

**Heterológ fehérjék expressziójára alkalmas rendszer  
fejlesztése**

című doktori értekezés tézisei

Készítette: Szamecz Béla

Témavezető: Dr. Dorgai László

Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány

Biotechnológiai Intézete

Szeged, 2005

## Bevezetés

A biotechnológia egyik fontos területe a valamilyen szempontból fontos és hasznos peptidek és fehérjék előállítás. Számos esetben ezek az eredeti előfordulási helyükről gazdaságosan nem izolálhatók, esetleg törvényességi és/vagy etikai okok is tilthatják ezt. Más esetekben a természetben elő sem fordulnak, lévén a molekuláris biológia eszközeivel előállított variánsai vagy részletei egy természetes fehérjének.

A fenti problémára kínálnak megoldást az expressziós rendszerek. Egy ilyen rendszer, a kiválasztott expressziós gazda természetes fehérje szintetizáló apparátusát használva, a megfelelő módon bejuttatott DNS fragmentben tárolt genetikai információ alapján elméletileg tetszőleges fehérje termelésére képes. A legfontosabb fehérje termelést meghatározó tényező a gazdaszervezet. Ma már nagyon széles skálán mozog ezek választható köre: lehet az prokarióta, egyszerű vagy fejlett magasabbrendű szervezet (pl. élesztő, növény vagy emlős), szövettenyészet vagy akár *in vitro* translációs rendszer is.

Az ismert expressziós gazdák közül számos szempontból kiemelkedő tulajdonságokkal rendelkeznek az élesztők. Kezelhetőségük a bakteriális rendszerekkel összemérhetően egyszerű és olcsó. Használatukat a társadalom is könnyebben elfogadja, tekintettel több ezer éves élelmiszeripari felhasználásukra. Az élesztők közül kitüntetett fontosságúak a metilotrófok (pl.

a *Pichia pastoris*), melyek ipari célú alkalmazását az egyszerű kezelhetőségen felül számos további előnyös tulajdonságuk indokolja:

- A metanollal indukálható alkohol oxidáz promóter, azon túl, hogy gyors és egyszerű szabályzást tesz lehetővé, indukció hatására rendkívül magas transzkripciós aktivitást eredményez;
- Szekréciós szignálok alkalmazásával a sejt a tenyésztőközegbe juttathatja a termelt proteint, így a termékkinyerés hatékony, mivel lehetőség van alacsony fehérje tartalmú táptalajok használatára, miközben a sejt kevés natív proteinjét szekretálja;
- A fentiek eredményeként magas termékkoncentráció érhető el a sejten belül, vagy azon kívül, ami a tenyésztőközeg egy literére vonatkoztatva néhány gramm is lehet;
- A *Saccharomyces cerevisiae*-vel szemben a glikozilációs folyamatok bizonyos szempontból közelebb állnak a magasabb rendű eukariótákhoz, így elkerülhető, hogy az eltérő glikoziláció miatt a fehérjék funkciója csökkenjen, illetve az a felhasználás során immunreakciót váltson ki;
- Köszönhetően a megfelelő poszttranszlációs érési folyamatoknak, számos bonyolult módosítást igénylő polipeptid esetében is aktív formában nyerhető ki a termelt protein;
- A fermentációs sémák léptéknövelése általában könnyen kivitelezhető, az termelés optimalizálásának módszerei ismertek;

## Célkitűzés

- Nincs szükség más magasabbrendűeknél alkalmazott drága és komplex tápközegre;

Az élesztő expressziós rendszereknek is legfontosabb eleme a kódoló DNS szakasz klónozását, az adott fehérje expresszióját, esetenként szekréciját és az expresszáló organizmus genomjában történő stabil fennmaradást biztosító vektor molekula. Ehhez különböző genetikai szignálok és a molekuláris biológia gyakorlatát megkönnyítő szekvenciaelemek szükségesek. Azaz a vektornak a termeltetni kívánt fehérjét kódoló struktúrgénen felül az egyik legfontosabb elemként hordoznia kell az átírás iniciációjáért felelős, tőle 5' irányban elhelyezkedő promóter régiót. A genetikai manipuláció feltétele egy olyan marker jelenléte a vektormolekulán, aminek segítségével meg lehet különböztetni a vektort tartalmazó sejteket a vektor nélküliektől. Szükség van a vektor hatékony fenntartását (integráció/autonóm replikáció) biztosító genetikai elemekre is. Az élesztő vektorok rendszerint úgynevezett *shuttle* vektorok, azaz bakteriális elemeket is tartalmaznak (replikációs origó, antibiotikum rezisztencia), mivel a DNS konstrukció elkészítése, *in vitro* manipulációja *E. coli*-ban történik.

A Bay Zoltán Biotechnológiai Intézet működésének egyik célja a gazdasági élet szereplői számára végzett, a gyakorlatban közvetlenül hasznosítható eredményre vezető kutatás-fejlesztés. Ezen belül gyakran merül fel olyan feladat, melynek során egy növényi, állati vagy humán eredetű fehérjét vagy azok bizonyos részeit kell nagy mennyiségben, aktív formában előállítani. Erre valamilyen általánosan elterjedt vagy jogi oltalom alatt álló expressziós rendszer használható. A prokarióta rendszerek szakmai korlátai használhatóságukat erősen limitálja. A jogilag védett, magasabbrendű rendszerek használata ezt a hátrányt kiküszöböli, de jelentősen növeli a munka költségét. Ezért célul tűztük ki egy gyakorlatban is használható, élesztő gazdára alapozott expressziós rendszer kifejlesztését, ami rendelkezik a metilotróf élesztők ismert előnyeivel, de a rendszer minden eleme saját fejlesztésű, ezért használata jogi korlátokba nem ütközik.

A fejlesztés egy, a célnak megfelelő élesztő törzs kiválasztását, az expressziós vektorokban használható promóter(ek) izolálását és karakterizálását, a vektor stabil fennmaradásának biztosítását, szelekcióra alkalmas markergének alkalmazását, és a heterológ kódoló szekvenciák könnyű inzertálására alkalmas plazmidok konstruálását igényli. A tézisek a fenti célok elérését célzó munkám legfontosabb eredményeit tartalmazzák.

## Alkalmazott módszerek

A standard mikrobiológiai és molekuláris biológiai módszereken túl, a következő módszereket használtuk kísérleteink során:

- rDNS analízis során genomi, rRNS-t kódoló fragmenteket izoláltunk *touchdown* PCR reakcióban, majd a nukleotidsorrend meghatározása után vizsgáltuk azok hasonlóságának mértékét az adatbankokban található rokon szekvenciákkal.
- degenerált és génspecifikus oligonukleotidokat használtunk standard és egyoldali PCR reakciókban a vizsgált gének izolálására.
- a promóter aktivitását saját rendszerben a képződő mRNS RT-PCR reakcióban való kvalitatív és félkvantitatív kimutatásával követtük.
- heterológ rendszerben (*Pichia pastoris*) a promóterek aktivitását a transzkripciós fúziókról termelődő  $\beta$ -galaktozidáz aktivitásának mérésével követtük.
- peroxidáz-kapcsolt reakcióban detektáltuk az alkohol oxidáz aktivitást.
- genomi könyvtárat készítettünk a *Pichia sp.* 159 törzs részlegesen emésztett DNS-ének felhasználásával, amely alkalmas volt ARS funkciójú genomi fragmentek szelekciójára.
- mértük a generációnkénti plazmidvesztést az élesztősejtekben.

## Eredmények és diszkusszió

- Izoláltuk a három rendelkezésünkre álló élesztőtörzs egy-egy rRNS-t kódoló genomi fragmentjét, majd ezek nukleotidsorrendjét megállapítottuk.
- A szekvenciákat adatbanki adatokkal összehasonlítva megállapítottuk a törzsek rendszertani helyét. Az eredmény megerősítette a két *Candida boidinii* törzs korábbi, hagyományos módszerekkel végzett rendszertani besorolását, míg a harmadik izolátumot a *Pichia* genusba sorolhattuk.
- A promóterek izolálása felé tett első lépésként ismert alkohol oxidáz szekvenciák alapján tervezett degenerált primereket használva amplifikáltuk a törzsek alkohol oxidázt kódoló genomi szakaszait, a két *Candida* törzsből 1-1 gént (*AOX673* és *AOX680*), míg a *Pichia* törzsből kettőt (*AOXA* és *AOXB*) azonosítottunk.
- Az rDNS és az *AOX* szekvenciák analízise alapján a *Pichia sp.* 159 törzset választottuk ki a további munkára.
- Az ismert szekvenciák alapján tervezett specifikus primerekkel, egyoldali PCR reakciókban izoláltuk a *Pichia sp.* 159 törzs mindkét alkohol oxidáz génjének 5' és 3' oldali nem-kódoló régióit, melyekről feltételezhető volt, hogy hordozzák a génműködéshez szükséges összes szabályzó elemet.
- Vizsgáltuk a promóterek működését saját rendszerben különböző szénforrások jelenlétében, illetve tápanyagmegvonás hatására. Ennek során RT-PCR amplifikációval detektáltuk az *AOXA* és *AOXB* génekről

képződött mRNS-t, és párhuzamosan kimutattuk az enzimaktivitás jelenlétét is. Megállapítottuk, hogy mindkét promóter indukálható metanollal. A glükóz mindkét gént represszálja, az *AOXA* gén esetében azonban glükóz jelenlétében is kimutatható volt egy alacsony szintű expresszió.

- Ez utóbbi eset kivételével az *AOXB* promóter aktivitása minden vizsgált esetben nagyobb volt, mint az *AOXA*-é, pl. egy belső kontrollhoz viszonyított félkvantitatív mérésorozatban az *AOXA*-nál háromszor több *AOXB*-specifikus mRNS-t mutattunk ki 0.5% metanol-indukció hatására.
- A metanol-indukció időfüggő hatásának vizsgálatakor is az *AOXB* termék volt a domináns, az *AOXA* elsődleges géntermék csak egy óra késéssel volt kimutatható.
- A mannitol gyenge indukálószernek bizonyult, míg a glicerol, gyengén hasznosítható szénforrásként, az éhezéssel közel megegyező hatással volt a promóterek aktivitására. Az éhezés mindkét gén tranziens indukcióját eredményezte.
- Elkészítettünk expressziós vektorokat, amelyekben az expressziós kazetta a lacZ ríprtergént tartalmazta a vizsgált promóterek irányítása alatt. A vektorok tartalmaztak továbbá egy genomi replikációs origót, amelyet a *Pichia* törzs genomi könyvtárából azonosítottunk. Szelekciós markerként a domináns Zeocin rezisztencia marker volt jelen a vektoron, illetve a *Pichia* 159 törzsből izolált *HIS4* gén is ezt a célt szolgálta.

- Az expressziós vektorok segítségével megvizsgáltuk a promóterek működését egy heterológ fajban is. Az *AOXB* promóter működése *Pichia pastoris*-ban alapvetően reprodukálta a saját rendszerben mért tulajdonságokat: a metanol erős, a *P. pastoris* saját *AOXI* promóterével összemérhető indukciót eredményezett, míg a glükóz ezt az aktivitást represszálta. Az éhezés *AOXB* indukáló hatása a heterológ gazdában szintén megfigyelhető volt.
- Az *AOXB* promóterrel szemben az *AOXA* promóterrel csak alacsony szintű transzkripciót tudunk detektálni, ami nem változott a vizsgált szénforrások hatására, feltételezésünk szerint a promóter szabályozó elemei és a heterológ gazda szabályozó apparátusának inkompatibilitása miatt.
- A heterológ expresszióval az expressziós vektor replikációt és szelekciót biztosító elemeinek működőképességét is bizonyítottuk.
- Eredményeink elegendő információt szolgáltatnak a promóterek működéséről a gyakorlati célú felhasználáshoz.

## Summary

During the project described in the thesis, I have been working toward the development of an expression system that fulfils the requirements of practical applications. Besides being easy to handle and cost-effective, the methylotrophic yeast-based expression systems have several other advantages: the expression from the alcohol oxidase promoter can be strictly controlled, a high level of protein overproduction can be achieved, and the post-translational pathways are able to process the proteins properly.

As the first specific aim, we searched for a methylotrophic yeast to be used as the host organism of an expression system. As the next step, we planned to isolate the alcohol oxidase promoter and determine the conditions of its inducibility and repressibility. Our final specific aim was to develop a model expression vector having a reporter gene under the transcriptional control of the alcohol oxidase promoter and the elements confirming stability and selectability.

Three methylotrophic yeast isolates were investigated. For molecular characterization, their 28S-ITS2-5.8S rDNA segments were isolated and sequenced. Sequence comparisons confirmed the initial classifications by conventional methods: two isolates were *Candida boidinii* strains, and the third belonged in the *Pichia* genus.

As the first step toward the isolation of the alcohol oxidase promoters, we isolated four genomic segments coding for alcohol oxidases: one from each

*Candida boidinii* strain (AOX673 and AOX680) and two from *Pichia* sp. 159 (AOXA and AOXB).

We isolated the 5' and 3' non-coding regions of both *Pichia* sp. 159 AOX genes, which presumably carry all the regulatory elements necessary for the proper function.

The activities of the promoters were followed in the presence of various carbon sources and during starvation, by detecting the specific mRNAs transcribed from AOXA and AOXB, in RT-PCR reactions. In parallel, the enzyme activity was detected. We found that both promoters can be induced with methanol. Glucose strongly repressed the expressions from both promoters, but not to the same extent; a low level of AOXA, but not AOXB-specific expression was detected in the presence of glucose. With the exception of this last finding, the activity of the AOXB promoter was in all experiments higher than that of AOXA: for example, the level of the AOXB-specific mRNA was three times higher than that of the AOXA mRNA in cultures induced with 0.5% methanol, as measured by semi-quantitative RT-PCR. In a time-course experiment, the AOXB-specific message was detected after 1 hour of methanol induction, while the AOXA mRNA level reached the detection threshold 1 hour later. Mannitol and glycerol proved to be weak inducers. Starvation resulted in the transient induction of both promoters. Since glycerol is a poorly metabolizable carbon source, its effect on the promoters could be similar to that of starvation.

Model expression vectors were constructed in which the expression cassette contained the lacZ reporter gene under the control of the *AOXA* or *AOXB* promoters. The vectors also contained a genomic replication origin that was selected from a genomic library of the *Pichia sp.* 159 strain. The vectors had either the dominant Zeocin resistance marker or the *HIS4* gene isolated from *Pichia sp.* 159 as a selection element.

The model expression vectors were used to test the functionality of the AOX promoters in a heterologous species. In *Pichia pastoris*, the *AOXB* promoter functioned similarly as in *Pichia sp.* 159: methanol resulted in a strong induction, with a level comparable to that of the *AOX1* promoter of *P. pastoris*, while glucose repressed this activity. Starvation also induced the *AOXB* promoter in this host. In contrast, only a very low level of transcription was detected from the *AOXA* promoter, which did not vary after change of the carbon source. The regulatory elements of this promoter are presumably not compatible with the transcription regulatory apparatus of the heterologous expression host. These experiments confirmed the functionality of the replication and selection elements of the vector.

Our results have provided data concerning the activities of the promoters under different circumstances, and furnish a solid foundation for practical applications.

## Tudományos közlemények

**Szamecz B**, Urbán G, Rubiera R, Kucsera J, Dorgai L. 2005. Identification of four alcohol oxidases from methylotrophic yeasts. *Yeast* 22: 669-676

Urbán G, **Szamecz B**, Dorgai L. 2005. Identification of an autonomously replicating element from *Pichia sp.* 159. kézirat

Nielsen KH, **Szamecz B**, Valasek L, Jivotovskaya A, Shin BS, Hinnebusch AG. 2004. Functions of eIF3 downstream of 48S assembly impact AUG recognition and GCN4 translational control. *EMBO J.* 23: 1166-1177

Valasek L, Mathew AA, Shin BS, Nielsen KH, **Szamecz B**, Hinnebusch AG. 2003. The yeast eIF3 subunits TIF32/a, NIP1/c, and eIF5 make critical connections with the 40S ribosome in vivo. *Genes Dev* 17: 786-799.

## Előadások

**Szamecz Béla**, Dr Dorgai László (témavezető). Kísérletek fehérje-expresszióra alkalmas rendszer kidolgozására élesztőben  
*XXIV OTDK Természettudományi Szekció, Mikrobiológia I tagozat*,  
II. helyezés, Debrecen, 1999. április

Klaus H. Nielsen, **Béla Szamecz**, Antonia Jitovovskaya, Leos Valasek, Alan G. Hinnebusch: In vivo evidence for critical functions of eIF3 in ribosomal scanning that impact GCN4 translational control  
*Translational Control Meeting* Cold Spring Harbor, New York,  
U.S.A. September 2002

## Köszönetnyilvánítás

Klaus H. Nielsen, **Béla Szamecz**, Antonina Jivotovskaya, Leos Valasek, Alan G. Hinnebusch: *In vivo* evidence that translation initiation factor 3 functions in ribosomal scanning and *GCN4* translational control  
*XXIth International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology*, Göteborg, Sweden July 2003

László Dorgai, **Béla Szamecz**, Gabriella Urbán: Development of an expression system based on a newly isolated methylotrophic yeast  
*1<sup>st</sup> Central European Forum for Microbiology (CEFOM) and the Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology* Keszthely, 2005. október

### Poszterek

**Béla Szamecz**, Gabriella Urbán, László Dorgai: Isolation and analysis of *His4*, a potential selection marker in a *Pichia* sp.  
*1<sup>st</sup> Central European Forum for Microbiology (CEFOM) and the Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology* Keszthely, 2005. október

Gabriella Urbán, **Béla Szamecz**, László Dorgai: Identification and characterization of an autonomously replicating element from a *Pichia* sp.  
*1<sup>st</sup> Central European Forum for Microbiology (CEFOM) and the Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology* Keszthely, 2005. október

Ezúton szeretnék köszönetet mondani

témavezetőmnek, Dr. Dorgai Lászlónak, hogy hasznos tanácsaival irányította kutatásaimat és elősegítette szakmai fejlődésemet, karrierem építését;

munkatársamnak, Urbán Gabriellának, aki eredményes munkájával segítette doktori dolgozatom elkészítését;

Bálint Arankának és Vörös Andreának, akiknek a mindennapi segítségére és értékes munkájára mindig számíthattam;

Dr. Kesserű Péternek és Szvetnik Attilának, akik hozzáértő kritikájukkal sokat segítettek dolgozatom megírásában;

a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszékéről Dr. Kucsera Juditnak, aki mindig készségesen segített megválaszolni kérdéseinket;

Dr. Kálmán Miklósnak, Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Intézetének igazgatójának, hogy a kutatásaimhoz szükséges feltételeket biztosította;

Dr. Klaus H. Nielsen-nek, Dr. Alan G. Hinnebusch-nak és Dr. Leoš Valašek-nek, akiktől sokat tanultam az élesztőkről, illetve akik révén kutathattam a transzlációs apparátus működését.