

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К.ЗАВОЛОТНОГО

*На правах рукопису*

ВИТЕЙЦЬКА  
Ореста Петрівна

КОНСТРУВАННЯ СИСТЕМИ ГЕТЕРОЛОГІЧНОЇ ЕКСПРЕСІЇ  
З ВИКОРИСТАННЯМ ПРОМОТОРА ГЕНУ АЛКОГОЛЬОКСИДАЗИ  
НА БАЗІ МЕТИЛОТРОФНИХ ДРІЖДЖІВ HANSENULA POLYMORPHA

03.00.23 - біотехнологія

Автореферат  
дисертації на здобуття вченого ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ - 1994



00778381 (Y)

Робота виконана у  
лення регуляторних систем  
ім. О.В.Палладіна НАН України та лабораторії генетики і біології  
рії нижчих еукаріот НВО "Біотехнологія", м. Москва.

- Наукові керівники** - доктор біологічних наук, професор  
Сибірій А.А.,  
- кандидат біологічних наук  
Вєбуров М.Ю.
- Офіційні опоненти** - доктор біологічних наук, професор  
Мацєлик Б.П.,  
- кандидат біологічних наук  
Закальський А.Є.
- Провідна установа** - Інститут молекулярної біології та  
генетики НАН України (м. Київ)

Захист дисертації відбудеться "16" листопада 1994 р.  
о "10" год на засіданні спеціалізованої вченої ради при  
Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного  
НАН України за адресою: м. Київ, вул. Заболотного, 154

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту  
мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України

Автореферат розісланий "13" листопада 1994 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

Пуріш Л.М.

ЛНБ ім. В. Стефаніка  
АН України

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

*Актуальність проблеми.* Дріжджі - промислові мікроорганізми, які широко використовуються в багатьох біотехнологічних процесах. Зовсім недавно вони привернули увагу дослідників як перспективні продуценти гетерологічних білків. Напочатку системи експресії гетерологічних генів створювали для добре вивчених лікарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Однак, використання сахароміцетів як продуцентів гетерологічних білків пов'язане з рядом проблем [Romanos et al, 1992].

З розвитком технології трансформації чужорідної ДНК зростає число нетрадиційних видів, придатних для продукції гетерологічних білків. Серед них особливе місце займають метилотрофні дріжджі, що мають ряд переваг над сахароміцетами. Основною характеристикою метилотрофів є наявність унікальних ферментів метаболізму метанолу, гени яких містять сильні регульовані промотори. Так, ген алкогольоксидази (АОХ) в умовах індукції забезпечує синтез ферменту, який складає 30-40% від загальної кількості білку клітини [van Dijken et al., 1976]. Метилотрофні дріжджі досить добре вивчені з точки зору фізіології та біохімії, але в молекулярно-генетичному аспекті наші знання про ці мікроорганізми залишаються далеко неповними. Клоновано незначну кількість генів цих мікроорганізмів. Дуже мало відомо про регуляцію експресії генів, що кодуєть ферменти метаболізму метанолу, не розкриті її молекулярні механізми. Останнім часом метилотрофні дріжджі *Hansenula polymorpha* та *Pichia pastoris* інтенсивно використовують як об'єкт дослідження експресії гетерологічних генів [Cregg et al., 1987; Srekrishna et al., 1989; Clare et al., 1991; Janowicz et al., 1991; Fellingner et al., 1991;

Hodgkins et al., 1993]. Продуктивність синтезу чужорідних білків у клітинах метилотрофних дріжджів значно вища, ніж в *S. cerevisiae* [Puckholz & Gleeson, 1991].

*Мета та завдання досліджень.* З метою створення системи експресії гетерологічних генів на базі метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* у роботі ставилися такі основні завдання:

1. Селекція мутантів з пошкодженим геном алкогольоксидази як реципієнтів для клонування гену *AOX* і його промотора;
2. Вивчення трансформації *H. polymorpha* реплікативними та інтегративними векторами;
3. Структурно-функціональний аналіз промотора гену *AOX*;
4. Конструювання векторів для експресії гетерологічних генів під контролем промотора *AOX* в клітинах *H. polymorpha*.

*Наукова новизна роботи.* В роботі розроблено метод позитивної селекції мутантів метилотрофних дріжджів з пошкодженим синтезом ферментів метаболізму метанолу, зокрема алкогольоксидази. Вперше отримано мутант *H. polymorpha* з дефектним геном алкогольоксидази і використано його як реципієнтний штаб при клонуванні гену *AOX*.

На основі гену *AOX* створено ряд векторів для інтеграції в геном *H. polymorpha* і показано, що найчастіше така інтеграція відбувається в хромосомний локус *AOX* за рахунок гомологічної рекомбінації.

Показано, що *XhoI-SalI*-фрагмент плазмиди YEp13 з геном *LEU2* *S. cerevisiae* містить послідовності, що забезпечують автономну реплікацію плазмиди в клітинах *H. polymorpha*.

Сконструйовано човниковий вектор для експресії гену *lacZ* *Escherichia coli* під контролем промотора *AOX* *H. polymorpha*. Виявлено відмінності в регуляції експресії цього гену

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

*Актуальність проблеми.* Дріжджі - промислові мікроорганізми, які широко використовуються в багатьох біотехнологічних процесах. Зовсім недавно вони привернули увагу дослідників як перспективні продуценти гетерологічних білків. Напочатку системи експресії гетерологічних генів створювали для добре вивчених лікарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Однак, використання сахароміцетів як продуцентів гетерологічних білків пов'язане з рядом проблем [Romasios et al, 1992].

З розвитком технології трансформації чужорідної ДНК зростає число нетрадиційних видів, придатних для продукції гетерологічних білків. Серед них особливе місце займають метилотрофні дріжджі, що мають ряд переваг над сахароміцетами. Основною характеристикою метилотрофів є наявність унікальних ферментів метаболізму метанолу, гени яких містять сильні регульовані промотори. Так, ген алкогольоксидази (AOX) в умовах індукції забезпечує синтез ферменту, який складає 30-40% від загальної кількості білку клітини [van Dijken et al., 1976]. Метилотрофні дріжджі досить добре вивчені з точки зору фізіології та біохімії, але в молекулярно-генетичному аспекті наші знання про ці мікроорганізми залишаються далеко неповними. Клоновано незначну кількість генів цих мікроорганізмів. Дуже мало відомо про регуляцію експресії генів, що кодуєть ферменти метаболізму метанолу, не розкриті її молекулярні механізми. Останнім часом метилотрофні дріжджі *Hansenula polymorpha* та *Pichia pastoris* інтенсивно використовують як об'єкт дослідження експресії гетерологічних генів [Cregg et al., 1987; Sreekrishna et al., 1989; Clare et al., 1991; Janowicz et al., 1991; Fellingner et al., 1991;

Hodgkins et al., 1993). Продуктивність синтезу чужорідних білків у клітинах метилотрофних дріжджів значно вища, ніж в *S. cerevisiae* [Puckholz & Gleeson, 1991].

*Мета та завдання досліджень.* З метою створення системи експресії гетерологічних генів на базі метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* у роботі ставилися такі основні завдання:

1. Селекція мутантів з пошкодженим геном алкогольоксидази як реципієнтів для клонування гену *AOX* і його промотора;
2. Вивчення трансформації *H. polymorpha* реплікативними та інтегративними векторами;
3. Структурно-функціональний аналіз промотора гену *AOX*;
4. Конструювання векторів для експресії гетерологічних генів під контролем промотора *AOX* в клітинах *H. polymorpha*.

*Наукова новизна роботи.* В роботі розроблено метод позитивної селекції мутантів метилотрофних дріжджів з пошкодженим синтезом ферментів метаболізму метанолу, зокрема алкогольоксидази. Вперше отримано мутант *H. polymorpha* з дефектним геном алкогольоксидази і використано його як реципієнтний штам при клонуванні гену *AOX*.

На основі гену *AOX* створено ряд векторів для інтеграції в геном *H. polymorpha* і показано, що найчастіше така інтеграція відбувається в хромосомний домен *AOX* за рахунок гомологічної рекомбінації.

Показано, що *XhoI-SalI*-фрагмент плазмиди YEp13 з геном *LEU2* *S. cerevisiae* містить послідовності, що забезпечують автономну реплікацію плазмиди в клітинах *H. polymorpha*:

Сконструйовано човниковий вектор для експресії гену *lacZ* *Escherichia coli* під контролем промотора *AOX* *H. polymorpha*. Виявлено відмінності в регуляції експресії цього гену

в дріжджах *H. polymorpha* та *S. cerevisiae*.

Методом делеційного картування встановлено область промотора AOX, необхідну для ефективної експресії зчепленого гену та її регуляції, а також виявлено послідовності промотора, які, очевидно, виконують роль UAS-ів (upstream activating sequence).

Отримано мутанти *H. polymorpha* з порушеною глюкозою репресією синтезу  $\beta$ -галактозидази *E. coli*, ген якої знаходиться під контролем промотора AOX, у яких, очевидно, пошкоджено регуляторні ділянки промотора.

Використовуючи промоторну та термінаторку послідовності гену AOX, сконструйовано касету з унікальним сайтом рестрикції *BamHI* для експресії гетерологічних генів в клітинах *H. polymorpha*.

*Науково-практичне значення роботи.* Дослідження процесу трансформації метилотрофних дріждзів реплікативними та інтегративними векторами, вивчення структури промотора гену AOX та механізмів регуляції експресії зчеплених з ним генів доповнює наші знання в області молекулярної генетики і може послужити основою для розробки нових генно-інженерних підходів до вивчення метилотрофних дріждзів.

Створення касети для експресії гетерологічних генів під контролем сильного регульованого промотора AOX, яка інтегрує в геном *H. polymorpha*, відкриває перспективи отримання на базі цього виду метилотрофних дріждзів штамів-продуцентів промислово важливих білків.

*Апробація роботи та публікації.* Матеріали дисертації доповідалися чи були представлені на V Міжнародному симпозіумі з мікробного росту на C<sub>1</sub>-сполуках (Харев, 1988), XII

Міжнародному Симпозиумі з дріжджів (Веймар, 1987), V Всесоюзному з'їзді ВГГ'С ім. Н.І.Вавилова (Москва, 1987), IV Міжнародному конгресі з клітинної біології (Монреаль, 1988), XVI Міжнародній конференції з генетики та молекулярної біології дріжджів (Відень, 1992), VIII Міжнародному симпозиумі з дріжджів (Атланта, 1992), Міжнародному семінарі з метилотрофних дріжджів (Львів, 1992), VI Українському з'їзді генетиків і селекціонерів (Київ, 1992), I Міжнародному семінарі з ядерного матриксу (Вроцлав, 1994).

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 3 статті і 7 тез.

*Структура та об'єм роботи.* Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, викладення отриманих результатів та їх обговорення, висновків і списку літератури (джерел). Робота викладена на сторінках друкованого тексту, ілюстрована 13 таблицями і 13 малюнками.

#### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

В роботі використовували дріжджі: *Hansenula polymorpha* штам DL-1 356 (leu2); штам CBS-4732 (Російська колекція мікроорганізмів, м. Пушкіно) і його ауксотрофні мутанти 8v (leu2), B8 (ade2), B13 (ura3), 48v (ura3 leu2), HPB1 (ade2 leu2) (НВО "Біотехнологія", м. Москва); *Saccharomyces cerevisiae* 146α (ura3 his3 trp2 leu2) (Російська колекція мікроорганізмів, м. Пушкіно); бактерії *Escherichia coli* C600 (F<sup>-</sup> thi-1 tgr-1 leuB6 lacY1 tonA21 supE44 I<sup>-</sup>) і JM103 (D/lac pro/ thi strA supE endA sbcB hsdR<sup>-</sup> F' traD36 proAB lacJq ZDM15) (НВО "Біотехнологія", м. Москва).

Мікроорганізми культивували в стандартних середовищах YEFD, YNB, LB [Maniatis et al., 1982] та модифікованому середовищі Беркгольдера [Sibirny et al., 1987] на чашках Петри чи в колбах (пробірках) на шейкері (200 об/хв). Середовища для гібридизації та спорювання описані [Gleeson & Sudbery, 1988]. Мутагенез проводили за допомогою УФ-опромінення або N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину.

Плазмідну ДНК в бактерій виділяли за методом [Ish-Horowitz et al., 1981], ДНК дріжджів виділяли згідно методу [Sherman et al., 1986]. Гібридизацію за Саузерном, а також всі маніпуляції з ДНК *in vitro* проводили стандартними методами, описаними [Maniatis et al., 1982].

Бактерії трансформували за методикою з  $\text{CaCl}_2$  [Maniatis et al., 1982]; трансформацію дріжджів здійснювали в присутності іонів  $\text{Li}^+$  [Ito et al., 1983].

Активності ферментів тестували *in situ* в пермеабілізованих дигітоніном клітинах [Сибірний і Павловський, 1981] або в безклітинних екстрактах [Сибірний і др., 1987]. Визначали активності наступних ферментів:  $\beta$ -галактозидази якісно [Rose, Botstein, 1978] і кількісно [Мілдер, 1976]; аденозоблоксидази якісно [Сибірний і Титоренко, 1986] і кількісно [Sibirny et al., 1987]; каталази [Roggenkamp et al., 1974]; формальдегід- і форміатдегідрогенази [Shutte et al., 1976]; дегідроксиацетонкінази [van Dijken et al., 1978]; фруктозо-1,6-дифосфатази [van Dijken & Quayle, 1977]; аденозольдегідрогенази [Hou et al., 1982]. Питомі активності ферментів виражали в нмоль продукту (субстрату), утвореного (використаного) і мг білку (клітин) за 1 хв.

Концентрацію білку в безклітинних екстрактах визначали

за методом [Lowry et al., 1951]. Концентрацію клітин визначали турбідиметричним методом при 540 нм.

Білки безклітинних екстрактів дріжджів розділяли за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі (12,5 %) в тріс-гліциновому буфері, рН 8,0 в присутності 0,1 % додецилсульфату натрію. Для фарбування білків гель обробляли 0,25% -ним розчином Куїзсої G-25, виготовленим на суміші метанол-оцтова кислота-вода (5:1:5).

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Отримання мутантів *H. polymorpha* з пошкодженим геном алкогольоксидази та використання їх для клонування гену АОХ.

Ген АОХ дріжджів *H. polymorpha* був вибраний як джерело надзвичайно сильного промотора, під контролем якого експресія гену регулюється шляхом катаболітної репресії/дерепресії та індукції [Roggenkamp et al., 1984]. З метою клонування цього гену шляхом комплементації відповідної мутації ми розробили метод селекції реципієнтного штаму з пошкодженим структурним геном АОХ. В основі методу лежить здатність алкогольоксидази окислювати аліловий спирт до високо токсичного акролеїну. Передбачалося, що клітини з високою активністю цього ферменту при інкубації в середовищі з аліловим спиртом загинуть, а мутанти з пошкодженою алкогольоксидазою - виживуть. Оскільки метилотрофні дріжджі містять, окрім алкогольоксидази, декілька ізоформ алкогольдегідрогенази (ADH), котрі теж окислюють аліловий спирт [Хейнару и Кангур, 1983], спочатку отримали мутанти з пошкодженою ADH. Після двох етапів селекції серед резистентних до алілового спирту клонів штаму DL-1(358) було вибрано мутант А1-2, який слабо ріс в

середовищі з етанолом, а ріст на метанолі не був порушений. На третьому етапі селекції з цього штаму на середовищі, яке містило азидовий спирт (80ММ), форміат (50ММ) і гліцерин (1%), були відібрані мутанти, негодні утилізувати метанол. Зі 100 перевірених клонів виділено 4 штами, у яких з проаналізованих ферментів метаболізму метанолу була відсутньою лише активність алкогольоксидази (Табл. 1). Електрофоретичне розділення безклітинних екотрактів цих штамів виявило відсутність білкової фракції, що відповідає алкогольоксидазі.

Т А Б Л И Ц Я 1

Активність ферментів метаболізму метанолу у вихідного штаму А1-2 і аох мутантів.

Дріжджі вирощували в середовищі з глюкозою (1%) та інкубували в середовищі з метанолом (1%) протягом 16 год. АОХ - алкогольоксидаза, САТ - каталаза, FMD - формальдегіддегідрогеназа, FTD - форміатдегідрогеназа, DAK - дигідроксиацетонкіназа, FBF - фруктозо-1,6-дифосфатаза.

Штам	Активність, нмоль/хв/мг білку					
	АОХ	САТ*	FMD	FTD	DAK	FBF
A1-2	1230	2460	160	57	64	110
M15	0	1300	130	53	40	72
M18	0	2300	145	47	50	38
M44	0	1020	160	304	18	100
M96	0	2000	177	35	50	64

\* Активність виражали в нмоль/хв/мг білку.

З мутанта М18 були ізольовані температурочутливі ревертанти (ts), які росли на метанолі при 25°, але не при 43°. В клітинах ts-ревертантів, вирощених при пермісивній температурі, активність АОХ була на порядок нижчою, ніж у штаму А1-2, тоді як активності інших ферментів метаболізму метанолу залишалися без суттєвих змін. Виявилось, що алкогольоксидаза ts-ревертантів характеризувалася підвищеною термолабільністю в порівнянні з білком штаму А1-2 (Рис. 1). Отримані результати свідчили про пошкодження первинної структури алкогольоксидази ts-ревертантів. Логічно було допустити, що у них, а саме і мутанта М18, пошкоджено структурний ген алкогольоксидази. Можливо, нонсенс-мутація в кодуючій частині гену АОХ мутанта М18 блокувала транскрипцію на ранній стадії, в результаті чого не синтезувався білок.

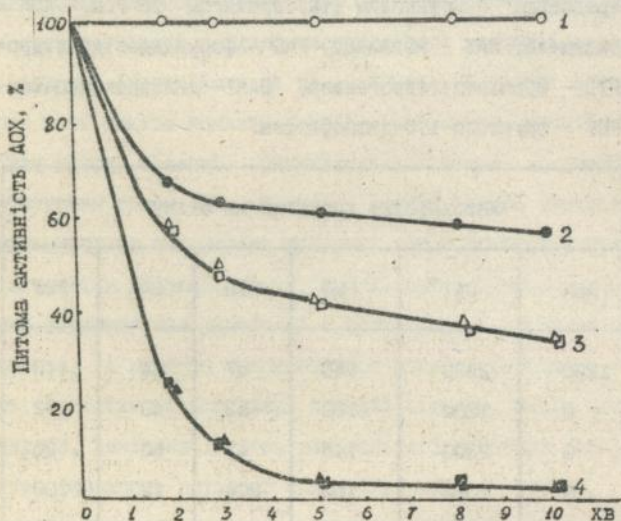


Рис. 1. Вплив попередньої інкубації на активність АОХ штаму А1-2 (1,2) і ts-ревертантів (3,4) при 45°C (1,3) і 53°C (2,4)

Мутант M18 використали як реципієнтний штам для клонування гену AOX. Попередньо з геномної бібліотеки *H. polymorpha* було виділено фрагмент ДНК, який гібридизував з олігонуклеотидом, комплементарним послідовності структурного гену AOX, яка на той час вже була відома [Ledeboer et al., 1985]. В результаті трансформації штаму M18 (*leu2 aox*) плазмідом, що містила фрагмент геному довжиною 11 т.п.о. і ген *LEU2 S. cerevisiae*, отримали клони, здатні рости в середовищі з метанолом, з активною алкогольоксидазою. Це остаточно доказало клонування гену AOX *H. polymorpha*.

## 2. Трансформація *H. polymorpha* реплікативними та інтегративними векторами.

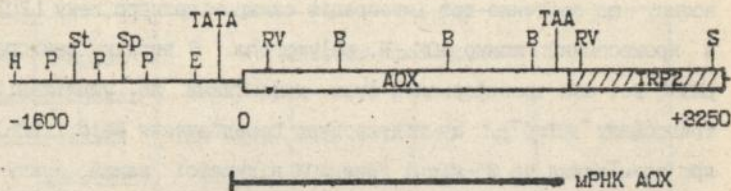
Раніше було показано, що деякі сахароміцетні вектори здатні трансформувати *H. polymorpha* [Тихомирова и Вельков, 1985; Gleeson et al., 1986; Roggenkamp et al., 1986]. Ми використовували плаزمіди, у яких в ролі послідовностей, що забезпечують автономну реплікацію (ARS), виступала 2 мкм ДНК. Виявилось, що тільки ті з них, які окрім 2 мкм ДНК містили *XhoI-SalI*-фрагмент (2,3 т.п.о.) геному *S. cerevisiae* з геном *LEU2* були здатні автономно реплікуватися в клітинах *H. polymorpha*. Частота трансформації штаму 48v кільцевим вектором YEp13 становила 10-20 клонів на 1 мкг ДНК. Стабільність таких трансформантів дорівнювала в середньому 80% після вирощування протягом 10 генерацій в багатому середовищі YEPD. Трансформація лінійним *XhoI-SalI*-фрагментом (2,3 т.п.о.) цього вектора супроводжувалася зростанням частоти трансформації на порядок. 1-5% трансформантів утворювали великі колонії, стабільність яких становила 100% після вирощування

протягом 10 генерацій в середовищі YEFD, а решта колоній були дрібними з дуже низькою стабільністю (<0,1%). *XhoI-SalI*-фрагмент, замкнений в кільце, теж трансформував клітини *H. polymorpha* з утворенням нестабільних  $Leu^+$  колоній. Ці дані свідчили про те, що, очевидно, при трансформації лінійним фрагментом плазмиди YEp13 в ряді випадків (стабільні клони) відбувається інтеграція його в геном *H. polymorpha* за рахунок негомологічної рекомбінації. Негомологічну рекомбінацію екзогенної ДНК в дріжджах *H. polymorpha* спостерігали також [Roggenkamp et al., 1986; Tikhomirova et al., 1986; Faber et al., 1992]. Поява нестабільних  $Leu^+$  колоній у випадку трансформації кільцевим фрагментом YEp13 свідчила про його автономну реплікацію. Це дозволило нам припустити, що в межах *XhoI-SalI* фрагменту геному *S. cerevisiae* з геном LEU2 знаходяться послідовності, здатні функціонувати в ролі ARS-ів в клітині *H. polymorpha*.

Ефективна експресія гетерологічного гену вимагає стабільної реплікації чужерідної ДНК в клітині. Найбільш надійним способом стабілізації є інтеграція її в геном. Для інтеграції ДНК у визначене місце геному використовують методи розщеплення та заміщення гену, в основі яких лежить гомологічна рекомбінація. Конструюючи інтегративні вектори, ми використали *HindIII-SacI*-фрагмент клонованого гену AOX *H. polymorpha* (Рис. 2).

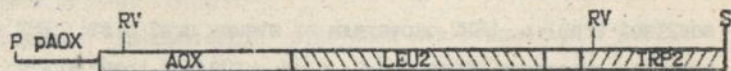
Вектор pMOX1 було отримано в результаті вклучення в *SalI* сайт кодуючої послідовності гену AOX гену LEU2 *S. cerevisiae*. Вектор pMOX3 отримали заміною *EcoRV*-фрагменту гену AOX на ген LEU2 *S. cerevisiae*. Штам HРВ1 трансформували лінійними фрагментами ДНК і відбирали  $Leu^+$  клони. Після

A

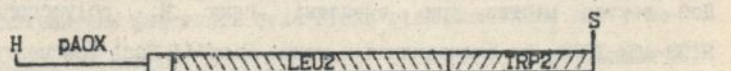


B

pMOX1



pMOX3



pHPM1

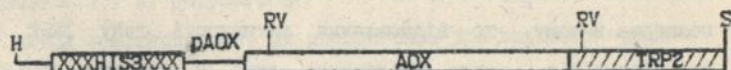


Рис.2. А. Фізична карта фрагменту ДНК з геном AOX, клонowanego Ledeboger et al. (1985).

В. Інтегративні вектори, сконструйовані на основі гену AOX.

H-HindIII; P-PstI; St-StuI; Sp-SphI; E-Eco473; RV-EcoRV; B-BglII; S-SacI.

трансформації спостерігали появу стабільних (1-5%) і нестабільних (<0,1%) клонів. Стабільні трансформанти мали Aox<sup>-</sup>фенотип, що свідчило про інтеграцію сахароміцетного гену LEU2 в хромосомний локус AOX *H. polymorpha*. У випадку вектора pMOX3 всі aox трансформанти були дефектними по утилізації триптофану (Trp<sup>-</sup>), що підтвердило передбачення Reid [1988] про розміщення на 3'-кінці гену AOX відкритої рамки зчитування, гомологічної гену TRP2 *S. cerevisiae*. Поява трансформантів з фенотипом Aox<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup> була незаперечним доказом гомологічної заміни AOX-TRP2 хромосомного локусу *H. polymorpha* на (aox-trp2)::LEU2 фрагмент вектора. Трансформант ade2(aox-trp2)::LEU2 окрестили зі штамом ura3 his3::LEU2 і отримали сегрегант HPE11 (ade2 his3::LEU2(aox-trp2)::LEU2), який послужив реципієнтом при трансформації вектором pHPM1. Цей вектор містив три зчеплені гени *H. polymorpha* HIS3-AOX-TRP2, що знаходилися в межах *HindIII-SacI*-фрагменту (Рис. 2). Ген HIS3 [Семенова и др., 1991] був вбудований в *StuI* сайт промотора гену AOX. Особливість даної конструкції полягала в тому, що відновлення активності гену TRP2 у трансформантів могло відбутися лише у випадку заміни (aox-trp2)::LEU2 хромосомного локусу на AOX-TRP2 послідовність вектора. Результати трансформації приведені в табл. 2. Дійсно, клони, відібрані за ознакою Trp<sup>-</sup>, містили активну AOX. До того ж, переважна більшість з них набули фенотипу His<sup>-</sup>. Це вказувало на інтеграцію гену HIS3 у складі вектора pHPM1 в геном. Гібридизація за Саузерном хромосомної ДНК таких трансформантів показала, що у них відбулася заміна шляхом подвійного кросинговеру aox-trp2 локусу реципієнтного штаму на послідовність вектора pHPM1. У трансформантів з фенотипом

Трансформація *H. polymorpha* НРВ11 вектором рНРМ1.

Селек- тивний маркер	Число проаналі- зованих клонів	Фенотип трансформантів			
		His <sup>+</sup> Trp <sup>+</sup> Aox <sup>+</sup>	His <sup>-</sup> Trp <sup>+</sup> Aox <sup>+</sup>	His <sup>+</sup> Trp <sup>-</sup> Aox <sup>+</sup>	His <sup>+</sup> Trp <sup>-</sup> Aox <sup>-</sup>
Trp	22	21	1	0	0
His	103	38	0	63	2

His<sup>-</sup>Trp<sup>+</sup>Aox<sup>+</sup> рекомбінація відбулася між генами AOX і TRP2, не зачепивши гену HIS3, який, очевидно, згодом елімінувався. Серед трансформантів, відібраних за ознакою His<sup>+</sup>, картина рекомбінантних фенотипів була більш різноманітною, але у переважачої більшості випадків (95%) інтеграція відбувалася в локус AOX. Ці дані свідчили про високу частоту гомологічної рекомбінації у *H. polymorpha*.

Метод заміщення гену ми використали для введення делецій та інсерцій в промотор AOX геному *H. polymorpha*.

**3. Вивчення експресії гетерологічного гену під контролем промотора AOX на моделі AOX-lacZ у дріжджах.**

Човниковий вектор рMG, що включав ген β-галактозидази (lacZ) *E. coli* під контролем промотора гену AOX *H. polymorpha*, отримали в результаті включення в полілінкер плазмідні YEp356R [Meurers et al., 1986] HindIII-EcoRI-фрагменту 5'-некодуючої області гену AOX (1,6 т.п.о.) і XhoI-SalI-фрагменту з геном LEU2 геному *S. cerevisiae* (Рис. 3). Частота

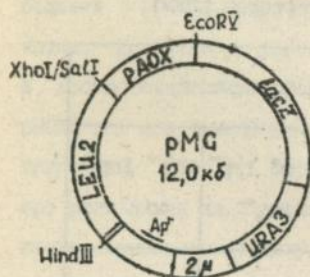


Рис.3. Схема вектора pMG з геном lacZ E. coli під контролем промотора AOX.

трансформації плазмідом pMG дріжджів *H. polymorpha* і *S. cerevisiae* становила 50-100 Leu<sup>+</sup> колоній на 1 мкг ДНК. До того ж, всі трансформанти містили β-GAL. Стабільність трансформантів після вирощування протягом 10 генерацій в неселективних умовах в середньому дорівнювала 80 % для *H. polymorpha* і 70 % для *S. cerevisiae*.

Т А Б Л И Ц Я 3

Активність β-галактозидази в дріжджах *H. polymorpha* і *S. cerevisiae* на різних джерелах вуглецю.

Дріжджі вирощували в середовищі з глюкозою, а потім інкубували в середовищі вказаного складу протягом 18 год.

Джерело вуглецю		Активність β-галактозидази, нмоль/хв/мг білку	
		<i>H. polymorpha</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Глюкоза	2 %	0	310
Без вуглецю		2500	1060
Гліцерин	2 %	950	3090
Метанол	1 %	13000	1050
Етанол	1 %	0	3100

В клітинах метилотрофних дріжджів експресія гену *lacZ* під контролем промотора *AOX* регулювалася таким же чином, як і експресія власного гену *AOX*, тобто шляхом глюкозної репресії/дерепресії та метанольної індукції (Табл. 3). Але на відміну від *H. polymorpha*, у *S. cerevisiae* метанол не індуктував синтезу  $\beta$ -GAL, а гліцерин та етанол не виступали в ролі репресорів. В той же час репресія синтезу  $\beta$ -GAL в присутності глюкози в обох видів свідчила про подібність механізмів глюкозної репресії у дріжджів. Отримані дані підтвердили попередні повідомлення [Gleeson & Sudbery, 1989; Сибирний и др., 1986] про те, що етанольна та глюкозна репресії синтезу ферментів метаболізму метанолу відбуваються різними шляхами.

#### 4. Структурно-функціональний аналіз промотора гену *AOX*.

З метою встановлення послідовностей, суттєвих для ефектної експресії гену та її регуляції, проведено делеційне картування промотора *AOX*. Делеції ділянок промотора в складі плазмиди pMG та інтегративних векторів отримували шляхом вирізання певних рестрикційних фрагментів або обробкою нуклеазою *Bal31*. Вплив делецій на експресію гену вивчали на моделі *AOX-lacZ* (див. розділ 3) або гаміною інтактного промотора *AOX* геному *H. polymorpha* на делеційні похідні методом заміщення гену (див. розділ 2). З таблиці 4 видно, що делеція другого *PstI*-фрагменту промотора, розміщеного між -1000 і -665 п.о., знижувала активність  $\beta$ -GAL на метанолі в 1,5 рази, тоді як вирізання двох *PstI*-фрагментів між -1000 і -403 п.о. привело до зменшення активності в 3 рази. Ми допустили, що з меж цих фрагментів знаходяться послідовності, що активують експресію (UAS). Делеції в промоторі справа від

Вплив делецій в промоторі АОХ на експресію гену *lacZ* *E.coli* Дріжджі вирощували в середовищі з глюкозою (2%), а потім інкубували 15 год без вуглецю (-С) або з метанолом (1%).

Вектор	Схема промотора АОХ і його делеційних похідних	Активність β-GAL нмоль/хв /мг білку										
		ГЛЮКОЗА	-С	МЕТАНОЛ								
pMG	<table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">P</td> <td style="text-align: center;">P</td> <td style="text-align: center;">P</td> <td style="text-align: center;">E</td> </tr> <tr> <td colspan="4" style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"></td> </tr> </table>	P	P	P	E					0	2500	13000
P	P	P	E									
pMGΔ1	<table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">P</td> <td style="text-align: center;">P</td> <td style="text-align: center;">P</td> <td style="text-align: center;">E</td> </tr> <tr> <td colspan="4" style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"></td> </tr> </table>	P	P	P	E					0	3000	9500
P	P	P	E									
pMGΔ2	<table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">P</td> <td style="text-align: center;">-885</td> <td style="text-align: center;">P</td> <td style="text-align: center;">E</td> </tr> <tr> <td colspan="4" style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"></td> </tr> </table>	P	-885	P	E					0	700	3500
P	-885	P	E									
pMGΔ3	<table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">-1000</td> <td style="text-align: center;">-403</td> <td style="text-align: center;">E</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"></td> </tr> </table>	-1000	-403	E				0	-	100		
-1000	-403	E										
pMGΔ4	<table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">-250</td> <td style="text-align: center;">E</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"></td> </tr> </table>	-250	E			0	-	92				
-250	E											
pMGΔ5	<table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">-310</td> <td style="text-align: center;">E</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"></td> </tr> </table>	-310	E			0	-	53				
-310	E											
pMGΔ6	<table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">-280</td> <td style="text-align: center;">E</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"></td> </tr> </table>	-280	E			0	-	30				
-280	E											
pMGΔ7	<table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">-270</td> <td style="text-align: center;">E</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"></td> </tr> </table>	-270	E			0	-	20				
-270	E											
47R	<table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">-260</td> <td style="text-align: center;">E</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"></td> </tr> </table>	-260	E			0	-	10				
-260	E											
	-98											

-403 п.о., отримані за допомогою нуклеази Bal31, супроводжувалися різким падінням активності  $\beta$ -GAL. Це свідчило про суттєву роль цієї ділянки промотора в експресії зчепленого гену.

Наші дані угоджуються з результатами, отриманими Ledeboger et al. [1985], які вказують на розміщення точки ініціації транскрипції на 105-115 п.о. вліво від кодону ATG, а на роль TATA-боксу пропонують TAAATT-послідовність в позиції -171 замість TATAAATA-послідовності, розміщеної в позиції -58.

Введення делецій та інсерцій в промотор AOX на хромосомі дозволило виключити вплив фактору копійності на рівень експресії гену (Табл. 5). Так, було встановлено, що делеція окремих PstI-фрагментів промотора (вектори р $\Delta$ 1 і р $\Delta$ 2) чи пошкодження їх структури шляхом інсерції гену HIS3 (в StuI сайт - вектор рHPM1 і в SphI сайт - вектор рHPM2), незначно знижує активність AOX. Але одночасне видалення обох PstI-фрагментів приводить до падіння активності AOX майже в 20 разів. Отримані дані підтвердили наше припущення про існування в промоторі AOX UAS-послідовностей. Ми передбачаємо, що UAS1 розміщений між -665 і -403 п.о., а UAS2 знаходиться в межах -1000 і -848 п.о. Подібне твердження про існування в межах PstI-фрагментів промотора AOX двох UAS-ів висловили Godecke & Hollenberg [1990].

Делеційним картуванням нам не вдалося встановити послідовностей промотора AOX, які би приймали участь в глюкозній чи етанольній репресії. З цією метою ми селекціонували мутанти з пошкодженою глюкозною репресією синтезу  $\beta$ -GAL, ген якої знаходився під контролем промотора AOX на плазміді рM3. На середовищі, яке містило лактозу (10%) - джерело вуглець,

ТАБЛИЦЯ 5

Вплив інсерцій і делецій в промоторі АОХ на експресію  
гену алкогольоксидази

Дріжджі вирощували в середовищі зі сумішшю гліцерину (2 %) і метанолу (1 %). P-PstI; Sp-SphI; St-StuI; E-EcoRI.

Вектор	Схема промотора АОХ інтегративного вектору	Активність АОХ	
		нмоль/хв/мг білку	
		глюкоза	метанол
wt (8v)		0	483
pHPM1		0	457
pHPMΔ1		0	440
pHPM2		0	405
pM		0	380
pMΔ1		0	273
pMΔ2		0	149
pMΔ3		0	27

і форміат - індуктор синтезу  $\beta$ -GAL, відібрали мутанти, ре-  
систентні до 2-дезоксиглюкози (175 мг/л). У більшості з них  
було пошкоджено глюкозну репресію синтезу як  $\beta$ -GAL, так і  
AOX. Мутації такого типу мали рецесивний характер і, очевид-  
но, відбулися в транс-діючих генах, які приймають участь в  
глюкозній репресії синтезу ферментів метаболізму метанолю.  
Лише у 2-х штамів (15-2 і 15-9) на глюкозі спостерігалася  
часткова дерепресія синтезу  $\beta$ -GAL, але не AOX (Табл.6). Було  
встановлено, що ці мутації домінують і знаходяться в цю-

Т А Б Л И Ц Я 6

Активність  $\beta$ -галактозидази і алкогольоксидази у  
вихідного штаму HPG і мутантів з пошкодженою  
глюкозною репресією

Дріжджі вирощували в середовищі з глюкозою (1%), а потім  
інкубували 16 год в середовищі без джерела вуглецю (-C) чи  
з метанолом (1%). Активність виражали в нмоль/хв/мг білку.

Штам	Глюкоза		-C		Метанол	
	$\beta$ -GAL	AOX	$\beta$ -GAL	AOX	$\beta$ -GAL	AOX
HPG	1,3	0	241	65	4780	1070
15-2	7,7	0	1920	58	15400	950
15-9	14,0	0	3170	64	21300	520
1L	8,0	0	871	175	7780	800
5L	4,4	0	1350	66	14060	430
7L	15,0	0	284	116	2970	240
18L	2,1	0	254	81	4450	200

положенні по відношенню до гену *lacZ*. Крім мутантів, резистентних до 2-дезоксиглюкози, ми відібрали штами, здатні рости в середовищі з лактозою без індуктора (L-мутанти), у яких рівень активності  $\beta$ -GAL на глюкозі від 3 до 15 раз перевищував рівень вихідного штаму. Ми передбачаємо, що у виділених нами мутантів пошкоджено ділянки промотора AOX, які приймають участь в глюкозній репресії. Остаточним доказом цього буде оіквенування таких промоторів.

**Б. Конструювання касети для експресії гетерологічних генів під контролем промотора AOX в клітинах *H. polymorpha*.**

Як приклад гетерологічної експресії продемонстровано експресію гену поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) в клітинах *H. polymorpha*. Для цього створено вектор, що містив ген HBsAg під контролем промотора AOX (Рис.4). Ген HB/ауw субтипу було клоновано в лабораторії Гібадуліна Р.А. Інституту вірусології ім. Д.І.Івановського РАМН. *HpaI*-фрагмент вірусної ДНК (1084 п.о.), що відповідав кодуючій послідовності S-антигену без про-частин, включали в *BamHI* сайт вектора pB1, який містив промотор довжиною 540 п.о. і 3'-нетранслючу область гену AOX (ген TRP2) *H. polymorpha* (вектор pHES3). Далі *BamHI-SacI*-фрагмент цього вектора замінили на *EgII-SacI*-фрагмент гену AOX з термінатором транскрипції (вектор pHES4). Після цього в *EcoRI* сайт гену TRP2 ввели селективний маркер - ген LEU2 *S. cerevisiae*. Отримали вектор pHES5. *SacI*-фрагментом цього вектора трансформували штам *H. polymorpha* 8v і відбирали  $Leu^+$  клони, які тестували на присутність HBsAg імунологічно. При періодичному культивуванні на суміші гліцерину (2%) і метанолу (0,5%) 5іль-

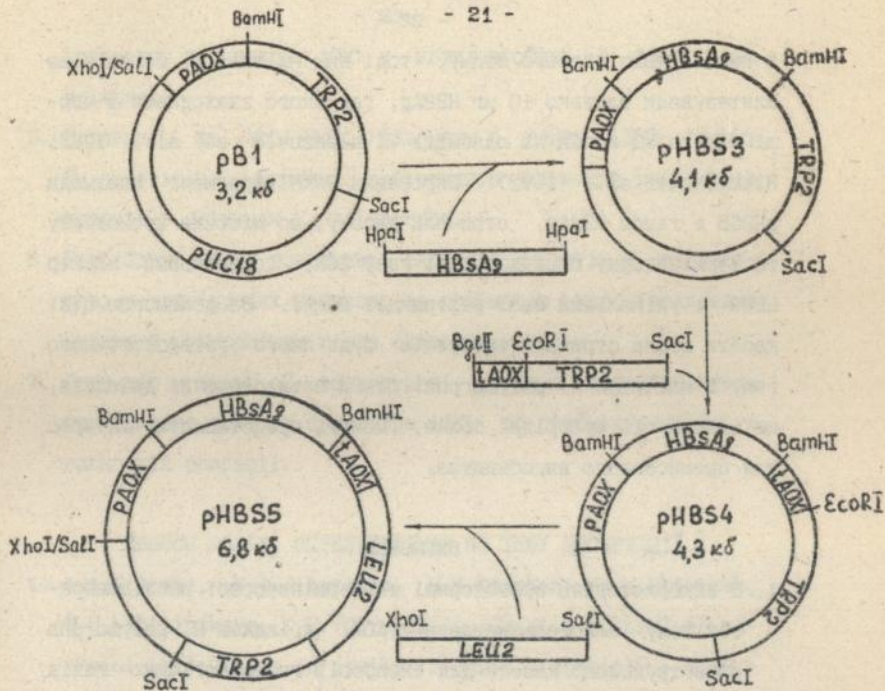


Рис. 4. Конструювання вектора з геном HBsAg під контролем промотора AOX.

ність клонів продукувала 50-100 мкг антигену на 1 г клітинного білку, і тільки 1-2 % клонів синтезувало 10-20 мг продукту на 1 г білку. Гібридизацією за Саузерном ДНК, виділеної з найбільш активних трансформантів, було показано, що у них ген HBsAg інтегрував в геном в числі 2-3-х копій. Для порівняння, Janowicz et al. [1991] в клітинах *H. polymorpha* отримали 1,5-2,0 мг, а Cregg et al. [1987] в *P. pastoris* отримали 23 мг HBsAg на 1 г білку при інтеграції вірусної ДНК

в геном реципієнтного штаму, тоді як клітини *S. cerevisiae* синтезували близько 10 мкг HBsAg, ген якого знаходився в числі більше 50 копій на плазміді [Valenzuela et al., 1982; Nitzeman et al., 1993]. Вирізавши *Bam*HI-фрагмент плазміді pHB55 з геном HBsAg, отримали касету, що містила промоторну та термінаторну послідовності гену AOX, селективний маркер LEU2 і унікальний сайт рестрикції *Bam*HI. За допомогою цієї касети можна отримати експресію будь-якого гетерологічного гену в клітинах *H. polymorpha*. Штами метилотрофних дріжджів, що синтезують чужорідні білки, можуть представляти інтерес для промислового виробництва.

#### ВИСНОВКИ

1. З використанням промоторної та термінаторної послідовностей гену алкогольоксидази (AOX) дріжджів *H. polymorpha* сконструйовано касету для експресії гетерологічних генів у клітинах цих дріжджів.
2. Отримано експресію генів  $\beta$ -галактозидази (*lacZ*) *E. coli* і поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg), що знаходяться під контролем промотора AOX, в клітинах *H. polymorpha*.
3. Делеційним картуванням промотора гену AOX встановлено, що послідовність промотора між -403 і -88 п.о. необхідна для ефективної експресії в умовах дерепресії/індукції, а також достатня для глюкозної та етанольної репресії в клітинах *H. polymorpha*. Області промотора між -1000 і -848 п.о. і -493 і -403 п.о., очевидно, містять послідовності, що активують експресію (UAS).
4. Виявлено відмінності в регуляції експресії гену *lacZ* під

контролем промотора АOX у метилотрофних і пекарських дріжджак.

5. Показано, що *XhoI-SalI*-фрагмент з геном LEU2 геному *S. cerevisiae*, здатний забезпечити автономну реплікацію плазмід в клітинах *H. polymorpha*.
6. Розроблено метод позитивної селекції мутантів *H. polymorpha*, неутилізуючих метанол, за допомогою якого ізольовано мутант з пошкодженим геном алкогольоксидази.
7. Отримано мутанти *H. polymorpha*, у яких передбачається пошкодження ділянок промотора АOX, що приймають участь в глекосній репресії.

#### СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. A.A.Sibirny, V.I.Titorenko, M.V.Gonchar, V.M.Ubiyvovk, G.P.Ksheminskaya, O.P.Vytvytskaya. Genetic control of methanol utilization in yeasts//J.Basic Microbiol. - 1988. - v.5. - p.293-319.
2. 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. - т. 58, вып. 5. - с.751-759.
3. Грачева В.Д., Михайлов В.М., Щедрин А.В., Витвицкая О.П., Семенова В.Д. Предпосылки к созданию системы экспрессии генов в метилотрофных дрожжах *Hansenula polymorpha*. Клонирование гена метанолоксидазы//Сборник научных трудов ВНИИСЭНТИ. - М., 1990. - т. 1. - с. 5-12.
4. Витвицкая О.П., Злочевский М.Л., Вебуров М.Ю. Структурно-функциональный анализ промотора гена АOX метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha*//Подано до друку.

Витвицкая О.П. Конструирование системы гетерологичной экспрессии с использованием промотора гена алкогольоксидазы на базе метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha*.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.23. - биотехнология, Институт микробиологии и вирусологии им.Д.К.Заболотного НАН Украины, Киев, 1994 год.

Исследована возможность применения метилотрофных дрожжей *H. polymorpha* в качестве продуцентов гетерологичных белков. Используя промоторную и терминаторную последовательности гена алкогольоксидазы (АОХ) *H. polymorpha*, сконструирован вектор, содержащий уникальный сайт рестрикции, для экспрессии гетерологичных генов в клетках метилотрофных дрожжей. Исследована трансформация *H. polymorpha* репликативными и созданными на базе гена АОХ интегративными векторами. Проведен структурно-функциональный анализ промотора гена АОХ и установлены области, активирующие экспрессию. Получена экспрессия генов *lacZ* *Escherichia coli* и HBsAg в метилотрофных дрожжах.

Ключевые слова: дріжджі, промотор, гетерологічна експресія.

контролем промотора AOX у метилотрофних і пекарських дріжджак.

5. Показано, що *XhoI-Sali*-фрагмент з геном LEU2 генотипу *S. cerevisiae*, здатний забезпечити автономну реплікацію плазмід в клітинах *H. polymorpha*.
6. Розроблено метод позитивної селекції мутантів *H. polymorpha*, неутилізуючих метанол, за допомогою якого ізольовано мутант з пошкодженим геном алкогольоксидази.
7. Отримано мутанти *H. polymorpha*, у яких передбачається пошкодження ділянок промотора AOX, що приймають участь в глюкозній репресії.

#### СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. A.A.Sibirny, V.I.Iitorenko, M.V.Gonchar, V.M.Ubiyovok, G.P.Ksheminskaya, O.P.Vytvytskaya. Genetic control of methanol utilization in yeasts//J.Basic Microbiol. - 1988. - v.5. - p.293-319.
2. 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. - т. 58, вып. 5. - с.751-759.
3. Грачева В.Д., Михайлов В.М., Щадрин А.Б., Витвицкая О.П., Семенова В.Д. Предпосылки к созданию системы экзпрессии генов в метилотрофных дрожжах *Hansenula polymorpha*. Клонирование гена метанооксидазы//Сборник научных трудов ВНИИСЭНТИ. - М., 1990. - т. 1. - с. 5-12.
4. Витвицкая О.П., Злочевский М.Л., Бебуров М.Ю. Структурно-функциональный анализ промотора гена AOX метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha*//Подано до друку.

Витвицкая О.П. Конструирование системы гетерологичной экспрессии с использованием промотора гена алкогольоксидазы на базе метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha*.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.23. - биотехнология, Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины, Киев, 1994 год.

Исследована возможность применения метилотрофных дрожжей *H. polymorpha* в качестве продуцентов гетерологичных белков. Используя промоторную и терминаторную последовательности гена алкогольоксидазы (AOX) *H. polymorpha*, сконструирован вектор, содержащий уникальный сайт рестрикции, для экспрессии гетерологичных генов в клетках метилотрофных дрожжей. Исследована трансформация *H. polymorpha* репликативными и созданными на базе гена AOX интегративными векторами. Проведен структурно-функциональный анализ промотора гена AOX и установлены области, активирующие экспрессию. Получена экспрессия генов *lacZ* *Escherichia coli* и *MBsag* в метилотрофных дрожжах.

Ключевые слова: дріжджі, промотор, гетерологічна експресія.

Vytvytska O.P. **Creation of the heterologous expression system using the alcohol oxidase gene promoter on the base of the methylotrophic yeast Hansenula polymorpha.**

Thesis to obtain the candidate of biological sciences in the speciality 03.00.23. - biotechnology, Zabolotny Institute of microbiology and virology, Ukrainian National Academy of Sciences, Kyiv, 1994.

The possibility of the use of the methylotrophic yeast *H. polymorpha* as the producer of heterologous proteins has been investigated. Using promoting and terminating sequences of the alcohol oxidase gene (AOX), the vector with the unique restriction site for the heterologous gene expression in the methylotrophic yeast cells has been constructed. The transformation of the *H. polymorpha* by replicative and integrative vectors has been researched. The structural and functions' analysis of the AOX gene promoter has been done and the upstream activating sequences have been established. The expression of the *lacZ* Escherichia coli and the HBsAg genes in the methylotrophic yeast has been recieved.

Ав 31.134

**Ав 31.134**

Безкоштовно

ПІДПИСАНО ДО ДРУКУ 11.10.94. ФОРМАТ ПАПЕРУ 60x84 1/16  
ПАПІР ГАЗЕТНИЙ. ДРУК ОФІСНИЙ. БЕЗКОШТОВНО.  
ДРУКАРСЬКИХ ЛИСТІВ 1. ЗАМ. 837. ТИРАЖ 100.

---

РОТОПРИТ ЛЬВІВСЬКОГО ЦНТІ. ВУЛ. 700-РІЧЧЯ ЛЬВОВА, 57.