

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА КЛОНУВАННЯ ГЕНА ФОРМАЛЬДЕГІДРЕДУКТАЗИ У МЕТИЛОТРОФНИХ ДРІЖДЖІВ *HANSENULA POLYMORPHA*

С. Я. ПАРИЖАК

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
вул. Пекарська, 69 (Шімзерів, 1), Львів, 79010,
e-mail: sola_paryzhak@yahoo.com

Ідентифіковано та клоновано ген *ADH1 Hansenula polymorpha*, який кодує одну з ізоформ алкогольдегідрогенази (АДГ), що володіє формальдегідредуктазною активністю. Для цього проведено скринінг гомологічних послідовностей гена *ADH1 Saccharomyces cerevisiae* в геномі метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* та знайдено дві відкриті рамки трансляції (ВРТ) (*orf 1017* та *orf 347*) з 80 % гомологією до гена *ADH1 S. cerevisiae*. Одну з них клонували в плазмиду *p21* і трансформували у геном штаму *H. polymorpha leu2-2*. Стабільні рекомбінантні штами володіли підвищеною резистентністю до формальдегіду і вищими активностями АДГ і формальдегідредуктази в безклітинних екстрактах у порівнянні з батьківським штамом.

Ключові слова: формальдегід, формальдегідредуктаза, метилотрофні дріжджі *Hansenula polymorpha*, клонування гена.

Вступ. Формальдегід (ФА) є широко поширеним промисловим продуктом, який використовується при виробництві багатьох будівельних матеріалів і товарів широкого вжитку, як стерилізуючий агент у медицині та фармакології. Він має здатність спонтанно реагувати з багатьма біологічно активними сполуками, в тому числі білками і нуклеїновими кислотами, викликаючи їх хімічну модифікацію та інактивацію, що зумовлює високу токсичність цієї сполуки (Lu et al., 2010). Водночас ФА є природним метаболітом живих організмів: його виявлено у фруктах, овочах, м'ясі, пиві і в біологічних рідинах людини, зокрема у плазмі його концентрація складає від 13 до 97 мкмоль (Tang. et al., 2009). Вивчення механізмів утворення та метаболічної трансформації ФА в живих системах проводиться на багатьох організмах. Виявилось, що в детоксикації ФА у дріжджів беруть участь певні ізоферменти алкогольдегідрогенази (АДГ). Зокрема, у пекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, в утилізації ФА задіяні дві алкогольдегідрогенази: одна – із формальдегідредуктазною активністю (*Adh1p*) і друга – із глутатіонзалежною дегідрогеназною активністю (*Adh5p*). Продукт гена *ADH1* – *Adh1p* – цитозольний ізофермент АДГ, який каталізує НАДН-залежне відновлення ацетальдегіду до етанолу і ФА до метанолу без участі глутатіону (Grey et al., 1996). Цю реакцію,

зворотню до дегідрогеназної, називають у випадку ФА, як субстрату, формальдегідредуктазною.

Що стосується метилотрофних дріжджів, то для них на підставі існуючих біохімічних даних та за аналогією з пекарськими дріжджами можна припустити існування функціонально подібного ферменту, ген якого ще досі не ідентифіковано.

Метою даної роботи було ідентифікувати та клонувати ген метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* продукт якого володіє формальдегідредуктазною активністю.

Матеріали і методи. У роботі використовували штами *H. polymorpha* CBS4732 *leu2-2* (Lahtchev et al., 2002) та *S. cerevisiae* BY4742 (*MATaleu2-Δ0lys2-Δ0ura3-Δ0his3-Δ1*) люб'язно наданий д-ром Д. Беком (ун-т м. Балтімор, США). Дріжджі вирощували на багатому середовищі (YPD, у г/л): пептон – 10; дріжджовий екстракт – 5; глюкоза – 20) або на синтетичному середовищі Беркгольдера (СБ) з наступним мінеральним складом (у 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.

Залізо вносили у середовище у вигляді солі Мора в концентрації 0,2 мг/л, зі стандартною кількістю мікроелементів та 0,05%-м дріжджовим екстрактом при 30°C (Демків О.М. та ін., 2005). Джерелом вуглецю слугували 1 % глюкоза (в/о) або 1 % метанол (по об'єму). До середовища при

необхідності додавали лейцин – до концентрації 40 мг/л.

Таблиця 1. Плазмідні, використані в роботі

Table 1. Plasmids used in the work

| Плазмідні | Характеристика | Джерело отримання |
|---|--|------------------------------------|
| pBluescript ІІKS ⁺ 2,9 т.п.н. | Вектор загального призначення <i>E. coli</i> (<i>ori ColE1</i> , <i>Ap^R</i> , <i>lacZ'</i>) | МВІ Fermentas, Литва |
| p21 7,9 т.п.н. | Вектор експресії у <i>H. polymorpha</i> з <i>GAP</i> промотором та Zeo ^r | О. Ішук, Інститут біології клітини |
| pBlorf1014 4,1 т.п.н. | Похідна pBluescriptІІKS ⁺ з клонуваним геном <i>ADH1 H. polymorpha</i> | Отримано в ході роботи |
| pBlorf347 4,2 т.п.н. | Похідна pBluescriptІІKS ⁺ з клонуваним геном <i>ADH2 H. polymorpha</i> | –//– |
| p21 <i>ADH1Hp</i> 8,9 т.п.н. | Похідна p21 з клонуваним геном <i>ADH1 H. polymorpha</i> | –//– |

Бактерійний штам *Escherichia coli* DH5 α ϕ 80d *lacZ*ΔM15, *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 використовували стандартні молекулярно-генетичні методи (Sambrook, Russell, 2001). Виділення сумарної ДНК з клітин дріжджів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae* проводили за допомогою набору Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Ендонуклеази рестрикції та лігазу використовували згідно з інструкцією виробника (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Виділення плазмідної ДНК з бактерій *E. coli* проводили методом Бірнбойма і Долі (Sambrook, Russell, 2001). Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) здійснювали на ампліфікаторі Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), з використанням Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) відповідно до інструкції виробника. Трансформацію дріжджових

клітин проводили методом електропорації (Faber et al., 1994). Безклітинні екстракти для визначення активності ферментів отримували як описано в роботі (Демків О.М. та ін., 2005). Загальні активності ферментів у свіжих безклітинних екстрактах визначали спектрофотометрично (Shimadzu-UV-1650) при 340 нм за швидкістю утворення NADH – для АДГ чи утилізації NADH – для ФР (Демків О.М. и др., 2011). Питому активність (ПА) для кожного ферменту (в мкмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка) розраховували за формулою: ПА = ПА_{+субстрат} – ПА_{-субстрат}, яка враховує неспецифічні фонові реакції.

Результати та їх обговорення. Оскільки геном *H. polymorpha* є секвенований, то нами був проведений пошук послідовностей в геномі *H. polymorpha* гомологічних до гена *ADH1 S. cerevisiae*, білковий продукт якого виявляє формальдегідредуктазну активність. З цією метою була використана електронна база даних геному *H. polymorpha* (<http://ssl.biomax.de/rheinbiotech>). У результаті пошуку було знайдено 2 відкриті рамки трансляції (BPT) у *H. polymorpha* (orf 1017, orf 347), які мають найбільшу (72,7 % та 74,7 %, відповідно) подібність до сахароміцетного гомолога. Порівняння ймовірних білкових продуктів генів orf 347 та orf 1014 з білком Adh1p *S. cerevisiae* було зроблено за допомогою пакету програм DNA-Star (Lasergene, США). Гіпотетичні білки ORF 1017 та ORF 347 є дуже близькими за своєю амінокислотою послідовністю – відсоток ідентичності становить 81,2 %. Це свідчить про ймовірну наявність певного предкового гена, спільного для orf 347 та orf 1017. Можна припустити, що виявлені гени функціонально близькі *ADH1 S. cerevisiae*.

У зв'язку з тим, що на сьогодні залишаються невивченими гени, продукти яких володіють формальдегідредуктазними активностями у *H. polymorpha*, ми вирішили створити вектори з включенням до їх складу BPT orf 347 та orf 1014 і дослідити продукти експресії цих генів. З цією метою за допомогою ПЛР, використовуючи сконструйовані праймери (Orf347HpFor (5'-TcatATGAT GTC TAT TTC GAG AGT TG-3')/Orf347HpRev (5'-agcGGCCGc ACC AGT TAT TTA CCT-3'), Orf1014HpFor (5'-TcaTATGGC ATC CTT CTA TCA ATCA-3')/Orf1014HpRev (5'-TGCGGCCGC ATC ATA TTC ATT CAC CTA T-3' і хромосомну ДНК *H. polymorpha* як матрицю ми ампліфікували BPT orf 347 та orf 1014. Отримані фрагменти (1,5 т.п.н., 1 т.п.н.) клонували в плазміді pBluescriptІІKS⁺ за допомогою T/A клонування.

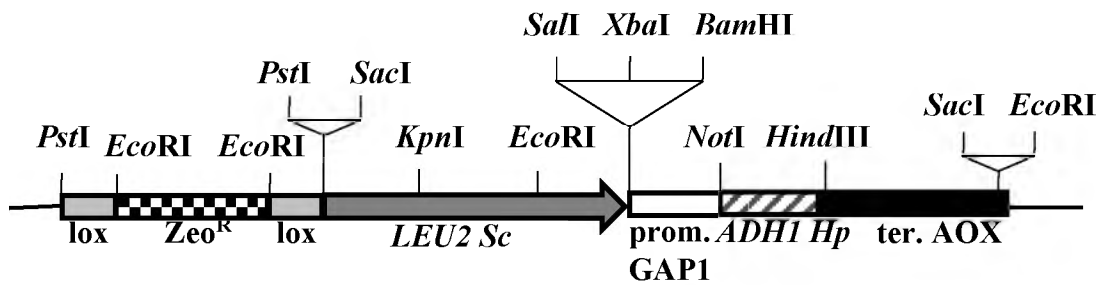


Рис. 1. Лінійна схема плазмиду експресії p21ADH1Hp (8,9 т.п.н.), сконструйованої для отримання над-продуцента ФР метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*.

Примітка: Фрагмент ДНК *S. cerevisiae*, що несе ген *LEU2*, позначено товстою сірою стрілкою; *GAP1* промотор *H. polymorpha* позначено незабарвленим відрізком; термінатор *AOX* *H. polymorpha* позначено товстим чорним відрізком; ген *ADH1* *H. polymorpha* – товстою смугастою лінією; ген резистентності до зеоцину – товстою пунктирною лінією; *loxP* послідовності – товстими світло-сірими відрізками. Сайти рестрикції: *PstI*, *EcoRI*, *KpnI*, *SalI*, *XbaI*, *NotI*, *HindIII*, *SacI*.

Як результат, були отримані плазмиди pBlorf347 та pBlorf1014. Плазмиду pBlorf1014 використали для подальшого субклонування BPTorf 1014. pBlorf1014 гідролізували ендонуклеазами рестрикції *NotI* та *HindIII*, проводили елюцію фрагмента ДНК, розміром 1,0 т.п.н., який лігували з *NotI* – *HindIII* розщепленим вектором p21. Ген ORF 1014 *H. polymorpha* умовно позначили *ADH1*. В результаті було сконструйовано рекомбінантну конструкцію, що отримала назву p21ADH1Hp, величиною 8,9 т.п.н. (рис. 1).

Одержану плазмиду використали для електротрансформації штаму *H. polymorpha leu2-2*. Було показано, що p21ADH1Hp трансформує вищезазначений штам до *Leu⁺Zeo^R*-фенотипу з частотою приблизно $1,2 \times 10^3$ трансф./мкг ДНК. Отримані трансформанти стабілізували, культивуючи по чергово в селективних (в середовищі YPD з антибіотиком) і неселективних умовах (YPD) протягом шести пересівів. Додатковим маркером для селекції служив ген *LEU2* *S. cerevisiae*, наявний у складі вектора. Усі стабільні трансформанти, резистентні до зеоцину, були прототрофами за лейцином.

У трансформантів, які добре росли на середовищі з зеоцином, досліджували продуктивність синтезу ФР. Рекомбінантні штами характеризувалися вищим синтезом цільового ферменту у порівнянні з вихідним штамом *leu2-2* *H. polymorpha*. Активність АДГ в безклітинних екстрактах *Tf 2* та *Tf 3* була в 1,5 – 3 рази вищою, ніж у *leu2-2*, і сягала 0,66 – 1,33 Од./мг білка. Активність ФР в безклітинних екстрактах *Tf 2* та *Tf 3* була в 4,1 – 5,1 рази вищою, ніж у *leu2-2*, і сягала 3,7 – 4,6 Од./мг білка (рис. 2). Отже, плазмид-

Fig. 1. Linear scheme of plasmid p21ADH1Hp (8.9 kb), constructed with the purpose of obtaining overproducer of methylotrophic yeast *H. polymorpha* FR.

Note: *S. cerevisiae* DNA fragment containing gene *LEU2* is marked as thick gray arrow; *GAP1* promoter *H. polymorpha* gene is marked as white segment; terminator *AOX* *H. polymorpha* as thick black line segment; gene *ADH1* *S. cerevisiae* as thick striped line; gene of resistance to zeocine as thick dotted line; *loxP* sequences as thick light gray lines. Restriction sites: *PstI*, *EcoRI*, *KpnI*, *SalI*, *XbaI*, *NotI*, *HindIII*, *SacI*.

да p21ADH1Hp збільшує продуктивність продуцента ФР в середньому в 4,5 рази.

Наявність у геномі трансформантів рекомбінантної плазмиди, що містить ген *orf1014* *H. polymorpha*, тестували за допомогою ПЛР при температурі 51,5 °С. Використовували праймери ScFor/ScRev і хромосому ДНК стабільних трансформантів як матрицю. Як результат, був отриманий фрагмент очікуваної величини (~ 1,0 т.п.н.) (рис. 3). Інтегранти володіли підвищеною резистентністю до ФА і здатні були рости при 3 мМ ФА в середовищі з 1% глюкозою (Glc) (рис. 4).

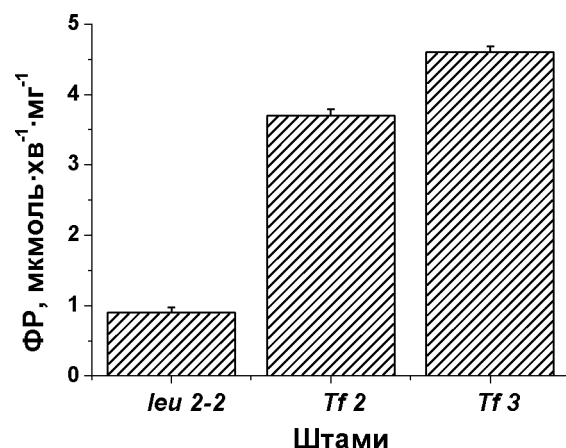


Рис. 2. Питома активність ФР в безклітинних екстрактах штамів *H. polymorpha leu2-2* та трансформантів *Tf 2*, *Tf 3*, вирощених на середовищі з 1 % Glc.

Fig. 2. Activity of FR in the cell-free extracts of *H. polymorpha leu2-2* and its transformants *Tf 2*, *Tf 3* strains, grown in the medium with 1 % Glc.

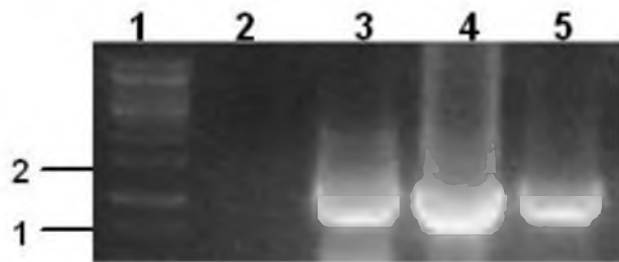


Рис. 3. Електрофореграми ПЛР-аналізу трансформантів штаму *H. polymorpha leu2-2* плазмідною *p21ADH1Hp*.

Примітка: Доріжки: 1 – ДНК фага λ розщеплена рестриктазою *PstI* ($\lambda/PstI$) (розміри фрагментів подано в т.п.н.), 2 – негативний контроль (хромосомна ДНК штаму *S. cerevisiae* BY4742), 3 – Tf2, 4 – Tf3, 5 – позитивний контроль (плазмід *p21ADH1Hp*).

Fig. 3. Electrophoresis of the PCR assay of *H. polymorpha leu2-2* transformants with the plasmid *p21ADH1Hp*.

Note: Lanes: 1 – DNA of phage λ digested with *PstI* ($\lambda/PstI$) (the fragment values are expressed in kb), 2 – negative control (chromosomal DNA of *S. cerevisiae* BY4742), 3 – Tf2, 4 – Tf3, 5 – positive control (plasmid *p21ADH1Hp*).

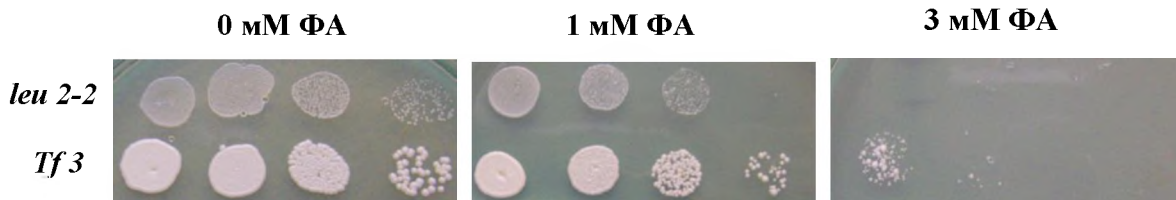


Рис. 4. Резистентність вихідного штаму *H. polymorpha leu2-2* і трансформанта Tf3 до ФА при рості на середовищі з 1 % Glc

Примітка: наносили по 5 мкл суспензії – зліва на право: з A_{600} 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; результат отримано на третю добу.

Fig. 4. Resistance of the parental strain *H. polymorpha leu2-2* and transformant Tf3 which grow in the medium with 1 % Glc

Note: 5 μ l of the cell suspension was added to FA with A_{600} 0.1; 0.01; 0.001; 0.0001; the result was obtained on the third day.

Висновки. Ідентифіковано та клоновано ген *ADH1* *H. polymorpha*, який кодує одну з ізоформ АДГ. Надекспресія гена *ADH1* (*orf1014*) *H. polymorpha* в клітинах *H. polymorpha* призводить до збільшення резистентності рекомбінантних штамів до ФА і суттєвого підвищення питомих активностей АДГ та ФР в безклітинних екстрактах, що свідчить про перспективність сконструйованих штамів як продуцентів формальдегідредуктази.

Подяка. Автор висловлює ширю подяку канд. біол. наук Ю.В. Ребцю за допомогу у проведенні експериментальної частини роботи, а також проф. М.В. Гончару за забезпечення фінансової підтримки даної роботи.

Список літератури:

1. Демків О.М., Парижак С.Я., Красовська О.С., Стасик О.В., Гайда Г.З., Сибірний А.А., Гончар М.В. Конструювання штамів – надпродуцентів формальдегіддегідрогенази метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* // Біополімери і клітина. – 2005. – Т. 21, № 6. – С. 525–530.
2. Демків О.М., Парижак С.Я., Ишук Е.П., Гайда Г.З., Гончар М.В. Активності ферментів катаболізма формальдегіда у рекомбінантних

штаммов *Hansenula polymorpha* // Микробиологія. – 2011. – Т. 80, № 3. – С. 301–307.

3. Faber K.N., Haima P., Harder W., Veenhuis M., Geert A.B. Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha* // Curr. Genet. – 1994. – V. 25. – P. 305–310.
4. Grey M., Schmidt M., Brendel M. Overexpression of *ADH1* confers hyper-resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae* // Curr. Genet. – 1996. – V. 29. – P. 437–440.
5. 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. – V. 177. – P. 150–158.
6. Lu K., Collins L.B., Ru H. et al. Distribution of DNA adducts caused by inhaled formaldehyde is consistent with induction of nasal carcinoma but not leukemia // Toxicol. Sci. – 2010. – V. 116. – P. 441–451.
7. Sambrook J., Russell D.W. Molecular cloning, a laboratory manual. – 3rd ed. – Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York, 2001. – 450 p.
8. Tang X., Bai Y., Duong A. et al. Formaldehyde in China: production, consumption, exposure levels, and health effects // Environment. International. – 2009. – V. 35, N. 8. – P. 1210–1224.

IDENTIFICATION AND CLONING OF THE FORMALDEHYDE REDUCTASE GENE IN METHYLOTROPHIC YEAST *HANSENULA POLYMORPHA*

S.Ya. Paryzhak

Gene ADH1 of Hansenula polymorpha was identified and cloned. It codes one of alcohol dehydrogenase (ADH) isoforms which possesses formaldehyde reductase (FR) activity. For this purpose screening of homologous sequences of ADH1 Saccharomyces cerevisiae gene in the methylotrophic yeast H. polymorpha genome was conducted. Two open reading frames (ORF) that have more than 80% homology to ADH1 gene of S. cerevisiae were found. One of them was cloned in plasmid p21 and transformed into genome of H. polymorpha leu2-2. Stable recombinant strains had an elevated resistance to formaldehyde and higher activities of ADH and FR in cell-free extracts, when compared to the parental strain.

Key words: formaldehyde, formaldehyde reductase, methylotrophic yeast Hansenula polymorpha, gene cloning.

Одержано редколлегією 10.10.2013