

Μοριακή κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση ανθρώπινης ΕΡΟ σε *Pichia pastoris*



Τσομακίδης Π., Σοφία Χ., Κερασούλα Κ., Μαρία Τ., Ραφαήλ Σ.

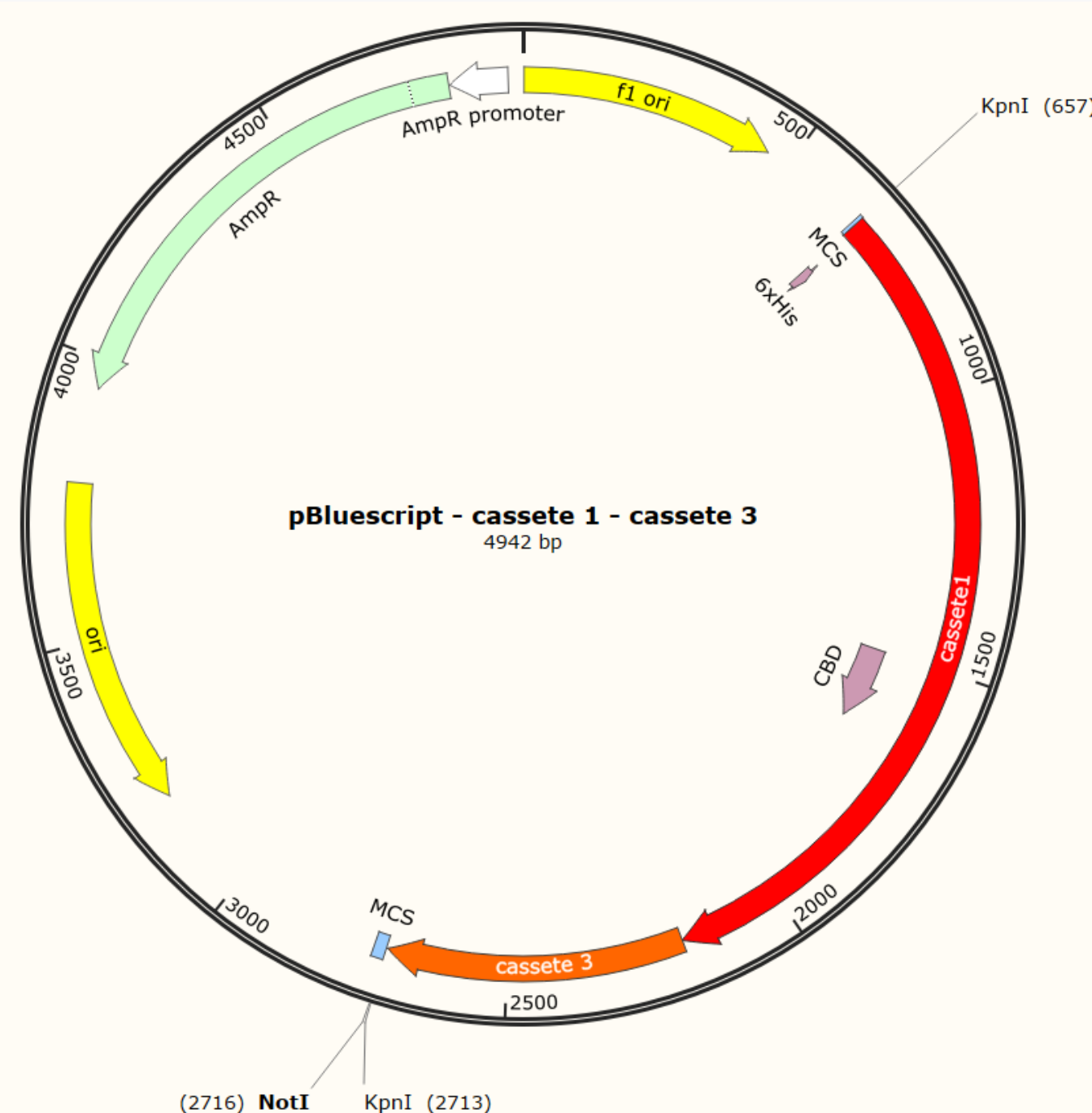
Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Αλεξανδρούπολη 2021

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το 1982 η κλωνοποίηση και παραγωγή της ανθρώπινης ινσουλίνης αποτέλεσε το πρώτο βιοτεχνολογικό φάρμακο που εγκρίθηκε για χορήγηση σε ασθενείς με διαβήτη¹. Έκτοτε έρευνες κλωνοποίησης κι άλλων ανθρώπινων γονιδίων έχουν αναπτυχθεί ραγδαία. Τα πιο διαδεδομένα συστήματα έκφρασης ανθρώπινων πρωτεϊνών είναι κύτταρα θηλαστικών π.χ. CHO cells². Το *Pichia pastoris* είναι ένας ευκαρυωτικός μονοκύτταρος μεθυλότροφος μύκητας και αποτελεί ένα εναλλακτικό σύστημα έκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών³. Το συγκριτικό πλεονέκτημα έναντι άλλων συστημάτων είναι ότι παρέχει εύκολη και γρήγορη ανάπτυξη και συμπεριλαμβάνει τις μεταφραστικές τροποποιήσεις των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών⁴. Στόχος της ερευνητικής προσπάθειας είναι η έκφραση της ανθρώπινης ερυθροποιητίνης από στελέχη του *Pichia pastoris*

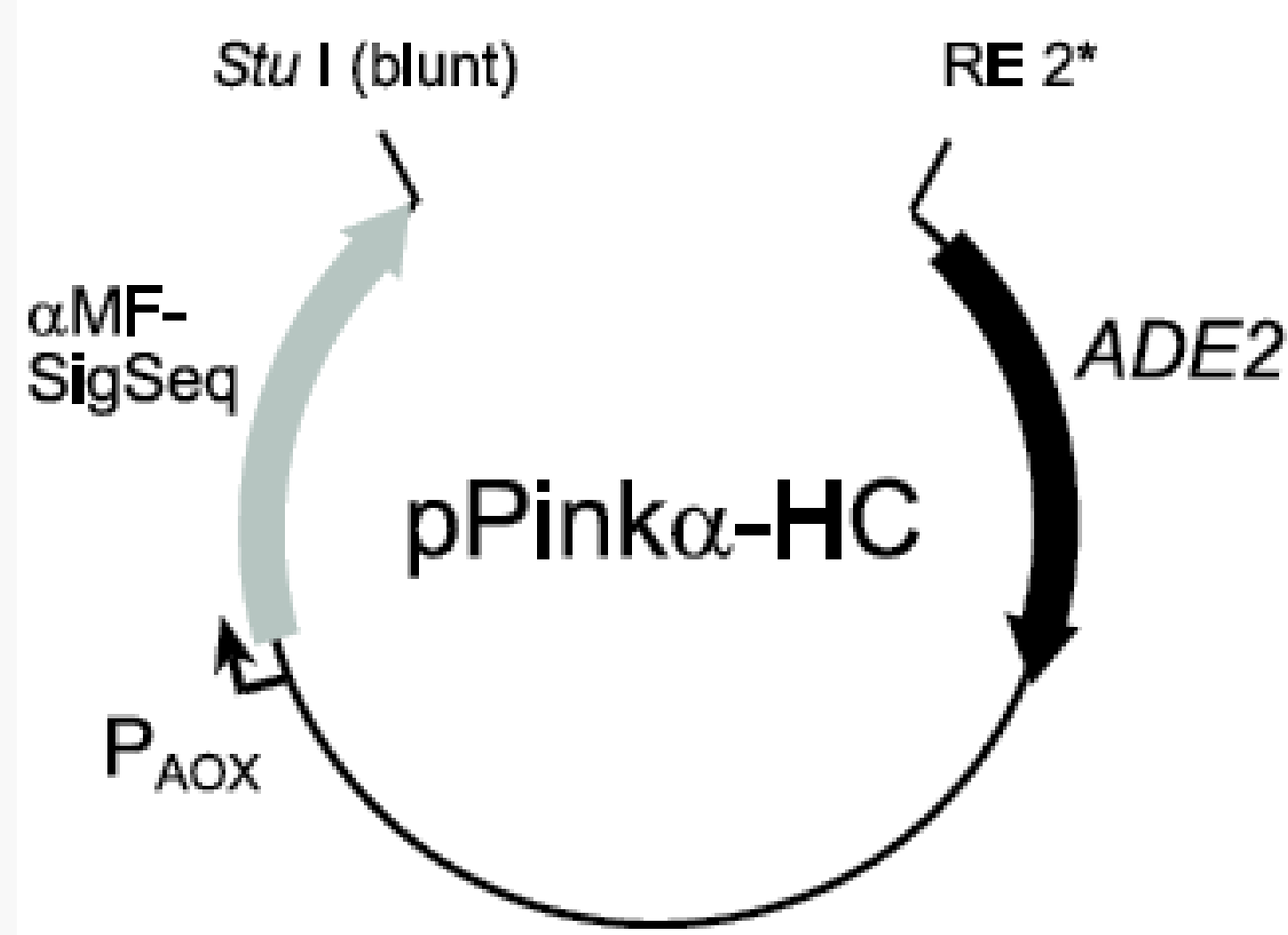
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Για τις ανάγκες απομόνωσης και καθαρισμού της πρωτεΐνης σχεδιάστηκε μια αλληλουχία cassette 1 η οποία κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ιντεΐνη, περιέχει μία επικράτεια CBD και μία ετικέτα πολυιστιδίνης. Η αλληλουχία cassette 1 με την χρήση κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων ανοδικά από την αλληλουχία που κωδικοποιεί την ερυθροποιητίνη. Ως φορέας χρησιμοποιήθηκε ο pBluescript SK- (εικόνα 1). Μετά την απομόνωση του ενθέματος ολόκληρη η αλληλουχία κλωνοποιήθηκε στον φορέα pPinkα-HC που χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό και την έκφραση του φαρμακευτικού πεπτιδίου (εικόνα 2).



Εικόνα 1. Χάρτης πλασμιδίου pBluescript SK-. Στο φορέα κατασκευάστηκε το ένθεμα με το γονίδιο που κωδικοποιεί την ερυθροποιητίνη (cassette 3) και φέρει ανοδικά το γονίδιο cassette 1.

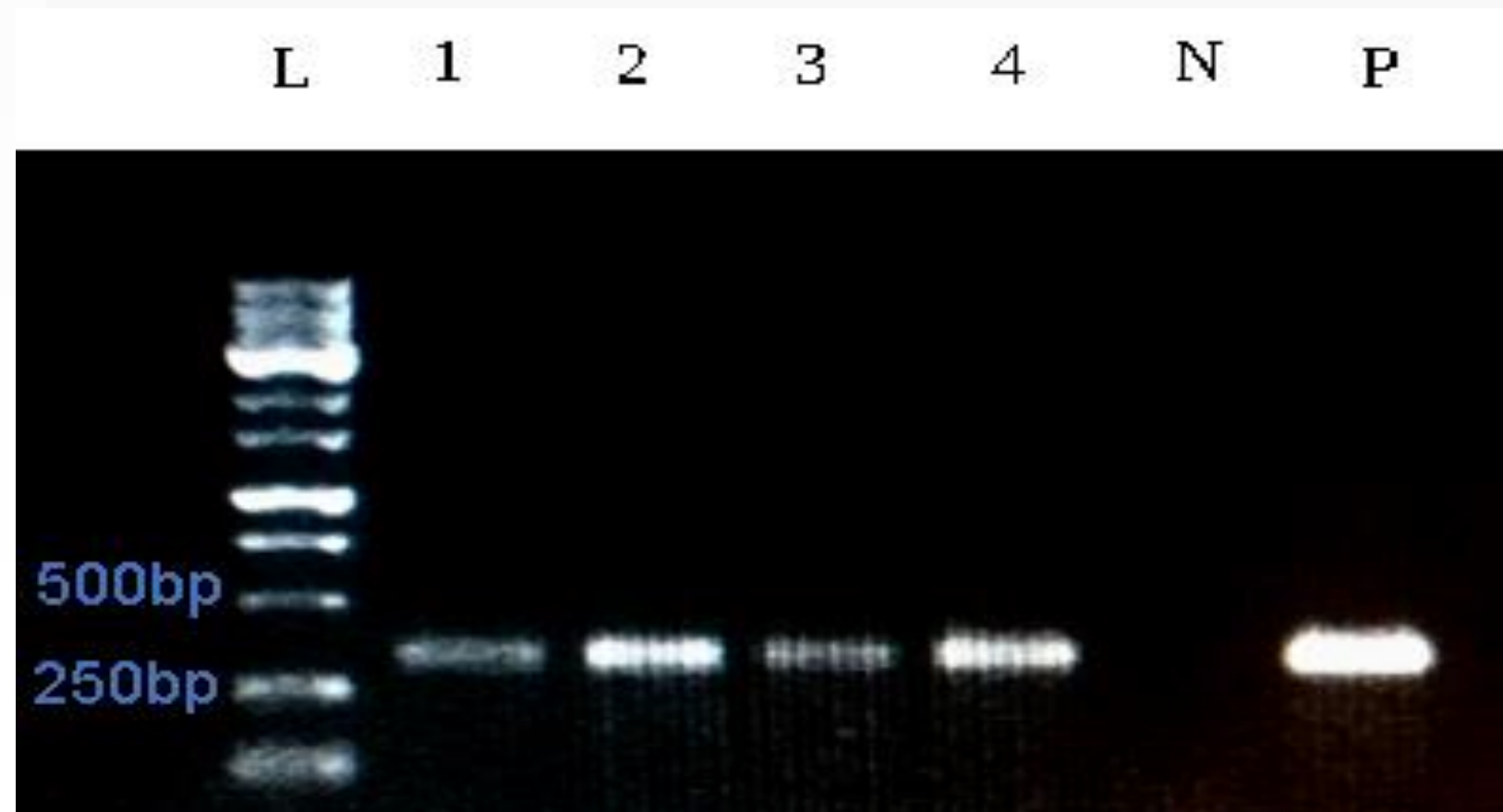
Εικόνα 2. Φορέας pPinkα-HC της Invitrogen. Ο φορέας χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του ενθέματος και τον μετασχηματισμό των στελεχών του *Pichia pastoris*. Το γονίδιο ade2 αποτελεί το γονίδιο επιλογής των μετασχηματισμένων στελεχών. Ο παράγοντας αMF συμβάλει στην καθοδήγηση της πρωτεΐνης στο ΕΔ. Ο υποκινητής P_{AOX} ενεργοποιείται όταν υπάρχει μεθανόλη στο θρεπτικό μέσο.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1

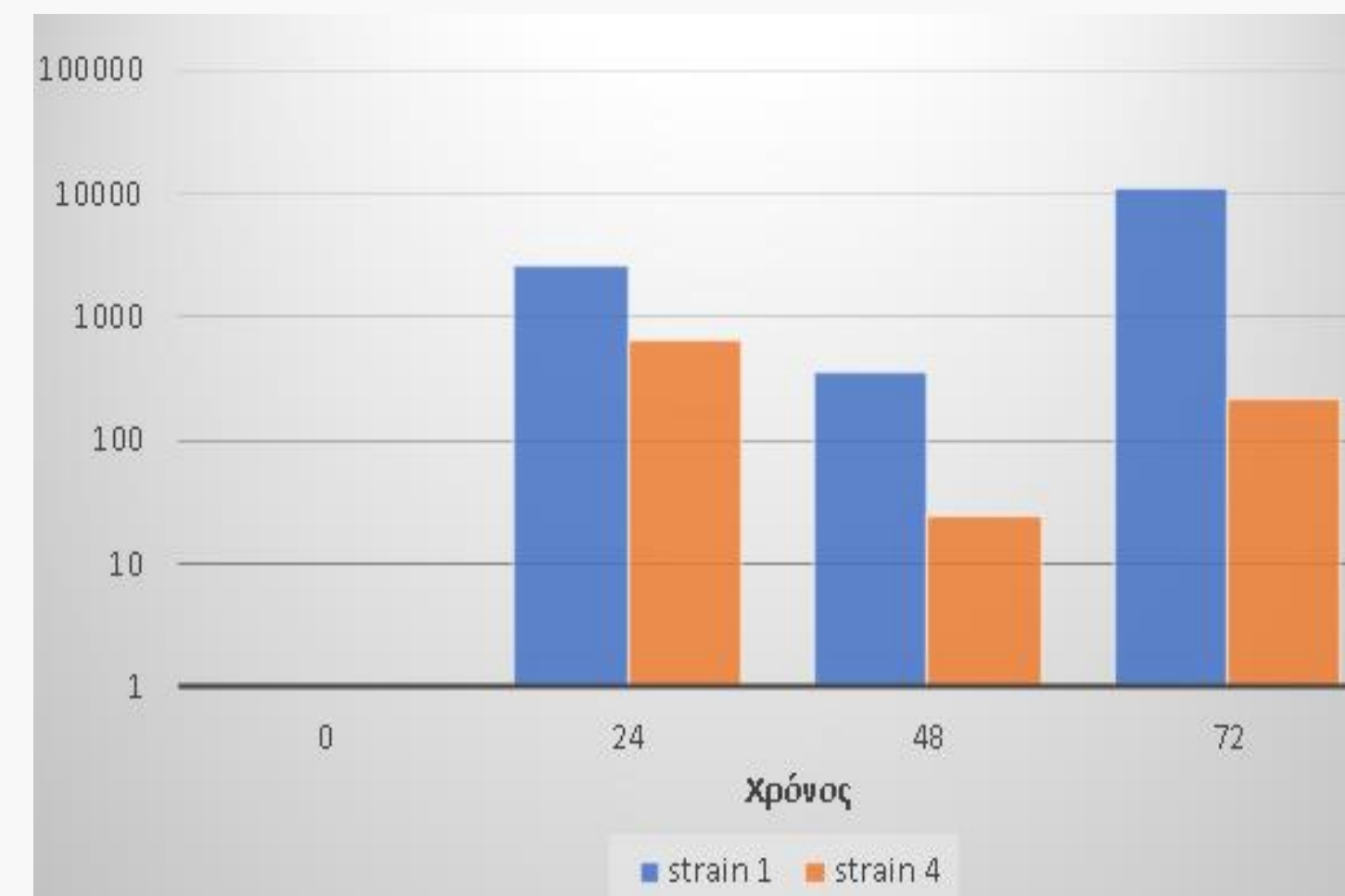
Για την ταυτοποίηση των μετασχηματισμένων στελεχών *Pichia pastoris* εξετάστηκε η εισαγωγή του ενθέματος στο γονιδιωματικό DNA.



Εικόνα 3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή άγαρόζης 0,6% w/v. Τα δείγματα προέρχονται από προϊόντα PCR. Οι εκκνητές που σχεδιάστηκαν στοχεύουν είναι ειδική για γονίδιο που κωδικοποιεί την ερυθροποιητίνη και δίνουν προϊόν 300bp.

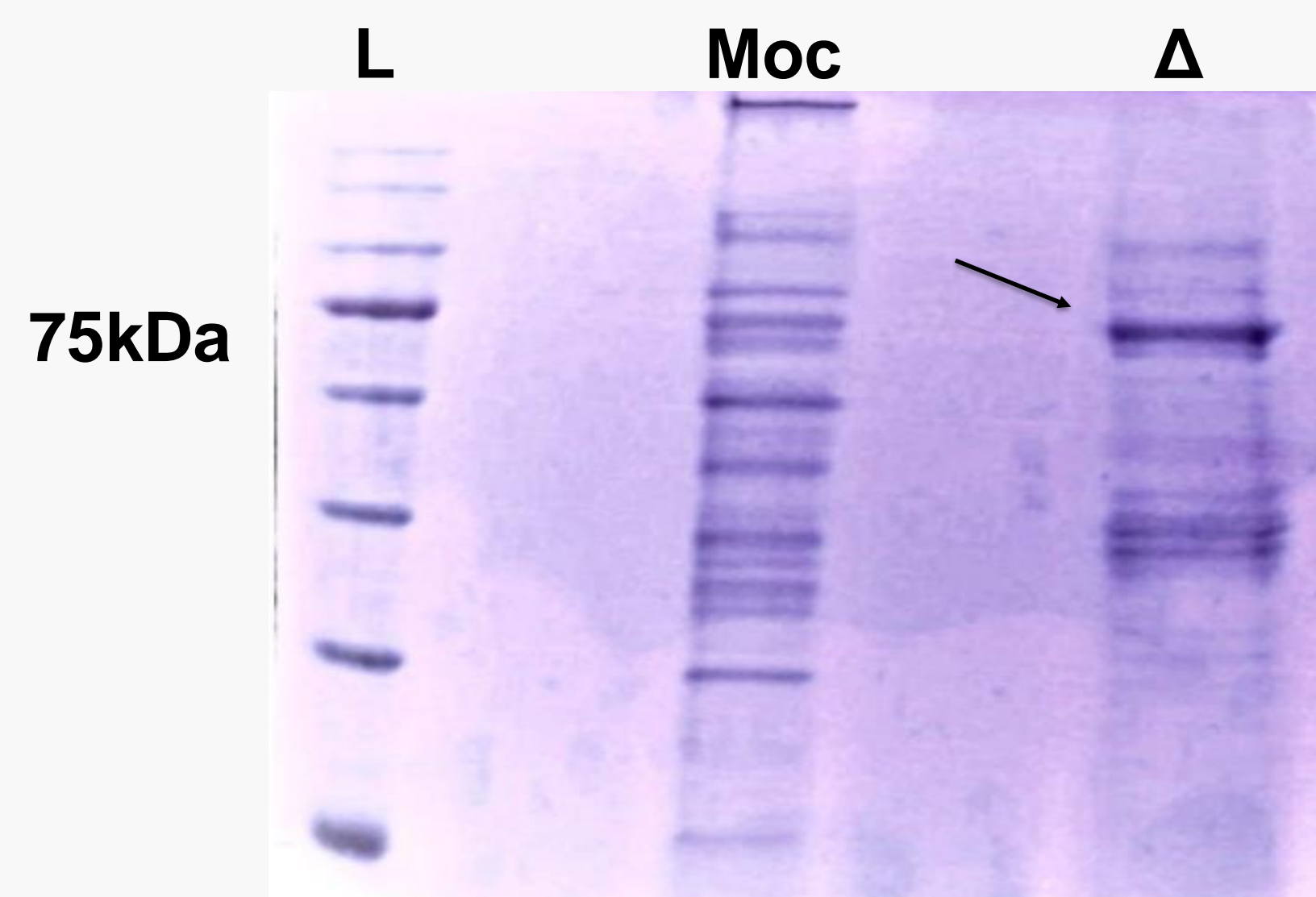
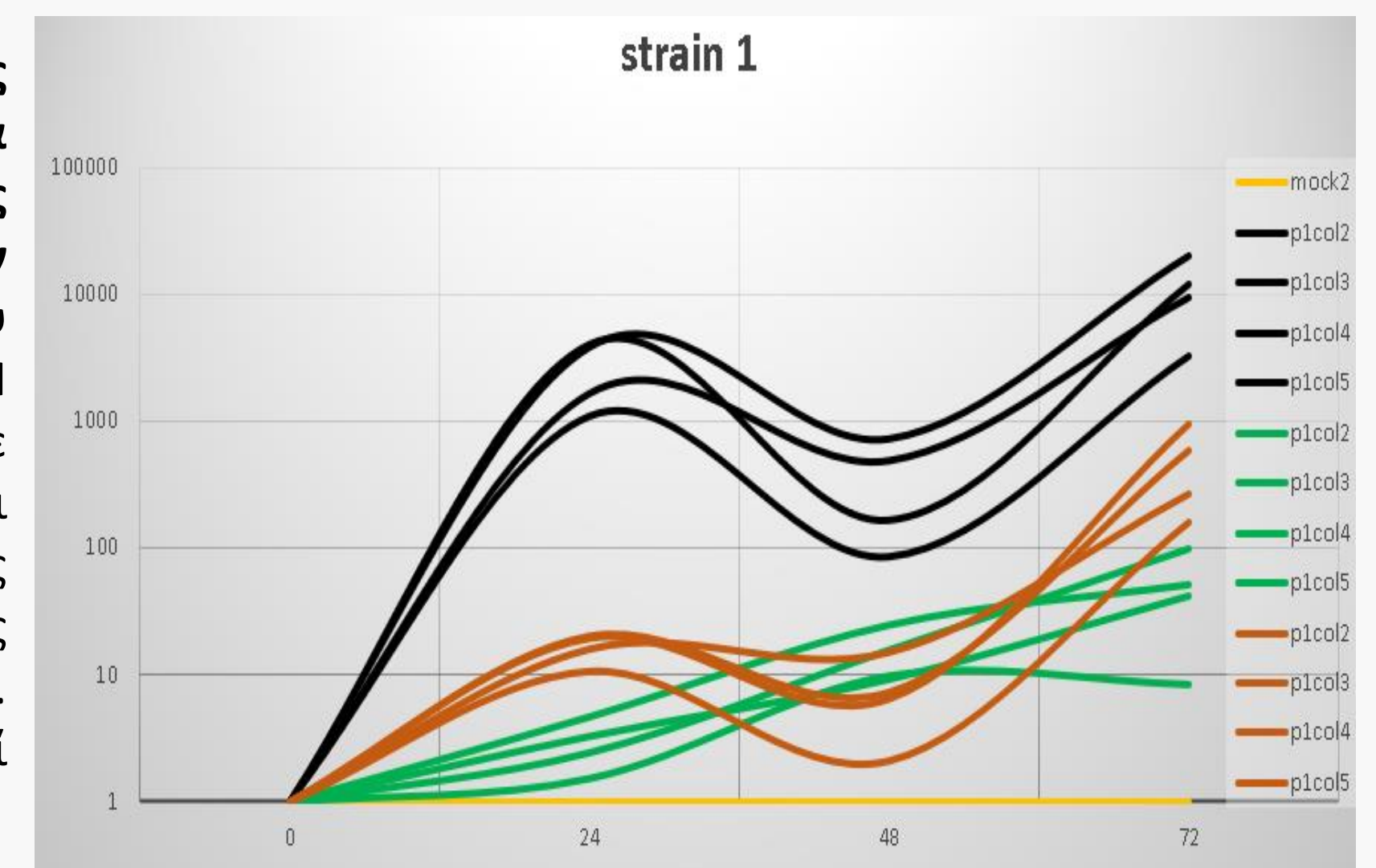
2

Αφού επιλέχτηκε ο κατάλληλος κλώνος δοκιμάστηκαν : 1) δύο διαφορετικά στελέχη του *Pichia pastoris* τα οποία διαφέρουν σε απενεργοποιητικές μεταλλάξεις πρωτεασών και 2) τρεις διαφορετικές συνθήκες επαγωγής που διαφέρουν στις περιεκτικότητες των συστατικών του θρεπτικού μέσου και στην ενεργό οξύτητα.



Εικόνα 4. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της πρωτεΐνης ανάμεσα στα δύο στελέχη. Το strain 1 που αποτελεί το στέλεχος αγρίου τύπου και δεν φέρει απενεργοποιητικές μεταλλάξεις εμφανίζει μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης για κάθε χρονική στιγμή.

Εικόνα 5. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της πρωτεΐνης ανάμεσα στις τρεις διαφορετικές συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου επαγωγής της έκφρασης. Η συνθήκη που απεικονίζεται με μαύρο χρώμα εμφανίζει μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης συγκριτικά με τις υπόλοιπες συνθήκες για κάθε χρονική στιγμή. Συνεπώς η μείωση του pH ευνοεί την έκφραση της πρωτεΐνης.



Εικόνα 6. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10% w/v και εμφάνιση σε Coomassie Blue. Το μοριακό βάρος του ενθέματος του γονιδίου της ερυθροποιητίνης μαζί με την cassette 1 είναι περίπου 75kDa. Στο σημείο του βέλους φαίνεται μία μπάντα στο σωστό μοριακό βάρος η οποία δεν εμφανίζεται στην Moc αποικία. Επόμενος στόχος είναι η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης με τεχνικές μεγαλύτερης ειδικότητας π.χ. Western.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Pavlou, A. K. & Reichert, J. M. Recombinant protein therapeutics—success rates, market trends and values to 2010. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1513–1519 (2004).
- Nielsen, J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. *Bioengineered* **4**, 207–211 (2013).
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J. & Higgins, D. R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* **16**, 23–52 (2000).
- Cereghino, J. L. & Cregg, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 45–66 (2000).