

Національна Академія наук України
Відділення регуляторних систем клітини
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна

На правах рукопису

Протченко
Ольга Володимирівна

**ДОСЛІДЖЕННЯ ФЕРИРЕДУКТАЗНОЇ СИСТЕМИ
ДРІЖДЖІВ PICHIA GUILLIERMONDII**

03.00.04 - біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Львів - 1997

544.1



00761023 (J)

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі регуляції клітинного синтезу низькомолекулярних сполук Відділення регуляторних систем клітини Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України

Наукові керівники: доктор біологічних наук, професор ШАВЛОВСЬКИЙ Г.М.

кандидат біологічних наук
ФЕДОРОВИЧ Д.В.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
ТИМОЧКО М.Ф.

кандидат біологічних наук, доцент
ТРАЧ В.М.

Провідна організація - Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України (м. Київ)

Захист відбудеться "25" лютого 1997 року о "10" годині на засіданні Спеціалізованої Вченої Ради Д 04.13.01 у Відділенні регуляторних систем клітини Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України (290005, Львів-5, ул.Драгоманова 14/16). З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Відділення регуляторних систем клітини Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України.

Автореферат розісланий "24" січня 1997 року

Вчений секретар Спеціалізованої ради,
кандидат хімічних наук

Гончар М.В.

AB-36823

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність. В останні роки активно ведуться дослідження транспорту заліза в клітину та регуляції цього процесу у різних видів мікроорганізмів. Описано два основних механізми поглинання заліза. Один з них полягає у використанні сидерофорів - низькомолекулярних хелаторів заліза, котрі переводять Fe(III) у розчинну форму і забезпечують ним клітини. В іншому випадку залізо переноситься через мембрану специфічним транспортером у формі Fe(II). В обох випадках процес поглинання та акумуляції заліза проходить за участю фериредуктаз, ферментів, що відновлюють Fe(III) до Fe(II).

Серед дріжджів процес транспорту цього металу досліджувався у *Saccharomyces cerevisiae* [Lesuisse & Labbe, 1994], *Schizosaccharomyces pombe* [Roman et al., 1993], *Rhodotorula pilimanae* [Carrane et al., 1978]. Але особливий інтерес в цьому плані представляють флавіногенні види дріжджів, у яких біосинтез рибофлавіну регулюється залізом. У перспективних продуцентів вітаміну B₂ - дріжджів *Pichia guilliermondii* регуляція транспорту заліза та біосинтезу рибофлавіну (РФ) здійснюється за участю іонів заліза та продуктів генів негативного типу дії RIB80 та RIB81 [Шавловський и соавт., 1992, 1993]. Раніше було показано (Шавловський и соавт., 1988; Федорович и соавт., 1989), що залізо у цих дріжджів може поглинатися в процесах сидерофор- та цитрат-залежного транспорту. Одним з найважливіших в транспорті цього металу є етап відновлення Fe(III) до Fe(II). Властивості, регуляція активності та синтезу фериредуктавної системи у *P.guilliermondii* не досліджені.

Мета і завдання досліджень. Метою роботи було дослідження функціонування і регуляції фериредуктавної системи, у *P.guilliermondii* та деяких інших видів дріжджів.

Для виконання роботи необхідно було:

- дослідити зв'язок між транспортом заліза та фериредуктавною активністю клітин;
- вивчити властивості фериредуктази *in vitro* у *P.guilliermondii* та інших видів дріжджів;
- дослідити регуляцію активності та синтезу фериредуктази в клітинах дріжджів.
- селекціонувати мутанти дріжджів *P.guilliermondii* з порушеною регуляцією синтезу фериредуктази та провести їх генетичний аналіз;

Наукова новизна. Досліджено роль фериредуктазної системи в транспорті заліза клітинами дріжджів, її властивості, регуляцію активності та синтезу.

Вперше виявлено стимулюючий вплив іонів міді на фериредуктазну систему у *P.guilliermondii* і деяких інших видів дріжджів.

Встановлено, що Fe(II) репресує синтез фериредуктази у *P.guilliermondii*. Показано, що гени негативного типу дії RIB80 та RIB81, включені в контроль біосинтезу рибофлавіну, приймають участь і в регуляції синтезу фериредуктази. Виявлено новий ген негативного типу дії HIT (high iron transport), котрий приймає участь в регуляції процесу транспорту заліза в клітину та біосинтезу РФ.

Практичне значення. Запропоновано метод виділення мутантів *P.guilliermondii*, здатних до надсинтезу рибофлавіну, використовуючи як селективну ознаку здатність відновлювати трифенілтетраозлий хлорид (ТТХ). Селекціоновані hit-мутанти можуть бути застосовані для подальшого конструювання штамів-надсинтетиків вітаміну В₂. Завдяки високій редуктазній активності клітин hit-мутантів, можливим є осадження відновленої форми вітаміну В₂ з культурального середовища інших штамів-надсинтетиків РФ.

На захист виносяться наступні положення:

- відновлення Fe(III) до Fe(II) за участю фериредуктаз є необхідним етапом в транспорті ^{55}Fe у *P.guilliermondii* та інших видів дріжджів.

- іони міді є необхідними для забезпечення функціонування фериредуктазної системи у дріжджів

- гени RIB80, RIB81 та HIT негативного типу дії, включені в контроль біосинтезу РФ, приймають участь і в регуляції фериредуктазної активності у *P.guilliermondii*.

- регуляція синтезу фериредуктази у *P.guilliermondii* здійснюється за участю іонів заліза.

Апробація роботи. Апробація роботи відбулася у відділі регуляції клітинного синтезу низькомолекулярних сполук Відділення регуляторних систем клітини Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України. Основні положення дисертації доповідалися на 15-му Міжнародному спеціалізованому симпозиумі по дріжджах (Рига, 1991), на засіданні Львівського відділення Українського мікробіологічного товариства (Львів, 1991), на IV Українському біохімічному з'їзді (Одеса, 1993), на Всеукраїнській конференції з фізіології і біохімії тварин (Львів, 1995), на конференціях молодих вчених у Відділенні регуляторних систем клітини Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України.

Публікації. Основні результати досліджень викладені в 9 друкованих працях.

Об'єм і структура роботи. Робота надрукована на 139 сторінках, включаючи ілюстративний матеріал. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, 4 розділів експериментальних досліджень, висновків, списку літератури. Робота ілюстрована 29 таблицями та 19 рисунками. Бібліографічний покажчик містить 168 джерел, в тому числі 146 - іновемних авторів.

ЛІБ ім. В. Стефаника
АН України

ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. Наводяться дані про основні закономірності поглинання заліза та регуляції цього процесу у різних видів мікроорганізмів. Висвітлена роль фериредуктаз, їх біохімічні властивості, особливості регуляції активності та синтезу у різних видів бактерій, дріжджів, грибів.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Матеріали і методи. В роботі використовували наступні штами дріжджів: *Pichia guilliermondii* ATCC 9058 - штам дикого типу, *Pichia guilliermondii* генетичної лінії L2, L4 [Сибирный и соавт., 1977], мутанти *P.guilliermondii* з порушеною регуляцією флавіногенезу *rib80* (*rib80,metX,MAT⁻*) [Шавловский и соавт., 1992], *rib81* (*rib81,hisX,MAT⁻*) [Шавловский и соавт., 1993], *rib83*, *rib84* [Шавловский и соавт., 1989]; УФ-залежні мутанти RA24 (*rib1,ade2,MAT⁻*), RG104 (*rib1,hisX,MAT⁺*) [Логвиненко и соавт., 1972]. Використовували також дріжджі *Hansenula polymorpha* ML3, *Debaryomyces hansenii* rassa Fabrii ВКМ Y-102, *Candida boidinii* T2A-1, *Candida crusei* EL-1, *Candida famata* 0-3, *Pichia pinus* F4, *Rhodotorula pilimanae* ВКМ 4-1977, *Schwanniomyces occidentalis* 1758, *Saccharomyces cerevisiae* S288.

Дріжджі культивували на середовищі Беркгольдера [Burkholder, 1943]. Використовували середовища з високим 0,2 мкг/мл або низьким 0,01 мкг/мл вмістом заліза, яке додавали у формі солі Мора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \times \text{FeSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$. Від іонів металів середовище очищали 8-оксихіноліном. [Warring & Warkman, 1943]. Дріжджі вирощували при 30°C на круговій качалці (200об/хв) або в бутлях (20л) з барботажем.

Мутагенез дріжджів проводили за допомогою УФ-променів. Отримання гібридів та принципи гібридологічного аналізу описані в роботі [Шавловский и соавт., 1979].

Біомасу дріжджів визначали турбідиметричним методом на фотоелектроколориметрі ФЕК-56М. Вміст флавінів в культуральній рідині визначали флюориметрично на апараті ЕФ-3М, [Bessy et al., 1949]. Концентрацію білка в безклітинних екстрактах і препаратах фериредуктази визначали за методом [Lowry et al., 1951]. Вихід білка з колонок реєстрували спектрофотометрично за поглинанням при 280 нм.

Концентрацію негемінового заліза в клітинах дріжджів визначали за методом [Kurup & Brodie, 1967].

Визначення швидкості поглинання заліза інтактними клітинами проводили за методом [Шавловский и соавт., 1988], використовуючи циклотронне $^{55}\text{FeCl}_3$ з питомою активністю 16×10^{11} Бк/Г в 0,5 N HCl (Ленінградське відділення В/О "Изотоп")

Комплекси заліза з сидерофорами отримували за методом [Wieb & Winkelmann, 1975]. Сидерофори виділяли з культуральної рідини залізодефіцитних культур мікроорганізмів: копроген з *Neurospora crassa* [Sivarama Sastry et al., 1962], родоторулеву кислоту з *Rhodotorula pilimanae* [Atkin et al., 1970], залізов'язуючий пептид з культуральної рідини *P.guilliermondii* (речовина X) [Федорович и соавт. 1992].

Фериредуктазну активність клітин дріжджів визначали за модифікованим нами методом [Lesuisse et al., 1987], використовуючи для зв'язування Fe(II) α, α' -дипіридил, оптичну густину визначали при 522 нм. Активність фериредуктази в безклітинних екстрактах визначали за методом [Straka & Emery, 1978]. Активність феріоксидази визначали за модифікованим нами методом [Osaki et al., 1967], використовуючи для зв'язування Fe(III) десферіоксамін В, оптичну густину визначали при 450 нм. За одиницю активності ферменту приймали його кількість, що забезпечує перетворення 1мкМ субстрату за 1 хв.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження фериредуктазної активності інтактних клітин P.guilliermondii.

Для з'ясування ролі редукції Fe(III) до Fe(II) в поглинанні заліза клітинами дріжджів, визначали швидкості відновлення заліза та поглинання ^{55}Fe з різних комплексів інтактними клітинами P.guilliermondii ATCC 9058. Найбільша фериредуктазна активність спостерігалась у випадку використання комплексів заліза з речовиною X (залізов'язуючим пептидом з культуральної рідини P.guilliermondii) та родоторулевою кислотою. Але швидкість відновлення Fe(III) до Fe(II) корелювала з швидкістю поглинання ^{55}Fe тільки при використанні природних для P.guilliermondii хелаторів заліза - цитрату та речовини X.

Таблиця 1

Швидкість відновлення Fe(III) до Fe(II) і поглинання ^{55}Fe з рівних комплексів інтактними клітинами P.guilliermondii ATCC 9058

Комплекс Fe(III)	Швидкість відновлення Fe(III), нмоль Fe/мг сухих клітин за хв	Відносна швидкість поглинання ^{55}Fe , %
Fe(III)-EDTA	0,87	100
Fe(III)-цитрат	4,15	725
Fe(III)-родоторулева к-та	8,02	255
Fe(III)-копроген	3,61	104
Fe(III)-десферіоксамін В	3,91	165
Fe(III)-речовина X	5,95	473

Відновлення заліза в комплексах з цитратом, речовиною X та EDTA вимагало джерела енергії (глюкози) і пригнічувалось інгібіторами клітинного метаболізму. азидом натрію, ціанідом калію та 2,4-динітрофенолом (88%, 63%, та 47% відповідно). N,N'-дициклогексилкарбодимід та фторид натрію знижували рівень відновлення

заліза клітинами вдвічі. В присутності глюкози швидкість відновлення Fe(III)-цитрату зростала в 2 рази, а Fe(III)-речовини X - в 3 рази.

Фериредуктазна активність клітин *P.guilliermondii* в логарифмічній фазі росту була втричі вища, ніж в стаціонарній.

Клітини *P. guilliermondii*, а також інших видів дріжджів виділяють в оточуюче середовище речовину (речовини?) з редуруючими властивостями. Найбільш активно відновлювала залізо культуральна рідина видів *P.guilliermondii*, *S. famata*, *S. occidentalis*.

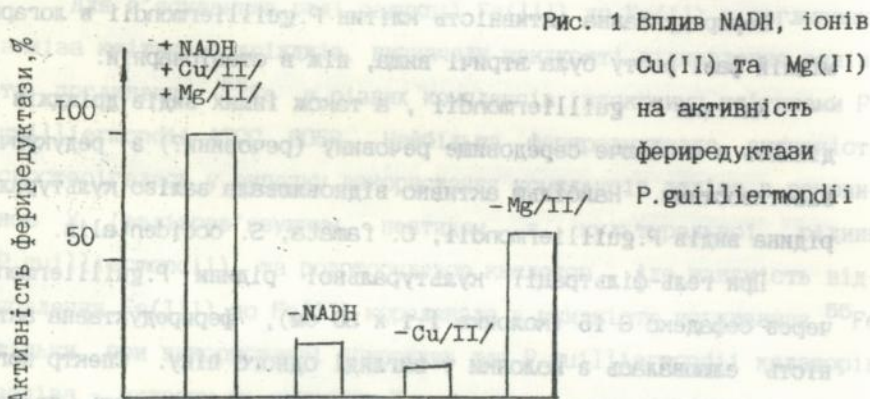
При гелі-фільтрації культуральної рідини *P.guilliermondii* через сефадекс G-15 (колонка 1,1 x 30 см), фериредуктазна активність елюувалась з колонки у вигляді одного піку. Спектр поглинання найбільш активних фракцій ($E_{max} = 265$ нм) свідчить, що це не NAD-вмісна сполука.

Відновлення заліза у *P.guilliermondii* так само, як у *S.cerevisiae* [Lesuisse et al., 1987], обумовлено дією двох факторів: фериредуктазною активністю інтактних клітин та екскрецією низькомолекулярної сполуки (сполук), що, очевидно, полегшує солюбілізацію заліза [Lesuisse et al., 1992].

Дослідження активності фериредуктази в безклітинних екстрактах дріжджів *P.guilliermondii*.

Активність фериредуктази в безклітинних екстрактах *P.guilliermondii*, визначена за методиками, описаними в літературі [Straka & Emeri, 1979; Lesuisse et al., 1990; Ernst & Winkelmann, 1977 та ін.], була низькою. При дослідженні впливу іонів двовалентних металів на активність фериредуктази в безклітинних екстрактах *P.guilliermondii* виявилось, що для прояву фериредуктазної активності у *P.guilliermondii* необхідні іони Mg(II) і Cu(II) (рис. 1). Як донор електронів в фериредуктазній реакції використовували NADH. Заміна його на NADPH викликала незначне (10%) зни-

ження активності. В присутності інших відновних агентів (відновленого глутатіону, сукцинату, цистеїну) фериредуктазна активність не проявлялась.



Для отримання частково очищених препаратів фериредуктази використовували клітини дріжджів *P.guilliermondii* ATCC 9058, вирощені протягом 48 годин в середовищі з низьким вмістом заліза (0,01 мкг/мл).

При гель-фільтрації безклітинного екстракту через сефадекс G-200 (колона 1,1 x 100 см), зрівноважений 0,01 М тріс-НCl буфером, рН 7,0 з 0,05 М MgCl₂ та 0,1 М гліцирином, фериредуктаза відділялась від основної маси високомолекулярних білків, але в цих умовах відбувалась значна втрата фериредуктазної активності. Виявлено два піки редукції заліза: в високомолекулярній та низькомолекулярній фракціях.

При фракціонуванні сульфатом амонію безклітинних екстрактів фериредуктаза висолить при 40 - 60% насичення. На отриманих таким шляхом препаратах проводили дослідження впливу концентрації іонів Cu(II) на активність фериредуктази. Виявлено, що максимальна активність фериредуктази спостерігається при концентрації іонів міді $0,5 \times 10^{-4}$ М. Цікаво було дослідити, як впливають іони цього

металу на фериредуктазну активність інтактних клітин, а також на швидкість поглинання заліза. Іони цього металу стимулюють відновлення заліза не тільки *in vitro*, але і *in vivo* (табл. 2). При дослідженні активності фериредуктази в безклітинних екстрактах деяких видів дріжджів, виявлено, що додавання іонів Cu (II) до інкубаційної рідини підвищує фериредуктазну активність. Особливо це характерно для *D.kloeckeri*, *C.famata*, *C.crusei*.

Таблиця 2

Вплив іонів міді на швидкість поглинання заліза з комплексу ^{55}Fe -ЕДТА та фериредуктазну активність клітин *P.guilliermondii* 9058, вирощених при високому (0,2 мкг/мл) та низькому (0,01 мкг/мл) вмісті заліза в середовищі.

Концентрація Cu(II)	Вміст Fe в середовищі, мкг/мл	Фериредуктазна активність інтактних клітин, нмоль Fe/мг сухих клітин за хв	Початкова швидкість поглинання ^{55}Fe , %
-	0,2	0,44	100
10^{-4} М	-	1,42	251
-	0,01	1,25	3631
10^{-4} М	-	4,92	6311

При дослідженні впливу інгібіторів клітинного метаболізму на активність фериредуктази *P.guilliermondii* виявлено, що помітно інгібували цю ферментативу реакцію сполуки, що зв'язують SH-групи - п-хлормеркурбензоат та оцтовокисла ртуть. Значно пригнічував активність фериредуктази інгібітор мідьзалежних ферментів - дитилдитіокарбамат натрію. Азид натрію, 2,4-динітрофенол, N,N'-дициклогексилкарбодимід не впливали істотно на активність фериредуктази. Кисень слабо інгібував цей фермент. В анаеробних умовах фериредуктазна активність зростала на 24%.

Для дослідження субстратної специфічності фериредуктази

P.guilliermondii використовували різні комплекси заліза. Виявлено, що найкраще процес редукції Fe(III) в Fe(II) відбувається у випадку використання комплексів Fe(III) з цитратом, речовиною X (залізов'язувачий пептид з культуральної рідини *P.guilliermondii*) та ЕДТА.

Недавно в літературі було висловлено припущення [Askwith et al., 1994], що в транспорті заліза у *S.cerevisiae* приймає участь мідьвмісна феріоксидаза, але активність цього ферменту не визначали. Дослідження феріоксидазної активності у *P.guilliermondii* проводили в препаратах, отриманих шляхом висолювання сульфатом амонію (30-70% насичення) з безклітинних екстрактів. Для проявлення реакції були необхідні іони міді, але не NAD. Таким чином, це не є зворотня реакція. При гель-фільтрації препарату феріоксидази через сефадекс G-200 активність фериредуктази та феріоксидази виявлено в тих самих фракціях.

Можливо, фериредуктаза та феріоксидаза у *P.guilliermondii*, так само як у *S.cerevisiae* [Askwith et al., 1996], є компонентами єдиної окисно-відновної Fe-транспортної системи, що забезпечує спряження процесів транспорту, відновлення і окислення іонів Fe та Cu.

Селекція та дослідження властивостей мутантів з підвищеною активністю фериредуктазної системи у *P.guilliermondii*.

Для виділення мутантів з підвищеними відновними властивостями клітин було використано трифенілтетразолій хлорид (ТТХ), який при відновленні утворює речовину червоного кольору - трифенілформазан (ТФФ). Мутанти отримували з РФ-залежних штамів *P.guilliermondii* RA24 та RG104.

Селекціоновані штами належали до однієї комплементарної групи. В порівнянні з вихідним штамом RG-104, мутанти активніше відновлювали ТТХ, метиленовий синій, феріціанід та РФ (в 30-60

разів), мали вищий рівень транспорту ^{55}Fe (в 30-70 разів), фериредуктазну активність клітин (10 -50 разів) та загальний вміст негемінового заліза в клітинах (2-3 рази). Прототрофні по рибофлавіну (РФ) мутанти синтезували на порядок більше РФ, ніж штам дикого типу L2 (табл. 3).

Таблиця 3

Фенотипічні ознаки hit-мутантів та вихідного штаму.

	<i>P.guilliermondii</i> RG-104,	hit
Відновлення ТТХ, мкгТФФ/ мг сухих клітин	1,1	42,4
Швидкість відновлення Fe(III), нмоль Fe/мг сухих клітин за хв	0,42	14,35
Відносна швидкість поглинання ^{55}Fe , %	100	6413
Вміст негемінового Fe в клі- тинах, мкг Fe/мг сухих клітин	58,6	121,3
Продуктивність флавіногенезу, мкг РФ/мг сухих клітин	0,2 (L2)	2,2

hit мутанти нагадували мутант *MAC1^{up1}* *S. cerevisiae* [Jungmann et al.,1993], котрий відзначається високою редуктазною активністю та гіперчутливістю до іонів міді. При концентрації іонів міді в середовищі 5 - 25 мкМ ріст hit мутантів, порівняно з штамом дикого типу, частково пригнічувався, а при концентрації 50 мкМ повністю припинявся (рис.2). В той же час, клітини цього штаму, вирощені в середовищі з концентрацією іонів міді 5 - 25 мкМ, відновлювали Fe(III) з більшою швидкістю, ніж ті, котрі росли при оптимальному забезпеченні іонами міді (0,1 мкМ).

Для того, щоб дослідити природу мутації hit, було проведено три реципрокні скрещування hit-мутантів та штамів

P.guilliermondii дикого типу. В результаті нами отримано ізоген-

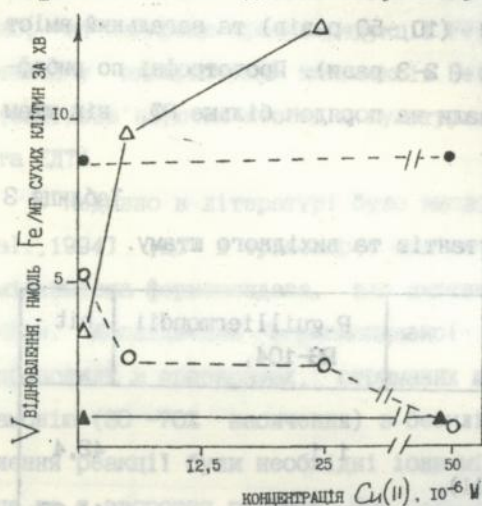


Рис.2 Вплив іонів міді на ріст [\circ] та фериредуктазну активність [Δ] hit-мутанта [$\circ\Delta$] та штаму дикого типу *P.guilliermondii* ATCC 9058 [$\bullet\Delta$].

ні, або близькі до ізогенних штами. Мейотичне розщеплення серед ауксотрофних сегрегантів, отриманих з гібридів hit x L4 за ознакою " відновлення ТТХ " становило 1:1. Сегреганти, відібрані за червоним забарвленням колоній на середовищі з ТТХ, при вирощуванні на середовищі з високою концентрацією заліза (0,2 мкг/мл) синтезували більші кількості РФ, порівняно з диким типом (від 1,3 до 2,2 мкг РФ/мг сухих клітин). Фериредуктазна активність клітин та швидкість поглинання у цих штамів були в 5 - 10 разів вищі, порівняно з штамом дикого типу. Друга група сегрегантів, котрі нездатні відновлювати ТТХ, за фериредуктазною активністю клітин, швидкістю поглинання ^{55}Fe та продуктивністю флавіногенезу не відрізнялась від штаму дикого типу.

Для того, щоб одержати додаткові докази про участь гену HIT в регуляції транспорту заліза в клітину та в регуляції флавіногенезу, за допомогою нітрозогуанідину з штамів hit-s-16 та hit-s-9 було отримано 135 штамів, котрі не виявляли високої редуктазної активності на середовищі з ТТХ. Для в'ясування генетичної природи

ревертантів, їх схрещували з вихідними hit мутантами протилежного типу спаровання. У трьох гібридів, редуктазна активність по відношенню до ТТХ, швидкості відновлення Fe(III) та поглинання ^{55}Fe , а також продуктивність флавіногенезу були на рівні дикого типу. Отже, повернення до фенотипу дикого типу у цих трьох штамів обумовлене мутацією в гені hit. Таким чином, наші дослідження вказують, що мутація hit обумовлена пошкодженням одного гену, локалізованого в ядрі.

Оскільки за фенотипічними ознаками hit-мутанти схожі на мутантів з порушеною регуляцією флавіногенезу rib80 та rib81 [Шавловский и соавт., 1992, 1993], котрим також притаманні надсинтез РФ та висока швидкість поглинання ^{55}Fe , було проведено комплементарційний аналіз hit мутантів на наявність мутацій rib80 та rib81. Гібриди, отримані схрещуванням регуляторних мутантів rib80 або rib81 та мутантів hit, не відрізнялись від дикого типу ні за фериредуктазною активністю, ні за швидкістю поглинання заліза, ні за продуктивністю флавіногенезу. Тобто, мутація hit не обумовлена пошкодженням генів RIB80 або RIB81.

Таким чином, отримані нами дані свідчать, що крім RIB80 та RIB81, у *P.guilliermondii* ідентифіковано ще один ген негативного типу дії HIT, котрий приймає участь в регуляції біосинтезу РФ та транспорту Fe в клітину.

Дослідження регуляції синтезу фериредуктази у *P.guilliermondii* та інших видів дріжджів.

Проведено дослідження здатності відновлювати Fe(III) до Fe(II) в комплексах з цитратом, речовиною X та ЕДТА клітин різних видів флавіногенних (*P.guilliermondii*, *C. famata*, *D. kloeckeri*) та нефлавіногенних дріжджів (*H. polymorpha*, *C. boidinii*, *C. crusei*, *P. pinus*), вирощених при високому (0,2 мкг/мл) і низькому (0,01 мкг/мл) вмісті заліза в середовищі (табл.4).

Таблиця 4

Продуктивність флавіногенезу та швидкість відновлення Fe(III) в комплексах з цитратом [1], речовиною X [2] та ЕДТА [3] інтактних клітин різних видів дріжджів, вирощених в середовищах з високим (0,2 мкг/мл) та низьким (0,01 мкг/мл) вмістом заліза

Вид	Вміст заліза в середовищі, мкг/мл	Продуктивність флавіногенезу, мкг РФ/мг сухих клітин	Швидкість відновлення Fe(III), нмоль Fe/мг сухих клітин за хв.		
			1	2	3
P.guilliermondii	0,01	14,30	2,02	2,18	1,45
	0,2	0,40	1,61	1,21	0,81
P.pinus	0,01	0,30	1,09	2,1	1,05
	0,2	0,17	2,34	3,71	1,61
C.boidinii	0,01	0,13	4,92	4,19	4,03
	0,2	0,06	0,81	1,94	1,21
C.krusei	0,01	0,17	4,84	2,66	1,98
	0,2	0,06	4,11	2,17	1,05
H.polymorpha	0,01	0,15	0,97	1,05	0,89
	0,2	0,05	2,18	3,31	1,89
D.kloeckeri	0,01	32,80	1,25	2,83	0,81
	0,2	1,00	0,75	1,92	0,65
C.famata	0,01	17,80	2,50	4,67	1,29
	0,2	2,50	0,50	0,65	0,65

Вищою фериредуктазною активністю, порівняно з іншими дослідженими видами, відзначались клітини *C. boidinii* та *C. crusei* при вирощуванні на обох типах середовищ.

Дефіцит заліза в середовищі вирощування приводив до зростання швидкості відновлення Fe(III) у *C. boidinii*, *D. kloeckeri*, *C. famata*. У *P. pinus* та *H. polymorpha* в цих умовах, навпаки, спостерігалось зниження фериредуктазної активності.

Зростання активності відновлення Fe(III) до Fe(II) клітинами дріжджів за умов дефіциту заліза залежить від природи комплексу

Fe(III)-сидерофор. Для більшості досліджених видів це було характерним у випадку використання комплексу Fe(III)-речовина X (*P.guilliermondii*, *C.boidinii*, *D.kloeckeri*, *C. famata*).

Результати визначення фериредуктазної активності в безклітинних екстрактах досліджуваних видів дріжджів в основному узгоджуються з даними, отриманими на інтактних клітинах.

Для з'ясування механізму регуляції фериредуктазної активності при виникненні дефіциту заліза в клітинах *P.guilliermondii* вивчали вплив α, α' -дипіридилу, який утворює хелатні комплекси з Fe(II) та циклогексїмїду, інгібітора синтезу білку, на фериредуктазну активність інтактних клітин та в безклітинних екстрактах. Як видно з таблиці 5, дефіцит заліза, викликаний α, α' -дипіридилом, приводить до синтезу фериредуктази, а циклогексїмїд блокує цей процес.

Таблиця 5

Вплив α, α' -дипіридилу та циклогексїмїду на синтез фериредуктази у *P.guilliermondii*

Додано до інкубаційної рідини	Швидкість відновлення Fe інтактними клітинами,		Активність фериредуктази,	
	нмоль Fe/мг сухих клітин за хв	%	Е/мг білку $\times 10^{-3}$	%
Fe (0,4 мкг/мл)	0,8	100	36,3	100
α, α' -дипіридил (100 мкг/мл)	2,5	312	99,93	256
α, α' -дипіридил (100 мкг/мл) + циклогексїмїд (15 мкг/мл)	0,85	110	43,56	120

Як було зазначено вище, у *P.guilliermondii* деякі мутації, які регулюють біосинтез рибофлавіну, мають плейотропну дію і впливають також на процеси транспорту та акумуляції заліза клітиною (Шавловский и соавт., 1989, 1992, 1993). Мутанти з пошкодже-

ною регуляцією біосинтезу рибофлавіну негативного типу дії rib80, rib81, а також hit, для яких характерна висока швидкість поглинання ⁵⁵Fe та підвищений вміст цього металу в клітинах, відзначаються високою фериредуктазою активністю. При вирощуванні цих мутантів в умовах дефіциту заліза відбувається незначне додаткове зростання фериредуктазної активності. Як і у дикого типу

Таблиця 6
Продуктивність флавіногенезу та швидкість відновлення Fe(III) в комплексах з цитратом [1], речовиною X [2] та EDTA [3] інтактних клітин мутантів *P.guilliermondii* з пошкодженою регуляцією флавіногенезу, вирощених в середовищах з високим (0,2 мкг/мл) та низьким (0,01 мкг/мл) вмістом заліза

Штам	Вміст заліза в середовищі, мкг/мл	Продуктивність флавіногенезу мкг РФ/мг сухих клітин	Швидкість відновлення Fe(III), нмоль Fe/мг сухих клітин за хв.		
			1	2	3
<i>P.guilliermondii</i>	0,01	14,24	3,22	4,18	1,45
ATCC 9058	0,2	0,16	1,31	1,21	0,81
rib80 1018-32	0,01	14,74	10,10	5,03	2,45
	0,2	3,08	5,52	2,22	2,45
rib81 131-7	0,01	10,91	11,5	5,25	3,67
	0,2	8,97	3,04	4,15	2,26
rib8081	-	-	-	-	-
	0,2	-	16,21	-	-
hit 1-1	0,01	14,12	15,82	30,93	5,36
	0,2	1,45	9,64	27,03	3,98
rib83 LV 251	0,01	0,27	2,05	-	-
	0,2	0,27	1,40	-	-
rib84 LV 248	0,01	0,34	2,40	-	-
	0,2	0,09	1,30	-	-

- не визначали

P.guilliermondii, ступінь зростання активності залежав від природи комплексу заліза.

Поєднання двох мутацій негативного типу дії, *rib80* та *rib81*, в гаплоїдному геномі (Шавловський та співавт., 1994), приводило до підвищення в декілька раз фериредуктазної активності, порівняно з вихідними штамами.

У мутантів *rib83* та *rib84* [Шавловский и соавт., 1989] з пошкодженням регуляції біосинтезу РФ за позитивним типом дії (у яких біосинтез рибофлавіну не регулюється залізом), фериредуктазна активність клітин, вирощених в умовах оптимального для росту забезпечення залізом, була на рівні батьківського штаму.

Таким чином, висока швидкість транспорту заліза в клітину мутантів *rib80*, *rib81*, та *hit* обумовлена підвищеною фериредуктазною активністю.

Участь генів негативного типу дії *RIB80*, *RIB81*, *HIT* та іонів $Fe(II)$ в регуляції флавіногенезу та фериредуктазної активності вказує на існування спільних шляхів регуляції синтезу ферментів флавіногенезу та Fe -транспортної системи.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що клітини дріждів *P.guilliermondii* здатні відновлювати $Fe(III)$ до $Fe(II)$ в комплексах з природними та синтетичними хелаторами: цитратом, залізов'язуючим пептидом з культуральної рідини *P.guilliermondii* (речовина X), ЕДТА, а також родоторулевою кислотою, копрогеном, десферіоксаміном В. Іntenсивність відновлення $Fe(III)$ у *P.guilliermondii* залежить від енергозабезпеченості клітини, і найбільш активно відбувається в логарифмічній фазі росту. Виявлено кореляцію між швидкістю відновлення $Fe(III)$ та поглинанням ^{55}Fe у випадку використання природних для *P.guilliermondii* хелаторів заліза цитрату та залізов'язуючого пептиду з культуральної рідини цього виду дріждів.

2. Розроблено метод визначення активності фериредуктази *in vitro* з використанням α, α -дипіридилу. Показано, що ⁹¹⁸ проявлення активності цього ферменту у *P.guilliermondii* необхідні NADH, іони Mg(II), Cu(II). Вперше виявлено, що іони Cu(II), стимулюють відновлення заліза як *in vivo* так і *in vitro* у *P. guilliermondii* та деяких інших видів дріжджів.

3. Встановлено наявність феріоксидазної активності в частково очищених препаратах *P.guilliermondii*. Показано, що для проявлення активності ферменту необхідні іони Cu(II).

4. Виділено колекцію *hit*-мутантів (*high iron transport*) *P.guilliermondii*, які активно відновлюють Fe(III) та поглинають ⁵⁵Fe з різних комплексів. За допомогою комплементарного аналізу показано, що такий фенотип обумовлений однією ядерною моногенною мутацією.

5. Регуляторні гени біосинтезу РФ негативного типу дії RIB80, RIB81 та HIT приймають участь в регуляції фериредуктазної активності у *P.guilliermondii*.

6. Виявлено, що в умовах дефіциту заліза зростає фериредуктазна активність у флавіногенних дріжджів *S.occidentalis*, *D.kloeckeri*, *S.famata*, а також у нефлавіногенних дріжджів *C.boidinii*. Клітини *H. polymorpha* та *P.pinus* проявляють вищу фериредуктазну активність при вирощуванні в середовищі з високим вмістом заліза.

7. У *P.guilliermondii* при дефіциті заліза відбувається депресія синтезу фериредуктази.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Стенчук Н.Н., Протченко О.В. Рибофлавіназависимые мутанты дрожжей *Pichia guilliermondii* с пониженной потребностью в рибофлаvine. VII Съезд Украинского микробиологического общества. Тезисы докладов. - Киев-Черновцы - 1989 - Ч.1. - С. 30.

2. Стенчук Н.Н., Протченко О.В., Федорович Д.В., Шавловский Г.М. Мутанты *Pichia guilliermondii* с повышенной способностью к восстановлению ионов железа и рибофлавина // Генетика. - 1991. - Т.27, N 3. - С.561-564.
3. Fedorovich D.V., Protchenko O.V., Shavlovsky G.M. Iron transport and its regulation in *Pichia guilliermondii* // 15th International specialised symposium on yeast.- Riga.- 1991.-P.42.
4. Федорович Д.В., Шавловский Г.М., Протченко О.В. Ферриредуктазная активность клеток *Pichia guilliermondii* и особенности ее регуляции // Микробиология. - 1992. - Т.61, N 1. - С.11-17.
5. Протченко О.В., Стенчук М.М., Федорович Д.В., Шавловський Г.М. Селекція та деякі властивості мутантів дріжджів *Pichia guilliermondii* з підвищеною активністю ферисидерофорредуктази // VII Съезд Украинского общества генетиков и селекционеров им.Вавилова. Тезисы докладов. - Киев. - 1992. - Ч.1. - С.128-129.
5. Федорович Д.В., Протченко О.В., Шавловський Г.М. Дослідження ферисидерофорредуктазної активності дріжджів та її ролі в транспорті заліза // IV Укр. біохім. з'їзд. Тези доповідей. - Київ. - 1992. - Ч.1. - С.55.
6. Федорович Д.В., Протченко О.В. Властивості та регуляція активності фериредуктази дріжджів // Мікробіол. журн. - 1994. - Т.56, N1. - С.108.
7. Федорович Д.В., Протченко О.В., Шавловський Г.М. Фериредуктаза *Pichia guilliermondii*: властивості і регуляція активності та синтезу // Укр. біохім. журн. - 1995. - Т.67, N1. - С.32-38.
8. Федорович Д.В., Кітик І.В., Протченко О.В., Шавловський Г.М. Дослідження транспорту та акумуляції заліза клітинами дріжджів *Pichia guilliermondii* // Всеукр. конф. з фізіології та біохімії тварин. Тези доповідей. - Львів. - 1995. - С.158-159.
9. Федорович Д.В., Китык И.В., Джала В.И., Протченко О.В.,

Шавловский Г.М. Аккумуляция и окислительно-восстановительные превращения железа в клетках *Pichia guilliermondii* и флавиногенных мутантов этих дрожжей // Микробиология (в печати).

Протченко О.В.

Исследование ферриредуктазной системы дрожжей *Pichia guilliermondii*.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия, Отделение регуляторных систем клетки Института биохимии им.О.В.Палладина НАН Украины, Львов, 1997.

РЕЗЮМЕ

Исследовано закономерности проявления ферриредуктазной активности интактными клетками *P.guilliermondii*, а также в бесклеточных экстрактах фракционированных сульфатом аммония. Впервые показано, что кроме NADH и ионов Mg(II), для проявления активности ферриредуктазы *in vitro* необходимы ионы Cu(II). Ферриредуктаза слабо угнетается кислородом и способна восстанавливать железо в комплексах с природными и синтетическими хелаторами. Селекционировано коллекцию *hit*-мутантов *P.guilliermondii* с нарушенной регуляцией синтеза ферриредуктазы и транспорта железа в клетку и проведен их генетический анализ. Показано, что гены негативного типа действия, включенные в контроль биосинтеза рибофлавина, RIB80 и RIB81, принимают участие и в регуляции ферриредуктазной активности у *P.guilliermondii*. Исследовано влияние железа на ферриредуктазную активность некоторых видов дрожжей. Установлено, что ионы этого металла репрессируют синтез ферриредуктазы у *P.guilliermondii*. Обсуждаются возможные механизмы координированной регуляции флавиногенеза и обеспечения клетки Fe и Cu.

Ключові слова: дріжджі, фериредуктаза, транспорт заліза, мутанти, регуляція.

Protchenko O.V.

Investigation of the ferrireductase system of yeast *Pichia guilliermondii*

The Candidate Thesis for a Master's Degree, the Speciality 03.00.04 - Biochemistry - Division of regulatory cell system, O.V. Palladin Institut of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 1997.

SUMMARY

Properties of ferrireductase activity of whole cells, crude extracts and ammonium sulfate preparations of yeast *P.guilliermondii* were studied. Ferrireductase of *P.guilliermondii* requires not only NADH and Mg(II), but and Cu(II) ions. Oxygen acts as a slight inhibitor. Ferrireductase reduces complexes Fe(III) with natural and arteficial chelators. The collection of hit gain-of-function mutants defective in regulation of the ferrireductase activity were selected and their genetic analysis was done. RIB80, RIB81 and HIT genes involved in negative control of riboflavin biosynthesis also take part in the regulation of ferrireductase activity in *P.guilliermondii*. Iron regulates the synthesis of ferrireductase in *P.guilliermondii* by negative feed-back mechanism.



