

О. П. Витвицкая, М. Л. Злочевский, М. Ю. Бебуров

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА АЛКОГОЛЬОКСИДАЗЫ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ *HANSENULA POLYMORPHA*

Исследовано влияние делеций в промоторе гена алкогольоксидазы (АОХ) на экспрессию генов *lacZ* *Escherichia coli* и АОХ *H. polymorpha*. Показано, что область между -403 п. о. и кодоном АТГ промотора АОХ абсолютно необходима для транскрипции гена и ее регуляции в метилотрофных дрожжах. Установлено присутствие в промоторе участков, активирующих экспрессию. Обнаружены различия в регуляции экспрессии гена, находящегося под контролем промотора АОХ, в дрожжах *H. polymorpha* и *Saccharomyces cerevisiae*.

Введение. В последнее время за рубежом широко ведутся работы по созданию штаммов — продуцентов гетерологичных белков на базе метилотрофных дрожжей [1—3]. Главное преимущество их перед традиционными сахаромецетами состоит в наличии сильных промоторов уникальных генов, кодирующих ферменты метаболизма метанола. Так, промотор гена алкогольоксидазы (рАОХ) — первого фермента окисления метилового спирта — способен обеспечить синтез алкогольоксидазного белка в количестве, равном 30 % общего белка клетки [4]. Кроме того, он является строгорегулируемым промотором, осуществляющим репрессию/дерепрессию и индукцию транскрипции сцепленного гена [5].

Изучение структурно-функциональных характеристик промоторов дрожжевых генов занимает значительное место в выяснении механизмов регуляции их транскрипции. Довольно хорошо изучены промоторы таких дрожжевых генов, как *CYC1* и *CYC7* [6], *GAL1* — *GAL10* [7], *ADH2* [8] и др. Так, для многих из них установлено наличие UAS-последовательностей, связывающихся с позитивными факторами регуляции (активаторами), и URS-последовательностей, участвующих в репрессии [9—11].

Структурная часть гена АОХ *H. polymorpha* вместе с 5'-некодирующей областью клонированы в 1985 г.; установлена их нуклеотидная последовательность [12]. Но структура промотора, его роль в регуляции изучены еще недостаточно. Пока в литературе было единственное сообщение о картировании регуляторных последовательностей промотора АОХ [13].

В представленной работе сделана попытка методом делеционного анализа установить области промотора гена АОХ, отвечающие за активацию и репрессию транскрипции гена β -галактозидазы, на модели рАОХ-*lacZ*, а также в хромосомном локусе гена АОХ.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы дрожжей *H. polymorpha* CBS4732 8v (*leu2*), HPB (*ade2*, *his3*, *trp2*, *aox*⁻) и *S. cerevisiae* 146a (*ura3*, *his3*, *trp2*, *leu2*); бактерий *E. coli* C600 (*F*⁻, *thi-1*, *tgr-1*, *leuB6*, *lacY1*, *tonA21*, *supE44*, λ ⁻) и JM103 (Δ /*lac pro*/, *thi*, *strA*, *supE*, *endA*, *sbcB*, *hsdR*⁻, *F'*, *traD36*, *proAB*, *lacJ*^c, *ZAM15*).

Дрожжи, выращивали в стандартных средах YPD или YNB с добавлением аминокислот (50 мг/л) и источника углерода (как указано в тексте). Бактерии выращивали в среде LB с добавлением, если это

необходимо, ампициллина (100 мг/л) [14]. Культивирование проводили либо на чашках Петри, либо в колбах на качалке при 37 °С для *E. coli* и *H. polymorpha*, или 28 °С для *S. cerevisiae*. Плотные среды содержали агар — 20 г/л.

Плазмидную ДНК из *E. coli* выделяли по методу [15]; ДНК дрожжей — согласно методу [16].

Бактерии трансформировали по методике с CaCl_2 [17], а дрожжи — в присутствии ионов Li^+ [18].

Гибридизацию дрожжевой ДНК с меченым зондом осуществляли по Саузерну. Зонд получали ник-трансляцией, как описано там же [14].

Таблица 1

Активность β -галактозидазы в дрожжах в присутствии разных источников углерода

Источник углерода	Активность, нмоль·мин ⁻¹ × ×мг белка ⁻¹	
	<i>H. polymorpha</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Глюкоза (2 %)	0	310 ± 30
Без углерода	2500 ± 150	1060 ± 50
Глицерин (2 %)	950 ± 50	3080 ± 50
Метанол (1 %)	13000 ± 800	1050 ± 40
Этанол (1 %)	0	3100 ± 80

Примечание. Дрожжи выращивали в среде с глюкозой до середины лог-фазы и затем инкубировали в среде указанного состава в течение 15 ч.

Активности ферментов β -галактозидазы и АОХ определяли в дрожжевых колониях на чашках Петри [19, 20] или в бесклеточных экстрактах [21, 22]. При этом были проанализированы, как минимум, два клона. Экстракты получали разрушением клеток при помощи стеклянных шариков на вибраторе. Удельные активности ферментов выражали в нмоль продукта (субстрата), образованного (расходо-ванного) 1 мг белка за 1 мин. Белок определяли по Лоури с соавт. [23].

В работе использовали рестриктазы, нуклеазу *Bal31*, ДНК-лигазу, ДНК-полимеразу I производства НПО «Фермент» (Вильнюс).

Результаты и обсуждение. Для изучения влияния делеций на экспрессию гена, находящегося под контролем промотора АОХ в плазмиде, был сконструирован вектор *pMG*, содержащий *pAOX-lacZ* конструкцию. Исходная плаزمида *YEp356R* включала ген *lacZ E. coli*, кодирующий β -галактозидазу, ген *URA3 S. cerevisiae*, 2 мкм ДНК, фрагмент бактериальной плазмиды, содержащий ген устойчивости к ампициллину и *ori*-сайт [24]. Вектор *pMG* получили вставкой в полилинкер плазмиды *YEp356R HindIII-EcoRI*-фрагмента 5'-некодирующей области гена АОХ [25] и гена *LEU2 S. cerevisiae*. Частота трансформации плазмидой *pMG* дрожжей была 50—100 *Leu*⁺ колоний на 1 мкг ДНК. Все трансформанты содержали β -галактозидазу. Стабильность их после выращивания на протяжении 10 генераций в неселективных условиях составляла 90 % для *H. polymorpha* и 75 % для *S. cerevisiae*.

В клетках метилотрофных дрожжей экспрессия гена *lacZ* под контролем промотора АОХ регулировалась так же, как и экспрессия собственного гена АОХ, т. е. глюкозной и этанольной репрессией/дерепрессией и метанольной индукцией (определяли по окрашиванию колоний на чашках Петри, содержащих разные источники углерода). В отличие от *H. polymorpha*, в клетках *S. cerevisiae* глюкоза полностью не репрессировала синтез β -галактозидазы, а глицерин и этанол индуцировали его (табл. 1). Эти данные указывают на различия в механизмах экспрессии генов под контролем промотора АОХ в метилотрофных и пекарских дрожжах.

В работе [12] высказано предположение о том, что регуляторные элементы промотора АОХ расположены между *PstI*-сайтами, поскольку эта область содержит последовательности двойной симметрии, способные образовывать петельные структуры. Поэтому план исследований заключался в последовательном делетировании *PstI*-фрагментов промотора и изучении влияния делеций на активность β -галактозидазы. Плазмиды *pMGΔ2* с делецией двух *PstI*-фрагментов была получена расщеплением плазмиды *pMG* рестриктазой *PstI* с последующим

сшиванием «липких» концов ДНК-лигазой. Плазмиду *pMGΔ1* получили в результате встраивания первого *PstI*-фрагмента, элюированного из геля, в *PstI*-сайт вектора *pMGΔ2*. Для исследования области промотора, расположенной справа от *PstI*-сайтов, плазмиду *pMGΔ2*, расщепленную *PstI*, обрабатывали в течение разного времени нуклеазой *Bal31*. При этом получили набор векторов с делециями промотора разной длины (*pMGΔ3* — *pMGΔ7*). Вектор *47R* с укороченным до 98 п. о. промотором образован в результате замены *HindIII-EcoRI*-фрагмента плазмиды *pMG* на *Eco473-EcoRI*-фрагмент промотора с последующей вставкой гена *LEU2*. Набором полученных векторов трансформировали штамм 8v. Влияние делеций на экспрессию гена *lacZ* изучали по активности β-галактозидазы (табл. 2). Из данных, представленных в табл. 2, следует, что полученные нами делеции в промоторе АОХ снижают активность β-галактозидазы в условиях derepressии и метанольной индукции, но не влияют на глюкозную репрессию. Удаление одного из двух *PstI*-фрагментов приводило к некоторому снижению уровня экспрессии гена *lacZ*, в то время как делетирование области между —403 и —98 п. о. сопровождалось резким падением активности β-галактозидазы.

Поскольку ген *lacZ* находился в плазмиде, можно было допустить влияние иных факторов (не только делеций) на его экспрессию. Чтобы исключить это, мы получили делеции промотора в хромосомном ло-

Таблица 2

Влияние делеций в промоторе АОХ на экспрессию гена *lacZ*, кодирующего β-галактозидазу *E. coli*

Вектор	Схема промотора АОХ и его делеционных производных	Активность β-галактозидазы, нмоль·мин ⁻¹ ·мг белка ⁻¹		
		Глюкоза	-С	Метанол
<i>pMG</i>		0	2500±150	13000±800
<i>pMGΔ1</i>		0	3000±150	9500±500
<i>pMGΔ2</i>		0	700±50	3500±100
<i>pMGΔ3</i>		0	-	100±12
<i>pMGΔ4</i>		0	-	92±5
<i>pMGΔ5</i>		0	-	53±5
<i>pMGΔ6</i>		0	-	30±3
<i>pMGΔ7</i>		0	-	20±1
<i>47R</i>		0	-	10±1

Примечание. Дрожжи выращивали в среде с глюкозой (2%) и затем инкубировали в среде с метанолом (1%) или без источника углерода (-С) в течение 15 ч. Прочерк означает отсутствие активности при качественном определении на чашках Петри.

кусе гена АОХ с помощью ряда интегративных векторов. Интегративные векторы были сконструированы на базе гена АОХ *H. polymorpha*. Они содержали структурную часть гена АОХ вместе с его фланкирующими последовательностями. В 5'-области векторов *pHPM1* и *pHPM2* располагался дополнительно ген *HIS3 H. polymorpha*, встроенный в *StuI*- (*pHPM1*) или *SphI*-сайт (*pHPM2*) промотора гена АОХ. На 3'-конце всех интегративных векторов находился ген *TRP2*, делегированный в хромосомном локусе АОХ-*TRP2* реципиентного штамма НРВ. Делеции промотора АОХ в составе интегративного вектора *pM* получали аналогично таковым в плазмиде *pMG*. В случае трансформации штамма НРВ векторами *pHPM1* и *pHPM2* большинство клонов имело фенотип *His⁺Trp⁺Aox⁺*, а в случае вектора *pM* и его делеционных производных — фенотип *Trp⁺Aox⁺*. Методом гибридизации по Саузерну было доказано, что вектор *pHPM1* интегрировал в хромосомный локус АОХ-*TRP2 H. polymorpha*. Влияние инсерций и делеций на экспрессию гена АОХ изучали по активности АОХ (табл. 3). Эти данные подтверждают результаты, полученные на модели *pAOX-lacZ*, о том, что удаление *PstI*-фрагментов промотора АОХ сопровождается снижением уровня экспрессии сцепленного гена. Это позволяет предположить наличие в пределах *PstI*-фрагментов промотора АОХ последовательностей, играющих роль UAS-ов, активирующих транскрипцию. Наши данные согласуются с сообщением [13], указывающим на наличие позитивно действующих элементов в промоторе гена АОХ *H. polymorpha*. Изучив влияние делеций на экспрессию гена β-лактамазы, сцепленного с промотором АОХ, а также метилирование различных областей промотора, авторы утверждают, что UAS1 расположен между —505 и —472 п. о. и содержит последовательность TCCTTGCACCGCAA, а

Таблица 3
Влияние инсерций и делеций в промоторе АОХ на экспрессию гена алкогольоксидазы

Вектор	Схема промотора АОХ интегративного вектора	Активность алкогольоксидазы, ¹ нмоль·мин ⁻¹ ·мг белка ⁻¹	
		Глюкоза	Метанол
wL(8V)		0	463±35
pHPM1		0	342±20
pHPM2		0	360±20
pM		0	405±25
pMΔ1		0	273±18
pMΔ2		0	140±15
pMΔ3		0	27±2

Примечание. Дрожжи выращивали в среде со смесью глицерина (2%) и метанола (1%) до середины лог-фазы.

UAS2 локализован в рамках —732——715 п. о. и состоит из TCGAGGTCGTGG. UAS1-подобная последовательность (с единственной заменой 5-го Т на С) обнаружена в гене каталазы (CAT) *H. polymorpha* в положении от —415 до —401 п. о. [26]. Поскольку экспрессия генов АОХ и САТ регулируется также кислородом, было высказано предположение о том, что UAS1 также участвует в O₂-зависимой регуляции этих генов [13].

Из данных табл. 2 следует, что участок промотора между —403 и —98 п. о. имеет существенное значение для транскрипции, так как делеции в этой области приводят к резкому падению уровня экспрессии сцепленного гена, а промотор длиной 98 п. о. (вектор 47R) почти не способен обеспечить экспрессию. Одним из возможных объяснений этого факта может быть предположение, высказанное авторами работы [12], о том, что роль ТАТА-бокса в гене АОХ играет последовательность ТАААТТ, расположенная в позиции —171, а не Golberg-Hogness-последовательность, которая находится в позиции —56 [12]. Это предположение базируется на данных S₁-картирования промотора, указывающих на размещение точки инициации транскрипции на 105 п. о. влево от АТГ.

Большую значимость области промотора АОХ, расположенной между UAS-последовательностями и ТАТА-боксом, можно объяснить исходя из модели, предложенной в работе [10], согласно которой ДНК между ТАТА-боксом и UAS-ми образует петлю. Это обеспечивает стерическое взаимодействие активаторов, связанных с UAS-ми, с транскрипционными факторами, связанными с РНК-полимеразой, необходимое для инициации транскрипции. Возможно, последовательность промотора АОХ вправо от —403 п. о. существенна для образования такой петлевой структуры. Иным объяснением важной роли этой последовательности промотора может быть наличие в ее пределах сайтов связывания с факторами, непосредственно активирующими транскрипцию в условиях дерепрессии и/или индукции.

Для другого вида метилотрофных дрожжей *P. pastoris* было установлено, что последовательность, локализованная на 180 п. о. влево от ТАТА-бокса гена АОХ, абсолютно необходима для высокого уровня экспрессии в среде с метанолом, а также глюкозной репрессии. Эта же последовательность, независимо от ориентации и расстояния, вызывала метанольную индукцию и глюкозную репрессию гена *HIS3 P. pastoris* [27].

В работе [13] возможный сайт связывания промотора АОХ *H. polymorpha* с репрессором постулирован между —925 и —895 п. о. Полученные нами данные о делеции этой области отрицают высказанное предположение. По-видимому, сайты связывания с репрессором промотора АОХ расположены справа от —403 п. о., но они не могли быть картированы с помощью нашей модели из-за отсутствия в делеционных производных, обработанных нуклеазой *Bal31*, UAS-ов, необходимых для инициации транскрипции. Сайты связывания с репрессором (URS) между UAS-последовательностями и ТАТА-боксом установлены для генов GAL-системы (GAL1 и GAL4) [11].

Выводы. Таким образом, в результате делеционного анализа промотора гена АОХ установлено, что последовательность между —403 п. о. (от АТГ) и точкой инициации трансляции (АТГ) играет важную роль в транскрипции сцепленного гена в условиях дерепрессии/индукции, а также глюкозной и этанольной репрессии в дрожжах *H. polymorpha*. Слева от этой области до —1000 п. о., очевидно, расположены UAS-последовательности, активирующие экспрессию гена. URS-сайты, участвующие в репрессии, нами не обнаружены. Высказано предположение о том, что они находятся справа от —403 п. о.

Авторы благодарны проф. А. А. Сибирному за обсуждение результатов работы.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ АНАЛІЗ ПРОМОТОРНОЇ
ОБЛАСТІ ГЕНА АЛКОГОЛЬОКСИДАЗИ МЕТИЛОТРОФНИХ
ДРІЖДЖІВ *HANSENULA POLYMORPHA*

Резюме

Досліджено вплив делецій в промоторі гена АОХ на експресію генів *lac Z Escherichia coli* і АОХ *H. polymorpha*. Показано, що область між —403 п. о. і кодоном АТГ промотора АОХ абсолютно необхідна для транскрипції гена і її регуляції у метилотрофних дріжджах. Встановлено присутність у промоторі ділянок, активуючих експресію. Виявлено відмінності в регуляції експресії генів, що знаходяться під контролем промотора АОХ, у дріжджах *H. polymorpha* і *Saccharomyces cerevisiae*.

O. P. Vitvitskaya, M. L. Zlochevskii, M. Yu. Beburov

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF METHYLOTROPHIC
YEAST *HANSENULA POLYMORPHA* ALCOHOL OXYDASE GENE PROMOTER

Summary

The influence of deletions in the AOX promoter on the *Escherichia coli lacZ* and the *H. polymorpha* AOX gene expression has been studied. It was shown, that the region between —403 bp and ATG codon is absolutely necessary for gene transcription and its regulation in the methylotrophic yeasts. The upstream activating sequences (UAS_s) of the AOX promoter have been determined. The differences of gene expression regulation under the control of the AOX promoter in the yeast *H. polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae* have been found.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Cregg J. M., Vedvick T. S., Raschke W. C. Recent advances in the expression of the foreign genes in *Pichia pastoris* (Review) // *Bio/Technology*.—1993.—11.—P. 905—910.
2. Janovich A. Z., Melber K., Merckelbach A. et al. Simultaneous expression of the S and L surface antigens of hepatitis B, and formation of mixed particles in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // *Yeast*.—1991.—7.—P. 431—443.
3. Veale R. A., Guiseppin M. L. F., Van Eijk H. M. J. et al. Development of a strain of *Hansenula polymorpha* for the efficient expression of guar α -galactosidase // *Ibid.*—1992.—8.—P. 361—372.
4. Veenhuis M., Van Dijken J. P., Harder W. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeast // *Adv. Microbiol. and Physiol.*—1983.—24.—P. 1—82.
5. Roggenkamp R., Janovicz Z., Stanikowsky B., Hollenberg C. P. Biosynthesis and regulation of the peroxisomal methanol oxidase from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // *Mol. and Gen. Genet.*—1984.—194.—P. 489—493.
6. Pfeiffer K., Prezani T., Guarente L. Yeast HAP1 activator binds to two upstream activation sites of different sequence // *Cell*.—1987.—49.—P. 19.
7. West G. R. W., Yocum R. R., Ptashne M. *Saccharomyces cerevisiae* GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UAS_s // *Mol. and Gen. Biol.*—1984.—4.—P. 2467.
8. Beier D. B., Sledziewski A., Young E. T. Deletion analysis identifies a region, upstream of the *ADH2* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which is required for *ADR1*-mediated derepression // *Ibid.*—1985.—5.—P. 1743—1749.
9. Bram R. J., Kornberg R. Specific protein binding to far upstream activating sequences in polymerase II promoters // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1985.—82.—P. 43.
10. Guarente L. UAS_s and enhancers: common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals // *Cell*.—1988.—52.—P. 32.
11. Nehlin J. O., Carlberg M., Ronne H. Control of yeast *GAL* genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response // *EMBO J.*—1991.—10, N 11.—P. 3373—3377.
12. Ledeboer A. M., Maat J., Visser C. et al. Molecular cloning and characterization of a gene coding for methanol oxidase in *Hansenula polymorpha* // *Nucl. Acids. Res.*—1985.—13.—P. 3063—3082.
13. Godecke S., Hollenberg C. P. *In vitro* and *in vivo* DNA: protein interactions at the MOX-promoter of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // *Abstr. of 15th Int. conf. on yeast genet. and mol. biol.*—Banff, 1990.—P. 280.
14. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. *Molecular cloning. A laboratory manual.*—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982.—250 p.

15. *Ish-Horowicz D., Burke J. F.* Rapid and efficient cosmid vector cloning // Nucl. Acids Res.—1981.—9.—P. 2989.
16. *Sherman F., Fink G. R., Hicks I. B.* Methods in yeast genetics, a laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1986.—280 p.
17. *Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.* Molecular cloning. A Laboratory manual.—Ibid, 1989.
18. *Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A.* Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations // J. Bacteriol.—1983.—153.—P. 163—168.
19. *Rose M., Botstein D.* Construction and use of gene fusion to *lacZ* (*bGal*) that are expressed in yeast // Meth. Enzymol.—1983.—101.—P. 167—181.
20. *Сибирный А. А., Титоренко В. И.* Метод качественного определения алкогольоксидазы и каталазы в дрожжевых колониях // Укр. биохим. журн.—1986.—58, № 5.—С. 65—68.
21. *Miller J. L.* Experiments in molecular genetics.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1972.—324 p.
22. *Sibirny A. A., Titorenko V. I., Efremov B. D., Tolstorukov I. I.* Multiplicity of mechanisms of carbon catabolite repression involved in the synthesis of alcohol oxidase in the methylotrophic yeast *Pichia pinus* // Yeast.—1987.—3.—P. 233.
23. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem.—1951.—193.—P. 265—275.
24. *Myers A. M., Tzagoloff A., Kinney D. M., Lusty C. J.* Yeast shuttle and integrative vectors with multiply cloning sites suitable for construction of *lacZ* fusion // Gene.—1986.—45.—P. 299—310.
25. *Грачева В. В., Михайловер В. М., Щедрик А. В. и др.* Предпосылки к созданию системы экспрессии генов в метилотрофных дрожжах *Hansenula polymorpha*. Клонирование гена метанолоксидазы // Биотехнология—медицине и народному хозяйству: Сб. науч. тр. ВНИИСЭНТИ.—М.; 1990.—С. 5—12.
26. *Didion T., Roggenkamp R.* Deficiency of peroxisome assembly in a mutant of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // Curr. Gen.—1990.—7.—P. 113—117.
27. *Buckholz R., Lin Y.-C., Koutz P.* Upstream sequences required for methanol/glucose regulation of the *P. pastoris* alcohol oxidase gene // Abstr. of 13th Int. conf. on yeast gen. and mol. biol.—Banff, 1986.—Vol. 2.—P. 45.

Отд-ние регулятор. систем клетки Ин-та биохимии
им. А. В. Палладина НАН Украины, Львов

Получено 18.10.94