, свидетельствуют, что ген РФ-синтазы находится в составе EcoRI фрагмента хромосомной ДНК размером ~12 т.п.н. (плаزمиды pER7-1). В случае клонирования по HindIII сайту было получено два типа рекомбинантных плазмид, которые несут фрагменты хромосомной ДНК размерами ~1,7 и ~3,7 т.п.н. (плазмиды pHR7-3 и pHR7-9 соответственно). Рестрикционный анализ плазмид показал, что ген РФ-синтазы находится в составе HindIII фрагмента хромосомной ДНК размером ~1,7 т.п.н., а фрагмент размером ~3,7 т.п.н. имеет внутренний HindIII сайт. Клонированный HindIII фрагмент хромосомной ДНК размером ~1,7 т.п.н. локализован в центральной части клонированного EcoRI фрагмента хромосомной ДНК. В отличие от плазмид, сконструированных ранее [9], полученные нами рекомбинантные плазмиды несут структурный ген РФ-синтазы *P. guilliermondii* и его полную регуляторную область в составе различных по размеру фрагментов хромосомной ДНК (рис. 1).

С использованием хлорида лития проведена трансформация описанными выше рекомбинантными плазмидами РФ-зависимого штамма *P. guilliermondii* (rib⁻) РГ-162 с блокированной РФ-синтазой. Эффективность трансформации колебалась в пределах 5–10 трансформантов на 1 мкг ДНК, что свидетельствует об отсутствии автономно реплицирующихся последовательностей (ARS-элементов) в составе клонированных фрагментов. Для всех использованных плазмид было получено два типа трансформантов: быстро растущие и медленно растущие. Накопление биомассы рекомбинантными клонами было в 3–10 раз ниже по сравнению со штаммами дикого типа. Медленно растущие трансформанты после нескольких пересевов либо погибали, либо выплывали быстро растущие клоны. В культуральной жидкости всех проанализированных

трансформантов накапливались флюоресцирующие вещества, основную часть которых составляли РФ и предшественник рибофлавина — ДМРЛ. Некоторые рекомбинантные штаммы экскретировали также небольшие количества флюоресцирующих в ультрафиолете неидентифицированных продуктов. Активность флавиногенеза у рекомбинантных штаммов была в 7–15 раз выше, чем у штамма *P. guilliermondii* дикого типа L2 (табл. 1).

Активность РФ-синтазы у рекомбинантных клонов, полученных при трансформации плазмидами p19R7, pER7-1, pHR7-9, pHR7-3 ($0,69 - 0,85$ ед/мл белка $\times 10^3$), была несущественно снижена по сравнению со штаммом дикого типа L2 ($1,0$ ед/мл белка $\times 10^3$) (данные не приведены). Таким образом, введение сконструированных плазмид в клетки дрожжей с заблокированной РФ-синтазой компенсирует ауксотрофность по РФ, но не обеспечивает полного восстановления фенотипа дикого типа.

Полученные результаты можно объяснить исходя из следующих фактов. Все известные РФ-синтазы являются гомотримерами [14–16]. При введении в клетки *P. guilliermondii* кольцевых плазмид, по-видимому, возможно несколько типов рекомбинации, в результате которой плазида интегрирует в хромосому (рис. 2). В некоторых случаях в результате рекомбинации структурный ген РФ-синтазы дублируется, что может привести к экспрессии и мутированного, и немутированного (клонированного) генов (рис. 2, 1, 2, 4). Вероятно, что в этих случаях уровни экспрессии мутированного и немутированного генов будут различными. Вследствие этого РФ-синтаза рекомбинантных клонов может включать в себя как активные, так и неактивные субъединицы. Вопрос о том, в какой степени сохранится активность и стабильность белка, содержащего одну или две мутированные субъединицы, остается открытым. Но не вызывает сомнения, что экспрессия мутантного аллеля гена РФ-синтазы может привести к снижению РФ-синтазной активности в бесклеточных экстрактах рекомбинантных клонов. Кроме того, нельзя исключить возможность у *P. guilliermondii* неспецифической рекомбинации, характерной для некоторых дрожжей и грибов. Например, у *Neurospora crassa* описана «рекомбинация по флангам», при которой происходит интеграция участка ДНК из плазмиды не в мутированный локус, а рядом

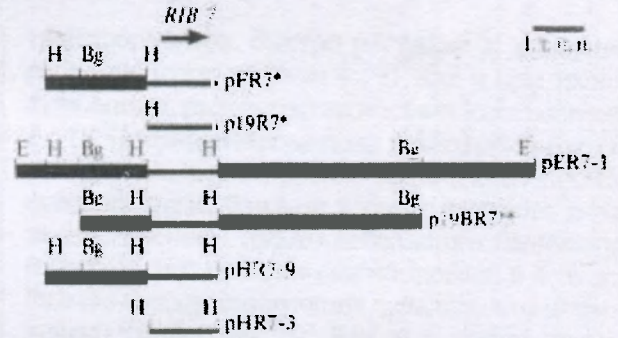


Рис. 1. Взаиморасположение клонированных фрагментов хромосомной ДНК *P. guilliermondii*, несущих ген РФ-синтазы. * Плазмиды pFR7 и p19R7 получены и описаны ранее [9]. **Плазида p19BR7 получена при субклонировании гена РФ-синтазы. Сайты узнавания рестриктазами: E – EcoRI, H – HindIII, Bg – BglII. — положение структурного гена РФ-синтазы, GenBank AF 459790

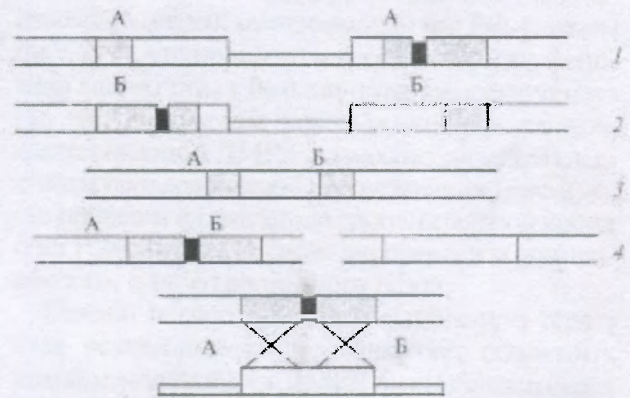


Рис. 2. Схема возможных типов интеграции клонированного гена в хромосомную ДНК *P. guilliermondii*. □ — векторная ДНК; — хромосомная ДНК. □ — клонированный ген РФ-синтазы; ■ — мутированный ген РФ-синтазы в составе хромосомы. ■ — мутация, инактивирующая РФ-синтазу. А, Б — зоны рекомбинации

с ним, в результате чего в хромосоме оказывается несколько копий клонированного гена [17].

С целью исключения возможности интеграции плазмид в результате рекомбинации по единичному сайту (рис. 2) была проведена трансформация *rib7* штамма *P. guilliermondii* линейными формами плазмид. Плазмиду p19R7 гидролизовали по сайтам HindIII и EcoRI, а плазмиду pHR7-3 по HindIII сайтам. Полученные фрагменты ДНК размером 1,4 и 1,7 т.п.н. соответственно элюировали из геля и использовали для трансформации штамма PG-162 (*rib7*) *P. guilliermondii*. В обоих случаях были получены два типа

Таблица 1
Активность флавиногенеза у рекомбинантных штаммов *P. guilliermondii*, полученных при трансформации кольцевыми формами плазмид, которые несут ген РФ-синтазы

№ штамма	Плаزمид	Активность флавиногенеза, ед./мг клеток
L2		0,52
2	p19R7	9,62
6		8,86
7		7,06
19	pER7-1	7,45
20		6,06
31	pHR7-9	3,92
32		3,58
62	pHR7-3	7,61
65		8,48
68		8,24

Примечание. Стабильные трансформанты *pb7* штамма *P. guilliermondii* выращивали в течение 5 дней при 30 °С в синтетической среде Беркгольдера на крутовой качалке. Клетки осаждали центрифугированием (4000 g × 10 мин) и определяли интенсивность флюоресценции культуральной жидкости на флюориметре ЭФ-3М, используя светофильтры для витамина В₂. Активность флавиногенеза выражали как отношение интенсивности флюоресценции к сухому весу клеток.

Таблица 2
Активность флавиногенеза у рекомбинантных штаммов *P. guilliermondii*, полученных при трансформации линейными фрагментами ДНК, которые несут ген РФ-синтазы

№ штамма	Плазмид	Активность флавиногенеза, ед./мг клеток
L2		0,55
4	p19R7	0,93
5		2,45
6		2,55
11		0,69
18		0,44
21		1,04
31	pHR7-3	2,48
32		0,87
34		0,61
41		0,58

Примечание. Измерение активности флавиногенеза проводили, как описано в примечании к табл. 1.

трансформантов: быстро растущие и медленно растущие (соотношение 4 : 1), как и при трансформации кольцевыми плазмидами (соотношение 2 : 1). Проанализированные трансформанты характеризовались скоростью роста и активностью флавиногенеза, близкой к штамму дикого типа, за исключением только небольшого количества (около 15 %), которые синтезировали в 4–6 раз больше флюоресцирующих веществ, чем штамм дикого типа (табл. 2). Как и в случае трансформации кольцевыми плазмидами, основную часть флюоресцирующих веществ у этих трансформантов составлял предшественник РФ – ДМРЛ. Полученные результаты свидетельствуют в пользу предположения о возможности различных типов рекомбинации в клетках *P. guilliermondii*. По-видимому, линейные фрагменты ДНК в большинстве случаев интегрируют в хромосому *P. guilliermondii*, замещая мутированный ген РФ-синтазы (рис. 2, 3), что приводит к восстановлению фенотипа дикого типа у большинства трансформантов (85 %). Получение рекомбинантных клонов, накапливающих ДМРЛ, возможно, является следствием негомологичной рекомбинации (рис. 2, 4), что приводит к появлению дополнительной копии гена РФ-синтазы, а также экспрессии и мутированного, и немутированного генов.

Однако предположение о дупликации гена в ходе рекомбинации не позволяет объяснить повышенный синтез ДМРЛ рекомбинантными клонами и снижение скорости их роста, поскольку активность РФ-синтазы в экстрактах рекомбинантных клонов была снижена незначительно по сравнению со штаммом *P. guilliermondii* дикого типа. В то же время РФ был обнаружен в культуральной жидкости всех проанализированных трансформантов. Очевидно, что для решения этого вопроса необходимо провести анализ нуклеотидной последовательности клонированного гена и более детально изучить рекомбинационные процессы у этого вида дрожжей. Сравнительный анализ промоторных областей гена РФ-синтазы и клонированного ранее гена ГГФ-циклогидролазы поможет создать базу, необходимую для понимания молекулярных механизмов регуляции флавиногенеза у *P. guilliermondii* и конструирования продуцентов этого витамина.

Конструирование и анализ библиотек были проведены на базе Отделения органической химии и биохимии Мюнхенского Технического Университета (Garching, Germany) при поддержке Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 369).

SUMMARY. The *RIB7* gene encoding riboflavin synthase of *Pichia guilliermondii* has been cloned on the vector pBR322 as the 3.7 kbp HindIII and 12.0 kbp EcoRI fragments of the chromosomal DNA. The structural gene was localized in the central region of the cloned EcoRI fragment. The constructed plasmids complemented riboflavin deficiency in a yeast mutant strain defective in riboflavin synthase, but complete recovery of the wild type phenotype was only observed when linear DNA fragments carrying the *RIB7* gene were used for transformation. The peculiarities of recombination of hybrid plasmids in yeast *P. guilliermondii* are discussed.

РЕЗЮМЕ. Ген *RIB7* *Pichia guilliermondii*, що кодує рибофлавинсинтазу, клоновано на векторі pBR322 в складі HindIII і EcoRI фрагментів хромосомної ДНК розміром 3,7 і 12 кб, відповідно. Структурний ген локалізовано в центральній частині клонованого EcoRI фрагменту. Введення сконструйованих плазмід в клітини дріжджів з блокованою рибофлавинсинтазою компенсує аутотрофію по рибофлавіну, але повне відновлення фенотипу дикого типу спостерігається тільки при використанні лінійних фрагментів ДНК, що несуть ген *RIB7*. Обговорюються особливості рекомбінації гібридних плазмід в клітині *P. guilliermondii*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Шавловський Г.М., Жарова В.П., Шелюкова Н.Ф., Троч В.М., Сибиряк А.А., Каванюк Г.П. Флавиногенная активность природных штаммов дрожжей *Pichia guilliermondii* // Прикл. биохимия и микробиология. - 1978. - 14, № 5. - С. 184-187.
2. Шавловський Г.М., Логвиненко Е.М. Сверхсинтез флавинов у мікроорганізмів і його молекулярні механізми // Прикл. биохимия и микробиология. - 1988. - 24, № 4. - С. 435-447.
3. Шавловський Г.М., Степчук М.М., Федорович Д.В., Кушнір В.І. Про взаємодію факторів негативного контролю біосинтезу рибофлавіну у дріжджів *Pichia guilliermondii* // Докл. АН України. - 1994. - № 4. - С. 138-140.
4. Федорович Д.В., Шавловський Г.М., Пратченко О.В. Ферриредуктазная активність кліток *Pichia guilliermondii* і особливості її регуляції // Микробиология. - 1992. - 61, № 1. - С. 11-17.
5. Шавловський Г.М., Колтун Л.В., Каванюк Г.П., Логвиненко Е.М., Степчук Н.Н. Регуляція біосинтезу рибофлавіну елементами позитивного контролю у дрожжей *Pichia guilliermondii* // Генетика. - 1989. - 25, № 2. - С. 250-258.
6. Закальський А.Е., Злочевський М.Л., Стасів Ю.З., Логвиненко Е.М., Бобуров М.Ю., Шавловський Г.М. Клонирование гена *RIB1*, кодирующего фермент первого этапа флавиногенеза у дрожжей *Pichia guilliermondii* - ГТФ-циклогидролазу, в клетках *Escherichia coli* // Генетика. - 1990. - 26, № 4. - С. 614-620.
7. Liauta-Teglivets O., Haslacher M., Boretskii Y.R., Kohlwein S.D., Shavlovskii G.M. Molecular cloning of the GTP-cyclohydrolase structural gene *RIB1* of *Pichia guilliermondii* involved in riboflavin biosynthesis // Yeast. - 1995. - 11. - P. 945-952.
8. Pratchenko O.V., Boretsky Y.R., Romanuk T.M., Fedorovich D.V. Oversynthesis of riboflavin by yeast *Pichia guilliermondii* in response to oxidative stress // Укр. биохим. журн. - 2000. - 72, №2. С. 19-23.
9. Логвиненко Е.М., Стасів Ю.З., Злочевський М.Л., Вартовський А.Я., Бобуров М.Ю., Шавловський Г.М. Клонирование гена *RIB7*, кодирующего рибофлавинсинтазу дрожжей *Pichia guilliermondii* // Генетика. - 1993. - 29, № 6. - С. 922-927.
10. Шавловський Г.М., Сибиряк А.А., Каванюк Г.П., Колтун Л.В., Логвиненко Е.М. Генетическая классификация рибофлавинзависимых мутантов дрожжей *Pichia guilliermondii* // Генетика. - 1979. - 15, № 9. - С. 1561-1588.
11. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Методи генетической инженерии. Молекулярное клонирование - М.: Мир, 1984. - 480 с.
12. Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W. High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation // Nucl. Acid Res. - 1988. - 16, № 13. - P. 6127-6145.
13. Шавловський Г.М., Тельяр І.Е., Струтинчикова Л.П. О регуляції флавиногенеза у рибофлавінзависимых мутантов *Escherichia coli* // Микробиология. - 1982. - 51, № 6. - С. 986-992.
14. Meinung W., Tibbels G., Ladenstein R., Eberhardt S., Fischer M., Bacher A. Evidence for local 32 symmetry in homotrimeric riboflavin synthase of *Escherichia coli* // J. Struct. Biol. - 1998. - 121, № 1. - P. 53-56.
15. Bacher A., Baur R., Eggers U., Harders H-D., Otto M.K., Schneppele H. Riboflavin synthases of *Bacillus subtilis* // J. Biol. Chem. - 1980. - 255, № 2. - P. 632-637.
16. Santos M.A., Garcia-Ramirez J.J., Revuelta J.L. Riboflavin biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning, characterization, and expression of the *RIB5* gene encoding riboflavin synthase // J. Biol. Chem. - 1995. - 270, № 1. - P. 437-444.
17. Case Mary E. Genetical and molecular analyses of qa-2 transformants in *Neurospora crassa* // Genetics. - 1986. - 113, № 3. - P. 569-587.

Отделение регуляторных систем клетки Поступила
 Ин-та биохимии НАН Украины, Львов. 03.02.2000
 Мюнхен, техн. ун-т. Гархинг, Германия