

## Регуляція вуглецевими субстратами промотору гена алкогольоксидази у мутантів дріжджів *Hansenula polymorpha* з пошкодженою катаболітною репресією

О. Г. Стасик, О. В. Стасик, А. А. Сибірний

Інститут біології клітини НАН України  
Вул. Драгоманова, 14/16, Львів, 79005, Україна

E-mail: stasyk@biochem.lviv.ua

---

*У мутантів метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* з пошкодженою катаболітною репресією проаналізовано регуляцію синтезу власної пероксисомної алкогольоксидази та гетерологічної секретованої глюкозооксидази вуглецевими субстратами. Встановлено, що мутації, які ведуть до надсинтезу ферментів на середовищі з глюкозою, є специфічними щодо субстратної регуляції промотору алкогольоксидази. Отримані мутантні штами є перспективними продуцентами гетерологічних білків.*

---

Вступ. Катаболітна репресія є одним з основних механізмів регуляції експресії генів вуглецевими субстратами у дріжджів. Молекулярні механізми репресії залишаються маловивченими, особливо що стосується перших етапів передачі сигналу репресії від вуглецевих субстратів-ефекторів до промоторів відповідних генів [1–3]. У метилотрофних дріжджів синтез ключових пероксисомних та цитозольних ферментів метаболізму метанолу є регульованим. За оптимальних умов безперервної культури при індукції метанолом пероксисомна алкогольоксидаза (АОХ), перший фермент утилізації метанолу, може складати до 30 % від загальної кількості клітинного білка. Проте у клітин, вирощених на глюкозному або етанольному середовищі, промотор АОХ ( $P_{АОХ}$ ) є повністю репресованим [4]. Розуміння молекулярних механізмів такої регуляції є цікавим для фундаментальних та прикладних досліджень. Так, на основі  $P_{АОХ}$  у дріжджів *H. polymorpha* розроблено і впроваджено у виробництво систему експресії гетерологічних білків медичного та біотехнологічного значення [5].

Мета даної роботи — дослідити регуляцію  $P_{АОХ}$  різними вуглецевими субстратами у мутантів *H. polymorpha* з пошкодженою катаболітною репресією. Використовуючи як модель експресію гетерологічного білка під  $P_{АОХ}$ , порівняти катаболітну регуляцію синтезу власних і чужорідних білків з різною локалізацією у *H. polymorpha*.

**Матеріали і методи Штами.** У роботі використовували штами *H. polymorpha* дикого типу NCYC 495-8 (*leu10*), NCYC 495 (*leu1-1*) та NCYC 495 (*met6*), люб'язно надані д-ром П. Садбері (Шеф-фільдський університет, Велика Британія), а також мутанти, нечутливі до катаболітної репресії, — *gcr1-2 leu10* [4], ЕАО (*leu10*) [6]. Умови гібридизації штамів описано раніше [7].

**Середовища та умови культивування.** Штами *H. polymorpha* інкубували при температурі 37 °С у багатому середовищі YPD (1 %-й дріжджовий екстракт, 2 %-й бактопептон, 1 %-ва глюкоза) та мінеральному середовищі YNB (0,67 % Yeast Nitrogen Base («Difco», США)). Концентрація вуглецевих ростових субстратів становила 1 %, факторів росту (лейцин, метіонін) — 40 мг/мл. Для штамів, що експресують секретовану глюкозооксидазу *Aspergillus niger* (GOD), до середовища додавали фос-

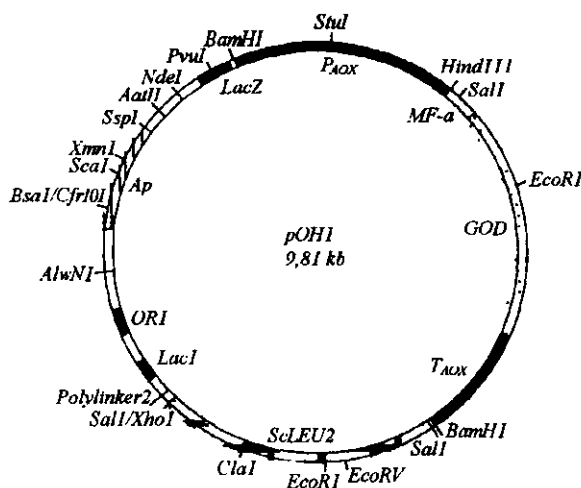


Рис. 1. Схема інтегративного вектора *pOH1*, який містить касету експресії гена глюкозооксидази *A. niger* (*GOD*) під промотором гена алкогольоксидази ( $P_{AOX}$ ) *H. polymorpha*

фатний буфер (рН 6,0) у кінцевій концентрації 100 мМ для стабілізації *GOD* у культуральному середовищі. Біомасу дріжджів визначали фотоколориметрично при 590 нм і виражали в перерахунку на мг/мл сухої маси клітин.

**Конструювання вектора *pOH1* для інтегративної трансформації.** Методи рекомбінантних ДНК використовували, як описано [8]. Касету експресії з вектора *pWG31*, який містив  $P_{AOX}$  і *AOX* термінатор, ген *GOD* з *A. niger* та секреторну *MF-α* лідерну послідовність з *Saccharomyces cerevisiae* [9], клонували в унікальний *BamHI* сайт човникової плазмиди *pYT1* [10] з утворенням *pOH1* (рис. 1). Для ефективної інтеграції *pOH1* у геном реципієнтного штаму шляхом гомологічної рекомбінації вектор лінеаризували по *StuI* сайту в області  $P_{AOX}$ . Штами *H. polymorpha* трансформували методом електропорації [11].

**Визначення активності ферментів.** Активність *AOX* визначали в пермеабілізованих клітинах, згідно з описаним раніше методом [12], і виражали в  $\text{мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  сухої маси клітин. Активність *GOD* аналізували в 50 мМ фосфатному буфері (рН 6,0), що містив 3 мМ о-діанізидин, 2,5 од/мл пероксидази хрому та 0,06 мл культурального середовища. Реакцію запускали додаванням 0,06 мл 2 М D-глюкози. Реакційну суміш інкубували при температурі 30 °С. Зупиняли реакцію додаванням 0,34 мл концентрованої *HCl*.

Оптичну густина реакційної суміші визначали спектрофотометрично при 525 нм. Активність ферменту виражали в од/мл культурального середовища.

**Визначення *GOD* методом прямої заливки на чашках.** Клітини, вирощені на YPD, переносили методом реплік на середовища з різними джерелами вуглецю та інкубували протягом 2–3 діб. Чашки заливали 10 мл реакційної суміші для *GOD*, яка містила 50 мМ фосфатний буфер (рН 6,0), 3 мМ о-діанізидин, 100 мМ D-глюкозу, 2,5 од/мл пероксидази хрому та 0,3 %-й агар. Колонії, що секретують *GOD*, утворювали гало червоного кольору.

**Інші методи.** Для УФ-мутагенезу використовували дозу опромінення, яка забезпечувала 10 % виживання клітин. Електрофорез білків в SDS-поліакриламідному гелі проводили згідно з методикою [13]. Умови та методи електронно-мікроскопічного дослідження клітин описано раніше [14].

**Результати і обговорення.** Нами ізольовано та генетично і біохімічно проаналізовано мутанти *H. polymorpha* з пошкодженою глюкозною катаболітною репресією [4]. Мутанти *gcr1* (*glucose catabolite repression*) були здатні рости на середовищі з метанолом у присутності токсичного неметаболізованого аналога глюкози, 2-дезоксиглюкози, і проявляли плеiotропний фенотип [4]. Характерною особливістю *gcr1* мутантів є конститутивний синтез *AOX* у середовищі з глюкозою. В цій роботі проаналізовано ріст і кінетику активності *AOX* при інкубації мутанта *gcr1-2* та штаму дикого типу на інших вуглецевих субстратах.

Встановлено, що, крім репресії глюкозою, у *gcr1-2* мутанта пошкоджено репресію синтезу *AOX* у середовищах з манозою, дисахаридом трегалозою, а також підвищений в порівнянні зі штамом дикого типу синтез ферменту в середовищі з ксилозою (рис. 2, б, г, е). Поряд з цим мутант не відрізняється від штаму дикого типу за репресією *AOX* такими субстратами, як етанол, фруктоза, мальтоза і сахароза. В усіх випадках пошкодження репресії корелює із сповільненням росту *gcr1-2* на відповідному вуглецевому субстраті (рис. 2). Нами клоновано відповідний ген *GCR1* методом функціональної комплементції і встановлено, що він кодує білок, гомологічний транспортерам глюкози, з можливою сенсорною функцією. Таким чином, різниця в ефекті різних цукрів на синтез *AOX* у *gcr1-2* може бути зумовлена диференційованою участю продукту гена *GCR1* у їхньому транспорті та передачі сигналу репресії.

Для аналізу регуляції експресії гетерологічних білків під  $P_{AOX}$  у *gcr* мутантів нами сконструйовано штами-продуценти секретованої *GOD* гриба *A. niger*. Вихідним штамом був *H. polymorpha* ЕАО

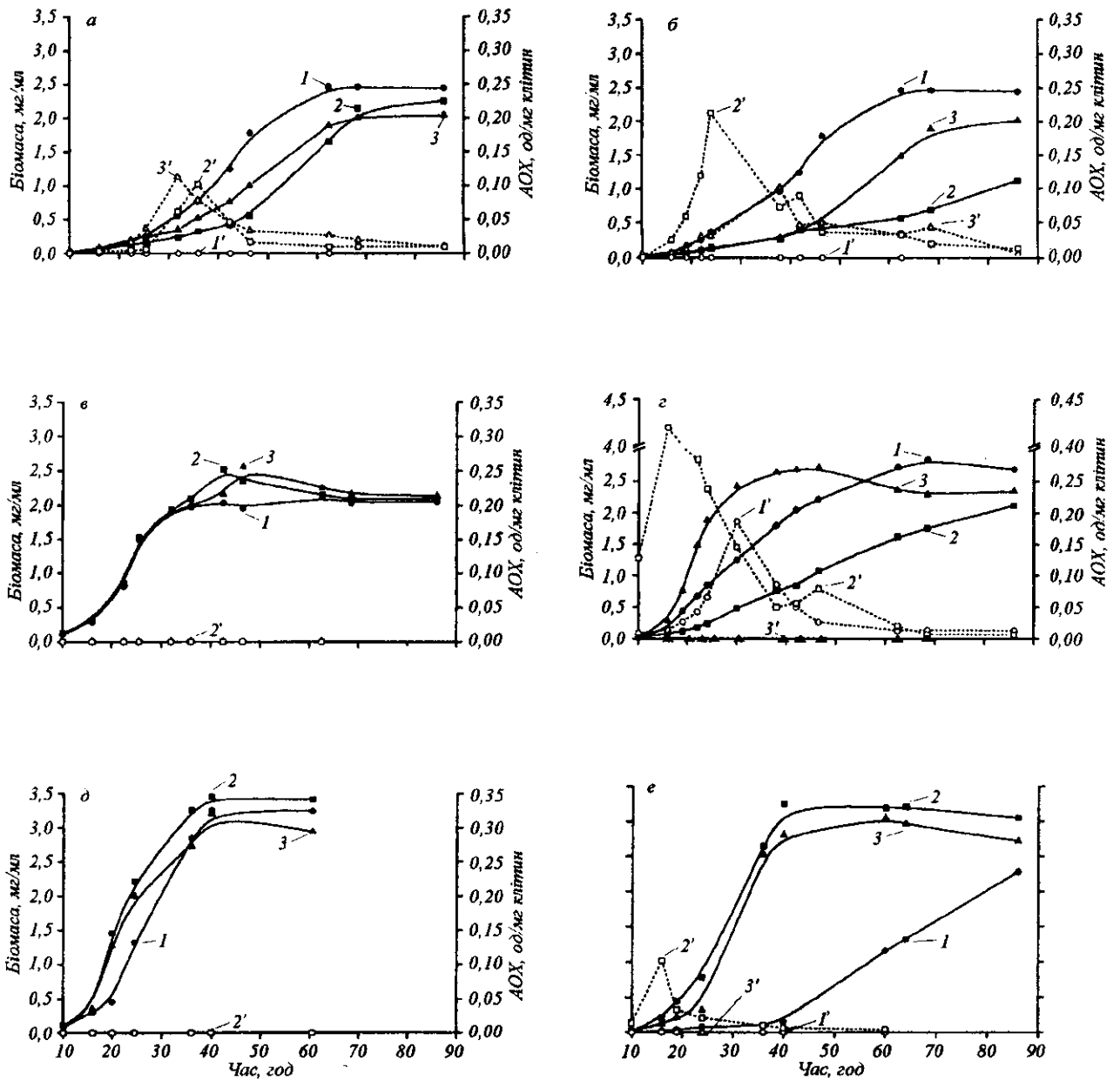


Рис. 2. Регуляція різними вуглецевими субстратами активності пероксисомної АОХ у *H. polymorpha* (а, в, д — штам дикого типу; б, г, е — мутант *gcr1-2*; кінетика росту — суцільна лінія; кінетика активності АОХ — штрихова лінія): а, б — етанол (1, 1'); ксиліоза (2, 2'); метанол (3, 3'); в, г — маноза (1, 1'); глюкоза (2, 2'); фруктоза (3, 3'); д, е — трегалоза (1, 1'); сахароза (2, 2'); мальтоза (3, 3')

(*leu10*). Його отримано як похідний від *gcr1-2* внаслідок введення вторинних мутацій, які підвищували рівень конститутивної експресії АОХ у середовищі з глюкозою [6]. Такий комплекс мутацій зумовлює біогенез збільшених у розмірах

пероксисом у клітинах, вирощених на глюкозному середовищі (рис. 3).

Шляхом схрещування мутанта ЕАО (*leu10*) зі штамом дикого типу NCYC 495 (*leu1-1*) і відбору рекомбінантних *gcr* штамів з *leu1-1* міткою ви-

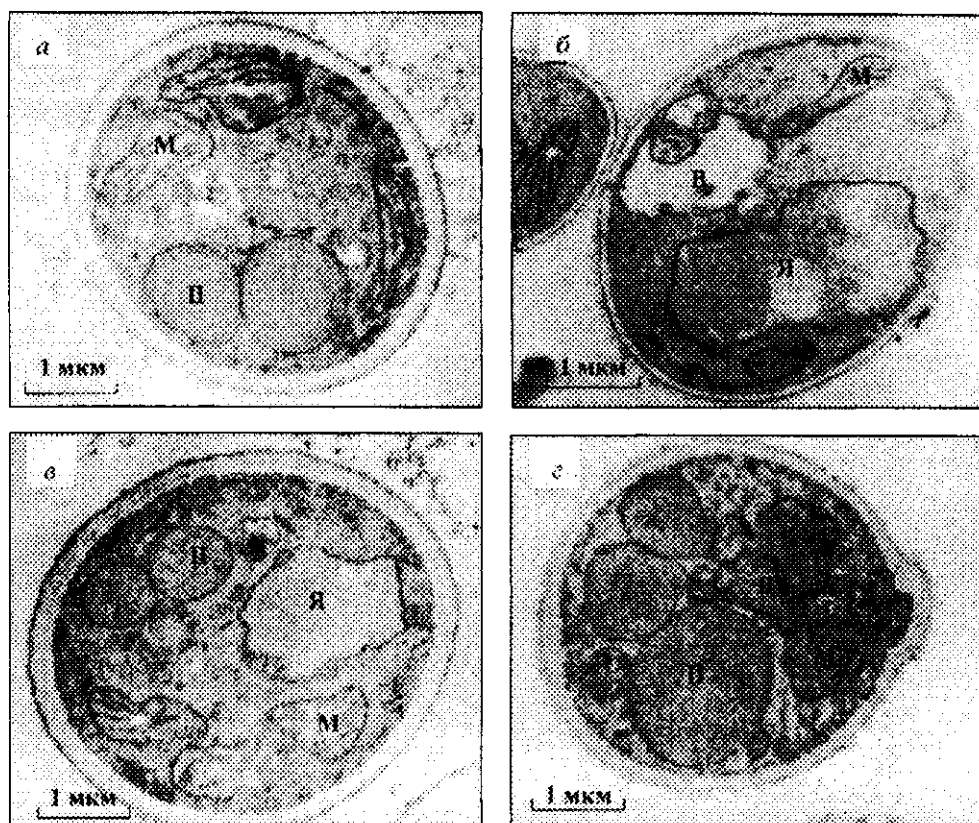


Рис. 3. Електронні мікрофотографії клітин штамів *H. polymorpha*: а — штам дикого типу, метанол; б — штам дикого типу, глюкоза; в — *gcr1-2*, глюкоза; г — ЕАО (*leu10*), глюкоза. Умовні позначення: П — пероксисома; В — вакуоля; М — мітохондрія; Я — ядро

ділено штам ЕАО2 (*leu1-1*). Для підвищення ефективності інтегративної трансформації сконструйовано вектор *pOH1* з касетою експресії *GOD* (див. «Матеріали і методи») (рис. 1). Вектор містив ген *LEU2 S. cerevisiae*, що комплементує ауксотрофний дефект у *leu1-1* штамів *H. polymorpha*. Активність секретованої *GOD* у прототрофних трансформантів штаму дикого типу і ЕАО2 визначали методом прямої заливки на чашках. Відібрано штам ЕАО2-1, який продукував *GOD* з високою активністю на середовищі з глюкозою і залишався мітотично стабільним протягом тривалої інкубації у неселективних умовах. ЕАО2-1 характеризувався відсутністю АОХ активності і, як наслідок, втратив здатність рости на метанольному середовищі. Ген АОХ, імовірно, був ушкоджений при інтеграції касети експресії *GOD* в області  $P_{AOX}$ .

Встановлено, що експресія гетерологічного ферменту у рекомбінантного штаму ЕАО2-1 індукується метанолом, глюкозою та ксилозою і водночас репресується сахарозою (рис. 4, а, б). Таким чином, регуляція синтезу *GOD* у штаму

ЕАО2-1 збігається з регуляцією АОХ у мутанта *gcr1-2* на середовищах з даними джерелами вуглецю (рис. 2). Аналіз активності секретованої *GOD* в культуральному середовищі показав, що при інкубації ЕАО2-1 у глюкозному середовищі вона є дещо нижчою порівняно з такою штаму дикого типу в метанольному середовищі (0,62 і 0,85 од/мл відповідно) (рис. 4, а). Слід зазначити, що у вихідного реципієнтного штаму ЕАО2 (*leu1-1*) активність АОХ при інкубації на глюкозному середовищі була у 4—5 разів вищою (6,7 од/мл), ніж при інкубації з метанолом (1,6 од/мл). Причиною такої відмінності може бути специфіка секреції гетерологічної *GOD*, а також конверсія цим ферментом позаклітинної глюкози до глюконової кислоти, яка не утилізується *H. polymorpha*, поряд з нагромадженням іншого токсичного продукту реакції — перекису водню (даних не наведено). При інкубації з ксилозою, яка не є субстратом *GOD*, експресія гетерологічного білка була в 4 рази вищою (3,6 од/мл), ніж при індукції штаму дикого типу метанолом.

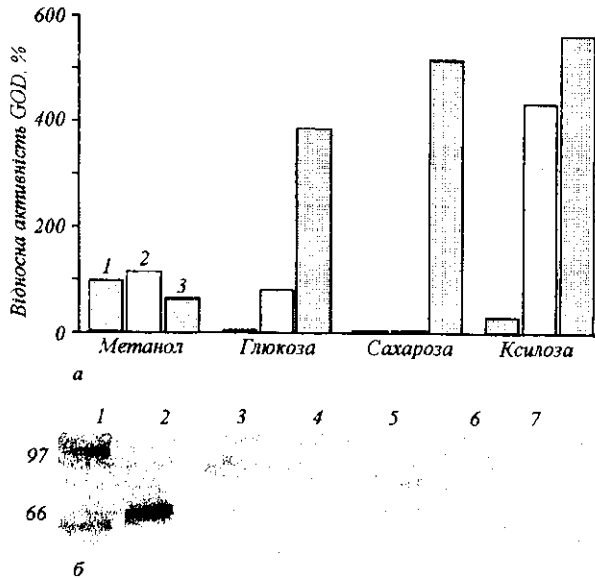


Рис. 4. Відносна активність GOD у культуральному середовищі після інкубації штамів *H. polymorpha* з різними джерелами вуглецю протягом 110 год (активність ферменту у штаму дикого типу, індукованого метанолом, прийнята за 100 % і відповідає 0,86 од./мл) (а: 1 — дикий тип, 2 — EAO2-1; 3 — EAO2-1-H) і електрофореграма культурального середовища продуцентів, інкубованих протягом 60 год на різних вуглецевих субстратах (б: 1 — білкові маркери (кДа); 2 — очищена GOD *A. niger* (стандарт); 3 — EAO2-1 (ксилоза, 3,6 од. GOD/мл); 4 — EAO2-1 (глюкоза, 0,45 од. GOD/мл); 5 — EAO2-1 (метанол, 0,95 од. GOD/мл); 6 — дикий тип (метанол, 0,72 од. GOD/мл); 7 — дикий тип (глюкоза))

Електрофорез білків культурального середовища показав, що GOD, секретована *H. polymorpha*, має вищу молекулярну масу (86 кДа), ніж білок, виділений з *A. niger* (75 кДа), за рахунок гіперглікозилювання [9], яке не впливає на активність ферменту (рис. 4, б). Кількість білка GOD в культуральному середовищі клітин, вирощених на різних субстратах, за даними білкового електрофорезу, узгоджується з ферментативною активністю GOD (рис. 4). Найкращим вуглецевим субстратом для експресії GOD у штамів з пошкодженою репресією  $P_{AOX}$  є ксилоза. Крім цього, GOD є єдиним білком, що секретується рекомбінантними штамми-продуцентами. Таким чином, його можна виділити з культурального середовища у високоочищеному стані.

Методом УФ-мутагенезу штаму EAO2-1 нами

отримано мутанти з підвищеною експресією GOD на глюкозному середовищі. Метод відбору надпродуцентів GOD базувався на спостереженні, що після інкубації протягом чотирьох діб на чашках з глюкозним середовищем, у якому не підтримували постійне рН, активність ферменту у вихідного штаму EAO2-1 різко знижувалася. За таких умов відібрано колонії з підвищеною активністю GOD. Штам EAO2-1-11 виявляв у чотири рази вищу активність гетерологічного ферменту в глюкозному середовищі порівняно з диким типом, інкубованим з метанолом (рис. 4, а). Крім цього, отриманий надпродуцент характеризувався зміненою регуляцією експресії GOD і секретував великі кількості ферменту на середовищі з сахарозою.

Схрещуванням штаму EAO2-1-11 зі штамом дикого типу NCYC495 (*met6*) одержано рекомбінантний штам з відновленою високою активністю AOX як на середовищі з глюкозою, так і сахарозою (даних не наведено). Отже, у даного штаму збереглася регуляція  $P_{AOX}$ , характерна для EAO2-1-11.

Таким чином, мутації, які спричинюють підвищення конститутивної експресії  $P_{AOX}$ , мають різний вплив на його регуляцію вуглецевими субстратами. Встановлення природи цих мутацій буде предметом наших подальших досліджень. Отримані мутанти з пошкодженою катаболітною репресією  $P_{AOX}$  є перспективними для експресії інших гетерологічних білків на дешевих цукрах — нетрадиційних для *H. polymorpha* вуглецевих субстратах.

Автори висловлюють глибоку подяку О. Р. Кулачковському за допомогу в проведенні електронно-мікроскопічних досліджень.

O. G. Stasyk, O. V. Stasyk, A. A. Sibirny

Carbon source regulation of the alcohol oxidase promoter in mutants of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* impaired in catabolite repression

Summary

Carbon source regulation of the alcohol oxidase and heterologous glucose oxidase synthesis in mutants of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* impaired in catabolite repression was analyzed. It was shown that the mutations causing the enzymes oversynthesis in glucose medium are specific in respect to substrate regulation of the alcohol oxidase promoter. The mutants isolated are promising hosts for production of foreign proteins.

O. G. Стасык, O. B. Стасык, A. A. Сибирный

Регуляція вуглецевими субстратами промотора гена алкогольоксидази у мутантів дрожжей *Hansenula polymorpha* с поврежденной катаболитной репрессией

Резюме

У мутантов метилотрофных дрожжей *H. polymorpha* с по-

врежденной катаболитной репрессией проанализирована регуляция синтеза пероксисомной алкогольоксидазы и гетерологической глюкозооксидазы углеродными субстратами. Установлено, что мутации, приводящие к суперсинтезу ферментов в среде с глюкозой, являются специфическими по отношению к субстратной регуляции промотора алкогольоксидазы. Полученные мутантные штаммы являются перспективными продуцентами гетерологических белков.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сибирный А. А., Титоренко В. И. Молекулярные механизмы катаболитной регуляции у дрожжей.—М.: ВИНТИИ, 1990.—214 с. (Итоги науки и техники; Сер. Молекуляр. биология; Т. 33).
2. Gancedo J. M. Yeast carbon catabolite repression // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*—1998.—62.—P. 334—361.
3. Thevelein J. M. Signal transduction in yeast // *Yeast.*—1994.—10, N 22.—P. 1753—1790.
4. Стасик О. В., Кишинская Г. П., Кулачковский А. Р., Сибирный А. А. Мутанты метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* с поврежденной катаболитной репрессией // *Микробиология.*—1997.—66, № 6.—С. 755—760.
5. Faber K. N., Harder W., Ab G., Veenhuis M. *Hansenula polymorpha*: a yeast of commercial and scientific interest // *Yeast.*—1995.—11.—P. 1331—1344.
6. Gonchar M. V., Maidan M. M., Moroz O. M., Woodward J. R., Sibirny A. A. Microbial O<sub>2</sub>- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-electrod sensors for alcohol assays based on the use of permeabilized yeast cells as the sensitive bioelements // *Biosensors and Bioelectronics.*—1998.—13.—P. 945—952.
7. Gleeson M. A., Sudbery P. E. Genetic analysis in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // *Yeast.*—1988.—4.—P. 293—303.

8. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual.*—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.—452 p.
9. Hodgkins M., Mead D., Balance D. J., Goodey A., Sudbery P. Expression of the glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* in *Hansenula polymorpha* and its use as a reporter gene to isolate regulatory mutants // *Yeast.*—1993.—9.—P. 625—635.
10. Tan X., Waterham H. R., Veenhuis M., Cregg J. M. The *Hansenula polymorpha* PER8 gene encodes a novel peroxisomal integral membrane protein involved in proliferation // *J. Cell. Biol.*—1995.—128.—P. 307—319.
11. Faber K. N., Haima P., Harder W., Veenhuis M., Geert A. B. Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha* // *Curr. Genet.*—1994.—25.—P. 305—310.
12. Сибирный А. А., Титоренко В. И., Ефремов В. Д., Толсторуков И. И. Multiplicity of mechanisms of carbon catabolite repression involved in the synthesis of alcohol oxidase in the methylotrophic yeast *Pichia pinus* // *Yeast.*—1987.—3, N 4.—P. 233—241.
13. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.*—1970.—227.—P. 680—685.
14. Сибирный А. А., Витвицкая О. П., Кулачковский А. Р., Убийвовк В. М. Селекция и свойства мутантов метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* с поврежденной алкогольоксидазой // *Микробиология.*—1989.—58, № 4.—С. 634—641.

УДК 582.282.23:575.224  
Надійшла до редакції 12.11.01