

КЛОНИРОВАНИЕ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ *PPKAR2* И *PPPD11* ДРОЖЖЕЙ *PICHIA PASTORIS*, ОЦЕНКА ИХ АКТИВНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ

© М.А. Цыганков, М.В. Падкина

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

Для цитирования: Цыганков М.А., Падкина М.В. Клонирование промоторов генов *PpKAR2* и *PpPD11* дрожжей *Pichia pastoris*, оценка их активности и эффективности использования для экспрессии гетерологичных генов // Экологическая генетика. — 2018. — Т. 16. — № 2. — С. 50–59. doi: 10.17816/ecogen16250-59.

Поступила в редакцию: 26.04.2018

Принята к печати: 25.06.2018

✿ Дрожжи *Pichia pastoris* успешно используют в биотехнологии, с их помощью синтезированы различные соединения. Промоторы — ключевой фактор продуктивности системы экспрессии, так как они определяют уровень транскрипции гетерологичного гена. Целью нашей работы было изучение промоторных областей генов *PpKAR2* и *PpPD11* и оценка возможности их применения для эффективной экспрессии гетерологичных генов. Активность промоторов оценивали с помощью системы на основе структурного гена кислой фосфатазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* — *PHO5*. Чтобы выяснить влияние сверхпродукции собственного и гетерологичного белка на активность изучаемых промоторов, мы использовали штаммы-продуценты белка протеиндисульфидизомеразы *P. pastoris* и дельтазеина кукурузы. Для оценки эффективности применения изучаемых промоторов для экспрессии гетерологичных генов мы проэкспрессировали под их контролем ген, кодирующий интерферон-альфа16 человека. С помощью биоинформатических методов определены потенциальные сайты связывания транскрипционных факторов. В результате работы мы показали, что изучаемые промоторы оказались слабее промотора гена *AOX1*, но повышают свою активность в ответ на продукцию гетерологичных белков и могут быть использованы для экспрессии гетерологичных генов в дрожжах *P. pastoris*.

✿ **Ключевые слова:** *Pichia pastoris*; экспрессия гетерологичных генов; промотор *KAR2*; промотор *PD11*.

CLONING OF *PPKAR2* AND *PPPD11* GENES PROMOTERS FROM YEAST *PICHIA PASTORIS*, AN EVALUATION OF THEIR ACTIVITY AND EFFICACY FOR THE HETEROLOGOUS GENES EXPRESSION

© М.А. Tsygankov, M.V. Padkina

Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

For citation: Tsygankov MA, Padkina MV. Cloning of *PpKAR2* and *PpPD11* genes promoters from yeast *Pichia pastoris*, an evaluation of their activity and efficacy for the heterologous genes expression. *Ecological genetics*. 2018;16(2):50-59. doi: 10.17816/ecogen16250-59.

Received: 26.04.2018

Accepted: 25.06.2018

✿ **Background.** Yeast *Pichia pastoris* is successfully used in biotechnology, with their help synthesized various compounds. Promoters are a key factor in the productivity of an expression system, since they determine the expression level of a heterologous gene. **The aim** of our work was to study the promoter regions of the *PpKAR2* and *PpPD11* genes and to evaluate their use for effective expression of heterologous genes. **Materials and Methods.** To evaluate the activity of promoters, we used a reporter system based on the structural gene of acid phosphatase of yeast *Saccharomyces cerevisiae* — *PHO5*. To determine the effect of overproduction of native and heterologous protein on the activity of the promoters under study, we used the producer strains of *P. pastoris* protein disulfide isomerase and maize delta-zein. To evaluate the effectiveness of the use of the promoters under study for the expression of heterologous genes, we have expressed under their control a gene encoding human interferon-alpha16. **Results.** The promoters of the yeast genes — *PpKAR2* and *PpPD11* were cloned. Their activity was compared with the promoter of the *PpAOX1* gene in the native strains, as well as in strains with overproduction of native and heterologous proteins. Under the control of these promoters, the gene encoding human interferon-alpha 16 is expressed. **Conclusion.** The promoters studied were weaker than the promoter of the *AOX1* gene, but increase their activity in response to the production of heterologous proteins and can be used to express heterologous genes.

✿ **Keywords:** *Pichia pastoris*; heterologous gene expression; *KAR2* promoter; *PD11* promoter.

ВВЕДЕНИЕ

Дрожжи *Pichia pastoris* успешно используют для экспрессии гетерологичных генов, с их помощью синтезированы различные гетерологичные белки, уровень продукции которых выше, чем во многих других микробных системах [1]. Список белков, успешно синтезированных в *P. pastoris*, постоянно расширяется, несколько биофармацевтических продуктов были одобрены Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США для использования в медицине, и более 70 продуктов находятся на поздней стадии разработки [2]. В процессе создания системы экспрессии гетерологичного гена всегда встает вопрос о выборе промотора. Промоторы — ключевой фактор продуктивности системы экспрессии, так как он определяет уровень экспрессии гетерологичного гена [3]. Одними из наиболее часто применяемых промоторов *P. pastoris* являются индуцибельный промотор гена алкогольоксидазы-1 — *PAOX1* и конститутивный промотор гена глицероальдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*PGAP*) [4]. Достоинства промотора *PAOX1* заключаются в его высокой активности и возможности регулировать экспрессию гетерологичного гена. В связи с опасностью использования на производстве такого ядовитого и опасного индуктора, как метанол, проводится работа по получению вариантов промотора, которые можно индуцировать без применения метанола при сохранении высокой активности [5]. Так, был получен штамм с делециями структурных генов $\Delta mig1 \Delta mig2 \Delta nrg1$, отвечающих за катаболическую репрессию *PAOX1*, и сверхпродукцией активатора транскрипции *Mit1p*, у которого активность *PAOX1* на среде с глицерином составляла 77 % его активности на среде с метанолом [6]. Аналогичный подход показал эффективность и при работе с конститутивным промотором *PGAP* [7]. Одновременно с модификацией известных промоторов идет поиск новых промоторов, которые можно использовать для экспрессии гетерологичных генов [8–11]. На сегодняшний день

увеличение ассортимента промоторов, пригодных для биотехнологии, а также изучение их регуляции является актуальной задачей. Примерами промоторов, которые могут быть применены в биотехнологии, служат промоторы генов *PpKAR2* и *PpPDI1*.

PpKAR2 — ген, который кодирует шаперон *Kar2p*/BiP эндоплазматического ретикулума (ЭР). Основная функция *Kar2p* — стабилизация несвернутых белков и поддержание их в растворимом состоянии, а также направление неправильно собранных полипептидных цепей в цитоплазму для мечения убиквитином с последующей деградацией в протеасоме [12]. Кроме того, *Kar2p* участвует в ответе клетки на несвернутый белок (UPR — unfolded protein response). В дрожжах *S. cerevisiae*, как и в клетках млекопитающих, синтез этого шаперона при тепловом шоке кратковременно повышается, хотя и при нормальных условиях он синтезируется на высоком базальном уровне [13]. В нормальных условиях белок *Kar2p*/BiP ассоциирован с N-концевым доменом трансмембранного белка *Ire1p*, C-концевой домен которого локализован в цитоплазме и обладает киназной и нуклеазной активностью [14]. При накоплении несвернутых белков в ЭР комплекс *Kar2p* — *Ire1p* диссоциирует, это вызывает полимеризацию *Ire1p* в мембране ЭР, трансфосфорилирование цитоплазматического C-концевого домена *Ire1p*, что приводит к появлению эндорибонуклеазной активности *Ire1p*. Активированный *Ire1p* катализирует удаление интрона мРНК *HAC1* и инициирует синтез активатора транскрипции генов, промоторы которых содержат UPR-последовательность, в первую очередь генов шаперонов и фолдаз (рис. 1). Стоит отметить, что в дрожжах *P. pastoris* несплайсированный вариант мРНК *HAC1* не был обнаружен [14].

PpPDI1 — структурный ген протеиндисульфидизомеразы (*Pdi1p*). Этот белок есть у микроорганизмов, растений и животных. Ген конститутивно экспрессируется в большинстве тканей и органов, *Pdi1p* является

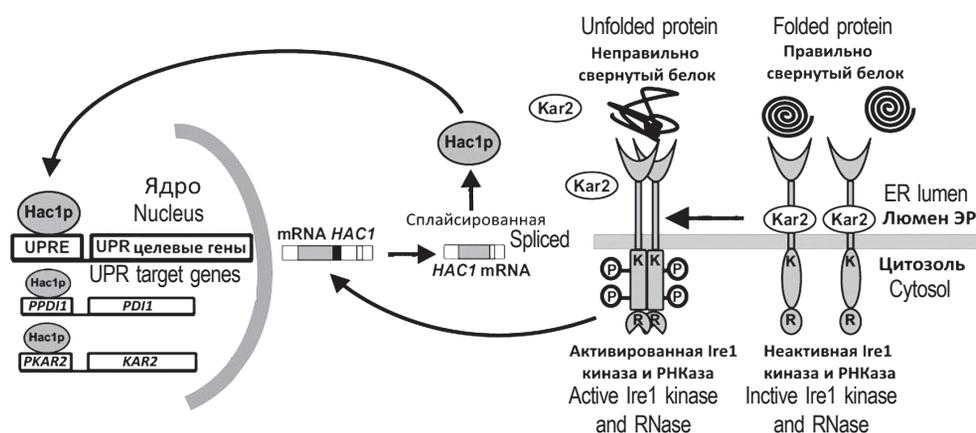


Рис. 1. Схема ответа клетки дрожжей *S. cerevisiae* на накопление несвернутого белка в эндоплазматическом ретикулуме [14, с изм.]

Fig. 1. Scheme of response of *S. cerevisiae* yeast cell to accumulation of non-folded protein in ER [14, with changes]

одним из основных белков в ЭР [15]. В его функции входит формирование, восстановление и изомеризация дисульфидных связей в синтезируемых белках. Кроме того, он выполняет функции шаперона [16].

При синтезе гетерологичных белков повышается уровень экспрессии как гена *PpKAR2*, так и гена *PpPDI1* [12]. С другой стороны, известно, что сверхэкспрессия этих генов может повышать продукцию гетерологичных белков [17, 18], в частности интерферонов [19].

Целью нашей работы было изучение промоторных областей генов *PpKAR2* и *PpPDI1* и оценка возможности их использования для эффективной экспрессии гетерологичных генов. Активность промоторов мы оценивали при помощи репортерной системы на основе структурного гена кислой фосфатазы (КФ) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* — *PHO5* [20]. Чтобы выяснить влияние сверхпродукции собственного и гетерологичного белка на активность изучаемых промоторов, мы применяли штаммы-продуценты белков *PpPdi1p* и дельтазеина кукурузы. Для оценки эффективности изучаемых промоторов для экспрессии гетерологичных генов мы проэкспрессировали под их контролем ген, кодирующий интерферон-альфа16 человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмиды

Генетические конструкции создавали при помощи плазмид *pPIC9*, *pPICZαA* (Invitrogen) и плазмид, полученных ранее, — *pPIC9-PHO5* [20] и *pPIC9-IFNα16* [21], в которых структурные гены кислой фосфатазы *PHO5* и интерферона-альфа16 человека *HuIFNα16* находятся под контролем промотора *PAOX1*.

Штаммы

На этапе конструирования плазмид и их амплификации использовали штамм ДН5а *Escherichia coli* (*F'*/*endA1 hsdR17* ($r_k^- m_k^+$) *supE44 thi-1 recA1 gyrA* (*Nal*) *relA1 D(lacZYA-argF) U169 deoR [f80dlacD(lacZ)M15]*). Для получения дрожжевых штаммов нужного генотипа применяли штамм *P. pastoris* GS115 (*his4*) (Invitrogen) (*his4* — мутация, приводящая к потребности в гистидине). Также использовали ранее полученные штаммы *P. pastoris* — GS-AOX1PHO5 [20], GS-AOX1PDI1 [19], в которых гены *PHO5* и *PpPDI1* находятся под контролем промотора *PAOX1*.

Полимеразная цепная реакция

Для амплификации промоторов генов *PpPDI1* и *PpKAR2* использовали следующие праймеры:

- прямой AatII-PpPDI1 —
5'-TCAATAGACGTC AACACGAACACTGTAAATAG-3',
- обратный PpPDI1-BamHI —
5'-AGTAGTGGATCCTCTTATAGATAGGAAGAAG-3',
- прямой AatII-PpKAR2 —
5'-TTTAGAGACGTC AAGACTTGAGATGGACATG-3',
- обратный PpKAR2-BamHI —
5'-CTATGTGGATCCTCTTGAGTGTGGAATTG-3'.

В обоих случаях прямой праймер содержал сайт узнавания для рестриктазы AatII, а обратный праймер — для рестриктазы BamHI. Подчеркнуты сайты узнавания рестриктаз. В качестве матрицы применяли хромосомную ДНК штамма GS115. Для амплификации гена дельтазеина кукурузы использовали прямой праймер F-BstI-dZein — 5'-CGGGATTCCGAAACGATGGCAGCCAAGATG-3', обратный праймер R-dZein-NotI — 5'-ATAATAGCGGCCGGAATGCAGCACCAC-3'.

Прямой праймер содержал сайт узнавания для рестриктазы BstBI, а обратный праймер — для рестриктазы NotI. В качестве матрицы была выбрана κДНК, полученная из суммарной РНК кукурузы при помощи набора MMLV RT kit (Евроген). Суммарную РНК выделяли из листьев кукурузы сорта «Лакомка сахарная» реагентом для выделения суммарной РНК — ExtractRNA (Евроген). Применяли методики, рекомендованные производителем.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в приборе T100 ThermalCycler (BIO-RAD) по следующей программе: плавление цепей ДНК при 95 °С в течение 45 с, отжиг праймеров в течение 90 с при температуре 55 °С (для амплификации промотора *PKAR2*), 45 °С (для амплификации промотора *PPDI1* и гена дельтазеина), полимеразная реакция при 72 °С в течение 120 с. После окончания ПЦР пробу инкубировали при 72 °С в течение 5 мин. Всего 35 циклов.

Выделение ДНК

Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора реактивов PlasmidMiniprep (Евроген) по методике, рекомендованной производителем. Выделение хромосомной ДНК из клеток дрожжей проводили по методике Smash & Grab [22].

Трансформация

Трансформацию дрожжей плазмидными векторами выполняли методом электропорации по описанной ранее методике [23]. Трансформацию бактерий проводили по стандартной методике [24].

Бактериальные штаммы культивировали в среде Луриа-Бертани [24]. 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. 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 (среда YPD) и антибиотик 150 мг/л. Для отбора дрожжевых трансформантов, прототрофных по гистидину, использовали минимальную среду и 6,8 г/л смеси витаминов, микроэлементов и источника азота (Sigma). При работе на чашках Петри во все среды добавляли 20 г агара на 1 л среды.

Культивирование дрожжевых штаммов

При экспрессии гена *HuIFNα16* под контролем изучаемых промоторов применяли жидкую среду YPD. Культивировали в течение 48 часов при 20 °С.

Для определения активности КФ клетки дрожжей с твердой среды ресуспендировали в стерильной воде и засеивали в 50 мл среды, содержащей дрожжевой экстракт — 10 г, пептон — 20 г, метанол — 20 мл и 0,1 М калий-фосфатный буфер (рН 6,0) на литр. Культивирование продолжалось 96 часов при 20 °С, измерения выполняли каждые 24 часа. Эксперимент для определения активности КФ проводили в трех повторностях. Культивировали во всех случаях при 150 об/мин.

Определение активности кислой фосфатазы

Активность КФ определяли по ранее разработанной методике [25]. В качестве контрольной пробы использовали суспензию культуральной жидкости штамма GS115, выращенного в тех же условиях. Удельную активность определяли как отношение оптической плотности при 410 нм к плотности клеточной суспензии при 600 нм.

Идентификация гетерологичного белка

Анализ гетерологичных белков электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) и гибридизацию с антителами осуществляли по методике, примененной нами ранее [26].

Пробы готовили концентрированием культуральной жидкости в 10 раз при помощи центрифужных ультрафильтров Amicon Ultra 0,5 mL (MerckMillipore). В качестве контроля на гель наносили культуральную жидкость штамма GS115, выращенного в тех же условиях.

Для идентификации белка интерферона-альфа16 человека использовали первичные кроличьи IgG поликлональные антитела PA5-54146 (Thermoscientific), в качестве вторичных антител — конъюгат видоспецифических антител к иммуноглобулинам кролика и пероксидазы хрена (Sigma, A-0545). Все антитела разводили в 1000 раз.

Биоинформатические методы

Открытые рамки считывания 5' области гена *PpKAR2* для выбора промоторного участка определяли с помощью интернет-сервиса ExPASy Шведского института биоинформатики [27]. Поиск сайтов связывания транскрипционных факторов производили с помощью базы данных транскрипционных факторов *S. cerevisiae* — Yeabstract [28] и программного обеспечения Genomatix Software Suite [29]. Статистическую обработку данных выполняли с использованием программ Excel и GraphPadPrizm 6 [30]. Межгрупповые различия оценивали с помощью *U*-критерия Манна — Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ 5' регуляторных областей генов *PpPPD11* и *PpKAR2*

Для клонирования промоторной области гена *PpPPD11* был взят участок в 254 нуклеотида между стартовым

кодонам структурного гена и терминирующим кодоном гена, лежащего в 5' области [16]. После анализа нуклеотидной последовательности 5' области гена *PpKAR2* был выбран участок, состоящий из 311 нуклеотидов, между стартовым кодоном структурного гена *PpKAR2* и последним триплетом ближайшей открытой рамки считывания. Последовательность промотора *PPD11*: 5`-aacacgaacactgtaaataagaataaaaagaaaactggatagtagaactcaatgtagtgttctattgtcttacgcggtcttttagattgcaatccccagaatggaatcgccatcttctcaacccactcaagataatctaccagacatactacgcctccatcCCAGCaccacgctcgcatcaCCCTaaactcaataattgaacacgactgatttccaaaccttcttctctctctataaga-3`. Последовательность промотора *PKAR2*: 5`-aagacttgagatggacatgataaacaattatagtgaaatagaaccataatacaatattctaagaggaaccgtttacctgtggttctattgtggcctactgtactagctagtgaatacaccttgcctcagcttgaagtTGACAAactcagccaaatgatcttgaatgctgcgaaacctcaaggccatcGAAttTTCtGAAttTTCaggttttcataCAGCGTgtcatcttcttctcgctactatttaaatcgtaccagatcccttcttctccttattcaattccaacactcaaga-3`. Подчеркнуты последовательности сайтов связывания факторов транскрипции, отдельно выделен перекрывающийся сайт Xbp1p.

Выбранные нуклеотидные последовательности были проанализированы на присутствие сайтов связывания факторов транскрипции. В промоторе гена *PpPPD11* было выявлено 24, а в промоторе гена *PpKAR2* — 43 потенциальных сайта связывания факторов транскрипции. Нас интересовали белки-регуляторы, которые участвуют в ответе клетки на несвернутые белки в ЭР и такие стрессорные факторы, как повышение температуры и концентрации активных форм кислорода, дефицит питательных веществ. Выбор этих белков-регуляторов был обусловлен тем, что изменения, происходящие в клетке при сверхпродукции гетерологичных белков и воздействии многих стрессорных факторов, похожи [31]. Как следует из табл. 1, промотор *PKAR2* содер-

Таблица 1

Потенциальные сайты связывания транскрипционных факторов в промоторах *PPD11* и *PKAR2*

Table 1

Potential binding sites for transcription factors in *PPD11* and *PKAR2* promoters

Промотор / Promoter	Транскрипционный фактор / Transcription factors	
	Название / Name	Нуклеотидная последовательность / Nucleotide sequence
<i>PPD11</i> , <i>PKAR2</i>	Nac1p	CCAGC
<i>PKAR2</i>	Xbp1p	CTCGA
	Yap1p	TGACAA
	Hot1p	CATTGGC
	Hsf1p	GAA/TTC повторы / repeats
<i>PPD11</i>	Msn2p/Msn4p	AGGGG

жит больше потенциальных сайтов связывания белков, участвующих в ответе клетки на стрессорные факторы, по сравнению с промотором *PPD11*.

В обоих промоторах присутствуют сайты связывания транскрипционного фактора Нас1р. Нас1р регулирует ответ клетки на накопление несвернутого белка в ЭР и контролирует биогенез мембран (см. рис. 1) [14]. С промотором гена *PKAR2* могут взаимодействовать также белки Hsf1p, Xbp1p, Yap1p и Hot1p. Hsf1p — фактор транскрипции, который в виде тримера активирует в ответ на повышение температуры и другие стрессорные факторы экспрессию генов, промоторы которых содержат инвертированные повторы NGAAN, где N — любой нуклеотид. Активность Hsf1p регулируется на пост-трансляционном уровне за счет фосфорилирования [32]. В промоторе *PKAR2* найдено несколько сайтов связывания белка Hsf1p. Xbp1p — транскрипционный репрессор, который активируется при повышении температуры, окислительном стрессе, дефиците глюкозы и взаимодействует с промоторами структурных генов G1/S циклинов. Он является потенциальным субстратом протеинкиназы Cdc28p [33]. Yap1p необходим для обеспечения устойчивости к окислительному стрессу, также опосредует

устойчивость к кадмию. Он активирует транскрипцию генов, продукты которых влияют на окислительно-восстановительный гомеостаз клетки [34]. Hot1p — фактор транскрипции, обеспечивающий адаптацию клетки к высокому осмотическому давлению, необходим для индукции генов биосинтеза глицерина *GPD1* и *GPP2* [35].

В промоторе гена *PPD11* есть сайт связывания белков Msn2p/Msn4p. Msn2p/Msn4p при воздействии различных стрессорных факторов — температуры, активных форм кислорода и др. — экспортируются в ядро и активируют транскрипцию генов, промоторы которых содержат STRE (stress response element — элемент стрессового ответа) [36].

Клонирование промоторов генов *PpPPD11* и *PpPKAR2*, получение плазмид, содержащих гены *PHO5* и *HuIFNα16* под контролем данных промоторов

В качестве матрицы для амплификации выбранных промоторных областей генов *PpPPD11* и *PpPKAR2* была использована хромосомная ДНК штамма GS115. Для создания плазмид, несущих ген *PHO5* под контролем промоторов *PPD11* и *PKAR2*, использовали плазмиду *pPIC9-PHO5* (рис. 2, а). Вектор обрабатывали рестриктазами AatII и BamHI, чтобы удалить промотор

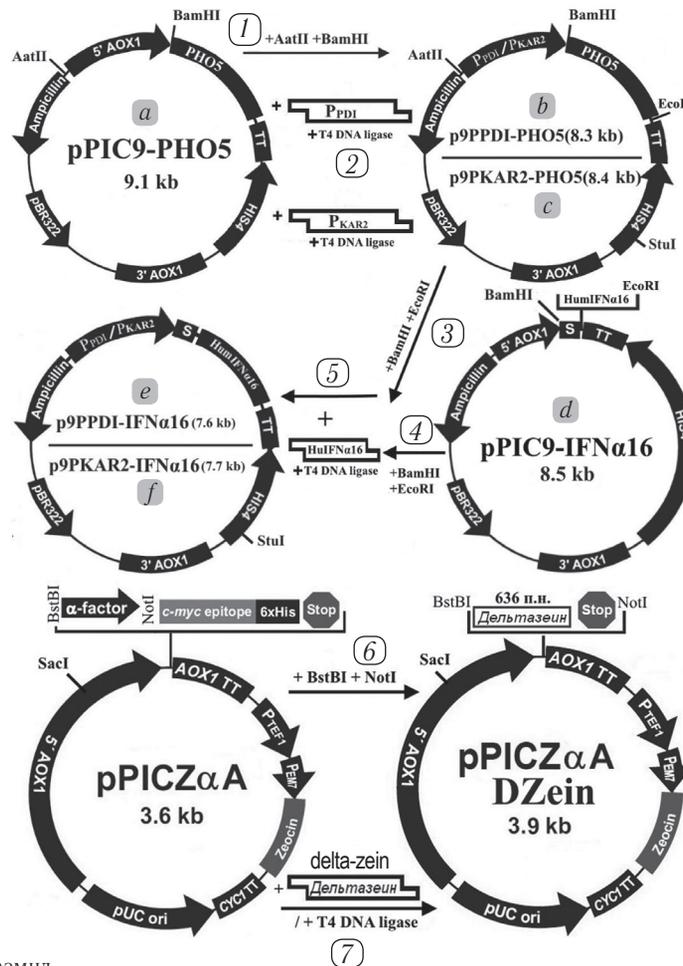


Рис. 2. Схема получения плазмид
Fig. 2. Plasmid construction

гена *AOX1*, а затем лигировали с последовательностями промоторов генов *PpPDI1* и *PpPKAR2*, которые были обработаны этими же рестриктазами. Подтверждение структуры полученных плазмид проводили при помощи ПЦР, рестрикционного анализа и секвенирования. Схема получения плазмид *p9PKAR2-PHO5* и *p9PPDI-PHO5* представлена на рис. 2 (1, 2).

Для получения конструкций, в которых под контролем промоторов *PPDI1* и *PKAR2* находится структурный ген интерферона-альфа16 человека (*HuIFNα16*), плазмиды *p9PKAR2-PHO5* и *p9PPDI-PHO5* обрабатывали рестриктазами *VamHI* и *EcoRI* и лигировали с фрагментом ДНК, содержащим сигнальную последовательность α-фактора дрожжей *S. cerevisiae* и ген *HuIFNα16*, который был получен при обработке плазмиды *pPIC9-IFNα16* теми же рестриктазами. Схема конструирования плазмид представлена на рис. 2 (4, 5).

Получение дрожжевых штаммов с репортерной системой на основе КФ *S. cerevisiae* и штаммов-продуцентов дельтазеина кукурузы

Штаммы GS-PPDI1-PHO5 и GS-PKAR2-PHO5, в которых репортерный ген *PHO5* находится под контролем изучаемых промоторов, были получены трансформацией штамма GS115 соответственно плазмидами *p9PKAR2-PHO5* и *p9PPDI1-PHO5*. Плазмиды обрабатывали рестриктазой *StuI*, таким образом, вставка в геном происходила в локус *HIS4*, что обеспечивало появление функциональной копии гена *HIS4* и прототрофность штамма по гистидину.

Для оценки влияния сверхпродукции гетерологичного белка на активность промоторов *PPDI1* и *PKAR2* использовали дельтазеин кукурузы. Для получения плазмиды, в которой под контролем промотора *PAOX1* находится ген

дельтазеина кукурузы, плазмиду *pPICZαA* обрабатывали рестриктазами *BstBI* и *NotI* и лигировали с фрагментом дельтазеина кукурузы, обработанным теми же рестриктазами. Схема получения плазмиды представлена на рис. 2 (5, 6). Штаммы GS-PPDI1-PHO5 и GS-PKAR2-PHO5 трансформировали плазмидой *pPICZαADZein*. Плазмиду предварительно обрабатывали рестриктазой *SacI*, сайт расщепления которой находится в 5 области промотора *PAOX1*. Интеграция в геном происходила в промоторную область гена *AOX1* без нарушения его функции. Таким образом получили штаммы GS-PPDI1-PHO5/*PAOX1-Dzein* и GS-PKAR2-PHO5/*PAOX1-Dzein*, в которых репортерный ген *PHO5* находится под контролем соответственно промоторов *PKAR2* и *PPDI1*, а структурный ген гетерологичного белка — под контролем промотора *PAOX1*.

Для оценки влияния сверхпродукции собственного белка на активность промотора *PKAR2* штамм GS-*PAOX1-PDI1* [19], в котором под контролем промотора *PAOX1* находится ген *PpPDI1*, был трансформирован плазмидой *p9PKAR2-PHO5*. Плазмида была обработана рестриктазой *StuI*, таким образом, встраивание происходило в локус *HIS4*. В результате был получен штамм GS-PKAR2-PHO5/*PAOX1-PDI1*, в котором ген *PHO5* находится под контролем промотора *PKAR2*, а структурный ген белка *Pdi1p* — под контролем промотора *PAOX1*.

Оценка активности промоторов *PPDI1* и *PKAR2*

Активность изучаемых промоторов оценивали по активности КФ, которую измеряли в суспензии клеток. При выращивании дрожжей в качестве единственного источника углерода мы использовали метанол, чтобы обеспечить сверхэкспрессию генов, находящихся под контролем промотора *PAOX1*. Полученные значения активности КФ представлены на рис. 3.

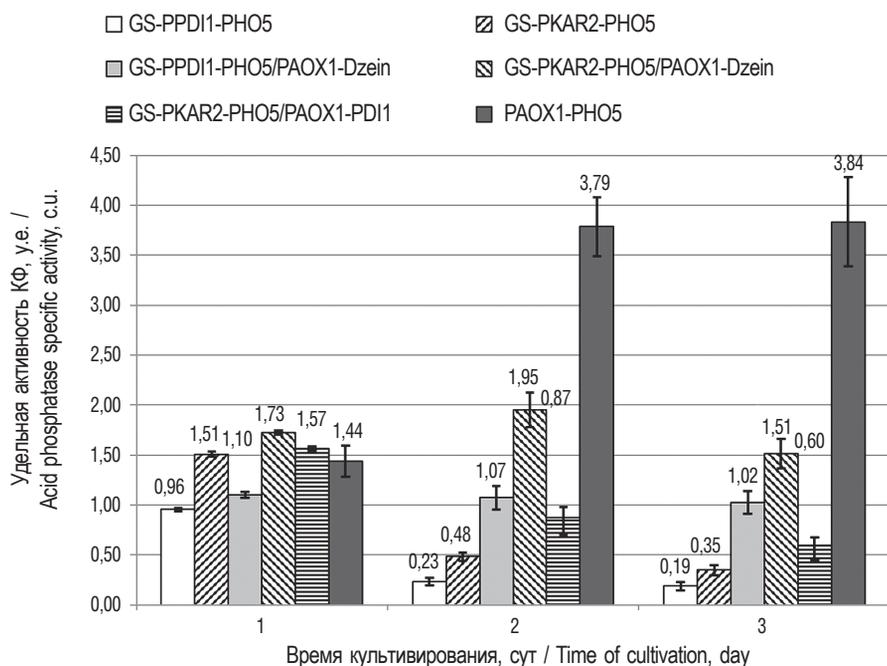


Рис. 3. Активность промоторов *PKAR2* и *PPDI1* в сравнении с активностью промотора *PAOX1* в исходном штамме и в штаммах со сверхпродукцией собственного и гетерологичного белков. Данные представлены со стандартной ошибкой среднего

Fig. 3. The activity of promoters *PKAR2* and *PPDI1* in comparison with the activity of the *PAOX1* promoter in the original strain and in strains with overproduction of native and heterologous proteins. The data are presented with a standard error of the mean

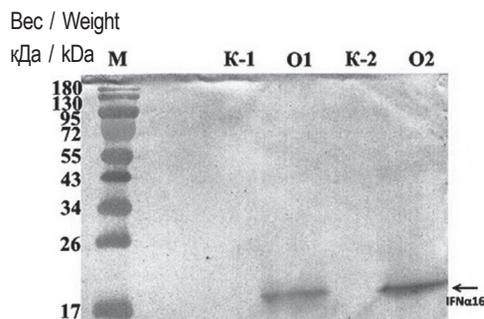


Рис. 4. Иммуноблоттинг белков культуральных сред штаммов дрожжей, содержащих ген *HuIFNα16* человека под контролем изучаемых промоторов. Культуральные жидкости штаммов: [O1] — GS-PPD11-IFNα16 и [O2] — GS-PKAR2-IFNα16. М — маркер, [K-1], [K-2] — культуральная жидкость штамма GS115

Fig. 4. Western-blot analysis of proteins from culture fluids of yeast strains containing human *HuIFNα16* gene under the control of promoters under study. Description: Culture fluids of strains: [O1] — GS-PPD11-IFNα16 and [O2] — GS-PKAR2-IFNα16. M — protein marker, [K-1], [K-2] — a culture fluid of the strain GS115

Из графиков видно, что активность изучаемых промоторов заметно ниже, чем у *PAOX1*, особенно со вторых суток культивирования. В то же время при сверхэкспрессии гетерологичного гена активность промоторов *PKAR2* и *PPD11* увеличивается.

Использование промоторов *PPD11* и *PKAR2* для экспрессии гетерологичного гена *HuIFNα16*

Для проверки эффективности экспрессии гетерологичного гена под контролем изучаемых промоторов исходный штамм GS115 был трансформирован плазмидами *p9PKAR2-IFNα16* и *p9PPD11-IFNα16* соответственно, в которых под контролем изучаемых промоторов находится структурный ген интерферона-альфа16 человека. Обозначения полученных штаммов — GS-PKAR2-IFNα16 и GS-PPD11-IFNα16. Ранее ген *HuIFNα16* человека был клонирован под контролем промотора гена *AOX1* [21].

Наличие в штаммах-трансформантах нужных генетических конструкций и ориентацию встройки определяли при помощи ПЦР. Наличие гетерологичного белка в культуральной жидкости оценивали при помощи ИФА с антителами к интерферону-альфа16. В качестве контроля использовали культуральную жидкость исходного штамма GS115, выращенного в тех же условиях.

Как следует из результатов (рис. 4), в культуральной жидкости штаммов-продуцентов присутствует интерферон-альфа16 человека.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ промоторов *PKAR2* и *PPD11*

В промоторах *PKAR2* и *PPD11*, как мы и предполагали, представлены потенциальные сайты связывания факторов транскрипции, которые регулируют ответ

клетки дрожжей на различные стрессорные факторы, в том числе тепловой и окислительный шок и накопление несвернутого белка в ЭР. Исходя из анализа последовательностей изучаемых промоторов, можно заключить, что у дрожжей *P. pastoris*, как и у дрожжей *S. cerevisiae*, белок Hac1p — центральный участник UPR — взаимодействует с промоторами *PPD11* и *PKAR2* (см. рис. 1). Но, как было уже отмечено ранее, у дрожжей *P. pastoris* в нормальных условиях не был найден несплайсированный вариант мРНК *HAC1*, что позволяет говорить об отличии механизмов UPR у разных видов дрожжей и, возможно, постоянной активности всех белков — участников UPR у *P. pastoris* [14]. Более детальное исследование состояния клетки дрожжей *P. pastoris* в условиях сверхпродукции гетерологичного белка, в том числе проверка наличия или отсутствия несплайсированного варианта мРНК *HAC1*, позволит дать ответ на этот вопрос. Существуют данные, подтверждающие тесную связь изменений, которые происходят в клетке при окислительном стрессе и нарушении процесса секреции белка [37]. Дрожжи *P. pastoris* являются облигатными аэробами, в течение всего периода культивирования у них активно функционируют митохондрии, вырабатываются активные формы кислорода и увеличивается количество шаперонов и других белков, обеспечивающих защиту клеток от окислительного стресса. В связи с этим можно предположить большую готовность клетки метилотрофных дрожжей к воздействию различных стрессорных факторов, в том числе синтезу гетерологичных белков. Широкий спектр гетерологичных генов, успешно экспрессированных в *P. pastoris*, и высокая продуктивность штаммов-продуцентов это косвенно подтверждают.

Сравнение активности промоторов *PKAR2*, *PPD11* и *PAOX1* в исходных штаммах

Как следует из результатов (см. рис. 3), максимальную активность промоторы *PPD11* и *PKAR2* исходных штаммов демонстрировали на первые сутки культивирования. Активность промотора *PPD11* составляла 64 % от *PKAR2*, а активность промотора *PKAR2* значимо не отличалась от активности промотора *PAOX1* ($p = 0,667$) и составила 1,51 у. е.

Активность промоторов *PPD11* и *PKAR2* в течение культивирования снижалась и на третьи сутки составляла 5 % (*PPD11*) и 9 % (*PKAR2*) активности промотора *PAOX1* с сохранением значимой разницы между собой ($p = 0,026$), в то время как активность *PAOX1* повышалась. Увеличение активности *PAOX1* можно объяснить тем, что клетке нужно время для адаптации к катаболизму метанола. Одной из причин снижения активности *PPD11* и *PKAR2* могут быть изменения метаболизма штаммов-продуцентов, ранее обнаруженные у дрожжей *S. cerevisiae* в стационарной фазе роста и сопровождающиеся замедлением скорости процессов транскрипции и трансляции [38].

Учитывая функции белков Pdi1p, Kar2p, Aox1p в клетке и роль последнего в метаболизме метанола, промоторы *PPD11* и *PKAR2* не могут конкурировать с таким сильным промотором, как *PAOX1*. Известно, что при росте на средах, содержащих метанол в качестве единственного источника углерода, в клетке *P. pastoris* количество Aox1p может достигать 30 % от суммарного клеточного белка, а количество полиА-мРНК *PpAOX1* может составлять до 5 % пула мРНК [39].

Сравнение активности промоторов *PKAR2*, *PPD11* и *PAOX1* в условиях сверхэкспрессии гетерологичного и собственного генов

Данные (см. рис. 3) говорят о том, что при сверхсинтезе гетерологичного белка дельтазеина кукурузы, структурный ген которого клонирован под контролем *PAOX1*, оба промотора демонстрируют рост активности. Максимальный прирост активности по сравнению с исходным штаммом (без сверхэкспрессии генов) составил 436 % (*PPD11*) и 331 % (*PKAR2*) на третьи сутки культивирования. Активность промотора *PPD11* повышалась в большей степени относительно исходного штамма, на вторые сутки культивирования она составляла 28 % активности промотора *PAOX1* и сохранялась на одном уровне на протяжении всего времени культивирования. Максимальная активность у промотора *PKAR2* была зарегистрирована также на вторые сутки и составляла 51 % от активности *PAOX1*.

Повышение активности обоих исследуемых промоторов в условиях синтеза гетерологичного белка может свидетельствовать, что экспрессия генов *PpPD11* и *PpKAR2* увеличивается в ответ на воздействие этого стрессорного фактора. Промотор *PKAR2* в абсолютных величинах реагирует сильнее, вероятно, потому, что Kar2p является шапероном и играет основную роль в поддержании нормальной конформации как собственных, так и гетерологичных белков в ЭР. А белок Pdi1p участвует в формировании третичной структуры только белков, содержащих дисульфидные связи. Очевидно, различные стрессорные факторы могут затруднять нормальное сворачивание белков, что будет увеличивать время существования комплексов белок — шаперон и уменьшать пул свободных молекул шаперона. Это потребует увеличения количества Kar2p и, соответственно, усиления экспрессии гена *PpKAR2*. Не случайно промотор гена *PpKAR2* имеет большее количество сайтов связывания транскрипционных факторов, контролирующих ответ клетки на различные стрессорные воздействия, по сравнению с промотором гена *PPD11*.

При сверхпродукции собственного белка *P. pastoris* — Pdi1p — активность промотора *PKAR2* также увеличивалась, но в меньшей степени. Максимальный прирост активности (80 %) был зафиксирован на вторые сутки культивирования. Это может свидетельствовать в пользу нашего предположения о том, что для сворачивания собственных белков требуется меньше

времени, быстрее происходит освобождение Kar2p из комплекса шаперон — белок, поэтому не требуется значительного увеличения количества шаперона.

Экспрессия гена модельного гетерологичного белка

В предварительных экспериментах мы показали возможность использования промоторов *PPD11* и *PKAR2* для экспрессии гена *HulFNα16*. Продemonстрированное нами повышение активности промоторов генов *PpPD11* и *PpKAR2* у штаммов-продуцентов гетерологичного белка дает основание предполагать, что эти промоторы могут быть востребованы в биотехнологии.

Использование для экспрессии гетерологичных генов промоторов, которые повышают свою активность в ответ на синтез гетерологичного белка, может повысить продуктивность всего процесса за счет положительной обратной связи между накоплением гетерологичного белка в ЭР и активностью примененного промотора (рис. 5).



Рис. 5. Схема возможного эффекта от применения промоторов шаперонов для продукции гетерологичных белков

Fig. 5. Scheme of possible effect from the use of chaperone promoters for the production of heterologous proteins

ЛИТЕРАТУРА

- Schwarzthans JP, Luttermann T, Geier M, et al. Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Adv.* 2017;35(6):681-710. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.07.009.
- Pichia.com [Internet]. Pichia Technology from RCT. Pichia Produced Products on the Market [cited 2018 Apr 19]. Available from: www.pichia.com/science-center/commercialized-products/.
- Zahl RJ, Pena DA, Mattanovich D, Gasser B. Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res.* 2017;17(7). doi: 10.1093/femsyr/fox068.
- Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(12):5301-5317. doi: 10.1007/s00253-014-5732-5.
- Patent USA No US008236528B2/ 2012.

6. Wang J, Wang X, Shi L, et al. Methanol-Independent Protein Expression by AOX1 Promoter with trans-Acting Elements Engineering and Glucose-Glycerol-Shift Induction in *Pichia pastoris*. *Sci Rep*. 2017;7:41850. doi: 10.1038/srep41850.
7. Ata O, Prielhofer R, Gasser B, et al. Transcriptional engineering of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for improved heterologous protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*. 2017;114(10):2319-2327. doi: 10.1002/bit.26363.
8. Stadlmayr G, Mecklenbrauker A, Rothmuller M, et al. Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production. *J Biotechnol*. 2010;150(4):519-529. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.09.957.
9. Prielhofer R, Maurer M, Klein J, et al. Induction without methanol: novel regulated promoters enable high-level expression in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*. 2013;12:5. doi: 10.1186/1475-2859-12-5.
10. Vogl T, Glieder A. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *N Biotechnol*. 2013;30(4):385-404. doi: 10.1016/j.nbt.2012.11.010.
11. Landes N, Gasser B, Vorauer-Uhl K, et al. The vitamin-sensitive promoter PTH11 enables pre-defined autonomous induction of recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*. 2016;113(12):2633-2643. doi: 10.1002/bit.26041.
12. Gasser B, Saloheimo M, Rinas U, et al. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microb Cell Fact*. 2008;7:11. doi: 10.1186/1475-2859-7-11.
13. Kohno K, Normington K, Sambrook J, et al. The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol*. 1993;13(2):877-890. doi: 10.1128/MCB.13.2.877.
14. Guerfal M, Ryckaert S, Jacobs PP, et al. The HAC1 gene from *Pichia pastoris*: characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins. *Microb Cell Fact*. 2010;9:49. doi: 10.1186/1475-2859-9-49.
15. Wilkinson B, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1699(1-2):35-44. doi: 10.1016/j.bbapap.2004.02.017.
16. Warsame A, Vad R, Kristensen T, Oyen TB. Characterization of a gene encoding a *Pichia pastoris* protein disulfide isomerase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;281(5):1176-1182. doi: 10.1006/bbrc.2001.4479.
17. Guan B, Chen F, Su S, et al. Effects of co-overexpression of secretion helper factors on the secretion of a HSA fusion protein (IL2-HSA) in *Pichia pastoris*. *Yeast*. 2016. doi: 10.1002/yea.3183.
18. Sun H, Bankefa OE, Ijeoma IO, et al. Systematic assessment of *Pichia pastoris* system for optimized beta-galactosidase production. *Synth Syst Biotechnol*. 2017;2(2):113-120. doi: 10.1016/j.synbio.2017.04.001.
19. Цыганков М.А., Падкина М.В. Влияние сверхэкспрессии гена *PDI* на продукцию гетерологических белков в дрожжах *Pichia pastoris* // Экологическая генетика. — 2017. — Т. 15. — № 2. — С. 21–30. [Tsygankov MA, Padkina MV. Influence of *PDI* gene overexpression on heterologous proteins production in yeast *Pichia pastoris*. *Ekol Genet*. 2017;15(2):21-30. (In Russ.).] doi: 10.17816/ecogen15221-30.
20. Савинов В.А., Румянцев А.М., Самбук Е.В., Падкина М.В. Создание тест-системы для изучения генетического контроля регуляции гена *AOX1* дрожжей *Pichia pastoris* // Вестник СПбГУ. Серия 3. Биология. — 2009. — № 4. — С. 114–119. [Savinov VA, Rumyantsev AM, Sambuk EV, Padkina MV. Constructing a test-system for researching genetic control of alcoholoxidase 1 gene regulation in yeast *Pichia pastoris*. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Seriya 3, Biologiya*. 2009;(4):114-119. (In Russ.)]
21. Патент РФ на изобретение №2380405/ 29.11.2007. Падкина М.В., Доброгорская М.В., Карабельский А.В. и др. Способ получения рекомбинантного альфа 16-интерферона человека и фармацевтическая композиция для лечения вирусных заболеваний на основе рекомбинантного альфа 16-интерферона человека. [Patent RUS No 2380405/ 29.11.2007. Padkina MV, Dobrogorskaya MV, Karabel'skiy AV, et al. Sposob polucheniya rekombinantnogo al'fa 16-interferona cheloveka i farmatsevticheskaya kompozitsiya dlya lecheniya virusnykh zabolevaniy na osnove rekombinantnogo al'fa 16-interferona cheloveka. (In Russ.)]
22. Web.mit.edu [Internet]. “Smash and Grab” Yeast Genomic Prep Методика выделения ДНК, “Smash and Grab” [cited 04.04.18]. Available from: <http://web.mit.edu/biology/guarente/protocols/quickprep.html>.
23. Wu S, Letchworth GJ. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques*. 2004;36(1):152-154. doi: 10.2144/04361DD02.
24. Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. [Maniatis T, Fritch E, Sambrook J, *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Moscow: Mir; 1984. (In Russ.)]
25. Падкина М.В., Краснопевцева Н.Г., Петрашень М.Г. и др. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Характеристика кислых фосфатаз разных штаммов // Генетика. — 1974. — Т. 10. — № 11. — С. 100–111.

- [Padkina MV, Krasnopevtseva NG, Petrashen' MG, et al. Genetiko-biokhimičeskoe izučenie kislykh fosfataz drozhzhey *Saccharomyces cerevisiae*. Kharakteristika kislykh fosfataz raznykh shtammov. *Genetika*. 1974;10(11):100-111. (In Russ.)]
26. 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*. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 2010;46(4):448-455. (In Russ.)]
 27. Expasy.org [Internet]. SIB (Swiss Institute of Bioinformatic) Bioinformatics Resource Portal [cited 2018 Apr 19]. Available from: <https://www.expasy.org/>.
 28. Yeasttract.com [Internet]. Yeast Search for Transcriptional Regulators And Consensus Tracking [cited 2018 Apr 19]. Available from: <http://www.yeasttract.com/>.
 29. Genomatix.de [Internet]. Genomatix Software Suite — Scientific Analysis of genomic data [cited 2018 Apr 19]. Available from: <http://www.genomatix.de/>.
 30. Graphpad.com [Internet]. GraphPad Prism software [cited 2018 Apr 19]. Available from <https://www.graphpad.com/>.
 31. Jurgen B, Lin HY, Riemschneider S, et al. Monitoring of genes that respond to overproduction of an insoluble recombinant protein in *Escherichia coli* glucose-limited fed-batch fermentations. *Biotechnol Bioeng*. 2000;70(2):217-224. doi: 10.1002/1097-0290(20001020)70:2<217::AID-BIT11>3.0.CO;2-W.
 32. Eastmond DL, Nelson HC. Genome-wide analysis reveals new roles for the activation domains of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor (Hsf1) during the transient heat shock response. *J Biol Chem*. 2006;281(43):32909-32921. doi: 10.1074/jbc.M602454200.
 33. Mai B, Breeden L. Xbp1, a stress-induced transcriptional repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* Swi4/Mbp1 family. *Mol Cell Biol*. 1997;17(11):6491-6501. doi: 10.1128/MCB.17.11.6491.
 34. Rodrigues-Pousada C, Menezes RA, Pimentel C. The Yap family and its role in stress response. *Yeast*. 2010;27(5):245-258. doi: 10.1002/yea.1752.
 35. Alepuz PM, de Nadal E, Zapater M, et al. Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *EMBO J*. 2003;22(10):2433-2442. doi: 10.1093/emboj/cdg243.
 36. Garreau H, Hasan RN, Renault G, et al. Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 2000;146(Pt 9):2113-2120. doi: 10.1099/00221287-146-9-2113.
 37. Tyo KE, Liu Z, Petranovic D, Nielsen J. Imbalance of heterologous protein folding and disulfide bond formation rates yields runaway oxidative stress. *BMC Biol*. 2012;10:16. doi: 10.1186/1741-7007-10-16.
 38. Werner-Washburne M, Braun E, Johnston GC, Singer RA. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*. 1993;57(2):383-401.
 39. Lin-Cereghino GP, Godfrey L, de la Cruz BJ, et al. Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol*. 2006;26(3):883-897. doi: 10.1128/MCB.26.3.883-897.2006.

✿ Информация об авторах

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

Марина Владимировна Падкина — профессор, биологический факультет, кафедра генетики и биотехнологии, лаборатория биохимической генетики. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. E-mail: mpadkina@mail.ru.

✿ Information about the authors

Mikhail A. Tsygankov — Engineer-Researcher, Faculty of Biology, Department of Genetics and Biotechnology, Laboratory of Biochemical Genetics. Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: mial.tsygankov@yandex.ru.

Marina V. Padkina — Professor, Faculty of Biology, Department of Genetics and Biotechnology, Laboratory of Biochemical Genetics. Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: mpadkina@mail.ru.