

В. А. Савинов, А. М. Румянцев, Е. В. Самбук, М. В. Падкина

СОЗДАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ РЕГУЛЯЦИИ ГЕНА АЛКОГОЛЬОКСИДАЗЫ 1 ДРОЖЖЕЙ *PICCHIA PASTORIS*

Введение

Дрожжи *Pichia pastoris* являются перспективным объектом молекулярной биотехнологии и широко используются для продукции белков различного происхождения. Для этой цели чаще всего применяют промоторы генов, экспрессия которых регулируется источником углерода. Промотор гена *AOX1* является одним из таких промоторов. Его активность индуцируется добавлением метанола в среду. Экспрессия гена *AOX1* регулируется на уровне транскрипции, мРНК *AOX1* не обнаруживается при выращивании дрожжей на глюкозе и глицерине, но при переносе на среду с метанолом может достигать 5% от суммарной полиА-мРНК [8, 10]. Регуляция экспрессии гена *AOX1* в значительной степени похожа на регуляцию экспрессии *GAL1* гена дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: для максимальной экспрессии гена требуется не только отсутствие репрессирующего источника углерода, глюкозы, но и обязательное наличие индуктора. Именно строгая регуляция транскрипции гена *AOX1*, а также способность промотора *AOX1* обеспечивать высокий уровень синтеза алкогольоксидазы 1 обусловили широкое использование данного промотора для гетерологичной экспрессии.

В настоящее время механизм регуляции экспрессии гена *AOX1* изучен недостаточно. Известен только один ген, регулирующий экспрессию *AOX1* и других генов пути утилизации метанола у дрожжей *P. pastoris*, *MXR1*. Он кодирует белок, который взаимодействует с промоторным участком гена *AOX1*. Этот белок имеет определенную гомологию с белком активатором Adr1p сахаромикетов [15].

Для изучения генетического контроля регуляции гена *AOX1* необходимо создание удобной тест-системы. С этой целью может быть использован любой секреторный белок, активность которого можно легко тестировать на колониях дрожжей. Таким белком у дрожжей *S. cerevisiae* является кислая фосфатаза, представленная семейством изоформ — Pho3p, Pho5p, Pho10p и Pho11p [3]. У *P. pastoris* известна одна кислая фосфатаза, продукт гена *PHO1*.

Для данной работы, которая является первым этапом изучения регуляции экспрессии гена *AOX1* в ответ на различные сигналы окружающей среды, был выбран ген репрессибельной КФ2 — *PHO5 S. cerevisiae*, так как ранее была показана корреляция между активностью КФ на колониях дрожжей и уровнем экспрессии гена *PHO5* [6].

Материалы и методы исследования

Штаммы. В работе использовали следующие штаммы дрожжей: GS115 (*his4*) *P. pastoris* и YM954 *S. cerevisiae* (*MATa ade2-101 ura3-52 his3-200 leu2-3,112 lys2-801 trp1-901 gal4-542*), любезно предоставленный Ж. Мале (J. Mallet, France).

Для амплификации плазмид использовали штамм *Escherichia coli* DH-5 α ($F'/en-dA1\ hsdR17\ (r_k^- m_k^+) \ supE44\ thi^-1\ recA1\ gyrA\ (Nal^r)\ relA1\ \Delta(lacZYA-argF)U169\ deoR\ (\phi80dlac\Delta(lacZ)M15)$).

Плазмиды. Для создания вектора экспрессии pPIC9-AOX1-PHO5 использовали плазмиду pPIC9 («Invitrogen», США), содержащую промоторную и терминаторную области гена алкогольоксидазы 1, последовательность сигнального пептида α -фактора (*MF α 1*) дрожжей *S. cerevisiae*, полилинкерную область и ген *HIS4*.

Для проведения ПЦР использовали праймеры комплементарные 5'- и 3'-последовательностям гена *PHO5* дрожжей *S. cerevisiae*. Последовательность прямого праймера 5'-CGGGATCCCGAGATTACCAA-3' содержит сайт узнавания для эндонуклеазы рестрикции *BamHI* (GGATCC), последовательность обратного праймера 5'-CGGAATTCCAAAАСТАТТGT-3' содержит сайт узнавания для эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* (GAATTC). ПЦР проводили с использованием Taq полимеразы (Fermentas, Литва). В качестве матрицы использовали хромосомную ДНК дрожжей *S. cerevisiae*. Для амплификации фрагмента ДНК проводили 20–50 циклов реакции по следующей программе: плавление цепей ДНК — при 95°C в течение 60 с, отжиг праймеров — в течение 60 с при температуре 40°C, полимеразная реакция — при 72°C в течение 60 с. После окончания ПЦР пробу инкубировали при 72°C в течение 7 мин.

Трансформацию дрожжей и бактерий [1, 4], выделение ДНК из клеток бактерий и дрожжей [12], электрофорез ДНК в агарозном геле [5] проводили в стандартных условиях стандартными методами. Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции, выделение фрагментов ДНК из агарозных гелей и лигирование фрагментов ДНК проводили в условиях, предложенных фирмой-производителем ферментов и реагентов (Fermentas, Литва).

Мутагенез. Для получения мутантов *P. pastoris* с отсутствием активности репрессибельной КФ клетки штамма GS115 высевали в количестве 10³–10⁴ на чашку Петри со средой ПЕП и облучали УФ в течение 30 с (35 мВт/м²), затем культивировали в темноте при 30°C.

Качественное определение активности КФ у дрожжей *P. pastoris* проводили по стандартной методике, разработанной ранее [6].

Условия культивирования штаммов. В работе использовали минимальную среду Md и полные среды YPD, ПЕП стандартного состава [2]. Для выращивания штамма GS115, несущего мутацию в гене *HIS4*, в минимальную среду добавляли 20 мг гистидина на 1 л среды. Для индукции экспрессии гена *PHO5*, находящегося под контролем промотора гена *AOX1*, клетки *P. pastoris* переносили на минимальную среду, содержащую в качестве источника углерода вместо глюкозы метанол в концентрации 1%. Для подавления активности КФ у дрожжей *P. pastoris* использовали среду ПЕПФО с КН₂РO₄ в концентрации 500 мг/л.

Результаты исследования и их обсуждение

Создание удобной тест-системы для изучения регуляции гена *AOX1* дрожжей *P. pastoris* предполагало конструирование плазмиды на основе вектора pPIC9, содержащей репортерный ген *PHO5* под контролем промотора *AOX1* и получение штамма *P. pastoris*, лишенного активности КФ.

Для получения плазмиды pPIC9-AOX1-PHO5 синтезировали последовательность гена *PHO5*, фланкированную сайтами рестрикции *BamHI* и *EcoRI*, методом ПЦР по матрице хромосомной ДНК дрожжей *S. cerevisiae*. Встраивание этого фрагмента ДНК

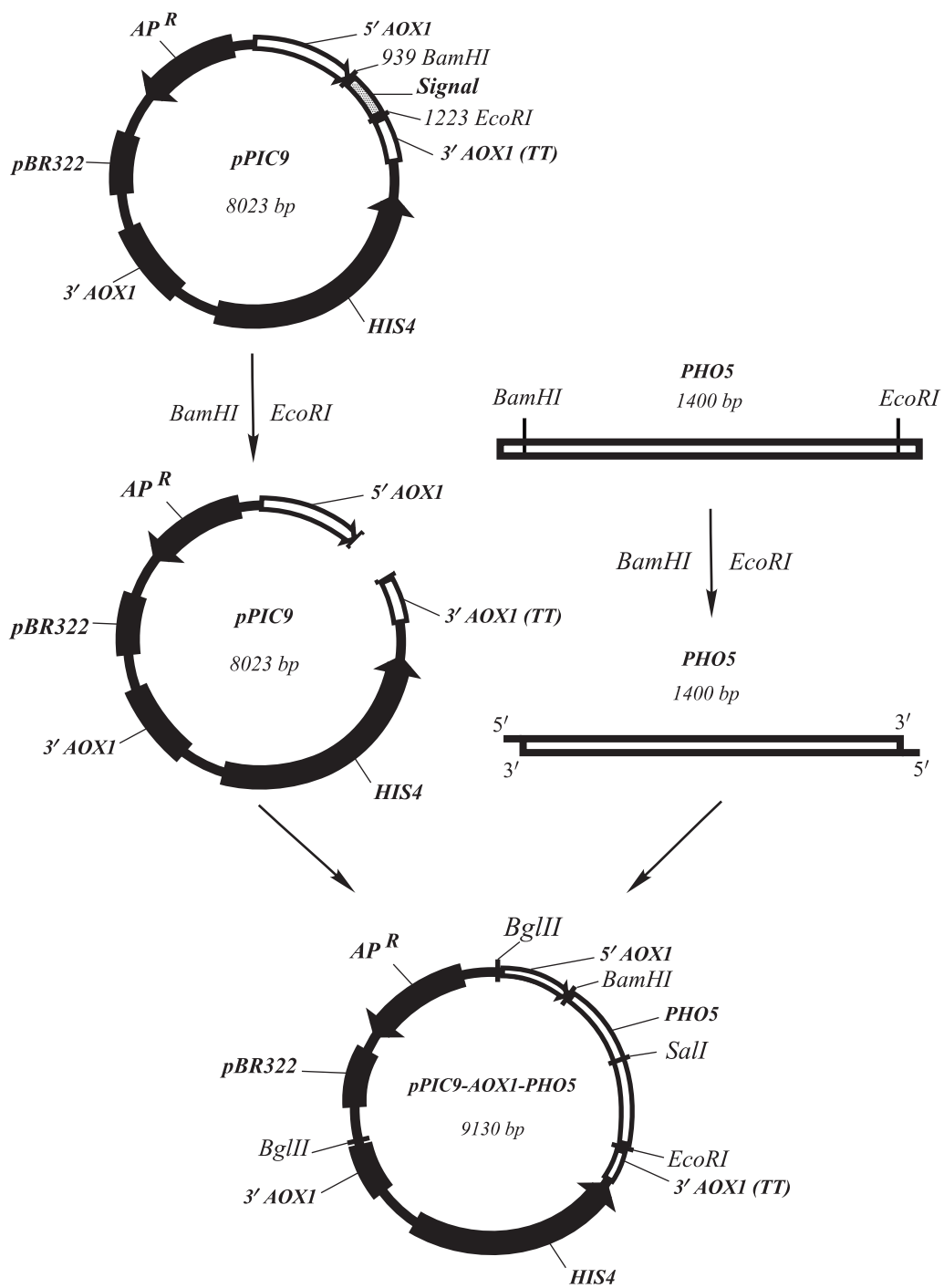


Рис. 1. Схема конструирования плазмиды *pPIC9-AOX1-PHO5* на основе вектора *pPIC9*, содержащей кодирующую последовательность гена *PHO5* под контролем промотора гена *AOX1*.

в вектор pPIC9 осуществляли по сайтам *Bam*HI-*Eco*RI таким образом, чтобы кодирующая часть гена *PHO5* оказалась под контролем промотора *AOX1* и последовательность сигнального пептида *MFa1*, обеспечивающая секрецию гетерологичных белков, была замещена оригинальной сигнальной последовательностью КФ2. Схема конструирования представлена на рис. 1.

Последовательность гена *PHO5*, фланкированную сайтами рестрикции *Bam*HI и *Eco*RI, получали методом ПЦР по матрице хромосомной ДНК дрожжей *S. cerevisiae*. Встраивание этой последовательности в вектор pPIC9 осуществляли по сайтам *Bam*HI-*Eco*RI таким образом, чтобы кодирующая часть гена *PHO5* оказалась под контролем промотора *AOX1*.

Структуру полученной плазмиды pPIC9-*AOX1-PHO5* анализировали, обрабатывая ее эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Sal*I. На электрофореграмме (рис. 2) присутствуют фрагменты ДНК, соответствующие теоретически ожидаемым.

Следующий этап — получение у штамма GS115 мутантов с отсутствием или снижением активности КФ. Появление мутантов индуцировали с помощью УФ. Среди примерно 1500 клонов были выявлены 4 мутанта с различной степенью снижения активности КФ. Один из них — 4-GS115, у которого активность КФ отсутствовала, был выбран в качестве реципиента для трансформации.

Клетки штамма 4-GS115, несущего мутацию *his4*, приводящую к потребности в гистидине, трансформировали линейаризованным *Bgl*III-фрагментом плазмиды pPIC9-*AOX1-PHO5*, что обеспечивает встраивание фрагмента в локус *AOX1* за счет гомологичной рекомбинации с промотором и терминатором гена *AOX1*. В связи с тем, что плаزمида pPIC9-*AOX1-PHO5* содержит маркерный ген дикого типа *HIS4*, трансформанты отбирали на селективной среде по восстановлению способности синтезировать гистидин и далее анализировали активность КФ у трансформантов на разных средах.

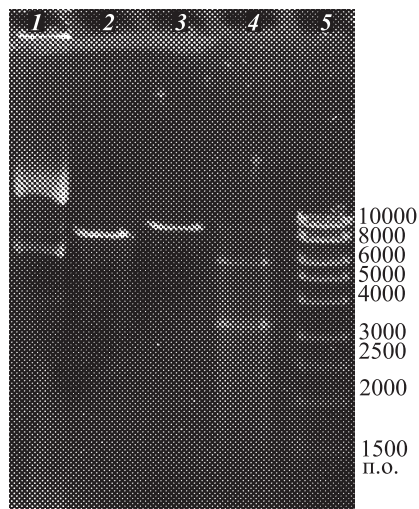


Рис. 2. Рестрикционный анализ плазмид.

Дорожки: 1 — плазмиды pPIC9-*AOX1-PHO5*; 2 — вектор pPIC9 (8023 п.о.), обработанный рестриктазой *Bam*HI; 3 — плазмиды pPIC9-*AOX1-PHO5*, обработанная рестриктазой *Bam*HI (ок. 9100 п.о.); 4 — плазмиды pPIC9-*AOX1-PHO5*, обработанная рестриктазой *Sal*I (3300 и 5800 п.о.); 5 — ДНК-маркер.

Активность КФ у штаммов *P. pastoris* в средах различного состава

Среда	Наличие активности КФ у штаммов <i>P. pastoris</i>		
	<i>GS115 (PHO1)</i>	<i>4-GS115</i>	<i>4-GS115 [AOX1-PHO5]</i>
ПЕП	+	—	—
ПЕПФО	—	—	—
<i>Md</i> + гистидин	—	—	—
<i>Md</i> + метанол	—	—	+

Оказалось, что у этих трансформантов активность КФ появляется только после индукции промотора *AOX1* метанолом (таблица). Этот факт свидетельствует о том, что КФ2 секретируются на поверхность колоний *P. pastoris*, следовательно, сигнальный пептид КФ2 *S. cerevisiae* успешно работает в клетках *P. pastoris*.

Заключение

Метилотрофные дрожжи *P. pastoris* первоначально привлекли внимание в качестве возможного источника относительно недорогого кормового белка. В связи с этим были разработаны среды и технологии длительного культивирования, позволяющие получать значительную биомассу дрожжей, что явилось одной из причин широкого использования дрожжей *P. pastoris* в биотехнологии [7]. Еще одним преимуществом *P. pastoris* является наличие сильного строго регулируемого промотора гена *AOX1*, транскрипция которого репрессируется глюкозой и глицерином и индуцируется только метанолом. Это отличает дрожжи *P. pastoris* от дрожжей *Hansenula polymorpha*, у которых экспрессия гомологичного гена *MOX1* происходит и на среде с глицерином [14]. В то же время *P. pastoris* является неудобным генетическим объектом вследствие гомоталличности, и поэтому генетика объекта развита слабо.

В силу этого создание тест-системы, основанной на использовании репортерного гена *RHO5* сахаромикетов, находящегося под контролем промотора гена *AOX1* *P. pastoris*, позволит изучать как генетический контроль регуляции экспрессии гена *AOX1*, так и влияние факторов среды на уровень экспрессии этого гена.

КФ2 имеет классическую сигнальную последовательность, состоящую из 17 аминокислот [11]. Существуют примеры успешной секреции гетерологичных белков дрожжами *S. cerevisiae* при помощи этой лидерной последовательности, например, гирудина *Hirudo medicinalis*, потенциального ингибитора тромбина [9]. Известно, что мутантная КФ2, лишенная сигнальной последовательности, тем не менее, оказывается на поверхности клеток дрожжей. Причиной этого является наличие дополнительного сигнала секреции, расположенного в N-концевой части зрелого белка [13]. В предварительных экспериментах нами было показано, что в отличие от дрожжей-сахаромикетов уровень секреции КФ у *P. pastoris* очень низок. Причиной может являться менее эффективная работа сигнального пептида *RHO1* или отсутствие дополнительного сигнала секреции.

Использование данной тест-системы представляет не только практический, но и теоретический интерес, так как позволит подобрать оптимальные условия для культивирования метилотрофных дрожжей-продуцентов и оценить возможности использования сигнальной последовательности КФ2 дрожжей сахаромикетов для секреции гетерологичных белков дрожжами *P. pastoris*.

Литература

1. Гловер Д. Клонирование ДНК. М., 1988. С. 538.
2. Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. Н., Федорова И. В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромикетов. Л., 1976. 143 с.
3. Краснопецева Н. Г., Уразманова Н. А., Падкина М. В., Смирнов М. Н. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей. XII. Выделение и характеристика репрессибельных кислых фосфатаз у дрожжей // Вестн. Ленингр. ун-та. 1986. № 3 (3). С. 98–106.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., 1984. 480 с.
5. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М., 2002. 248 с.
6. Самсонова М. Г., Падкина М. В., Краснопецева Н. Г., Кожин С. А. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. 1975. № 9 (11). С. 104–115.
7. Cereghino J. L., Cregg J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* // FEMS Microbiol. Rev. 2000. Vol. 24. P. 45–66.

8. Cregg J. M., Vedvick T. S., Raschke W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris* // Biotechnology. 1993. Vol. 11. P. 905–910.
9. Heim J., Takabayashi K., Meyhack B., Märki W., Pohlig G. C-terminal proteolytic degradation of recombinant desulfato-hirudin and its mutants in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Eur. J. Biochem. 1994. Vol. 226. P. 341–353.
10. Lin-Cereghino G. P., Godfrey L., de la Cruz B. J., Jonson S., Khuongsathiene S., Tolstorukov I., Yan M., Lin-Cereghino J., Veenhuis M., Subramani S., Cregg J. Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris* // Mol. Cell Biol. 2006. Vol. 26. P. 883–897.
11. Monod M., Sive S., Haguenauer-Tsapis R., Rauseo-Koenig I., Hinnen A. In vivo and in vitro studies of PHO5 mutants at the signal peptidase cleavage site // Proc. Alko Symp. on Industr. Yeast Genet. Helsinki, 1987. Vol. 5. P. 149–154.
12. Sambrook J., Russel D. W. Molecular cloning: A laboratory manual, 3d ed. New York, 2001. 2222 p.
13. Silve S., Volland C., Hinnen A., Haguenauer-Tsapis R. In vivo translocation of the cell wall acid phosphatase across the yeast endoplasmic reticulum membrane: are there multiple signals for the targeting process // Biochimie. 1990. Vol. 72. P. 103–114.
14. Sudbery P. E. The expression of recombinant proteins in yeast // Curr. Opin. Biotechnol. 1996. Vol. 7. P. 517–524.
15. Tschopp J. F., Brust P. F., Cregg J. M., Stillman C. A., Gingeras T. R. Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris* // Nucl. Acids Res. 1987. Vol. 15. P. 3859–3876.

Статья поступила в редакцию 31 июля 2009 г.