

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОВ МЕТАБОЛИЗМА МЕТАНОЛА У ДРОЖЖЕЙ *PICHIA PASTORIS*

Сидорин А.В., Румянцев А.М.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург,
antonsidorin@list.ru

Метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* являются широко распространенной системой в биотехнологии, поскольку используется для гетерологической экспрессии.

Данные дрожжи могут использовать метиловый спирт в качестве единственного источника углерода. Его метаболизм обеспечивается ферментами, которые кодируются *MUT*-генами. Гены метаболизма метанола у *P. pastoris* репрессируются глюкозой, глицерином и этанолом и активируются метиловым спиртом.

Алкогольоксидаза у *P. pastoris* катализирует первую реакцию утилизации метанола – его окисление до формальдегида с образованием перекиси водорода, которая токсична для клетки. Промотор гена алкогольоксидазы *AOX1* широко используется в биотехнологии при синтеза рекомбинантных белков, в связи с чем его регуляция источниками углерода активно изучается.

Известно, что основным активатором транскрипции гена *AOX1* является Mxr1, который имеет несколько сайтов связывания с промотором. Белок семейства 14-3-3 связывается с белком Mxr, подавляя тем самым его активность. Помимо белка Mxr1, в клетке существуют иные репрессоры, связывающиеся с промотором гена *AOX1* напрямую. Так, например, при росте клеток на среде с глюкозой или глицерином активируется белок Nrg1, подавляющий транскрипцию гена *AOX1*.

В нашей лаборатории впервые было показано, что экспрессия *MUT*-генов у *P. pastoris* влияет наличие ряда аминокислот в среде. Так, если в среде присутствуют глутамат или пролин наблюдается частичная репрессия гена *AOX1*. Дальнейшие исследования показали, что в данной регуляции ключевую роль занимает Тог-киназный комплекс. У эукариот Тог-киназный комплекс регулирует работу множества клеточных систем в ответ на сигналы окружающей среды [3].

Целью данной работы являлось изучение передачи сигналов о наличии аминокислот в среде при регуляции *MUT*-генов.

Для этого получили штаммы, содержащие делеции генов, продукты которых участвуют в Тог-кинажном сигналинге (*Ure2p*, вовлечённый в обеспечении азотной катаболитной репрессии) и в регуляции трансляции – *Gcn1p*. Помимо мишеней Тог-киназного комплекса, изучили роль репрессора промотора *AOX1* на среде с глюкозой или глицерином - белка Nrg1. Исходный штамм содержал в своём геноме репортерную систему, где под контроль

промотора гена *AOX1* был встроен ген кислой фосфатазы (КФ) *PHO5* дрожжей *S. cerevisiae*. [1].

Штаммы $\Delta gcn1$ -4-GS115, $\Delta ure2$ -4-GS115 и $\Delta nrg1$ -4-GS115, имеющие делеции в генах *GCN1*, *URE2* и *NRG1* соответственно, выращивали на средах, содержащие метанол в качестве источника углерода и пролин или сульфат аммония в качестве источников азота. Результаты количественной оценки активности репортерного гена у данных штаммов представлены на рисунке 1.

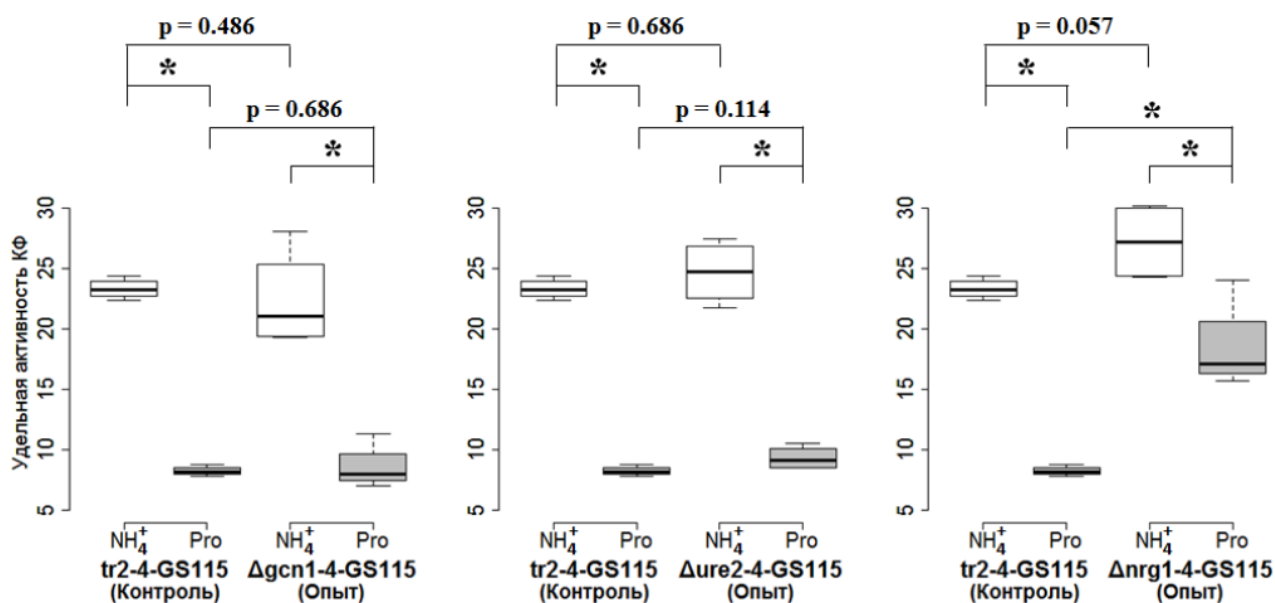


Рисунок 1 - Удельная активность КФ Pho5, секретируемой штаммами дрожжей *P. pastoris* *tr2-4-GS115* (контрольный штамм), $\Delta gcn1$ -4-GS115 (штамм с делецией в гене *GCN1*), $\Delta ure2$ -4-GS115 (штамм с делецией в гене *URE2*) и $\Delta nrg1$ -4-GS115 (штамм с делецией в гене *NRG1*) в средах с метанолом и разными типами источников азота (сульфатом аммония и пролином). * $p < 0.05$.

Делеции генов *URE2* и *GCN1* не привели к изменению регуляции гена *AOX1* пролином. Однако делеция *NRG1* приводит к частичной дерепрессии гена *AOX1* на среде с пролином. Таким образом, можно предположить, что белок Nrg1 участвует в репрессии гена *AOX1* в зависимости как от источника углерода (глицерина и метанола), так и от наличия пролина в среде.

Для грибов вида *Candida albicans* показана непосредственная связь между Тог-киназой и белком Nrg1: активированная Тог-киназа способствует активации экспрессии гена *NRG1* [2]. В связи с этим, возможно, что репрессия *MUT*-генов источниками азота осуществляется через передачу сигнала от Тог-киназы к белку Nrg1.

Путь метаболизма метанола уникален для метилотрофных дрожжей и при этом у *P. pastoris* он оказался под контролем сложной сети регуляторных систем. Полученные результаты важны для изучения координированной регуляции метаболизма основных биогенных элементов и для изучения