

Картування ділянки рибофлавінового оперону *Bacillus subtilis*, що детермінує активність 3, 4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтази

Н. І. Борецька, О. Є. Люта-Теглівець,
А. Я. Вороновський, Ю. Р. Борецький*, Г. М. Шавловський

Відділення регуляторних систем клітини інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, 290005 Львів, вул. Драгоманова, 14/16

За допомогою рибофлавінових ауксотрофів Escherichia coli та рекомбінантних плазмід проведено комплементарний аналіз рибофлавінового оперону B. subtilis. Показано, що третя відкрита рамка трансляції рибофлавінового оперону B. subtilis кодує біфункціональний білок, який каталізує розщеплення ГТФ до 2, 5-діаміно-4-окси-6-рибозиламінопіримідин-5'-фосфату і утворення 3, 4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфату з рибозозо-5-фосфату.

Вступ. Аналіз нуклеотидної послідовності рибофлавінового оперону *B. subtilis* виявив п'ять відкритих рамок трансляції (ВРТ), що транскрибуються у вигляді однієї поліцистронної мРНК [1]. Було встановлено, що клоновані фрагменти рибофлавінового оперону *B. subtilis*, які містять ВРТ-3 або її 3'-кінцеву частину, комплементують мутацію ауксотрофності за рибофлавіном мутантів *Escherichia coli* 1100 BSV821 з блокованою ГТФ-циклогідролазою. Результати секвенування сконструйованих плазмід засвідчили, що при видаленні 400 нуклеотидів від початку структурної частини гена в клітинах *E. coli* синтезується білок, який зберігає ГТФ-циклогідролазну активність та деякі властивості фермента з бацил. Отже, N-кінцева частина білка довжиною приблизно 130 амінокислотних залишків є несуттєвою для прояву циклогідролазної активності і, можливо, має додаткові функції [2]. Нещодавно було показано, що ця частина N-амінокислотної послідовності бацилярної ГТФ-циклогідролази є подібною до амінокислотної послідовності 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтази, яка каталізує одну з реакцій біосинтезу рибофлавіну в клітинах *E. coli* [3]. В даній роботі представлено докази того, що фермент, який кодується ВРТ-3 рибофлавінового оперону *B. subtilis*, є біфункціональним і проявляє активність ГТФ-циклогідролази та 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтази.

Матеріали і методи. *Бактерійні штами.* В роботі використано ауксотрофні за рибофлавіном штами *E. coli* 1100 BSV821 [4], *E. coli* K802 *ribA-81* (блокована ГТФ-циклогідролаза), а також ауксотрофні за рибофлавіном мутанти *E. coli* K802 *rib-73*, *E. coli* K802 *rib-379* з блокуванням утворенням попередника рибофлавіну — 6, 7-диметил-8-рибітиллюмазину (ДМРЛ) [5].

Виділення плазмідної ДНК, рестрикцію, електрофорез і лігування

*Correspondence address.

проводили за загальноприйнятими методиками [6].

Клітини *E. coli* трансформували за модифікованим методом Mandel [6]. Для селекції трансформантів використовували агаризований L-бульйон, що містить 100 мкг/мл ампіциліну і 50 мкг/мл рибофлавіну або середовище без рибофлавіну.

В роботі використані також АТФ, ГТФ, ЕДТА, дитіотрейтол, меркаптоетанол і тріс фірми «Sigma» (США). Ендонуклеази *BamHI*, *BglII*, *PvuII* і ДНК-лігаза виробництва НПО FERMENTAS (Литва).

Всі інші реактиви — кваліфікації хч і осч.

Результати та обговорення. Наявність споріднених та ідентичних ділянок в структурі білків дозволяє висловити припущення про належність їх до одного класу ферментів або про ідентичність використаних ними субстратів [7, 8]. У кожному випадку підтвердження таких припущень вимагає безпосереднього дослідження функцій білків. Виявлення областей гомології білка, що кодується ВРТ-3 рибофлавінового оперону бацил з двома різними ферментами *E. coli*, дозволяє припустити, що цей білок є біфункціональним. Для доказу цього було проведено експерименти по трансформації двох груп рибофлавінових ауксотрофів *E. coli* гібридними плазмідами, які несуть фрагменти рибофлавінового оперону *B. subtilis*. Комплементация ауксотрофності за рибофлавіном мутантів *E. coli* з пошкодженою ГТФ-циклогідролазою (І біохімічна група) і мутантів з блоком 3, 4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтази (ІІІ біохімічна група) плазмідами, що несуть ВРТ-3 оперону *B. subtilis*, є експериментальним підтвердженням біфункціональності досліджуваного білка.

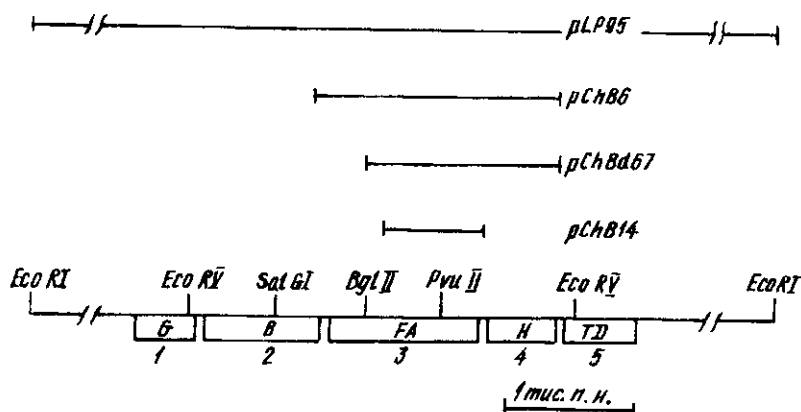
Конструювання деяких плазмід, використаних в даній роботі, описане раніше [2]. Результати трансформації свідчать, що всі плазміди комплементують ауксотрофність за рибофлавіном мутантів *E. coli* з пошкодженою ГТФ-циклогідролазою. Це є доказом ефективної експресії клонуваних фрагментів в клітинах *E. coli* (таблиця). Водночас ауксотрофність мутантів третьої біохімічної групи комплементується тільки при введенні плазмід, що містять повну послідовність ВРТ-3 рибофлавінового оперону *B. subtilis* (рисунок). Одна з таких плазмід — *pChB6* — несе фрагмент ДНК розміром 1,8 тис. п. н., який містить повну послідовність ВРТ-3 і, очевидно, повну послідовність ВРТ-4 — гена β -субодиниці рибофлавінсинтази, яка в клітинах *B. subtilis* каталізує утворення ДМРЛ [9].

Наявність ВРТ-4 у складі плазміди зумовлює неоднозначність

Частота трансформації рибофлавінових ауксотрофів *E. coli* плазмідами, що містять фрагменти рибофлавінового оперону *B. subtilis*

Штам (група)	Селективне середовище	Частота трансформації, клітин/мкг ДНК · 10 ⁵			
		<i>pLP95</i>	<i>pChB6</i>	<i>pChBd67</i>	<i>pChB14</i>
ribA-81 (I)	LB+Ap*	1,2	1,4	1,0	1,5
	LB+Ap+B ₂ **	1,4	1,5	1,4	1,7
BSV-82i (I)	LB+Ap	0,8	1, 1,1	1,0	
	LB+Ap+B ₂	1,1	1,3	1,3	1,2
rib-83 (III)	LB+Ap	1,8	1,9	0	0
	LB+Ap+B ₂	1,9	2,1	2,3	2,4
rib-379 (III)	LB+Ap	2,8	2,5	0	0
	LB+Ap+B ₂	3,1	3,6	4,6	4,1

* Агаризований L-бульйон, що містить 100 мкг/мл ампіциліну; ** те саме з додаванням 50 мкг/мл рибофлавіну.



Положення клонованих фрагментів на карті рибофлавінового оперону. Відкриті рамки трансляції вказані згідно з даними Міронова та ін. [11]

інтерпретації результатів, оскільки до третьої біохімічної групи були віднесені рибофлавінові ауксотрофи *E. coli* з пошкодженою або 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазою, або 6,7-диметил-8-рибітиллюмазинсинтазою. Ці ауксотрофи здатні рости без рибофлавіну при наявності в середовищі ДМРЛ або 2,3-бутандіону. Тому для локалізації послідовності, що кодує 3, 4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазу, та ідентифікації мутантів, використаних у роботі, треба було отримати плазмиду, котра несли би цю частину оперону, але з делецією однієї чи другої ВРТ. Наявність одного *BglII*-сайта в послідовності ВРТ-3 дала можливість сконструювати плазмиду *pChBd67*, що відрізняється від *pChB6* відсутністю *VamHI-BglII*-фрагмента величиною 0,4 тис. п. н. (див. рисунок). Видалення цього фрагмента призводить до втрати 300 нуклеотидів 5'-кінцевої послідовності ВРТ-3 і не зачіпає структури ВРТ-4.

ДНК *pChB6* обробляли ендонуклеазами *VamHI* і *BglII*; виділений після електрофорезу фрагмент довжиною 1,4 тис. п. н. лігували з *pUC19*, лінеаризованою по сайту *VamHI*. Потім лігують сумішшю трансформували клітини мутанта *E. coli* з пошкодженою ГТФ-циклогідролазою. Всі проаналізовані трансформанти містили однотипні плаزمіди, що відрізнялись від *pChB6* меншою довжиною (4,1 тис. п. н.) і наявністю одного сайту *VamHI*. Одну з цих плазмід — *pChBd67* було використано для трансформації рибофлавінових ауксотрофів першої та третьої груп (див. таблицю). Отримані результати свідчать про те, що делеція 5'-кінцевого фрагмента ВРТ-3 довжиною 0,3 тис. п. н. веде до нездатності плазмиди трансформувати мутанти третьої групи до прототрофності за рибофлавіном і практично не впливає на ефективність трансформації мутантів з блокованою ГТФ-циклогідролазою. Цей факт є доказом того, що делеція 5'-кінцевої ділянки ВРТ-3 призводить до пошкодження структурного гена і втрати активності 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтази і не інактивує ГТФ-циклогідролазу.

Нещодавно було показано, що послідовність амінокислотних залишків, детермінована послідовністю нуклеотидів ВРТ-3 має 10 близькоспоріднених замін і 106 гомологічних положень з ГТФ-циклогідролазою *E. coli* [10]. Всі виявлені області гомології локалізовані в С-кінцевій частині бациллярного поліпептиду. Водночас N-кінцева частина бациллярного ферменту довжиною приблизно 200 амінокислотних залишків є несуттєвою для прояву ГТФ-циклогідролазної активності і характеризується високим ступенем гомології

з 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазою *E. coli* [2, 3]. В цій області локалізовано понад 80 гомологічних положень. Аналіз нуклеотидної послідовності оперону, здійснений Міроновим із співавт., не виявив в межах ВРТ-структур необхідних для приєднання рибосом [11]. N-амінокислотна послідовність ГТФ-циклогідролази, виділеної з *B. subtilis*, збігається з такою, що задається послідовністю нуклеотидів ВРТ-3. Молекулярна маса ферменту, визначена за допомогою електрофорезу в присутності додецилсульфату натрію, також відповідає молекулярній масі поліпептиду, що кодується ВРТ-3 [12]. Отже, ВРТ-3 рибофлавінового оперону кодує лише один білок, котрий має ділянки, споріднені до двох різних ферментів флавіногенезу *E. coli* [3, 10]. Таким чином, ВРТ-3 рибофлавінового оперону *B. subtilis* кодує біфункціональний білок, який каталізує розщеплення ГТФ до 2, 5, 6-триамінопіримідинрибозо-5'-фосфату і утворення 3, 4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфату з рибулозо-5-фосфату. Активність 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтази детермінується 5'-кінцевою частиною структурного гена і є функцією N-кінцевої частини білка.

Відомо, що біосинтез рибофлавіну включає не менше шести реакцій, які каталізуються відповідними ферментами і, за винятком другої та третьої реакцій, є універсальним для всіх вивчених мікроорганізмів [13]. Локалізація ділянки, що детермінує активність 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтази в межах ВРТ-3, дає можливість пояснити невідповідність кількості структурних генів в складі рибофлавінового оперону бацил до кількості етапів біосинтезу цього вітаміну.

Н. И. Борецкая, О. Е. Люта-Тегливец, А. Я. Вороновский, Ю. Р. Борецкий, Г. М. Шавловский

Картирование участка рибофлавинового оперона *Bacillus subtilis*, детерминирующего активность 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазы

Резюме

С помощью ауксотрофных по рибофлавину штаммов *Escherichia coli* и рекомбинантных плазмид проведен комплементационный анализ рибофлавинового оперона *B. subtilis*. Показано, что ОРФ-3 рибофлавинового оперона *B. subtilis* кодирует бифункциональный белок, катализирующий расщепление ГТФ до 2,5-диамино-4-окси-6-рибозиламинопириимидин-5'-фосфата и образование 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфата из рибулозо-5-фосфата.

N.I. Boretska, O.Ye. Liauta-Teglivets, A.Y. Voronovsky, J.R. Boretsky, G.M. Shavlovsky

Mapping of *Bacillus subtilis* riboflavin operon fragment coding for 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase

Summary

Complementation analysis of *Bacillus subtilis* riboflavin operon was carried out by means of *Escherichia coli* riboflavin deficient strains and recombinant plasmids. It was found that ORF-3 of *B. subtilis* riboflavin operon encodes for a bifunctional enzyme. It catalyses formation of both 2,5-diamino-4-hydroxy-6-ribosylamino-pyrimidine-5'-phosphate from GTP and 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate from ribulose-5-phosphate.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Міронов В. Н., Краев А. С., Чернов Б. К. и др. Гены биосинтеза рибофлавіна *Bacillus subtilis* — полная первичная структура и модель организации // Докл. АН СССР.— 1989.—305, № 2.—С. 482—487.
2. Борецкий Ю. Р., Дробинская И. Е., Батчикова Н. В. и др. Субклонирование и исследование гена ГТФ-циклогидролазы *Bacillus subtilis* // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.—1991.—№ 7.—С. 22—25.
3. Richter G., Volk R., Krieger C. et al. Biosynthesis of riboflavin: cloning, sequencing, and expression of the gene coding for 3, 4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase of

- Escherichia coli* // J. Bacteriol.—1992.—174, N 12.—Р. 4050—4056.
4. Бандрин С. В., Рабинович П. М., Степанов А. И. Три группы сцепления генов биосинтеза рибофлавина *Escherichia coli* // Генетика.—1983.—19, N 9.—С. 1419—1425.
 5. Шавловский Г. М., Тесляр Г. Е., Струговицкова Л. П. Изучение регуляции флавиногеназа у рибофлавинзависимых мутантов *E. coli* // Микробиология.—1982.—56, № 6.—С. 986—992.
 6. Маннатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—479 с.
 7. O'Kane D. J., Karle V. A., Lee J. Purification of lumazine proteins from *Photobacterium leiognathy* and *P. phosphoreum*: Bioluminescence properties // Biochemistry.—1985.—24, N 6.—Р. 1461—1467.
 8. O'Kane D. J., Woodward B., Lee J. Borrowed proteins in bacteria bioluminescence // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1991.—188, N 5.—Р. 1100—1104.
 9. Bacher A., Mailander B. Biosynthesis of riboflavin in *Bacillus subtilis*: function and genetic control of riboflavinsynthase complex // J. Bacteriol.—1978.—134, N 2.—Р. 476—482.
 10. Richter G., Ritz H., Katzenmeier G. et al. Biosynthesis of riboflavin: cloning, sequencing, mapping, and expression of the gene coding for GTP-cyclohydrolase II in *E. coli* // Ibid.—1993.—175.—Р. 4045—4051.
 11. Миронов В. Н. Гены биосинтеза рибофлавина *Bacillus subtilis*, полная нуклеотидная последовательность и оперонная организация: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.—М.: ИМБ АН ССР, 1989.—20 с.
 12. Борецкий Ю. Р., Скоблов Ю. С., Ходова О. М., Рабинович П. М. Очистка и свойства ГТР-циклогидролазы *Bacillus subtilis* // Биохимия.—1992.—57, N 7.—С. 1021—1030.
 13. Шавловский Г. М., Логвиненко Е. М. Сверхсинтез флавинов у микроорганизмов и его молекулярные механизмы // Прикл. биохимия и микробиология.—1988.—24, № 4.—С. 435—437.