

**СИГНАЛ ЯДЕРНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ГАММА-ИНТЕРФЕРОНА БЫКА
ОБЕСПЕЧИВАЕТ ТРАНСЛОКАЦИЮ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА
В ЯДРО КЛЕТКИ ДРОЖЖЕЙ *PICHIA PASTORIS***

© A. E. Градобоеva, M. V. Падкина

*Кафедра генетики и селекции С.-Петербургского государственного университета;
электронный адрес: agrad74@mail.ru*

Известно, что экспрессия гетерологичных генов в клетках микроорганизмов может оказывать негативное влияние на клетку хозяина. Исходя из этого при использовании микроорганизмов для производства рекомбинантных белков необходимо иметь представление о том, как именно ведет себя чужеродный белок в клетке. В данной работе нами был получен модифицированный ген *IFNG* быка, который кодирует структуру интерферона, несущего делецию 10 аминокислот на С-конце, а также генетические конструкции, обеспечивающие экспрессию нативного и модифицированного генов *IFNG* быка совместно с геном *GFP* в клетках дрожжей *Pichia pastoris*. При помощи химерных белков ИФН- γ /GFP и ИФН- γ (Δ 10)/GFP мы показали, что сигнал ядерной локализации ИФН- γ быка выполняет свою функцию в клетках дрожжей, тогда как его отсутствие приводит к тому, что гетерологичный продукт остается в цитоплазме.

Ключевые слова: рекомбинантные белки, гамма-интерферон быка, сигнал ядерной локализации.

Микроорганизмы все более активно используются в биотехнологии для производства рекомбинантных белков, поэтому представляют бесспорный интерес процессы, происходящие с чужеродными белками в клетке-производителе.

Известно, что для полноценного осуществления своих функций белок должен принять нативную конформацию, попав в определенный компартмент клетки. Для этого существуют сигналы транслокации, обеспечивающие направленный транспорт белка после его образования. Такими сигналами служат аминокислотные последовательности, присоединенные к одному из концов белковой молекулы или находящиеся внутри нее и формирующие определенную трехмерную структуру. Например, белки, которые должны попасть в эндоплазматический ретикулум (ЭР), обычно несут N-концевой сигнальный пептид. Его центральная часть образована 5—10 гидрофобными аминокислотными остатками. Большинство этих белков направляется из ЭР в аппарат Гольджи (АГ); те же, которые имеют на С-конце специфическую последовательность, остаются в качестве постоянных компонентов ЭР (Кольман, Рём, 2000).

Избирательность ядерного транспорта обеспечивается «сигналами ядерной локализации» (NLS — nuclear localization sequence) — короткими пептидными последовательностями, обогащенными положительно заряженными аминокислотами лизином и аргинином. Сигнал такого типа впервые был идентифицирован в белке вируса SV40, так называемом Т-антителе, большом (90 кДа) белке, необходимом для репликации вирусной ДНК в ядре. В норме Т-антитело накапливается в ядре вскоре после его син-

теза в цитозоле. Однако замена одной аминокислоты делает невозможной транспортировку белка и вызывает его накопление в цитоплазме. В ходе дальнейших экспериментов была определена минимальная последовательность, обуславливающая способность белка проникать в ядро. Удалось показать, что сигнал ядерной локализации для Т-антитела представляет собой восемь следующих друг за другом аминокислот (PPKKKRKV). Дальнейшие эксперименты убедили в том, что эта последовательность обеспечивает успешную транслокацию в ядро различных белков (Kalderon et al., 1984).

Помимо белков ядерного метаболизма (гистонов, транскрипционных факторов и пр.) NLS обнаружены у различных белков, в частности у гамма-интерферона (ИФН- γ). Для молекул мышьего и человеческого ИФН- γ показано наличие на С-конце NLS следующего состава: ¹²⁶RKRKRSR¹³², а в районе аминокислотных остатков 78—92 — второго, менее эффективного сайта ядерного транспорта, которые обеспечивают транслокацию ИФН- γ в ядро. Таким образом, помимо того, что ИФН- γ использует хорошо изученный к настоящему моменту путь JAK-STAT для транспорта в ядро, он сам в комплексе с рецептором также может попадать в клетку и ядро (Larkin et al., 2001). Способность попадать в клетку была показана и для интерферонов I класса (Marchetti et al., 2006).

Существуют два различных пути проникновения комплекса ИФН с рецептором в клетку — клатринзависимый путь и транспортировка с помощью кавеол. В первом случае поглощение комплекса происходит в так называемых окаймленных ямках — областях мембран, у которых внутренняя поверхность выстлана белком клатрином.

Клатрин облегчает включение комплекса в «ямку» и способствует отделению везикулы. Эндоцитоз по кратинзависимому пути необходим для активации белков STAT1 и STAT2 интерферонами I типа. Комплекс рецептора ИФН- γ также может проникать в клетку этим путем, однако активация STAT1 происходит при проникновении комплекса через специфические участки мембраны — микродомены, которые характеризуются устойчивостью к детергентам и обогащены холестеролом и гликосфинголипидами. При этом происходит образование кавеол — неокаймленных колбообразных инвагинаций мембранны (Doherty, McMahon, 2009). Таким образом, в отличие от интерферонов I типа, использующих только кратинзависимый путь проникновения в клетку комплекса лиганда с рецептором. Связанный с рецептором ИФН- γ может транспортироваться в клетку посредством образования кавеол. Попавший через кавеолу комплекс далее транспортируется в ядро (Nichols, Lippincott-Schwartz, 2001; Marchetti et al., 2006).

В процессе продукции гетерологичных белков их локализация во многом определяет стабильность рекомбинантных продуктов, а также их влияние на клетку-хозяина. Известно, что продукция гетерологичного белка может оказывать отрицательное влияние на метаболизм клетки-продуцента, даже если этот белок не имеет гомологов в клетке-хозяине. Этот эффект был показан в работах по изучению продукции гетерологичных белков в клетках бактерий *Escherichia coli* (Remaut et al., 1986; Thomas et al., 1997; Lilie et al., 1998; Hoffman, Rinas, 2000; Ellis, 2001).

Влияние продукции гетерологичных белков на клетки дрожжей изучено довольно плохо. Показано, что суперпродукция α -амилазы мыши клетками дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* приводит к нарушению клеточного цикла, в частности к увеличению продолжительности митоза (Wang, Kuo, 2001). Это явление связано с изменением уровня продукции белков семейства циклинзависимых киназ, играющих важную роль в контроле клеточного цикла дрожжей. Рекомбинантный ИФН- β человека оказывает негативное влияние на жизнеспособность клеток дрожжей *S. cerevisiae*, что обусловлено снижением активности цитохром-С-оксидазы (Парфенова и др., 2002). Есть также данные о том, что гетерологичная продукция в клетках дрожжей *S. cerevisiae* может вызывать так называемый ответ на неправильно свернутые белки (UPR — unfolded protein response). UPR индуцируется вследствие накопления агрегатов белков с неправильной конформацией в ЭР и выражается в активации генов, кодирующих ферменты и шапероны, вовлекаемые в фолдинг белков (Ng et al., 2000).

Поэтому очень важно проследить за судьбой чужородного белка в клетке-хозяине. Для этого в трансформирующие векторы вводят репортерные гены, кодирующие нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях может быть легко тестировано. Чаще всего в этом качестве используется пользующийся все большей популярностью ген зеленого флуоресцентного белка (GFP — green fluorescent protein). Его флуоресценция обусловлена непосредственно белком, для ее проявления не требуется субстратов или кофакторов. Благодаря этому свойству ген GFP является очень перспективным репортерным геном, позволяющим проводить разнообразные прижизненные (недеструктивные) исследования с трансгенными организмами. В составе химерных белков, созданных генно-инженерными методами, GFP обычно сохраняет свою

функциональную активность. В живых клетках белок GFP также очень стабилен (Лабас и др., 2002). Соединяя ген GFP со структурными генами других белков, можно оценить скорость образования и локализацию интересующих белков.

Цель нашей работы — проследить за судьбой рекомбинантного ИФН- γ быка в клетках дрожжей *Pichia pastoris*: проверить наличие на C-конце молекулы ИФН- γ быка сигнала ядерной локализации и выяснить, будет ли NLS млекопитающих функционировать в дрожжевой клетке. Для решения поставленной задачи мы получили модифицированный ген ИФН- γ быка, имеющий делецию тридцати пар оснований на C-конце, и создали генетические конструкции, содержащие ген GFP, сшитый с нативным и модифицированным генами ИФН- γ быка, экспрессия которых в клетках дрожжей *P. pastoris* происходит под контролем промотора гена алкогольоксидазы 1 (*AOX1*).

Материал и методика

Плазиды. Для создания векторов экспрессии pBIG-GFP и pBIGd10-GFP использовали плазиды pBIG (Градобоева и др., 2002) и pEGFP-C3, любезно предоставленные д-ром С. Карстеном (США).

Штаммы. Для получения штаммов дрожжей *P. pastoris* (продуцентов нативного и модифицированного ИФН- γ быка, сшитого с GFP) в качестве реципиента был использован штамм дрожжей *P. pastoris* GS115 (*his4*) (Invitrogen, США). Для амплификации плазидной ДНК использовали штамм *E. coli* DH5 α (F'/endA1 hsdR17 (r_k^+ , m_k^+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal r) relA1 (lacZYA-argF)U169 deoR (phi80dlacDelta(lacZ)M15).

Условия культивирования. Для выращивания дрожжей *P. pastoris* использовали полную среду BMGY, содержащую на 1 л дистиллированной воды 10 г дрожжевого экстракта, 20 г пептона, 3.75 г КН₂РО₄, 12 г К₂НРО₄·3Н₂O, 0.5 г MgSO₄·7Н₂O, 0.4 г CaSO₄·H₂O, 3 г (NH₄)₂SO₄, 16.25 мг FeSO₄·7Н₂O, 1.5 мг CuSO₄·5Н₂O, 5 мг ZnSO₄·7Н₂O, 0.75 мг MnSO₄·H₂O, 50 мг биотина и 10 г глицерина.

Для индукции экспрессии гена ИФН- γ быка (*IFNG*), находящегося под контролем промотора гена *AOX1*, клетки дрожжей переносили в среду, содержащую в качестве источника углерода вместо глицерина метanol в концентрации 1 %. Для селекции трансформантов, имеющих фенотип Mut- и различающихся снижением скорости роста на среде с метанолом, использовали минимальную среду с метанолом в концентрации 0.5 % в качестве единственного источника углерода. При выращивании штамма GS115, несущего мутацию в гене *HIS4*, в среду добавляли 20 мг гистидина на 1 л среды. При работе с чашками Петри во все среды добавляли 20 г агара на 1 л среды.

Выделение плазидной ДНК, трансформацию бактерий и дрожжей, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили по стандартному протоколу (Гловер, 1988). Электрофорез фрагментов ДНК, а также гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции проводили по стандартной методике (Маниатис и др., 1984) в условиях, предлагаемых фирмой-производителем (Fermentas, Литва). Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля осуществляли при помощи соответствующего набора реактивов и методики, предлагаемой фирмой-производителем (Fermentas, Литва).

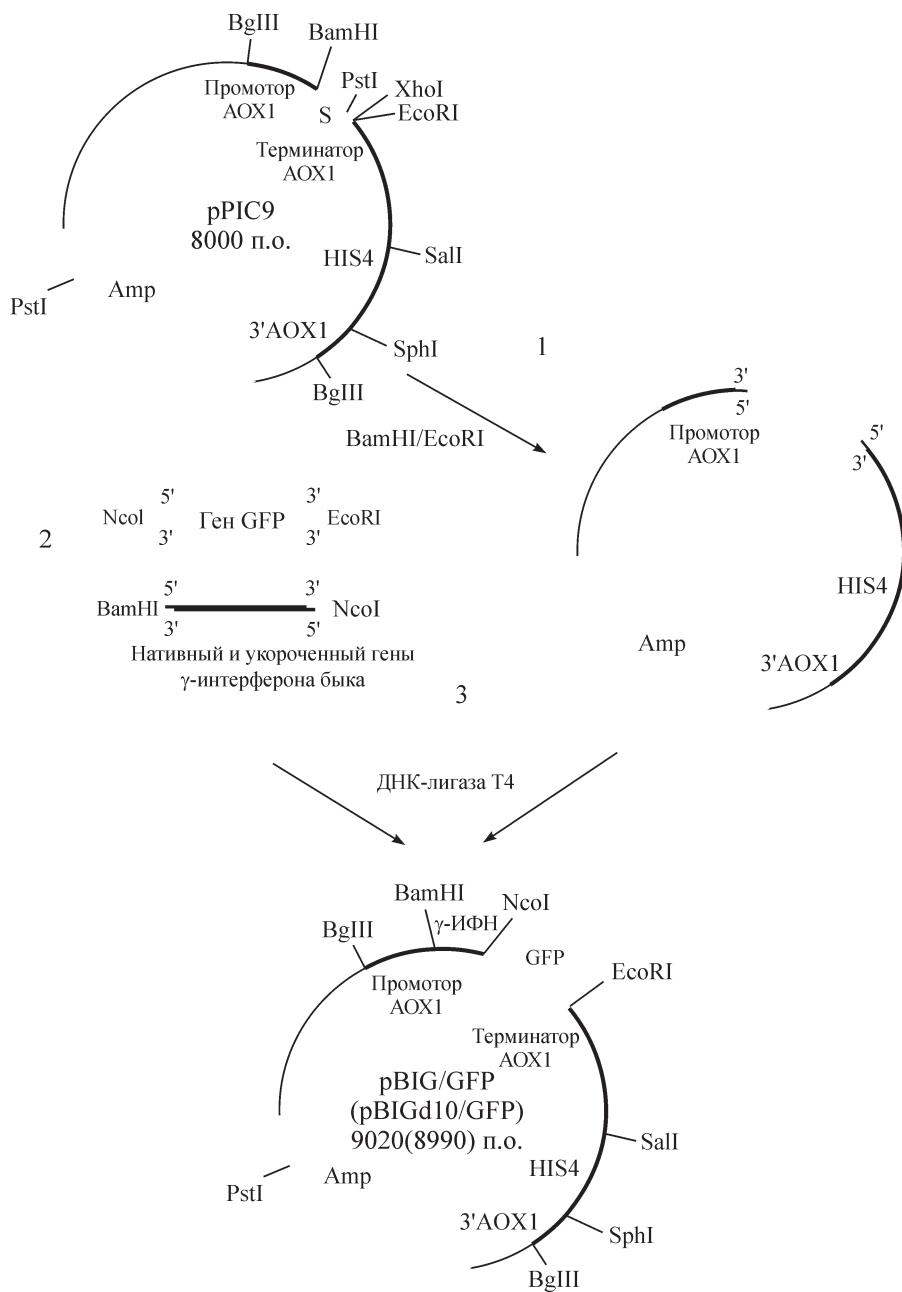


Рис. 1. Схема конструирования плазмид pBIG-GFP и pBIGd10-GFP.

1 — обработка вектора pPIC9 эндонуклеазами рестрикции BamHI и EcoRI, 2 — получение нативного и модифицированного структурных генов ИФН- γ быка и гена GFP, 3 — получение плазмид pBIG-GFP и pBIGd10-GFP.

Результаты и обсуждение

Получение нативного и модифицированного генов *IFNG* быка. Известно, что удаление 10 аминокислот с C-конца молекулы ИФН- γ человека не влияет на биологическую активность белка, а, напротив, ведет к повышению его стабильности, поскольку повышает устойчивость к действию протеаз (Мирошников и др., 2005). Чтобы проследить судьбу модифицированного таким образом ИФН- γ быка в клетках дрожжей, нами был получен ген, кодирующий этот белок, с такими же изменениями.

Нативный и модифицированный гены *IFNG* быка получали с помощью ПЦР, используя в качестве матрицы

плазмиду pBIG. Для получения нативного гена *IFNG* быка использовали в качестве праймеров следующие олигонуклеотиды: прямой 5'-CGGGATCCAAACGATGCAG-GGCCAATTTC-3' и обратный 5'-CATGCCATGGATGCTTTCGACCTCGAAC-3'. Отжиг праймеров проводили 1 мин при 41 °C в течение 30 циклов.

Используя олигонуклеотиды такого состава, мы получили ген *IFNG* нативного интерферона, имеющий сайты узнавания для рестриктазы BamHI (GGATCC) на 5'=конце и для NcoI (CCATGG) на 3'=конце.

Исходя из гомологии ИФН- γ человека и быка (<http://au.expasy.org/sprot/>) для получения гена *IFNG-Δ30* быка, имеющего модификацию на C-конце, нами был использован подход, аналогичный ранее предложенному

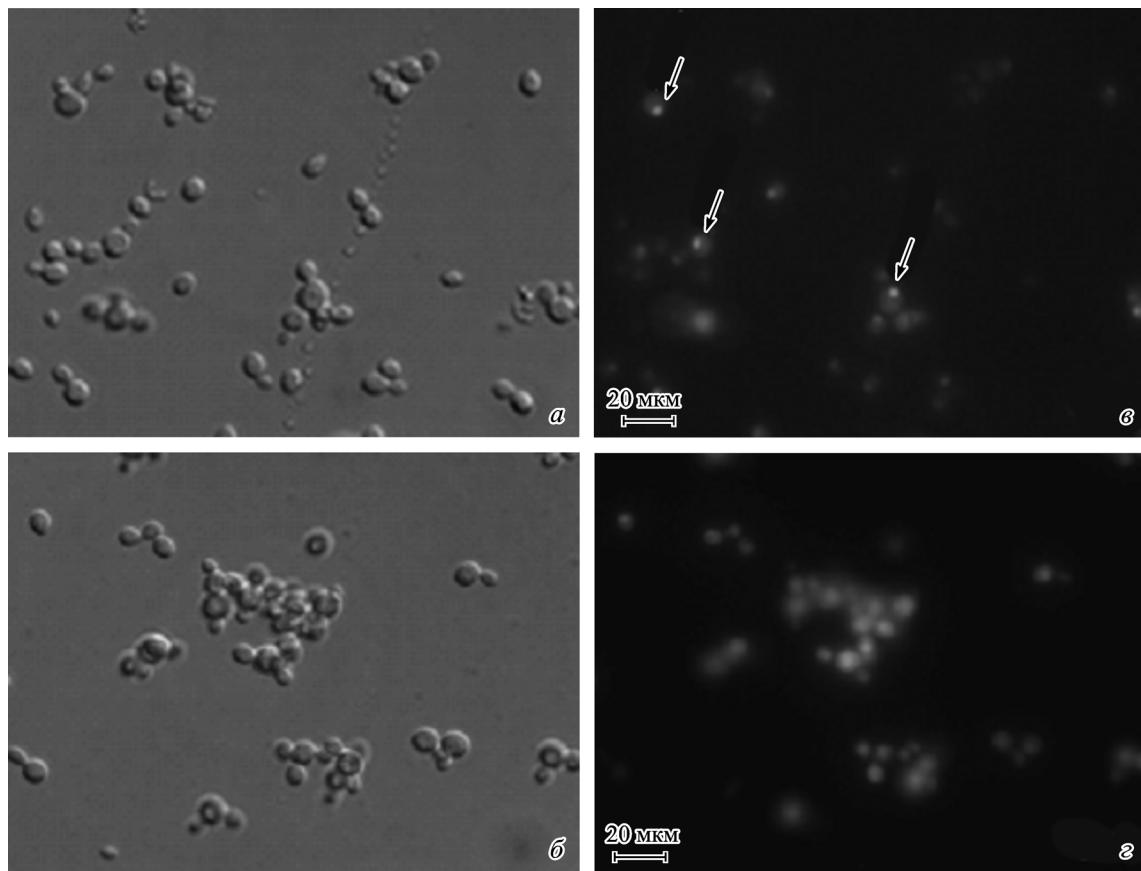


Рис. 2. Локализация нативного (G115/pBIG-GFP) и модифицированного (GS115/pBIGd10-GFP) ИФН- γ быка в клетках дрожжей *Pichia pastoris*.

a — G115/pBIG-GFP, *б* — GS115/pBIGd10-GFP (поляризационно-контрастная микроскопия), *в* — G115/pBIG-GFP, *г* — GS115/pBIGd10-GFP (флуоресцентная микроскопия). Стрелками указаны окрашенные ядра.

Мирошниковым с соавторами (2005). В качестве праймеров для ПЦР использовали следующие олигонуклеотиды: прямой 5'-CGGGATCCAAACGATGCAGGGCCAATTTT-3' и обратный 5'-CATGCCATGGATGCAGAACCCCTT-CCTT-3'.

Олигонуклеотиды были подобраны таким образом, чтобы амплифицированная последовательность гена содержала на 5'= и 3'= концах сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции BamHI (GGATCC) и NcoI (CCATGG) соответственно. Отжиг праймеров проводили 1 мин при 41 °C в течение 30 циклов. Результат контролировали при помощи электрофореза в агарозном геле.

Таким образом, нами был получен ген ИФН- γ быка, имеющий следующие изменения по сравнению с нативным:

130 140
ИФН- γ ...ArgLys**ArgLys**ArgSerGlnMetLeuPhe**Arg**Gly**Arg**ArgAlaSerMet,
ИФН- γ (Δ 10) ... ArgLys**Gly**ArgSerAlaSerMet.

Создание конструкций, обеспечивающих экспрессию нативного *IFN- γ* и укороченного *IFNG-Δ30* генов быка совместно с геном *GFP* в клетках дрожжей *P. pastoris*. Ген *GFP* амплифицировали с помощью ПЦР. В качестве матрицы использовали плазмиду pEGFP-C3. Для амплификации гена *GFP* использовали следующие праймеры: прямой 5'-CATGCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC-TG-3' и обратный 5'-GGAATTCTTACTTGTACAGCT-CGTCC-3'. Отжиг праймеров проводили 1 мин при 39 °C

30 циклов. Олигонуклеотиды были подобраны таким образом, чтобы амплифицированная последовательность гена *GFP* содержала на 5'= и 3'= концах сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции NcoI (CCATGG) и EcoRI (GAATTC) соответственно.

Продукты ПЦР наносили на 0.7%-ный агарозный гель и выделяли фрагменты ДНК соответствующих размеров (около 800 п. о. для гена *GFP* и 390—420 п. о. для генов *IFNG-Δ30* и *IFNG* соответственно). В качестве вектора использовали плазмиду pPIC9, обработанную эндонуклеазами рестрикции BamHI и EcoRI. Ген *GFP* обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NcoI и EcoRI, а гены *IFNG-Δ30* и *IFNG* — BamHI и NcoI. Вектор и два встраиваемых в него фрагмента лигировали при помощи ДНК-лигазы фага T4. Схема конструирования приведена на рис. 1.

Полученными лигазными смесями трансформировали клетки *E. coli* и высевали их на чашки со средой LB, содержащей ампциллин в концентрации 50 мкг/мл. Из трансформантов выделяли плазмидную ДНК и проверяли наличие встройки *IFNG/GFP* с помощью рестрикционного анализа. Для этого использовали рестриктазы BamHI и EcoRI. В случае искомой ДНК ожидали получить фрагменты 1190—1220 п. о., соответствующие гену *IFNG-Δ30* и гену *IFNG*, спитым с геном *GFP*, и 7800 п. о., соответствующий вектору pPIC9, лишенному фрагмента гена MFα дрожжей *S. cerevisiae*, кодирующего сигнальный пептид. По результатам рестрикционного анализа, полученные плазмиды pBIG-GFP и pBIGd10-GFP содержат

фрагменты ДНК, включающие в себя нативный ген *IFNG* и укороченный ген *IFNG-Δ30* быка, сшитые с геном *GFP*. Полученные плазмида использовали для трансформации штамма дрожжей *P. pastoris* GS115.

Получение штаммов дрожжей *P. pastoris*, синтезирующих химерные белки ИФН- γ /GFP и ИФН- γ (Δ10)/GFP. Для интеграции экспрессионной кассеты в хромосомную ДНК клетки-хозяина переводили рекомбинантные плазмида pBIG-GFP и pBIGd10-GFP из кольцевой формы в линейную. Для этого ДНК обрабатывали рестриктазой BglIII, а затем трансформировали штамм *P. pastoris* GS115. При этом либо ген *IFNG* встраивается в локус *AOX1* за счет гомологичной рекомбинации, либо происходит замещение мутантного гена *his4* на соответствующий ген дикого типа из экспрессионной кассеты. В обоих случаях трансформанты приобретают способность расти на среде без гистидина, однако только интегранты по локусу *AOX1* имеют резко сниженную способность расти на среде с метанолом. Поэтому клонны трансформированных клеток, выросшие на селективной среде без гистидина, перепечатывали на среду с метанолом в качестве единственного источника углерода и отбирали нужные клонны (фенотип His+Mut−).

Определение внутриклеточной локализации химерных белков ИФН- γ /GFP и ИФН- γ (Δ10)/GFP. Штаммы дрожжей *P. pastoris* GS115/pBIG-GFP и GS115/pBIGd10-GFP выращивали в условиях индукции синтеза рекомбинантных белков. Идентификацию наличия и местоположения гибридных белков (нативного и укороченного ИФН- γ быка, сшитых с белком GFP) в клетках дрожжей проводили при помощи микроскопа Leica DM6000 B, оборудованного цифровой камерой Leica DFC500, в режиме эпифлуоресценции.

Результаты, представленные на рис. 2, свидетельствуют о том, что нативный рекомбинантный ИФН- γ быка в дрожжевой клетке преимущественно локализован в ядре, тогда как модифицированный ИФН- γ быка, лишенный 10 аминокислот на С-конце, как правило, равномерно распределен в цитоплазме. Это подтверждает гипотезу, согласно которой сигнал ядерной локализации высших эукариот выполняет свою функцию в клетках низших, т. е. является консервативной последовательностью. Эти сведения необходимо учитывать в работах по гетерологичной экспрессии, так как попадание чужеродного белка в ядро клетки-продуцента может оказывать негативное влияние, поскольку существует вероятность его участия в различных метаболических процессах клетки хозяина. Подобное явление было показано на примере негативного воздействия на клетки дрожжей *S. cerevisiae* гетерологичного ИФН- β человека, продукция которого приводит к нарушению функций митохондрий в клетке хозяина, по-видимому, за счет взаимодействия с цитозольными белками дрожжей, имеющими фибронектиновые повторы (FNIII), которые присутствуют в экстраклеточных доменах рецепторов интерферонов (Парфенова и др., 2002).

Таким образом, в результате данной работы был получен модифицированный ген *IFNG-Δ30* быка, который кодирует структуру ИФН- γ быка, несущего делецию 10 аминокислот на С-конце, а также генетические конструкции, обеспечивающие экспрессию нативного и модифицированного генов *IFNG* быка совместно с геном *GFP* в клетках дрожжей *P. pastoris*. При помощи химерных белков ИФН- γ /GFP и ИФН- γ (Δ10)/GFP мы показали, что сигнал ядерной локализации ИФН- γ быка выполняет

свою функцию в клетках дрожжей, тогда как его отсутствие приводит к тому, что гетерологичный продукт остается в цитоплазме.

Список литературы

- Гловер Д. 1988. Клонирование ДНК. М.: Мир. 538 с.
- Градобоева А. Е., Падкина М. В., Парфенова Л. В., Самбуку Е. В., Смирнов М. Н. 2002. Штамм дрожжей *Pichia pastoris* PS105(pBIG) — продуцент внутриклеточного иммунного интерферона быка, рекомбинантная плазмидная ДНК, обеспечивающая биосинтез внутриклеточного иммунного интерферона быка и способ конструирования рекомбинантной плазмидной ДНК pBIG. Патент РФ RU 2231545 С1.-МКИ С 12 Н 1/19, 15/23, 15/81.
- Кольман Я., Рём К. 2000. Наглядная биохимия. М.: Мир. 469 с.
- Лабас Ю. А., Гордеева А. В., Фрадков А. Ф. 2002. Флюоресцирующие и цветные белки. Природа. 3 : 33—43.
- Маниатис Т., Фриз Э., Сэмбрук Дж. 1984. Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование. М.: Мир. 480 с.
- Мирошников П. Н., Лебедев Л. Р., Терещенко Т. А. 2005. Получение интерферона-гамма и его аналога дельтаферона. Биотехнология. 1 : 11—18.
- Парфенова Л. В., Самбуку Е. В., Смирнов М. Н., Падкина М. В. 2002. Продукция β -интерферона человека в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* ведет к снижению активности цитохром с-оксидазы. Биотехнология. 6 : 3—10.
- Doherty G. J., McMahon H. T. 2009. Mechanisms of endocytosis. Annu. Rev. Biochem. 78 : 857—902.
- Ellis R. J. 2001. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. Trends Biochem. Sci. 26 : 597—604.
- Hoffman F., Rinas U. 2000. Kinetics of heat-shock response and inclusion body formation during temperature-induced production of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol. Prog. 16 : 1000—1007.
- Kalderon D., Roberts B. L., Richardson W. D., Smith A. E. 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. Cell. 39 : 499—509.
- Larkin J., 3rd, Subramanian P. S., Torres B. A. et al. 2001. Differential properties of two putative nuclear localization sequences found in the carboxyl-terminus of human IFN-gamma. J. Interferon Cytokine Res. 21 : 341—348.
- Lilie H., Schwarz E., Rudolph R. 1998. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. Curr. Opin. Biotechnol. 9 : 497—501.
- Marchetti M., Monier M.-N., Fradagrad A. et al. 2006. Stat-mediated signaling induced by TypeI and TypeII interferons (IFNs) is differentially controlled through lipid microdomain association and clathrin-dependent endocytosis of IFN receptors. Mol. Biol. Cell. 17 : 2896—2909.
- Ng D. T. W., Spear E. D., Walter P. 2000. The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control. J. Cell Biol. 150 : 77—88.
- Nichols B. J., Lippincott-Schwartz J. 2001. Endocytosis without clathrin coats. Trends in Cell Biol. 11 : 406—412.
- Remaut E., Stansser P., Simons G. et al. 1986. Use of the phage lambda P₁ promoter for high-level expression of human interferons in *Escherichia coli*. Methods in Enzymol. 119 : 366—375.
- Thomas J. G., Ayling A., Baneyx F. 1997. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli* — to fold or to refold. Appl. Biochem. Biotechnol. 66 : 197—238.
- Wang B.-D., Kuo T.-T. 2001. Induction of a mitosis delay and cell lysis by high-level secretion of mouse α -amylase from *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 67 : 3693—3701.

Поступила 7 IV 2010

NUCLEAR LOCALIZATION SEQUENCE OF BOVINE GAMMA-INTERFERON
PROVIDES TRANSLOCATION OF RECOMBINANT PROTEIN TO YEAST
PICHIA PASTORIS CELL NUCLEUS

A. E. Gradoboeva, M. V. Padkina

Department of Genetics and Selection, St. Petersburg State University;
e-mail: agrad74@mail.ru

It is known that heterologous protein production in microorganisms has negative influence upon a host cell. In this regard, of particular interest is to know the fate of recombinant proteins in a cell. In this study, it was shown that NLS of bovine gamma-interferon functions in yeast *Pichia pastoris* cells. The absence of the C-terminal NLS of bovine gamma-interferon leads to cytoplasmic localization of the recombinant protein.

Key words: recombinant proteins, bovine gamma-interferon, nuclear localization sequence.