

© Д. М. Музаев, А. М. Румянцев,
Е. В. Самбук, М. В. Падкина

Санкт-Петербургский
государственный университет

Дрожжи *Pichia pastoris* используются для синтеза множества рекомбинантных белков. Широкое применение этого вида дрожжей в биотехнологии обусловлено относительной простотой культивирования, дешевизной используемых сред и возможностью осуществления посттрансляционных модификаций белков. Основными способами повышения выхода рекомбинантного белка являются увеличение числа копий генов, кодирующих исследуемый белок, а также коэкспрессия вспомогательных факторов, участвующих в фолдинге, созревании и секреции белка. Необходимым условием для применения этих подходов является расширение коллекции ауксотрофных мутантов. В ходе данной работы была создана коллекция плазмид и штаммов, позволяющая осуществлять множественную интеграцию чужеродных генов в геном *P. pastoris*.

✿ **Ключевые слова:** *Pichia pastoris*; рекомбинантные белки; экспрессия генов; геновая инженерия.

НОВЫЕ ШТАММЫ ДРОЖЖЕЙ *PICHELIA PASTORIS* — ПРОДУЦЕНТЫ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ БЕЛКОВ

ВВЕДЕНИЕ

Дрожжи *P. pastoris* широко используются для наработки самых разнообразных белков, начиная от столбнячного токсина и эпидермального фактора роста мыши и заканчивая мембранными белками, включающими ABC транспортеры, аквапорины и тетраспанины (Darby et al., 2012; Cregg et al., 2000). Исходя из опыта применения *P. pastoris* в биотехнологии известно, что существует приблизительно 50–75%-я вероятность удачного синтеза любого чужеродного белка в *P. pastoris*. При этом использование дрожжей *P. pastoris* открывает широкие возможности для оптимизации условий культивирования, что позволяет достигать необычайно высоких уровней продукции целевого белка (Cregg & Cereghino, 2000).

Активное использование дрожжей *P. pastoris* в современных биотехнологических производствах напрямую связано с особенностями их метаболизма. К преимуществам мейлотрофных дрожжей можно отнести простоту культивирования, относительную дешевизну среды и возможность применения различных методик генетических манипуляций. Ещё одной особенностью этого вида дрожжей является способность осуществлять посттрансляционные модификации, характерные для белков высших эукариот.

В биотехнологии при работе с дрожжами самой сложной задачей является достижение оптимального баланса между уровнем синтеза целевого белка и жизнеспособностью штаммов-продуцентов. Применение *P. pastoris* открывает широчайшие возможности для оптимизации условий культивирования. Одним из способов увеличения уровня синтеза целевого белка является получение штаммов *P. pastoris*, несущих множественные копии чужеродного гена. Другим подходом, чаще всего используемым при работе с секреторными белками, является коэкспрессия генов, кодирующих различные вспомогательные факторы. Для успешного применения этих подходов необходимо создание коллекции плазмид, позволяющих осуществлять множественную интеграцию чужеродных генов в геном *P. pastoris*, а также получение множественно-маркированных штаммов-продуцентов.

Одной из стратегий усиления экспрессии специфического гена в *P. pastoris* является увеличение числа экспрессионных кассет в штамме-хозяине (Scorer et al., 1994). Для этого могут быть использованы векторы с множественными тандемными копиями гена, расположенными последовательно в экспрессионной кассете (Brierley, 1998). Кроме того, существует возможность конструирования кассеты экспрессии на основе вектора, несущего в качестве селективного маркера один из генов устойчивости к действию антибиотиков. К числу этих маркерных генов относятся гены устойчивости к зеоцину (*ZeoR*) (Higgins et al., 1998), бластицидину (*BlaR*), генетицину (*G418R*) (Scorer et al., 1994; Sunga & Cregg, 2004).

Другим подходом является конструирование нескольких векторов экспрессии с различными селективными маркерами и последующая их интеграция в геном штаммов *P. pastoris*. При этом чаще всего применяются плазмидные векторы, которые содержат ген гистидинолдегидрогеназы *HIS4* в качестве селективного маркера, и соответствующие им ауксотрофные штаммы.

Поступила в редакцию 19.11.2014
Принята к публикации 25.02.2015

При работе с дрожжами *S. cerevisiae* широко используются селективные системы на основе генов *URA3* и *LYS5*. Использование этих генов даёт возможность проведения позитивной и негативной селекции (Littlewood, 1972).

Ген *URA3* кодирует оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазу (ЕС 4.1.1.23), фермент, необходимый для биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов. Позитивная селекция основана на ауксотрофности мутантов *ura3*, которые не способны расти на среде без урацила. Мутанты *ura3* могут быть отобраны на среде, содержащей 5-фтороротовую кислоту (ФОК). Поскольку под действием декарбоксилазы ФОК превращается в токсическое соединение 5-фтороурацил, клетки дикого типа *URA3* погибают на среде с ней (Sherman, 1997).

Другой ген, широко используемый в селективных системах — *LYS5* кодирует фермент фосфопантетилтрансферазу (ЕС 2.7.8.7). Этот фермент в пути биосинтеза лизина преобразует неактивный апо-фермент альфа-аминодипатредуктазы в активную форму. Мутации в гене *LYS5* ведут к ауксотрофности клеток по лизину. Мутантов *lys5* можно отобрать на среде с-аминоадипиновой кислотой.

В ходе данной работы были созданы экспрессионные системы дрожжей *P. pastoris*, основанные на ортологах генов *URA3* и *LYS5* дрожжей *S. cerevisiae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Среды и условия культивирования штаммов

При работе с дрожжами использовали стандартные культуральные среды: богатую среду YPD, ПЕП, синтетическую минеральную среду Md (Guthrie & Fink, 1991). Штаммы дрожжей *P. pastoris* выращивали при 30 °С. Для культивирования бактериальных штаммов использовали среду LB. Штаммы *E. coli* выращивали при 37 °С.

Плазмиды

ПЦР-продукты клонировали в промежуточный вектор pTZ57R/T (Thermoscientific). В качестве основы для создания векторов для экспрессии чужеродных генов в *P. pastoris* использовали плазмиду *pPIC9* (Invitrogen®).

Методы

Выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью алгоритмов Blast и Clustal.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя реактивов (Thermoscientific). Последовательности праймеров для проведения ПЦР представлены в таблице 1.

Выделение ДНК из клеток бактерий и дрожжей, трансформацию дрожжей и бактерий и электрофорез ДНК в агарозном геле проводили в стандартных условиях (Sambrook & Russel, 2001). Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции, выделение фрагментов ДНК из агарозных гелей и лигирование фрагментов ДНК проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя использованных реактивов и наборов (Thermoscientific).

Секвенирование проводили с использованием реактивов Big Dye v3.1 и Big Dye v1.1 (Applied Biosystems) на генетическом анализаторе 3130 (Applied Biosystems). Полученные хроматограммы анализировали с помощью программ BioEdit и UniGene.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клонирование генов *PpURA3* и *PpLYS5*

На первом этапе работы был проведен анализ баз данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) и <http://www.pichiagenome.org/>, содержащих геномные последовательности дрожжей *P. pastoris*. Были выявлены последовательности гомологичные генам *URA3* и *LYS5* дрожжей *S. cerevisiae*: *PpURA3* (*P. pastoris* GS-115, хромосома 3, локус PAS_chr3_0381, gene ID: 8199513), и *PpLYS5* (*P. pastoris* GS-115, хромосома 4, локус PAS_chr4_0793, gene ID: 8200571). К выбранным последовательностям были подобраны праймеры, позволяющие амплифицировать указанные гены и их регуляторные области (табл. 1). 5'-концы праймеров содержат последовательности сайтов рестрикции (*PpURA3*: *SphI* и *SpeI*; *PpLYS5*: *SphI* и *XbaI*), необходимые для проведения последующего клонирования ПЦР-продуктов.

В качестве матрицы для амплификации генов *PpURA3* и *PpLYS5* была использована хромосомная ДНК штамма X-33 дрожжей *P. pastoris* (дикий тип,

Таблица 1

Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе

Название	Последовательность
Прямой праймер <i>URA3</i>	5'-ACTAGTATTCTGACATCCTTTAGAGCAC-3'
Обратный праймер <i>URA3</i>	5'-ACTAGTCTGGTCAAAGAAAGCAC-3'
Прямой праймер <i>LYS5</i>	5'-GCATGCAGTCACCATTTCTTCAC-3'
Обратный праймер <i>LYS5</i>	5'-TCTAGATGGATGAGGTATTGGAG-3'

Lifetechnologies). Амплифицированные фрагменты генов *URA3* и *LYS5* были клонированы в промежуточном векторе *pTZ57R/T*, при этом использовали технологию ТА-клонирования, реализованную в наборе InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo scientific). Фрагменты встраивали в ген *lacZ*, что обеспечивало возможность использования метода бело-голубой селекции на среде с субстратом X-gal. В результате были получены генетические конструкции на основе вектора *pTZ57R/T*, которые содержали последовательности генов *PpURA3* и *PpLYS5*, ограниченные сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции. Структура плазмид была подтверждена данными рестрикционного анализа, ПЦР и секвенирования.

Создание ауксотрофных штаммов *P. pastoris*

В нуклеотидную последовательность генов *PpURA3* и *PpLYS5* в составе векторов *pTZ57R/T-URA3* и *pTZ57R/T-LYS5* были внесены делеции. Вектор *pTZ57R/T-URA3* был обработан рестриктазой *BsrGI* (размер удаленного участка составил 1253 п. о.), а вектор *pTZ57R/T-LYS5* рестриктазами *ClaI* и *BsrGI* (размер удаленного участка составил 418 п. о.). Фрагменты обрабатывали *Pfu*-полимеразой и проводили их самолигиро-

вание. Плазмиды анализировали с помощью рестрикционного анализа, ПЦР и секвенирования.

Полученные плазмиды *pTZ57R/T-ΔPpura3* и *pTZ57R/T-ΔPplys5* (рис. 1) были использованы для создания штаммов *P. pastoris* ауксотрофных по урацилу и лизину соответственно. С помощью ПЦР по матрице данных плазмид были амплифицированы фрагменты генов *Ppura3* и *Pplys5*, содержащие делеции. Данными фрагментами был трансформирован штамм X-33 дрожжей *P. pastoris*. Для эффективного отбора трансформантов была использована негативная селекция. Штаммы, несущие делецию в гене *PpURA3*, отбирали по способности к росту на среде с 5-фтороротовой кислотой (ФОК) с добавлением урацила. Были отобраны клоны, характеризующиеся ауксотрофностью по урацилу (рис. 2).

Штаммы, несущие делецию в гене *PpLYS5*, отбирали на среде с альфа-аминоадипиновой кислотой с добавлением лизина. Были отобраны клоны, характеризующиеся ауксотрофностью по лизину (рис. 2).

Различий в скорости роста полученных штаммов *P. pastoris* 1-X-33 *ura3Δ* и 2-X-33 *lys5Δ* по сравнению с исходным штаммом X-33 не наблюдали.

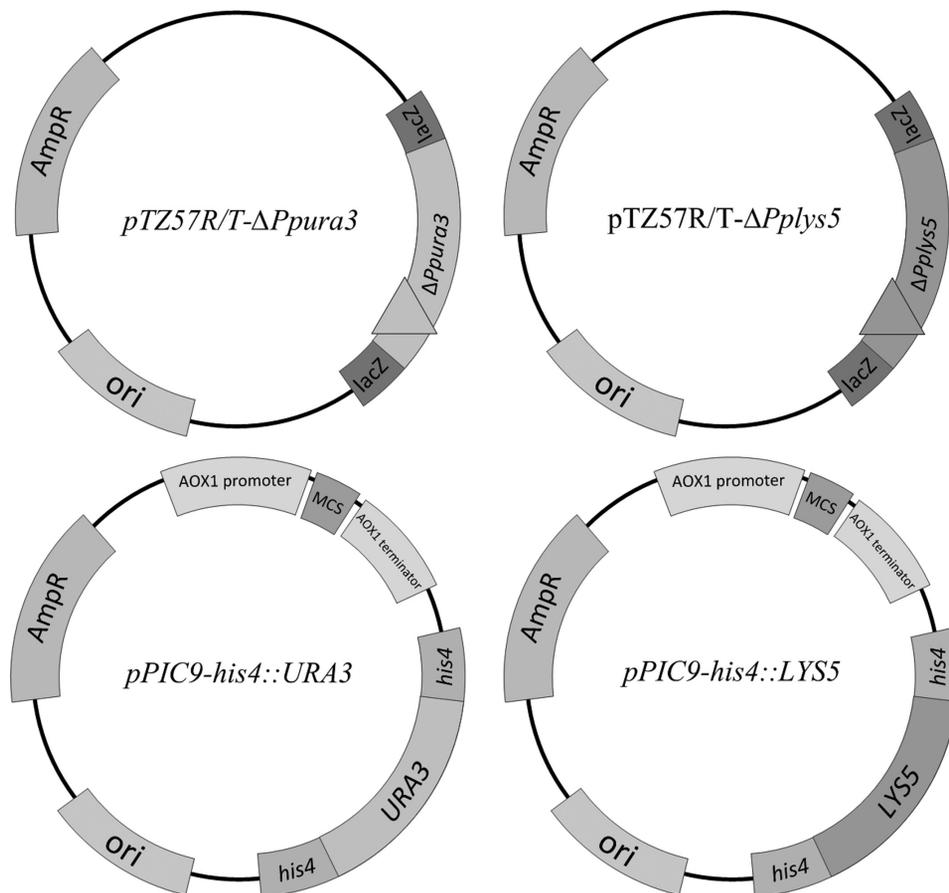


Рис. 1. Плазмиды, полученные в ходе работы: *pTZ57R/T-ΔPpura3*, *pTZ57R/T-ΔPplys5*, *pPIC9-his4::URA3* и *pPIC9-his4::LYS5*. *AmpR* — ген β -лактамазы, отвечающий за устойчивость к ампициллину; *ori* — участок начала репликации; MCS — сайт множественного клонирования

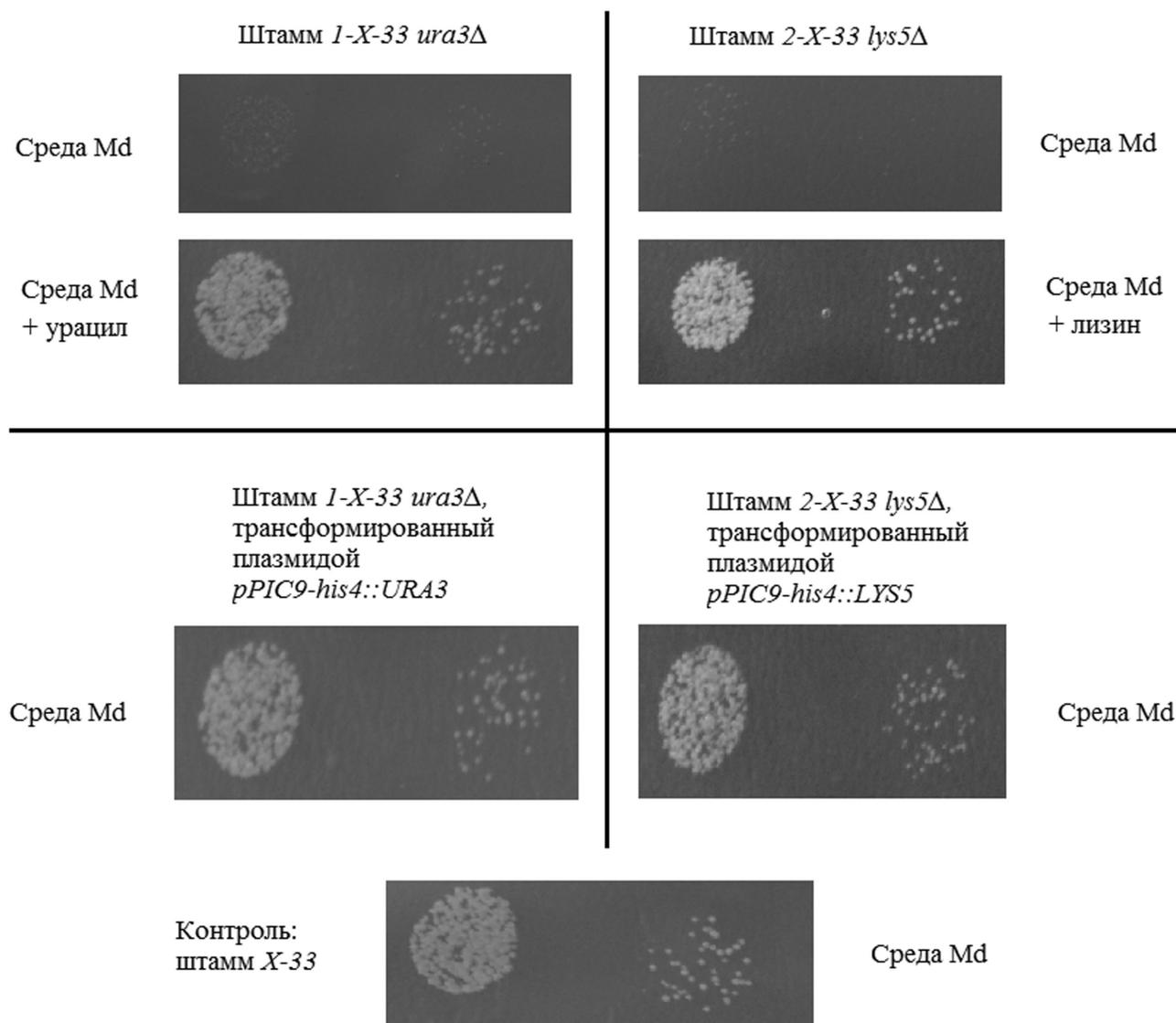


Рис. 2. Рост полученных штаммов на средах различного состава

Создание векторов экспрессии на основе маркеров *PpURA3* и *PpLYS5*

Помимо упомянутых выше ауксотрофных штаммов для экспрессии чужеродных генов в *P. pastoris* необходимо наличие векторов, позволяющих проводить селекцию трансформантов. В данной работе в качестве основы был выбран вектор *pPIC9* (Invitrogen®), несущий ген *HIS4* дрожжей *P. pastoris*, который обеспечивает селекцию трансформантов по восстановлению прототрофности по гистидину. В ходе работы фрагменты, содержащие последовательность гена *HIS4*, в составе *pPIC9* замещали на последовательности генов *PpURA3* и *PpLYS5*. Для этого при замене *HIS4* на *PpURA3* вектор *pPIC9* был обработан рестриктазами *XbaI* и *SphI*. При этом был удален участок, содержащий ген *HIS4*, размером 2751 п. о. Встраиваемый фрагмент, содержащий ген *PpURA3*, был

получен при обработке вектора *pTZ57R/T-URA3* рестриктазами *SpeI* и *SphI*, а фрагмент *PpLYS5* — при обработке вектора *pTZ57R/T-LYS5* рестриктазами *SphI* и *XbaI*. Далее проводили лигирование фрагментов *PpURA3* или *PpLYS5* с вектором *pPIC9*. Полученные плазмиды анализировали с помощью рестрикционного анализа, ПЦР и секвенирования. Таким образом, на основе вектора *pPIC9* были созданы генетические конструкции, в которых исходная последовательность гена *HIS4* заменена на последовательности генов *PpURA3* и *PpLYS5* (рис. 1).

Плазмидой *pPIC9-his4::URA3* трансформировали созданный ранее штамм *P. pastoris* 1-Х-33 *ura3Δ*, а плазмидой *pPIC9-his4::LYS5* — штамм 2-Х-33 *lys5Δ*. У полученных трансформантов восстанавливалась прототрофность по урацилу и лизину соответственно (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Использование дрожжей *P. pastoris* в биотехнологии открывает широкие возможности для оптимизации условий синтеза рекомбинантных белков. Для повышения выхода рекомбинантного белка применяется увеличение числа копий генов, кодирующих исследуемый белок, а также коэкспрессия различных вспомогательных факторов. Одним из существенных ограничений применения данных методов является недостаточная доступность штаммов *P. pastoris* и соответствующих плазмид.

Созданный в ходе данной работы штамм 1-X-33 *ura3Δ* аналогичен описанным ранее штаммам *P. pastoris*, несущим ауксотрофность по урацилу (Cereghino et al., 2000). Получение данного штамма является необходимым этапом для создания штаммов *P. pastoris*, характеризующихся другими ауксотрофностями. Для этого в ходе дальнейшей работы будут использованы методы дисрупции генов, основанные на применении гена *PpURA3* в качестве селективного маркера (Scherer & Davis, 1979).

В качестве альтернативного подхода возможно применение созданного впервые штамма 2-X-33 *lys5Δ*, поскольку использование гена *PpLYS5* так же позволяет проводить позитивную и негативную селекцию.

Созданные в ходе работы плазмиды и ауксотрофные штаммы позволяют осуществлять интеграцию чужеродных генов в геном *P. pastoris*. Дальнейшее их применение позволит ещё больше расширить коллекцию селективных маркеров и ауксотрофных мутантов дрожжей *P. pastoris*. Полученные результаты имеют важное практическое значение, поскольку дают возможность оптимизировать синтез рекомбинантных белков за счет строгого контроля количества копий чужеродного гена или за счёт коэкспрессии генов, кодирующих различные вспомогательные факторы. Так же использование подобной коллекции открывает широкие перспективы для применения генетического анализа у дрожжей *P. pastoris*.

Работа поддержана грантами ведущей научной школе НШ-5115.2014.4, а также грантом СПбГУ 1.38.229.2014.

ЛИТЕРАТУРА

- Brierley R.A. (1998) Secretion of recombinant human insulin-like growth factor (IGF-1). *Methods in Molecular Biology: Pichia Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ. V. 103: P. 149–177.
- Cregg J.M., Cereghino J.L., Shi J.Y., Higgins D.R. (2000) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*. V. 16: P. 23–52.
- Darby R.A., Cartwright S.P., Dilworth M.V., Bill R.M. (2012) Yeast Species Shall I Choose? *Saccharomyces cerevisiae* Versus *Pichia pastoris* (Review). *Recombinant Protein Production in Yeast: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*. V. 866: P. 11–23.
- Guthrie C., Fink G.R. (1991) *Guide to yeast genetics and molecular biology*. Academic Press. V. 3: P. 194–933.
- Higgins D.R., Busser K., Comiskey J., Whittier P.S., Purcell T.J., Hoeffler J.P. (1998) Small vectors for expression based on dominant drug resistance with direct multicopy selection. *Methods in Molecular Biology: Pichia Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ. V. 103: P. 41–53.
- Littlewood B.S. (1972) A method for obtaining antibiotic-sensitive mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. V. 71 (2): P. 305–308.
- Scorer C.A., Clare J.J., McCombie W.R., Romanos M.A., Sreekrishna K. (1994) Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *BioTechnology*. V. 12: P. 181–184.
- Sambrook J., Russel D.W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3d edition. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sherman F. (1997) *Yeast genetics. The encyclopedia of molecular biology and molecular medicine*. V. 6: P. 302–325.
- Sunga A.J., Cregg J.M. (2004) The *Pichia pastoris* formaldehyde dehydrogenase gene (FLD1) as a marker for selection of multicopy expression strains of *P. pastoris*. *Gene*. V. 330: P. 39–47.
- GenBank. *Komagataella pastoris* GS115. Reference genome sequence. Cited 19.12.2014. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/338?genome_assembly_id=28698.
- Pichia pastoris* Genome Browser. Genome Database of the *Pichia pastoris*. Cited 19.12.2014. URL: <http://www.pichiagenome.org/>.
- Lin Cereghino G.P., Lin Cereghino J., Sunga A.J., Johnson M.A., Lima M., Gleeson M.A.G., Cregg J.M. (2000) New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*. *Gene*. V. 263: P. 159–169.
- Scherer S., Davis R.W. (1979) Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* V. 76: P. 4951–4955.

CREATION OF NEW *PICHELIA PASTORIS* STRAINS FOR RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION

Muzaev D.M., Rumyantsev A.M., Sambuk E.V., Padkina M.V.

✉ **SUMMARY:** *Pichia pastoris* yeasts are widely used as a production platform for heterologous proteins. Wide biotechnological use of these yeasts is

determined by simplicity of cultivation, cheap media and ability to provide posttranslational modifications. Basic approaches for enhancement of the recombinant protein outcome constitute increasing number of gene copies, which encode target protein, as well as co-expression of supporting factors for protein folding, processing and secretion. Development of relevant

plasmids and auxotrophic strains is essential for solving these tasks. In this study, we report plasmids and strains collection, which will allow to conduct integration of multiple foreign genes in *P. pastoris* genome

✿ **KEY WORDS:** *Pichia pastoris*; recombinant proteins; genes expression; gene engineering.

✿ Информация об авторах

Музаев Дмитрий Михайлович — магистр, кафедра генетики и биотехнологии. Санкт-Петербургский государственный университет. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: dmmuzaev@yandex.ru.

Muzaev Dmitry Mikhaylovich — master, Dept. Genetics and Biotechnology. Saint Petersburg State University. 199034, Saint Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9. Russia. E-mail: dmmuzaev@yandex.ru.

Румянцев Андрей Михайлович — магистр, кафедра генетики и биотехнологии. Санкт-Петербургский государственный университет. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: rumyantsev-am@mail.ru.

Rumyantsev Andrey Mikhaylovich — master, Dept. Genetics and Biotechnology. Saint Petersburg State University. 199034, Saint Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9. Russia. E-mail: rumyantsev-am@mail.ru.

Самбук Елена Викторовна — д. б. н., профессор, кафедра генетики и биотехнологии. Санкт-Петербургский государственный университет. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: esambuk@mail.ru.

Sambuk Elena Viktorovna — Dr. Sci. Biol, professor, Dept. Genetics and Biotechnology. Saint Petersburg State University. 199034, Saint Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9. Russia. E-mail: esambuk@mail.ru.

Падкина Марина Владимировна — д. б. н., профессор, кафедра генетики и биотехнологии. Санкт-Петербургский государственный университет. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: mpadkina@mail.ru.

Padkina Marina Vladimirovna — Dr. Sci. Biol, professor, Dept. Genetics and Biotechnology. Saint Petersburg State University. 199034, Saint Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9. Russia. E-mail: mpadkina@mail.ru.