

Diss. ETH No. 8709

Expression of Heterologous Cytochrome P450 Genes in *Saccharomyces cerevisiae*

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZUERICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
BEAT-DENIS ZURBRIGGEN
Dipl. Natw. ETH
born December 31, 1958
citizen of Saas-Grund VS

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. A. Fiechter, examiner
PD. Dr. O. Käppeli, co-examiner

ADAG Administration & Druck AG
Zürich 1988

Eidg. Techn. Hochschule
Institut für Biotechnologie
ETH-Hörsaalgebäude A1
CH-8093 Zürich
Switzerland
A. Fiechter
5.12.1988

4. SUMMARY

The expression of eukaryotic cytochromes P450 in yeast opens the possibility for their investigation as catalysts in different chemical hydroxylations and for the study of their structure-function relationship by site-specific mutagenesis. For many applications in pharmaceutical industry mass production is required.

This work aimed to examine the expression of complete and 5' deleted rat liver cytochrome P450e cDNA in *S. cerevisiae* under the control of the acid phosphatase (PHO5) promoter and terminator. 5' deleted cytochrome P450e cDNA was fused with the PHO5 signal sequence, and the construction of a complete cytochrome P450e cDNA was carried out. The expression cassettes of both constructions were inserted in the yeast expression vector pDP34.

In the first part of this work, the expression of the truncated as well as the intact cytochrome P450e was studied qualitatively in shake flask cultures. The production of both cytochrome P450e forms was tested by recording CO-difference spectra, performing Southern-, Northern- and immunoblotting. The truncated cytochrome P450e was not localized in the microsomes and was not functional. The intact cytochrome P450e was clearly localized in the microsomal fraction, and preliminary data showed, that the intact cytochrome P450e was functional. For the demethylation of 4-nitroanisole, a turnover of $0.33 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ nmoles}^{-1}$ cytochrome P450e was obtained.

In the second part of the thesis, the expression of the mammalian proteins in *S. cerevisiae* was quantitatively measured by CO-difference spectra. Only low levels of truncated cytochrome P450e appeared. The maximally truncated cytochrome P450e constituted 0.1% of total cellular protein (20 nmoles g^{-1} dry weight). The expression of the truncated cytochrome P450e was not stable and the production ceased after a relatively short period of time (80 h) in a continuous cultivation to a non-detectable level. By a repeated fed-batch process heterologous expression of cytochrome P450e was activated for at least 6 consecutive cycles. The time of induction could be regulated by the phosphate concentration in the supply medium at very low dilution rate under continuous growth conditions.

Intact cytochrome P450e was produced continuously over an extended period of time (up to 60 generations; $D=0.07\text{ h}^{-1}$). The maximal expression level was measured at 60 nmoles g^{-1} dry weight (0.3% of total protein). The decrease of intact protein production could be accelerated by a dilution rate shift from a low dilution rate (0.07 h^{-1}) to a higher dilution rate (0.15 h^{-1}) and was paralleled by the decrease of the relative plasmid copy number.

From the results, it can be concluded that there is a rapid transition from an oxidative to an oxido-reductive glucose metabolism, due to the phosphate limitation. Hence, the physiology of *S. cerevisiae* changed under phosphate-limitation during continuous growth, which is not beneficial for heterologous gene expression.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Expression heterologer Cytochrom P450e Gene in der Hefe *S. cerevisiae* (*GRF18*) zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene molekulargenetische Konstruktionen kloniert. Einerseits wurde die 5'-deletierte cDNA des Cytochrom P450e Gens mit der Signalsequenz der sauren Hefephosphatase (PHO5) zu einer chimären Cytochrom P450e cDNA fusioniert. Andererseits wurde eine komplette Cytochrom P450e cDNA ohne PHO5 Signalsequenz kloniert. Die Expressionskassetten beider Konstruktionen wurden der Regulation des PHO5 Promotors und dessen Terminators unterstellt und auf einem Hefeexpressionsvektor (pDP34) kloniert. Mit dem PHO5 Promotor wurde die Expression der Cytochrom P450 Proteine durch die Phosphatkonzentration im Medium reguliert. Das induzierbare PHO5 Expressionssystem wurde gewählt, um die Produktion des Ratten-Cytochrom P450 Gens in der Hefe *S. cerevisiae* zu regulieren und um die Proteinexpression von der Biomassebildung abzutrennen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Expression beider Konstruktionen nur qualitativ in Schüttelkulturen untersucht. Unterschiede wurden in der Lokalisation und der Funktionalität der verschiedenen P450e gemessen. Das vollständige Cytochrom P450e Protein wurde eindeutig in den Mikrosomen nachgewiesen. Die Funktionalität des Elektronenflusses von der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase zum Cytochrom P450e wurde bestätigt. Bei der Demethylierung von 4-Nitroanisol wurde eine Umsetzungsrate von $17 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Cytochrom P450 gemessen. Das unvollständige Cytochrom P450e war weder in den Mikrosomen lokalisiert noch funktionell.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Expression beider molekulargenetischer Konstruktionen im Chemostat quantitativ untersucht. Sowohl das unvollständige wie auch das vollständige Protein wurde im Chemostat synthetisiert. Die Produktion des unvollständigen Proteins war instabil. Während der kontinuierlichen Züchtung wurde maximal $20\text{-}30 \text{ nmol g}^{-1}$ Cytochrom P450e (pro Biomasse) produziert. Die Produktion des unvollständigen Cytochroms P450e

nahm rasch ab und konnte nach 80 h Kultivation im CO-Differenzspektrum nicht mehr nachgewiesen werden. Um die Expression dieser instabilen Form zu verlängern und die totale Produktionsmenge von Cytochrom P450e zu erhöhen, wurde eine Kombination des Zulaufverfahrens mit kontinuierlicher Züchtung verwendet.

Das stabile, vollständige Cytochrom P450e wurde in kontinuierlicher Züchtung bis zu 60 Generationen exprimiert. Maximal konnten 60 nmol g^{-1} Trockengewicht (0.3% der totalen Proteinmenge) produziert werden. Die relative Plasmidkopienzahl und somit die Expression von Cytochrom P450e nahm bei hoher Verdünnungsrate (0.15 h^{-1}) rascher ab als bei niedriger Verdünnungsrate (0.075 h^{-1}).

Die erhaltenen Resultate zeigen, dass die Regulation der Expression heterologer Cytochrom P450e cDNA in *S. cerevisiae* mit dem PHO5 Expressionssystem genau untersucht werden muss. Die züchtungstechnische Nutzung der Regulation mit dem PHO5 Expressionssystem ist problematisch, weil die Phosphatlimitation zur Reprimierung des oxidativen Stoffwechsels der Hefezellen führt. Zur Verbesserung der Syntheseleistung käme der Einsatz eines Pi-Regelkreises (mit on-line Pi-Messung), eine zweistufige Auslegung der Synthese und/oder ein einstufiges Zellrückführungssystem in Frage.