

Конструювання штамів — надпродуцентів формальдегіддегідрогенази метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha*

О. М. Демків, С. Я. Парижак, О. С. Красовська, О. В. Стасик, Г. З. Гайда, А. А. Сибірний, М. В. Гончар

Інститут біології клітини НАН України
Вул. Драгоманова, 14/16, Львів, 79005, Україна
E-mail: gonchar@biochem.lviv.ua

*Для генно-інженерного конструювання надпродуцента глутатіонзалежної формальдегіддегідрогенази (ФдДГ) обрано термотолерантні метилотрофні дріжджі *H. polymorpha* NCYC 495 (*leu1-1*). Ген *FLD1* з власним промотором введено у плазмиду інтегративного типу *pUT1*, яка містила ген *LEU2* *Saccharomyces cerevisiae*, з подальшим включенням цього гена у геном штаму-реципієнта *leu1-1*. Здійснено селекцію інтегративних трансформантів за ознаками прототрофності по лейцину та резистентності до підвищених концентрацій формальдегіду (до 15 мМ) у ростовому середовищі. Визначено оптимальні умови культивування штамів для досягнення максимального рівня синтезу ФдДГ. Відібрано кращий трансформант як перспективний продуцент ФдДГ з активністю до 4 мкмоль · хв⁻¹ · мг⁻¹ білка у безклітинному екстракті.*

*Ключові слова: глутатіонзалежна формальдегіддегідрогеназа, метилотрофні дріжджі *Hansenula polymorpha*, генно-інженерне конструювання.*

Вступ. Формальдегід (ФА) відіграє ключову роль у метаболізмі метанолу, оскільки є першим продуктом окислення метанолу та ключовим метаболітом у точці розгалуження дисимілятивних і асимілятивних гілок метилотрофного обміну [1]. ФА має здатність спонтанно реагувати з багатьма біологічно активними сполуками, в тому числі білками і нуклеїновими кислотами, спричинюючи їхню хімічну модифікацію та інактивацію, що зумовлює високу токсичність цієї сполуки [2, 3]. Водночас відомо, що ФА — це універсальний природний метаболіт, який утворюється в живих клітинах у реакціях деметилювання (при каталізі деметилазами і специфічними пероксидазами) і метилювання, при біотичному (індукованому вірусами) та хіміч-

ному стресах, а також в умовах теплового шоку [4]. На прикладі ракових клітин [4] і тканин рослин [5] показано, що ФА може виступати як один із медіаторів апоптозу — програмованої загибелі клітин. Вміст цього метаболіту різко підвищується (на 5—10 тисяч відсотків) у листях дерев перед їхнім осіннім опаданням. Ці дані стимулюють інтерес дослідників різного профілю до проблеми вивчення ролі ФА в біологічних системах, і метилотрофні дріжджі можуть слугувати зручною моделлю для подібних досліджень.

На сьогодні для метилотрофних дріжджів уже відомо кілька ефективних механізмів підтримання цитозольного пулу ФА на нетоксичному рівні — від компартименталізації реакції його утворення у спеціальних органелах (пероксисомах) до активного синтезу низки комплексуючих агентів і ферментів, здатних перетворювати ФА у нетоксичні продукти

© О. М. ДЕМКІВ, С. Я. ПАРИЖАК, О. С. КРАСОВСЬКА,
О. В. СТАСИК, Г. З. ГАЙДА, А. А. СИБІРНИЙ,
М. В. ГОНЧАР, 2005

(глутатіон, формальдегіддегідрогеназа, неспецифічна альдегіддегідрогеназа, формальдегідредуктаза, алкогольоксидаза, дигідроксіацетонсинтаза) [6, 7].

Моніторинг вмісту ФА в біологічних рідинах і харчових продуктах, стічних водах та інших відходах виробництва є життєво необхідним, оскільки ФА є відомим подразником, мутагеном та ймовірним канцерогеном [8]. ФА — дуже небезпечна для здоров'я сполука, навіть у концентрації, близькій до норми. Він подразнює слизові оболонки очей, верхніх дихальних шляхів, дуже активно сенсibiliзує шкіру, відіграє важливу патогенетичну роль у розвитку клінічних ускладнень діабету [9].

Розробка селективних, високочутливих, надійних та простих методів для швидкого і недорогого експрес-аналізу ФА є актуальним завданням аналітичної біотехнології. Пошук та конструювання мікробних продуцентів ферментів, які беруть участь у метаболізмі ФА, є одним з етапів виконання цього завдання.

Метою даної роботи був пошук та генетичне конструювання дріжджових продуцентів глутатіонзалежної формальдегіддегідрогенази (ФдДГ).

Матеріали і методи. У роботі використано штам генетичної лінії: *H. polymorpha* 356 (*leu2*) лінії DL1 (дикий тип), люб'язно переданий для досліджень д-ром Л. П. Тихоміровою (Пушино, РФ). Використовували також штами дріжджів з колекції Інституту біології клітини НАН України: *H. polymorpha* NCYC 495 (*leu1-1*), *H. polymorpha* CBS 4732 (*leu2-2*) *H. anomala* (Д-84), *H. polymorpha* K-105 (*gcr1*, *cat*) (Д-81) [10], *Pichia fermentas* (Д-38), *Rhodotorula pilimanae* (Д-76), *Saccharomyces cerevisiae* S-288C (Д-57); термотолерантний штам *S. cerevisiae* IZR-42 (Д-101), виділений з Еволюційного Каньйону, люб'язно наданий проф. Е. Нево (Хайфа, Ізраїль); штами *Kluyveromyces lactis* Y-762, *K. thermotolerans* Y-894, отримані з ВКМ (Москва, РФ). Крім того, використано штами *Pichia guilliermondii* ATCC 9058; *Schizosaccharomyces pombe*, отримані з колекції кафедри мікробіології Львівського національного університету ім. І. Франка (Україна).

Дріжджі вирощували на синтетичному середовищі, яке містило (г/л): KH_2PO_4 — 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 3,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; CaCl_2 — 0,1, зі стандартною кількістю мікроелементів та 0,05 %-м дріжджовим екстрактом [7]. Джерелом вуглецю слугували глюкоза (1 або 2 %) чи метанол (1 %). У середовище при необхідності додавали лейцин — до

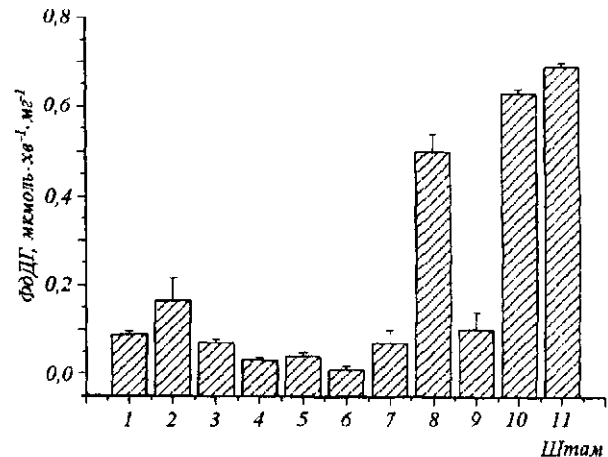


Рис. 1. Скринінг штамів дріжджів за рівнем активності глутатіонзалежної формальдегіддегідрогенази (ФдДГ) у безклітинних екстрактах. Дріжджі вирощували в синтетичному середовищі з 1 %-ю глюкозою та 0,75 %-м дріжджовим екстрактом. Штами: 1 — *Pichia guilliermondii* 9058H; 2 — *P. fermentas*; 3 — *Rhodotorula pilimanae*; 4 — *Saccharomyces cerevisiae* S-288C; 5 — *S. cerevisiae* IZR-42; 6 — *Kluyveromyces lactis*; 7 — *H. anomala*; 8 — *H. polymorpha* 356; 9 — *H. polymorpha* K-105; 10 — *H. polymorpha leu2-2*; 11 — *H. polymorpha leu1-1*

концентрації 40 мг/л. Клітини вирощували у пробірках або колбах об'ємом 250 мл на круговому шейкері (200 об/хв) за температури 30 °С. Оптичну густину дріжджових культур вимірювали турбідиметрично на фотоелектроколориметрі КФК-2МП і за допомогою калібрувальної кривої визначали їхню суху біомасу в 1 мл середовища.

Для конструювання вектора використовували ген *FLD1* *H. polymorpha* [11, 12] та плазмиду *pYT1*, люб'язно надані Дж. Креггом (Інститут вищих студій Кека, США). Плазмідну ДНК з клітин *Escherichia coli* виділяли методом [13]. Дріжджові клітини трансформували методом електропорації [14]. Ефективність трансформації/інтеграції оцінювали за кількістю колоній (у перерахунку на 1 мг ДНК), які виростили на агаризованому синтетичному середовищі з 2 %-ю глюкозою, без додавання дріжджового екстракту і лейцину. Селекцію інтегративних трансформантів здійснювали за лейциновою прототрофністю. Фенотипову стабільність рекомбінантних штамів досліджували, вирощуючи їх за неселективних умов протягом 10 генерацій та повторно переносючи з багатого агаризованого середовища (YPD) на мінімальне, з 2 %-ю глюкозою.

Відмиті від середовища клітини руйнували на планетарному гомогенізаторі (діаметр скляних кульок складав 0,5 мм, 1000 об/хв, $r_{\text{сер}} = 10$ см, 6 хв, 4 °С). Безклітинні екстракти відокремлювали від

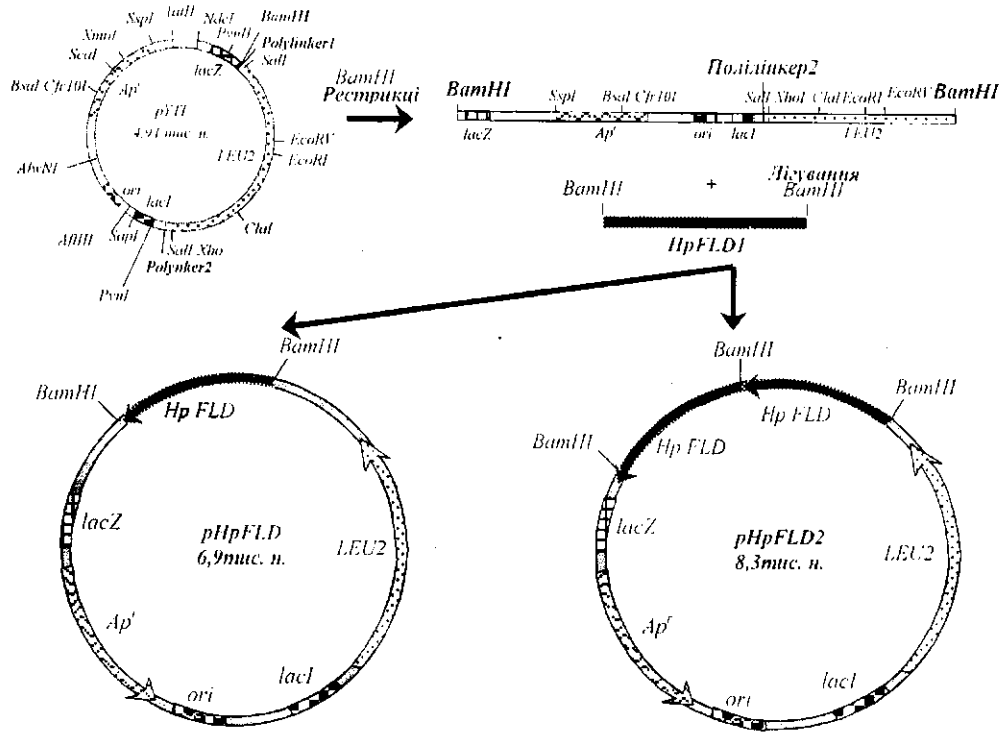


Рис. 2. Схема конструювання інтегративних плазмід *pHpFLD* і *pHpFLD2* з однією і двома вставками гена *FLD1* відповідно

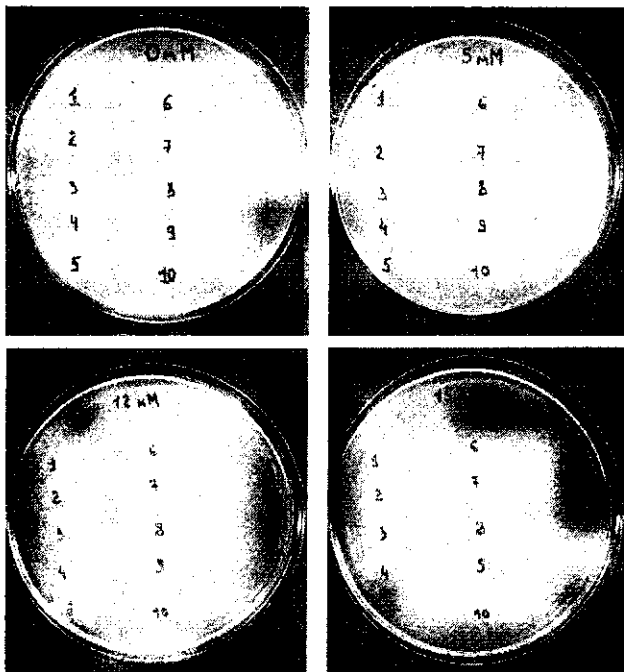


Рис. 3. Аналіз чутливості/резистентності вихідного штаму *H. polymorpha leu1-1* та його трансформантів (Тf) до формальдегіду на синтетичному середовищі, яке містило 1 %-й метанол та різні концентрації ФА (0, 5, 12 і 15 мМ). Штами: 1 — NCYC 495 *leu 1-1*; 2 — Tf 11-12; 3 — Tf 11-2; 4 — Tf 11-6; 5 — Tf 11-3; 6 — Tf 11-19; 7 — Tf 11-34; 8 — Tf 11-36; 9 — Tf 11-38; 10 — Tf 11-112

уламків клітин центрифугуванням (15000 *g*, $r_{\text{сеп}} = 8$ см, 15 хв, 4 °C). Загальну активність ФдДГ визначали у безклітинних екстрактах спектрофотометрично при 340 нм за швидкістю утворення NADH у 50 мМ фосфатному буфері, рН 8,0, за присутності 2 мМ глутатіону, 1 мМ ФА і 1 мМ NAD⁺, а неспецифічну — за тих же умов, але без додавання ФА. Питому активність (ПА) ФдДГ (мкмоль · хв⁻¹ · мг⁻¹ білка) вираховували за різницею: $ПА_{\text{ФдДГ}} = ПА_{\text{ФА}} - ПА_{\text{ФА}}$.

Результати і обговорення. Для вибору оптимального штаму-реципієнта, придатного для конструювання продуцентів глутатіонзалежної ФдДГ, здійснювали скринінг низки штамів дріжджів за ознакою підвищеного синтезу ФдДГ. Для цього клітини дріжджів вирощували за однакових неспецифічних умов до середини логарифмічної фази, отримували безклітинні екстракти і визначали в них загальну активність ФдДГ (рис. 1). Як видно з цього рисунку, здатність до підвищеного синтезу цільового ферменту порівняно з іншими штамами була притаманна одному з представників термо-лерантних метилотрофних дріжджів — *H. polymorpha* NCYC 495 (*leu1-1*). Цей штам і було взято за основу для генетичного конструювання дріжджових продуцентів глутатіонзалежної ФдДГ.

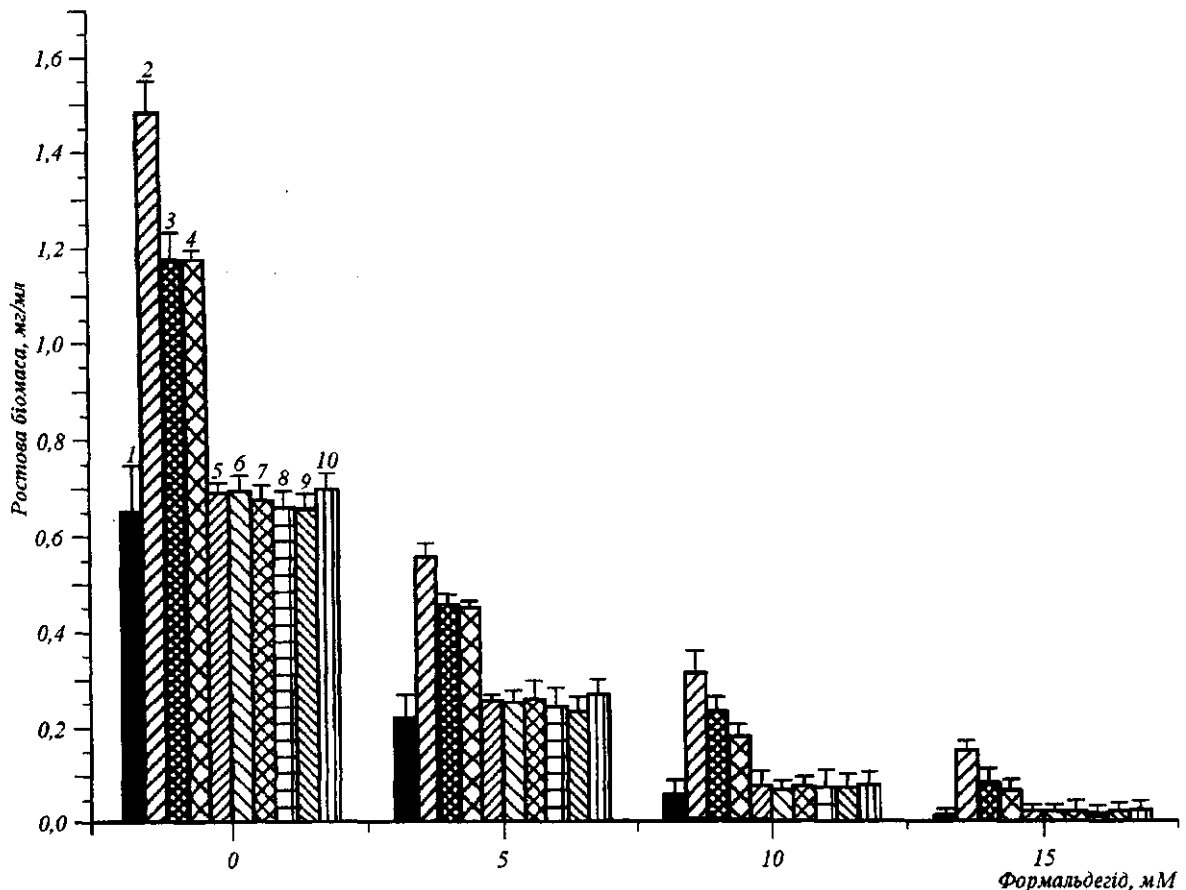


Рис. 4. Ростова біомаса вихідного штаму *H. polymorpha leu1-1* та його трансформантів (Tf) за три доби вирощування у синтетичному середовищі, яке містило 1 %-й метанол та різні концентрації формальдегіду. Штами: 1 — *leu1-1*; 2 — Tf 11-6; 3 — Tf 11-3; 4 — Tf 11-2; 5 — Tf 11-19; 6 — Tf 11-112; 7 — Tf 11-36; 8 — Tf 11-38; 9 — Tf 11-34; 10 — Tf 11-12

Для одержання векторів фрагмент плазмід *pKO7* з геном *FLD1* *H. polymorpha* із власним промотором у різній копійності (1—2) було інтегровано (О. С. Красовська, неопубліковані дані) у плазмід *pYT1*, лінеаризовану по сайту рестрикції *BamHI*, яка містила ген *LEU2* *S. cerevisiae* (як селективний маркер). Схему конструювання плазмід представлено на рис. 2. Плазмід містили одну (*pHpFLD1*; 6,9 тис. нуклеотидів) або дві (*pHpFLD2*; 8,9 тис. нуклеотидів) вставки гена *FLD1* *H. polymorpha*.

Продукти глутатіонзалежної ФдДГ конструювали, трансформуючи отримані плазмід в хромосомну ДНК штаму-реципієнта *H. polymorpha leu1-1*. Ефективність трансформації/інтеграції штаму *leu1-1* обома векторами була приблизно однаковою — $2 \cdot 10^3$ колоній на 1 мкг ДНК. Для подальшого відбору найкращих продуцентів цільового ферменту ми обмежили коло досліджень аналізом трансформантів, сконструйованих з використанням

плазмід *pHpFLD2*, яка містила дві вставки гена *FLD1* *H. polymorpha*.

Отримані прототрофні за лейцином трансформанти досліджували на резистентність до підвищених концентрацій ФА в агаризованому ростовому середовищі (джерелом вуглецю слугував 1 %-й метанол). Далі відібрали 50 трансформантів, резистентних до 10 мМ ФА, у яких вивчали генетичну стабільність за збереженням прототрофності до лейцину та резистентності до ФА. Хоча *pHpFLD2* не містить специфічної послідовності ARS для *H. polymorpha*, однак відомо, що сахароміцетний ген *LEU2* має у клітинах цього виду слабку ARS-активність. Дев'ять трансформантів, які виявилися фенотипово стабільними при вирощуванні за неселективних умов протягом 10 генерацій, було використано для подальшого аналізу.

На рис. 3 показано здатність досліджуваних трансформантів рости на агаризованому середовищі при підвищених концентраціях ФА: три з дев'яти

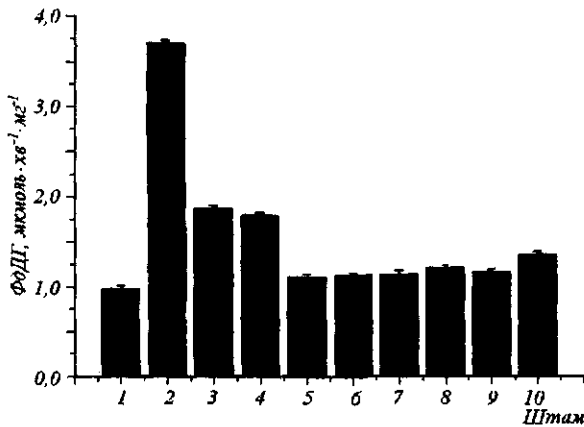


Рис. 5. Питома активність формальдегідегідрогенази (ФдДГ) у безклітинних екстрактах штаму *N. polymorpha leu1-1* і його трансформантів (Тф). Клітини кожного штаму вирощували до однакової біомаси (~1 мг/мл) у синтетичному середовищі, яке містило 1 %-й метанол. Штами: 1 — *leu 1-1*; 2 — Тф 11-6; 3 — Тф 11-3; 4 — Тф 11-2; 5 — Тф 11-19; 6 — Тф 11-112; 7 — Тф 11-36; 8 — Тф 11-38; 9 — Тф 11-34; 10 — Тф 11-12

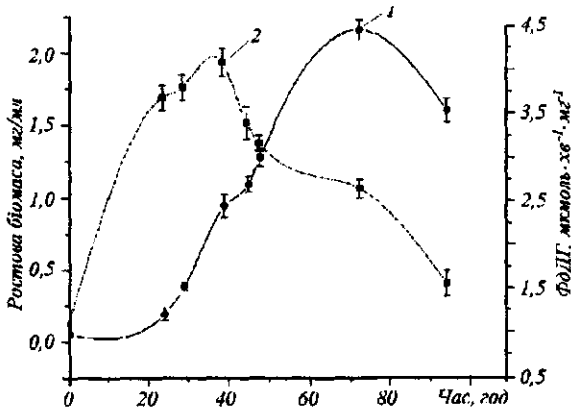


Рис. 6. Ростова біомаса та питома активність формальдегідегідрогенази (ФдДГ) при вирощуванні трансформанта Тф 11-6 на синтетичному середовищі, яке містило 1 %-й метанол

трансформантів росли при 12 мМ ФА, а один — при 15 мМ ФА.

Відібрані трансформанти аналізували на резистентність до ФА у рідкому середовищі. Проводили вимірювання ростової біомаси культури дріжджів при різних концентраціях ФА за три доби росту. На рис. 4 подано ростові характеристики трансформантів і вихідного штаму. Найрезистентнішими виявилися штами Тф 11-2, Тф 11-3 і Тф 11-6. Вони краще росли як в агаризованому, так і в рідкому середовищі з підвищеними концентраціями ФА (5–15 мМ).

На наступному етапі відбору трансформантів визначали питому активність ФдДГ у безклітинних екстрактах досліджуваних штамів. Штами вирощували протягом доби на синтетичному середовищі, яке містило 1 %-й метанол. Аналіз активності глутатіонзалежної ФдДГ у безклітинних екстрактах трансформантів показав, що їм притаманна підвищена активність ферменту порівняно з вихідним штамом.

Як видно з рис. 5, активність ФдДГ у штамів Тф 11-3 і Тф 11-2 була в два рази вищою відносно вихідного штаму *leu1-1*, а у трансформанта Тф 11-6 — її рівень зростав більше, ніж утричі. Оскільки у трансформанта Тф 11-6 виявлено найвищу активність ФдДГ, подальші дослідження проводили саме з ним.

При визначенні активності ФдДГ у безклітинних екстрактах трансформанта Тф 11-6 у динаміці росту дріжджів (рис. 6) показано, що найвищу активність ФдДГ спостерігали у ранній логарифмічній фазі росту. Такі умови вирощування трансформанта Тф 11-6 (синтетичне середовище з 1 %-м метанолом та 0,05 %-м дріжджовим екстрактом, температура 30 °С, концентрація клітин не вище 1 мг/мл) було обрано як оптимальні для отримання біомаси — джерела подальшого виділення та очищення цільового ферменту — ФдДГ.

Трансформанти Тф 11-3, Тф 11-2 і Тф-11-6 — перспективні надпродуценти ФдДГ — зберігали в середовищі YPD у присутності 30 %-го гліцерину за температури -70 °С протягом 8 місяців. За таких умов зберігання клітини трансформантів не втрачали своїх властивостей щодо резистентності до підвищених концентрацій ФА та здатності до надсинтезу ФдДГ.

Таким чином, у ході проведеної роботи створено стабільні генно-інженерні надпродуценти дріжджової глутатіонзалежної ФдДГ. Досліджено оптимальні умови культивування трансформантів для забезпечення максимального рівня синтезу ФдДГ і їхнього зберігання. Це надасть можливість розробити прості і водночас ефективні схеми очищення цільового ферменту, який буде використано для розробки ензиматичних та біосенсорних методів визначення ФА.

Автори вдячні за фінансову підтримку роботи INTAS (грант 03-51-6278) і NATO (Linkage grant LST.NUKR.CLG 980621).

O. M. Demkiv, S. Ya. Paryzhak, E. S. Krasov's'ka, O. V. Stasyk,
G. Z. Gayda, A. A. Sibirny, M. V. Gonchar

Construction of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* strains
over-producing formaldehyde dehydrogenase

Summary

The thermotolerant methylotrophic yeast *H. polymorpha* NCYC 495 (*leu1-1*) was chosen for genetic construction of the strain, over-producing glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (FdDH). *FLD1* gene with its own promoter was inserted into an integrative plasmid pYT1 containing *LEU2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* (as a selective marker) and the constructed vector was used for multi-copy integration of the target gene into genome of *leu1-1* recipient cells. Selection of the strains was carried out by leucine prototrophy, as well as by resistance to elevated concentrations of formaldehyde in the medium (up to 15 mM). The optimal cultivation conditions for the selected strains were established which resulted in maximal synthesis of the target enzyme. The best recombinant strain was chosen as a perspective over-producer of FdDH (with the protein activity of 4 $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ in cell-free extract).

Key words: glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase, methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*, genetic construction.

О. М. Демкив, С. Я. Парижак, Е. С. Красовская,
О. В. Стасык, Г. З. Гайда, А. А. Сибирный, М. В. Гончар

Конструирование штаммов — сверхпродуцентов
формальдегиддегидрогеназы метилотрофных
дрожжей *Hansenula polymorpha*

Резюме

Для генно-инженерного конструирования сверхпродуцента глутатионзависимой формальдегиддегидрогеназы (ФдДГ) выбраны термотолерантные метилотрофные дрожжи *H. polymorpha* NCYC 495 (*leu1-1*). Ген *FLD1* с собственным промотором был введен в плазмиду интегративного типа pYT1, содержащую ген *LEU2* *Saccharomyces cerevisiae*, с последующим включением целевого гена в геном штамма-реципиента *leu1-1*. Проведена селекция интегративных трансформантов по признакам прототрофности по лейцину и резистентности к повышенным концентрациям формальдегида (до 15 mM) в ростовой среде. Определены оптимальные условия культивирования штаммов для достижения максимального уровня синтеза ФдДГ. Выбран лучший трансформант как перспективный продуцент ФдДГ (с активностью до 4 мкмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка в бесклеточном экстракте).

Ключевые слова: глутатионзависимая формальдегиддегидрогеназа, метилотрофные дрожжи *Hansenula polymorpha*, генно-инженерное конструирование.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Nonconventional Yeasts in Biotechnology: a Handbook* / Ed. K. Wolf.—Berlin; Heidelberg; New York: Springer, 1996.—P. 203—253; 277—291; 293—311.
2. Aggelis G., Margariti N., Kralli C., Flouri F. Growth of *Candida boidinii* on methanol and the activity of methanol-degrading enzymes as affected from formaldehyde and methyl-formate // *Biotechnology*.—2000.—80.—P. 119—125.
3. *Formaldehyde* // Environmental Health Criteria 89.—Geneva: World Health Organization, 1989. (Польський переклад: *Formaldehyd* // *Kryteria zdrowne srodowiska*. Т. 89.—Jydu: Instytut Medycyny Pracy, 1993.—S. 1—191.)
4. Szende B., Tyihak E., Szokan G., Katay G. Possible role of formaldehyde in the apoptotic and mitotic effect of 1-methyl-ascorbigen // *Pathol. Oncol. Res.*—1995.—1.—P. 38—42.
5. Tyihak E., Trezl L., Szende B. Formaldehyde cycle and the phases of stress syndrome // *Stress of Life. From Molecules to Man* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*—1998.—851.—P. 259—270.
6. Гончар М. В. Альтернативні механізми детоксикації формальдегіду, форміату та пероксиду водню у метилотрофних дріжджів // *Мікробіол. журн.*—2000.—62, № 1.—С. 30—39.
7. Майдан Н. Н., Гончар М. В., Сибирный А. А. Окисление экзогенного формальдегида в клетках метилотрофных и неметилотрофных дрожжей // *Биохимия*.—1997.—62.—С. 744—749.
8. Feron V. J., Til H. P., Vrijer F., Woutersen R. A., Cassee F. R., Bladeren P. J. Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment // *Mutat. Res.*—1991.—259.—P. 363—385.
9. Yu P. H. Deamination of methylamine and angiopathy; toxicity of formaldehyde, oxidative stress and relevance to protein glycoxidation in diabetes // *J. Neural Transmis. (Suppl.)*.—1998.—52.—P. 201—216.
10. Стасык О. В., Кшемминская Г. П., Кулачковский А. П., Сибирный А. А. Мутанты метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* с поврежденной катаболической репрессией // *Микробиология*.—1997.—66, № 6.—С. 755—760.
11. Shen S., Sulter G., Jeffries T. W., Cregg J. M. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris* // *Gene*.—1998.—216.—P. 93—102.
12. Baerends R. J. S., Sulter G. J., Jeffries T. W., Cregg J. M., Veenhuis M. Molecular characterization of the *Hansenula polymorpha* *FLD1* gene encoding formaldehyde dehydrogenase // *Yeast*.—2002.—19.—P. 37—42.
13. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.—452 p.
14. 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.

УДК 577.21:577.152.1 + 661.727.1
Надійшла до редакції 27.09.05