



УДК 582.282.23+575.113

ГЕН *ARO4* – НОВИЙ ДОМІНАНТНИЙ СЕЛЕКТИВНИЙ МАРКЕР ДЛЯ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FAMILATA* (*CANDIDA FLARERI*) ТА *HANSENULA POLYMORPHA* (*PICHIA ANGUSTA*)

К. В. Дмитрук

Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна
e-mail: dmytruk@cellbiol.lviv.ua

Ген *ARO4* кодує 3-дезоксид-арабіногептуросонат-7-фосфатсинтазу (ДАГФ-синтазу), що каталізує перший етап шляху біосинтезу ароматичних амінокислот у прокариотів, рослин і грибів. У даній роботі описано успішне застосування модифікованого гена *ARO4m*, що кодує ДАГФ-синтазу, нечутливу до ретроінгібування тирозином для селекції трансформантів дріжджів *Candida famata* і *Hansenula polymorpha*, резистентних до DL-4-фторфенілаланіну. Інтегративна плазмідна з цим маркером забезпечувала частоту трансформації до 50 трансформантів/мкг ДНК для обох видів дріжджів.

Ключові слова: домінантний селективний маркер, дріжджі, *Candida famata*, *Hansenula polymorpha*.

ВСТУП

Неконвенційні дріжджі – важливі модельні еукаріотичні мікроорганізми в дослідженні молекулярних механізмів життєвих процесів і водночас перспективні біотехнологічні об'єкти. На відміну від пекарських дріжджів, вони менш вивчені в генетичному та біохімічному аспекті, проте часто мають унікальні метаболічні властивості (здатність до засвоєння нетипових органічних субстратів і надсинтезу низки практично важливих біологічно активних сполук, наявність особливих ферментів, адаптація до багатьох токсичних сполук і здатність до їхньої детоксикації тощо) [17].

Дріжджі *Candida famata* (*Candida flareri* або *Debaryomyces subglobosus*) є привабливим об'єктом як із наукової, так і з практичної точки зору. Це осмотолерантні дріжджі, здатні рости при високій концентрації солі, а також здатні до надсинтезу рибофлавіну (вітаміну B₂) за умов дефіциту заліза в середовищі. Особливості клітинного метаболізму за умов осмотичного шоку та механізми регуляції біосинтезу рибофлавіну викликають зацікавлення дослідників [17]. Дріжджі *C. famata* знаходять своє практичне застосування, адже мутантні штами цього виду, отримані ме-

тодами класичної селекції, належать до найбільш флавіногенних організмів, вони тривалий час використовувались як промислові продуценти вітаміну B₂ [12, 18, 16].

Метилотрофні дріжджі *H. polymorpha* є одним із найдокладніше вивчених видів неконвенційних дріжджів. Ці дріжджі є об'єктом дослідження механізмів термотолерантності, гомеостазу пероксисом, метаболізму метанолу, продукції гетерологічних білків і високотемпературної алкогольної ферментації [11]. Промислове використання *H. polymorpha* обумовлене кількома цікавими особливостями цього виду дріжджів. Дріжджі *H. polymorpha* здатні нагромаджувати значну біомасу у ферментерах, що забезпечує високі виходи цільових продуктів. Як і *Saccharomyces cerevisiae*, дріжджі *H. polymorpha* ростуть на дешевих і простих поживних середовищах, для них розроблені генетичні методи, є досвід у промисловому використанні та масштабуванні.

Ефективне використання потенціалу цих видів дріжджів із використанням генно-інженерних підходів для модифікацій метаболічних шляхів клітин і конструювання нових штамів із модифікованими фізіолого-біохімічними характеристиками потребує додаткових селективних маркерів. На сьогодні існують певні вимоги до маркерів для конструювання рекомбінантних мікроорганізмів для їх подальшого застосування у біотехнологічній промисловості. Низка патогенних мікроорганізмів, серед яких *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* і *Aspergillus fumigates*, є близькоспорідненими до мікроорганізмів, що використовуються у мікробіологічному виробництві та інших галузях народного господарства. Тому за наявності маркерів-генів, що забезпечують стійкість до антибіотиків у рекомбінантних мікроорганізмах, має враховуватися можливе горизонтальне перенесення цих генів до патогенних бактерій чи грибів [10, 1]. Як альтернативні селективні маркери для генетичної трансформації використовують гомологічні дріжджові гени, що забезпечують стійкість до певних антиметаболітів. Такі рекомбінантні дріжджові штами розцінювати як небезпечні у сенсі поширення стійкості до антибіотиків не можна. Адже відсутність чужорідної ДНК унеможлиблює перенесення генів, що забезпечують стійкість до антибіотиків у патогенні організми, а також продукцію токсичних чи алергенних білків рекомбінантами [2].

У даній роботі описано розробку та використання нового домінантного селективного маркера, що забезпечує резистентність до синтетичного аналога амінокислоти фенілаланіну – DL-4-фторфенілаланіну у біотехнологічно важливих видів неконвенційних дріжджів *C. famata* і *H. polymorpha*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі використовували штами *C. famata* L20105 *leu2* [19], *H. polymorpha* CBS4732 *leu2-2* [14] та *Debaryomyces hansenii* CBS767. Дріжджі вирощували на багатому середовищі YPD (0,5% дріжджовий екстракт, 1% пептон, 2% глюкоза) або на мінеральному середовищі YNB (0,67% YNB, 2% глюкоза) при 30°C. Для культивування дріжджових штамів до мінерального середовища додавали 40 мг/л лейцину. Для селекції дріжджових трансформантів *C. famata* і *H. polymorpha* середовище містило 0,8 г/л тирозину та мінімально токсичні концентрації DL-4-фторфенілаланіну 2,5 і 0,5 г/л, відповідно.

Бактерійний штам *E. coli* DH5 α (Ф80*dlacZ* Δ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (*lacZYA-argF*)U169) вирощували при 37°C

на багатому середовищі LB (0,5% дріжджовий екстракт, 1% пептон, 1% NaCl). Для селекції плазмідовмісних бактерій використовували ампіцилін у концентрації 100 мг/л.

У роботі були використані стандартні молекулярно-генетичні методи [15]. Геномна ДНК дріжджів була ізольована за допомогою Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Ендонуклеази рестрикції та лігаза використовувалися згідно з інструкцією виробника (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Виділення плазмідної ДНК з бактерій *E. coli* проводилося за допомогою Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA). Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) проводилася на ампліфікаторі GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), з використанням Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) згідно з інструкцією виробника. Трансформація дріжджів *S. famata* і *H. polymorpha* проводилася методом електропорації [19, 5].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Мутантний алель *ARO4m* гена *ARO4* вперше було ідентифіковано в результаті пошуку мутантів *Saccharomyces cerevisiae* резистентних до DL-4-фторфенілаланіну (ФФА) із додаванням тирозину [8]. ФФА є синтетичним аналогом амінокислоти фенілаланіну. Інтерес до таких мутантів викликаний попередніми спостереженнями, в яких промислові ФФА-резистентні штами сахароміцетів здатні до надсинтезу фенілетилового спирту, який, у свою чергу, надає приємного легкого аромату троянди при отриманні напоїв під час алкогольної ферментації [9]. Ген *ARO4m* кодує ДАГФ-синтазу, нечутливу до ретроінгібування тирозином [7]. Нечутливість до ретроінгібування продукту гена *ARO4m* спричинена трансверсією С496 до А у відкритій рамці трансляції (ВРТ), що призвело до амінокислотної заміни глутаміну-166 на лізин (Q166→K) [6]. Ген *ARO4m* був успішно використаний як домінантний селективний маркер для трансформації промислових штамів винних дріжджів [3]. Цей ген було вирішено використати як селективний маркер для трансформації неконвенційних дріжджів *S. famata* і *H. polymorpha*.

Дріжджі *S. famata* належать до організмів з особливим генетичним кодом. Триплет CUG, який у більшості дріжджів кодує лейцин, у *S. famata* кодує серин [4]. Тому в нашій роботі було використано ген *ARO4* близькоспорідненого виду дріжджів *Debaryomyces hansenii* з характерним для *S. famata* кодуванням серину. Повна нуклеотидна послідовність геному *D. hansenii* наявна у загальнодоступній базі даних Genolevures (<http://www.genolevures.org/deha.html#>). За гомологією до гена *ARO4* (*YBR249C*) *S. cerevisiae* було ідентифіковано ВРТ *D. hansenii* (DEHA2A04774g), що кодує білок із 368 амінокислотних залишків з ідентичністю 68% та подібністю 81% до сахароміцетного гомолога. Положення амінокислоти глутаміну, що відповідає за ретроінгібування ДАГФ-синтази тирозином, виявилось консервативним серед декількох проаналізованих дріжджових гомологів (рис. 1).

Модифікацію гена *ARO4* (DEHA2A04774g) *D. hansenii* у напрямку нечутливості відповідного білкового продукту ДАГФ-синтази до ретроінгібування тирозином було проведено за допомогою сайт-специфічного мутагенезу. За допомогою ПЛР, двох пар праймерів Ko153 (CTA TTA TTA TAC ATT AAG CAAAGA GCT CAT GAG TAA



Рис. 1. Порівняння амінокислотних послідовностей ділянки DAHP-синтаз, що відповідає за ретроінгібування тирозином кількох видів дріжджів. Консервативні амінокислотні залишки виділені на чорному фоні. Зірочкою позначено амінокислоту, що була замінена (Q157→K). Скорочення видових назв дріжджів: Sc – *S. cerevisiae*; Cg – *Candida glabrata*; Pg – *Pichia guilliermondii*; Dh – *D. hansenii*; Hp – *H. polymorpha*

Fig. 1. Alignment of DAHP synthase's site sequences responsible for feedback inhibition by tyrosine from several yeasts. Conserved sequences are on black background. Asterisk indicates amino acid was changed (Q157→K). Abbreviations of yeasts species decoded as follows: Sc – *S. cerevisiae*; Cg – *Candida glabrata*; Pg – *Pichia guilliermondii*; Dh – *D. hansenii*; Hp – *H. polymorpha*

AAC ACC AAT CCC) / Ko154 (CAA AAA GTC TGA GAA GTA TTT TGG AGA AAT GGT ATC CAA C) та Ko155 (GTT GGA TAC CAT TTC TCC AAA ATA CTT CTC AGA CTT TTT G) / Ko156 (CGC GGA TCC GAT AAG AAAATG AAA CGA GAT CC) та хромосомної ДНК штаму *D. hansenii* CBS767 було введено нуклеотидну трансверсію С469 до А, що призводить до заміни Q157→K (нуклеотиди для введення мутації позначені виділеним шрифтом, сайти рестрикції в цих і подальших праймерах – підкресленим шрифтом). Для забезпечення ефективного рівня експресії модифікований ген *ARO4m* з власним термінатором було поєднано зі сильним конститутивним промотором гена *TEF1 C. famata*, що кодує фактор елонгації трансляції α [4, 13]. Промотор гена *TEF1 C. famata* (683 п.н.) та *ARO4m* з власним термінатором (1328 п.н.) було ампліфіковано за допомогою відповідних пар праймерів Ko153 / Ko156 та Ko151 (CCG GAA TTC TAA CGA ACA GCT CAT CAG) / Ko152 (GGG ATT GGT GTT TTA CTC ATG AGC TCT TTG CTT AAT GTA TAA TAA TAG). Праймери Ko151 та Ko156 були використані для отримання касети, в якій ген *ARO4m D. hansenii* перебуває під контролем промотора гена *TEF1 C. famata*. Отриманий фрагмент розміром 1964 п.н. після обробки рестриктазами EcoRI та BamHI було клоновано в EcoRI/BamHI-лінеаризовану плазмиду pUC57. Сконструйована плазміда отримала назву pTDhARO4m (рис. 2). Відповідність отриманої касети експресії було підтверджено її секвенуванням.

Наступне завдання полягало у визначенні мінімальної токсичної концентрації ФФА в середовищі для дріжджів *C. famata* і *H. polymorpha*. Дріжджові клітини піддавали процедурі трансформації та висівали на мінеральне середовище, що містило лейцин, тирозин і різні концентрації ФФА (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 2,25; 2,5; 2,75; 3; 4; 5 г/л). Було встановлено, що мінімальні токсичні концентрації для *C. famata* і *H. polymorpha* становлять 2,5 і 0,5 г/л, відповідно.

EcoRI-лінеаризовану плазмиду pTDhARO4m трансформували у реципієнтні штами дріжджів *C. famata* і *H. polymorpha*. Після трансформації клітини висіва-

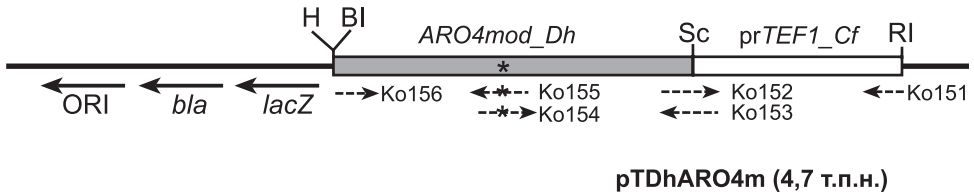


Рис. 2. Лінійна схема плазміди pTDhARO4m (4,7 т.п.н.). Промотор гена *TEF1* *C. famata* і BPT гена *ARO4m* *D. hansenii* із власним термінатором позначено білим та сірим відрізками, відповідно. Переривчастими стрілками позначено праймери (пояснення у тексті). Бактерійна точка початку реплікації, ген *bla*, що забезпечує селекцію бактерійних трансформантів на середовищі з ампіциліном, і фрагмент гена *lacZ* *E. coli* позначено стрілками. Сайти рестрикції: H – HindIII; BI – BamHI; Sc – SacI; RI – EcoRI

Fig. 2. Linear scheme of plasmid pTDhARO4m (4.7 kb). Promoter *TEF1* *C. famata* gene and ORF *ARO4m* *D. hansenii* gene with own terminator are designed with white and grey lines, respectively. Primers are designed with dashed narrows (explanation in the text). Bacterial origin of replication, gene *bla* for selection of bacterial transformants on the ampicillin containing medium and fragment of gene *lacZ* *E. coli* are designed with narrows. Restriction sites: H – HindIII; BI – BamHI; Sc – SacI; RI – EcoRI

ли на селективне мінеральне середовище, що містило лейцин, тирозин і ФФА. Колонії, здатні рости на селективному середовищі, з'явилися після 5 днів інкубації з частотою 20 і 50 трансформантів на 1 мкг плазмідної ДНК для *C. famata* і *H. polymorpha*, відповідно. Наявність плазміди pTDhARO4m у геномі одержаних трансформантів було підтверджено за допомогою ПЛР із використанням пари праймерів Ko151 / Ko156 (рис. 3, А, Б).

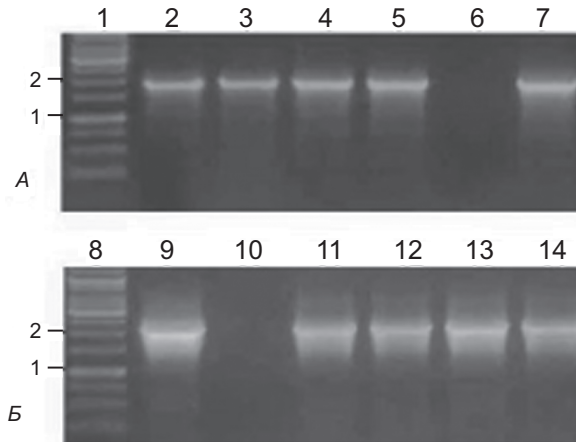


Рис. 3. Електрофореграми ПЛР-аналізу трансформантів штамів *C. famata* (А) і *H. polymorpha* (Б) плазмідною pTDhARO4m. 2–5 та 11–14 – трансформанти *C. famata* та *H. polymorpha*, відповідно. 7 і 9 – позитивні (плазмідна pTDhARO4m), 6 і 10 – негативні (хромосомна ДНК штамів *C. famata* і *H. polymorpha*) контролю. 1 та 8 маркер молекулярної маси фрагментів (розміри фрагментів подано в т.п.н.)

Fig. 3. Electrophoresis of the PCR assay of *C. famata* (A) and *H. polymorpha* (B) transformants with the plasmid pTDhARO4m. Lines 2–4 and 11–14 are transformants of *C. famata* and *H. polymorpha*, respectively. Lines 7 and 9 represent positive (plasmid pTDhARO4m), while 6 and 10 negative (chromosomal DNA of *C. famata* and *H. polymorpha*) controls. 1 and 8 are a marker of the molecular mass of the fragments (the fragment values are expressed in kb)

Новий доміантний селективний маркер, ген *ARO4m D. hansenii*, забезпечує ефективну інтегративну трансформацію біотехнологічно важливих видів неконвенційних дріжджів *S. famata* і *H. polymorpha*. Даний маркер може бути використаний для конструювання промислових штамів, без застережень негативного впливу при можливому горизонтальному перенесенні маркерного гена до патогенних мікроорганізмів.

ВИСНОВОК

Розроблено новий доміантний селективний маркер, ген *ARO4m D. hansenii*, що забезпечує трансформацію дріжджів *S. famata* і *H. polymorpha* з частотою 20 та 50 трансформантів на 1 мкг плазмідної ДНК, відповідно.

ПОДЯКИ

Автор висловлює подяку В. Ю. Яцишин і М. В. Семків за допомогу у проведенні експериментальної частини роботи, а також проф. А. А. Сибірному за забезпечення фінансової підтримки даної роботи.

1. Adam A.C., Gonzalez-Blasco G., Rubio-Texeira M., Polaina J. Transformation of *Escherichia coli* with DNA from *Saccharomyces cerevisiae* cell lysates. **Appl. Environ. Microbiol.**, 1999, 65(12):5303–5306.
2. Akada R. Genetically modified industrial yeast ready for application. **J. Biosci. Bioeng.**, 2002, 94(6):536–544.
3. Cebollero E., Gonzalez R. Comparison of two alternative dominant selectable markers for wine yeast transformation. **Appl. Environ. Microbiol.**, 2004, 70(12): 7018–7023.
4. Dmytruk K.V., Voronovsky A.Y., Sibirny A.A. Insertion mutagenesis of the yeast *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) by random integration of linear DNA fragments. **Curr. Genet.**, 2006, 50(3): 183–191.
5. Faber K.N., Haima P., Harder W. et al. Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. **Curr. Genet.**, 1994, 25: 305–310.
6. Fukada K., Asano K., Ouchi K., Takasawa S. Feedback-insensitive mutation of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase caused by a single nucleotide substitution of *ARO4* structural gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ferment. Bioeng.**, 1992, 74: 117–119.
7. Fukada K., Watanabe M., Asano K. Altered regulation of aromatic amino acid biosynthesis in β -phenylethyl-alcohol-overproducing mutants of sake yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Agric. Biol. Chem.**, 1990, 54: 3151–3156.
8. Fukuda K., Watanabe M., Asano K. et al. A mutated *ARO4* gene for feedback-resistant DAHP synthase which causes both o-fluoro-DL-phenylalanine resistance and β -phenethyl-alcohol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, 1991, 20: 453–456.
9. Fukuda K., Watanabe M., Asano K. et al. Breeding of brewing yeast producing a large amount of β -phenethyl-alcohol and β -phenethyl acetate. **Agric. Biol. Chem.**, 1990, 54: 269–271.
10. Gasson M.J. Gene transfer from genetically modified food. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 2000, 11(5): 505–508.
11. Gellissen G. ***Hansenula polymorpha: Biology and Applications***. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, 352 p.
12. Heefner D.L., Weaver C.A., Yarus M.J., Burdzinski L.A. **Method for producing riboflavin with *Candida famata***. United States Patent 5164303, 11/17/1992.

13. *Ishchuk O.P., Dmytruk K.V., Rohulya O.V.* et al. Development of a promoter assay system for the flavinogenic yeast *Candida famata* based on the *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase *LAC4* reporter gene. **Enzyme Microb. Technol**, 2008, 42: 208–215.
14. *Lahtchev K.L., Semenova V.D., Tolstorukov I.I.* et al. Isolation and properties of genetically defined strains of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* CBS4732. **Arch. Microbiol**, 2002, 177: 150–158.
15. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 253 p.
16. *Sanchez S., Demain A.* Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. **Microbial Biotechnology**, 2008, 1(4): 283–319.
17. *Satyanaarayana T., Kunze G.* **Yeast Biotechnology: Diversity and Applications**. Köthen: Springer, 2009, 744 p.
18. *Stahmann K.-P., Revuelta J.L., Seulberger H.* Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 2000, 53: 509–516.
19. *Voronovsky A., Abbas C., Fayura L.* et al. Development of a transformation system for the flavinogenic yeast *Candida famata*. **FEMS Yeast Res**, 2002, 2: 381–388.

ARO4 GENE – A NEW DOMINANT SELECTIVE MARKER FOR YEASTS *CANDIDA FAMATA* (*CANDIDA FLARERI*) AND *HANSENULA POLYMORPHA* (*PICCHIA ANGUSTA*)

K. V. Dmytruk

*Institute of Cell Biology NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: dmytruk@cellbiol.lviv.ua*

ARO4 gene encodes the enzyme 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate (DAHP) synthase catalyses the first step in aromatic amino acid biosynthesis in prokaryotes, plants and fungi. Successful application of modified *ARO4m* gene encoding DAHP synthase insensitive to the feedback inhibition by tyrosine for selection of *Candida famata* and *Hansenula polymorpha* yeasts transformants resistant to the DL-4-fluoro-phenylalanine is described in this work. Integrative plasmid harboring the marker transformed both yeasts with frequency up to 50 transformants per μ g of DNA.

Key words: dominant selective marker, yeast, *Candida famata*, *Hansenula polymorpha*.

ГЕН *ARO4* – НОВЫЙ ДОМНАНТНЫЙ СЕЛЕКТИВНЫЙ МАРКЕР ДЛЯ ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA FAMATA* (*CANDIDA FLARERI*) И *HANSENULA POLYMORPHA* (*PICCHIA ANGUSTA*)

К.В. Дмитрук

*Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова, 14–16, Львов 79005, Украина
e-mail: dmytruk@cellbiol.lviv.ua*

Ген *ARO4* кодирует 3-дезоксид-арабиногептуронат-7-фосфатсинтетазу (ДАГФ-синтетазу), катализирующую первый этап пути биосинтеза ароматических

аминокислот у прокариотов, растений и грибов. В представленной работе описывается успешное использование модифицированного гена *ARO4m*, кодирующего ДАГФ-синтазу, нечувствительную к ретроингибированию тирозином для селекции трансформантов дрожжей *Candida famata* и *Hansenula polymorpha*, резистентных к DL-4-фторфенилаланину. Интегративная плазмида с этим маркером обеспечивала частоту трансформации до 50 трансформантов/мкг ДНК для обоих видов дрожжей.

Ключевые слова: доминантный селективный маркер, дрожжи, *Candida famata*, *Hansenula polymorpha*.

Одержано: 15.07.2010