

© М.А. Цыганков,
М.В. Падкина

ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Дрожжи *Pichia pastoris* используются для синтеза секреторных рекомбинантных белков. Одним из подходов к повышению продукции целевых белков является сверхэкспрессия генов-помощников, белковые продукты которых участвуют в процессе секреции. Задачей нашего исследования была оценка влияния сверхпродукции протеиндисульфидизомеразы (Pdi) дрожжей *P. pastoris* на продукцию рекомбинантных интерферонов. В ходе нашей работы получены штаммы дрожжей *P. pastoris*, экспрессирующие ген *PpPDI* под контролем промотора алкогольоксидазы-1 (*AOX1*). Показано влияние суперпродукции Pdi на жизнеспособность и скорость роста клеток, а также на продукцию гетерологичных белков — интерферона-альфа 16 человека и интерферона-гамма курицы.

✿ **Ключевые слова:** *Pichia pastoris*; экспрессия гетерологичных генов; Pdi; рекомбинантные интерфероны.

ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНА *PDI* НА ПРОДУКЦИЮ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ БЕЛКОВ В ДРОЖЖАХ *PICHTIA PASTORIS*

ВВЕДЕНИЕ

Дрожжи *Pichia pastoris* представляют собой удобную систему экспрессии гетерологичных генов. Особенности *P. pastoris* являются простота культивирования, методики генетических манипуляций, сильные, сравнимые с бактериальными промоторы, например промотор гена *GAP* или строго регулируемый промотор гена *AOX1*, а аэробный тип метаболизма позволяет достигать высокой плотности клеточной суспензии. От прокариотических систем экспрессии *P. pastoris* выгодно отличает наличие ферментов посттрансляционных модификаций эукариотических белков и высокая вероятность их успешного синтеза и правильного фолдинга [28]. *P. pastoris*, в отличие от распространённой эукариотической системы экспрессии гетерологичных генов на основе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, синтезируют гликопротеины с меньшим количеством мономеров без иммуногенных α -1,3-связанных манноз [15]. Количество гетерологичных генов, экспрессированных в *P. pastoris*, постоянно увеличивается, а появление нуклеотидной последовательности генома в открытом доступе [29] открывает дополнительные возможности для изучения данного организма. Одновременно растёт количество коммерческих препаратов на основе рекомбинантных белков, произведённых в *P. pastoris*, на данный момент их уже 16 [33].

Многие рекомбинантные белки продуцируют в дрожжах в виде секреторных продуктов. Прежде чем покинуть клетку после трансляции, белок должен проделать длинный путь, сопровождаемый посттрансляционными модификациями — из эндоплазматического ретикулума (ЭР) через транспортные везикулы в аппарат Гольджи (АГ) и через секреторные везикулы во внеклеточное пространство [18]. Многие секреторные гетерологичные белки в дрожжевых системах экспрессии продуцируются в количестве не более 1 % от теоретически возможного [25]. Очевидно, что изучение подходов к увеличению выхода таких белков в *P. pastoris* является актуальной задачей.

Было показано, что в *P. pastoris* синтез гетерологичных белков является стрессорным фактором и приводит к повышенному уровню транскрипции генов шаперонов, вспомогательных белков фолдинга, внутриклеточного транспорта и других [20]. Исходя из этого, можно предположить, что коэкспрессия генов белков, участвующих в секреции и фолдинге, может влиять на выход гетерологичного белка.

Одним из таких белков является протеиндисульфидизомераза (Pdi). Pdi — мультифункциональный белок массой 57 кДа, который находится в ЭР эукариотических клеток. Он катализирует формирование, восстановление и изомеризацию дисульфидных связей в синтезируемых белках. Помимо каталитической функции, Pdi выступает в качестве шаперона, ингибируя агрегацию неправильно свернутых белков, и является частью по крайней мере двух мультиэнзимных комплексов [40].

У эукариот Pdi была обнаружена в результате исследования окислительного рефолдинга *in vitro* Гилбертом и др. [8]. У хорошо изученных дрожжей *S. cerevisiae* найдены четыре паралога гена *ScPDI* [31], а у человека существует целое семейство Pdi, насчитывающее 20 белков, участвующих во многих физиологических и патологических процессах [14]. Нуклеотидная

Поступила в редакцию 26.12.2016
Принята к публикации 15.06.2017

последовательность гена *PpPDI* в дрожжах *P. pastoris* была расшифрована Уорсеймом и др. [40]. Во всех организмах Pdi выполняет важные, незаменимые функции. Делеция у дрожжей *S. cerevisiae* основного гена *ScPDI1* приводит к нежизнеспособности клеток [19], а у нематоды *Caenorhabditis elegans* один из трех паралогов — ген *CePDI2* необходим для нормального постэмбрионального развития [41]. Сведений о наличии паралогов гена *PpPDI* в дрожжах *P. pastoris* и влиянии делетирования гена *PpPDI* на жизнеспособность дрожжей нет.

Коэкспрессию гена *PDI* для увеличения синтеза гетерологических белков использовали во многих системах экспрессии. Эффект был показан, начиная от бесклеточных систем трансляции при получении антител [37] до систем на основе гибридом [24] и клеток яичников китайского хомячка (СНО-линий) [16]. В клетках *Escherichia coli* коэкспрессия эукариотической Pdi увеличивала выход антигенсвязывающего домена (Fab-домена) [23] и бычьего ингибитора трипсина [32]. В бакуловирусной системе коэкспрессия гена *PDI* повышала уровень растворимых антител *in vivo* [22]. Влияние сверхэкспрессии гена *PDI* на продукцию гетерологических белков изучали и в дрожжах. Например, внесение еще одной копии гена *KIPDI1* в геном дрожжей *Kluyveromyces lactis* повышало продукцию сывороточного альбумина человека — белка, насыщенного дисульфидными связями [26]. В дрожжах *Schizosaccharomyces pombe* сверхэкспрессия каждого из двух паралогов гена *SpPDI* приводила к повышению продукции секретируемого сывороточного трансферрина человека [30]. Многочисленны примеры сверхэкспрессии гена *PDI* в дрожжах *S. cerevisiae* и *P. pastoris* [21].

Целью нашего исследования было оценить влияние сверхэкспрессии гена *PpPDI* на уровень продукции модельных гетерологических белков: интерферона-альфа16 человека (IFN α 16-hum) и интерферона-гамма курицы (IFN γ -chk).

Интерфероны — белки иммунной системы, участвующие в обеспечении противовирусной защиты орга-

низма, обладающие многообразными биологическими функциями. Выбор этих белков в качестве модельных был обусловлен несколькими причинами. Во-первых, препараты на основе интерферонов используются для лечения различных вирусных и онкологических заболеваний человека [9]. IFN γ -chk может быть использован как адъювант вакцин и фактор роста в птицеводстве [27]. Во-вторых, данные интерфероны различаются по своему строению: IFN α 16-hum — негликозилированный белок, в котором присутствуют две дисульфидные связи (Uniprot No P05015, 01.09.2016), IFN γ -chk — гликозилированный белок без дисульфидных связей (Uniprot No P49708, 01.09.2016). Различия в строении белков позволят ответить на вопрос, как влияет сверхэкспрессия гена *PpPDI* на продукцию интерферонов, и оценить зависимость эффекта от присутствия в белках дисульфидных связей и сайтов гликозилирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмиды

Для создания векторов экспрессии использовали плазмиды *pPIC9* и *pPIC α A* (Invitrogen).

Штаммы

На этапе конструирования плазмид и их амплификации применяли штамм DH5a *Escherichia coli* (*F'*/*endA1 hsdR17* (*r_k⁻ m_k⁺*) *supE44 thi-1 recA1 gyrA* (*Nal^r*) *relA1 D* (*lacZYA-argF*) *U169 deoR* (*f80dlacD* (*lacZ*) *M15*). В работе были использованы штаммы дрожжей *P. pastoris*, экспрессирующие структурные гены интерферона-альфа16 человека (GS-humA16) [11] и интерферона-гамма курицы (GS-chkIG) [13], под контролем промотора гена *AOX1* и секретирующие гетерологические белки. Для получения штаммов фенотипа Mut⁺ и Mut^S, не секретирующих гетерологические белки, применяли штамм *P. pastoris* GS115 (*his4*) (Invitrogen) (*his4* — мутация, приводящая к потребности в гистидине). Полученные в работе штаммы приведены в таблице 1.

Таблица 1

Штаммы, полученные в работе Strains, obtained in the work

Название, употребляемое в статье	Генотип	Фенотип
GS-HIS	<i>his4:: HIS4</i>	HIS ⁺ Mut ⁺
GS-aox1	<i>aox1 ΔHIS4</i>	HIS ⁺ Mut ^S
GS-AOX1PDI	<i>PAOX1:: PAOX1-PDI</i>	HIS ⁺ Mut ⁺ Zeo ^R
GS-chkIFNG-AOX1PDI	<i>aox1 ΔPAOX1 -chkIFNG PAOX1:: PAOX1-PpPDI</i>	HIS ⁺ Mut ^S Zeo ^R
GS-humIFNA16-AOX1PDI	<i>aox1 ΔPAOX1 -humIFNA16 PAOX1:: PAOX1-PDI</i>	HIS ⁺ Mut ^S Zeo ^R

Примечание: HIS⁺ — прототрофность по гистидину, Mut⁺ — быстрый и Mut^S — медленный рост дрожжей на среде с метанолом, определяемый функциональностью гена *AOX1*, Zeo^R — способность расти на среде с антибиотиком зеоцином.

Note: HIS⁺ — histidine prototrophy, Mut⁺ — fast and Mut^S — slow yeast grow rate in medium containing methanol as a sole carbon source, which is determined of *AOX1* gene functionality, Zeo^R — ability to grow on a medium containing Zeocin

Трансформация

Трансформацию дрожжей плазмидными векторами производили методом электропорации по описанной ранее методике [42]; трансформацию бактерий — по стандартной методике [5].

Бактериальные штаммы культивировали в среде Луриа — Бертани [5]. Для отбора трансформантов, устойчивых к ампициллину, в среду добавляли антибиотик в концентрации 50 мг/л; для отбора трансформантов, устойчивых к зеоцину, в среду добавляли антибиотик в концентрации 25 мг/л. При работе на чашках Петри во все среды добавляли 20 г агара на 1 л среды. Штаммы *E. coli* выращивали при 37 °С.

Для отбора дрожжевых трансформантов, устойчивых к антибиотику зеоцину, использовали среду, содержащую на 1 литр: дрожжевой экстракт — 10 г, пептон — 20 г, глюкозу — 10 г и агар — 20 г, антибиотик — 150 мг/л.

Для отбора дрожжевых трансформантов, прототрофных по гистидину, использовали минимальную среду, содержащую 25 г/л агара и 6,8 г/л смеси витаминов, микроэлементов и источника азота (Y0626 (Sigma)). Для селекции трансформантов, имеющих фенотип Mut^S, штаммы высевали на минимальную среду (Mm), содержащую 0,5 % метанола в качестве единственного источника углерода, и визуально определяли клетки с замедленным ростом.

Выращивание штаммов-продуцентов гетерологических белков

Дрожжи *P. pastoris* культивировали двумя методами — одностадийным и двухстадийным в трех повторностях. При двухстадийном культивировании на первом этапе дрожжи выращивали 48 часов при 30 °С в 200 мл среды, содержащей на литр: дрожжевой экстракт — 10 г, пептон — 20 г, глицерин — 20 г. Затем клетки отбирали центрифугированием при 5000 об/мин 10 минут и переносили в 50 мл среды, содержащей на литр: дрожжевой экстракт — 10 г, пептон — 20 г, метанол — 20 мл и 0,1М калий фосфатный буфер pH = 6,0 (УРМ-КФБ). Культивировали при 20 °С 48 часов. При одностадийной схеме выращивания клетки дрожжей одного возраста с твердой среды ресуспендировали в стерильной воде и одинаковое количество клеток засеивали в 50 мл среды УРМ-КФБ. Культивирование проводили 48 часов при 25 °С. Несмотря на то что 20–22 °С — оптимальная температура для индукции интерферонов, при которой количество белка в культуральной среде максимально [3], для одностадийного культивирования мы выбрали температуру 25 °С, чтобы обеспечить достаточную биомассу продуцента и количество гетерологического белка. Плотности клеточной суспензии измеряли при длине волны 600 нм.

Для определения влияния сверхпродукции Pdi на удельную скорость роста выращивали инокулом до

стационарной фазы роста на среде с УРМ-КФБ, затем засеивали одинаковое количество клеток в 120 мл среды Mm. Культивирование проводили 3 суток при 30 °С. Каждые 2 часа измеряли плотность клеточной суспензии. В качестве контроля использовали штамм GS-HIS. Эксперименты выполняли в двух повторностях. Культивирование во всех случаях осуществляли при 150 об/мин.

Для определения влияния восстанавливающих агентов на штаммы со сверхэкспрессией гена *PpPDI* дрожжи высевали в разных разведениях на твердые среды, содержащие анализируемые вещества, в условиях индукции дополнительной копии гена *PpPDI* по методике, описанной ранее [17].

Анализ гетерологических белков

Анализ гетерологических белков электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) и гибридизацию с антителами выполняли по методике, использованной нами ранее [10].

Пробы готовили концентрированием культуральной жидкости в 10 раз при помощи центрифужных ультрафильтров Amicon Ultra 0,5 mL (Merck Millipore). В качестве контроля на гель наносили культуральную жидкость штамма GS-aox1, выращенного в тех же условиях. Для оценки количества целевого белка в пробах на гель наносили известное количество трипсиногена А, имеющего молекулярную массу 25 кДа, близкую гетерологическим интерферонам. Электрофореграммы анализировали с помощью компьютерной программы GelQuantNET (BiochemLabSolutions).

Для определения интерферона-альфа16 человека использовали первичные кроличьи IgG-поликлональные антитела PA5-54146 (Thermo scientific). В качестве вторичных применяли конъюгат видоспецифических антител к иммуноглобулинам кролика и пероксидазы хрена А-0545 (Sigma). Все антитела разводили в 1000 раз.

Выделение ДНК

Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора реактивов Plasmid Miniprep (Евроген) по методике, рекомендованной производителем; хромосомную ДНК из клеток дрожжей — по методике Smash&Grab [7].

Полимеразная цепная реакция

Для амплификации гена *PpPDI* использовали праймеры: прямой (f-HindIII-PDI) 5'-ACCC~~AA~~GCTTACGATGCAATCAACTGGGA-3' и обратный (r-PDI-XhoI) 5'-GC~~CT~~CGAGTTAAAGCTCGTCGTGAGCGT-3'. Прямой праймер содержал сайт узнавания для рестриктазы HindIII, а обратный праймер — для рестриктазы XhoI. Для проверки ориентации гена *PpPDI*, клонированного под промотором гена *AOX1*, в качестве прямого использовали праймер (5-AOX1) 5'-CATCCAAAGACGAAAGGTTG-3',

Получение штаммов

Штамм GS-aox1 с фенотипом HIS⁺ Mut^S был получен трансформацией штамма GS115 плазмидой pPIC9, обработанной рестриктазой BglII (рис. 1b). Встраивание полученной линейной конструкции, фланкированной 5- и 3-областью гена AOX1, происходит с замещением хромосомного гена AOX1 экспрессионной кассетой и маркерным геном HIS4.

Штамм GS-HIS с фенотипом HIS⁺ Mut⁺ был также получен из штамма GS115 трансформацией плазмидой pPIC9. Плазмиду обрабатывали рестриктазой StuI (рис. 1c), таким образом вставка в геном происходила в локус HIS4, что обеспечивало появление в геноме функциональной копии гена HIS4 и прототрофность штамма по гистидину. Штамм GS-HIS был использован в качестве контрольного при оценке влияния сверхэкспрессии гена PpPDI на скорость роста дрожжей. Штамм GS-aox1 был использован в качестве контрольного при анализе культуральной жидкости штаммов, продуцирующих гетерологичные белки. Для оценки роста клеток при сверхэкспрессии гена PpPDI применяли штамм GS-AOX1PDI, который получали трансформацией штамма GS-HIS плазмидой pPICZαA-AOX1PDI. Вектор обрабатывали рестриктазой SacI, которая гидролизовала его в 5-области промотора AOX1 (см. рис. 1), вставка экспрессионной кассеты происходила в хромосомный локус AOX1 за счет кроссинговера с сохранением функциональности гена AOX1.

Для оценки влияния сверхэкспрессии гена PpPDI на продукцию гетерологичных белков штаммы, полученные ранее в нашей лаборатории, секретирующие в культуральную среду интерферон-альфа16 человека [11] и интерферон-гамма курицы [13], трансформировали плазмидой pPICZαA-AOX1PDI. Гены, кодирующие гетерологичные интерфероны, находятся под контролем промотора гена AOX1, штаммы были получены замещением хромосомного гена AOX1 экспрессионной кассетой и имеют фенотип HIS⁺ Mut^S. Плазмиду pPICZαA-AOX1PDI также обрабатывали рестриктазой SacI, сайт расщепления которой находится в 5-области промотора AOX1 (см. рис. 1). Интеграция в геном осуществлялась в промоторную область гена AOX1 без нарушения функции промотора и гена AOX1. В итоге на некотором расстоянии работают два промотора гена AOX1, каждый из которых контролирует свой ген и имеет свою область терминции транскрипции.

Наличие в штаммах реципиентов нужных генетических конструкций и ориентацию встройки определяли при помощи ПЦР. Появление в культуральной жидкости целевого белка подтверждали электрофорезом культуральных жидкостей штаммов-продуцентов (рис. 2). ИФА-анализ исходных штаммов, подтверждающий наличие целевого белка, был проведен ранее [11, 13].

Определение копийности гена PpPDI

При трансформации методом электропорации возможна множественная встройка вектора в геном дрож-

жей P. pastoris [44]. Количество копий генов определяли методом относительной количественной оценки при помощи РТ-ПЦР, в частности ΔCt-методом с применением референсного гена [2]. В качестве контрольных были взяты исходный штамм GS115 и штамм GS-HIS. РТ-ПЦР осуществляли в трех параллельных повторностях. Данные РТ-ПЦР представлены на рис. 3. Значения относительного количества гена PpPDI в исходном штамме и штаммах-реципиентах обрабатывали при помощи

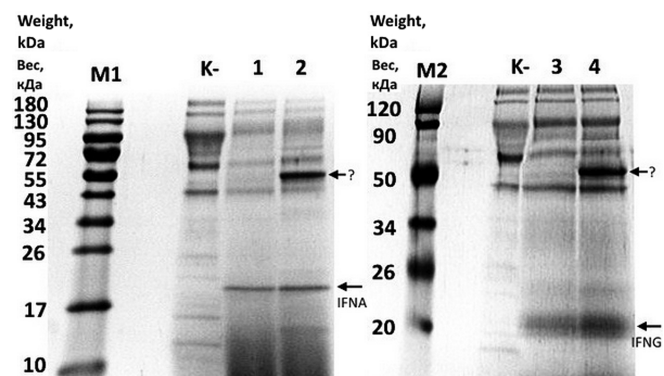


Рис. 2. Электрофореграмма белков культуральной среды штаммов-продуцентов со сверхэкспрессией гена PpPDI: M1, M2 — маркеры молекулярного веса белков; (K-, 1, 2, 3, 4) — белковые компоненты из культуральной среды штаммов: [K-] — GS115, [1] — GS-humIFNA16, [2] — GS-humIFNA16-AOX1PDI, [3] — GS-chkIFNG, [4] — GS-chkIFNG-AOX1PDI

Fig. 2. SDS-PAGE analysis of proteins from culture fluid of productive strains with PpPDI gene overexpression: M1, M2 — protein markers of a certain molecular weight (kDa), (K-, 1, 2, 3, 4) — protein components from culture fluid of these strains: [K-] — GS115, [1] — GS-humIFNA16, [2] — GS-humIFNA16-AOX1PDI, [3] — GS-chkIFNG, [4] — GS-chkIFNG-AOX1PDI

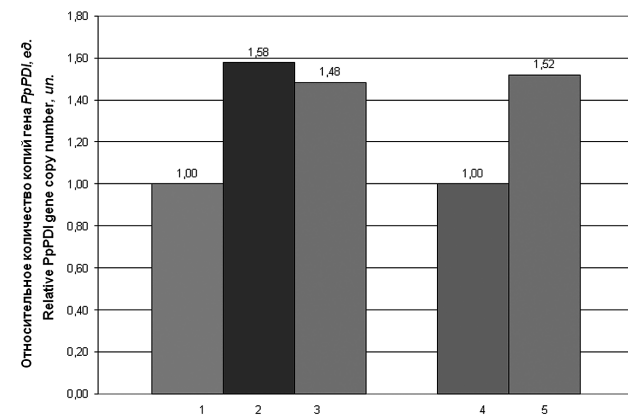


Рис. 3. Определение копийности гена PpPDI в полученных штаммах: штаммы: [1] — GS115, [2] — GS-humIFNA16-AOX1PDI, [3] — GS-chkIFNG-AOX1PDI, [4] — GS-HIS, [5] — GS-AOX1PDI

Fig. 3. PpPDI gene copy number determination in the obtained strains: Strains: [1] — GS115, [2] — GS-humIFNA16-AOX1PDI, [3] — GS-chkIFNG-AOX1PDI, [4] — GS-HIS, [5] — GS-AOX1PDI

критерия Манна — Уитни [6]. Полученные значения находятся в зоне значимости.

Скорость роста штаммов со сверхэкспрессией гена *PpPDI*

Для оценки влияния сверхэкспрессии гена *PpPDI* на скорость роста контрольный штамм GS-HIS и штамм GS-AOX1PDI выращивали на жидких средах Mm в условиях индукции промотора гена *AOX1*. Культивировали в двух параллельных экспериментах. Удельную скорость роста культуры рассчитывали по формуле

$$\mu = (\ln X_1 - \ln X_0) / (T_1 - T_0),$$

где X_1 и X_0 — значения биомассы, соответствующие времени роста T_1 и T_0 [1]. Данные скорости роста изучаемых штаммов, приведенные на рис. 4, показывают замедленный рост клеток со сверхэкспрессией гена *PpPDI*.

Влияние сверхэкспрессии гена *PpPDI* на устойчивость штаммов к восстанавливающим агентам

Исходя из данных, что мутанты *pdi* бактерий чувствительны к восстанавливающему агенту дитиотрейтолу (DTT), в учебном пособии Мюльберга [8] было высказано предположение, что сверхэкспрессия *PpPDI* будет придавать устойчивость к восстановителям — DTT и β -меркаптоэтанолу. Данных о влиянии этих соединений на *P. pastoris* нет. У близких к *P. pastoris* дрожжей *Pichia methanolica* добавление в среду 2–3 мМ β -меркаптоэтанол приводит к 50 % ингибированию роста вне зависимости от источника углерода [4]. Дрожжи *S. cerevisiae* дикого типа растут при 32 мМ концентрации DTT в среде, хотя такая концентрация препятствует росту чувствительных к DTT мутантов *hac1* [35].

Мы показали, что при 8 мМ DTT и 0,01 мМ β -меркаптоэтанол характер роста у исходного штамма и штамма со сверхэкспрессией гена *PpPDI* не от-

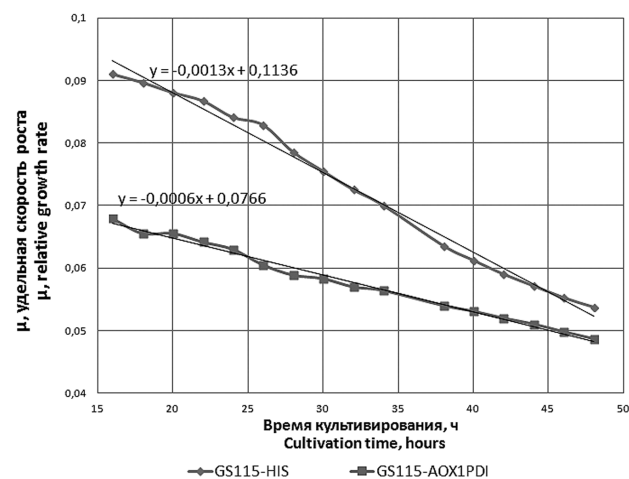


Рис. 4. Влияние сверхэкспрессии гена *PpPDI* на скорость роста клеток

Fig. 4. Effect of *PpPDI* gene overexpression on cell growth rate

личался. Повышение концентрации DTT до 16 мМ и β -меркаптоэтанол до 2 мМ приводило к гибели клеток обоих штаммов.

Сравнение одностадийного и двухстадийного культивирования

В качестве несомненного плюса дрожжей *P. pastoris*, как системы для продукции гетерологичных белков, указывается возможность их роста до высокой плотности клеточной суспензии, что увеличивает возможный выход белка. Мы провели культивирование при разных условиях: двухстадийное, искусственно обеспечивающее высокую плотность клеток в среде, и одностадийное, при росте до естественной плотности клеточной суспензии. При одностадийном культивировании плотность биомассы достигала 10 г/л, при двухстадийном — 73 г/л после 48 часов индукции.

Выход белка в исходных штаммах-продуцентах при одностадийном культивировании составил $3,4 \pm 1,2$ мг/л среды IFN α 16-hum и $2,1 \pm 0,7$ мг/л IFN γ -chk, при двухстадийном — $6,0 \pm 1,3$ мг/л IFN α 16-hum и $6,9 \pm 1,5$ мг/л IFN γ -chk. При двухстадийном культивировании целевого белка в культуральной жидкости оказалось больше на 76 % для IFN α 16-hum и на 228 % для IFN γ -chk.

Средняя продуктивность клеток (количество белка, отнесенное к клеточной массе, мкг/мг) при одностадийной индукции составила $0,37 \pm 0,14$ мкг/мг для IFN α 16-hum и $0,22 \pm 0,08$ мкг/мг для IFN γ -chk. При двухстадийной индукции продуктивность составила $0,07 \pm 0,03$ мкг/мг для IFN α 16-hum и $0,10 \pm 0,02$ мкг/мг для IFN γ -chk. Видимо, несмотря на снижение продуктивности клеток, при двухстадийной индукции выход белка увеличивается, что обусловлено большей биомассой.

Влияние сверхэкспрессии гена *PpPDI* на продукцию гетерологичных белков

Сверхэкспрессия гена *PpPDI* при одностадийной схеме культивирования привела к увеличению продукции обоих целевых белков: на 30 ± 10 % для IFN α 16-hum и на 30 ± 4 % для IFN γ -chk. При двухстадийном культивировании увеличилась продукция только IFN α 16-hum — на 19 ± 3 %, а для IFN γ -chk такого влияния не наблюдалось.

Мы столкнулись с тем, что в культуральной жидкости при росте штаммов-продуцентов как IFN α 16-hum, так и IFN γ -chk при сверхэкспрессии гена *PpPDI* появляется большое количество растворимого белка с молекулярной массой около 50 кДА, не присутствующего в культуральных средах контрольных штаммов (см. рис. 2).

Для того чтобы выяснить, не является ли этот белок производным целевых белков, мы провели ИФА культуральной жидкости штамма GS-humIFN α 16 с антителами к IFN α 16-hum. Данные ИФА на рис. 5 свидетельствуют, что белок массой 50 кДА не имеет отношения к IFN α 16-hum. Определение природы белка, секре-

тируемого в культуральную среду дрожжами при сверхэкспрессии гена *PpPDI*, — дело дальнейших экспериментов. Тонкая полоса в районе 40 кДа на рис. 5 может объясняться наличием в пробе IFN α 16-hum в виде димера, так как интерфероны альфа-типа способны образовывать нековалентно связанные димеры [34].

ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень продукции секреторного белка не только зависит от уровня транскрипции соответствующего гена и трансляции, но и определяется эффективностью работы всего секреторного аппарата клетки дрожжей. Сворачивание (фолдинг) секреторных белков в ЭР является ключевым этапом в ходе синтеза как собственных, так и гетерологичных белков в клетке и происходит при участии молекулярных шаперонов, в частности Pdi-фермента, катализирующего образование дисульфидных связей. Эксперименты, проведенные нами, позволяют оценить влияние сверхпродукции Pdi в дрожжевой клетке на продукцию гетерологичных интерферонов — IFN α 16-hum и IFN γ -chk.

Данные РТ-ПЦР говорят о встройке не более одной дополнительной копии гена. Даже одна дополнительная копия гена под контролем сильного промотора оказывает эффект на скорость роста штамма и продукцию гетерологичных белков. Полученное дробное количество копий гена *PpPDI* можно объяснить анеуплоидией исследуемого штамма по четвертой хромосоме, где и находится ген *PpPDI*, а так как референсный ген находится в третьей хромосоме, то он в данном случае не теряет своих референсных свойств.

Полученные штаммы со сверхэкспрессией гена *PpPDI* жизнеспособны и могут быть использованы в дальнейших исследованиях. Наблюдаемое замедление скорости роста в логарифмической фазе согласуется с данными, полученными для дрожжей *S. cerevisiae*, в которых сверхэкспрессия гена *PDI* приводит к такому же эффекту [35]. Как уже было сказано, Pdi — мультифункциональный белок и может действовать в клетке и как фермент, и как шаперон. Есть данные, что Pdi в условиях теплового стресса может брать на себя часть функций шаперона ЭР — калнексина [43]. Полученные данные позволяют предположить, что повышенная продукция Pdi оказывает влияние на различные внутриклеточные процессы. Замедленный рост можно объяснить тем, что сверхэкспрессия гена *PpPDI* под сильными промотором гена *AOX1*, работающим в дополнение к нативной копии *AOX1*, приводит к перегрузке аппарата трансляции.

Учитывая функцию Pdi в окислительном фолдинге белка, можно было ожидать, что устойчивость штаммов, содержащих лишнюю копию гена *PpPDI*, к восстанавливающим агентам повысится. Это бы открыло возможность для создания нового вектора для трансформации дрожжей, содержащего дополнительную копию гена *PpPDI*

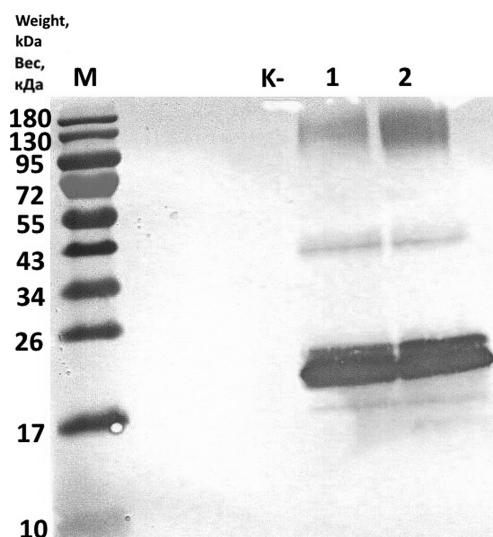


Рис. 5. Иммуноблотинг белков культуральных сред: [M] — маркер молекулярной массы белков. Культуральные жидкости штаммов: [K-] — GS-*aox1* при одностадийном культивировании, [1] — GS-humIFN α 16 при одностадийном и [2] — при двухстадийном культивировании

Fig. 5. Western-blot analysis of proteins from culture fluids: [M] — protein marker of a certain molecular weight (kDa). Culture fluid probes of strains: [K-] — GS-*aox1* in one step cultivation, [1] — GS-humIFN α 16 in one step cultivation and [2] — in two step cultivation

в качестве маркера устойчивости. Однако повышенная устойчивость к DTT или β -меркаптоэтанолу штаммов со сверхэкспрессией гена *PpPDI* обнаружена не была. Более того, в сравнении с другими видами дрожжей исходные штаммы *P. pastoris* проявляли меньшую устойчивость к исследуемым веществам. Исходя из данных, что Pdi действует координированно с белком Ero1p, который является донором окисляющих эквивалентов [8], можно предположить, что только совместное повышение экспрессии генов *PpPDI* и *PpERO1* способно повысить устойчивость клетки к восстанавливающим агентам.

Выход белка при двухстадийном культивировании оказался выше по сравнению с одностадийным, но наблюдалось падение продуктивности клеток. Возможно, на выход целевого белка негативно влияла высокая плотность клеточной суспензии в начале стадии индукции. Нахождение оптимальных условий культивирования штаммов-продуцентов может быть важным фактором повышения выхода рекомбинантных белков.

Несмотря на замедление роста штаммов со сверхэкспрессией гена *PpPDI*, продукция целевого белка в случае одностадийного культивирования возрастала для обоих целевых белков. При двухстадийном культивировании положительный эффект наблюдался только для IFN α 16-hum. Можно сделать вывод, что эффект сверхэкспрессии генов-помощников может зависеть от метода культивирования и конкретного гетерологичного белка.

В нашей работе наибольшее положительное влияние сверхэкспрессии гена *PpPDI* наблюдали для IFN α 16-hum, содержащего дисульфидные связи, что предсказуемо, исходя из основной функции Pdi. Тем не менее данные о повышении продукции разных модельных белков, отличающихся по строению, наличию дисульфидных связей, углеводного компонента, можно рассматривать как еще одно доказательство того, что помимо непосредственной функции фермента, контролирующего образование дисульфидных связей, Pdi является также шапероном и может неспецифично повышать продукцию секретируемых гетерологичных белков. Использование штаммов со сверхэкспрессией гена *PpPDI* в сочетании с оптимизацией культивирования можно рассматривать как способ повышения эффективности производства интерферонов IFN α 16-hum и IFN γ -chk. Исходя из механизмов окислительного фолдинга, включающего слаженную работу Pdi с Ero1p [8], было бы логично ожидать положительного синергического эффекта при одновременной сверхэкспрессии генов *PpPDI* и *PpERO1* на выход рекомбинантных белков.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А.М. Румянцеву и А.Е. Зобниной (СПбГУ, лаборатория биохимической генетики) за методическую помощь.

Работа поддержана грантами: СПбГУ 1.38.229.2014, НШ 9513.2016.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаретова Л.А., Кириенко О.А. Оценка параметров роста микроорганизмов в условиях периодического и непрерывного культивирования. — Хабаровск: Изд-во Тихоокеан. гос. ун-та, 2010. — 16 с. [Garetova LA, Kirienko OA. Ocenka parametrov rosta mikroorganizmov v uslovijah periodicheskogo i nepreryvnogo kul'tivirovaniya. Khabarovsk: Izd-vo Tihookean. gos. un-ta; 2010. 16 p. (In Russ.)]
2. Ермилова Е.В., Залуцкая Ж.М., Лапина Т.В., Шишова М.Ф. Количественный анализ экспрессии генов / Под ред. Е.В. Ермиловой. — 2-е изд. — СПб.: ТЕССА, 2011. — 122 с. [Ermilova EV, Zaluckaja ZhM, Lapina TV, Shishova MF. Kolichestvennyj analiz jekspressii genov. Ed by E.V. Ermilovoj. 2nd ed. Saint Petersburg: TESSA; 2011. 122 p. (In Russ.)]
3. Карабельский А.В., Зиновьева Ю.Г., Смирнов М.Н., Падкина М.В. Создание штаммов дрожжей *Pichia pastoris* — продуцентов химерных белков «альбумин-интерлейкин-2» и «альбумин-интерферон- α 16» // Вестник Санкт-Петербургского университета. — 2009. — Вып. 2. — Сер. 3. — С. 53–63. [Karabel'skij AV, Zinov'eva JuG, Smirnov MN, Padkina MV. Sozdanie shtammov drozhzhej *Pichia pastoris* producentov himernyh belkov "al'bumin-interlejkin-2" i "al'bumin-interferon- α 16". *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta*. 2009;2(3):53-63. (In Russ.)]
4. Леонович О.А., Серкова Н.Н., Рабинович Я.М. Токсичность меркаптоэтанола для различных линий дрожжей *Pichia methanolica*, растущих на различных источниках углерода // Прикладная биохимия и микробиология. — 2001. — Т. 37. — № 1. — С. 96–99. [Leonovich SA, Serkova NN, Rabinovich IM. Toxicity of mercaptoethanol to mutant strains of the yeast *Pichia methanolica* growing on different carbon sources. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 2001;37(1):96-9. (In Russ.)]
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Ред. А.А. Баев, К.Г. Скрыбин. — М.: Мир, 1984. — 480 с. [Maniatis T, Fritch EE, Sambrook J. Molecular Cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1982:545.]
6. Манн – Уитни, автоматический расчет. Доступно по: <http://www.psychol-ok.ru/statistics/mann-whitney/>. Ссылка активна на 27.09.2016.
7. Методика выделения ДНК, «Smash and Grab». Доступно по: <http://web.mit.edu/biology/guarente/protocols/quickprep.html>. Ссылка активна на 01.09.16.
8. Мюльберг А.А. Фолдинг белка. — СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2004. — 176 с. [Mjul'berg AA. Folding belka. Saint Petersburg: Izd-vo S.-Peterb. un-ta; 2004. 176 p. (In Russ.)]
9. Наровлянский А.Н., Ершов Ф.И., Гинцбург А.Л. Интерфероны: перспективные направления исследований // Иммунология. — 2013. — № 3. — С. 168–172. [Narovljanskij AN, Ershov FI, Gincburg AL. Interferony: perspektivnye napravlenija issledovanij. *Immunologija*. 2013;3:168-172. (In Russ.)]
10. Падкина М.В., Парфёнова Л.В., Градобоева А.Е., Самбук Е.В. Синтез гетерологичных интерферонов в клетках дрожжей *Pichia pastoris* // Прикладная биохимия и микробиология. — 2010. — Т. 46. — № 4. — С. 448–455. [Padkina MV, Parfenova LV, Gradoboeva AE, Sambuk EV. Heterologous interferons synthesis in yeast *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2010;46(4):409-414. (In Russ.)]
11. Патент РФ на изобретение № 2380405/2007. [Patent RUS No 2380405/2007. (In Russ.)]
12. Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени. — 3-е изд. — М.: БИНОМ, 2011. — 223 с. [Rebrikov DV. PCR v real'nom vremeni. Moscow: BINOM; 2011. 223 p. (In Russ.)]
13. Цыганков М.А., Зобнина А.Е., Падкина М.В. Синтез модифицированных, устойчивых к протеолитической деградации интерферонов-гамма в дрожжах *Pichia pastoris* // Прикладная биохимия и микробиология. — 2014. — Т. 50. — № 4. — С. 429–436. [Tsygankov MA, Zobnina AE, Padkina MV. Synthesis of recombinant gamma interferons resistant to proteolysis

- in the yeast *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2014;50(4):387-393. (In Russ.]. doi: 10.7868/S055510991404028X.
14. Шишкин С.С., Еремина Л.С., Ковалев Л.И., Ковалева М.А. AGR2, ERP57/GRP58 и некоторые другие протеин-дисульфидизомеразы человека // Успехи биологической химии. — 2013. — Т. 53. — С. 81–120. [Shishkin SS, Eremina LS, Kovalev LI, Kovaleva MA. AGR2, ERP57/GRP58 i nekotorye drugie protein-disulfidizomerazy cheloveka. *Uspehi biologicheskoy himii*. 2013;53:81-120 (In Russ.)]
 15. Balamurugan V, Reddy GR, Suryanarayana VV. S. *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins — Vaccines. *Indian Journal of Biotechnology*. 2007;6:175-186.
 16. Borth N, Mattanovich D, Kunert R, Katinger H. Effect of increased expression of protein disulfide isomerase and heavy chain binding protein on antibody secretion in a recombinant CHO cell line. *Biotechnol Prog*. 2005 Jan-Feb;21(1):106-11. doi: 10.1021/bp0498241.
 17. Conn PM. The unfolded protein response and cellular stress. *Methods Enzymol*. 2011;489: xvii. doi: 10.1016/B978-0-12-385116-1.00020-0.
 18. Delic M, Valli M, Graf AB, et al. The secretory pathway: exploring yeast diversity. *FEMS Microbiol Rev*. 2013Nov;37(6):872-914. doi: 10.1111/1574-6976.12020.
 19. Farquhar R, Honey N, Murant SJ, et al. Protein disulfide isomerase is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 1991;108(1):81-9. doi: 10.1016/0378-1119(91)90490-3.
 20. Gasser B, Maurer M, Rautio J, et al. Monitoring of transcriptional regulation in *Pichia pastoris* under protein production conditions. *BMC Genomics*. 2007;19;8:179. doi: 10.1186/1471-2164-8-179.
 21. Gasser B, Saloheimo M, Rinas U, et al. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microbial Cell Factories*. 2008;7:11. doi: 10.1186/1475-2859-7-11.
 22. Hsu TA, Watson S, Eiden JJ, Betenbaugh MJ. Rescue of immunoglobulins from insolubility is facilitated by PDI in the baculovirus expression system. *Protein Expr Purif*. 1996 May;7(3):281-8. doi: 10.1006/prep.1996.0040.
 23. Humphreys DP, Weir N, Lawson A, et al. Co-expression of human protein disulphide isomerase (PDI) can increase the yield of an antibody Fab' fragment expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*. 1996Feb12;380(1-2):194-7. doi: 10.1016/0014-5793(96)00028-2.
 24. Kitchin K, Flickinger MC. Alteration of hybridoma viability and antibody secretion in transfectomas with inducible overexpression of protein disulfide isomerase. *Biotechnol Prog*. 1995Sep-Oct;11(5):565-74. doi: 10.1021/bp00035a011.
 25. Liu Z, Liu L, Osterlund T, et al. Improved production of a heterologous amylase in *Saccharomyces cerevisiae* by inverse metabolic engineering. *Appl Environ Microbiol*. 2014Sep;80(17):5542-50. doi: 10.1128/AEM.00712-14.
 26. Lodi T, Neglia B, Donnini C. Secretion of human serum albumin by *Kluyveromyces lactis* overexpressing *KIPDI1* and *KIERO1*. *Appl Environ Microbiol*. 2005Aug;71(8):4359-4363. doi: 10.1128/AEM.71.8.4359-4363.2005.
 27. Lowenthal JW, Lambrecht B, van den Berg TP, et al. Avian cytokines — the natural approach to therapeutics. *Dev Comp Immunol*. 2000Mar-Apr;24(2-3):355-65. doi: 10.1016/s0145-305x(99)00083-x.
 28. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*. 2005Mar;22(4):249-70. doi: 10.1002/yea.1208.
 29. Mattanovich D, Callewaert N, Rouze P, et al. Open access to sequence: browsing the *Pichia pastoris* genome. *Microb Cell Fact*. 2009Oct16;8:53. doi: 10.1186/1475-2859-8-53.
 30. Mukaiyama H, Tohda H, Takegawa K. Overexpression of protein disulfide isomerases enhances secretion of recombinant human transferrin in *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010Apr;86(4):1135-43. doi: 10.1007/s00253-009-2393-x.
 31. Norgaard P, Westphal V, Tachibana C, et al. Functional differences in yeast protein disulfide isomerases. *J Cell Biol*. 2001Feb5;152(3):553-562. doi: 10.1083/jcb.152.3.553.
 32. Ostermeier M, De Sutter K, Georgiou G. Eukaryotic protein disulfide isomerase complements *Escherichia coli* dsbA mutants and increases the yield of a heterologous secreted protein with disulfide bonds. *J Biol Chem*. 1996May3;271(18):10616-22.
 33. *Pichia* Technology from RCT. Available from: <http://www.pichia.com/science-center/commercialized-products/>. Accessed December 1, 2016.
 34. Radhakrishnan R, Walter LJ, Hruza A, et al. Zinc mediated dimer of human interferon-alpha 2b revealed by X-ray crystallography. *Structure*. 1996Dec15;4(12):1453-63. doi: 10.1016/s0969-2126(96)00152-9.
 35. The *Saccharomyces* Genome Database. Available from: <http://www.yeastgenome.org/locus/S000000548/overview>. Accessed September 1, 2016.
 36. Rand JD, Grant CM. The thioredoxin system protects ribosomes against stress-induced aggregation. *Mol Biol Cell*. 2006Jan;17(1):387-401. doi: 10.1091/mbc.e05-06-0520.
 37. Ryabova LA, Desplancq D, Spirin AS, Pluckthun A. Functional antibody production using cell-free translation: effects of protein disulfide isomerase and chaperones. *Nat Biotechnol*. 1997Jan;15(1):79-84. doi: 10.1038/nbt0197-79.
 38. Uniprot No P05015. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P05015>. Accessed October 30, 2016.
 39. Uniprot No P49708. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P49708>. Accessed October 30, 2016.

40. Warsame A, Vad R, Kristensen T, Oyen TB. Characterization of a gene encoding a *Pichia pastoris* protein disulfide isomerase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001Mar;281(5):1176-82. doi: 10.1006/bbrc.2001.4479.
41. Winter AD, Cormack G, Page AP. Protein disulfide isomerase activity is essential for viability and extracellular matrix formation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* 2007Aug15;308(2):449-61. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.05.041.
42. Wu S, Letchworth GJ. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BioTechniques.* 2004 Jan;36(1):152-4.
43. Zhang H, He J, Ji Y, et al. The effect of calnexin deletion on the expression level of PDI in *Saccharomyces cerevisiae* under heat stress conditions. *Cell Mol Biol Lett.* 2008;13(1):38-48. doi: 10.2478/s11658-007-0033-y.
44. Zhu T, Guo M, Sun C, et al. A systematical investigation on the genetic stability of multi-copy *Pichia pastoris* strains. *Biotechnol Lett.* 2009May;31(5):679-84. doi: 10.1007/s10529-009-9917-4.

INFLUENCE OF *PDI* GENE OVEREXPRESSION ON HETEROLOGICAL PROTEINS PRODUCTION IN YEAST *PICHTIA PASTORIS*

M.A. Tsygankov, M.V. Padkina

For citation: Ecological genetics. 2017;15(2):21-30

✿ **SUMMARY: Background.** The yeast *Pichia pastoris* is used for synthesis of recombinant secretory proteins. Overexpression of assistant genes, coding proteins involved in secretion, is one of approaches to improve the production of target protein. *PpPDI* gene encodes *P. pastoris* yeast protein disulfide isomerase (Pdi). **The aim** of our study was to evaluate the effect of Pdi overproduction on recombinant interferons (human interferon- α 16 and chicken interferon- γ) production. **Materials and Methods.** *PpPDI* gene was cloned under the control of the *AOX1* gene promoter in plasmid pPICZ α A. Primers for AJ302014.1 nucleotide sequence of NCBI data base were used for *PpPDI* gene cloning. The chromosomal DNA of the GS115 strain was used as a template. To generate strains with *PpPDI* gene overexpression we used a previously obtained strains producing human interferon- α 16 and chicken interferon- γ . Yeast transformation was performed by electroporation. Cultivation was performed using single and two-stage strategies in standard media containing methanol as the sole carbon source to induce the *AOX1* gene promoter. **Results.** We obtained interferon-producing strains with *PpPDI* gene overexpression. Over-expression of the *PpPDI* gene in yeast *P. pastoris* increases the production of interferon- α 16, a protein containing disulfide bonds, regardless of the mode of cultivation. Effect of *PpPDI* gene over-expression on the production of interferon- γ — the protein without disulfide bonds, depends on cultivation mode. **Conclusion.** *PpPDI* gene overexpression can be used to enhance the production of interferons and other proteins that contain disulfide bonds. Effect of *PpPDI* gene overexpression on recombinant proteins without disulfide bonds may depend on cultivation procedure.

✿ **KEYWORDS:** *Pichia pastoris*; heterologous gene expression; Pdi; recombinant interferons.

✿ Информация об авторах

Михаил Александрович Цыганков — инженер-исследователь, лаборатория биохимической генетики, кафедра генетики и биотехнологии. ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. E-mail: mial.tsygankov@yandex.ru.

Марина Владимировна Падкина — д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория биохимической генетики, кафедра генетики и биотехнологии. ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. E-mail: mpadkina@mail.ru.

✿ Information about the authors

Mikhail A. Tsygankov — engineer-researcher, Laboratory of biochemical genetics, Department of Genetics and Biotechnology. St Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: mial.tsygankov@yandex.ru.

Marina V. Padkina — PhD, leading researcher, Department of Genetics and Biotechnology. St Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: mpadkina@mail.ru.