Облікова картка дисертації

I. Загальні відомості

Державний обліковий номер: 0408U004070

Особливі позначки: відкрита

Дата реєстрації: 01-10-2008

Статус: Захищена

Реквізити наказу МОН / наказу закладу:

II. Відомості про здобувача

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Капустяк Костянтин Євгенович
2. Kapustiak Kostiantyn Evgenovych

Кваліфікація:

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Вид дисертації: кандидат наук

Аспірантура/Докторантура: ні

Шифр наукової спеціальності: 03.00.07

Назва наукової спеціальності: Мікробіологія

Галузь / галузі знань: Не застосовується

Освітньо-наукова програма зі спеціальності: Не застосовується

Дата захисту: 17-09-2008

Спеціальність за освітою: 7070410

Місце роботи здобувача: Інститут біології клітини НАН України

Код за ЄДРПОУ: 25255758

Місцезнаходження: 79005, м.Львів, вул.Драгоманова 14/16

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

III. Відомості про організацію, де відбувся захист

Шифр спеціалізованої вченої ради (разової спеціалізованої вченої ради): Д 26.233.01

Повне найменування юридичної особи: Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

Код за ЄДРПОУ: 05417087

Місцезнаходження: вул. академіка Заболотного, 154, м. Київ, Київська обл., 03143, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

IV. Відомості про підприємство, установу, організацію, в якій було виконано дисертацію

Повне найменування юридичної особи: Інститут біології клітини НАН України

Код за ЄДРПОУ: 25255758

Місцезнаходження: 79005, м.Львів, вул.Драгоманова 14/16

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

V. Відомості про дисертацію

Мова дисертації:

Коди тематичних рубрик: 34.27.21

Тема дисертації:

1. Мутація rib1-86 як інструмент для виявлення генів, задіяних у регуляції біосинтезу рибофлавіну та гомеостазу заліза у дріжджів pichia guilliermondii.

2. Mutation rib1-86 as instrument for find out a genesinvolved in regulaton of riboflavin biosynthesis and iron homeostasis in the yeasts Pichia guilliermondii

Реферат/анотація:

1. Дисертація присвячена дослідженню генетичних механізмів супресії мутації rib1-86, яка пошкоджує ген RIB1(кодує фермент ГТФ-циклогідролазу II, яка каталізує перший етап флавіногенезу) і спричиняє повну ауксотрофність по РФ у мутантів P. guilliermondii. Мутанти rib1-86 здатні спонтанно ревертувати до прототрофності по РФ з частотою до 10-6. Клонування і наступне секвенування мутантного алеля rib1-86 показало наявність точкової мутації у положенні + 620 п.н. вправо від старт-кодону. Заміна гуаніну на аденін в цій точці перетворює цистеїновий кодон на тирозиновий (C207Y). Генетичний аналіз колекції спонтанних ревертантів мутанта rib1-86 дозволив виявити 6 нових генів RED1-RED6 (reduction), що беруть участь у регуляції біосинтезу РФ та метаболізму заліза. У порівнянні із штамом дикого типу мутанти red характеризуються наступними властивостями: підвищеною активністю ГТФ-циклогидролази і РФ-синтази, а

також збільшеним рівнем біосинтезу РФ; збільшеною Fe/Cu-редуктазной активністю і підвищеним вмістом негемінового заліза в клітинах; високою чутливістю до перехідних металів. Вперше показано, що у P. guilliermondii надсинтез РФ, викликаний дефіцитом іонів заліза або пошкодженням регуляторних генів, корелює із зростанням рівнів мРНК ключових ферментів цього біосинтетичного шляху

2. The thesis is devoted to investigation of the regulaton of riboflavin biosynthesis and ron homoeostasis in the yeasts Pichia guilliermondii. It is known, that Pichia guilliermondii can overproduces riboflavin (vitamin B2) in response to iron limitation. Molecular mechanisms of such regulation are still unknown. To study this phenomenon, it is necessary to select putative mutations leading to altered regulation of riboflavin biosynthesis and identify genes involved. To select mutants defective in regulation of riboflavin biosynthesis, we used P. guilliermondii RF deficient strain rib1-86. This strain lacks activity of GTP cyclohydrolase II (encoded by RIB1 gene) that catalyses hydrolysis of guanosine-5-triphosphate to 2,5-diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinone 5'-phosphate - the first committed stage of riboflavin biosynthesis. In contrast to other P. guilliermondii rib1 mutants, strain rib1-86 is able to grow without riboflavin under condition of iron starvation. Also, this strain spontaneouslyreverted to riboflavin prototrophy at a frequency approximately 10-7. Rate of reversion is increased in conditions of RF deprivation. We hypothesize that riboflavin prototrophy in this strain can be restored by hyperexpression of RIB1 gene that can be caused by iron starvation, or mutations affecting regulation of riboflavin biosynthesis. To check this hypothesis, we studied the mutant allele rib1-86 of RIB1 gene and characterized spontaneous revertants (riboflavin prototrophs) of P.guilliermondii rib1-86 strain. 2.1 kbp DNA fragment encomprizing GTP cyclohydrolase II structural gene was amplified by PCR using chromosomal DNA of P.guilliermondii rib1-86 strain as a template. Obtained DNA fragment was purified, digested with Xba1 and BamH1 endonucleases and cloned into corresponding sites of pUC19 vector. Sequencing of the mutant allele rib1-86 and subsequent alignment of RIB1 and rib1-86 nucleotide sequences revealed a single point mutation: substitution of G620 to A, that converts a cysteine codone to tyrosine. Alignment of amino acid sequences of GTP cyclohydrolase II from different microorganisms revealed that in most cases this position (207) is occupied by valine. Earlier it was shown that three cysteine residues located near this position are necessary to release formate from the imidazole ring of GTP. It is possible that C207 is needed also for the catalytic hydrolysis of GTP to 2,5-diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinone 5'-phosphate in P. guilliermondii. The presence of cysteine in the same position of GTP cyclohydrolase II of yeast Candida albicans which also overproduce RF in response to iron limitation can be a suggestion in favor of this speculation. Most likely, C207Y substitution inactivates P. guilliermondii GTP cyclohydrolase II not completely or makes it unstable. Subsequently, in the case of hyperexpression of the gene total level of GTP cyclohydrolase II activity is sufficient to provide riboflavin synthesis according to the cell needs. Results of Northern blotting demonstrated that an increase in RF production by P. guilliermondii cells caused by iron starvation or regulatory mutation correlates with elevated level of mRNAs of key enzymes involved in this biosynthetic pathway. We conclude that regulation of RF biosynthesis by iron in P. guilliermondii occurs at the transcriptional level. Obtained spontaneous revertants were crossed with the wild type strain, and segregants were analyzed. A collection of riboflavin producing haploid strains (without rib1-86 mutation) was obtained. Colonies of segregants were red on medium supplemented with threephenyltetrazoliumchloride (TTC). The genetic analysis of these segregants revealed six novel loci RED1-RED6 (reduction), as well as previously identified genes RIB81, RIB80 and HIT1. Newly identified mutations are not linked with the RIB1 locus, are recessive, monogenic and possessed nuclear localization. Compare to the wild-type strain, all red mutants possessed increased activity of GTP cyclohydrolase and elevated levels of RF production. All of them possessed increased ferric/cupric reductase activity and higher non-hemin iron content. In addition, they were more sensitive to transitional metals. The metal hypersensitivity can be prevented by increased extracellular iron. Study of one corresponding mutant, red6, showed derepression of RIB1 mRNA synthesis in iron-sufficient medium.

Державний реєстраційний номер ДіР:

Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки:

Стратегічний пріоритетний напрям інноваційної діяльності:

Підсумки дослідження:

Публікації:

Наукова (науково-технічна) продукція:

Соціально-економічна спрямованість:

Охоронні документи на ОПІВ:

Впровадження результатів дисертації:

Зв'язок з науковими темами:

VI. Відомості про наукового керівника/керівників (консультанта)

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Сибірний Андрій Андрійович
2. Sybirnyi Andrii Andriyovych

Кваліфікація: д.б.н., 03.00.15

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

VII. Відомості про офіційних опонентів та рецензентів

Офіційні опоненти

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Мацелюх Богдан Павлович
2. Мацелюх Богдан Павлович

Кваліфікація: д.б.н., 03.00.07

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Малюта Станіслав Станіславович

2. Малюта Станіслав Станіславович

Кваліфікація: д.б.н., 03.00.15

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Батіч Тетяна Вікторівна

2. Батіч Тетяна Вікторівна

Кваліфікація: к.б.н., 03.00.07

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Рецензенти

VIII. Заключні відомості

Власне Прізвище Ім'я По-батькові голови ради Підгорський Валентин Степанович

Власне Прізвище Ім'я По-батькові головуючого на засіданні

Підгорський Валентин Степанович

Відповідальний за підготовку облікових документів

Реєстратор

Керівник відділу УкрІНТЕІ, що є відповідальним за реєстрацію наукової діяльності



Юрченко Т.А.