

А. С. Кочевенко, А. Р. Ферні

Характеристика гена *IPMD-SSU1 Lycopersicon esculentum* та його роль у біосинтезі лейцину

(Представлено членом-кореспондентом НАН України М. В. Кучуком)

Методом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів ген *IPMD-SSU1* було картовано на хромосомі 6. За допомогою RACE ПЛР встановлено повнорозмірну кодуєчу нуклеотидну послідовність гена. Шляхом qRT-PCR досліджено експресію гена *IPMD-SSU1* у різних органах культурного томата. Найвищий рівень експресії гена зафіксовано в листках, а також плодах на сороковий день після розкриття квітки. За умов пригнічення активності гена *IPMD-SSU1* виявлено зменшення вмісту лейцину в листках рослин, що експресували κДНК у антисенс-орієнтації.

Біосинтетичний шлях двох незамінних амінокислот з розгалуженим ланцюгом валіну і лейцину починається з пірувату і на початкових етапах потребує узгодженої взаємодії таких ферментів, як ацетолактатсинтаза (ALS, EC 2.2.1.6), кетол-кисла редуктоізомераза (KARI, EC 1.1.1.86) та дигідрокси-кисла дегідратаза (DHAD, EC 4.2.1.9). Продукт цих реакцій 2-оксо-ізовалеріат (KIV) може у подальшому піддаватися трансамінації і перетворюватися на валін або використовуватись для біосинтезу лейцину (рис. 1). Саме на стадії 2-оксо-ізовалеріату і відбувається відгалуження біосинтетичного шляху лейцину. Деаміноване похідне валіну в результаті наступних чотирьох послідовних реакцій перетворюється на лейцин. Перші три реакції, які каталізуються ферментами 2-ізопропілмалатсинтазою (IPMS,

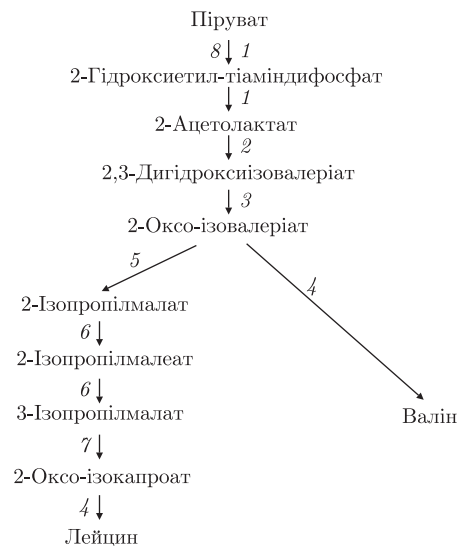


Рис. 1. Біосинтетичні шляхи лейцину і валіну у рослин. 1 — ацетолактатсинтаза; 2 — кетол-кисла редуктоізомераза; 3 — дигідрокси-кисла дегідратаза; 4 — амінотрансфераза (BCAT); 5 — ізопропілмалатсинтаза; 6 — 3-ізопропілмалатдегідратаза; 7 — 3-ізопропілмалатдегідрогеназа; 8 — піруватдегідрогеназа

ЕС 4.1.3.12), ізопропілмалатдегідратазою (IPMD, ЕС 4.2.1.33) та ізопропілмалатдегідрогеназою (IPMDH, ЕС 1.1.1.85), призводять до елонгації аліфатичного ланцюга 2-оксокислоти на один атом вуглецю і формування 2-оксо-ізокапроату (ОІК). На фінальному етапі ОІК у результаті трансамінуючої реакції за участю ВСАТ (аміотрансферази амінокислот з розгалуженим ланцюгом) перетворюється на лейцин (див. рис. 1) [1].

Другий специфічний фермент у біосинтезі лейцину — ізопропілмалатдегідратаза (IPMD), який ще іноді називають ізопропілмалатізомеразою, є представником сімейства аконітаз. Члени цього сімейства каталізують перетворення α -гідроксикислот у β -гідроксикислоти. Якщо у дріжджів IPMD протеїн — мономер, то у бактерій і рослин IPMD — це гетеродимер, що містить дві субодиниці — маленьку та велику, молекулярна маса яких становить близько 26 і 55 кДа відповідно [2, 3]. У геномі модельного об'єкта *Arabidopsis thaliana* було виявлено один ген AtLeuC (At4g13430), який кодує велику субодиницю, і три гени AtLeuD1 (At2g43100), AtLeuD2 (At3g58990), AtLeuD3 (At2g43090), що кодують маленьку субодиницю. Вважається, що маленька субодиниця має регуляторну функцію, саме вона забезпечує субстратну специфічність IPMD протеїну. AtLeuD1 і AtLeuD2 задіяні у біосинтезі глюкозинолатів, тоді як AtLeuD3 відіграє важливу роль у біосинтезі лейцину. Дослідження субклітинної локалізації з використанням флуоресцентної мітки та імуноферментного аналізу показали, що протеїн IPMD функціонує в хлоропластах [4, 5].

Метою нашого дослідження було дати детальну характеристику гена, що кодує маленьку субодиницю IPMD (далі IPMD-SSU1), а саме встановити повнорозмірну кодуючу нуклеотидну послідовність, хромосомну локалізацію та експресію гена, а також виконати його функціональний аналіз.

Хромосомну локалізацію гена IPMD-SSU1 встановлювали шляхом аналізу поліморфізму його нуклеотидної послідовності в популяції з 75 інтрогресивних ліній томата, отриманих від схрещування *Lycopersicon esculentum* і *L. pennellii*. Такий підхід дає можливість досить точно локалізувати ген, оскільки кожна лінія містить тільки один інтрогресивний хромосомний сегмент, що становить приблизно 12 сМ, від дикого виду на генетичному фоні культурного томата. Крім того, завдяки великій кількості суміжних ліній, що містять інтрогресивні сегменти, які частково перекриваються, можна значно зменшити регіон знаходження гена, іноді до 0,6–1 сМ. Тотальну ДНК із листків батьківських та інтрогресивних ліній томата виділяли з використанням цетилтриметиламонійброміду (ЦТАБ) за методом [6]. Після обробки ендонуклеазою EcoR I ("Roche", Німеччина) рестрикційні фрагменти розділяли в 1%-му агарозному гелі і переносили на мембрану Porablot ("Macherey Nagel", Німеччина). ДНК фіксували на мембрані за допомогою опромінення ультрафіолетовим світлом. кДНК із EST клону cTOS24D10 використовували як зонд для Саузерн-гібридизації. Для введення радіоактивної мітки ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$) у пробу використовували набір Rediprime II DNA Labeling System ("Amersham Pharmacia Biotech"), всі операції проводили згідно з протоколом фірми-виробника. Гібридизацію мембран із радіоактивно міченим зондом здійснювали в жорстких умовах. Сигнал реєстрували за допомогою фосфоіміджера Fuji BAS2000 ("Fuji Photo Film"). Результати Саузерн-блот-гібридизації свідчать про те, що інтрогресивні лінії IL6-2, IL6-2-2 несуть аллель *L. pennellii*, тоді як IL6-1, IL6-3, IL6-4 мають аллель *L. esculentum* (рис. 2 а, б). Таким чином, ген IPMD-SSU1 було картовано на хромосомі 6, у хромосомному регіоні розміром 6,1 сМ, що обмежений молекулярними маркерами СТ83 і ТГ177 і відповідає сховищу 6С згідно з [7].

Нуклеотидну послідовність кДНК вставки клону cTOS24D10 визначали з використанням набору Big Due Terminator Cycle Sequencing Kit на автоматичному секвенаторі ABI

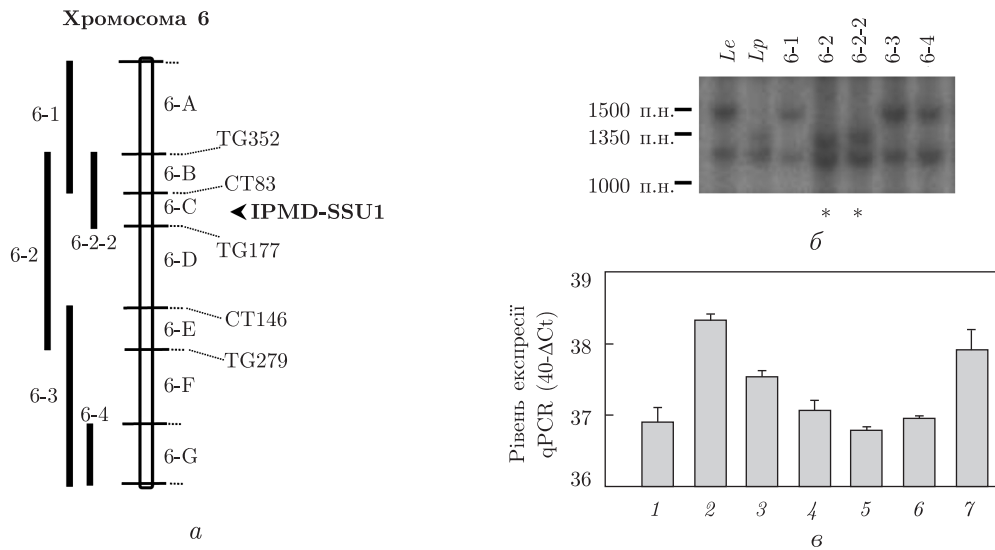


Рис. 2. Картування гена IPMD-SSU1 (а, б) та аналіз його експресії (в): а — локалізація на хромосомній карті; б — результати блотингу за Саузерном (6-1 — 6-4 — інтрогресивні лінії томата IL6-1 — IL6-4; *Le* — *L. esculentum*; *Lp* — *L. pennellii*; зірочками відмічені лінії, які успадкували даний ген від дикого виду *L. pennellii*); в — кількісна ПЛР у реальному часі (qPCR) (1 — стебла; 2 — листки; 3 — квітки; 4 — плоди 10 д. п. р. к.; 5 — плоди 20 д. п. р. к.; 6 — плоди 30 д. п. р. к.; 7 — плоди 40 д. п. р. к. (д. п. р. к. — день після розкриття квітки))

PRISM® 310 (“PE Applied Biosystems”, Німеччина). Було виявлено, що кДНК вставка має розмір 684 п. н. і містить усічену кодуєчу послідовність гена та прилеглий до неї 3′-нетрансльований район. 5′-кінцеву нуклеотидну послідовність гена IPMD-SSU1 було встановлено за допомогою методу 5′-RACE ПЛР, для цього використовували набір реактивів Gene Racer Kit (“Invitrogen”, Німеччина). мРНК, ізольовану з листків томата, було використано як матрицю. Продукт 5′-RACE розміром 381 п. н. ампліфікували, застосовуючи таку комбінацію праймерів: GeneRacer 5′ CGACTGGAGCACGAGGACACTGA і 5Racer-IPMD-SSU1 GTTTCTTGTACTCATCTGGATTTG. Після електрофорезу в 1%-му агарозному гелі продукт ПЛР очищали за допомогою набору реактивів NucleoSpin® Extract II (“Macherey Nagel”, Німеччина), після чого його клонували у вектор pCR4Blunt-TOPO і секвенували. Визначену нуклеотидну послідовність кДНК IPMD-SSU1 (1121 п. н.), що містить кодуєчу послідовність (771 п. н.) і 5′-3′-нетрансльовані регіони, та виведену амінокислотну послідовність зображено на рис. 3.

Для більш поглибленого розуміння ролі IPMD у метаболізмі амінокислот з розгалуженим ланцюгом було проведено аналіз експресії цього гена в різних типах тканин за допомогою ПЛР у реальному часі (qRT-PCR). Сумарну РНК із замороженої тканини окремих органів: стебел, квіток, листків та плодів на стадії 10, 20, 30 і 40 д. п. р. к. (день після розкриття квітки), ізолювали за допомогою Trizol реагенту (“Invitrogen”, Німеччина). Перший ланцюг кДНК синтезували з 3 мкг сумарної РНК із використанням оліго-(dT)-праймера (0,5 мг), зворотної транскриптази SuperScript III (200 од.) (“Invitrogen”, Німеччина), за рекомендаціями фірми-виробника. qRT-PCR аналіз проводили з використанням інтеркалюючого флуоресцентного барвника SYBR Green. Реакційна суміш для qRT-PCR (10 мкл) містила 1x Power SYBR Green PCR Master Mix (“Applied Biosystems”, США), 50 нг кДНК і 500 нМ кожного генспецифічного праймера — FrqRT-IPMD CCCAGCAGAATACCTAACCCTTG

gttttcaacgaaaaattagcattctccgcccactccgagctttaatca
 atggcgcttcaacagctgtttccagttccatcaccaccttcaaatcctcttcgttccaa
 M A A S T A V S S S I T T F K S S S F Q
 ccacgcgcctcctctatgaatcctctcccttccgtcaaattcccatcaat
 P R A S S M N P L P S V K F P S I S S H
 aatccattaatctcccattccgtctcagctccgaaaaactacactgtcgcacctctccgt
 N P L I S H S V S A P K N Y T V A P L R
 tccgcccgcctctactacaccggaaactaccaagactgccaccacatttcacggcctc
 S A A A S T T P E T T K T A T T F H G L
 tgctacgttctcggagacaatatcgacactgaccaaatcatcccagcagaatacctaacc
 C Y V L G D N I D T D Q I I P A E Y L T
 cttgtaccttcaaatccagatgagtacaagaaactcgggtcgtatgctctatgtggactt
 L V P S N P D E Y K K L G S Y A L C G L
 ccctcatcgtaccaaacccgttctcgtcgaaccaggtgaattgacgtcaaagtactccatc
 P S S Y Q T R F V E P G E L T S K Y S I
 gtcataaggtggtgacaactttggatgcggatcatcgcgtgagcagcgcgggttgcctg
 V I G G D N F G C G S S R E H A P V A L
 ggggcagctggtgtatcggcagtggtggcggagtcgtatgcgaggatcttttcaggaat
 G A A G V S A V V A E S Y A R I F F R N
 tcagtttcgactggtgaagtctatccgcttgaatcggaaaagagaatatgtgaggagtg
 S V S T G E V Y P L E S E K R I C E E C
 aagactggtgatgtggtgaccgttgaattggagagagtaggttgattaatcatacaact
 K T G D V V T V E I G E S R L I N H T T
 ggaaaagagtataaattgaagcctattggtgatgctggtcctgtcattgaagctggtggc
 G K E Y K L K P I G D A G P V I E A G G
 attttcgcttatgcaagaaaggctggaatgatttctgcacgagaagcttagttttccaag
 I F A Y A R K A G M I S A R E A -
 tggttaattgactcagttcttttaagtttgtactttaagattattattgcataataaa
 tatggtgtttgtgtgttttgcagttataatcgatgtataaactacatacgaatata
 gttgggttgactctatatgatctggaggattatcacaatttcattataattagtttgcct
 tttgtttgatgaccgagaactctgtctggaccaactttaggaccaatccaaccttggaa
 attcgtcggcaaggggtgtcgaacctgagacctccaacatggaagtccaagct

Рис. 3. Нуклеотидна послідовність κДНК ізопропілмалатдегідратази та виведена амінокислотна послідовність культурного томата *L. esculentum*

і ReqRT-IPMD CGACCCGAGTTTCTTGTACTCATC. Внутрішній ампліфікаційний стандарт UBІ3 ампліфікували з праймерами FrqRTUBІ3 GGTTAAGCTCGCTGTGTTGCA і ReqRTUBІ3 CGAAGCCTCTGAACSTTTCCA. qRT-PCR аналіз виконували на приладі ABI7000 Real Time PCR System (“Applied Biosystems”, США) за таких умов: 2 хв, 50 °C; 10 хв, 95 °C; 15 с, 95 °C, 1 хв, 60 °C, 40 циклів; 15 с, 95 °C, 20 с, 60 °C; 15 с, 95 °C. Аналіз даних проводили за допомогою програми SDS 2.2.1. Встановлено, що ген IPMD-SSU1 експресується у всіх типах тканин, що використовувались, хоча рівень його експресії значно варіював (див. рис. 2, в). Листки і плоди на стадії 40 д. п. р. к. мали найбільшу кількість транскрипту IPMD-SSU1, тоді як у плодах на стадії 20 д. п. р. к. вона була найменшою.

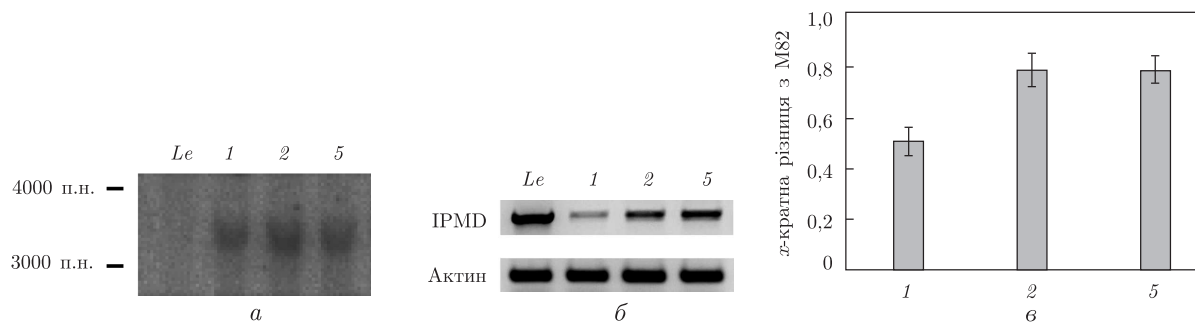


Рис. 4. Аналіз трансгенних рослин, що експресують 35S:ант-IPMD-SSU1 конструкцію. *а, б* — результати Саузерн-блот-гібридизації і ЗТ-ПЛР відповідно (рестрикцію тотальної ДНК проводили за допомогою ендонуклеаз AflII і VrmI; фрагмент гена NPT II використовували як зонд); *в* — вміст лейцину в листках трансгенних рослин, за даними ГХ-МС аналізу (*Le* — *L. esculentum*; 1, 2, 5 — незалежні трансгенні лінії)

Функціональний аналіз гена IPMD-SSU1 проводили шляхом інактивації його активності (loss-of-function approach) з використанням методу антисенс-РНК. Для цього на основі бінарного вектора pK2WG7 [8] було створено конструкцію 35S:ант-IPMD-SSU1, яка містила кДНК послідовність (874 п. н.) гена IPMD-SSU1 томата в антисенс-орієнтації під контролем конститутивного р35S промотору і t35S термінатора вірусу мозаїки цвітної капусти. 35S:ант-IPMD-SSU1 вводили у рослини *L. esculentum* (cv. Moneymaker) шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації за методом [9]. Трансгенні рослини відбирали за їх здатністю рости на селективному середовищі з канаміцином (100 мг/л). Наявність конструкції 35S:ант-IPMD-SSU1 у геномі відселектованих рослин підтверджували за допомогою Саузерн-блот-гібридизації з використанням радіоактивно міченого зонда, специфічного до гена неоміцинофосфотрансферази (NPT II) (рис. 4, *а*). Аналіз експресії гена IPMD-SSU1 у рослин-трансформантів проводили за допомогою методу зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР, RT-PCR). Для ампліфікації фрагмента кДНК розміром 1049 п. н. використовували таку комбінацію праймерів: IPMD-RT-PCR-F CACTCCGAGCTTTAATCAATGG, IPMD-RT-PCR-R TGCCAGCGAATTTCCAAGGT. Ампліфікацію здійснювали на термоциклері PTC-200 (MJ Research, США) за таких умов: 5 хв, 95 °С; 3 хв, 95 °С, 45 с, 56 °С, 1 хв, 72 °С, 30 циклів; 10 хв, 72 °С. Отримані результати вказують на зниження експресії гена IPMD-SSU1 в клітинах трансгенних рослин порівняно з експресією в контролі (див. рис. 4, *б*). Для аналізу вмісту амінокислот у листках трансгенних рослин застосовували метод газової хроматографії в комбінації з мас-спектрометрією (ГХ-МС, GC-MS) за протоколом [10]. ГХ-МС аналіз виявив, що у всіх трансгенних ліній вміст лейцину був знижений (див. рис. 4, *в*).

Таким чином, нами картовано на хромосомній карті томата ген IPMD-SSU1, встановлено його повнорозмірну кодуючу послідовність і досліджено динаміку його експресії. Проведений функціональний аналіз шляхом інактивації експресії гена IPMD-SSU1 довів важливу роль продукту цього гена в біосинтетичному шляху лейцину.

1. Singhl B. K., Shaner D. L. Biosynthesis of Branched Chain Amino Acids: From Test Tube to Field // Plant Cell. – 1995. – 7. – P. 935–944.
2. Yasutake Y., Yao M., Sakai N. et al. Crystal structure of the Pyrococcus horikoshii isopropylmalate isomerase small subunit provides insight into the dual substrate specificity of the enzyme // J. Mol. Biol. – 2004. – 344. – P. 325–333.
3. Drevland R. M., Waheed A., Graham D. E. Enzymology and Evolution of the Pyruvate Pathway to 2-Oxobutyrate in Methanocaldococcus jannaschii // J. Bacteriol. – 2007. – 189. – P. 4391–4400.

4. Knill T., Reichelt M., Paetz C. et al. Arabidopsis thaliana encodes a bacterial-type heterodimeric isopropylmalate isomerase involved in both Leu biosynthesis and the Met chain elongation pathway of glucosinolate formation // Plant Mol. Biol. – 2009. – **71**. – P. 227–239.
5. He Y., Chen B., Pang Q. et al. Functional specification of Arabidopsis isopropylmalate isomerases in glucosinolate and leucine biosynthesis // Plant Cell Physiol. – 2010. – **51**. – P. 1480–1487.
6. Doyle J. J., Doyle J. L. Isolation of Plant DNA from fresh tissue // Focus. – 1990. – **12**. – P. 13–15.
7. Pan Q., Liu Y. S., Budai-Hadrian O. et al. Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and Arabidopsis // Genetics. – 2000. – **155**. – P. 309–322.
8. Karimi M., Inze D., Depicker A. GATEWAYTM vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation // Trends Plant Sci. – 2002. – **7**. – P. 193–195.
9. McCormick S., Niedermeyer J., Fry J. et al. Leaf disk transformation of cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Cell Rep. – 1986. – **5**. – P. 81–84.
10. Roessner U., Wagner C., Kopka J. et al. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry // Plant J. – 2000. – **23**. – P. 131–142.

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

Надійшло до редакції 14.01.2011

A. S. Kochevenko, A. R. Fernie

Characteristic of gene IPMD-SSU1 of *Lycopersicon esculentum* and its role in the biosynthesis of leucine

Gene IPMD-SSU1 is mapped on chromosome 6 by using the restriction fragment length polymorphism method. The full-length CDS encoding the IPMD-SSU1 gene is identified by RACE-PCR. qRT-PCR is used to study the expression of gene IPMD-SSU1 in various organs of tomato. The highest level of expression is observed in leaves and fruits at the stage in 40 days post anthesis. Inhibition of the activity of IPMD-SSU1 gene results in a decrease of the leucine content in tomato leaves.