

НОВИЙ ПІДХІД ДО ВИВЧАННЯ ДЕГРАДАЦІЇ БІЛКІВ *KOMAGATAELLA PHAFFII*

Зазуля А.З.

Львівський національний університет імені Івана Франка

Наукові керівники – Гнатуш С.О., кандидат біологічних наук, професор, завідувачка кафедри мікробіології Львівський національний університет імені Івана Франка
Семків М.В., кандидат біологічних наук, науковий співробітник
відділу молекулярної генетики та біотехнології Інститут біології клітини НАН України

Метилотрофні дріжджі *Komagataella phaffii* вважають одними із найефективніших продуцентів рекомбінантних білків промислового значення, зокрема, інсуліну, поверхневого антигену вірусу гепатиту В, інтерферонів, ферментів алкогольоксидази, нітрилази тощо [Gellisen, 2002; Krasovska et al., 2008, 2013; Grabek-Lejko D., 2013]. Запорукою створення штамів-продуцентів білків промислового значення є максимальне зниження рівня деградації цих білків у цитозолі. Однак механізми деградації власних цитозольних білків, а також рекомбінантних чужорідних білків біотехнологічного значення з цитозольною локалізацією у метилотрофних дріжджів залишаються нез'ясованими. Гомеостаз у клітинах усіх живих організмів підтримується за рахунок балансу між процесами синтезу та деградації компонентів клітини. Основними шляхами деградації клітинних компонентів є протеосомна деградація та автофагія. Автофагія – це універсальний процес, притаманний для всіх еукаріот. Дисфункція автофагії може спричиняти рак, нейродегенеративні захворювання, мікробні інфекції і пришвидшене старіння. Тому стимуляція автофагії може бути ефективним підходом до лікування метаболічних та нейродегенеративних захворювань [Pierzynowska K et al., 2018, 2019].

Метою нашої роботи було розробити систему селекції рекомбінантних штамів дріжджів *K. phaffii* з пошкодженою деградацією цитозольних білків на моделі гетерологічного фермента β -галактозидази, для якого існують зручні методи аналізу. Така система селекції дозволить проводити інсерційний мутагенез з наступним візуальним скринінгом мутантів з пошкодженим процесом автофагії для подальшого їх вивчення. Метод інерційного мутагенезу полягає в отриманні мутацій шляхом інтеграції інсерційної касети в геном організма-реципієнта, що призводить до зміни або блокування експресії певного гена. Такий метод забезпечує можливість ідентифікації пошкодженого гена [Dmytruk K. V, 2006]. Отримані на *K. phaffii* результати можна буде екстраполювати на вищі організми, оскільки процес автофагії є еволюційно консервативним. Зокрема, ми плануємо здійснити пошук у геномі людини генів, гомологічних до ідентифікованих у дріжджах, та дослідити функції цих генів на модельних клітинних лініях, створених для вивчення ефективності автофагії.

У роботі використали мікробіологічні (культивування, мікроскопування), біохімічні (визначення активності ферменту за допомогою хромогенного субстрату о-нітрофеніл- β -D-галактопіранозиду (ОНФГ) та 5-бромо-4-хлоро-3-індоліл- β -D-галактозиду (X-Gal), визначення концентрації білка за Лоурі), молекулярної біології (виділення геномної та плазмідної ДНК з клітин дріжджів та *Escherichia coli*, постановка ПЛР), генетичної інженерії (отримання рекомбінантних молекул ДНК за методом Гібсона), математичні (статистична обробка результатів) методи.

Було сконструйовано вектор, у якому ген *LAC4 Kluyveromyces lactis* VKM Y-1535, що кодує β -галактозидазу [Hamilton S. R., 2003], злитий з флуоресцентною міткою GFP, було експресовано під контролем індукованого метанолом промотора гена формальдегіддегідрогенази (*prFLD1_Kp*). Селективним маркером був ген *HIS4*, який відновлює прототрофічність по гістидину. Отриманий вектор було лінеаризовано ендонуклеазою рестрикції Sac I та використано для трансформації штамів дріжджів *K. phaffii* GS200 *his4arg4* [Selvarasu S., 2009] та *K. phaffii* SMD1163 *his4pep4prb1* з дефектом процесу автофагії (інактивовані протеїназа А та протеїназа В) [Anthony C., 1982]. Отримано 6 рекомбінантних штамів *K. phaffii* SMD1163/LAC та 3 рекомбінантні штами *K. phaffii* GS200/LAC. Усі отримані рекомбінантні штами здатні накопичувати мічену GFP β -галактозидазу під час росту на метанолі, а після перенесення клітин на глюкозу відбувалася деградація цього білка. Після оцінки активності β -галактозидази у трансформантів *K. phaffii* GS200/LAC і *K. phaffii* SMD1163/LAC, вирощених на метанолі, за допомогою хромогенного субстрату X-Gal було відібрано 2 рекомбінантні штами для подальшої роботи. У них було виявлено наявність флуоресцентної мітки GFP за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Було встановлено, що інактивація β -галактозидази в клітинах, перенесених з метанолу на глюкозу, відбувається повільніше у трансформантів *K. phaffii* SMD1163/LAC_1 порівняно з *K. phaffii* GS200/LAC_4. На 24 год після перенесення клітин з метанолу на глюкозу, залишковий рівень β -галактозидази в *K. phaffii* GS200/LAC_4 становив близько 10%, тоді як у *K. phaffii* SMD1163/LAC_4 (з дефектом процесу автофагії) зберігав близько 73% початкової активності β -галактозидази (рис. 1). Початкова активність β -галактозидази у відповідного штаму з експресією гену *LAC4* на 24 год у середовищі з 1% метанолом приймалась за 100%. Отже, β -галактозидаза інактивується шляхом деградації, що відбувається у вакуолях, тобто за допомогою механізму автофагії.

Було проведено інсерційний мутагенез *K. phaffii* GS200/LAC_4 з використанням BamHI-лінеаризованої плазмиди pPICZ-B (отриманої від Nova lifetech Inc) як інсерційної касети. Трансформанти відбирали на агаризованому середовищі YPD з додаванням зеоцину (150 мг/л). Аналогічно до попереднього етапу роботи у трансформантів, що містили плазмиду pPICZ-B було визначено активність β -галактозидази за допомогою хромогенного субстрату X-Gal (рис. 2).

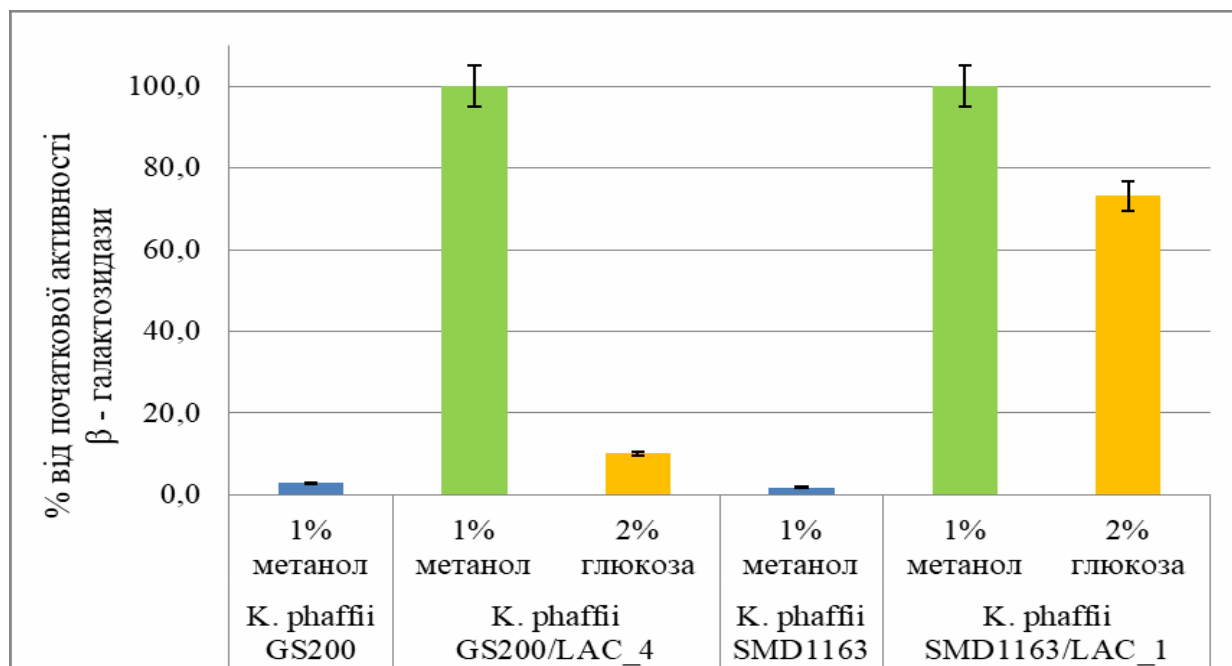


Рис. 1. Відносна активність β-галактозидази на 24 год після перенесення клітин *K. phaffii* GS200/LAC_4 і *K. phaffii* SMD1163/LAC_1 з 1% метанолу на глюкозу. *K. phaffii* GS200, *K. phaffii* SMD1163 – вихідні штами

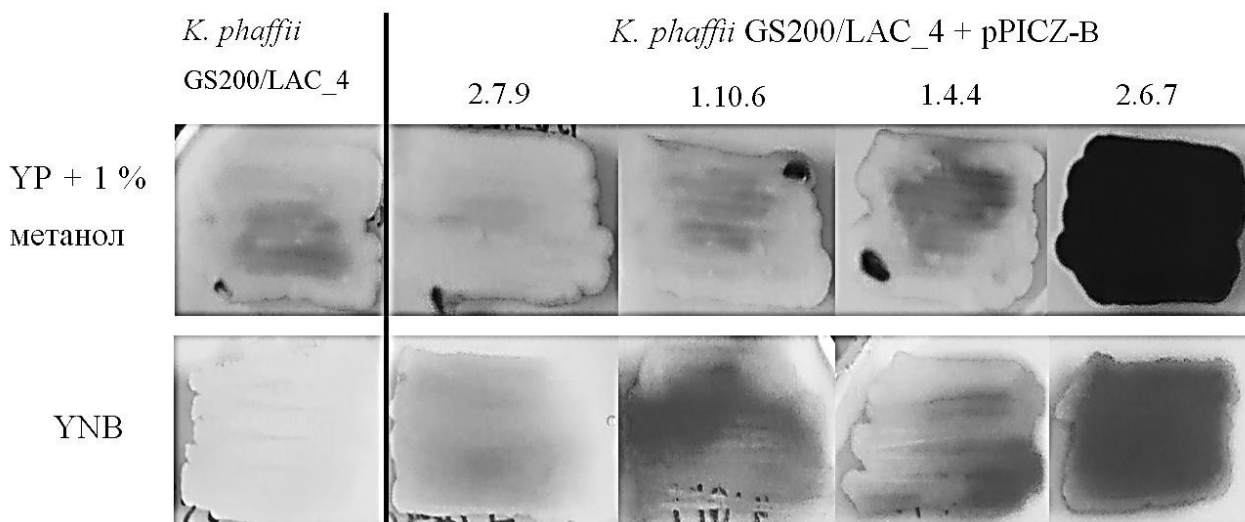


Рис. 2. Оцінка активності β-галактозидази у *K. phaffii* GS200/LAC_4 і інсерційних мутантів *K. phaffii* GS200/LAC_4 + pPICZ-B, вирощених на метанолі, а потім перенесених на глюкозу, за допомогою хромогенного субстрату X-Gal

Один із отриманих трансформантів *K. phaffii* GS200/LAC_4 + pPICZ-B 2.6.7, який візуально демонстрував найвищу залишкову активність β-галактозидази, перевірили на швидкість інактивації β-галактозидази після

перенесення клітин з рідкого середовища з 1% метанолом у рідке середовище з 10% глюкози. Відносна активність β -галактозидази у *K. phaffii* GS200/LAC_4 + pPICZ-B 2.6.7 на 24 годину становила 55%, що у 2 рази більше, ніж у вихідного штаму *K. phaffii* GS200/LAC_4. Це свідчить про можливі порушення процесу автофагії у цього штаму дріжджів (рис. 3).

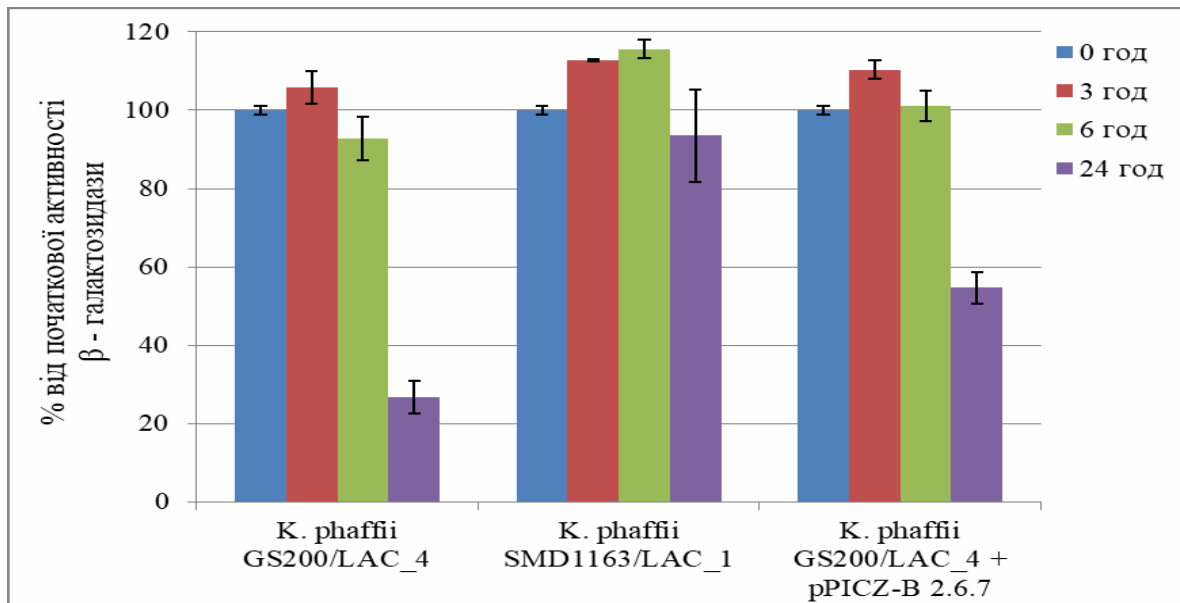


Рис. 3. Відносна активність β -галактозидази на 24 год після перенесення клітин *K. phaffii* GS200/LAC_4, *K. phaffii* SMD1163/LAC_1 та *K. phaffii* GS200/LAC_4+ pPICZ-B 2.6.7 з 1% метанолу на 10% глюкозу

У подальших наших роботах буде встановлено сайт інсерції касети у штаму *K. phaffii* GS200/LAC_4 + pPICZ-B 2.6.7 і, таким чином, ідентифіковано ген, який може мати вплив на процес автофагійної деградації цитозольних білків у *K. phaffii*.