

РИБОСОМНЫЙ ПРОМОТОР *pRPL25* ДРОЖЖЕЙ *Yarrowia lipolytica* КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ОБЪЕКТ ДЛЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ

© 2023 г. А. А. Черенкова¹, Б. В. Свиридов², Т. К. Дворянчикова², О. Е. Мелькина², *

¹ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет
им. Д.И. Менделеева», Москва, 125480 Россия

²ФГБУ НИИЦ «Курчатовский институт» Курчатовский комплекс
НБИКС-природоподобных технологий, Москва, 123098 Россия

*e-mail: oligamelkina@gmail.com

Поступила в редакцию 21.09.2023 г.

После доработки 16.10.2023 г.

Принята к публикации 08.11.2023 г.

В метаболической инженерии дрожжевых штаммов-продуцентов промоторы относятся к ключевым элементам. Благодаря высокому уровню активности промотор гена *RPL25*, кодирующего белок L25 большой субчастицы рибосомы *Yarrowia lipolytica*, — это перспективный объект исследования и оптимизации. Для исследования структуры этого промотора нами сконструирована библиотека рандомизированных последовательностей с шагом в 100 нуклеотидов. Используя в качестве белка-репортера зеленый флуоресцентный белок, мы оценили активность полученных промоторных последовательностей. Показано, что среди исследованных производных промотора *pRPL25* минимальная функциональная длина составляет 199 п.н., а оптимальная — 497 п.н. Также выявлено существенное снижение уровня экспрессии производных промотора *pRPL25* при уменьшении длины от 497 до 400 п.н., на основании чего мы предполагаем, что между 400 и 500 нуклеотидами промотора гена *RPL25* находится активирующая последовательность (upstream activating sequence, UAS). Промотор *pRPL25* и его производные можно использовать в биоинженерии метаболических путей с требуемым уровнем экспрессии генов. Сконструированные на их основе штаммы могут быть более эффективными продуцентами целевых молекул, чем классические системы экспрессии, например на основе *Saccharomyces cerevisiae*.

Ключевые слова: *Yarrowia lipolytica*, метаболическая инженерия, рибосомный промотор, синтетический промотор, флуоресценция

DOI: 10.56304/S0234275823050058

Дрожжи *Yarrowia lipolytica* относятся к важным нетрадиционным продуцентам широкого спектра соединений промышленной биотехнологии, включая олеохимические соединения, терпены, органические кислоты, многоатомные спирты и рекомбинантные белки [1–4]. При конструировании штаммов-продуцентов *Y. lipolytica* необходима сборка одной или нескольких экспрессионных кассет — единиц транскрипции, каждая из которых состоит из промотора, кодирующей последовательности и терминатора [1, 5].

Типичная промоторная последовательность дрожжей включает основной (коровый) промо-

тор и вышерасположенную регуляторную область [2, 6], что схематично изображено на рис. 1.

Коровый промотор — основная детерминанта экспрессии гена, он обеспечивает базовый, минимально необходимый уровень транскрипции [7]. Его длина составляет около 100–200 п.н., включая ТАТА-последовательность, с которой связывается РНК-полимераза II и начинается процесс транскрипции [7–9]. Регуляторная область содержит один или несколько сайтов связывания факторов транскрипции, которые могут взаимодействовать друг с другом и с основными транскрипционными белковыми комплексами, регулируя активность промотора [6, 10].

В настоящее время исследованы и модифицированы различные эндогенные или гибридные промоторы дрожжей *Y. lipolytica* [2]. Увеличение разнообразия доступных промоторов, варьирую-

Сокращения: *hrGFP* (humanized *Renilla reniformis* green fluorescent protein) — ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок; *RPL25* — ген, кодирующий белок L25 60S субчастицы рибосомы; *TEF1* — ген, кодирующий фактор элонгации трансляции 1α.

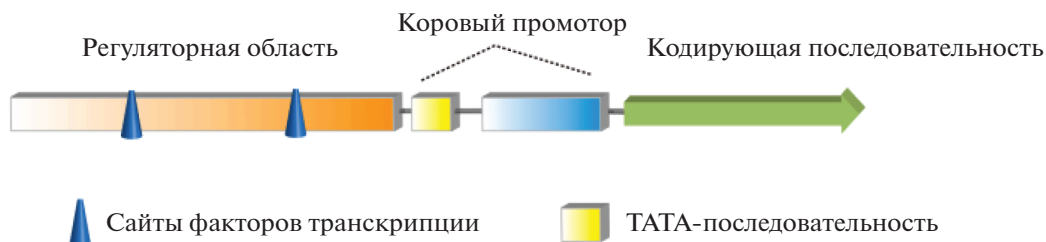


Рис. 1. Схематичное строение дрожжевого промотора. Адаптировано из работы [2].

Fig. 1. Schematic structure of a yeast promoter. Adapted from [2].

```

TTCAACCGCCACTTTTCGCACCTCTGGATGCAAGAAGCCCCACATCACCATTGTCAACAGAGCAACGGT
AGAAGCCCGAATGATGGCCGATAGATACGAATTTTCATTAGTAATGAAGTTGAATAGTGTATCTGCGTG
GCGGGCCTTATACCTGTGCTTTTATTCACAATGTTTCAGTGAGATATTAACCTGCAGTACATCCGCGGT
TAAATAAGTTTAGTTGGGAGTACTTGTGTATGTCAACAGACGACCTACTGACTCTGTATTGTAGGGCA
ACAGTTCGCACAAGTAGACGTTTAGCACATTAATCTTCGAAGTAATGCTTTATCACGTGACATAATCTG
CAAAAAGTCATATGACGCTCCTGGGCAATAACATGCAACAAGTCCGGAGAATAAGGCCCATTTATTAG
TGCATGGCGATCTTCGAACGCGCACTTCTATAGCTCCATCCATCCATCCCATCACCAAGTCCAAACTCC
GTCTACCAATAAGGGTTTAAGGTTCGTCCTTTTGGGGTTCATCTATCCACGTGACCTATTTTAGACGAC
CCTAAATATAGCTCTAGAAATCGTCATTATGGTTGAATGTTTCTGTCCACATGCCACTACAAGACAAAT
ATTTACCTGGTAATAATTCCCCTACCACATCTTCCGCTCCCACACAGAGTTACCCTGCCTTTAGTCTAG
GGTTAGCCCTAAAGACAGTACAGGCTAACCTAAAGCGGTGCCAAACTTTTCACTACATCAAATCCGC
CGGCTCAAAAATCTTAGTTCCTCAGCTCACACTCACGACATCAAC
    
```

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность промотора гена *RPL25* *Y. lipolytica*. Направление 5' → 3'.

Fig. 2. Nucleotide sequence of the *Y. lipolytica* *RPL25* gene promoter. Direction 5' → 3'.

щих по транскрипционным характеристикам, способствует расширению инструментальной базы для метаболической инженерии штаммов-продуцентов. Ввиду сложности и специфичности системы регуляции эукариотических промоторов в работах по метаболической инженерии *Y. lipolytica* чаще всего выбирают эндогенные промоторные последовательности [2, 11].

Потенциальным источником дрожжевых промоторов с сильной конститутивной экспрессией могут быть гены, кодирующие белки рибосом. В исследованиях *Saccharomyces cerevisiae* показано, что 50% транскриптов, синтезированных РНК-полимеразой II, относится к пулу генов рибосомных белков, а активность промоторов этих генов максимальна в фазе экспоненциального роста клеток, тогда как при переходе к стационарной фазе заметно снижается [12, 13]. В недавно проведенном скрининге эндогенных и гибридных промоторов *Y. lipolytica* [14] показано, что в экспоненциальной фазе роста, при выращивании как в богатой, так и в минимальной питательной среде, из

64 исследованных промоторов рибосомных белков только активность промотора гена *RPL25* превышала таковую для известного “сильного” промотора гена *TEF1* (кодирует фактор элонгации трансляции 1α) [15].

В проведенной нами работе нативный рибосомный промотор pRPL25 был использован как объект получения рандомизированных последовательностей с различной активностью, которые в дальнейшем можно использовать при конструировании штаммов-продуцентов *Y. lipolytica* с требуемым уровнем экспрессии генов.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы микроорганизмов и плазмиды

В работе использовали штаммы микроорганизмов и плазмиды, представленные в табл. 1.

Нуклеотидная последовательность промотора гена *RPL25*, кодирующего белок L25 60S субчастицы рибосомы (локус YALI1_F32792g), представлена на рис. 2.

Таблица 1. Штаммы и плазмиды
Table 1. Strains and plasmids

Штамм или плазида	Характеристика	Источник или ссылка
Штаммы <i>Escherichia coli</i>		
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 nupG recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1</i> λ^-</i>	[16]
Штаммы <i>Y. lipolytica</i>		
Y-3178	W29 MatA, дикий тип	БРЦ ВКПМ ^a
Y-4972	W29 Δ <i>ku70::URA3</i>	БРЦ ВКПМ
Y-4973	W29 Δ <i>ku70</i> Δ <i>URA3</i>	БРЦ ВКПМ
Y-1156	W29 Δ <i>ku70</i> IntC2::P _{TEF} - <i>hrGFP</i> -T _{LIP2} — с интегрированным в C2-локус генома промотором pTEF1, транскрипционно слитым с геном-репортером <i>hrGFP</i>	[14]
Y-1384	W29 Δ <i>ku70</i> IntC2::P _{RPL25} - <i>hrGFP</i> -T _{LIP2} — с интегрированной в C2-локус генома полноразмерной последовательностью промотора pRPL25, транскрипционно слитой с геном-репортером <i>hrGFP</i>	[14]
RP100	W29 Δ <i>ku70</i> IntC2::P _{dRPL25_100} - <i>hrGFP</i> -T _{LIP2} — как Y-1384, но содержит производное промоторной последовательности pRPL25 длиной 100 п.н.	Данная работа
RP199	W29 Δ <i>ku70</i> IntC2::P _{dRPL25_199} - <i>hrGFP</i> -T _{LIP2} — как Y-1384, но содержит производное промоторной последовательности pRPL25 длиной 199 п.н.	Данная работа
RP300	W29 Δ <i>ku70</i> IntC2::P _{dRPL25_300} - <i>hrGFP</i> -T _{LIP2} — как Y-1384, но содержит производное промоторной последовательности pRPL25 длиной 300 п.н.	Данная работа
RP400	W29 Δ <i>ku70</i> IntC2::P _{dRPL25_400} - <i>hrGFP</i> -T _{LIP2} — как Y-1384, но содержит производное промоторной последовательности pRPL25 длиной 400 п.н.	Данная работа
RP497	W29 Δ <i>ku70</i> IntC2::P _{dRPL25_497} - <i>hrGFP</i> -T _{LIP2} — как Y-1384, но содержит производное промоторной последовательности pRPL25 длиной 497 п.н.	Данная работа
RP600	W29 Δ <i>ku70</i> IntC2::P _{dRPL25_600} - <i>hrGFP</i> -T _{LIP2} — как Y-1384, но содержит производное промоторной последовательности pRPL25 длиной 600 п.н.	Данная работа
Плазмиды		
pProUA-mScarlet	Плазмидный вектор содержит ген зеленого флуоресцентного белка (<i>hrGFP</i>), который оптимизирован по кодонам для экспрессии в <i>Y. lipolytica</i> , а также селективный маркер <i>URA3</i> , представляющий собой ген синтеза урацила. Вектор разработан для встраивания исследуемого промотора методом Golden Gate Assembly непосредственно перед геном <i>hrGFP</i> ; Ap ^r ^b	[14]
pCasNA-IntC2	Хелперная плазида содержит ген белка Cas9, последовательность ДНК-мишени (sgRNA) для встраивания в C2-локус хромосомы и ген устойчивости к ноурсетрицину; Ap ^r	[14]
pProUA-dRPL25_100	Производное промоторной последовательности pRPL25 длиной 100 п.н., встроенное в вектор pProUA-mScarlet; Ap ^r	Данная работа
pProUA-dRPL25_199	Производное промоторной последовательности pRPL25 длиной 199 п.н., встроенное в вектор pProUA-mScarlet; Ap ^r	Данная работа
pProUA-dRPL25_300	Производное промоторной последовательности pRPL25 длиной 300 п.н., встроенное в вектор pProUA-mScarlet; Ap ^r	Данная работа

Таблица 1. Окончание

Штамм или плаزمида	Характеристика	Источник или ссылка
pProUA-dRPL25_400	Производное промоторной последовательности pRPL25 длиной 400 п.н., встроенное в вектор pProUA-mScarlet; Ap ^r	Данная работа
pProUA-dRPL25_497	Производное промоторной последовательности pRPL25 длиной 497 п.н., встроенное в вектор pProUA-mScarlet; Ap ^r	Данная работа
pProUA-dRPL25_600	Производное промоторной последовательности pRPL25 длиной 600 п.н., встроенное в вектор pProUA-mScarlet; Ap ^r	Данная работа

Примечание: ^aНациональный биоресурсный центр “Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов”; ^bAp^r – устойчивость к ампициллину.

Note: ^aNational bioresource center “All-Russian Collection of Industrial Microorganisms”; ^bAp^r – ampicillin resistance.

Таблица 2. Праймеры, использованные для создания рандомизированной библиотеки промотора pRPL25
Table 2. Primers used to generate the randomized pRPL25 promoter library

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')
RPL1F	GCAGAAGACTCACGGGACAGTCACAGGCTAACC
RPL2F	GCAGAAGACTCACGGGCCACTACAAGACAAATATTTAC
RPL3F	GCAGAAGACTCACGGGGTTCGTCCTTTTTGGGGT
RPL4F	GCAGAAGACTCACGGCCATTATTTAGTGCATGGCG
RPL5F	GCAGAAGACTCACGGTTAATCTTCGAAGTAATGCTTTA
RPL6F	GCAGAAGACTCACGGGCGGTTAAATAAGTTTAGTTGG
RPL_R	ATGGAAGACAGCATTGTTGATGTCGTGAGTGTGA

Питательные среды и реактивы

Клетки *E. coli* TOP10 растили в бульоне Лурия–Бертани (LB) при 37°C в течение 2 ч до средней логарифмической фазы роста. Селекцию трансформированных штаммов TOP10 проводили на L-агаре с добавлением ампициллина (100 мкг/мл). Клетки *Y. lipolytica* растили в богатой среде YP (пептон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л) или минимальной среде YNB (Yeast Nitrogen Base; M139, HIMEDIA 6.75 г/л) с добавлением в качестве источника углерода 1% об. глюкозы. Для получения агаризованных сред дополнительно вносили 20 г/л агар-агара.

Ноурсетрицин (Jena Bioscience, Германия) использовали для селекции трансформированных штаммов *Y. lipolytica* в концентрации 50 мкг/мл агаризованной среды YP с добавлением 1% об. глюкозы.

Создание библиотеки рандомизированных последовательностей промотора pRPL25

Рандомизированные последовательности промотора pRPL25 с шагом в 100 п.н. синтезировали методом ПЦР с использованием праймеров, последовательности которых указаны в табл. 2. В качестве матрицы использовали хромосомную ДНК дрожжей *Y. lipolytica* Y-3178.

ПЦР-продукты встраивали по сайтам рестрикции *Bpi*I в плазмидный вектор pProUA-mScarlet методом Golden Gate Assembly непосредственно перед геном *hrGFP*. Трансформацию клеток *E. coli* TOP10 проводили кальциевым методом по ранее описанному протоколу [16]. Полученные плазмиды: pProUA-dRPL25_100, pProUA-dRPL25_199, pProUA-dRPL25_300, pProUA-dRPL25_400, pProUA-dRPL25_497 и pProUA-dRPL25_600 – проверяли на правильность сборки с помощью аналитической рестрикции и секвенированием по Сэнгеру.

Конструирование штаммов

Полученные плазмиды линейаризовали по сайтам рестрикции *Not*I и встраивали в хромосому С штамма Y-4973 *Y. lipolytica*. Трансформацию дрожжей проводили совместно с хелперной плазмидой pCasNA-IntC2 по ранее описанному протоколу [14].

Схематичное изображение интегрированных в C2-локус генома конструкций представлено на рис. 3.

Измерение оптической плотности и флуоресценции биомассы *Y. lipolytica*

Измерение оптической плотности и флуоресценции дрожжевых культур проводили на планшетном люминометре CLARIOstar Plus (BMG Labtech,

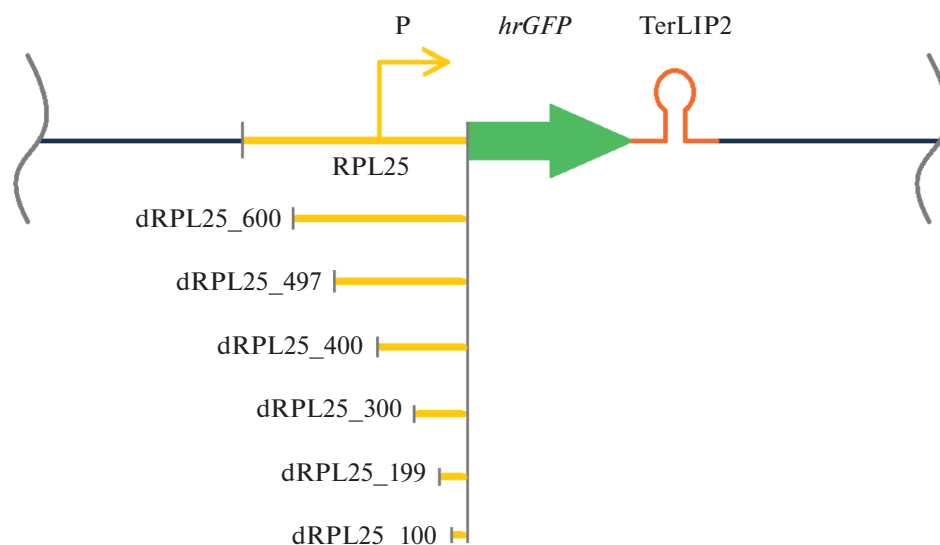


Рис. 3. Схематичное изображение интегрированных в хромосому *C. Y. lipolytica* конструкций, содержащих рандомизированные последовательности промотора pRPL25. Обозначения: P – промотор; *hrGFP* – ген зеленого флуоресцентного белка; TerLIP2 – терминатор гена *LIP2*.

Fig. 3. Schematic representation of *Y. lipolytica* C chromosome-integrated constructs containing randomized pRPL25 promoter sequences. Designations: P, promoter; *hrGFP*, green fluorescent protein gene; TerLIP2, terminator of the *LIP2* gene.

Германия). Для этого 200 мкл дрожжевой культуры осаждали центрифугированием, полученный осадок промывали 200 мкл дистиллированной воды, после чего ресуспендировали в таком же объеме дистиллированной воды. Для корректного измерения значений оптической плотности и флуоресценции пробы с дрожжевыми клетками разводили в 10 раз и 100 мкл полученной суспензии клеток переносили в черный 96-луночный планшет (#655096; Greiner Bio-One, Германия) для исключения перекрестного засвечивания. Планшет помещали в люминометр и измеряли оптическую плотность при длине волны 600 нм (OD_{600}) и флуоресценцию ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 495/535 нм). Коэффициент усиления фотоумножителя автоматически регулировался функцией расширенного динамического диапазона. Измеренные значения нормировали на время накопления – 1 с. В качестве образца сравнения использовали лунки с 200 мкл дистиллированной воды. Обработку полученных данных проводили с использованием программного обеспечения MARS (BMG Labtech).

Оценка активности промоторов

Измеренные значения оптической плотности (OD_{600}) и флуоресценции обрабатывали с помощью программного обеспечения Excel (Microsoft Office 2010). Относительную флуоресценцию (Relative Fluorescence, RF) для каждой лунки рассчитывали путем деления значения измеренной флуоресценции на OD_{600} . Активность исследуемого

(*i*-го) промотора (P_i) рассчитывали по следующему уравнению:

$$P_i (\%) = \frac{RF_{P_i} - \bar{X}(RF_{parent})}{\bar{X}(RF_{pTEF1} - \bar{X}(RF_{parent}))} \times 100,$$

где RF_{P_i} и RF_{pTEF1} – значения относительной флуоресценции штаммов с интегрированными *i*-м промотором и pTEF1 соответственно; RF_{parent} – значение относительной флуоресценции родительского штамма Y-4972 без интеграции; $\bar{X}$ – среднее арифметическое значение для трех повторов.

Активность каждого промотора (P_i) рассчитывали по шкале, где аутофлуоресценция родительского штамма Y-4972 без интеграции равна 0%, а флуоресценция штамма Y-1156 (W29 $\Delta ku70$ IntC2::P_{TEF1}-*hrGFP*-T_{LIP2}) с сильным промотором pTEF1 равна 100%. Стандартное отклонение для полученных значений силы *i*-го промотора рассчитывали на основе трех повторов с использованием независимых трансформантов с каждой конструкцией.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования активности промоторов рандомизированной библиотеки в сравнении с исходным промотором pRPL25 полученные дрожжевые трансформанты с каждой конструкцией инкубировали в богатой (YP) и минимальной (YNB) средах до экспоненциальной и стационарной фаз роста. Три изолированных колонии каждого штамма инокулировали в 20-миллилитровые стеклянные

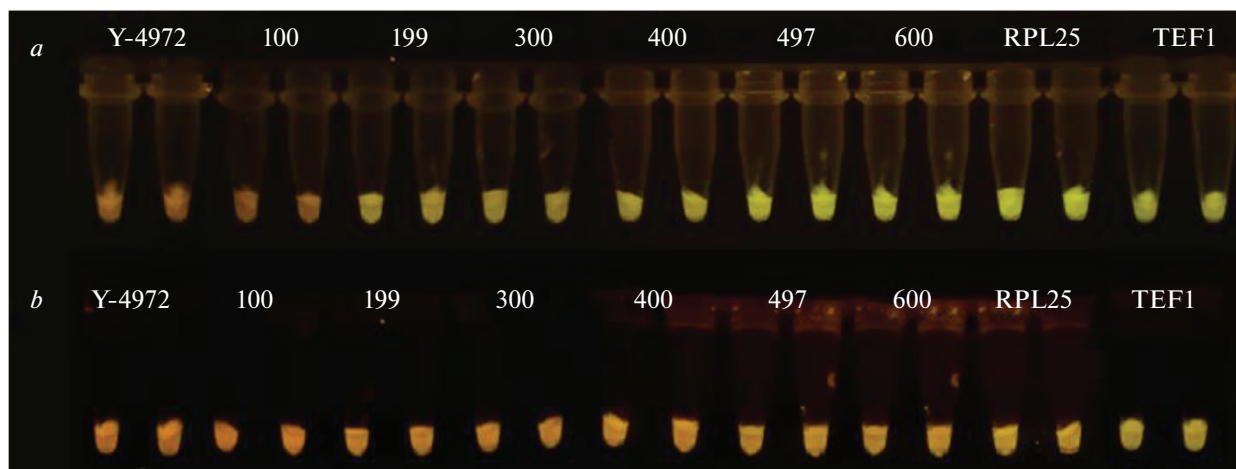


Рис. 4. Визуальная оценка флуоресценции биомассы штаммов *Y. lipolytica*, культивированных в среде YP с 1% об. глюкозы в течение 16 (а) и 32 (б) ч. Слева направо: родительский штамм Y-4972 без интеграции; штаммы с интегрированными в геном промоторными последовательностями: dRPL25_100, _199, _300, _400, _497, _600, RPL25 и TEF1.

Fig. 4. Visual assessment of biomass fluorescence of *Y. lipolytica* strains cultivated in YP medium with 1% vol. glucose for 16 (a) and 32 (b) h. From left to right: parent Y-4972 strain without integration; strains with the genome integrated promoter sequences: dRPL25_100, _199, _300, _400, _497, _600, RPL25, and TEF1.

пробирки, содержащие 1 мл YP с 1% об. глюкозы, и культивировали в течение 16–20 ч при 30°C и перемешивании со скоростью 250 об/мин. Полученную культуру засевали в 50-миллилитровые стеклянные пробирки, содержащие 2 мл YP или YNB с 1% об. глюкозы, доводили оптическую плотность до 0.1 OD₆₀₀ и растили при 30°C и 250 об/мин до экспоненциальной и стационарной фаз роста (соответственно 16/32 ч для богатой среды и 24/48 ч для минимальной среды). Из каждой культуры отбирали по 200 мкл суспензии, осаждали клетки центрифугированием (12000 g в течение 1 мин) и промывали в 200 мкл дистиллированной воды. На этом этапе визуально оценивали активность исследуемых промоторов — по флуоресценции биомассы штамма в синем светодиодном трансиллюминаторе DR46B (Clare Chemical Research, США) с оранжевым фильтром (рис. 4).

На следующем этапе измеряли оптическую плотность и флуоресценцию биомассы штаммов и рассчитывали активность промоторов по алгоритму, приведенному в разделе “Условия эксперимента”. Полученные результаты представлены на рис. 5.

Как видно из результатов, представленных на рис. 4 и 5, при длине последовательности pRPL25 в 100 п.н. интенсивность флуоресценции трансформанта аналогична контрольному штамму *Y. lipolytica* 4972. При увеличении длины до 199 п.н. активность промотора усиливается и достигает 30–40% (зависит от среды культивирования и стадии роста) от pTEF1. При увеличении длины промотора до 400 п.н. интенсивность флуоресценции и активность промотора практически не

меняются. Исходя из этого, можно заключить, что последовательность dRPL25 длиной 199 п.н. представляет собой коровый элемент промотора pRPL25, обеспечивающий базовый уровень экспрессии.

При дальнейшем увеличении длины промоторной последовательности до 497 п.н. наблюдали резкое усиление интенсивности флуоресценции и, следовательно, активности промотора: с 50 до 120% от активности pTEF1. На основе наблюдаемой разницы в силе dRPL25_400 и dRPL25_497 можно предположить, что между 400 и 500 нуклеотидами pRPL25 находится активирующая последовательность (upstream activating sequence, UAS).

Дальнейшее увеличение длины промотора pRPL25 до 600 п.н. не приводило к усилению его активности как в минимальной, так и в богатой среде. Таким образом, можно заключить, что последовательность dRPL25 длиной 497 п.н. может выступать в качестве оптимального укороченного варианта полноразмерного промотора pRPL25 без существенного снижения его силы.

Следует заметить, что для всех исследованных промоторов рандомизированной библиотеки выявлено снижение экспрессии репортерного гена при переходе от экспоненциальной к стационарной фазе роста штаммов *Y. lipolytica*, что характерно и для нативного промотора гена *RPL25*. Это видно как визуально — по ослаблению зеленой флуоресценции биомассы (рис. 4), — так и по данным гистограмм (рис. 5). Данная закономерность наблюдается при выращивании дрожжевой культуры как в богатой, так и в минимальной питательной среде. Сопоставимость результатов, полу-

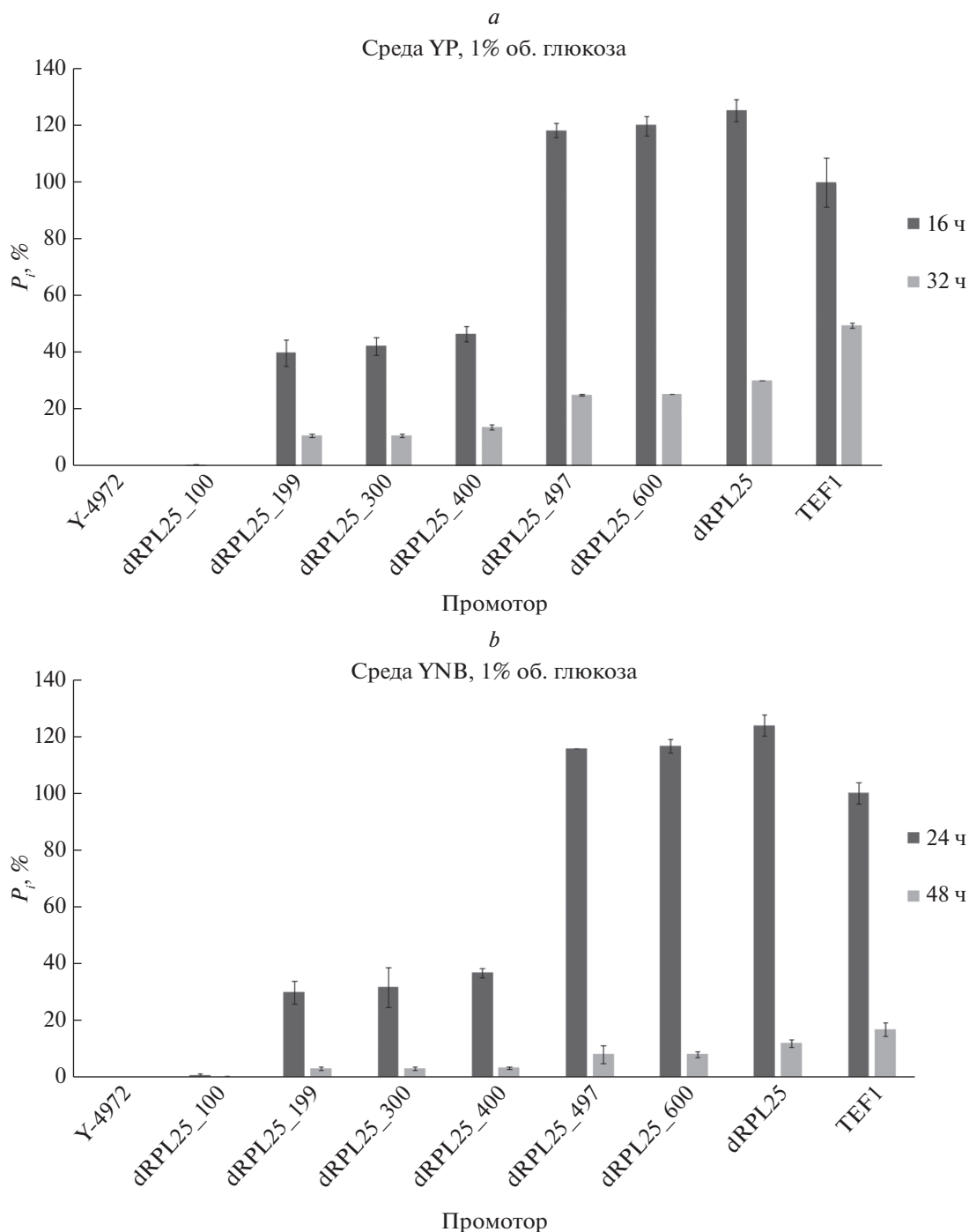


Рис. 5. Оценка активности промоторов (P_i) в штаммах *Y. lipolytica*, культивируемых в средах YP (*a*) и YNB (*b*) с 1% об. глюкозы до экспоненциальной и стационарной фаз роста (16/32 и 24/48 ч соответственно для *a* и *b*). Планки погрешностей отображают стандартное отклонение, рассчитанное на основе трех независимых трансформантов.

Fig. 5. Evaluation of promoter activity (P_i) in *Y. lipolytica* strains cultivated in YP (*a*) and YNB (*b*) media with 1% vol. glucose to exponential and stationary growth phases (16/32 and 24/48 h for *a* and *b*, respectively). Error bars represent the standard deviation calculated for three independent transformants.

ченных для сред различного состава, может свидетельствовать об одинаковой регуляции активности исследуемых промоторов в разных условиях роста клеток дрожжей [13]. Полученные результаты по снижению активности рибосомных промоторов в

стационарной фазе роста клеток согласуются с данными исследований, проведенных на *S. cerevisiae* [12, 13].

Стабильный уровень экспрессии сильных конститутивных промоторов обеспечивает высо-

кие выходы целевых продуктов, что было показано для эндогенных промоторов *Y. lipolytica* pFBA1, pTDH1, pGPM1 [17], задействованных в катаболических реакциях, а также для рибосомных промоторов pTEF1 и pRPS7 [15]. Для приведенных “катаболических” промоторов высокую активность регистрировали как в экспоненциальной, так и в стационарной фазах роста дрожжевой культуры, что позволяет применять их для синтеза гетерологичных белков или накопления липидных соединений [17], где важно сохранение высокого уровня экспрессии ключевых генов в стационарной фазе роста культуры.

Характерное для рибосомных промоторов дрожжей снижение активности в стационарной фазе роста можно использовать как инструмент для конструирования метаболических путей, в которых синтез конечных или промежуточных продуктов необходим на стадии экспоненциального роста [3, 18, 19]. Однако из рибосомных промоторов *Y. lipolytica*, помимо широкого используемого сильного промотора pTEF1, применение находит только значительно уступающий ему по активности промотор гена *RPS7*, кодирующего белок S7 малой субчастицы рибосомы [15, 20].

Исследованные нами нативный рибосомный промотор pRPL25 и его производное dRPL25_497 проявляют сопоставимые с pTEF1 уровни активности и дополняют набор сильных конститутивных промоторов, доступных для метаболической инженерии дрожжей *Y. lipolytica*. Сконструированные на их основе штаммы могут быть более эффективными продуцентами биологически активных молекул, чем классические системы экспрессии, такие как *S. cerevisiae* [15, 21, 22]. Более короткие производные промотора pRPL25, со сниженной активностью, также могут найти применение для решения задач метаболической инженерии, например, когда использование сильного промотора может привести к снижению выхода целевого продукта [23].

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим к.б.н. Т.В. Юзбашева за любезно предоставленные плазмиды из набора Yalcraft [14].

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках тематического плана Государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Madzak C. *Yarrowia lipolytica* strains and their biotechnological applications: how natural biodiversity and metabolic engineering could contribute to cell factories

- improvement. *J. Fungi*, 2021, 7(7), 548. <https://doi.org/10.3390/jof707548>
2. Sun M.L., Shi T.Q., Lin L., Ledesma-Amaro R., Ji X.J. Advancing *Yarrowia lipolytica* as a superior biomanufacturing platform by tuning gene expression using promoter engineering. *Bioresour. Technol.*, 2022, 347, 126717. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126717>
3. Soong Y.V., Liu N., Yoon S., Lawton C., Xie D. Cellular and metabolic engineering of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for bioconversion of hydrophobic substrates into high-value products. *Eng. Life Sci.*, 2019, 19(6), 423–443. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800147>
4. Park Y.K., Ledesma-Amaro R. What makes *Yarrowia lipolytica* well suited for industry? *Trends Biotechnol.*, 2023, 41(2), 242–254. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.07.006>
5. Decoene T., De Maeseneire S.L., De Mey M. Modulating transcription through development of semi-synthetic yeast core promoters. *PLoS One*, 2019, 14(11), e0224476. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224476>
6. Blazeck J., Alper H.S. Promoter engineering: recent advances in controlling transcription at the most fundamental level. *Biotechnol. J.*, 2013, 8(1), 46–58. <https://doi.org/10.1002/biot.201200120>
7. Portela R.M., Vogl T., Kniely C., Fischer J.E., Oliveira R., Glieder A. Synthetic core promoters as universal parts for fine-tuning expression in different yeast species. *ACS Synth. Biol.*, 2017, 6(3), 471–484. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00178>
8. Lubliner S., Regev I., Lotan-Pompan M., Edelheit S., Weinberger A., Segal E. Core promoter sequence in yeast is a major determinant of expression level. *Genome Res.*, 2015, 25(7), 1008–1017. <https://doi.org/10.1101/gr.188193.114>
9. Haberle V., Stark A. Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2018, 19(10), 621–637. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0028-8>
10. Blazeck J., Liu L., Redden H., Alper H. Tuning gene expression in *Yarrowia lipolytica* by a hybrid promoter approach. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77(22), 7905–7914. <https://doi.org/10.1128/AEM.05763-11>
11. Liu R., Liu L., Li X., Liu D., Yuan Y. Engineering yeast artificial core promoter with designated base motifs. *Microb. Cell Fact.*, 2020, 19(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01305-4>
12. Warner J.R. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem. Sci.*, 1999, 24(11), 437–440. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(99\)01460-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(99)01460-7)
13. Keren L., Zackay O., Lotan-Pompan M., Barenholz U., Dekel E., Sasson V., Aidelberg G., Bren A., Zeevi D., Weinberger A., Alon U., Milo R., Segal E. Promoters maintain their relative activity levels under different growth conditions. *Mol. Syst. Biol.*, 2013, 29(9), 701. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.59>
14. Yuzbashev T.V., Yuzbasheva E.Y., Melkina O.E., Patel D., Bubnov D., Dietz H., Ledesma-Amaro R. A DNA assembly toolkit to unlock the CRISPR/Cas9 potential for metabolic engineering. *Commun. Biol.*, 2023, 6(1), 858. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05202-5>

15. Müller S., Sandal T., Kamp-Hansen P., Dalbøge H. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 1998, 14(14), 1267–1283. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(1998100\)14:14<1267::AID-YEA327>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(1998100)14:14<1267::AID-YEA327>3.0.CO;2-2)
16. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Москва, Мир, 1984, 480 с.
17. Hong S.P., Seip J., Walters-Pollak D., Rupert R., Jackson R., Xue Z., Zhu Q. Engineering *Yarrowia lipolytica* to express secretory invertase with strong FBA1_{IN} promoter. *Yeast*, 2012, 29(2), 59–72. <https://doi.org/10.1002/yea.1917>
18. Wang D.N., Feng J., Yu C.X., Zhang X.K., Chen J., Wei L.J., Liu Z., Ouyang L., Zhang L., Hua Q., Liu F. Integrated pathway engineering and transcriptome analysis for improved astaxanthin biosynthesis in *Yarrowia lipolytica*. *Synth. Syst. Biotechnol.*, 2022, 7(4), 1133–1141. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2022.08.001>
19. Celinska E., Borkowska M., Bialas W., Kubiak M., Korpys P., Archacka M., Ledesma-Amaro R., Nicaud J.M. Genetic engineering of Ehrlich pathway modulates production of higher alcohols in engineered *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.*, 2019, 19(2), foy122. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy122>
20. Cho E.M., Lee H.S., Eom C.Y., Ohta A. Construction of high sensitive detection system for endocrine disruptors with yeast n-alkane-assimilating *Yarrowia lipolytica*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 20(11), 1563–1570. <https://doi.org/10.4014/jmb.1004.04030>
21. Madzak C., Gaillardin C., Beckerich J.M. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J. Biotechnol.*, 2004, 109(1–2), 63–81. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.10.027>
22. Nicaud J.M. *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 2012, 29(10), 409–418. <https://doi.org/10.1002/yea.2921>
23. Dulermo R., Brunel F., Dulermo T., Ledesma-Amaro R., Vion J., Trassaert M., Thomas S., Nicaud J.M., Leplat C. Using a vector pool containing variable-strength promoters to optimize protein production in *Yarrowia lipolytica*. *Microb. Cell Fact.*, 2017, 16(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0647-3>

***Yarrowia lipolytica* Ribosomal Promoter pRPL25 as a Perspective Object for Metabolic Engineering of Producer Strains**

A. A. Cherenkova^a, B. V. Sviridov^b, T. K. Dvoryanchikova^b, and O. E. Melkina^{b, #}

^aMendeleev University of Chemical Technology, Moscow, 125480 Russia

^bComplex of NBICS Technologies, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123098 Russia

[#]e-mail: oligamelkina@gmail.com

Abstract—Promoters are crucial components of yeast producer strain metabolic engineering. Due to its high activity, the promoter of the *RPL25* gene, which encodes L25 protein of large ribosomal subunit, is a promising object for investigation and optimization. Here, to investigate the *Yarrowia lipolytica* pRPL25 promoter structure, a randomized library of its sequences was generated in 100 nucleotide increments. The strength of the obtained promoters was evaluated using green fluorescent protein as a reporter. The results showed that the minimum functional length of the studied pRPL25 derivatives was 199 bp, the optimal functional length was 497 bp, and when the sequence was shortened to 400 bp, the expression level of the reporter decreased significantly. Based on this, we propose that the 400–500 bp region of the pRPL25 comprises an upstream activating sequence (UAS). The pRPL25 promoter and its derivatives potentially can be used in bioengineering to create metabolic pathways with a precise level of gene expression. Strains constructed on their basis may be more efficient producers of target compounds compared to classical expression systems, such as *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*, metabolic engineering, ribosomal promoters, synthetic promoters, fluorescence