

## КОЛЛЕКЦИЯ ПЛАЗМИД С РАЗЛИЧНЫМИ СИГНАЛАМИ СЕКРЕЦИИ ДЛЯ СИНТЕЗА РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ ДРОЖЖЕЙ *KOMAGATAELLA PHAFFII*

Метилотрофные дрожжи *Komagataella phaffii* в последние десятилетия стали одной из самых популярных систем для синтеза рекомбинантных белков для различных целей. Многие исследователи отдают предпочтение именно этим дрожжам в качестве системы экспрессии гетерологичных генов.

Данный вид дрожжей обладает всеми необходимыми чертами эффективной системы синтеза рекомбинантных белков: для *K. phaffii* доступны удобные методы проведения генетических манипуляций. Кроме того, их культуры можно выращивать до очень высоких плотностей на дешёвых средах, что обеспечивает высокую эффективность синтеза рекомбинантного белка. *K. phaffii* могут осуществлять множество свойственных высшим эукариотам посттрансляционных модификаций, а также обеспечивать правильную укладку белков. Наконец, эти дрожжи имеют ряд сильных промоторов, используемых для экспрессии генов[1,2]. Чаще всего используется промотор гена алкогольоксидазы I (*AOX1*) *K. phaffii*, который прекрасно подходит для регулируемой экспрессии чужеродных генов, индуцируется метанолом и является необычайно эффективным[3].

Гетерологичные белки, синтезируемые *K. phaffii*, могут продуцироваться либо внутриклеточно, либо секретироваться из клетки. Поскольку *K. phaffii* секретирует лишь небольшое количество собственных белков, секретируемый рекомбинантный белок составляет большую часть от общего количества белка в среде[4]. Таким образом, секреция является первым важным шагом в очистке белков, разделяя синтезируемые чужеродные белки от собственных внутриклеточных[5].

Чтобы направить рекомбинантный белок по пути секреции, требуется добавление сигнальной последовательности. Однако различные свойства и особенности рекомбинантных белков могут ограничивать возможность его секреции. При работе с *K. phaffii* используется несколько различных последовательностей сигналов секреции, включая сигнал кислой фосфатазы *K. phaffii* (*PHO1*) и другие нативные сигналы секреции. Чаще всего применяется сигнальная последовательность секреции от препро-пептида  $\alpha$ -фактора спаривания ( $\alpha$ -Mating Factor) дрожжей *S. cerevisiae*.

По ещё не выясненным причинам *K. phaffii* часто не может секретировать некоторые белки, даже если они обладают правильной сигнальной последовательностью. Некоторые рекомбинантные белки, слитые с препро-пептидом  $\alpha$ -фактора, остаются в ЭПР или аппарате Гольджи, что значительно уменьшает экспорт белка во внеклеточную среду. В работе Lin-Cereghino и др. рассматривалось, повлияет ли удаление определенных последовательностей аминокислот на уровни секреции гетерологичных белков. В исследовании был проведен сайт-направленный мутагенез последовательности, кодирующей сигнал секреции  $\alpha$ -фактора. Впоследствии оценивали активность ферментов и уровни белка во внеклеточной среде. Результаты работы показали, что, помимо прочих областей, делеция в области 57-70 аминокислот повышает эффективность секреции гетерологичных белков на 50%[6].

---

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

Целью работы является получение инструментов, позволяющих применять различные сигналы секреции при синтезе рекомбинантных белков в дрожжах *K. phaffii*, и сравнение эффективности этих сигналов.

На первом этапе методом амплификации последовательности гена *PHO1* с подобранными праймерами были получены плазмиды pPICZ-PHO1 и pPICZ $\alpha$ MF-PHO1, содержащие подконтрольный промотору *AOX1* репортерный ген кислой фосфатазы *PHO1* с нативной сигнальной последовательностью и сигнальной последовательностью  $\alpha$ MF соответственно, а также ген устойчивости к антибиотику зеоцину.

Далее полученные плазмиды pPICZ-PHO1 и pPICZ $\alpha$ MF-PHO1 были линейаризованы и интегрированы в геном *K. phaffii* (штамм X-33) методом электропорации. Трансформанты были отобраны на среде YEPDS с добавлением зеоцина.

Был проведён качественный анализ активности репортерного гена *PHO1* у штаммов X-33-PHO1 и X-33- $\alpha$ MF-PHO1 в сравнении с исходным штаммом X-33. Штаммы высевали на твёрдые среды с различными источниками углерода - метанолом и глюкозой (MMet и Md). Активность репортерной КФ была выявлена у полученных штаммов при росте на среде с метанолом. Это является результатом экспрессии репортерного гена *PHO1*, находящегося под контролем индуцируемого метанолом промотора гена *AOX1*. Исходный штамм X-33, используемый в качестве контроля, не демонстрировал активности КФ.

Наконец, путём сайт-направленного мутагенеза было произведено конструирование плазмиды pPICZ- $\Delta$ 57-70 $\alpha$ MF-PHO1, содержащей подконтрольный промотору *AOX1* репортерный ген *PHO1* с внесённой в последовательность  $\alpha$ MF делецией и ген устойчивости к зеоцину.

*Работа выполнена при поддержке гранта Санкт-Петербургского государственного университета № 75428571.*

## **Список литературы**

1. Cregg J.M. et al. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris* // Mol Biotechnol. 2000. Vol. 16, № 1. P. 23–52.
2. Macauley-Patrick S. et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. // Yeast. 2005. Vol. 22, № 4. P. 249–270.
3. Romanos M.A., Scorer C.A., Clare J.J. Foreign gene expression in yeast: a review // Yeast. 1992. Vol. 8, № 6. P. 423–488.
4. Tschopp J.F. et al. High-Level Secretion of Glycosylated Invertase in the Methylophilic Yeast, *Pichia Pastoris* // Nat Biotechnol. 1987. Vol. 5, № 12. P. 1305–1308.
5. Lin-Cereghino G., Leung W., Lin-Cereghino J. Expression of protein in *Pichia pastoris* // Methods Express: Protein Expression. 2007. P. 86–97.
6. Lin-Cereghino G.P. et al. The effect of  $\alpha$ -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris* // Gene. 2013. Vol. 519, № 2. P. 311–317.