

А. С. Кочевенко, А. Р. Ферні

Клонування і аналіз гена *Lycopersicon esculentum*, що кодує мітохондріальну ізоформу трансамінази амінокислот з розгалуженим ланцюгом

(Представлено академіком НАН України Ю. Ю. Глебою)

Ген *BCAT2* томата було картовано на хромосомі 7 за допомогою методу поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів. Шляхом Нозерн-блот-гібридизації вивчено рівень експресії даного гена в різних типах тканин. Дослідження субклітинної локалізації *BCAT2-GFP* протеїну проведено з використанням конфокальної мікроскопії. Виявлено, що *BCAT2* локалізується в мітохондріях. Отримані результати обговорюються з огляду на участь даного ферменту в метаболізмі амінокислот з розгалуженим ланцюгом.

Амінокислоти з розгалуженим ланцюгом (АКРЛ) валін, лейцин та ізолейцин є незамінними амінокислотами, які не синтезуються в організмі людини і тому повинні потрапляти до організму людини в достатній кількості із їжею. Нестача цих амінокислот або порушення їх метаболізму призводять до цілого спектра захворювань, таких як дисбаланс азотного метаболізму, порушення функціонування нервової системи, розвиток аномалій мозку тощо. На відміну від тварин рослини здатні не лише до деградації валіну, лейцину та ізолейцину, але й їх синтезу. Відомо, що біосинтез АКРЛ відбувається в пластидах, тоді як процес деградації локалізований у мітохондріях [1–3].

Трансамінази є важливим класом ферментів, задіяних у метаболізмі АКРЛ. Вони каталізують процес переносу аміногруп між глютаматом і специфічною альфа-кетокислотою з розгалуженим ланцюгом у прямому і зворотному напрямках. Завдяки цьому трансамінази відіграють важливу роль як у біосинтезі, так і деградації АКРЛ. Трансаміназна активність була описана для широкого кола еукаріотичних організмів, а саме: щурів, людей, дріжджів, кукурудзи, шпинату, гороху, томата та ін. [4]. Як правило, для рослин характерна наявність невеликого сімейства *BCAT*-генів. Наприклад, у модельного об'єкта *Arabidopsis thaliana* трансамінази АКРЛ кодуються шістьма генами. Ці існуючі окремі ізоформи мають різні типи експресії та різну субклітинну локалізацію. *AtBCAT2*, *AtBCAT3*, *AtBCAT5* локалізовані в хлоропластах, тоді як *AtBCAT1*, *AtBCAT4*, *AtBCAT6* функціонують у мітохондріях і цитозолі відповідно [2, 5].

Метою проведеного дослідження було встановлення повнокодуючої послідовності, знаходження на хромосомній карті та експресії гена *BCAT2 Lycopersicon esculentum*, а також вивчення біохімічних властивостей білка, що ним кодується.

Ген *BCAT2* було картовано методом аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ) в популяції інтрогресивних ліній томата, отриманих від схрещування *Lycopersicon esculentum* і *L. pennellii*. Тотальну ДНК інтрогресивних ліній томата та батьківських видів екстрагували з листової тканини за методом [6]. Після інкубації ізольованої ДНК з РНКазою (Promega) аліквоту в кількості 15 мкг обробляли рестриктазою *Xba* I ("Roche", Німеччина). Продукти рестрикції розділяли в агарозному гелі (1%) і переносили

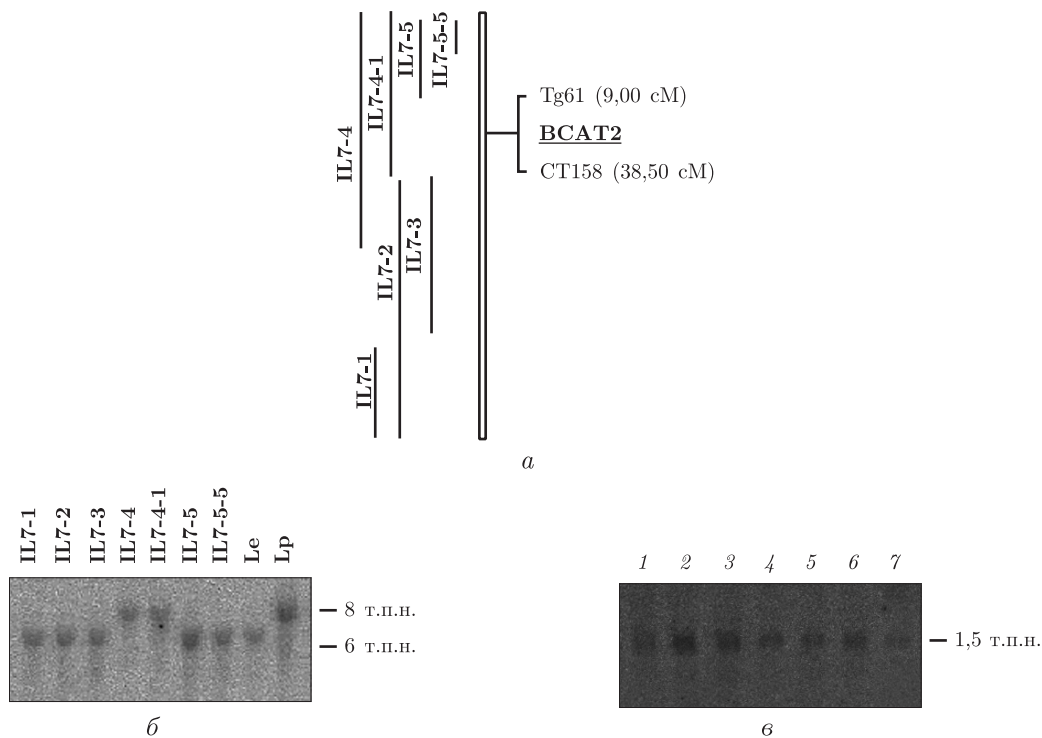


Рис. 1. Картування гена BCAT2 (а, б) та аналіз його експресії (в): а — локалізація на хромосомній карті; б — результати блотингу за Саузерном; IL7-1 — IL7-5-5 — інтрогресивні лінії томата; Le — *L. esculentum*; Lp — *L. pennellii*; в — Нозерн-блот-гібридизація; 1 — РНК із стебел; 2 — РНК з листків; 3 — РНК з квіток; 4 — РНК з плодів 10 д. п. р. к.; 5 — РНК з плодів 20 д. п. р. к.; 6 — РНК з плодів 30 д. п. р. к.; 7 — РНК з плодів 40 д. п. р. к. (д. п. р. к. — день після розкриття квітки)

на нейлонову мембрану Porablot N+ ("Macherey-Nagel", Німеччина). Гібридизацію з радіоактивно міченим зондом (як такий використовували кДНК вставку EST клону cLEC38O16) проводили протягом 8 год при 65 °С. За результатами Саузерн-блот-гібридизації ген BCAT2 було локалізовано на хромосомі 7 між маркерами TG61 і CT158 (рис. 1, а, б).

Рівень експресії гена BCAT2 у різних типах тканин оцінювали за допомогою Нозерн-блот-гібридизації. Для цього тотальну РНК виділяли з 1 г замороженої тканини за наведеним раніше методом [7]. Після обробки ДНКазою I аліквоту РНК (25 мкг), ізольовану з листків, стебла, квіток та плодів різного ступеня стиглості, розділяли в денатуруючому формальдегідному агарозному гелі (1,5%) і переносили на нейлонову мембрану Porablot N+ ("Macherey-Nagel", Німеччина) за допомогою капілярного методу. Як зонд для гібридизації використовували фрагмент кДНК, який містив разом із 5' послідовністю, яка не транслюється, частину (225 нуклеотидів) кодуючої послідовності гена BCAT2. Використання такої високоспецифічної проби дозволило уникнути крос-гібридизації з транскриптами, які кодують решту амінотрансфераз, задіяних у метаболізмі АКРЛ. На авторадіограмі було виявлено один мажорний транскрипт розміром 1500 п. н. (див. рис. 1, в). Експресія гена BCAT2 була найвищою в листках і квітках, тоді як у стеблі і плодах, особливо на пізніх стадіях стиглості, рівень експресії був значно нижчим.

3' і 5' RACE ПЛР було задіяно для встановлення повнорозмірної кодуючої послідовності даного гена. Використовували SMART RACE набір ("Invitrogen", Німеччина), всі реакції проводили згідно з рекомендаціями фірми виробника, 3' і 5' RACE зворотно транскрибу-

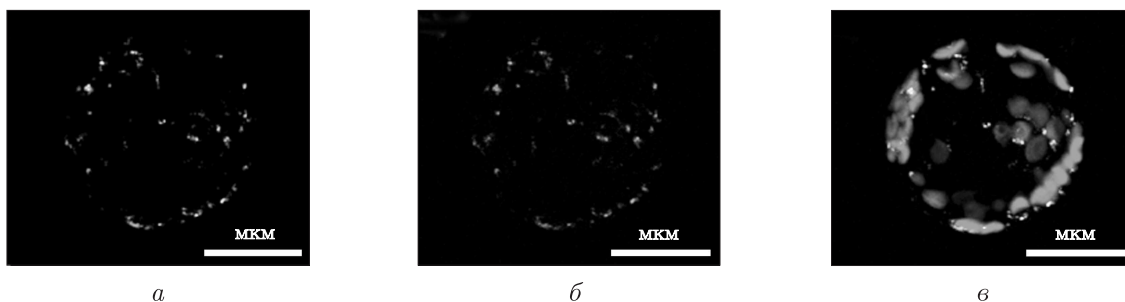


Рис. 2. Конфокально-мікроскопічний аналіз мезофільних протопластів тютюну, що експресують химерний протеїн ВСАТ2-GFP. Флуоресцентні маркери: *a* — зелений флуоресцентний протеїн GFP; *б* — барвник MitoTracker; *в* — об'єднане зображення автофлуоресценції хлорофілу, GFP і MitoTracker

вану мРНК з листків *Lycopersicon esculentum* сорту М82 було використано як матрицю. RACE ПЛР ампліфіковані продукти були клоновані у вектор pCR4Blunt-TOPO і секвеновані. Після встановлення нуклеотидної послідовності на кінцях RACE ПЛР продуктів були синтезовані праймери, за допомогою яких вдалося ампліфікувати повну кодуючу послідовність гена ВСАТ2.

Аналіз субклітинної локалізації білка є однією з необхідних складових для його детальної функціональної характеристики. Тому наступним етапом було створення химерного протеїну між ВСАТ2 та зеленим флуоресцентним протеїном (GFP), який відіграє роль флуоресцентної мітки, що дозволяє виявити місцезнаходження білка в клітині. Повнорозмірна кодуюча послідовність гена ВСАТ2 без стоп-кодона була ампліфікована з використанням прямого ВСАТ2F СACCATGATTCAAAGGGCCGCACCTG та зворотного ВСАТ2R TTCAATGTCAACAATССAATССС олігонуклеотидних праймерів. Ампліфікований продукт за розміром 1153 п. н. спочатку клонували в проміжний вектор pENTR-SD-D-TOPO, після чого його було субклонувано у вектор pK7FWG2 з використанням Gateway LR Recombinase (“Invitrogen”, Німеччина). Таким чином, повнорозмірна кодуюча послідовність ВСАТ2 була злита з послідовністю гена EGFP. Конструкція 35S:BCAT2-GFP була введена в мезофільні протопласти тютюну за допомогою методу ПЕГ-обумовленої трансформації. Аналіз тимчасової експресії химерного протеїну ВСАТ2-GFP проводили за допомогою конфокального лазерного сканувального мікроскопа (DM IRB, Leica, “Bensheim”, Німеччина). Для збудження GFP флуоресценції використовували аргоновий лазер 488 нм, флуоресценцію реєстрували у межах 505–530 нм. Флуоресцентний барвник MitoTracker (“Invitrogen”, Німеччина) використовували для специфічного фарбування мітохондрій. Детекцію сигналу проводили в межах 585–605 нм, при збудженні гелій-неоновим лазером 543 нм. Колокалізація сигналів флуоресценції для ВСАТ2-GFP і MitoTracker вказувала на те, що ВСАТ2 локалізується в мітохондріях (рис. 2).

Для біохімічної характеристики кодуюча нуклеотидна послідовність гена ВСАТ2 без стоп-кодону, яка знаходилась у векторі pENTR/D/-TOPO була субклонувана у вектор pYES-DEST52. Таким чином, була отримана конструкція, що кодує ВСАТ2-His6 рекомбінантний протеїн під контролем галактозного промотера (GAL1). Експресію рекомбінантного протеїну проводили в мутантному штамі дріжджів $\Delta bat1\Delta bat2$, у якого відсутні обидві амінотрансферази АКРЛ. Дріжджову культуру вирощували при 30 °С до оптичної густини A_{600} — 0,5–0,7 у мінімальному середовищі SC, яке містило 2% глюкози як джерело вуглецю. Експресію протеїну індукували шляхом заміни джерела вуглецю в живильному

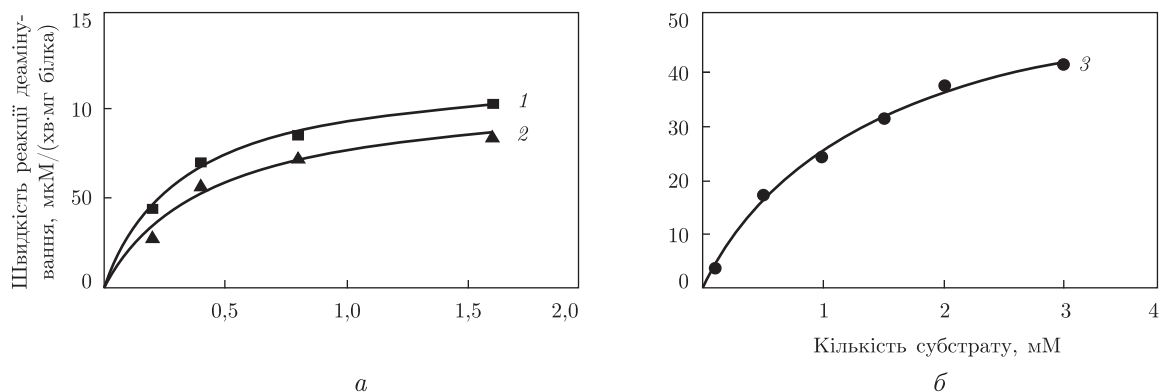


Рис. 3. Ензиматична активність ВСАТ2. Залежність швидкості реакції деамінування від кількості субстрату. *a* — лейцин (1), ізолейцин (2) як субстрат; *б* — валін (3) як субстрат

середовищі, замість глюкози використовували галактозу, кінцева концентрація якої в індукційному середовищі становила 2 г/л. Після індукції експресії культуру інкубували ще 8–12 год при 30 °С. Після цього клітини були осаджені центрифугуванням (5000 g, 10 хв) і лізовані в буфері YeastBuster™ (“Novagen”, Німеччина). Очищення рекомбінантного протеїну здійснювали методом металоафінної хроматографії на Ni²⁺-NTA агарозі (“Qiagen”, Німеччина) згідно з рекомендаціями фірми виробника. Активність очищеного протеїну визначали спектрофотометрично за методом [8]. Кінетичні параметри реакцій (K_M , V_{max}) були розраховані з трьох незалежних експериментів за рівнянням Міхаеліса–Ментен з використанням програми GraphPad Prism 5.

Ізольований ВСАТ2 протеїн був здатним каталізувати перетворення валіну, лейцину та ізолейцину у відповідні альфа-кетокислоти. Найвища активність ферменту була зафіксована у разі лейцину та ізолейцину як субстрату (рис. 3, табл. 1). Результати ензиматичного аналізу свідчать про те, що ВСАТ2 може розпочинати деградацію всіх трьох АКРЛ. Подібні результати було отримано під час вивчення мітохондріальної ізоформи амінотрансферази (AtBCAT1) у *Arabidopsis thaliana* [3]. AtBCAT1, як і ВСАТ2 томата, мала найменшу спорідненість до валіну як субстрату. Однак AtBCAT1, на відміну від ВСАТ2, мала більшу спорідненість до ізолейцину, ніж до лейцину.

Таким чином, наведені дані про субклітинну локалізацію та ензиматичні властивості протеїну ВСАТ2 переконливо вказують на те, що він виконує специфічні функції в катаболізмі АКРЛ. Встановлення ж місцезнаходження на хромосомній карті та нуклеотидної послідовності гена ВСАТ2 має не тільки фундаментальне, але й прикладне значення, оскільки ця інформація може бути використана під час розробки проектів та підходів із застосуванням трансгеномних технологій або маркер-допоміжної селекції, які мають за мету модифікацію вмісту АКРЛ у томаті чи інших споріднених видах.

Таблиця 1. Кінетичні параметри ВСАТ2. Значення константи Міхаеліса (K_M) і максимальної швидкості (V_{max}) реакції деамінування для очищеної амінотрансферази томата ($M \pm m$, $n = 5$)

Субстрат	K_M , мМ	V_{max} , мМ/(хв · мг білка)
Лейцин	0,32 ± 0,01	122,50 ± 1,87
Ізолейцин	0,43 ± 0,07	109,80 ± 6,24
Валін	1,38 ± 0,14	61,24 ± 2,78

1. Fujiki Y., Sato T., Ito M., Watanabe A. Isolation and characterization of cDNA clones for E1₁ and E2 subunits of the branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex in Arabidopsis // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**. – P. 6007–6013.
2. Diebold R., Schuster J., Daschner K., Binder S. The branched-chain amino acid transaminase gene family in Arabidopsis encodes plastid and mitochondrial proteins // Plant Physiol. – 2002. – **129**. – P. 540–550.
3. Schuster J., Binder S. The mitochondrial branched-chain aminotransferase (AtBCAT1) is capable to initiate degradation of leucine, isoleucine and valine in almost all tissue of Arabidopsis thaliana // Plant Mol. Biol. – 2005. – **57**. – P. 241–254.
4. Singh B. K. Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine // Plant amino acids: biochemistry and biotechnology. – New York: Marcel Dekker, 1999. – P. 227–247.
5. Schuster J., Knill T., Reichelt M. et al. Branched-chain aminotransferase4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in Arabidopsis // Plant Cell. – 2006. – **18**. – P. 2664–2679.
6. Doyle J. J., Doyle J. L. Isolation of Plant DNA from fresh tissue // Focus. – 1990. – **12**. – P. 13–15.
7. Robaglia C., Bruening G., Haseloff J., Gerlach W. L. Evolution and replication of tobacco ringspot virus satellite RNA mutants // EMBO J. – 1993. – **12**. – P. 2969–2976.
8. Prohl C., Kispal G., Lill R. Branched-chain-amino-acid transaminases of yeast Saccharomyces cerevisiae // Methods Enzymol. – 2000. – **324**. – P. 365–375.

Інститут клітинної біології та генетичної
інженерії НАН України, Київ
Макс-Планк-Інститут молекулярної
фізіології рослин, Гольм

Надійшло до редакції 03.11.2010

A. S. Kochevenko, A. R. Fernie

Molecular cloning and analysis of *Lycopersicon esculentum* gene encoding the tomato mitochondrial-targeted BCAT

Tomato BCAT2 gene is mapped on chromosome 7 by the RFLP-method. Its expression level in various tissue types is determined by Northern blot hybridization. Subcellular localization of BCAT2-GFP protein is investigated with the help of confocal microscopy. It was localized in mitochondria. The results obtained are discussed with regard to the role of this enzyme in the metabolism of branched-chain amino acids.