

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ ТРАНСПОРТА АМИНОКИСЛОТ И МЕТАБОЛИЗМА МЕТАНОЛА У ДРОЖЖЕЙ *PICHIA PASTORIS*

Волков А.А., Румянцев А.М.

*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург,
volkov.art.andr@gmail.com*

Дрожжи активно применяются в качестве объекта молекулярной биологии, а также в пищевой и фармацевтической промышленности. Одним из бурно развивающихся направлений современной биотехнологии является использование дрожжей в качестве системы для синтеза рекомбинантных белков. Метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) отлично зарекомендовали себя в качестве системы гетерологичной экспрессии генов. Эти дрожжи имеют ряд преимуществ по сравнению с традиционно применяемыми дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*. Так, *P. pastoris* являются облигатными аэробами, поэтому их культуры можно выращивать до более высоких клеточных плотностей. Помимо этого, при работе с *P. pastoris* используются промоторы генов метаболизма метанола (*MUT*-генов), обеспечивающие за счёт своей высокой активности и строгой регуляции эффективную экспрессию чужеродных генов. В связи с этим большой практический интерес вызывает изучение механизмов регуляции этих генов в зависимости от условий среды, в частности от наличия и доступности различных аминокислот [2, 3].

Целью данной работы являлось изучение взаимосвязи транспорта аминокислот и метаболизма метанола у дрожжей *P. pastoris*.

Был проведен биоинформатический анализ, в ходе которого в геноме *P. pastoris*, были выявлены два гена, являющиеся ортологами гена специфической пермеазы пролина *PUT4* дрожжей *S. cerevisiae*, а также три гена, ортологичные гену общей пермеазы аминокислот *GAP1* [6]. Обнаруженные гены были обозначены как *PpPUT4.1*, *PpPUT4.2* и *PpGAP1.1*, *PpGAP1.2*, *PpGAP1.3* соответственно.

Далее получили штаммы *Δgap1.1*-GS115, *Δgap1.2*-GS115, *Δgap1.3*-GS115, *Δput4.1*-GS115, *Δput4.2*-GS115 содержащие делеции в генах *PpGAP1.1*, *PpGAP1.2*, *PpGAP1.3* и *PpPUT4.1*, *PpPUT4.2* соответственно. Исходный штамм содержал в своём геноме репортерную систему, где под контроль промотора гена *AOX1* был встроен ген кислой фосфатазы (КФ) *PHO5* дрожжей *S. cerevisiae*.

Штаммы затем выращивали на минимальных средах с метанолом или глицерином в качестве источника углерода и сульфатом аммония, глутаматом, или пролином в качестве источников азота. Различий в росте штаммов с единичными делециями генов пермеаз аминокислот в исследуемых условиях не обнаружили.

У *S. cerevisiae* пермеаза Gap1p является единственным транспортером L-цитруллина – штаммы с делецией гена *GAP1* не растут на средах, в которых L-цитруллин является источником азота [5]. Было показано, что одиночные делеции генов *PpGAP1.1*, *PpGAP1.2*, *PpGAP1.3* не влияли на рост полученных штаммов *P. pastoris* на средах с L-цитруллином. Также было показано, что эти делеции по отдельности не влияли на скорость роста штаммов *P. pastoris* на средах, где отдельные аминокислоты (пролин или глутамат) являлись единственными источниками азота. Эти результаты позволяют предположить, что как минимум два из исследуемых генов (*PpGAP1.1*, *PpGAP1.2*, *PpGAP1.3*) кодируют активные белки.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что у *P. pastoris* при наличии пролина и глутамата в среде происходит репрессия генов метаболизма метанола. В ходе данной работы исследовали влияние делеций в генах пермеаз аминокислот на активность промотора гена *AOX1*, кодирующего алкогольоксидазу – основной фермент метаболизма метанола. Полученные штаммы содержали репортерную систему, где под контроль промотора гена *AOX1* был встроен ген КФ *RHO5*. Активность КФ у данных штаммов пропорциональна активности промотора *AOX1* в исследуемых условиях [4].

Таблица 1 – Активность КФ штаммов *Δgap1.1-GS115*, *Δgap1.2-GS115*, *Δgap1.3-GS115*, *Δput4.1-GS115*, *Δput4.2-GS115* и контрольного *tr2-4-GS115* с метанолом в качестве источника углерода и с различными источниками азота.

Источник углерода	Метанол			
	Источник азота	Сульфат аммония	Глутамат	Пролин
<i>tr2-4-GS115</i>				
<i>Δgap1.1-GS115</i>				
<i>Δgap1.2-GS115</i>				
<i>Δgap1.3-GS115</i>				
<i>Δput4.1-GS115</i>				
<i>Δput4.2-GS115</i>				

Как и ожидалось, у контрольного штамма активность КФ на среде с пролином была ниже, чем на среде с сульфатом аммония, поскольку промотор гена *AOX1* репрессируется при наличии пролина в среде. В данной работе было показано, что у штамма, несущего делецию в гене *PpPUT4.2* активность КФ на

среде с пролином выше, чем у контрольного штамма (табл. 1). Различий в активности КФ у штаммов с делециями других пермеаз по сравнению с контролем не выявлено.

Провели количественную оценку активности КФ [1]. Для этого штаммы *Δput4.1-GS115*, *Δput4.2-GS115* с делециями генов *PpPUT4.1* и *PpPUT4.2* и контрольный штамм *tr2-4-GS115* выращивали в жидких средах. На стадии индукции промотора *AOX1* в качестве источника углерода использовали метанол, а в качестве источника азота – сульфат аммония или пролин.

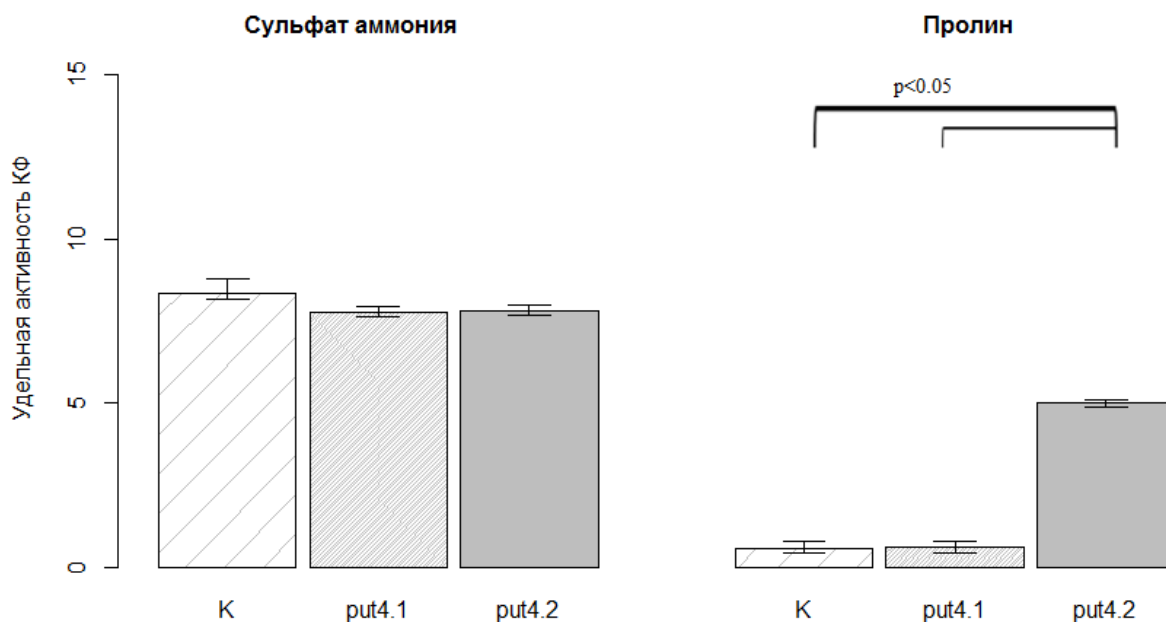


Рисунок 1 – Гистограмма «удельной» активности КФ штаммов *Δput4.1-GS115*, *Δput4.2-GS115*, несущих делеции *put4.1* и *put4.2*, после индукции промотора *AOX1* метанолом в средах, содержащих сульфат аммония и пролин. Для каждого штамма было проведено четыре независимых измерения для каждой среды (по два технических репликата для каждого из измерений). Показаны доверительные интервалы. На среде с пролином для штамма *Δput4.2-GS115* было показано значимое различие «удельной» активности в сравнении с контрольным штаммом *tr2-4-GS115*. Значение критерия Манна-Уитни меньше 0.05.

Показано, что наличие у штамма *Δput4.2-GS115* делеции в гене *PpPUT4.2* приводит к увеличению активности репортерной КФ в среде с метанолом и пролином по сравнению с контролем. Однако активность при этом остаётся меньше, чем в среде с метанолом и сульфатом аммония. Таким образом, делеция в гене *PpPUT4.2* у *P. pastoris* приводит к частичному снятию репрессии промотора *AOX1* пролином.

Полученные результаты позволяют предположить, что ген *PpPUT4.2* у *P. pastoris* кодирует активный белок, вовлечённый в регуляцию гена *AOX1* пролином. Участие гена *PpPUT4.2* в данной регуляции может осуществляться

по различным механизмам. С одной стороны, можно предположить, что белок PpPut4.2 является трансцептором и осуществляет взаимодействие с внеклеточным пролином, передавая сигнал о его наличии в среде на нижележащие эффекторы. С другой стороны, участие PpPut4.2 в данной регуляции может быть косвенным. При этом ключевым фактором, запускающим репрессию гена *AOX1* пролином может являться его внутриклеточная концентрация, которая снижается при удалении специфического транспортера данной аминокислоты, кодируемого геном *PpPUT4.2*.

Полученные результаты важны для для оптимизации условий культивирования штаммов *P. pastoris*. Данные дрожжи используются для экспрессии гетерологичных белков, поэтому крайне важен состав биотехнологических сред, в которые входят и аминокислоты. Также эти исследования важны для понимания процессов эволюции регуляторных систем, контролирующих путь метаболизма метанола у метилотрофных дрожжей.

Работа поддержана грантом РФФИ №18-34-00750.

Литература

1. Падкина М.В., Краснопевцева Н.Г., Петрашень М.Г., Кожин С.А., Смирнов М.Н. Генетико-биохимическое изучение КФ дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. I. Характеристика кислых фосфатах разных штаммов // Генетика. 1974. Т. 10. С. 100-110.
2. Румянцев А.М., Падкина М.В., Самбук Е.В. Влияние источника азота на экспрессию генов, контролирующих первые этапы утилизации метанола у дрожжей *Pichia pastoris* // Генетика. 2013. Т. 49. № 4. С. 454.
3. Савинов В.А., Румянцев А.М., Самбук Е.В., Падкина М.В. Создание тест-системы для изучения генетического контроля регуляции гена алкогольоксидазы 1 дрожжей *Pichia pastoris* // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3: Биология. 2009. № 4. С. 114.119.
4. Самсонова М.Г., Падкина М.В., Краснопевцева Н.Г. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. 1975. Т. 11. № 9. С. 104–115.
5. Regenber B., Hansen J. GAP1, a novel selection and counter-selection marker for multiple gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast. 2000. №16. С. 1111-1119.
6. Zhang W. et al. Regulation of Sensing, Transportation, and Catabolism of Nitrogen Sources in *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2018. Т. 82. № 1.