УДК 577.152.2:575.116.4

© 2012

А. С. Кочевенко, А. Р. Ферні

Клонування та картування гена, що кодує нову позамітохондріальну ізоформу амінотрансферази культурного томата, задіяну в деградації амінокислот з розгалуженим ланцюгом

(Представлено академіком НАН України Ю. Ю. Глебою)

Ідентифіковано новий ген томата (BCAT7), що кодує нову ізоформу амінотрансфераз, задіяних у метаболізмі амінокислот з розгалуженим ланцюгом. Ген було картовано в геномному регіоні між маркерами TG71 і TG528 на хромосомі 1. Шляхом RACE-PCR встановлено повнорозмірну кодуючу нуклеотидну послідовність цього гена. Вивчено його експресію в різних типах тканин томата та визначено субклітинну локалізацію протеїну, що ним кодується.

В рослинних та тваринних організмах амінокислоти з розгалуженим ланцюгом (BCAA) лейцин, валін та ізолейцин виконують важливі регуляторні та структурні функції [1, 2]. Однак за певних умов, як то порушення процесу деградації, високий рівень біосинтезу або швидкий кругообіг білків, концентрація BCAA та їх α-кетокислотних похідних може підвищуватися у рази та сягати токсичного рівня. Катаболізм BCAA є важливим механізмом детоксифікації клітин, він забезпечує підтримання запасу цих амінокислот на певному рівні, необхідному для біосинтезу білків.

Як було встановлено в багатьох дослідженнях, процес біосинтезу BCAA відбувається в хлоропластах [3, 4], тоді як щодо локалізації процесу деградації BCAA існують суперечливі повідомлення. Дослідження, проведені в декількох лабораторіях, переконливо показали, що цілий ряд ферментів, задіяних у деградації BCAA, локалізовано в мітохондріях; подальший аналіз їх ферментативної активності та субстратної специфічності довів, що мітохондрії дійсно здатні катаболізувати BCAA [5, 6]. З іншого боку, відомо, що альфа-кетокислоти, які формуються внаслідок реакції трансамінації BCAA, можуть бути катаболізовані в пероксисомах рослин до 2-метил-пропаноїл-КоА [7, 8]. Також було виявлено, що мутація гена *CHY1* у *Arabidopsis*, який кодує пероксисомальний фермент 3-гідроксиізобутирил-КоА гідролазу, призводить до порушення катаболізму валіну [9]. Таким чином, базуючись на сучасних літературних даних, цілком правомірно припустити, що у рослин можуть існувати обидва шляхи (мітохондріальний та пероксисомальний) катаболізму BCAA або проміжні продукти пероксисомального шляху можуть бути в подальшому метаболізовані в мітохондріях.

Амінотрансферази амінокислот з розгалуженим ланцюгом (BCATs) є ключовим класом ферментів, що задіяні не тільки в біосинтезі BCAA, але і в їх деградації. Оскільки накопичення BCAA у надмірних концентраціях є токсичним, то BCATs відіграють певну роль у детоксифікації клітин. У ході попередніх досліджень нами було клоновано і картовано понад 30 генів, що кодують ферменти, задіяні в метаболізмі амінокислот з розгалуженим ланцюгом в культурному томаті. Було також встановлено, що у *Solanum lycopersicum* BCATs кодуються невеликою родиною генів. Шість членів цієї родини ідентифіковано і локалізова-

но на хромосомній карті томата за допомогою методу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів [10]. Метою ж проведеного дослідження було клонування, картування та характеристика гена *BCAT7*, що кодує нову ізоформу амінотрансфераз амінокислот з розгалуженим ланцюгом у томата.

Клон cLEM-6-A9, що містив кДНК *BCAT7*, було ідентифіковано в загальнодоступній TIGR Tomato EST колекції. Для визначення нуклеотидної послідовності кДНК використовували автоматичний сиквенатор ABI PRISM® 310 (PE Applied Biosystems, Німеччина) та набір BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit. За результатами сиквенс-аналізу встановлено, що кДНК вставка має розмір 607 п. н. і містить усічену кодуючу послідовність гена *BCAT7*. Аналіз кластеру (SGN-U565 681) послідовностей, що відповідає гену *BCAT7* у базі даних SOL Genomics Network tomato EST database (http://solgenomics.net/index.pl; [11]), виявив, що відповідний кластер містить 24 гомологічних EST послідовностей, ізольованих в основному з насіння і незрілих зелених плодів.

Для встановлення повної кодуючої послідовності використовували метод полімеразної ланцюгової реакції з швидкою ампліфікацією кінців кДНК (RACE-PCR). 5′- та 3′-RACE виконували за допомогою набору реактивів Gene Racer Kit ("Invitrogen", Німеччина) згідно з протоколом виробника, використовуючи таку комбінацію геноспецифічного і універсального праймерів: GeneRacer 5′ і 5RaceReBCAT7, 3RaceFrBCAT7 і GeneRacer 3′ (табл. 1). Ампліфіковані продукти було клоновано у вектор pCR4Blunt-TOPO і сиквеновано. Визначена нуклеотидна послідовність кДНК *BCAT7* культурного томата містила кодуючу послідовність розміром 1674 п. н. і 5′-3′- нетрансльовані регіони 79 п. н. і 82 п. н. тощо (рис. 1). Білок, що кодується геном *BCAT7*, складається з 557 амінокислотних залишків і виявляє 14–16% ідентичності до амінокислотної послідовності амінотрансфераз BCAT1 *Arabidopsis thaliana* і BCAT1 та BCAT2 *Solanum lycopersicum*, що задіяні в катаболізмі амінокислот з розгалуженим ланцюгом.

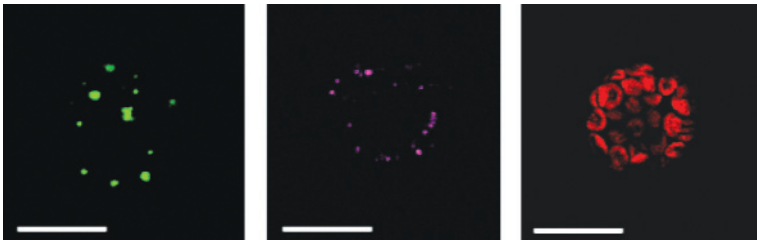
Для вивчення внутрішньоклітинної локалізації нової ізоформи нуклеотидну послідовність *BCAT7* без стоп-кодону було клоновано у вектор pK7FWG2, який сконструйовано для отримання GFP-мічених протеїнів [12]. Векторну конструкцію BCAT7-GFP було введено в мезофільні протопласти *N. tabacum* за допомогою методу ПЕГ-обумовленої трансформації [13]. За даними конфокальної мікроскопії, яку застосовували для візуалізації тимчасової експресії химерного протеїну BCAT7-GFP у протопластах тютюну, встановлено, що BCAT7-GFP не локалізовано ні в хлоропластах, ні в мітохондріях (рис. 2). Беручи до уваги форму і розмір субклітинних органел, в яких було виявлено сигнал флуоресценції, ми вважаємо, що найбільш вірогідним місцем локалізації BCAT7 протеїну є пероксисоми.

Таблиця 1. Праймери, які були використані в дослідженні

Назва праймеру	Нуклеотидна послідовність
GeneRacer 5′	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
5RaceReBCAT7	TAACTGGTGGGGGTCTTCCTGATT
GeneRacer 3′	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG
3RaceFrBCAT7	TCGAGTGTATGGCGGAAAGGTATT
FrqRTUBI3	GGTTAAGCTCGCTGTGTTGCA
ReqRTUBI3	CGAAGCCTCTGAACCTTTCCA
FrqRTBCAT7	AGAGGTCATCTTTGGTGCAGGAG
ReqRTBCAT7	GTCAAACCTGGCACACGTTGTT
FrGFPBCAT7	CACCATGGGAGAAGAAATTGAAGTGATA
ReGFPBCAT7	GTGCCCATACCAACTTATGAGAAGAGC

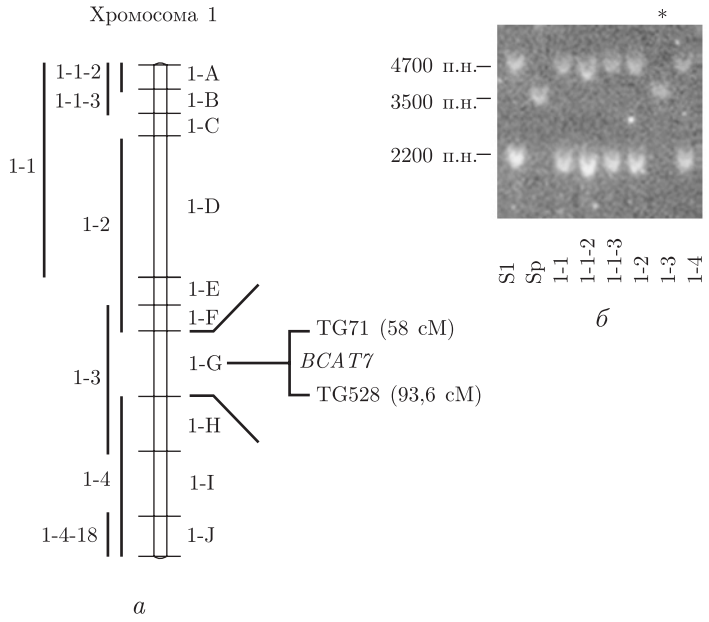
```
gaaaataacatttaggcgatacattcttgactctctcaaactcacaaaaccaagttgtgca
attcttgagtcttggata atg gagaagaaattgaagtgatacattcttggtctgcaccc
                  M  G  E  E  I  E  V  I  H  S  W  S  A  P
aggtccctaagcaccagcctcatgtactcttttgcccagagaaatgacatcgaagttctt
 R  S  L  S  T  S  L  M  Y  S  F  A  Q  R  N  D  I  E  V  L
gatgaaccactgtatgcaaatttttttgcgagtcactggagtggatagaccttacaaggaa
 D  E  P  L  Y  A  N  F  L  R  V  T  G  V  D  R  P  Y  K  E
aaacttcgatccgaactggagaatgatggaaataaggtggtgaaagaggtcatctttggt
 K  L  R  S  E  L  E  N  D  G  N  K  V  V  K  E  V  I  F  G
gcaggagtaaagaagtatcgctactgtaagcatatagccaaacaacgtgtgccaggtttg
 A  G  V  K  K  Y  R  Y  C  K  H  I  A  K  Q  R  V  P  G  L
acaaatgaattgatgaaaagaggaaagcacttcatactgataaggaatccccttgatatc
 T  N  E  L  M  K  R  G  K  H  F  I  L  I  R  N  P  L  D  I
ttgccatcctttgacaagattgtacctccatcatttcttgagctggggttggcagagctg
 L  P  S  F  D  K  I  V  P  P  S  F  L  E  L  G  L  A  E  L
gtctccgtatacagtgagttatctgaatcaggaagacccccaccagttattgatgctgca
 V  S  V  Y  S  E  L  S  E  S  G  R  P  P  P  V  I  D  A  A
gatcttcgtgaaaatcccgaggcgaccctgcgtggcctttgtgaagaccttgacattcca
 D  L  R  E  N  P  E  A  T  L  R  G  L  C  E  D  L  D  I  P
tttcaagattcaatgctcaggtgggaagctggaccgaaaccatttgatggcatctgggca
 F  Q  D  S  M  L  R  W  E  A  G  P  K  P  F  D  G  I  W  A
ccatggtggtataaaagtgtgcataaatcaacaggttttgctccagcaaagaaataccct
 P  W  W  Y  K  S  V  H  K  S  T  G  F  A  P  A  K  K  Y  P
acgccatttcccacatcattgtatgatttgttggagcaaagcctacccttttacaacatg
 T  P  F  P  T  S  L  Y  D  L  L  E  Q  S  L  P  F  Y  N  M
cttaaacgtcatgctagacgatcttcttctaattacctgaactcaactttacctcatcct
 L  K  R  H  A  R  R  S  S  S  N  Y  L  N  S  T  L  P  H  P
agtcttcctgttcctgctaatgagaagctgcttgcatgggttggtgatgagattgtgcct
 S  L  P  V  P  A  N  E  K  L  L  A  W  V  G  D  E  I  V  P
cgtgagactgcgaaggtttcagtatttgattcaattgtccaaggtggcgatggagtttgg
 R  E  T  A  K  V  S  V  F  D  S  I  V  Q  G  G  D  G  V  W
gagggacttcgagtgtatggcggaaaggtatttaagcttgaggagcatttagataggatg
 E  G  L  R  V  Y  G  G  K  V  F  K  L  E  E  H  L  D  R  M
ttcgactctgcgaaagcactagctttcagcaatgtaccaactcgcgaagaggtcaaagaa
 F  D  S  A  K  A  L  A  F  S  N  V  P  T  R  E  E  V  K  E
gctattttcaggactcttttaagaaatggaatgtttgataatgcacatatccgactaact
 A  I  F  R  T  L  L  R  N  G  M  F  D  N  A  H  I  R  L  T
ttgacacgtggtaaaaaggtaacctcaggaatgagcccagcattcaatcgttatggatgt
 L  T  R  G  K  K  V  T  S  G  M  S  P  A  F  N  R  Y  G  C
actttaatagttcttgctgaatggaaacctccagtatatgacaatgaaaagggcttaatg
 T  L  I  V  L  A  E  W  K  P  P  V  Y  D  N  E  K  G  L  M
ttagtgacggcaaccactcgtcgtaattcaccaaataatttggattcaaagattcaccat
 L  V  T  A  T  T  R  R  N  S  P  N  N  L  D  S  K  I  H  H
aacaaccttctcaacaacattcttgcaaagatagaaggtaataatgctggggctgatgat
 N  N  L  L  N  N  I  L  A  K  I  E  G  N  N  A  G  A  D  D
gcaatcatgctcgataaagatggctatgtgtcagaaactaatgctacaaatatattcttg
 A  I  M  L  D  K  D  G  Y  V  S  E  T  N  A  T  N  I  F  L
gtgaagaaagggcgtgtggtgacacctcatgctgattattgccttcctggcataactaga
 V  K  K  G  R  V  V  T  P  H  A  D  Y  C  L  P  G  I  T  R
gcaacagtcatggagcttgtgctgaaggaaagtttagctttagaggagcgaagaattagc
 A  T  V  M  E  L  V  L  K  E  S  L  A  L  E  E  R  R  I  S
ttatcagaatttcacactgctgatgaggtgtggacaacaggaactatgggggagctgagc
 L  S  E  F  H  T  A  D  E  V  W  T  T  G  T  M  G  E  L  S
ccggttgtcaaaattgatggacgtatagttggtgatggtcgagtaggacctataactctg
 P  V  V  K  I  D  G  R  I  V  G  D  G  R  V  G  P  I  T  L
agattgcaaaatgcttacaagaatctctcaaaagattcaggagtgcccataccaacttat
 R  L  Q  N  A  Y  K  N  L  S  K  D  S  G  V  P  I  P  T  Y
gagaagagc taa atacgtagtttccaggtgtatcaaaacaacagagctggagaagggttg
 E  K  S  -
ttcttctatctagacaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

Рис. 1. Нуклеотидна послідовність кДНК *BCAT7* та виведена амінокислотна послідовність культурного томата *S. lycopersicum*



а *б* *в*

Рис. 2. Експресія химерного протеїну BCAT7-GFP у мезофільних протопластах тютюну. Флуоресцентні маркери: *а* — зелений флуоресцентний протеїн GFP; *б* — барвник MitoTracker; *в* — автофлуоресценція хлорофілу, GFPi MitoTracker. Масштаб — 19 мкм



а *б*

Рис. 3. Встановлення локалізації гена *BCAT7* на хромосомній карті культурного томата. *а* — локалізація на хромосомній карті; *б* — результати блотингу за Саузерном; IL1–1 – IL1–4 інтрогресивні лінії томата; Sl — *S. lycopersicum*; Sp — *S. pennellii*. Зірочкою відмічено лінію, що успадкувала даний ген від дикого виду *S. pennellii*

Виявлення факту екстрамітохондріальної локалізації нової ізоформи BCAT, ключового ферменту, задіяного в процесі деградації BCAA, свідчить на користь існування додаткового шляху катаболізму амінокислот з розгалуженим ланцюгом або деяких його етапів у пероксисомах, як було запропоновано раніше [7, 9, 14].

Для подальшого з'ясування функціональної ролі гена *BCAT7* у різних типах тканин томата було проведено аналіз профілю його експресії. Рівень експресії в листках, суцвіттях, зелених (10 д. п. а.) та червоних (40 д. п. а.) плодах томата вивчали за допомогою методу qRT-PCR. Специфічні пари праймерів для генів *BCAT7* та убіквітину (*UBI3*), який використовували як внутрішній ампліфікаційний стандарт, були синтезовані за допомогою програми Primer Express (див. табл. 1). Виділення сумарної РНК, синтез одноланцюгової кДНК та RT-PCR аналіз проводили відповідно до раніше опублікованого протоколу [15]. Згідно з отриманими результатами, всі проаналізовані типи тканин мали відносно високий рівень експресії гена *BCAT7*. Однак кількість транскрипту *BCAT7* у незрілих плодах була нижчою, ніж у суцвіттях, листках і червоних стиглих плодах томата (табл. 2).

Ген *BCAT7* було картовано шляхом аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів у популяції інтрогресивних ліній томата, отриманих від схрещування культурного томата *S. lycopersicum* (сорту M82) з його диким родичем *S. pennellii* (LA 716), як детально описано раніше [9]. Сумарну ДНК гідролізували ендонуклеазою *Dra*I і гібридизували з фрагментом кДНК *BCAT7*, що був виділений із клону cLEM-6-A9 як продукт рестрикції ферментами *EcoR*I і *Xho*I. ДНК треки, що відповідали *S. lycopersicum* сорту M82 або інтрогресивним лініям, які містили *BCAT7* алель культурного томата, характеризувалися наявністю двох гібридизаційних смуг величиною 4,7 і 2,2 т. п. н., тоді як для ліній, що мали *S. pennellii* алель, була характерна наявність однієї гібридизаційної смуги розміром 3,5 т. п. н. За результатами Саузерн-блот-гібридизації встановлено, що ген *BCAT7* знаходиться на хромосомі 1 між маркерами TG71 і TG528 (рис. 3).

Порівняння даних локалізації гена *BCAT7* і кількісних метаболічних локусів (QTLs), що контролюють вміст BCAA [9], свідчить про те, що *BCAT7* за нормальних умов не впливає істотно на кількість амінокислот з розгалуженим ланцюгом у зрілих плодах томата. Це може бути обумовлено, наприклад, існуванням додаткового механізму на білковому рівні, який контролює ензиматичну активність протеїну BCAT7. Крім того, це, можливо, пов'язано з надлишком вуглеводів, який існує у тканинах плодів томата і може запобігати використанню BCAA як альтернативного джерела дихальних субстратів.

Таким чином, отримані результати свідчать про наявність у геномі томата гена *BCAT7*, що кодує нову ізоформу амінотрансфераз, задіяних у метаболізмі амінокислот з розгалуженим ланцюгом томата. Наведені дані щодо структури, хромосомної локалізації та специфічності експресії гена *BCAT7*. Виявлення позахлоропластної та позамітохондріальної субклітинної локалізації цього ферменту вказує на складну організацію процесу деградації BCAA, який потребує узгодженої взаємодії трьох різних клітинних компартментів.

Таблиця 2. Органоспецифічна експресія гена *BCAT7*

Тип тканини томата	Рівень експресії *BCAT7*, qRT-PCR (40-ΔCt)
Суцвіття	$36{,}85 \pm 0{,}08$
Листя	$35{,}48 \pm 0{,}14$
Зелені плоди	$34{,}04 \pm 0{,}07$
Червоні плоди	$35{,}46 \pm 0{,}09$

1. *Yoshizawa F.* Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo // Biochem. Biophys. Research Com. – 2004. – **313.** – P. 417–422.
2. *Binder S.* Branched-Chain Amino Acid Metabolism in Arabidopsis thaliana // The Arabidopsis Book. – 2010. – **8.** – doi:10.1199/tab.0137.
3. *Singhl B. K., Shaner D. L.* Biosynthesis of branched chain amino acids: from test tube to field // Plant Cell. – 1995. – **7.** – P. 935–944.
4. *Hagelstein P., Sieve B., Klein M. et al.* Leucine synthesis in chloroplasts: Leucine/isoleucine aminotransferase and valine aminotransferase are different enzymes in spinach chloroplasts // J. Plant Physiol. – 1997. – **150.** – P. 23–30.
5. *Anderson M. D., Che P., Song J. et al.* 3-Methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase is a component of the mitochondrial leucine catabolic pathway in plants // Plant Physiol. – 1998. – **118.** – P. 1127–1138.
6. *Schuster J., Binder S.* The mitochondrial branched-chain aminotransferase (AtBCAT-1) is capable to initiate degradation of leucine, isoleucine and valine in almost all tissues in Arabidopsis thaliana // Plant. Mol. Biol. – 2005. – **57.** – P. 241–254.
7. *Gerbling H., Gerhardt B.* Peroxisomal Degradation of branched-chain 2-oxo acids // Plant. Physiol. – 1989. – **91.** – P. 1387–1392.
8. *Reumann S., Ma C., Lemke S., Babujee L.* AraPerox. A Database of Putative Arabidopsis Proteins from Plant Peroxisomes // Ibid. – 2004. – **136.** – P. 2587–2608.
9. *Lange P. R., Eastmond P. J., Madagan K., Graham I. A.* An Arabidopsis mutant disrupted in valine catabolism is also compromised in peroxisomal fatty acid beta-oxidation // FEBS Lett. – 2004. – **571.** – P. 147–153.
10. *Кочевенко А. С., Ферні А. Р.* Картування генів томата, задіяних у метаболізмі амінокислот з розгалуженим ланцюгом // Доп. НАН України. – 2011. – № 7. – С. 156–160.
11. *Mueller L. A., Solow T. H., Taylor N. et al.* The SOL Genomics Network: a comparative resource for Solanaceae biology and beyond // Plant Physiol. – 2005. – **138.** – P. 1310–1317.
12. *Karimi M., Inze D., Depicker A.* GATEWAY(™) vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation // Trends Plant Sci. – 2002. – **7.** – P. 193–195.
13. *Paszkowski J., Shillito R. D., Saul M. et al.* Direct gene transfer to plants // EMBO J. – 1984. – **3.** – P. 2717–2722.
14. *Gerbling H., Gerhardt B.* Oxidative decarboxylation of branched-chain 2-oxo fatty acids by higher plant peroxisomes // Plant Physiol. – 1988. – **88.** – P. 13–15.
15. *Кочевенко А. С., Ферні А. Р.* Характеристика гена *IPMD-SSU1 Lycopersicon esculentum* та його роль у біосинтезі лейцину // Доп. НАН України. – 2011. – № 9. – С. 153–158.

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

Надійшло до редакції 20.01.2012

А. С. Кочевенко, А. Р. Ферни

Клонирование и картирование гена, кодирующего новую внемитохондриальную изоформу аминотрансферазы культурного томата, задействованную в деградации аминокислот с разветвленной цепью

Идентифицирован новый ген томата (BCAT7), кодирующий новую изоформу аминотрансфераз, задействованных в метаболизме аминокислот с разветвленной цепью. Ген был картирован в геномном регионе между маркерами TG71 и TG528 на хромосоме 1. Полноразмерная кодирующая нуклеотидная последовательность данного гена установлена с помощью RACE-PCR. Изучена экспрессия гена в разных типах тканей томата и определена субклеточная локализация кодируемого им протеина.

A. S. Kochevenko, A. R. Fernie

Cloning and mapping of the gene encoding a new extramitochondrial aminotransferase isoform of cultivated tomato which is involved in the degradation of branched chain amino acids

New tomato gene BCAT7 encoding a new branched chain amino acid aminotransferase isoform is identified. The gene is mapped on chromosome 1 between markers TG71 and TG528. Full-length CDS of the gene was determined by RACE-PCR. Gene expression and subcellular localization of the encoded protein are characterized.