

of electrophoresis (Brzezinski vs. Popereya) for the barley hordeins analysis was investigated. **Methods.** The original electrophoretic procedures were created. Hordeins were extracted from individual grain of several variants of brewing barley. **Results.** The hordein spectra were obtained after both procedures. There were no differences between electrophoregrams. Three protein zones were marked on each electrophoregram. But the brewing electrophoresis is less expensive. **Conclusion.** Electrophoresis of proteins is an effective method of laboratory quality control of barely grain.

Key words: hordeins, electrophoresis.

УДК 576.34:576.311.34:582.282.31

ДМИТРУК О.В.¹, СИБІРНИЙ А.А.^{1,2}

¹ Інститут біології клітини НАН України,

Україна, 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16, e-mail: verbaolena@gmail.com

² Факультет біотехнології і мікробіології, Жешівський університет,

Польща, 35-601, м. Жешів, вул. Зелверовіца, 4, e-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua

КАТАБОЛІТНА ДЕГРАДАЦІЯ ФРУКТОЗО-1,6-БІСФОСФАТАЗИ У МЕТИЛОТРОФНИХ ДРІЖДЖІВ *PICHA PASTORIS* І *HANSENULA POLYMORPHA*

Глюконеогенез є високорегульованим клітинним процесом, шляхом якого дріжджі можуть продукувати глюкозу з альтернативних неферментативних джерел вуглецю, таких як ацетат, лактат, етанол, метанол, гліцерин. При перенесенні дріжджів на середовище, що містить глюкозу, утворення більшості глюконеогенезних ферментів репресуються на транскрипційному рівні, а вже наявні у клітині ферменти піддаються швидкій деградації і протеолізу, а вуглецевий метаболізм клітини

переходить на гліколітичний шлях [1].

Фруктозо-1,6-бісфосфатаза (ФВР) є ключовим ферментом глюконеогенезу, вона каталізує перетворення фруктозо-1,6-бісфосфату до фруктозо-6-фосфату, який згодом метаболізує до глюкозо-6-фосфату (рис. 1). ФВР синтезується, якщо клітини дріжджів ростуть на неферментативних джерелах вуглецю, на середовищі з глюкозою фермент швидко інактивується і деградує. Цей процес носить назву катаболітна деградація [2].

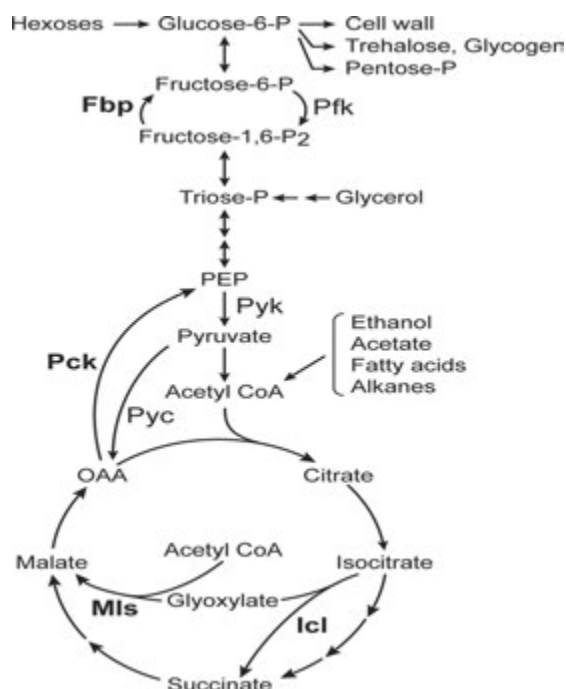


Рис. 1. Схема глюконеогенезу і гліколізу у дріжджів

У метилотрофних дріжджів, таких як *P. pastoris* і *H. polymorpha*, FBP також залучена у шляху метаболізму метанолу, тому дослідження катаболітної деградації FBP у цих дріжджів має значний науковий інтерес [3].

Матеріали і методи

Нуклеотидні послідовності досліджуваних дріжджових генів *P. pastoris* і *H. polymorpha* були знайдені в геномних базах даних: www.yeastgenome.org, <http://ergo.integratedgenomics.com/ERGO> і <http://genomeportal.jgi-psf.org/Hanpo2/Hanpo2.home.html>. Делеція гену FBP1 *P. pastoris* була отримана з допомогою використання ауксотрофного маркерного гена ZeoR. Підтвердження наявності делецій генів буде здійснено шляхом полімеразної ланцюгової реакції згідно стандартних протоколів дослідження [4]. Процедури клонування генів і підтвердження їхньої експресії будли проведені з використанням типових молекулярно-біологічних підходів: електрофорез нативних хромосомних ДНК (молекулярне каріотипування), рестрикційний аналіз, лігування ДНК, трансформація бактерій та дріжджів [4].

Приготування зразків для Вестерн-блот аналізу для дослідження деградації фруктозо-1,6-бісфосфатази було здійснено використовуючи попередньо описані протоколи досліджень [5]. Вестерн-блот аналіз було проведено згідно стандартних методик [4].

Визначення активності фруктозо-1,6-бісфосфатази було здійснено в безклітинних екстрактах дріжджів за умов індукції деградації згідно [6].

Результати та обговорення

На першому етапі роботи було визначено активність FBP у диких штамів дріжджів *P. pastoris* і *H. polymorpha*. Було показано, що після перенесення клітин із середовища, що містить метанол або етанол на середовище з глюкозою, FBP активність *P. pastoris* і *H. polymorpha* зменшувалася у 4,5 і 2 рази відповідно (рис. 2). Оскільки FBP метилотрофних дріжджів також задіяна у процесі утилізації метанолу, активність цього фермента на метанолі була у 3 і у 2 рази вищою, ніж на етанолі для *P. pastoris* і *H. polymorpha* відповідно. Активність FBP на глюкозі була у 10–13 разів нижчою, ніж на етанолі (рис. 3).

Дикі штами *P. pastoris* і *H. polymorpha* були проаналізовані шляхом Вестерн-блот гібридизації, використовуючи антитіла для FBP *S. cerevisiae* (рис. 4). Клітини дріжджів вирощували на середовищі з етанолом або метанолом у якості єдиного джерела вуглецю протягом 48 год, а потім переносили на середовище з глюкозою для індукції деградації FBP. Було показано, що FBP повністю деградує на середовищі з глюкозою після 5 годин інкубації клітин, попередньо-підрощених на глюконеогенезних субстратах (метанолі і етанолі) (рис. 2).

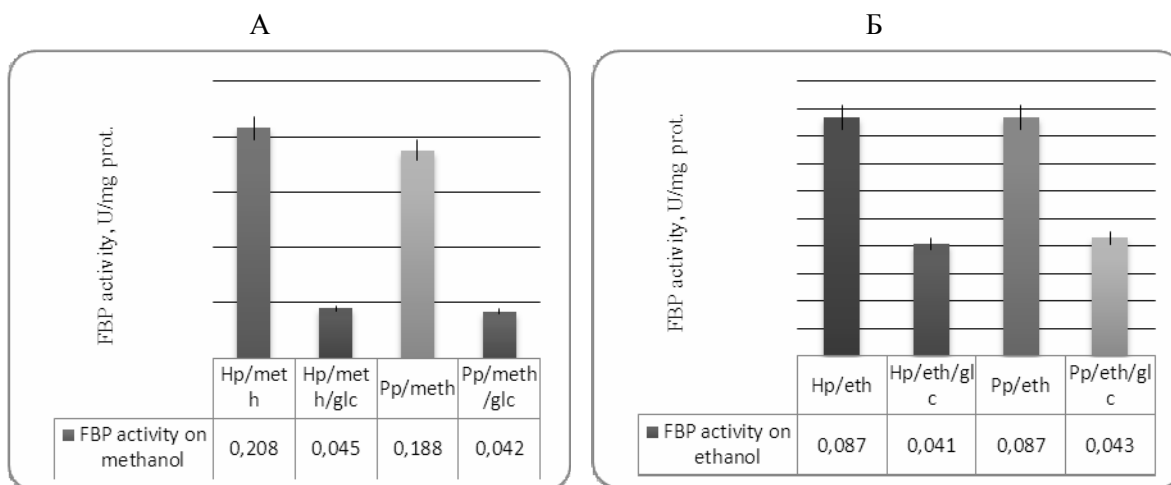


Рис. 2. Активність FBP у диких штамів дріжджів *P. pastoris* і *H. polymorpha* на середовищах, що містять метанол (А) або етанол (Б) у якості основного джерела вуглецю

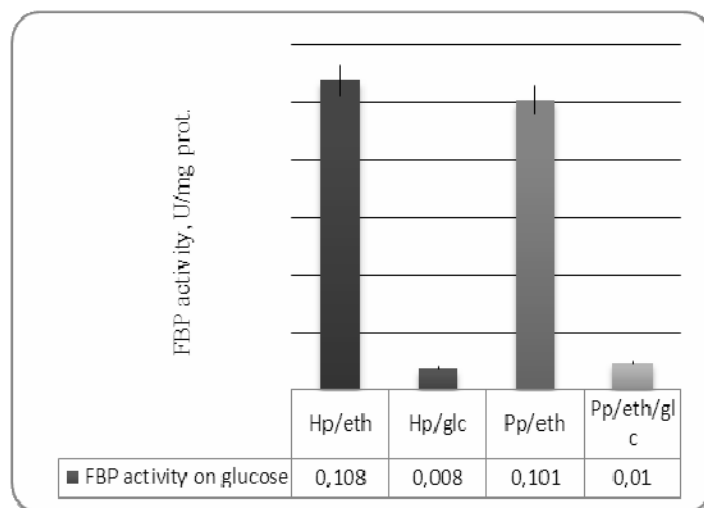


Рис. 3. Активність FBP у диких штамів дріжджів *P. pastoris* і *H. polymorpha* на середовищі, що містить етанол у якості основного джерела вуглецю

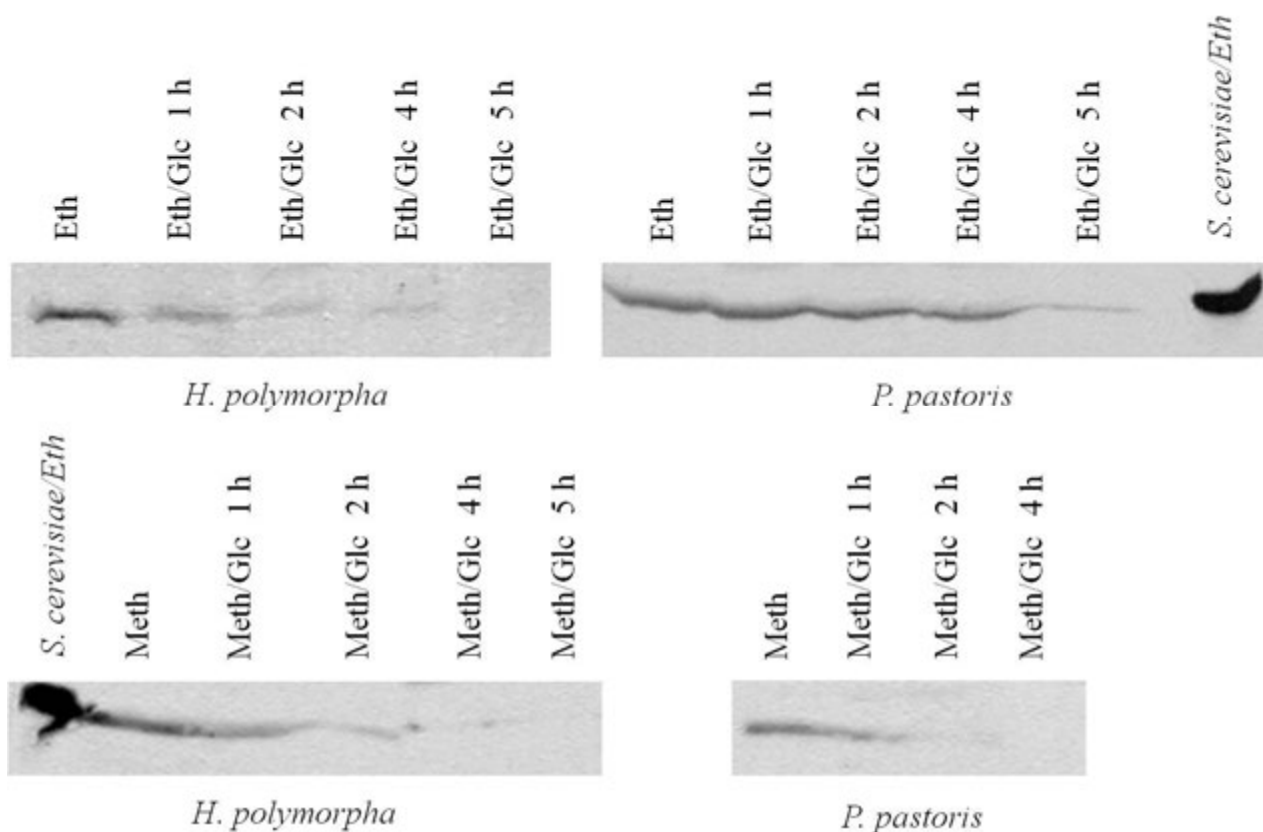


Рис. 4. Результати Вестерн-блот гібридизації диких штамів дріжджів *P. pastoris* і *H. polymorpha*

Наступним етапом роботи було конструювання плазмиди для делеції гена *FBP1* (рис. 5). Для цього ліву і праву фланкуючі ділянки гена *FBP1* було ампліфіковано за допомогою ПЛР і клоновано у плазмиду pUC57. Ген резистентності до норзеотренину було клоновано між фланкуючими ділянками. Цією плазмидою було трансформовано у дикий штам

P. pastoris GS200 і отримано норзеотренин-резистентні колонії дріжджів. Коректність делеції гена було підтверджено за допомогою ПЛР (рис. 6). Штами $\Delta fbp1$ не росли на середовищі з неферментативними джерелами вуглецю. Активність FBP у штамів $\Delta fbp1$ на гліцеролі і етанолі зменшилася у 2 рази, порівняно з диким штамом.

Для вивчення механізмів катаболічної деградації FBP було сконструйовано плазмиду для експресії гібридного гена *FBP* з геном *GFP* (ген, що кодує зелений флуорисцентний білок) під контролем власного FBP-промотора (рис. 7). Цією плазмидою, було трансформовано штам $\Delta fbp1$ і отримано колонії, здатні рости на середовищі без додавання гістидину. Отримані трансформанти були проаналізовані шляхом ПЛР, активність FBP у даних трансформантів становила 20% від активності фермента у дикого штаму дріжджів *P. pastoris* (рис. 8).

Висновки

1. Було показано, що FBP *P. pastoris* і *H. polymorpha* повністю деградує на середовищі з глюкозою після 5 годин інкубації клітин, попередньо підрощених на глюконеогенезних субстратах (метанолі і етанолі). Після

перенесення клітин із середовища, що містить метанол або етанол на середовище з глюкозою, FBP активність *P. pastoris* і *H. polymorpha* зменшувалася у 4,5 і 2 рази відповідно.

2. Було сконструйовано та проаналізовано штами дріжджів *P. pastoris* з делецією гена, що кодує *FBP1*. Активність FBP у штамі $\Delta fbp1$ на гліцеролі і етанолі зменшилася у 2 рази порівняно із диким штамом.

3. Для вивчення механізмів катаболічної деградації FBP було сконструйовано плазмиду для експресії гібридного гена *FBP1* з геном *GFP* (ген, що кодує зелений флуорисцентний білок) під контролем власного FBP-промотора. Активність FBP у цих трансформантів становила 20% від активності фермента у дикого штаму дріжджів *P. pastoris*.



Рис. 5. Схема плазмиди для делеції гена *FBPI* *P. pastoris*

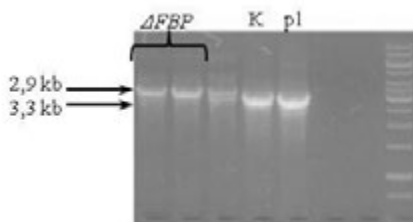


Рис. 6. Підтвердження коректності делеції гена *FBPI* у трансформантів штаму *P. pastoris* GS200 за допомогою ПЛР-аналізу

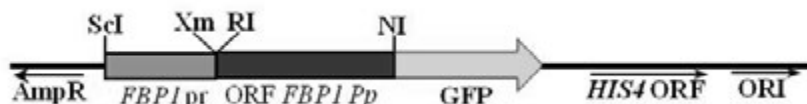


Рис. 7. Схема плазмиди для експресії гібридного гена *FBPI* з геном *GFP* під контролем власного FBP-промотора

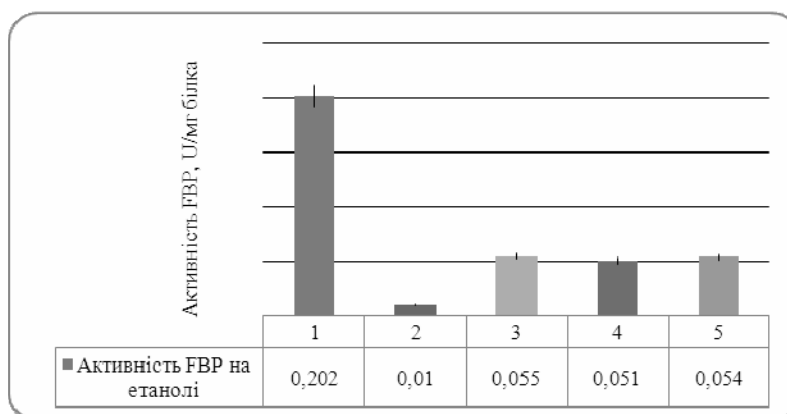


Рис. 8. Активність FBP у трансформантів штаму $\Delta fbp1$ плазмидою, для експресії гібридного гена *FBPI* з геном *GFP* під контролем власного FBP-промотора

Література

1. Regelman J., Schüle T., Josupeit F.S., Horak J., Rose M., Entian K.D., Thumm M., Wolf D.H. Catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide screen identifies eight novel GID genes and indicates the existence of two degradation pathways // *Mol Biol Cell*. – 2003. – 14 (4). – P. 1652–1663.
2. Shieh H.L., Chen Y., Brown C.R., Chiang H.L. Biochemical analysis of fructose-1,6-bisphosphatase import into vacuole import and degradation vesicles reveals a role for UBC1 in vesicle biogenesis // *J Biol Chem*. – 2001. – 276 (13). – P. 10398–10406.
3. Hung G.C., Brown C.R., Wolfe A.B., Liu J., Chiang H.L. Degradation of the gluconeogenic enzymes fructose-1,6-bisphosphatase and malate dehydrogenase is mediated by distinct proteolytic pathways and signaling events // *J. Biol Chem*. – 2004. – 279 (47). – P. 49138–49150.
4. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* [2nd ed.]. – Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. – 510 p.
5. Nazarko V.Y., Futej K.O., Thevelein J.M., Sibirny A.A. Differences in glucose sensing and signaling for pexophagy between the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* // *Autophagy*. – 2008. – 4 (3). – P. 381–384.
6. Gancedo C. Inactivation of 1,6-diphosphatase by glucose in yeast // *Journal of Bacteriology*. – 1971. – 107 (2). – P. 401–405.

DMYTRUK O.V.¹, **SIBIRNY A.A.**^{1,2}

¹ *Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 79005, Lviv, Drahomanov str., 14/16, e-mail: verbaolena@gmail.com*

² *Department of Biotechnology and Microbiology, Rzeszow University, Poland, 35-601, Rzeszow, Zelwerowicza str., 4, e-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua*

CATABOLITE DEGRADATION OF FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE IN METHYLOTROPHIC YEASTS *PICHA PASTORIS* AND *HANSENULA POLYMORPHA*

Aim. Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) which is synthesized when cells are grown on non-fermentable carbon sources. When yeast cells are subsequently shifted to a glucose-containing medium, FBPase is rapidly inactivated and degraded. This process is called catabolite degradation. **Methods.** Standard molecular biological and biochemical methods were used. **Results.** The wild type strains of *P. pastoris* and *H. polymorpha* were analyzed by Western blot, using the antibodies for FBP protein of *S. cerevisiae*. It was shown that FBPase is mostly degraded after 5 hours of incubation of cells in glucose-containing medium. After shifting the cells from methanol or ethanol-containing media on glucose medium, FBPase activity of *P. pastoris* and *H. polymorpha* wild-type strains decreased 4.5–5 and 2–2.5 times, respectively. **Conclusions.** The recombinant strains of *P. pastoris* with the deletion of *FBP* gene were constructed and analyzed. Δfbp strains did not grow in the medium with non-fermentable carbon sources. To study the mechanisms of catabolite degradation, plasmids for the expression of *FBP* fused with GFP were constructed. The recombinant strains with the expression of these plasmids were obtained and analyzed.

Key words: yeasts, fructose-1,6-bisphosphatase, catabolite degradation.

УДК 575.222.7:581.1

ДРОБОТ К.О., МАТВЄЄВА Н.А., КВАСКО О.Ю., ШАХОВСЬКИЙ А.М.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Україна, 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 148, e-mail: joyna56@gmail.com

СТВОРЕННЯ КУЛЬТУРИ «БОРОДАТИХ» КОРЕНІВ РОСЛИН АЛТЕЇ ЛІКАРСЬКОЇ *ALTHAEA OFFICINALIS* L. З ВИКОРИСТАННЯМ РІЗНИХ ВЕКТОРНИХ КОНСТРУКЦІЙ З ГЕНОМ *ifn- α 2b* ЛЮДИНИ

Алтея лікарська (*Althaea officinalis* L., Malvaceae), багаторічна трав'яниста рослина, поширена у Європі, є лікарською та використовується як у нетрадиційній медицині,

так і у фармакології для створення лікарських препаратів. Рослини алтеї мають ряд лікувальних властивостей завдяки наявності мукополісахаридів та інших сполук. Її листки та