

УВЕЛИЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОМОТОРА ГЕНА *SCCUP1* В ДРОЖЖАХ *PICHA PASTORIS* ПРИ СВЕРХПРОДУКЦИИ СОБСТВЕННОГО АКТИВАТОРА ТРАНСКРИПЦИИ *ACE1P*

Цыганков М.А., Падкина М.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург,
mial.tsygankov@yandex.ru
mpadkina@mail.ru

Дрожжи *Pichia pastoris* представляют собой удобную систему экспрессии гетерологичных генов. Особенности *P. pastoris* являются простота культивирования, разработанные методики генетических манипуляций, сильные, сравнимые с бактериальными промоторы. От прокариотических систем экспрессии *P. pastoris* выгодно отличает наличие ферментов посттрансляционных модификаций эукариотических белков, что способствует высокой вероятности их успешного синтеза и правильного фолдинга [4].

Несмотря на наличие широко используемого сильного индуцируемого метанолом промотора гена алкогольоксидазы-1 (*PAOX1*), поиск промоторов с различной активностью и способом регуляции является актуальной задачей [6].

На основе промотора гена *ScCUP1* (*PCUP1*) была создана конструкция для гетерологической экспрессии генов в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* [5]. Белок Cup1p – металлотионин. Металлотионеины – цистеин-богатые консервативные белки, представленные во всех эукариотах, одной из основной функцией которых является связывание ионов металлов внутри клетки [2]. Промотор *PCUP1* реагирует на повышенные уровни ионов меди (II). Было выявлено, что транскрипционный фактор (ТФ) Ace1p регулирует экспрессию гена *ScCUP1* [3]. Обнаружено, что промотор гена *ScCUP1* работает также в дрожжах *P. pastoris* [7]. Данные о функционировании ТФ Ace1p *S. cerevisiae* в дрожжах *P. pastoris* в литературе отсутствуют.

Нашей первой задачей было оценить влияние сверхпродукции ТФ Ace1p на активность промотора *PCUP1* в дрожжах *P. pastoris* в случае, когда ген ТФ клонирован под промотором *PAOX1*. При обнаружении положительного влияния на активность промотора *PCUP1* нашей следующей задачей было оценить эффект от сверхпродукции ТФ Ace1p в ситуации, когда его структурный ген клонирован под контролем того же промотора (*PCUP1*), на который он и оказывает свое позитивное воздействие (см. рис 1). Мы ожидали, что образование положительной обратной связи в данной системе могло бы увеличить активность изучаемого промотора.

В качестве репортерной системы, позволяющей оценить активность промотора, использовали структурный ген репрессибельной кислой фосфатазы (КФ, ген *PNO5*) дрожжей *S. cerevisiae* в составе плазмиды pPIC9 (Invitrogen) [1]. В качестве исходного использовался штамм GS115 (Invitrogen). Нами был

получен штамм дрожжей, в котором ген *PHO5* находится под контролем промотора *PCUP1* (GS-PCUP1-PHO5). Для получения штаммов GS-PCUP1-PHO5/PAOX1-ACE1 и GS-PCUP1-PHO5/PCUP1-ACE1, где помимо репортерной системы (PCUP1-PHO5) присутствует ген *ScACE1*, который находится под контролем промотора *PAOX1* или *PCUP1*, штамм GS-PCUP1-PHO5 был трансформирован плазмидой на основе вектора pPICZαA (Invitrogen), в которой ген *ScACE1* находится под контролем промотора *PAOX1* или промотора *PCUP1*.

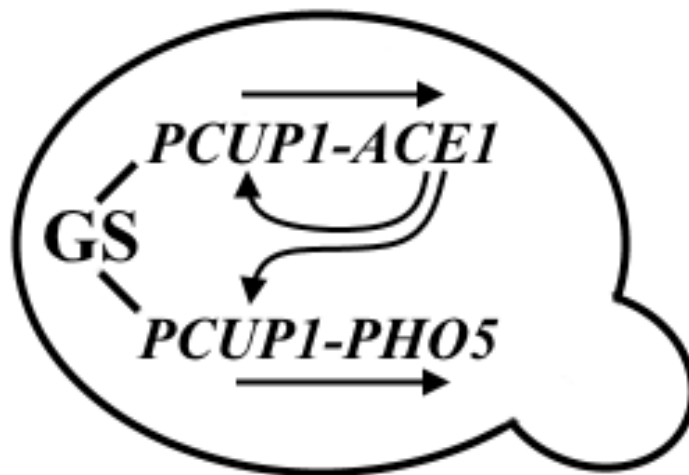


Рисунок 1 – Схема возможного участия ТФ Ace1p в регуляции экспрессии собственного структурного гена *ACE1* и репортерного гена *PHO5*, находящихся под контролем промотора *PCUP1*.

Штамм GS-PCUP1-PHO5/PAOX1-ACE1 позволил в условиях индукции промотора *PAOX1* оценить влияние сверхэкспрессии гена ТФ Ace1p на активность промотора *PCUP1*. Штаммы выращивали трое суток в среде, содержащей дрожжевой экстракт, пептон и метанол в качестве основного источника углерода и индуцирующего агента промотора *PAOX1*. Для индукции промотора *PCUP1* добавляли сульфат меди (II) до концентрации 10 мМ. Измеряли удельную (отнесенную к оптической плотности клеточной суспензии) активность КФ в суспензии клеток дрожжей в культуральной жидкости. Данные сведены на рисунке 2.

Измерения показали, что сверхэкспрессия гена *ScACE1* под контролем промотора *PAOX1* повышала активность промотора *PCUP1* со вторых суток измерений более чем в 4 раза. Из этого можно сделать вывод, что ТФ Ace1p из дрожжей *S. cerevisiae* работает в качестве положительного ТФ и в дрожжах *P. pastoris*.

Сопоставимое увеличение активности промотора *PCUP1* было выявлено в штамме GS-PCUP1-PHO5/PCUP1-ACE1.

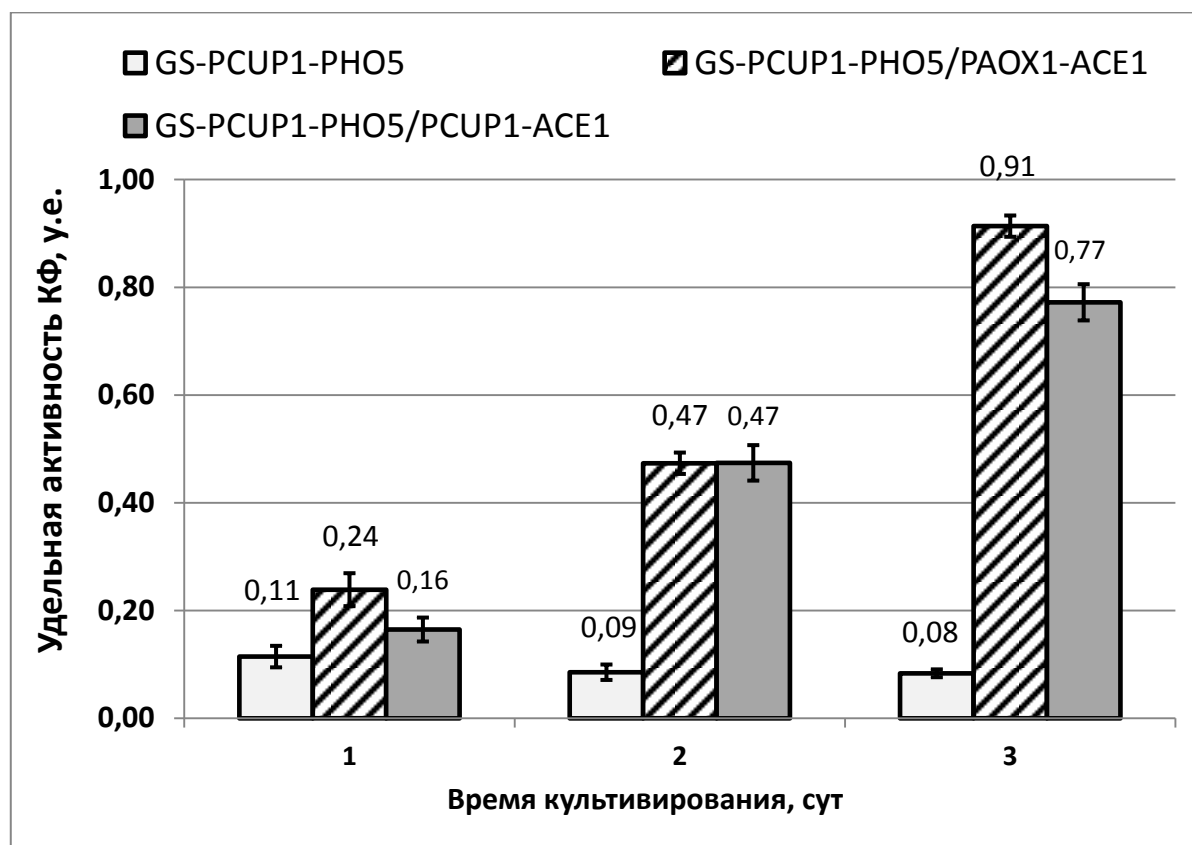


Рисунок 2 – Активность КФ штаммов GS-PCUP1-PHO5, GS-PCUP1-PHO5/PCUP1-ACE1 и GS-PCUP1-PHO5/PAOX1-ACE1 при росте на среде с метанолом.

На основании изложенного можно сделать вывод, что сверхэкспрессию транскрипционных факторов можно использовать в качестве подхода для повышения активности регулируемых ими промоторов. Эффект от предложенного нами подхода – клонирование позитивного ТФ под контролем промотора регулируемого им гена (рис 1) – сопоставим с эффектом от экспрессии позитивного ТФ под таким сильным промотором как *PAOX1*.

Литература

1. 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. Vol. 3, № 4. 2009. С. 114-119.
2. Coyle P., Philcox J.C., Carey L.C., Rofe A.M. Metallothionein: the multipurpose protein // Cell Mol Life Sci. 2002. Vol. 59, № 4. P. 627-647.
3. Koller A., Valesco J., Subramani S. The *CUP1* promoter of *Saccharomyces cerevisiae* is inducible by copper in *Pichia pastoris* // Yeast. 2000. Vol. 16, № 7. P. 651-656.
4. Macauley-Patrick S., Fazenda M.L., McNeil B., Harvey L.M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system // Yeast. 2005. Vol. 22, №4. P. 249-270.

5. Mascorro-Gallardo J.O., Covarrubias A.A., Gaxiola R. Construction of a *CUP1* promoter-based vector to modulate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* // Gene. 1996. Vol. 172, № 1. P. 169-170.

6. Prielhofer R., Maurer M., Klein J., Wenger J., Kiziak C., Gasser B., Mattanovich D. Induction without methanol: novel regulated promoters enable high-level expression in *Pichia pastoris* // Microb Cell Fact. 2013. Vol. 24, № 12. P. 5.

7. Thiele D.J. *ACE1* regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene // Mol Cell Biol. 1988. Vol. 8, № 7. P. 2745-2752.

8. Wang J., Wang X., Shi L., Qi F., Zhang P., Zhang Y. Zhou X., Song Z., Cai M. Methanol-Independent Protein Expression by *AOX1* Promoter with trans-Acting Elements Engineering and Glucose-Glycerol-Shift Induction in *Pichia pastoris* // Sci Rep. 2017. Vol.7. Article number 41850.