

УДК 577.151.6

## СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ПРОМОТОРОВ ДЛЯ ПРОДУКЦИИ СЕКРЕТИРУЕМОЙ β-МАННАНАЗЫ *Bacillus subtilis* КЛЕТКАМИ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ *Ogataea haglerorum*

© 2024 г. Д. А. Подплетнев<sup>1</sup>, А. Р. Лаптева<sup>1</sup>, С. П. Синеокий<sup>1</sup>, М. Г. Тарутина<sup>1,2, \*</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182, Россия

<sup>2</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”,  
Курчатовский геномный центр, Москва, 123182, Россия

\*e-mail: m\_tarutina@mail.ru

Поступила в редакцию 06.06.2023 г.

После доработки 09.08.2023 г.

Принята к публикации 31.08.2023 г.

Сильные и строго регулируемые промоторы являются мощным инструментом для создания высокопродуктивных штаммов-продуцентов рекомбинантных белков. Чтобы расширить потенциал системы экспрессии *Ogataea haglerorum*, природные метанол-индуцируемые промоторы генов *OhMOX* и *OhFMD* и конститутивный промотор гена *OhGAP* были изучены в сравнении с промотором гена *OpMOX* из дрожжей *O. polymorpha*. В качестве репортерного использовали ген *MANS*, кодирующий рекомбинантную β-маннаназу. При культивировании трансформантов *O. haglerorum*, содержащих ген *MANS* под контролем промоторов *pOhMOX*, *pOhFMD*, *pOhGAP* из *O. haglerorum* и *pOpMOX* из *O. polymorpha*, активность β-маннаказы в супернатанте составила 170, 93, 89 и 100% соответственно. По результатам ПЦР в реальном времени в клетках дрожжей *O. haglerorum* промотор *pOhMOX* обеспечивал более высокий уровень экспрессии гена *MANS*, чем промотор *pOpMOX* из дрожжей *O. polymorpha*. Полученные сведения о силе промоторов из дрожжей *O. haglerorum* могут быть полезны при конструировании продуцентов рекомбинантных белков и оптимизации путей метаболизма в дрожжах *O. haglerorum*.

**Ключевые слова:** *Ogataea haglerorum*, промоторы, термотолерантные метилотрофные дрожжи, β-маннаназа  
**DOI:** 10.31857/S0555109924010038, **EDN:** HCWDFE

Метилотрофные дрожжи родов *Komagataella* (*Pichia*) и *Ogataea* (*Hansenula*) широко используются для продукции рекомбинантных белков благодаря их способности достигать высокой плотности клеток при культивировании в минимальной среде в биореакторе и наличию сильных промоторов для эффективной экспрессии гетерологичных генов. Термотолерантные дрожжи рода *Ogataea* применяются для получения белков при повышенной температуре, 37°C и выше, что позволяет снизить вероятность контаминации, длительность ферментации, а также затраты на охлаждение биореактора [1].

Метилотрофные дрожжи используют общий путь метаболизма метанола. Первый фермент этого пути окисляет метанол до формальдегида и перекиси водорода. В дрожжах рода *Ogataea* этот этап контролируется метанолюксидазой, кодируемой геном *MOX*. Регуляция экспрессии гена *MOX* осуществляется на уровне транскрипции. Во время роста дрожжей на метаноле доля метанолюксидазы составляет 30–40% от клеточного белка [2], поэтому промотор гена *MOX* (*pMOX*) является

одним из наиболее сильных индуцируемых промоторов, широко используемых в системе экспрессии *O. polymorpha*. При использовании промотора *pMOX* получен широкий ассортимент белковых препаратов, например частицы антигена вируса гепатита В человека [3], белки ротавируса VP6 [4], папилломовируса HPV-16 [5], человеческий сывороточный альбумин [6], в последнем случае выход продукта в ферментере достигал 5.1 г/л. Другой сильный метанол-индуцируемый промотор, который используют для экспрессии гетерологичных генов в дрожжах *O. polymorpha*, — промотор гена *FMD*, кодирующего формилдегидрогеназу. Показано, что штаммы-продуценты *O. polymorpha*, содержащие под контролем промотора *pFMD* ген глюкоамилазы из *Schwanniomyces occidentalis* [7] или ген *CON* фитазы [8], продуцируют, соответственно, 1.4 или 13.49 г/л целевого фермента при культивировании в ферментере.

Промоторы эукариот, как правило, имеют больший размер, чем промоторы прокариот, и содержат коровый элемент (*core*) и специфические

регуляторные последовательности — UAS (upstream activation sequences) и URS (upstream repressing sequence). Коровый элемент ТАТА-бокс — это сайт связывания ТАТА-связывающего белка (ТВР), субъединицы транскрипционного фактора TFIIID, включенного в процесс инициации транскрипции [9]. Последовательности UAS и URS — *cis*-действующие элементы — представляют собой сайты связывания с транскрипционными факторами, которые усиливают (активатор) или ослабляют (репрессор) силу промотора [10, 11]. Экспериментально было показано, что в 5'-регуляторном регионе промотора гена *МОХ* из дрожжей *O. polymorpha* имеются последовательности, которые могут быть идентифицированы как UAS1, UAS2 и URS1 [2].

Механизм, с помощью которого метанол индуцирует транскрипцию генов, участвующих в пути утилизации метанола, не изучен до конца. Исследования в этом направлении проводят обычно на промоторе гена *АОХ1* из дрожжей *K. phaffii*. Были идентифицированы позитивные регуляторы промотора *pАОХ1* в ответ на метанол — Mxr1p, Mit1p и Prm1 [12, 13], которые не взаимодействуют друг с другом и имеют различные сайты связывания [14].

Альтернативой индуцируемому промоторам являются конститутивные промоторы, под контролем которых синтез рекомбинантных белков осуществляется без применения токсичного метанола. Одним из наиболее сильных конститутивных промоторов является промотор гена *GAP*, кодирующего глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу. Однако сила промотора *pGAP* сильно варьирует в зависимости от источника углерода в среде культивирования, что было показано в дрожжах *P. pastoris* и *O. thermomethanolica* [15, 16]. Промотор *pGAP* применяли, например, для экспрессии человеческого сывороточного альбумина [17] или фитазы [16].

Хотя системы экспрессии на метилотрофных дрожжах рода *Ogataea* хорошо разработаны, появляются новые их представители, потенциал которых не изучен. Вид *Ogataea haglerorum* выделен из дрожжей рода *Ogataea* в 2017 г. в результате проведения комплексного молекулярно-генетического анализа [18]. Для *O. haglerorum* разработаны технологии конструирования штаммов-продуцентов, включая экспрессионный вектор и метод введения ДНК в клетки реципиента [19]. Прежде для экспрессии гетерологичных генов использовали промотор гена *МОХ* (*pOpМОХ*) из дрожжей *O. polymorpha*. На основе штамма *O. haglerorum* ВКПМ Y-2584 были получены высокопродуктивные штаммы-продуценты β-маннаназы и фитазы, способные продуцировать ферменты при температуре 37°C [20, 21].

Цель данной работы — характеристика промоторов *pOhМОХ*, *pOhFMD* и *pOhGAP* из штамма

*O. haglerorum* ВКПМ Y-2584 в сравнении с промотором *pOpМОХ* из дрожжей *O. polymorpha*.

## МЕТОДИКА

Штамм дрожжей *Ogataea haglerorum* (G. I. Naumov, E. S. Naumova, C. F. Lee) ВКПМ Y-2584 получен из коллекции Биоресурсного центра Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ, НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, Россия). Для клонирования промоторов и наработки плазмид использовали штамм *E. coli* XL1 blue (“Stratagene”, США).

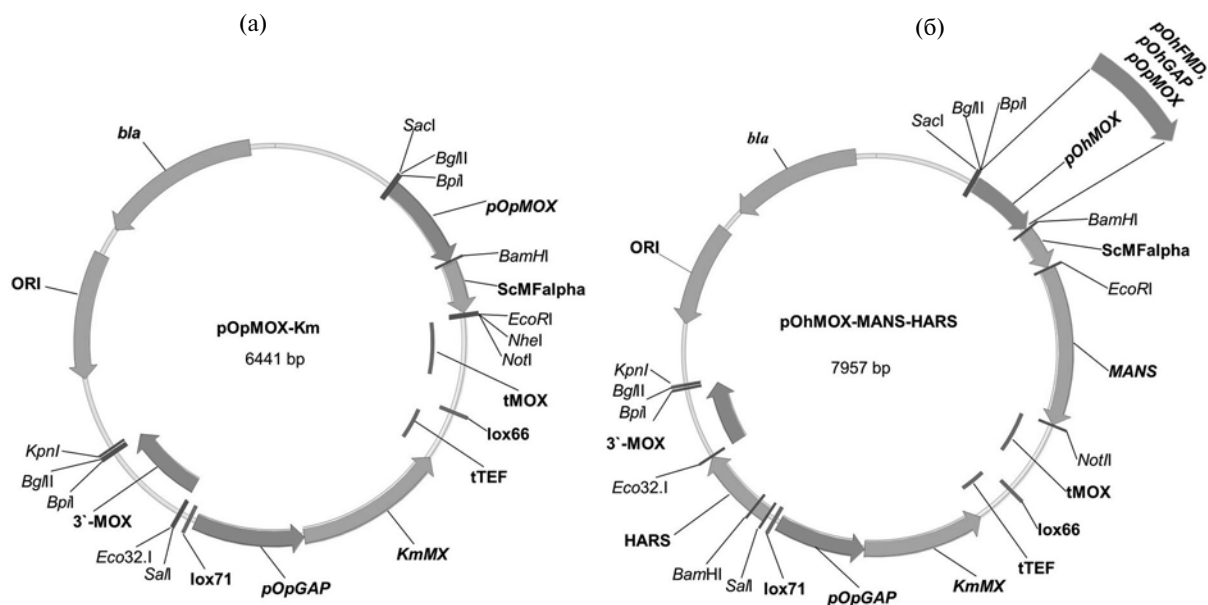
Дрожжи *O. haglerorum* выращивали на среде YPD (дрожжевой экстракт — 10 г/л, пептон — 20 г/л, глюкоза — 20 г/л) при 37°C.

*E. coli* XL1 blue выращивали на среде LB (дрожжевой экстракт — 5 г/л, триптон — 10 г/л, NaCl — 5 г/л) при 37°C, при необходимости в среду добавляли ампициллин в концентрации 100 мкг/мл.

Основные генно-инженерные методы работы с ДНК выполнялись согласно методическим указаниям [22]. Хромосомную ДНК из дрожжей выделяли с использованием набора для выделения ДНК из дрожжей (“diaGene”, “Диа-М”, Россия). Правильность сборки всех плазмид проверяли секвенированием на секвенаторе “3500 Genetic Analyzer” (“Applied Biosystems”, “Hitachi”, Япония) в ЦКП НИЦ “Курчатовский институт” (Россия). Названия и последовательности всех использованных в работе праймеров указаны в таблице в Дополнительных материалах 1. Амплификация производилась на амплификаторе Thermal Cycler T100 (“BioRad”, США) с использованием Кара-полимеразы (“KapaBiosystems”, США).

**Конструирование плазмид.** Вектор *pOpМОХ*-Km (рис. 1а) был сконструирован на основе коммерческого вектора *pBluescript II KS+* (X52327, “Stratagene”, США). На его основе были созданы используемые в работе плазмиды *pOhМОХ*-MANS-HARS, *pOpМОХ*-MANS-HARS, *pOhFMD*-MANS-HARS и *pOhGAP*-MANS-HARS (рис. 1б), конструирование которых описано ниже.

Первоначально были подобраны праймеры: *МОХ*-up-F и *МОХ*-dn-R для амплификации локуса *МОХ* размером 3.8 тыс. п.н. на основе последовательностей GenBank: АЕО102000008 (*O. parapolyomorpha* DL-1) и GenBank: АЕСК01000003.1 (*O. polymorpha* NCYC495 leu1.1). Праймеры *FMD*-up-F и *FMD*-dn-R использовали для амплификации 5'-нетранслируемой области гена *FMD* размером 900 п.н. на основе GenBank: АЕО102000010.1 (*O. parapolyomorpha* DL-1) и АЕСК01000001.1 (*O. polymorpha* NCYC495 leu1.1); *GAP*-up-F и *GAP*-dn-R — для амплификации 5'-нетранслируемой области гена *GAP* размером 800 п.н. на основе последовательностей GenBank: АЕО102000010.1 (*O. parapolyomorpha* DL-1) и АЕСК01000001.1



**Рис. 1.** Схема экспрессионного вектора рOpMOX-Km (а) и плазмиды рOhMOX-MANS-HARS (б). Промоторы *pOhFMD*, *pOhGAP* и *pOpMOX* содержат плазмиды рOhFMD-MANS-HARS (7986 п.н.), рOhGAP-MANS-HARS (8091 п.н.) и рOpMOX-MANS-HARS (7993 п.н.) соответственно.

(*O. polymorpha* NCYC495 leu1.1). Амплификация производилась с использованием хромосомной ДНК *O. haglerorum* в качестве матрицы.

На основании полученных нуклеотидных последовательностей, в которых при помощи программы AlignX (“Vector NTI”, США) определены содержащие промоторы области, были подобраны праймеры: рМОХ-2584-F и рМОХ-2584-R для амплификации промотора *pOhMOX* размером 464 п.н.; рFMD2584-F и рFMD2584-MF-R для амплификации промотора *pOhFMD* размером 492 п.н.; рGAP2584-F и рGAP2584-MF-R для амплификации промотора *pOhGAP* размером 603 п.н. Полученные ПЦР-фрагменты встраивали в вектор рOpMOX-Km по сайтам *SacI* и *BamHI* с замещением фрагмента ДНК, содержащего промотор *pOpMOX*.

Далее в вектор по сайтам *EcoRI* и *NotI* встраивали синтетический ген *MANS* (OR897818.1) с оптимизацией кодонов для метилотрофных дрожжей, кодирующий β-маннаназу из *B. subtilis* (КФ 3.2.1.78). Ген *MANS* размером 1032 п.н. был синтезирован в компании ООО “Иннова плюс” (Россия). Затем в вектор по сайтам *Eco32.1* и *Sall* встраивали фрагмент с *HARS* размером 526 п.н., который амплифицировали с хромосомной ДНК дрожжей *O. haglerorum* с праймеров *HARS-F* и *HARS-R*. В результате были получены плазмиды рOhMOX-MANS-HARS, рOpMOX-MANS-HARS, рOhFMD-MANS-HARS и рOhGAP-MANS-HARS (рис. 1б).

**Трансформация дрожжей *O. haglerorum*.** Трансформацию дрожжей *O. haglerorum* осуществляли

как описано в работе [23]. Электропорацию проводили с использованием электропоратора GenePulserXcell™ (“Bio-Rad”, США), параметры: 1500 В; 25 мкФ; 200 Ом. Трансформанты отбирали на плотной среде YPD с добавлением генетицина (G418, “Gibco”, Великобритания) в количестве 200 мкг/мл.

**Тест на митотическую стабильность.** Трансформанты растили в неселективных условиях (жидкая YPD) в глубоколоночных планшетах Deerwell Plate (“Eppendorf”, Германия) при 37°C в шейкере-инкубаторе Innova 44 (“New Brunswick”, Германия) в течение 24 ч. Затем культуру рассеивали для получения отдельных колоний на чашках Петри с неселективной средой. С помощью репликатора отбирали по 100 независимых колоний и анализировали их на способность расти на средах YPD и YPD с генетицином (200 мкг/мл). Появление колоний, не растущих на среде YPD с генетицином, указывало на то, что плазмиды не интегрированы в геном реципиента и содержатся в клетках трансформанта в виде автономно реплицирующейся ДНК.

**Изоляция плазмид из трансформантов *O. haglerorum*.** Из биомассы трансформантов *O. haglerorum*, выращенных в 2 мл среды YPD с генетицином (200 мкг/мл), выделяли ДНК с использованием набора GeneJet Plasmid Miniprep (“ThermoScientific”, Литва), которой трансформировали клетки *E. coli* XL1 blue. Из одного трансформанта со среды LB с ампициллином выделяли плазмидную ДНК и анализировали размер плазмиды методом электрофореза.

**Экспрессия гена *MANS* в дрожжах *O. hagerorum*.** Культивирование трансформантов, содержащих ген *MANS* под контролем метанол индуцируемых промоторов, проводили следующим образом. Отдельную колонию засеивали в 5 мл жидкой селективной среды YPD с генетицином в количестве 200 мкг/мл и выращивали при 37°C в шейкере-инкубаторе Innova 44 в течение 20 ч. Полученным инокулятом засеивали пробирки с 5 мл селективной среды в соотношении 1: 10. Пробирки инкубировали при 37°C и 250 об/мин в течение 120 ч. Метанол (3%) добавляли к культуре через 24 и 48 ч культивирования.

Для культивирования трансформантов, содержащих ген *MANS* под контролем конститутивного промотора *pOhGAP*, инокулятом засеивали пробирки с 5 мл селективной среды в соотношении 1: 10. Пробирки инкубировали при 37°C и 250 об/мин. в течение 72 ч. Глюкозу в количестве 2% добавляли через 24 и 48 ч культивирования. Отсутствие остаточной глюкозы в супернатанте проверяли методом ВЭЖХ на хроматографе Alliance (“Waters”, США) с рефрактометрическим детектором Waters 2414 с использованием колонки YMC-Pack Polyamine II (“YMC”, Япония).

По окончании культивирования биомассу отделяли центрифугированием при 1700 *g* в течение 10 мин. Супернатант использовали для измерения активности β-маннаназы и анализа ПААГ с ДДС-Na, который проводили в 12%-ном полиакриламидном геле в камере для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra (“Bio-Rad”, США). Для визуализации белков использовали Ку-масси бриллиантовый синий R250.

**Определение активности β-маннаназы.** Активность β-маннаназы определяли по методу Миллера с динитросалициловой кислотой (ДНС), используя маннозу (“Sigma”, США) в качестве стандарта [24]. В качестве субстрата использовали галактоманнан Locust bean gum from Ceratonia (LBG, “Sigma”, Италия). К 100 мкл 1%-ной суспензии LBG в 0.1 М ацетатном буфере (рН 5.0) добавляли 100 мкл супернатанта, содержащего фермент, и инкубировали при температуре 55°C в течение 10 мин. Затем к реакционной смеси добавляли 300 мкл ДНС, прогревали при 99°C в течение 5 мин. Измеряли содержание образующихся в результате ферментативной реакции редуцирующих сахаров спектрофотометрически при длине волны 540 нм на спектрофотометре Multiskan spectgum (“Thermo scientific”, США). За 1 ед. ферментативной активности β-маннаназы принимали количество фермента, действующего на субстрат с высвобождением 1 мкМ восстанавливающих сахаров (в пересчете на маннозу) за 1 мин в условиях эксперимента. Все измерения проводились трижды.

**Выделение РНК и анализ транскрипции гена *MANS* под контролем промоторов *pOhMOX***

**и *pOpMOX* методом ПЦР в реальном времени.** Для выделения РНК посевной культурой засеивали 50 мл селективной среды YP (дрожжевой экстракт — 10 г/л, пептон — 20 г/л) с генетицином (200 мкг/мл), содержащей глюкозу (1%) или метанол (1%) в колбах на 0.75 л до начальной оптической плотности OD<sub>600</sub> равной 0.1. Колбы, содержащие среду с метанолом, засеивали и культивировали при 37°C и 250 об./мин. в течение 12 и 20 ч, а среду с глюкозой — 12 ч. Биомассу отделяли от среды центрифугированием при 6000 об./мин. в течение 10 мин и использовали для выделения РНК.

РНК выделяли при помощи набора RNeasy (“Qiagen”, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Полученную тотальную РНК доводили до концентрации 500 нг/мкл, обрабатывали ДНКазой (“Thermo”, Литва) и использовали в качестве матрицы в реакции обратной транскрипции при помощи ревертазы из набора MMLT (“Евроген”, Россия) и Oligo-dT праймеров. Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для реакции ПЦР в реальном времени. Амплификацию проводили при помощи набора qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”, Россия) на приборе 7500 Fast Real-Time PCR System (“Applied Biosystems”, США). В реакционную смесь добавляли 1 мкл кДНК-матрицы (50 мкг/мл), по 1 мкл раствора каждого из праймеров (10 нМ/мл) и доводили объем до 20 мкл деионизированной водой. Использовали следующую программу ПЦР: 5 мин при 95°C (1 цикл), 30 с при 95°C, 20 с при 65°C и 30 с при 72°C (40 циклов). Определяли величину экспрессии гена *MANS* в образцах по методу *ddCT* [25]. Для амплификации транскриптов гена *MANS* размером 210 п.н. использовали праймеры RT-MANS-F и RT-MANS-R. В качестве референсного гена домашнего хозяйства использовали ген актина (*ACT*) из штамма *O. hagerorum* (нуклеотидная последовательность гена *ACT* указана в Дополнительных материалах 2). Для амплификации транскриптов референсного гена размером 180 п.н. использовали праймеры RT-ACT-F и RT-ACT-R.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Анализ последовательности локуса, кодирующего метанолоксидазу из дрожжей *O. hagerorum*.** Основываясь на предположении о консервативности генов, кодирующих пути метаболизма метанола в метилотрофных дрожжах рода *Ogataea*, были подобраны праймеры на основе последовательностей локуса *MOX* из дрожжей *O. polymorpha* NCYC495 leu1.1 и *O. parapolyomorpha* DL-1 из базы данных NCBI. В результате амплификации предположительного локуса *MOX* из *O. hagerorum* был получен ПЦР-фрагмент размером 3.8 т.п.н., нуклеотидная последовательность которого была определена секвенированием. В данной последовательности была определена предположительная открытая рамка

URS

-946 GCGACATCTCCAAGAGCTGGGCTGTGTTGAGGATGAGCC**GGACGTCGTTAAAGGAGGGCGCCAC**CAGGGCCGCTT -871

-870 GCTGATGGCGCGGCGCTCGTCCCTCGATGTAGAAGGCCTTTTCCAGAGGCAGTCTCGTGAAAAAGTTGCCGACGCTC -795

-794 GGAACCAGCTGCACGAGTCGAGACAATTCGGGGTGCCTGCTCTGGTCATTTTCGATGTTGTCGTCGATGAG**GAGTT** -719

-718 UAS2 **CGAGGTCGTTG**GAAGATTTCTGCGTAGCGGCCTTTTGCCTCAGAGTTCACCATGAGGTCGCCACGGCGGAGATGCC -643

-642 GTTGCTCTTACC CGCTACAGGACGAACGGCGTGGCCAGCAGGCCTTTGATCCACTCTATGAGCCCCTCACGACGG -567

-566 TGCTCCTTGAGCGCGTACTCCACTCTGTAGCGACTAGTCATCGGGGCTGGCTTCCTGCGCTGGGCGTGCTAATTAA -491

-490 UAS1 TTGTTGCCGCACCTGTACGGGGTCCCTGCAT**TCCTTGACCCGCT**CCGAAAATGCACCACTCGCTCTAGCCGTCGCG -415

-414 TAAAACCTCGTGAATCTGGCAACTGAGGGGGTCTGCAGCCGCAACCTAACTTCATCGCTTTAGGACGCAGCTGGAG -339

-338 AGCGTCCTGCGAGGCTCCCTGCTCGGGCGTAGCCTACAACGTGACTTTGCCTAAGCGGACGGCCCTCGCTCTGGCT -263

-262 GCTGCGCCTGCTACCAGAACTCGTT<sup>Δ22bp</sup>CCAGCAGCAGCGGTGTCGGAG**TGTCAGTTTCTCCACAGTGCA**ACTGCGGG -187

-186 TGAGTCCGCCAAAACCTGCTTTTCTTATGCTACCGTGCAGTGACTCCGGCATCCCCAGTTTTTGCCTACCTGATC -111

-110 TATA-box ACAGATGGGGTCAGCGCTGTCGCTAAGTGTACCAGCCGTCCCCACACGGGCCAT**CTATAAATA**GTGCCACCAGTGC -35

-34 ACGGTGGAGCCATCAACCAAAGTACAAAAACAAA**ATG** -1

**Рис. 2.** Последовательность, локализованная перед ATG кодоном гена *OhMOX*. Подчеркиванием выделена область между открытыми рамками считывания соседних генов. Предполагаемые последовательности URS (upstream repressing sequence), UAS1, UAS2 (upstream activator sequences) и TATA-бок выделены жирным шрифтом. Предполагаемый сайт связывания с *core*-последовательностью CYCC гомолога Mxr1 выделен курсивом и жирным шрифтом. Стартовый кодон открытой рамки считывания для метанооксидазы (ATG) выделен жирным шрифтом. Местоположение отсутствующего участка размером 22 п.н. обозначено ломаной линией.

считывания метанооксидазы (*Mox*), кодирующая белок размером 664 аминокислотных остатка, последовательность которого идентична на 99.2% *Mox* из штамма *O. polymorpha* NCYC495 leu1.1 (NCBI: XP\_018211707.1) и на 99.7% *Mox* из штамма *O. parapolyomorpha* DL-1 (NCBI: XP\_013934137.1). Высокое сходство говорит об обнаружении локуса *OhMOX*. Здесь и далее последовательности исследованных локусов указаны в таблице Дополнительные материалы 2.

Был проведен анализ последовательности размером 946 п.н., локализованной перед ATG кодоном гена *OhMOX*, содержащей промотор *pOhMOX* и регуляторные элементы из *O. haglerorum* (рис. 2). В 5'-области гена *OhMOX* были выявлены предполагаемые регуляторные области URS (upstream repression sequence), две последовательности UAS (UAS1 и UAS2, upstream activation sequence) и предполагаемый TATA-бок по гомологии с этими элементами, выявленными экспериментальным путем в 5' регуляторном регионе дрожжей *O. polymorpha* [2]. Локализация последовательностей URS (-907 до -883) и TATA-бокса

одинакова в дрожжах *O. haglerorum* и *O. polymorpha*, но имеются отличия в нуклеотидной последовательности URS: GGACGTCGTTAAAGGAGGGCGCCAC в дрожжах *O. haglerorum* и GGACGTCGTTGAACGAGGGGGCCAC в дрожжах *O. polymorpha*. Консервативные последовательности UAS1 (-460 до -447) и UAS2 (-723 до -709) располагаются ближе к старт-кодону, чем в дрожжах *O. polymorpha*, из них только последовательность UAS1 (TCCTTGACCCGCT) незначительно отличается от таковой (TCCTTGACCCGCAA) в *O. polymorpha*. В 5'-регионе гена *OhMOX* имеется также консенсус последовательность TGTCAGTTTCTCCACAGTGCA (-215 до -195), содержащая ключевой элемент CYCC (CTCC), которая предположительно является сайтом связывания с белком Mxr1p (methanol expression regulator 1). Транскрипционный фактор Mxr1p является ключевым активатором генов путей метаболизма метанола и биогенеза пероксисом в дрожжах *P. pastoris* [12, 14]. Предполагаемый сайт для связывания с Mxr1p выявлен в промоторе *pOtMOX* дрожжей *O. thermomethanolic* [26]. Предполагается, что Mxr1p

является гомологом регуляторного фактора Adr1 из *Saccharomyces cerevisiae*, поскольку эти белки имеют сходство N-конца, а также показано участие Adr1 в активации промотора *pOpMOX* при его использовании в *S. cerevisiae* [27].

Экспрессионная плазмида *pOhMOX-MANS-HARS* содержит промотор *pOhMOX* размером 464 п.н. В качестве промотора была взята последовательность, расположенная между открытой рамкой считывания гена *MOX* и соседним геном, за исключением участка последовательности, содержащего ТАТА-бокс последнего. Было проведено сравнение последовательности промотора *pOhMOX* (464 п.н.), клонированного в плазмиду, с последовательностями промоторного региона генов *MOX* из штаммов *O. polymorpha* (NCYC495 leu1.1), *O. parapolyomorpha* (DL1) и *O. angusta* с использованием программы Clustal Omega ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)). Результаты выравнивания последовательностей представлены в Дополнительных материалах 3. Последовательность промотора *pOhMOX* идентична последовательностям аналогичных промоторов из *O. polymorpha*, *O. parapolyomorpha* и *O. angusta* на 80,0, 82,7 и 80,0% соответственно. В промоторе *pOhMOX* отсутствует участок размером 22 п.н. (ACCAGAGCAGCAGAGGGCCGAT) на расстоянии –236 п.н. от АТГ-кодона и 21 п.н. до предположительного сайта связывания транскрипционного регулятора Mxr1p.

**Анализ последовательности промоторного региона гена *GAP*, кодирующего глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу из дрожжей *O. haglerorum*.** Проанализировали последовательность нуклеотидов размером около 800 п.н., амплифицированную с хромосомной ДНК *O. haglerorum* с использованием праймеров, подобранных на основе консервативных участков локуса *GAP* в штаммах *O. parapolyomorpha* DL-1 и *O. polymorpha* NCYC495 leu1.1. Амплифицированный фрагмент имел высокое сходство с локусом *GAP* из штаммов DL-1 и NCYC495. По аналогии с локусом *MOX* амплифицировали более протяженный участок региона *GAP* (см. Дополнительные материалы 2), содержащий открытую рамку считывания, кодирующую глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу — фермент, состоящий из 335 аминокислотных остатков, который идентичен на 96,7% *Gap* из штаммов *O. polymorpha* NCYC495 leu1.1 (NCBI: XP\_018209147.1) и *O. parapolyomorpha* DL-1 (GenBank: AAC08320.1) и на 92,3% *Gap* из штамма *O. thermomethanolica* BCC16875 (GenBank: AGL39758.1).

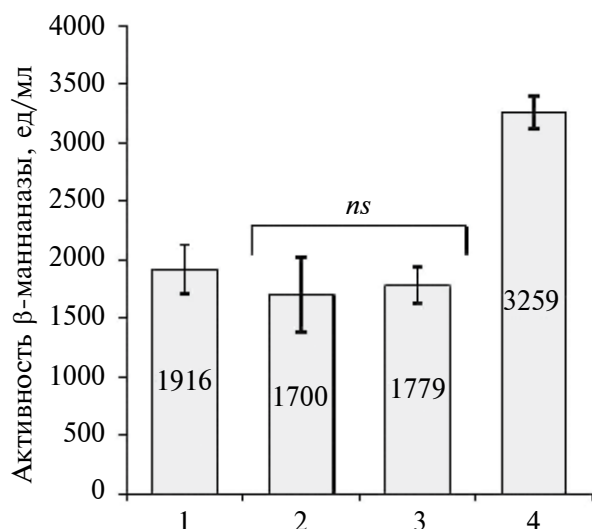
Сравнение последовательности промотора *pOhGAP* с аналогичными промоторами из родственных организмов *O. polymorpha*, *O. parapolyomorpha* и *O. angusta* не выявило каких-либо существенных структурных различий. Выравнивание

последовательностей представлено в дополнительных материалах 3 к статье.

**Анализ последовательности промоторного региона гена *FMD*, кодирующего формиатдегидрогеназу из дрожжей *O. haglerorum*.** На основе консервативных регионов локуса *FMD* в штаммах *O. parapolyomorpha* DL-1 и *O. polymorpha* NCYC495 leu1.1 были подобраны праймеры для амплификации 5'-нетранслируемой области гена *FMD* с частью последовательности структурной области гена. В результате был получен ПЦР-фрагмент размером около 900 п.н., содержащий предполагаемый промотор гена *FMD*, кодирующего формиатдегидрогеназу из дрожжей *O. haglerorum*, с высоким сходством к аналогичному региону в родственных штаммах. По аналогии с локусом *MOX* амплифицировали более протяженный участок региона *FMD* (см. Дополнительные материалы 2), содержащий открытую рамку считывания для формиатдегидрогеназы — фермента, состоящего из 362 аминокислотных остатков, который идентичен на 96,1% *Fmd* из штамма *O. polymorpha* NCYC495 leu1.1 (NCBI: XP\_018212858.1) и на 97,2% *Fmd* из штамма *O. parapolyomorpha* DL-1 (NCBI: XP\_013932954.1).

При сравнении последовательности промотора *pOhFMD* с аналогичными промоторами из родственных организмов *O. polymorpha*, *O. parapolyomorpha* и *O. angusta* было выявлено отсутствие участка размером 18 п.н. от –494 до –476 п.н. относительно последовательности *O. polymorpha*. Выравнивание промоторов представлено в Дополнительных материалах 3.

**Экспрессия гена *MANS* под контролем промоторов *pOhMOX*, *pOpMOX*, *pOhFMD* и *pOhGAP*.** Плазмидами *pOhMOX-MANS-HARS*, *pOhFMD-MANS-HARS*, *pOhGAP-MANS-HARS* и *pOpMOX-MANS-HARS* (рис. 1, б), содержащими HARS и различающимися промотором перед геном *MANS* трансформировали дрожжи *O. haglerorum*. Известно, что в дрожжах *O. polymorpha* наличие HARS на плазмиде способствует поддержанию ее в эпизомном состоянии [28], а интегративные плазмиды способны выщепляться из генома хозяина, захватывая участки ДНК, функционирующие как HARS и обеспечивающие автономную репликацию рекомбинантных плазмид [29]. В дрожжах *O. polymorpha* плазмиды, содержащие HARS, также могут интегрировать в геномную ДНК [30]. Для проведения исследования нами было отобрано по 12 трансформантов, в клетках которых содержались автономно реплицирующиеся плазмиды, сходные по размеру с исходными плазмидами (см. Дополнительные материалы 4). Подобный подход уже использовался ранее в исследованиях на дрожжах *O. polymorpha* [31, 32]. Эпизомная локализация плазмид была подтверждена в тесте на митотическую стабильность. Отобранные трансформанты имели сходные ростовые характеристики: оптическая плотность культуры



**Рис. 3.** Уровень активности манназазы (ед./мл) в образцах с геном *MANS* под контролем промоторов: 1 — *pOpMOX*; 2 — *pOhGAP*; 3 — *pOhFMD*; 4 — *pOhMOX*. Пределы погрешностей показывают стандартное отклонение среднего значения активности 12 трансформантов.  $p < 0.05$ , ns — несущественное различие.

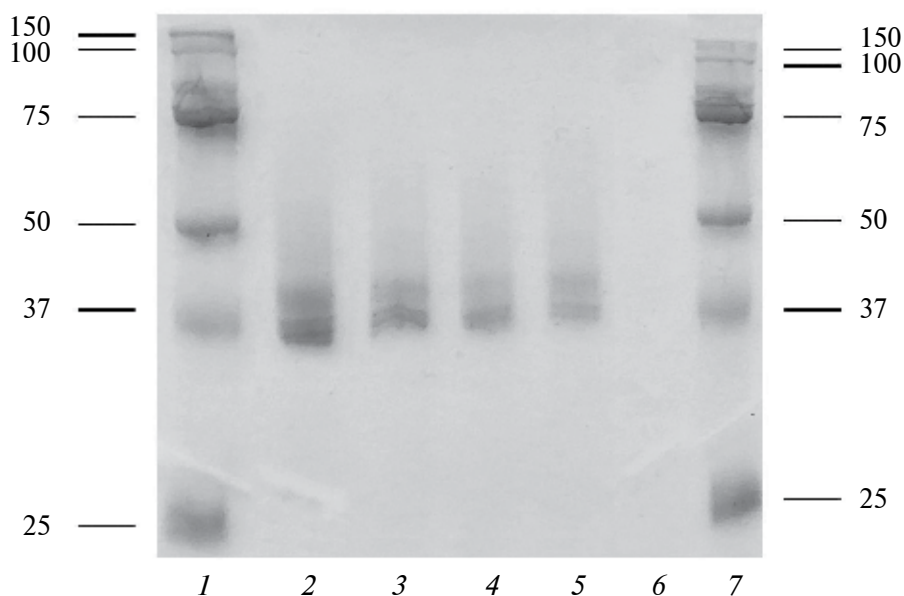
( $OD_{600}$ ) составила  $25 \pm 2$  ед. через 20 ч культивирования в селективной среде в пробирках.

По 12 трансформантов с каждой плазмидой культивировали в пробирках. Определяли активность β-манназазы в супернатанте. Среднее значение активности β-манназазы в супернатанте 12 трансформантов, содержащих плазмиду *pOpMOX*–*MANS*–*HARS* с промотором *pOpMOX*,

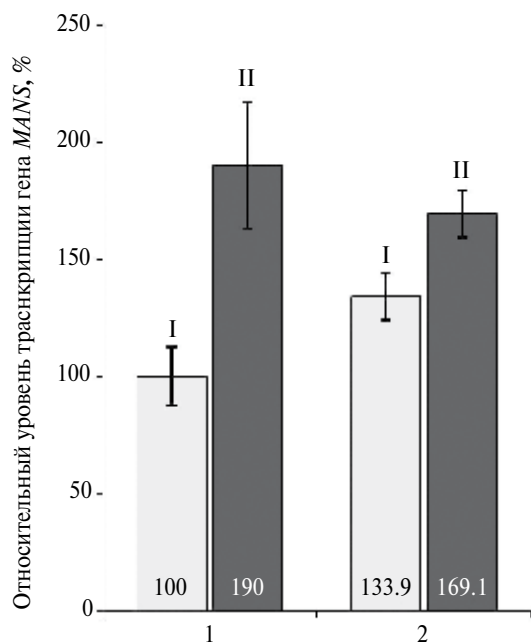
составило 1900 ед./мл (См. Дополнительные материалы 5). В этих же образцах до индукции метанолом активность β-манназазы не превышала 20–30 ед./мл. Поскольку конструкции экспрессионных плазмид (рис. 1б) отличаются только промоторной областью, то по разнице в активности β-манназазы в супернатанте анализируемых трансформантов можно косвенно судить о силе промоторов. Активность β-манназазы составляет 170, 93 и 89% в образцах, содержащих плазмиды с промоторами, соответственно, *pOhMOX*, *pOhFMD* и *pOhGAP* из *O. haglerorum* по сравнению с *pOpMOX* из *O. polymorpha* (рис. 3).

Проведение SDS-PAGE электрофореза показало, что β-манназаза, секретированная трансформантами *O. haglerorum*, мигрирует в виде двух форм с молекулярной массой около 38 и 40 кДа, возможно из-за разной степени гликозилирования (рис. 4). В последовательности *ManS* имеется один сайт для *N*-гликозилирования согласно программе NetNGlyc 1.0 ([www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)). Концентрация β-манназазы в супернатанте трансформантов с промотором *pOhMOX* выше, чем с другими промоторами, и по количеству секретированного белка в сторону снижения промоторы можно расположить следующим образом: *pOhMOX*, *pOpMOX*, *pOhFMD*, *pOhGAP*.

Далее исследовали уровень транскрипционной активности гена *MANS*, контролируемого промоторами *pOpMOX* и *pOhMOX*, методом ПЦР в реальном времени (рис. 5). В шести независимых трансформантах с каждым из промоторов определяли изменение экспрессии (количества транскриптов) гена



**Рис. 4.** Электрофорез в ПААГ с ДДС-На рекомбинантной β-манназазы, секретированной трансформантами *O. haglerorum*, содержащими плазмиды с промоторами *pOhMOX*, *pOpMOX*, *pOhFMD* и *pOhGAP*. 1, 7 — маркер молекулярной массы, кДа, 2 — *pOhMOX*, 3 — *pOpMOX*, 4 — *pOhFMD*; 5 — *pOhGAP*; 6 — образец с промотором *pOpMOX* в условиях без индукции.



**Рис. 5.** Относительный уровень транскрипции гена *MANS* (%), находящегося под контролем промоторов *pOhMOX* (II) или *pOpMOX* (I). Показан средний уровень транскрипции гена *MANS* в 6 трансформантах с каждым из промоторов при культивировании в среде с метанолом в течение 12 (1) и 20 ч (2). Уровень транскрипции гена *MANS* под контролем *pOpMOX* через 12 ч индукции принят за 100%. Пределы погрешностей показывают стандартное отклонение для трех независимых экспериментов,  $p < 0.05$ .

*MANS* после 12 и 20 ч индукции метанолом относительно образцов без индукции. За 100% был принят уровень экспрессии гена *MANS* под контролем промотора *pOpMOX* через 12 ч культивирования в среде с метанолом. Через 20 ч доля транскриптов гена *MANS* с промотора *pOpMOX* увеличилась приблизительно на 30%. Уровень транскрипции гена *MANS* с промотора *pOhMOX* оказался выше как через 12 ч, так и 20 ч индукции метанолом. Промотор *pOhMOX* из *O. haglerorum* активнее промотора *pOpMOX* из *O. polymorpha* приблизительно в 1.4–1.9 раз в этих условиях культивирования.

Полученные нами данные свидетельствуют об увеличенной силе промотора *pOhMOX* по сравнению с *pOpMOX* при экспрессии в клетках *O. haglerorum*. Одним из возможных объяснений различий в уровне экспрессии этих промоторов является их структурная организация. Оба промотора, клонированные в плазмиды *pOhMOX*–*MANS*–*HARS* и *pOpMOX*–*MANS*–*HARS*, содержат ТАТА-боксы, предполагаемый сайт связывания с Mx1 и UAS1 регуляторный элемент, однако в промоторе *pOhMOX* отсутствуют 22 п.н. на расстоянии –236 п.н. от стартового кодона АТГ в непосредственной близости от сайта связывания транскрипционного регулятора Mx1 (рис. 2). Возможно, отсутствие 22 п.н.

приводит к усилению связывания Mx1 с core-сайтом, повышая силу промотора *pOhMOX* в сравнении с промотором *pOpMOX*.

Результаты сравнения промоторов *pOhMOX* и *pOhFMD* по активности β-манназы согласуются с результатами, полученными Supri et al., которые исследовали аналогичные промоторы из дрожжей *O. polymorpha* по активности гетерологичной β-глюкуронидазы из *E. coli*. [32]. Также нами показано, что активность конститутивного промотора *pOhGAP* сравнима с активностями индуцируемых промоторов *pOpMOX* и *pOhFMD*, что согласуется с работой Yan et al. [33].

Таким образом, нами были идентифицированы в дрожжах *O. haglerorum* гены *MOX*, *FMD* и *GAP*, определены последовательности соответствующих промоторов, которые были охарактеризованы в сравнении с *pMOX* из *O. polymorpha* на примере активности β-манназы, секретируемой из клеток трансформантов *O. haglerorum*. Промоторы *pOhMOX* и *pOpMOX* сравнили также по относительному уровню транскрипции гена *MANS* методом ПЦР в реальном времени, подтвердив, что промотор *pOhMOX* сильнее промотора гена *MOX* из дрожжей *O. polymorpha* в клетках дрожжей *O. haglerorum*. Полученные результаты расширяют спектр знаний о промоторах термотолерантных дрожжей рода *Ogataea* и позволят оптимизировать систему экспрессии метилотрофных дрожжей *Ogataea haglerorum* для продукции рекомбинантных белков.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации: грант Курчатковского центра геномных исследований № 075-15-2019-1659.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abdel-Banat B.M.A., Hoshida H., Ano A., Nonklang S., Akada R. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 85. P. 861–867. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2248-5>
2. Gödecke S., Eckart M., Janowicz Z. A., Hollenberg C. P. // Gene. 1994. V. 139. № 1. P. 35–42. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90520-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90520-7)
3. Xu X., Ren S., Chen X., Ge J., Xu Z., Huang H. et al. // Virologica Sinica. 2014. V. 29. P. 403–409. <https://doi.org/10.1007/s12250-014-3508-9>
4. Bredell H., Smith J. J., Prins W. A., Gorgens J. F., van Zyl W. H. // FEMS Yeast Research. 2016. V. 16. № 2. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow001>



5. *Bredell H., Smith J. J., Gorgens J. F., van Zyl W. H.* // *Yeast*. 2018. V. 35. № 9. P. 519–529. <https://doi.org/10.1002/yea.3318>.
6. *Youn J. K., Shang L., Kim M. I., Jeong C. M., Chang H. N., Hahn M. S.* et al. // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 20. № 11. P. 1534–1538. <https://doi.org/10.4014/jmb.0909.09046>
7. *Gellissen G., Janowicz Z. A., Merckelbach A., Piontek M., Keup P., Weydemann U.* et al. // *Bio/Technology*. 1991. V. 9. № 3. P. 291–295. <https://doi.org/10.1038/nbt0391-291>
8. *Mayer A. F., Hellmuth K., Schlieker H., Lopez-Ulibarri R., Oertel S., Dahlems U.* et al. // *Biotechnol. Bioeng.* 1999. V. 63. № 3. P. 373–381. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(19990505\)63:3<373::aid-bit14>3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(19990505)63:3<373::aid-bit14>3.0.co;2-t)
9. *Smale S. T., Kadonaga J. T.* // *Annu. Rev. Biochem.* 2003. Vol. 72. № 1. P. 449–479. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161520>
10. *Portela R. M. C., Vogl T., Kniely C., Fischer J. E., Oliveira R., Glieder A.* // *ACS Synth. Biol.* 2017. V. 6. № 3. P. 471–484. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00178>
11. *Bar-Ziv R., Brodsky S., Chapal M., Barkai N.* // *Cell Rep.* 2020. V. 30. № 12. P. 3989–3995. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.114>
12. *Lin-Cereghino G. P., Godfrey L., de la Cruz B. J., Johnson S., Khuongsathiene S., Tolstorukov I.* et al. // *Mol. Cell. Biol.* 2006. V. 26. № 3. P. 883–897. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.3.883-897.2006>.
13. *Wang X. Wang Q., Wang J., Bai P., Shi L., Shen W., Ca M.* // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. № 12. P. 6245–6261. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.692053>.
14. *Kranthi B. V., Kumar R., Kumar N. V., Rao D. N., Rangarajan P. N.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1789. № 6–8. P. 460–468. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.05.004>
15. *Waterham H. R., Digan M. E., Koutz P. J., Lair S. V., Cregg V.* // *Gene*. 1997. V. 186. № 1. P. 37–44. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(96\)00675-0](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(96)00675-0)
16. *Harnpicharnchai P., Promdonkoy P., Sae-Tang K., Roongsawang N., Tanapongpipat S.* // *Ann. Microbiol.* 2014. V. 64. P. 1457–1462. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0765-z>
17. *Heo J. H., Hong W. K., Cho E. Y., Kim M. W., Kim J. Y., Kim C. H.* et al. // *FEMS Yeast Res.* 2003. V. 4. № 2. P. 175–184. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00150-8](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00150-8)
18. *Naumov G. I., Naumova E. S., Lee C. F.* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. № 7. P. 2465–2469. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002012>.
19. *Тарутина М. Г., Каширская М. Д., Лазарева М. Н., Лантвева А. Р., Синеокий С. П.* // *Биотехнология*. 2019. Т. 35. № 6. С. 51–56.
20. Патент РФ. 2022. № RU2764793 C1.
21. Патент РФ. 2022. № RU2785901 C1.
22. *Sambrook J., Russell D. W.* *Molecular Cloning a Laboratory Manual.* / Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
23. *Saraya R., Gidijala L., Veenhuis M., van der Klei I. J.* // *Methods Mol. Biol.* 2014. P. 43–62. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0563-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0563-8_3)
24. *Miller G. L.* // *Anal. Chem.* 1959. V. 31. № 3. P. 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
25. *Livak K. J., Schmittgen T. D.* // *Methods*. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
26. *Promdonkoy P., Tirasophon W., Roongsawang N., Eurwilaichitr L., Tanapongpipat S.* // *Curr. Microbiol.* 2014. V. 69. P. 143–148. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0568-x>
27. *Pereira G. G., Hollenberg C. P.* // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 238. № 1. P. 181–191. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0181q.x>.
28. *Roggenkamp R., Hansen H., Eckart M., Janowicz Z., Hollenberg C. P.* // *Mol. Gen. Genet.* 1986. V. 202. P. 302–308. <https://doi.org/10.1099/00221287-132-12-3459>
29. *Bogdanova A. I., Agaphonov M. O., Ter-Avanesyan M. D.* // *Yeast*. 1995. V. 11. № 4. P. 343–353. <https://doi.org/10.1002/yea.320110407>
30. *Kim S. Y., Sohn J.-H., Bae J.-H., Pyun Y.-R., Agaphonov M. O., Ter-Avanesyan M. D., Choi E. S.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. № 8. P. 4448–4454. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4448-4454.2003>
31. *Amuel C., Gellissen G., Hollenberg C. P., Suckow M.* // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2000. V. 5. P. 247–252. <https://doi.org/10.1007/BF02942181>
32. *Suppi S., Michelson T., Viigand K., Alamae T.* // *FEMS Yeast Res.* 2013. V. 13. № 2. P. 219–232. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12023>
33. *Yan C., Yu W., Yao L., Guo X., Zhou Y. J., Gao J.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2022. V. 106. № 9–10. P. 3449–3464. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11948-5>

## Comparison of the Efficiency of Various Promoters for the Production of Secreted $\beta$ -Mannanase by *Bacillus subtilis* by Cells of the Methylophilic Yeast *Ogataea haglerorum*

D. A. Podpletnev<sup>a</sup>, A. R. Lapteva<sup>a</sup>, S. P. Sineoky<sup>a</sup>, and M. G. Tarutina<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup>NRC «Kurchatov Institute», Moscow, 123182 Russia

<sup>b</sup>NRC «Kurchatov Institute», Kurchatov Genomic Center, Moscow, 123182 Russia

\*e-mail: m\_tarutina@mail.ru

In this article, strong promoters of thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea haglerorum* have been characterized. Promoters play a key role in the regulation of gene expression; therefore, they are the important element of expression vectors. Strong and strictly regulated promoters are a powerful tool for creating highly productive strains — producers of recombinant proteins. To expand the potential of the *O. haglerorum* expression system natural methanol-induced promoters of the *OhMOX* and *OhFMD* genes and the constitutive promoter of the *OhGAP* gene were studied in comparison with the promoter of the *MOX* gene from *O. polymorpha* yeast. A gene encoding recombinant  $\beta$ -mannanase was used as a reporter gene. It has been shown that in *O. haglerorum* yeast cells, the expression level (strength) of the *pOhMOX* promoter is about 1.4–1.9 times higher relative to the *pOpMOX* promoter from *O. polymorpha* yeast. The obtained data on the strength of promoters from yeast *O. haglerorum* can be useful in designing producers of recombinant proteins and optimizing metabolic pathways in methylotrophic yeast *O. haglerorum*.

**Keywords:** *Ogataea haglerorum*, promoters, Thermotolerant methylotrophic yeast,  $\beta$ -mannanase