

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ  
“ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ ПРОМЫШЛЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ”  
(ФГУП "ГОСНИИГЕНЕТИКА")

*На правах рукописи*

Тюрин Олег Владимирович

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ НА ОСНОВЕ  
МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ *KOMAGATAELLA KURTZMANII*

03.01.03 – Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук  
Козлов Дмитрий Георгиевич

Москва 2014

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>6</b>
<b>1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ.....</b>	<b>10</b>
1.1 Использование дрожжей для продукции рекомбинантных белков. Общие аспекты.....	10
1.2 Использование метилотрофных дрожжей для гетерологичной экспрессии.....	11
1.3 <i>Pichia pastoris</i> . Обзор основных преимуществ и ряд ограничений на применение в производстве.....	12
1.4 Современная классификация видов рода <i>Pichia / Komagataella</i> .....	16
1.5 Штаммы <i>Komagataella phaffii</i> , используемые в биотехнологии.....	18
1.6 Метаболический путь метанола в дрожжах рода <i>Komagataella / Pichia</i> .....	20
1.7 Векторы, используемые для гетерологичной экспрессии в дрожжах.....	24
1.8 Организация секреции рекомбинантных белков в клетках <i>Komagataella</i> . Сигнальные последовательности.....	26
1.9 Промотор АОХ1. Регуляция промотора АОХ1 посредством активатора транскрипции Mxr1p.....	29
1.10 Альтернативные промоторы, используемые для гетерологичной экспрессии GAP, FLD.....	30
1.11 Штаммы-продуценты на основе <i>K.phaffii</i> .....	31
1.12 Выводы из обзора источников и планирование работы.....	36
<b>2. РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ШТАММА <i>Komagataella kurtzmanii</i> Y727 (ВКПМ).....</b>	<b>37</b>
2.1 Выбор штамма.....	37
2.2 Исследование таксономических и основных фенотипических характеристик штамма ВКПМ Y727.....	39
2.3 Морфологические, физиологические и ростовые характеристики.....	42
2.4 Клонирование и анализ нуклеотидной последовательности промотора АОХ1 штаммов <i>K.kurtzmanii</i> Y-727 и <i>K.phaffii</i> GS115.....	45
2.5 Сравнительное исследование регуляции активности промоторов АОХ1, в клетках штаммов Y-727 и GS115.....	47
2.6 Клонирование и анализ нуклеотидной последовательности промоторов	

GAP штаммов <i>K.kurtzmanii</i> Y-727 <i>K.phaffii</i> GS115.....	50
2.7 Сравнительное исследование регуляции активности промоторов AOX1, GAP в клетках штаммов Y-727 и GS115.....	51
<b>3. ПОЛУЧЕНИЕ АУКСОТРОФНЫХ МУТАНТОВ.....</b>	<b>54</b>
3.1 Получение штамма <i>K.kurtzmanii</i> Y727ura3 <sup>mut</sup> .....	55
3.2 Получение штамма <i>K.kurtzmanii</i> Y727 ura3 <sup>mut</sup> his4Δ.....	57
3.3 Получение штамма <i>K.kurtzmanii</i> Y727his4Δ.....	59
3.4 Получение штамма <i>K.kurtzmanii</i> Y727arg4Δhis4Δ.....	60
3.5 Получение штамма <i>K. kurtzmanii</i> Y727ade2Δhis4Δ.....	61
3.6 Конструирование экспрессионных векторов.....	63
3.6.1 Базовый вектор Ty-URA3-AOX1.....	63
3.6.2 Базовый вектор pRH93-HIS4-AOX1.....	64
3.7 Оптимизация протокола трансформации.....	65
<b>4. ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ НА ОСНОВЕ</b>	
<b><i>K. kurtzmanii</i> Y-727.....</b>	<b>66</b>
4.1 Получение штамма <i>K.kurtzmanii</i> Y-727his4Δ/ pRH93-AOX1 <sub>Y727</sub> -HSA – продуцента человеческого сывороточного альбумина .....	66
4.2 Получение продуцента внутриклеточного белка поверхностного антигена вируса гепатита В.....	70
4.3 Получение продуцента рекомбинантного эндотелиального фактора роста (VEGF).....	72
4.4 Оценка эффективности системы экспрессии в условиях ферментации в биореакторе.....	76
5.1 Поиск альтернативного индуктора промотора AOX1.....	78
5.2 Исследование механизма индукции промотора AOX1.....	82
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>86</b>
<b>МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>87</b>
<b>6. МАТЕРИАЛЫ.....</b>	<b>87</b>
<b>7. МЕТОДЫ.....</b>	<b>87</b>
7.1 Условия культивирования <i>E.coli</i> .....	87
7.2 Методы генной инженерии.....	88

<b>7.3</b> Культивирование дрожжей.....	90
<b>7.4</b> Методы работы с белками.....	91
<b>7.5</b> Выделение и очистка VEGF.....	93
<b>7.6</b> Конструирование плазмид.....	95
<b>7.6.1</b> Конструирование плазмид pINT-G418-AOX1 <sub>Y727</sub> -LacZ; pINT-G418-AOX1 <sub>GS115</sub> -LacZ.....	95
<b>7.6.2</b> Конструирование плазмиды pURA3del.....	96
<b>7.6.3</b> Конструирование плазмиды pHIS4del.....	96
<b>7.6.4</b> Конструирование плазмиды pARG4del.....	97
<b>7.6.5</b> Получение ПЦР продуктов для комплементации мутации в гене URA3.....	97
<b>7.6.6</b> Конструирование плазмиды pADE2del.....	98
<b>7.6.7</b> Конструирование базового вектора Ty-URA3-AOX1.....	98
<b>7.6.8</b> Конструирование базового вектора pPH93-HIS4-AOX1.....	99
<b>7.6.9</b> Конструирование плазмиды pPH93-AOX1 <sub>Y727</sub> -HSA и pPH93-AOX1 <sub>GS115</sub> -HSA.....	100
<b>7.6.10</b> Конструирование плазмиды pINT-G418-GAP <sub>Y727</sub> -INU, pINT-G418-AOX1 <sub>Y727</sub> -INU и pINT-G418-GAP <sub>GS115</sub> -INU, pINT-G418-AOX1 <sub>GS115</sub> -INU.....	100
<b>7.6.11</b> Конструирование плазмид pPH93-AOX1 <sub>GS115</sub> -HbsAg и pPH93-AOX1 <sub>Y727</sub> -HBsAg.....	102
<b>7.6.12</b> Конструирование плазмид pINT-fldΔ-AOX1 <sub>Y727</sub> -LacZ; pINT-fldΔ-AOX1 <sub>GS115</sub> -LacZ.....	103
<b>7.6.13</b> Конструирование плазмиды pINT-AOX1 <sub>Y727</sub> -VEGF <sub>111b</sub> .....	104
<b>7.7</b> Получение модифицированных штаммов и штаммов-продуцентов.....	105
<b>7.7.1</b> Получение штаммов продуцентов: <i>K. kurtzmanii</i> Y-727/pINT-AOX1 <sub>Y727</sub> -LacZ ; <i>K. pfaffii</i> GS115/pINT-AOX1 <sub>GS115</sub> -LacZ.....	105
<b>7.7.2</b> Получение штаммов-продуцентов человеческого сывороточного альбумина.....	106
<b>7.7.3</b> Получение штаммов-продуцентов инулазы.....	106
<b>7.7.4</b> Получение продуцентов <i>HBsAg</i> .....	108

<b>7.7.5</b> Получение штамма-продуцента	
<i>K. kurtzmanii</i> Y727 / pINT-AOX1 <sub>Y727</sub> -VEGF <sub>111</sub> b.....	109
<b>7.7.6</b> Получение мутантных штаммов-продуцентов:	
<i>K. kurtzmanii</i> Y727/fldΔ-AOX1 <sub>Y727</sub> -LacZ; <i>K.pfaffii</i> GS115/fldΔ-AOX1 <sub>GS115</sub> -LacZ.....	110
<b>7.7.7</b> Проведение ферментации.....	111
<b>СПИСОК НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>112</b>

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы**

В настоящее время микробиологический синтез является основой для получения множества рекомбинантных белков и вакцин, используемых в различных отраслях промышленности, прежде всего в фармацевтической, пищевой, а также в ветеринарии и сельском хозяйстве. В связи с постоянным ростом спроса и увеличивающимся ассортиментом востребованных продуктов биосинтеза, растет спрос на использование и совершенствование микробиологических платформ, способных обеспечить высокоэффективный синтез рекомбинантных белков [78].

Для получения большинства из них используются гетерологичные системы экспрессии, включающие разрешённый к применению реципиентный штамм одноклеточного или многоклеточного организма, пригодного для трансформации, вектор для трансформации, включающий все необходимые элементы (селективные маркеры, промоторы, терминаторы, и т.д.), в том числе последовательность ДНК, кодирующую целевой белок; набор методик для работы с данным организмом.

Применяемые в настоящее время системы экспрессии можно подразделить на прокариотические - бактериальные, и эукариотические - на основе клеток дрожжей, мицелиарных грибов, насекомых или млекопитающих. Каждая из систем имеет свои технологические достоинства и ограничения, в основе которых лежат фундаментальные различия в транскрипции и трансляции генетического материала, в специфичности и уровне сложности протеолитических и шаперонных механизмов, а также механизмов, обеспечивающих посттрансляционные модификации целевых продуктов, включая протеолитическое процессирование, гликозилирование, фосфорилирование, формирование дисульфидных связей, цис/транс-изомеризацию остатков пролина и т.д. [1]. Использование бактериальных систем, например на основе *E.coli*, часто сопровождается необходимостью рефолдинга целевого белка (вследствие неправильного фолдинга в цитоплазме клетки и образования нерастворимых телец включения), что существенно ограничивает их применение [1]. Например, синтезированный клетками *E.coli* негликозилированный эритропоэтин (гликопротеин, стимулятор гематопоеза), стабильность и активность которого непосредственно зависит от гликозилирования, обладает значительно меньшей стабильностью по сравнению с

корректно гликозилированным эритропоэтином, секретлируемым клетками млекопитающих [2].

Основным недостатком систем экспрессии на основе клеток насекомых или млекопитающих, способных производить все необходимые посттрансляционные модификации, считается увеличение стоимости конечных продуктов в связи с необходимостью использования в производственном процессе сложного и дорогостоящего оборудования и питательных сред [3].

Использование дрожжей в качестве продуцента целевых рекомбинантных белков является компромиссным, и во многих случаях оптимальным решением. Дрожжи являются представителями эукариот и обладают способностью поддерживать большинство посттрансляционных модификаций, характерных для эукариотических клеток, а также обладают способностью к эффективной секреции белков в культуральную среду. При этом, культивирование дрожжей не требует дорогостоящего оборудования и сред, а выделение и очистка рекомбинантного белка существенно облегчена тем, что количество эндогенных секретлируемых белков дрожжей сравнительно невелико [3]. С начала 1980-х годов, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* успешно используются для биосинтеза рекомбинантных белков человеческого, животного и растительного происхождения, в особенности таких, которые трудно получить в значительных количествах из традиционных источников, либо для которых не применимы бактериальные системы экспрессии [22]. Немаловажно, что традиционные «пекарские» дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* имеют статус организмов, непатогенных для человека. Применение систем экспрессии на основе дрожжей позволяет сочетать простоту бактериальных систем и посттрансляционные модификации белка, схожие с модификациями, происходящими в клетках млекопитающих.

С начала 1990-х годов получили развитие альтернативные дрожжевые системы, основанные на метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris*, которые зарекомендовали себя более эффективными и перспективными продуцентами рекомбинантных белков, включая белки вирусов, бактерий, грибов, простейших, растений, беспозвоночных и позвоночных животных и человека, чем *S. cerevisiae* [48]. А с 2009 года, когда метилотрофные дрожжи *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) получили статус GRAS

(Generally Regarded as Safe) от организации FDA (Food and Drugs Administration, США), перспективы их использования для продукции белковых препаратов еще более возросли [66]. Однако, широкое применение данной системы в биотехнологии ограничено необходимостью использования высокотоксичного и огнеопасного метанола для индукции наиболее мощного регулируемого промотора AOX1. Другим ограничивающим обстоятельством является коммерческий статус основных штаммов, и экспрессионных векторов, распространяемых компанией Invitrogen (США).

### **Цели и задачи исследования**

Целью данной работы являлась разработка альтернативной отечественной системы экспрессии, основанной на новом штамме метилотрофных дрожжей рода *Komagataella kurtzmanii* (ВКПМ Y727).

Для достижения этой цели необходимо было решить следующие задачи:

- провести таксономические исследования нового штамма дрожжей и определить его видовую принадлежность;
- исследовать особенности регуляции генов, отвечающих за метаболизм метанола в дрожжах *Komagataella kurtzmanii*;
- провести поиск альтернативного индуктора, способного заменить высокотоксичный метанол для индукции промоторов, используемых в экспрессионных векторах;
- разработать систему экспрессии на основе оригинальной элементной базы штамма *Komagataella kurtzmanii*;
- сконструировать модельные штаммы - продуценты внутриклеточных и секретируемых рекомбинантных белков и оценить экспрессионные возможности новой системы на основе штамма дрожжей *Komagataella kurtzmanii*.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

На основе углубленных таксономических исследований установлен новый вид метилотрофных дрожжей *Komagataella kurtzmanii* ВКПМ Y-727, представляющих интерес с точки зрения биотехнологии.

Клонированы и секвенированы промоторные области генов AOX1, GAP дрожжей *K.kurtzmanii* Y-727 для регуляции гетерологичной экспрессии.

Получен набор мутантных производных базового штамма *K. kurtzmanii* Y-727, содержащих мутации в генах URA3, HIS4, ARG4 и ADE2.

Получены и охарактеризованы штаммы-продуценты модельных белков:  $\beta$ -галактозидазы *E.coli*, инулазы *Kluveromyces marxianus*, сывороточного альбумина человека (HSA), сосудисто-эндотелиального фактора роста человека (VEGF111b), поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg). Доказана высокая эффективность индуцируемого AOX1 и конститутивного промотора GAP дрожжей *K.kurtzmanii* Y-727.

Показано, что по эффективности биосинтеза гетерологичных белков продуценты на основе штамма *K.kurtzmanii* Y-727 не уступают или превосходят продуценты на основе ближайшего аналога *K.phaffii* GS115 (Invitrogen).

Найден новый безопасный индуктор промотора AOX1 – формиат. Показано, что уровень формиатной индукции промотора сравним с уровнем индукции метанолом.

Проведены исследования механизма индукции промотора AOX1.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Разработанная система экспрессии на основе метилотрофных дрожжей *K.kurtzmanii* Y-727 является эффективной и конкурентноспособной по отношению к имеющимся аналогам. Эффективность новой системы экспрессии показана на модельных штаммах-продуцентах как секретируемых так и внутриклеточных белков.

2. Новый найденный индуктор промотора алкоголь оксидазы – формиат обеспечивает сравнимый с метанолом уровень индукции.

3. Делеция гена FLD (формальдегид дегидрогеназы) увеличивает уровень индукции промотора алкоголь оксидазы в метилотрофных дрожжах в ответ на метанол и формиат.

## **1 Обзор литературных источников**

### **1.1 Использование дрожжей для продукции рекомбинантных белков.**

#### **Общие аспекты.**

Как уже было указано во введении, первые дрожжевые системы, нашедшие применение для промышленной экспрессии белков, были основаны на пекарских дрожжах-сахаромицетах. Основными факторами, повлиявшими на такой выбор стали:

1) Длительный опыт бытового и промышленного использования, который подтвердил их непатогенную природу, что зафиксировано их внесением в список безопасных для человека организмов (GRAS, Generally Regarded as Safe);

2) Сахаромицетные дрожжи стали одним из первых и базовых объектов научного исследования в областях микробиологии, генетики и молекулярной биологии, что привело к накоплению обширных знаний и разработке многочисленных и эффективных методов генетического анализа и селекции, методов генной инженерии, методов культивирования и т.д. [35].

Организация гетерологичной экспрессии в клетках дрожжей является сложным процессом и включает следующие этапы: клонирование интересующего гена в вектор, который содержит определенным образом выбранный промотор и терминатор транскрипции, трансформация дрожжевых клеток полученной векторной ДНК; селекцию трансформантов; анализ штаммов-продуцентов среди полученных трансформантов; ферментацию с целью оптимизации экспрессии и повышения выхода продукта. Уровень продукции рекомбинантного белка зависит от множества факторов, в частности: от конструкции экспрессионного вектора, которая может повлиять на эффективность трансформации; митотической стабильности плазмиды; стабильности матричной РНК; эффективности трансляции; корректного процессинга и устойчивости синтезированного рекомбинантного белка к протеолитической деградации. Очевидно, что для получения высокого выхода целевого продукта необходимо учитывать регуляцию метаболизма, процессов транскрипции, трансляции, посттрансляционной модификации и секреции белков у штаммов-продуцентов.

## 1.2 Использование метилотрофных дрожжей для гетерологической экспрессии

Несмотря на длительную и успешную практику экспрессии генов различных организмов в дрожжах *S. cerevisiae*, существует ряд определенных ограничений по использованию этих дрожжей в рамках биотехнологического крупномасштабного производства гетерологических белков. В первую очередь, это связано с тем, что промоторы генов дрожжей-сахаромицетов недостаточно сильны и для того, чтобы обеспечить уровень продукции рекомбинантных белков, сопоставимый с бактериальными системами экспрессии, необходимо использовать мультикопийные репликативные плазмиды [22, 112]. При длительном культивировании штаммов-продуцентов в промышленных ферментерах достаточно трудно обеспечить стабильное поддержание плазмиды без использования селективного давления (напр. использования дорогостоящих антибиотиков), поэтому постепенно происходит уменьшение доли клеток, синтезирующих чужеродный белок, что приводит к относительно низкому выходу продукта [67]. Существенным недостатком дрожжей *S. cerevisiae* является гипергликозилирование секретируемых гетерологических белков, что может сопровождаться изменением свойств белка, обуславливать его нежелательную иммуногенность и ограничивать применение подобных рекомбинантных белков в фармацевтической промышленности [68].

В этой связи использование альтернативных видов дрожжей для синтеза гетерологических белков позволяет сохранить достоинства системы экспрессии на базе эукариотических одноклеточных микроорганизмов (культивирование на относительно простых средах, возможность использования методов молекулярной генетики и генной инженерии, обеспечение корректной посттрансляционной модификации синтезированных рекомбинантных белков и их секреции) и при этом одновременно избавиться от основных недостатков, характерных для дрожжей-сахаромицетов.

В настоящее время в биотехнологии используют дрожжи *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* [22]. Дрожжи *P. pastoris*

оказались эффективными продуцентами белков вирусов, бактерий, грибов, простейших, растений, беспозвоночных и позвоночных животных и человека [48].

Интерес к продукции рекомбинантных белков с использованием систем экспрессии, основанных на метилотрофных дрожжах, в частности, рода *Pichia* (*Komagataella*) или *Hansenula* [6] основан на ряде преимуществ этих систем как с научной, так и с технологической точки зрения.

### **1.3 *Pichia pastoris*. Обзор основных преимуществ и ряд ограничений на применение в производстве.**

Дрожжи *Komagataella phaffii* (ранее *P. pastoris*) принадлежат к метилотрофным дрожжам, способным использовать метанол в качестве единственного источника углерода и энергии.

Изначально, интерес к метилотрофным дрожжам *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* [47], был связан с поиском источников относительно недорогого кормового белка. В связи с этим, в середине 1970-х годов в рамках проекта SCP (Single Cell Protein) компания Philips Petroleum Company разработала специальные среды и технологии длительного культивирования дрожжей *P. pastoris* в ферментерах объемом 1500 литров, позволившие получать более 130 граммов сухой биомассы из литра культуральной среды, что существенно превышало возможности дрожжей *S. cerevisiae*. Однако, после существенного повышения рыночных цен на метан, используемый для синтеза метанола – дешевого субстрата для метилотрофных дрожжей, проект SCP стал невыгодным. В начале 80-х годов прошлого века компания Philips Petroleum заключила договор с институтом SIBIA (Salk Institute Biotechnology / Industrial Associate Inc., La Jolla, California) на разработку системы гетерологичной экспрессии на основе дрожжей *P.pastoris*. А в 1993 году Philips Petroleum продала разработку компании RCT, и передала лицензию компании Invitrogen (USA) на компоненты системы. В настоящее время компания Invitrogen является обладателем прав на все штаммы производные штамма *P.pastoris* NRRL Y-11431. Впоследствии, данный вид был отнесен к отдельному роду *Komagataella*, о чем изложено подробнее в отдельной главе, поэтому в тексте будет встречаться также и название вида по новой классификации.

Учитывая преимущества перед традиционными дрожжами сахаромикетами, выявленные в процессе разработки проекта «Single Cell Protein», использование метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* получило дальнейшее развитие в виде системы гетерологичной экспрессии [1].

Одним из таких преимуществ является способность метилотрофных дрожжей вырастать до более высоких плотностей по сравнению с традиционно-используемыми дрожжами *S.cerevisiae*, что позволяет получить более высокий уровень продукции целевого белка [5]. При этом, процесс культивирования проще, поскольку рост метилотрофных дрожжей не блокируется продуктами метаболизма [48], тогда как например, в процессе ферментации дрожжей-сахаромикетов их рост может блокироваться этанолом, продуктом ферментации глюкозы. Дрожжи *P. pastoris* способны расти до очень большой оптической плотности клеточной суспензии, используя несбраживаемые источники углерода – глицерин, метанол, что в значительной мере определяет высокий уровень продукции гетерологичных белков [48].

Другим важнейшим преимуществом является наличие у метилотрофных дрожжей одного из самых мощных в природе промоторов, отвечающего за регуляцию транскрипции гена алкоголь оксидазы АОХ (в некоторых дрожжах МОХ, метанол оксидазы), контролирующего первую стадию утилизации метанола [3].

Наиболее часто для организации экспрессии гетерологичных белков в дрожжах *P.pastoris* используются промотор АОХ1 (промотор алкоголь оксидазы), GAP (промотор глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназы), FLD (промотор формальдегид дегидрогеназы), FDH (промотор формиат дегидрогеназы), DHAS (дигидроксиацетон синтазы) [9]. Среди них только GAP считается конститутивным промотором, активность которого практически не изменяется при росте культуры на многих субстратах, включая глицерин, глюкозу [79]. Известно, что промоторы АОХ1, FLD и FDH индуцируются в ответ на присутствие в питательной среде метанола или олеата. При росте культуры на глицерин- или глюкозо-содержащей среде, перечисленные промоторы репрессированы [11].

Привлекательность промотора AOX1 заключается не только в его высокой активности, но и в его строгой регуляции, которая является важным фактором при экспрессии целевых генов, кодирующих токсичные для клетки белки [12]. В отличие от некоторых сильных промоторов *S.cerevisiae*, например PGK1 [28], который индуцирован на глюкозе, но имеют базальный уровень экспрессии на ацетате и пирувате - промотор AOX1 полностью репрессирован при росте на средах, содержащих такие репрессирующие субстраты, как глюкоза, глицерин или этанол [12]. Более подробно регуляция промотора AOX1 будет рассмотрена в главе 1.9. При этом, можно провести аналогию с промотором гена галактокиназы (GAL1) в дрожжах *S.cerevisiae*, регуляция которого также зависит от присутствия, либо отсутствия индуктора и репрессирующих субстратов. Так, в случае присутствия в среде глюкозы, промотор полностью репрессирован; при отсутствии глюкозы – дерепрессирован, при этом уровень активности GAL1 составляет 0.3% от уровня полной активации промотора на галактозе [26].

Еще одним существенным преимуществом метилотрофных дрожжей *P.pastoris* является уровень и качество N-гликозилирования белков. Так, в белках, секретируемых клетками *P.pastoris*, размер углеводных цепочек составляет в среднем 8-12 остатков маннозы, и концевым остатком является низкоиммуногенный  $\alpha$ -1,2 маннозный остаток, тогда как сахаромицеты секретируют обычно гораздо более тяжело гликозилированный белок, содержащий до 100-150 остатков на одну цепочку, концевым остатком в которой оказывается высокоиммуногенный  $\alpha$ -1,3 маннозный остаток [61]. Помимо «корового» гликозилирования – 3 разветвленных маннозных остатка, ковалентно-связанных с амидной группой аспарагина через 2 остатка N-ацетилглюкозамина, сахаромицеты часто осуществляют, так называемое, гипергликозилирование (маннозное) белков. Гипергликозилирование заключается в последовательном ( $\alpha$ -1,6-) и разветвленном ( $\alpha$ -1,2-) присоединении около 200-300 маннозных остатков в аппарате Гольджи. Специфическим сайтом N-гликозилирования считается аспарагин, расположенный в триplete Asn-Xaa-Ser/Thr, где Xaa – любой аминокислотный остаток, за исключением пролина. Частота же гипергликозилирования, по-видимому, зависит от конкретного аминокислотного

остатка Хаа, а также от последовательности аминокислотных остатков, расположенных рядом с данным триплетом, и до сих пор является предметом дискуссий [10].

Таким образом, использование метилотрофных дрожжей для гетероэкспрессии позволяет избежать сложности, связанные с получением гипергликозилированных белков. С помощью экспрессионных систем на различных метилотрофных дрожжах, получено множество рекомбинантных белков как для фармацевтического, так и промышленного применения: поверхностный антиген гепатита В (субстанция для вакцины), антистатин, эпидермальный ростовой фактор, гирудин,  $\alpha$ 1-урокиназа, эндотелиальный ростовой фактор, фитаза и др. [3]. Первый разрешенный к использованию продукт получил регистрацию FDA (Food and Drug Administration, США) в декабре 2009 года.

Существует много видов метилотрофных дрожжей рода *Komagataella (Pichia)*, задепонированных в различных коллекциях: Пфаффа (университет Калифорнии), NRRL (Вашингтон, США), CBS (Утрехт, Нидерланды), ВКПМ (ГосНИИгенетики, РФ) и др. Наиболее часто используемыми в биотехнологии, а также в качестве моделей для изучения метилотрофных дрожжей рода *Komagataella (Pichia)* являются штаммы *Komagataella pfaffii* GS115 (NRRL Y-48124, фенотип his<sup>-</sup>; Invitrogen, США), KM71 (фенотип his<sup>-</sup>, Mut<sup>S</sup>) Данные штаммы являются производными дикого штамма X-33 (NRRL Y-11430) и широко используются в качестве экспрессионной системы, в биотехнологии [4]. Более подробно о классификации часто используемых штаммов будет изложено в главе 1.4 и 1.5.

При использовании штамма GS115 получены такие продукты как гранулоцит-колониестимулирующий фактор в количестве до 131 мг на 1 л культуральной жидкости [6], рекомбинантный хепсидин в количестве до 100 мг на 1 л культуральной жидкости [7], рекомбинантный ангиостатин в количестве 20 мг на 1 литр осветленной культуральной жидкости [27]. В качестве примера использования данного штамма для продукции ферментов промышленного назначения можно упомянуть продуцента фитазы [21].

Как уже указывалось во введении, важным недостатком при использовании данного штамма является необходимость использования метанола (который является токсичным и легко-воспламеняющимся веществом [53, 54]) в качестве индуктора, для активации экспрессии гена целевого белка, находящегося под контролем промотора АОХ1. В России санитарно-гигиенические требования к организации и проведению работ с метанолом накладывают серьезные ограничения на использование данного вещества в биотехнологическом производстве [53]. Например, в цехах на производствах и других подразделениях предприятия, применяющих метанол, количество метанола не должно превышать суточную потребность, а для хранения запасов должны использоваться специально оборудованные помещения. Предельно допустимая концентрация метанола в воздухе рабочей зоны равна 5 мг/куб.м, что, для сравнения, ниже соответствующей нормы для этанола в 100 раз. Производственные процессы с применением метанола или веществ, содержащих метанол, должны быть полностью герметизированы и исключать возможность контакта работающих с метанолом. В производствах, где применяется метанол, должен осуществляться систематический контроль за состоянием воздушной среды в соответствии с санитарными правилами [53].

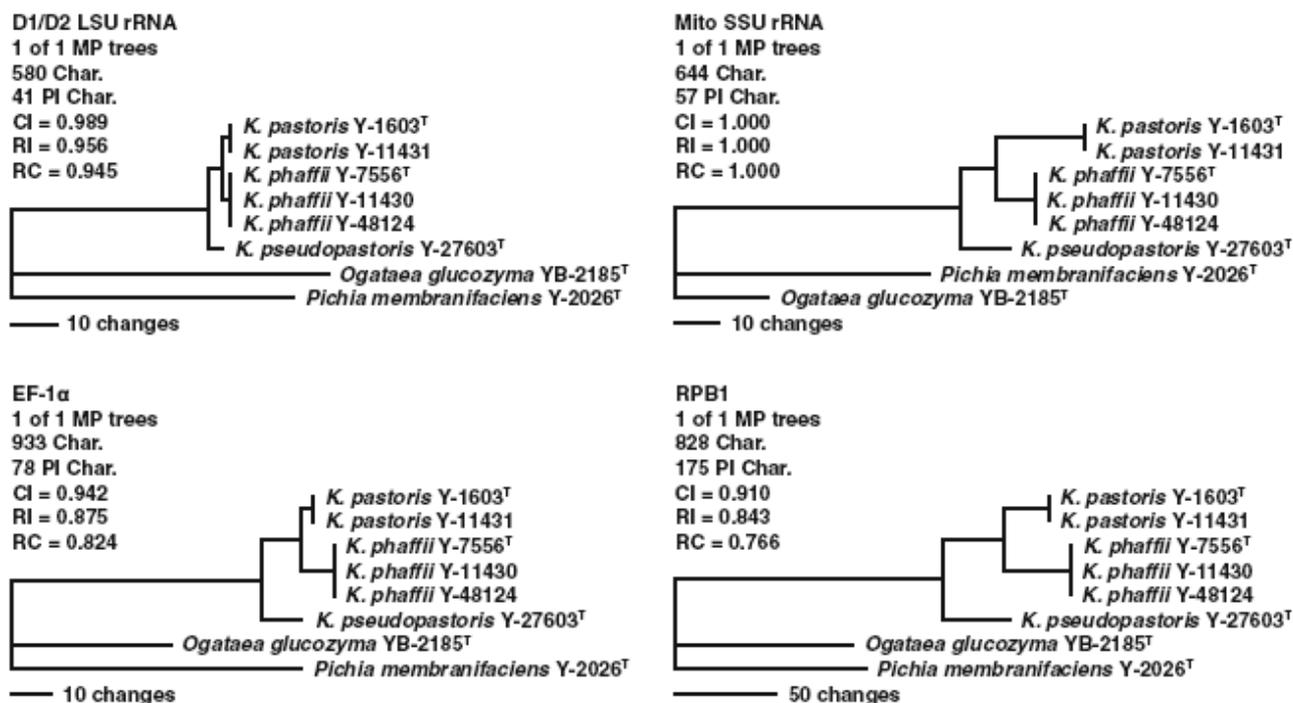
Строгое соблюдение всех этих условий на биотехнологическом производстве делает нерентабельным использование штаммов *P. pastoris*. В связи с этим, представляется важным найти решение, которое, с одной стороны, позволило бы использовать метилотрофные дрожжи для продукции целевого белка под контролем мощного промотора АОХ1; а с другой стороны, позволило бы не использовать метанол в качестве индуктора для экспрессии генов этого белка.

#### **1.4 Современная классификация основных видов рода *Pichia* / *Komagataella***

Кроме коллекции NRRL (Northern Regional Research Laboratories, IL, USA), в которой с 1981 года депонированы штаммы Y-7556, Y-11430, Y11431, известным источником дрожжевых штаммов является коллекция Пфаффа (Phaff Yeast Culture Collection (University of California), которая насчитывает на сегодняшний день 30 штаммов дрожжей *Komagataella* (*Pichia*). Используемый в настоящей работе

штамм был получен из коллекции ВКПМ, в которой с 1985 года он хранится в открытом доступе под номером Y-727. Штамм был выделен из сока пихты в горах Каталина на юге штата Аризона (США) и хранится в коллекции Пфаффа под номером 76-20.

Изначально данные представители метилотрофных дрожжей, NRRL Y-11430 и Y-727, были отнесены к роду *Pichia*, но начиная с 1994 года была предложена новая классификация для этого рода [69], [70], которая, основываясь на филогенетическом анализе участков генов 18S, 26S рибосомальной РНК, относила данный род к новому роду *Komagataella*. К 2005 году данная классификация была окончательно принята и подтверждена другими работами [71], [72], которые для филогенетического анализа использовали также сравнение по дополнительным геномным локусам: митохондриальной малой субъединицы рибосомальной РНК, фактору элонгации трансляции EF-1 $\alpha$ , субъединицы RPB1 РНК полимеразы II (Рис. 1).



**Рисунок 1. Филогенетический анализ видов рода *Komagataella* [72].** Обозначения: D1/D2 LSU rRNA – анализ по нуклеотидной последовательности 18S и 26S рибосомальной РНК; EF-1 $\alpha$  - анализ по нуклеотидной последовательности фактора элонгации трансляции; Mito SSU rRNA – анализ по нуклеотидной последовательности митохондриальной малой субъединицы рибосомальной РНК; RPB1 – анализ по нуклеотидной последовательности субъединицы RPB1 РНК полимеразы II; Шкала внизу каждой схемы (\_\_\_ N changes) графически отображает количество различающихся нуклеотидов

в анализируемой последовательности на горизонтальных ветвях графика. Тем самым, показана степень родства между анализируемыми видами.

Штамм NRRL Y-7556 является типовым штаммом вида *Komagataella phaffii*, т.е. данный штамм является эталонным при молекулярно-генетический анализе [72]. В результате данного анализа было установлено, что все нуклеотидные последовательности, используемые для анализа, были идентичны для всех трех штаммов: NRRL Y-7556, Y-11430 и Y48124. Тем самым подтверждается принадлежность этих штаммов к виду *Komagataella phaffii*. Штаммы Y-11430 и Y48124 (GS115) защищены патентом №4 414 329 (США) и являются собственностью компании Invitrogen (США).

### **1.5 Штаммы *Komagataella phaffii*, используемые в биотехнологии**

На сегодняшний день известно множество штаммов, являющихся производными дикого штамма *Komagataella phaffii* X-33 (NRRL Y-11430). Штамм *Komagataella phaffii* GS115 (NRRL Y-48124), наиболее часто использующийся в исследованиях, полученный из штамма X-33 путем мутагенеза и отбора мутантных штаммов по гену HIS4 (гистидинолдегидрогеназы), обладает фенотипом His<sup>-</sup>, что позволяет отбирать трансформантов на минимальной среде без гистидина [73]. Данный штамм, как и все его производные, а также генетические элементы (промотор AOX1, ген HIS4), клонированные в экспрессионные вектора, являются собственностью компании Invitrogen (США), и могут быть использованы только для исследовательских целей, что, очевидно, накладывает ограничения на биотехнологическое применения данного штамма.

Другим, часто используемым штаммом является KM71 (*his4 arg4 aox1Δ::ARG4*), полученный в результате делетирования гена AOX1 кассетой, содержащей ген ARG4 от *S.cerevisiae*. [73]. Данный штамм обладает, так называемым фенотипом Mut<sup>s</sup> (*methanol utilisation slow*). Вследствие того, что алкогольоксидаза 1 (Aox1p) обладает значительно более высокой активностью по сравнению с алкогольоксидазой 2 (Aox2p), данный штамм очень медленно растет на метаноле. Было показано, что при использовании данного штамма в качестве реципиента можно получить более высокий выход продукта [74].

Штамм MC100-3 (*his4 arg4 aox1Δ::SARG4 aox2Δ::his4*), в котором удалены оба гена алкогольоксидазы AOX1 и AOX2, и, таким образом, имеющий фенотип Mut<sup>-</sup> His<sup>-</sup>, используется в качестве реципиента. У данного штамма полностью утрачена способность расти на метаноле [75].

Иногда, при культивировании в ферментерах, где достигается высокая плотность биомассы, происходит частичный лизис клеток, с последующим высвобождением эндогенных протеолитических ферментов. С целью уменьшить протеолитическую деградацию секретируемых в культуральную среду белков, были получены мутантные штаммы по некоторым протеазам. Например, штаммы SMD1163 (*his4 pep4 prb1*), SMD1165 (*his4 prb1*), SMD1168 (*his4 pep4*) обеспечивают более стабильные условия для секреции рекомбинантных белков в культуральную среду. Ген вакуольной пептидазы А (*pep4*), отвечает за активацию карбоксипептидазы Y и протеиназы В. Протеаза В (ген *PRB1*) до процессинга протеиназой Y обладает примерно половиной активности. Поэтому у мутантов *pep4* сильно снижена активность протеиназы А и карбоксипептидазы Y, и частично снижена активность протеазы В, в то время, как у двойных мутантов *pep4prb1* практически отсутствует активность всех трех протеаз [75].

В таблице 1 приведена более полная, сводная информация, включающая название штамма, его генотип, фенотип.

**Таблица 1. Перечень генотипов и фенотипов некоторых штаммов *Komagataella phaffii*, производных дикого типа X-33 (NRRL-11430).**

Штамм	Генотип	Фенотип
SMD1168	<i>his4, pep4</i>	Mut <sup>+</sup> , His <sup>-</sup> , pep4 <sup>-</sup>
GS115	<i>his4</i>	Mut <sup>+</sup> , His <sup>-</sup>
KM71	<i>his4, aox1::ARG4, arg4</i>	Mut <sup>s</sup> , His <sup>-</sup>
X33	<i>Дикий тип</i>	
SMD1165	<i>his4, prb1</i>	Mut <sup>+</sup> , His <sup>-</sup> , prb1 <sup>-</sup>
SMD1163	<i>his4, prb1, pep4</i>	Mut <sup>+</sup> , His <sup>-</sup> , pep4, prb1 <sup>-</sup>

MC100-3	<i>Arg4his4aox1Δ::ScARG4,</i> <i>aox2Δ::Phis4</i>	Mut <sup>-</sup> , His <sup>-</sup>
---------	--	-------------------------------------

При выборе штамма для гетероэкспрессии руководствуются как свойствами определенного мутанта, так и целевого продукта, который необходимо получить.

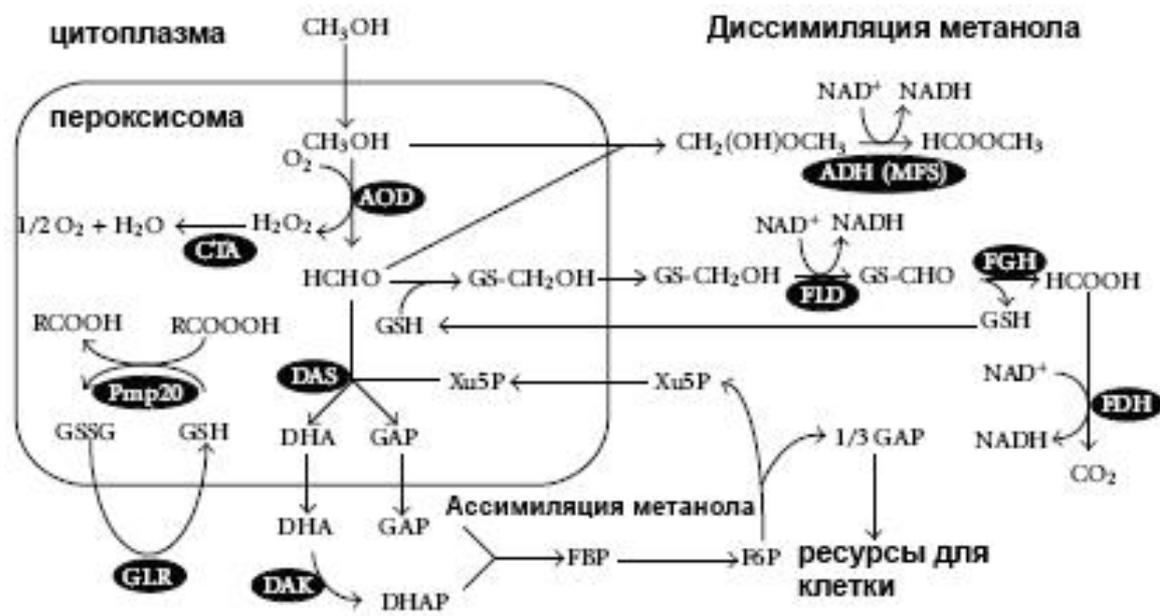
### 1.6 Метаболический путь метанола в дрожжах рода *Komagataella (Pichia)*

Как уже было указано в главе 1.3, метилотрофные дрожжи способны утилизировать метанол в качестве единственного источника углерода. Поскольку метанольная регуляция в метилотрофных дрожжах является ключевым моментом с точки зрения использования мощных промоторов ферментов, участвующих в метаболизме метанола, особое внимание можно уделить рассмотрению деталей этой регуляции.

На сегодняшний день известны два метаболических пути утилизации метанола: диссимиляционным и ассимиляционным. Как иллюстрирует схема приведенная на рис.1, первую реакцию окисления метанола катализирует алкогольоксидаза 1, Aox1p, кодируемая геном AOX1. Локализованная в пероксисоме алкогольоксидаза 1 является октамером и состоит из 8 идентичных субъединиц, содержит FAD в качестве кофактора [55]. В результате окисления метанола алкогольоксидазой образуются формальдегид и пероксид водорода. Пероксид водорода является субстратом для пероксисомной каталазы и расщепляется на воду и кислород. На этапе образования формальдегида метаболический путь утилизации метанола образует две ветви: ассимиляционный путь и диссимиляционный.

Часть формальдегида переходит в цитоплазму для дальнейшего окисления по диссимиляционному пути, а часть остается в пероксисоме, вступает в реакцию конденсации с ксилулозо-5-фосфатом, который транспортируется в пероксисому возможно посредством активного транспорта. Реакцию формальдегида с ксилулозо-5-фосфатом катализирует пероксисомальная дигидроксиацетонсинтаза, и эта реакция является первой в ассимиляционном пути [56]. Продукты этой реакции глицеральдегид-3-фосфат (GAP) и дигидроксиацетон (DHA) покидают пероксисому.

В цитоплазме GAP окисляется по гликолитическому пути до пирувата и далее в форме ацетил-КоА включается в цикл Кребса. Кроме того, GAP совместно с ДНА участвует в синтезе ксилулозо-5-фосфата. Сначала ДНА при помощи дигидроксиацетонкиназы превращается в дигидроксиацетон-фосфат (ДНАР), который вступает в реакцию конденсации с GAP, катализируемую альдозазой фруктозо-1,6-дифосфата [57]. В результате этой реакции фруктозо-1,6-дифосфат подвергается дефосфорилированию фруктозо-1,6-дифосфатазой, что приводит к образованию фруктозо-6-фосфата, который в серии последующих реакций, катализируемых транс кетолазой, трансальдозазой, рибозо-5-фосфатизомеразой рибулозо-5-фосфатизомеразой, превращается в ксилулозо-5-фосфат [58]. Примерно треть образовавшегося GAP расходуется на формирование клеточной массы. Остальная часть возможно участвует в образовании АТФ через цикл трикарбоновых кислот и окислительное фосфорилирование для поддержания энергетического баланса клетки (рис.2) [59].



**Рисунок 2. Метаболический путь утилизации метанола.** Условные обозначения: AOD (AOX) – алкогольоксидаза; CTA – каталаза; FLD – формальдегид дегидрогеназа; FGH – S-формилглутатионгидролаза; FDH – формиатдегидрогеназа; DAS – дигидроксиацетонсинтаза; DAK – дигидроксиацетонкиназа; GLR – глутатионредуктаза; GS-CH<sub>2</sub>-OH – S-гидроксиметилглутатион; GS-CHO – S-формилглутатион; GSH – глутатион восстановленный; GSSG – глутатион окисленный; DHA –

дигидроксиацетон; Xu5P – ксилулозо-5-фосфат; RCOOOH – алкил-гидропероксид; GAP – глицеральдегид-3-фосфат; F6P – фруктозо-6-фосфат; FBP – фруктозо-1,6-дифосфат.

В диссимиляционном пути часть формальдегида, полученного в результате окисления метанола, транслоцируется в цитоплазму, в виде S-гидроксиметилглутатиона, который возникает в результате некатализируемой реакции восстановленного глутатиона и формальдегида (рис. 2). Попадая в цитоплазму, S-гидроксиметилглутатион подвергается дальнейшему окислению NAD<sup>+</sup>-зависимой формальдегид дегидрогеназой. Образующийся в ходе реакции S-формилглутатион является нестабильным соединением и в водных растворах произвольно гидролизуется до формиата и GSH [60].

Далее S-формилглутатион гидролизуется до муравьиной кислоты и глутатиона S-формилглутатионгидролазой. Последний этап диссимиляции метанола, NAD-зависимое окисление формиата до углекислого газа, катализирует формиатдегидрогеназа. Две молекулы NADH, получающиеся в результате диссимиляционного пути утилизации метанола эквивалентны четырем молекулам АТФ образующимся в результате окислительного фосфорилирования в митохондриях. Таким образом, можно сказать, что энергетический эквивалент диссимиляции метанола равен четырем молекулам АТФ [62].

У метилотрофных дрожжей, растущих на метаноле, наблюдается высокая активность цитоплазматических дегидрогеназ формальдегида и формиата, а активность большинства ферментов цикла Кребса ниже, чем при росте на полиуглеродных субстратах [61]. Эти данные позволяют говорить о том, что в условиях роста на метаноле основная часть NADH, необходимого для синтеза АТФ, образуется вне митохондрий. С другой стороны, мутантные штаммы *H. polymorpha* с разрушенными генами FLD1 (кодирует формальдегиддегидрогеназу) и FDH1 (кодирует формиатдегидрогеназу) демонстрировали такую же способность к росту на метаноле, как и дикий тип. Учитывая, что в результате работы этих ферментов генерируются две молекулы NADH, можно предположить, что работа цикла трикарбоновых кислот является необходимой также и в условиях роста на метаноле, и что диссимиляционный путь утилизации метанола может выполнять скорее функцию детоксификации, нежели функцию генерации энергии в виде NADH [59]. В пользу последнего утверждения

свидетельствует также и то, что энергия, полученная в результате диссимилиации метанола в цикле трикарбоновых кислот равняется 5,3 моль в эквиваленте АТФ в расчете на 1 моль метанола, что больше в сравнении с 4 моль АТФ, полученные в результате прямой, окислительной диссимилиации метанола [62].

В связи с тем, что внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для NADH, возникает проблема окисления восстановленного кофермента. В настоящее время неизвестно, каким образом происходит окисление цитоплазматического NADH в клетках дрожжей *P. pastoris*. Возможно, у них существуют альтернативные митохондриальные NADH-дегидрогеназы, аналогичные Nde1p, Nde2p *S. cerevisiae* [76], которые обнаружены у большинства грибов и растений [77]. Активные центры этих ферментов обращены в межмембранное пространство, поэтому они способны окислять внемитохондриальный NADH и обеспечивать транспорт электронов молекуле убихинона. Передача электронов от цитоплазматического NADH в митохондриальную цепь переноса электронов может, вероятно, осуществляться при помощи челночного механизма, например, глицерофосфатного. В этом случае NADH реагирует в цитоплазме с ДНА-фосфатом, в результате реакции, которую катализирует глицерофосфатдегидрогеназа, образуется 3- глицерофосфат, легко проникающий в митохондрии. При помощи фермента, глицерофосфатдегидрогеназы, GAP окисляется до ДНА-фосфата, который возвращается в цитоплазму, а восстановленный флавопротеид передает приобретенные электроны убихинону [61].

Нарушение диссимилиационного пути утилизации метанола может приводить к замедленному росту клеток на данном субстрате. Например, делеция гена AOX1 приводит к проявлению фенотипа *mut<sup>s</sup>* (methanol utilization slowly) [109]. Медленный рост обусловлен действием фермента, кодируемого геном AOX2, который обладает значительно меньшей активностью в сравнении с алкогольоксидазой Aox1p. В случае делеции двух генов, отвечающих за окисление метанола до формальдегида – AOX1 и AOX2 – проявляется фенотип *mut<sup>r</sup>*. При этом клетки не способны утилизировать метанол [109].

Было показано, что делеция гена FLD, кодирующего формальдегид дегидрогеназу, также приводит к отсутствию роста клеток на метаноле, что обусловлено накоплением токсичного для клетки формальдегида [84, 85].

### **1.7 Векторы, используемые для гетерологичной экспрессии в дрожжах**

Для гетерологичной экспрессии в традиционных дрожжах используют репликативные, центромерные плазмиды а также интегративные векторы. Все векторы включают следующие элементы: селективные, промоторные участки, обеспечивающие транскрипцию целевого гена, сам целевой ген, терминаторные области для обеспечения терминации транскрипции.

Одним из очевидных условий применения какой-либо экспрессионной системы для гетерологичной экспрессии является наличие способа отбора трансформантов. Для отбора пользуются отличительными фенотипическими признаками, которые приобретают трансформанты вместе с новым генотипом. Это может быть устойчивость к какому-либо антибиотику, определенная ферментативная активность (напр.  $\beta$ -лактамазы, или  $\beta$ -галактозидазы, позволяющая визуально определить трансформантов); либо комплементация определенной ауксотрофности соответствующими селективными маркерами. Для биотехнологического применения штамма реципиента предпочтительнее более экономичный способ, который не предусматривает применения дорогостоящих антибиотиков или субстратов. Соответственно, выбранный нами для гетерологичной экспрессии дикий штамм ВКПМ Y-727 было необходимо модифицировать для того, чтобы иметь возможность отбирать трансформантов по комплементации определенных ауксотрофностей. Для этого необходимо привнести в данный штамм мутации, чтобы обеспечить ауксотрофность штамма по ряду субстратов. Например, мутанты по гену URA3, кодирующему ородитиндегидрогеназу, утрачивают способность синтезировать урацил, соответственно расти на средах без добавления урацила. Таким образом, используя данный фенотип, можно легко отбирать трансформанты по комплементации данной ауксотрофности геном URA3, клонированным в вектор для трансформации.

Для конструирования и амплификации плазмиды в клетках бактерий векторы включают в себя также бактериальный репликон, гены устойчивости к

соответствующему антибиотику в клетках *E.coli*. Репликативные векторы несут в своем составе последовательности хромосом дрожжей, способные к автономной репликации (ARS). В состав репликативных векторов входит фрагмент природной плазмиды дрожжей-сахаромицетов (2 мкм ДНК), который отвечает за репликацию плазмиды в клетках дрожжей. В метилотрофных дрожжах существуют аналогичные последовательности ARS (PARS), которые входят в состав репликативных плазмид [49]. Например, это могут быть последовательности хромосом дрожжей, способные поддерживать автономную репликацию PARS1 или PARS2 [13].

Стабильность вектора можно значительно повысить, включив в его состав одну из центромерных последовательностей хромосом дрожжей. Такие векторы ведут себя как минихромосомы и в этом случае потери плазмиды составляют менее 5% за одну генерацию. Однако количество копий такой плазмиды падает до 1-2 на клетку [50]. Поэтому их целесообразно использовать для клонирования тех генов, высокий уровень экспрессии которых может оказаться токсичным для клетки дрожжей.

Репликативные плазмиды чаще всего используют для экспрессии чужеродных генов в дрожжах *S. cerevisiae*. Для конструирования и амплификации плазмиды в клетках бактерий, в состав конструкции входят бактериальный репликон и гены устойчивости к соответствующему антибиотику. Для контроля экспрессии целевого гена, также входящего в конструкцию (с предварительно оптимизированным профилем используемых кодонов), используются, например, промоторы генов, кодирующих гликолитические ферменты, либо ферменты метаболического пути утилизации метанола. Количество репликативных плазмид в клетке зависит от используемой последовательности ARS. Например, репликативные векторы с фрагментом 2 мкм плазмиды в качестве ARS поддерживаются в клетке в количестве 200-400 копий. При длительном культивировании не представляется целесообразным применение таких плазмид из-за их митотической нестабильности. Частота потери плазмиды достаточно велика при каждой генерации, и составляет порядка 20% [23].

Наряду с репликативными векторами, также используются интегративные векторы, которые также содержат селективные маркеры, и необходимые элементы (бактериальный репликон, гены устойчивости к соответствующему антибиотику) для

конструирования и амплификации плазмиды в клетках бактерий. Наличие в составе такого вектора последовательности гена рибосомальной РНК или Ту-транспозона, которые присутствуют в геноме дрожжей в количестве 140 и 30-40 копий, соответственно, позволяет получать множественные встройки интересующего гена [25]. Уровень продукции гетерологичного белка при использовании таких мультикопийных интегрантов может быть выше, чем у трансформантов, несущих много копий репликативных плазмид [51]. Интегративные векторы чаще используют для трансформации метилотрофных дрожжей, в частности *K.phaffii* [13]. Целевой ген и регуляторные элементы, отвечающие за регуляцию его экспрессии также входят в состав вектора. Отличительной особенностью данных векторов является наличие флангов – нуклеотидных последовательностей (50-250 п.о.), ограничивающую с двух сторон интегрируемую часть плазмиды, которые направляют интеграцию предварительно линейаризованной плазмиды в определенный локус генома посредством гомологичной рекомбинации. Полученные в результате трансформации такими конструкциями интегранты значительно стабильнее. Соответственно, при культивировании в неселективных условиях на богатых средах частота потери вектора составляет не более 1% на одну генерацию [24]. Количество копий встроившихся в геном векторов зависит как от локуса, в который направляется интеграция (и соответственно используемых флангов), так и от количества ДНК, используемой для трансформации – т.к. вероятно встраивание по схеме «голова в хвост» нескольких копий фрагментов вектора [25].

## **1.8 Организация секреции рекомбинантных белков в клетках *Pichia*.**

### **Сигнальные последовательности.**

Одним из очевидных преимуществ дрожжевых систем экспрессии перед бактериальными является способность дрожжей к эффективной секреции белков в культуральную среду. Многие рекомбинантные белки, продуцируемые в дрожжевых культурах, являются секреторными и способны приобрести нативную конформацию в результате определенных посттрансляционных модификаций, которые возможны только при прохождении секреторного пути. Секреция гетерологичного белка значительно упрощает его очистку, а также позволяет избежать возможного

токсического влияния продукта на клетку дрожжей. Существуют многочисленные примеры успешного использования дрожжей для продукции секреторных белков (легких цепей антител, рецептора эритропоэтина, тромбомодулина, желудочной липазы, коллагеназы фибробластов, интерлейкина 8, интерферона  $\alpha$ ) [40].

Возможность секреции того или иного белка у дрожжей, как и у высших эукариота, определяется наличием на N-конце дополнительной аминокислотной последовательности, получившей название сигнальной или лидерной. Именно эта последовательность обеспечивает последовательную транслокацию секреторного белка в эндоплазматический ретикулум (ЭР), аппарат Гольджи (АГ), секреторные везикулы, на поверхность клетки. В процессинге секреторных белков дрожжей и гетерологичных белков непосредственное участие принимают протеазы. Сразу после транслокации полипептидной цепи в полость ЭР происходит отщепление сигнальной последовательности или, в случае использования лидерного пептида, например,  $\alpha$ -фактора, про-последовательности при помощи сигнальной пептидазы (КФ 3.4.21.89), которая находится на внутренней стороне мембраны ЭР. Сигнальная пептидаза дрожжей представляет олигомерный комплекс, состоящий из четырех субъединиц 13, 18, 20 и 25 кДа. Эффективность удаления лидерной области является необходимым условием эффективной секреции, т.к. в противном случае в основном гидрофобная последовательность аминокислотных остатков, образующих лидерную область может препятствовать секреции и быть причиной неправильного фолдинга.

Для секреции гетерологичных белков эффективно используют пре-про-пептид  $\alpha$ -фактора, который обеспечивает посттрансляционную транслокацию полипептидных цепей в ЭР [41]. Зрелый  $\alpha$ -фактор, состоящий из 13 аминокислот, является феромоном, который секретируют клетки дрожжей *S. cerevisiae*, принадлежащие к  $\alpha$ -типу спаривания. Ген MF $\alpha$ 1 кодирует структуру пре-про- $\alpha$ -фактора, белка, состоящего из 165 аминокислот, включающего сигнальную (пре-) последовательность (19 аминокислот), про-последовательность с тремя сайтами N-гликозилирования (66 аминокислот), четыре повтора зрелого  $\alpha$ -фактора (13 аминокислот). Перед каждым повтором находится короткий спейсерный пептид лизин - аргинин - (глутаминовая кислота / аспарагиновая кислота - аланин). При процессировании пре-про- $\alpha$ -фактора

участвуют четыре различных протеазы: сигнальная пептидаза отщепляет 19 аминокислот пре-области, Kex2p эндопротеаза (3.4.21.61) гидролизует пептидные связи между карбоксильной группой аргинина и аминогруппой глутаминовой (аспарагиновой) кислоты в спейсерных пептидах, в результате образуется про- область и четыре фрагмента, содержащих последовательность  $\alpha$ -фактора. Далее,  $\alpha$ -фактор подвергается расщеплению дипептидиламинопептидазой Stel3p (3.4.14.1), которая удаляет повторы глутаминовая (аспарагиновая) кислота - аланин на N-конце пептида, и карбоксипептидазой Kex1p (EC 3.4.16.4), которая отщепляет остатки лизина и аргинина на C-конце первых трех повторов  $\alpha$ -фактора [42].

Также, для получения секретируемых гетерологичных белков в клетках *K.phaffii* используют и другие лидерные последовательности, среди которых встречаются про-область кислой фосфатазы (PHO), инвертазы (SUC2), а также белков теплового шока (напр. hsp150). Часто секреция является лимитирующим фактором при продуцировании клеткой экзогенного белка. С целью оптимизации секреции используют модифицированные пре- и про-области, дающие существенное увеличение целевого белка на выходе [43]. Также, использование дипептидного линкера, помещенного после сайта процессинга Kex2 протеазы, способствует более полному отщеплению про-области  $\alpha$ -фактора [44]. В некоторых случаях целесообразно использовать собственную лидерную область целевого белка. Было показано, что секреция ацидофильной ксилоназы из *Aureobasidium pullulans* в клетках *Pichia pastoris* более эффективна при использовании собственной лидерной области, а также от  $\alpha$ -MF, чем при использовании про-области PHO1 [45]. В случае, когда на N-конце зрелого белка находится аргинин или лизин, что затрудняет процессинг белка предшественника протеазой Kex2, можно с достаточной эффективностью использовать лидерный пептид от сывороточного альбумина, как было показано для эффективной секреции рекомбинантного ингибитора трипсина [46].

Таким образом, несмотря на то, что в среднем,  $\alpha$ -факторная пре-про-область способна почти гарантированно обеспечить получение целевого секретируемого белка, выбор лидерного пептида для каждого конкретного рекомбинантного белка является задачей, требующей эмпирического подхода.

## 1.9 Промотор АОХ1. Регуляция промотора АОХ1 посредством активатора транскрипции Mxr1p

Промотор алкогольоксидазы АОХ1 является одним из самых мощных, точно регулируемых промоторов, вследствие чего и является одним из самых используемых в биотехнологии регуляторных элементов для метилотрофных дрожжей.

Показано, что в клетках *P.pastoris* промотор АОХ1 полностью репрессирован в условиях, когда источником углерода являются глюкоза, глицерин, этанол. В условиях отсутствия источника углерода, промотор дерепрессирован, при этом его активность составляет около 2% от индуцированного состояния [12]. При индукции метанолом, уровень синтеза фермента составляет до 30% суммарного клеточного белка [63]. Регуляцию экспрессии гена АОХ1 можно сравнить с регуляцией экспрессии GAL1 гена дрожжей *S. cerevisiae*, для которого также существуют состояния репрессии, дерепрессии и активации. Для активации экспрессии гена требуется не только отсутствие репрессирующего источника углерода (глюкозы), при котором наблюдается просто отсутствие катаболитной репрессии – т.е. состояние дерепрессии, но и обязательное наличие индуктора в данном случае метанола.

Такая регуляция транскрипции гена АОХ1 играет решающую роль при экспрессии гетерологичных генов, клонированных под контролем АОХ1 промотора, поскольку такая регуляция позволяет разделить стадии роста культуры и синтеза рекомбинантного белка. Такой подход позволяет избежать возможного токсичного влияния целевого белка на клетки дрожжей. При этом, на первой стадии происходит накопление биомассы при культивировании в среде, содержащей глицерин в качестве источника углерода. Затем, прекращают глицериновую подпитку и добавляют индуктор – метанол для активации гетероэкспрессии.

Было показано, что в активации промотора АОХ1 участвует белок активатор Mxr1p [64]. Данный белок принадлежит к семейству регуляторных белков, с ДНК-связывающим доменом на N-конце в виде «С<sub>2</sub>Н<sub>2</sub>цинковых пальцев», где в структуре ДНК связывающего домена присутствуют два иона цинка, каждый из которых координирует два цистеина и два гистидина. Выявлено, что у данной области высокая степень гомологии (порядка 70%) с N-концевой областью белка активатора Adr1p, который также принадлежит к семейству регуляторных белков с «цинковыми

пальцами» [64]. С помощью нозерн-блота было показано, что ген MXR1 экспрессируется конститутивно на низком уровне, т.е. даже, когда в культуральной жидкости присутствует глюкоза, либо глицерин [64]. Локализация активатора Mxr1p зависит от субстрата, на котором растут клетки. В присутствие глюкозы в среде Mxr1p находится в цитоплазме, но при росте на метаноле, этаноле и даже на глицерине – активатор транслоцируется в ядро [64]. По-видимому, ядерная локализация активатора не является достаточным условием для активации промотора AOX1, поскольку присутствие глицерина либо этанола в среде полностью репрессирует промотор AOX1. Было показано, что посттрансляционные модификации активационного домена Mxr1p, в частности, фосфорилирование серина в положении 215 является причиной взаимодействия активатора с белком из семейства 14-3-3 (Bmh1, Bmh2), что влечет к репрессии промотора AOX1. При этом фосфорилирование и соответственно, взаимодействие происходит при росте культуры на этаноле, в то время, как при росте на глюкозе или метаноле фосфорилирование и белок-белковое взаимодействие было ослаблено [65]. Таким образом, можно сделать вывод, что индукция промотора AOX1 происходит не только на этапе транслокации Mxr1p в ядро, но и посредством активации Mxr1p за счет посттрансляционных модификаций. Недавно были идентифицированы шесть областей связывания активатора Mxr1p с промоторной областью AOX1. Все шесть областей включают идентичный нуклеотидный мотив CYCC, где Y – является тиминном, либо цитозином [65]. Но, несмотря на последние данные, точный механизм регуляции промотора AOX1 на сегодняшний день не описан.

### **1.10 Альтернативные промоторы, используемые для гетерологичной экспрессии GAP, FLD**

Кроме сильного и регулируемого промотора AOX1, для регуляции гетерологичной экспрессии в дрожжах рода *Komagataella* используют также конститутивный (одинаково активированный на глюкозе, глицерине) промотор GAP (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы, ключевого фермента гликолиза) [79]. Данный промотор успешно использовали, например, для экспрессии рекомбинантной хитиназы 200-400 мг/л [80], S-аденозил-метионин синтазы – 2,49 г/л [81],

бактериальной  $\beta$ -лактамазы [79]. Однако, в других работах было показано, что использование AOX1 промотора приносило лучшие результаты. Так, например экспрессия гена  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS) снизилась примерно в 8 раз, по сравнению с экспрессией под контролем промотора AOX1 [82]. Также, при сравнении однокопийных продуцентов HBsAg (поверхностного антигена вируса гепатита В) более высокую продукцию обеспечивал продуцент с интегрированной конструкцией, где использовался AOX1 в качестве промотора [83].

Для контроля гетерологичной экспрессии также достаточно часто используется еще один регулируемый промотор FLD1 (глутатион-зависимой формальдегид дегидрогеназы). Данный промотор, как и промотор AOX1, индуцируется метанолом, как единственным источником углерода. Но, также, что особенно интересно, он может быть индуцирован метиламином, как единственным источником азота в среде [84]. Было показано, что уровень экспрессии гена липазы *Rhizopus oryzae* под контролем AOX1 при метанольной индукции, был таким же, как и под контролем промотора FLD1, при использовании метиламина в качестве индуктора и единственного источника азота [85].

Таким образом, при выборе стратегии и, соответственно, промотора для гетерологичной экспрессии, нельзя заранее предсказать, под контролем какого промотора экспрессия целевого гена будет наиболее эффективной.

### 1.11 Штаммы-продуценты на основе *K.phaffii*

Возможности *K.phaffii* по экспрессии гетерологичных белков различного происхождения, в том числе бактериальных, грибных, растительных, животных (в т.ч. человеческих), характеризуют данные, представленные в табл.2 [109].

**Таблица 2. Сводные данные по некоторым белкам, полученным в клетках *K. phaffii* [109]**

Белок	Способ получения	Количество
$\alpha$ -амилаза <i>Bacillus licheniformis</i>	Секреция, сигнальный пептид SUC2	2,5 г/л
T7A пероксидаза <i>Streptomyces viridosporus</i>	Секреция, сигнальный пептид $\alpha$ -MF	2,47 г/л

стрептокиназа <i>Streptococcus equisimili</i>	Внутриклеточно	77 мг/л
глюкоамилаза <i>Aspergillus awamori</i>	Секреция, нативный сигнальный пептид	400 мг/л
каталаза L <i>Aspergillus fumigatus</i>	Секреция, сигнальный пептид PHO1	2,3 г/л
фитаза (phy A) <i>Aspergillus niger</i>	Секреция, сигнальный пептид $\alpha$ -MF	65 ед/мл
инвертаза <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Секреция, нативный сигнальный пептид	2,5 г/л
$\alpha$ -галактозидаза зерен кофе	Секреция, сигнальный пептид $\alpha$ -MF	400 мг/л
Сывороточный альбумин человека (HSA)	Секреция, нативный сигнальный пептид	10 г/л
Инсулиноподобный фактор роста (IGF-1)	Секреция, сигнальный пептид $\alpha$ -MF	600 мг/л
рецептор эритропоэтина (EPO)	Секреция, сигнальный пептид PHO1	200 мг/л
сосудисто-эндотелиальный фактор роста (VEGF)	Секреция, сигнальный пептид PHO1	40 мг/л
поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg)	внутриклеточно	400 мг/л

В настоящей работе с целью оценки потенциала новой системы экспрессии, были получены продуценты ряда репортерных ( $\beta$ -галактозидазы, инулазы) и модельных белков, с помощью которых были показаны возможности данной системы применительно к секретируемым белкам, а также внутриклеточной продукции. В качестве модельных белков были выбраны секретируемый человеческий сывороточный альбумин (HSA), человеческий сосудисто-эндотелиальный фактора роста (VEGF), и поверхностный антиген вируса гепатита В (внутриклеточная продукция). Ниже приведена ключевая информация по данным белкам.

#### **Человеческий сывороточный альбумин (HSA)**

Альбумин является наиболее распространенным растворимым белком позвоночных с самой высокой концентрацией в плазме. Для медицинских целей альбумин в настоящее время производят путем фракционирования крови, собранной у доноров. К числу рисков использования донорского альбумина относятся возможность

передачи реципиентам инфекционных агентов, в частности, вирусов иммунодефицита человека, вирусов гепатитов и других.

Помимо основного использования в рецептурах кровезаменителей альбумин используется в качестве стабилизатора в составе различных вакцин, а также в состав рекомбинантных  $\alpha 2b$ ,  $\alpha 2a$  интерферонов, эритропоэтина и многих других. Использование альбумина в качестве носителя удлиняет период полураспада *in vivo* некоторых терапевтических агентов [86, 87]. Показано, что ковалентное или обратимое связывание с альбумином повышает растворимость комплекса лиганд-альбумин в плазме, уменьшает токсичность и защищает от протеолитического расщепления связанный лиганд [86].

В связи с этим, возникает потребность в рекомбинантном альбумине, полученном с помощью гетерологичной экспрессии, что очевидно исключает риски инфицирования пациентов. Наряду с актуальностью продукции рекомбинантного альбумина, данный белок можно использовать также с качестве модельного секретируемого белка для экспрессионной системы на метилотрофных дрожжах. В 2007 году рекомбинантный HSA, полученный в клетках *Pichia*, был одобрен к применению в медицине [88]. В 2008 году было запущено производство рекомбинантного альбумина в Японии, при этом, продукция составляла более 10 г на 1 литр культуральной жидкости [88]. В наборе, в котором поставляется основной конкурентный штамм *K.phaffii* GS115 (*Pichia* Expression Kit, Invitrogen) присутствует уже готовый штамм продуцент альбумина GS115-Albumin. Таким образом, продукция альбумина может являться адекватным показателем для оценки эффективности новой системы экспрессии.

### ***Поверхностный антиген вируса гепатита В (HbsAg)***

Профилактика гепатита В возможна путем иммунизации здорового населения препаратом поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg). Поверхностный антиген вируса гепатита В – белок, входящий в состав наружной оболочки, так называемой частицы Дэйна вируса гепатита В, содержит 5 антигенных детерминант, сочетание которых определяет серотип вируса и используется при изготовлении сыворотки. Наряду с частицами Дэйна можно обнаружить частицы размером около 22 нм (HBsAg частицы), которые не содержат вирусной ДНК и корового белка и состоят

практически из белка поверхностного антигена [94]. В качестве основы для создания рекомбинантной вакцины используется данный антиген, мономеры которого собираются в наноразмерные вирусоподобные HBV-частицы. Использование с этой целью природного вируса, выделенного из плазмы крови хронических носителей вируса, имеет ряд ограничений (потенциальная опасность вакцины, дефицит сырья, высокая стоимость и др.). Более перспективным является рекомбинантная вакцина, содержащая HBsAg, полученная генно-инженерным способом из штамма различных микроорганизмов. Первая отечественная рекомбинантная дрожжевая вакцина против гепатита В была создана НПК "Комбиотех Лтд." Однако, продуценты поверхностного антигена вируса гепатита В на основе штаммов *S.serevisiae* отличаются низкой продуктивностью и синтезируют около 5мг HBsAg на литр культуры [95].

В настоящее время известно достаточно много вакцин против гепатита В на основе рекомбинантных поверхностных антигенных детерминант этого вируса (патент США 5098704, МКИ А 61 К 39/29, НКИ 424-89, патенты Франции 2606281, МКИ А 61 К 39/29, и 2635532, МКИ С 12 N 15/51). Данные продуценты получены как на основе традиционных пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, так и на основе метилотрофных дрожжей, напр. *Hansenula polymorpha* (патент RU 2230782 С1).

Было показано, что HBsAg секретируется в культуральную жидкость с очень низкой эффективностью за счет неполного процессинга и отщепления сигнального пептида, а также высокой степенью гидрофобности HBsAg, поэтому в большинстве работ HBsAg получают как внутриклеточный белок [61].

Как правило, при создании вакцин используют плазмиды с природными участками генома вируса гепатита В (серотипы adr и adw), кодирующими его поверхностную антигенную детерминанту, которые экспрессируются под контролем сильных промоторов дрожжевых генов PHO5, или MOX (патент ЕПВ 0533492, МКИ А 61 К 39/29, патент США 5133961, МКИ А 61 К 39/29, НКИ 424-89), что обеспечивают получение высокого уровня экспрессии целевого продукта.

### ***Сосудисто-эндотелиальный фактор роста (VEGF)***

VEGF (vascular endothelial growth factor) - сосудистый эндотелиальный фактор роста - семейство структурно близких между собой белков, которые являются лигандами для семейства рецепторов VEGFR. VEGF существует в восьми изоморфных

формах : VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>148</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>165b</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>, получаемых в результате альтернативного сплайсинга мРНК, которая состоит из 8-ми экзонов [97]. VEGF влияет на развитие новых кровеносных сосудов (ангиогенез) и выживание незрелых кровеносных сосудов (сосудистая поддержка), связываясь с двумя близкими по строению мембранными тирозинкиназными рецепторами (рецептором-1 VEGFR-1 и рецептором-2 VEGFR-2) и активируя их [98]. Эти рецепторы продуцируются клетками эндотелия стенки кровеносных сосудов [99]. Связывание VEGF с этими рецепторами запускает сигнальный каскад, который в конечном итоге стимулирует рост эндотелиальных клеток сосуда, их выживание и пролиферацию [100]. На основании проведенных наблюдений было показано, что многие опухоли экспрессируют VEGF в условиях гипоксии, и что он чрезвычайно важен для развития и поддержания сосудистого русла опухоли, которое, в свою очередь, способствует росту и метастазированию опухоли [101]. Существует 2 вида каждой изоформы – а и b. Различие 6-ти С-концевых аминокислот обуславливает принадлежность к виду а или b. Считалось, что VEGF<sub>xxx</sub>a обладает ангиогенной активностью, в то время как антагонист VEGF<sub>xxx</sub>b – обладает антиангиогенной активностью. Но в последних работах было показано, что обе формы обладают ангиогенной активностью [105].

В аспекте медицинского применения VEGF рассматривают в качестве стимулятора ангиогенеза и локальной васкуляризации костных и хрящевых тканей при трансплантации [102].

Актуальность данной задачи послужила основанием для создания продуцента секретлируемого рекомбинантного VEGF на основе штамма ВКПМ Y-727. Недавно было показано, что биологически активная димерная форма VEGF может быть получена в результате секреции в клетках дрожжей *K. phaffii* [103]. В настоящей работе в качестве объекта для гетероэкспрессии была выбрана изоформа VEGF<sub>111</sub> [104]. Данная форма получается в результате альтернативного сплайсинга мРНК и выщепления с 5-го по 7-ой экзоны. Таким образом, получается изоформа, менее подверженная протеолизу, поскольку в пределах 5-го экзона находится сайт узнавания плазмينا матриксных металлопротеаз, что сказывается на продолжительности жизни активного белка [104]. Кроме того, отсутствие гепарин-связывающего домена,

кодируемого экзоном 7, обуславливает большую проницательную способность за счет отсутствия аффинности к гепарину, содержащемуся во внеклеточном матриксе [104].

### **1.12 Выводы из обзора источников и планирование работы**

Таким образом, принимая во внимание актуальность на сегодняшний день систем экспрессии на метилотрофных дрожжах, представляется важным развитие собственной, отечественной патентно-чистой экспрессионной системы, лишенной, по возможности тех недостатков, которые присутствуют в доступных, вышеописанных системах. В качестве контрольной системы сравнения целесообразно использовать экспрессионную систему на основе штамма *K.pfaffii* GS115 (Invitrogen).

Для создания оригинальной системы экспрессии на основе нового штамма дрожжей следует произвести необходимые таксономические исследования с тем, чтобы достоверно классифицировать базовый реципиентный штамм и описать его фенотипические, морфологические, ростовые характеристики. Также, необходимо клонировать и изучить особенности регуляции наиболее перспективных промоторных элементов штамма.

С целью разработки селективной системы отбора трансформантов необходимо сконструировать набор ауксотрофных производных базового штамма и клонировать гены селективных маркеров, комплементирующие соответствующие ауксотрофные мутации. Также, необходимо сконструировать широкий набор экспрессионных плазмид на базе оригинальных генетических элементов реципиентного штамма.

Для оценки экспрессионного потенциала нового штамма в сравнении с наиболее часто используемыми и коммерчески-доступными штаммами компании Invitrogen следует получить и охарактеризовать продуценты модельных секретлируемых и внутриклеточных белков.

Принимая во внимание недостатки используемых на сегодняшний день коммерческих экспрессионных систем – в частности, использование метанола, как индуктора, необходимо провести поиски нового субстрата для безопасной индукции часто используемого промотора AOX1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

### 2 РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ШТАММА *Komagataella kurtzmanii* Y727 (ВКПМ)

#### 2.1 Выбор штамма

Дикий штамм метилотрофных дрожжей Y-727 для разработки новой системы экспрессии был получен из коллекции ВКПМ. Согласно имевшемуся описанию, данный штамм был депонирован как штамм *P.pastoris*, родственной штамму NRRL-11430 или NRRL-48124 (GS115). Штамм находился в коллекции ВКПМ в открытом доступе с 1998 г. и в этой связи мог быть использован для разработки новой системы экспрессии. Однако, данный штамм был практически не изучен, в частности не была охарактеризована активность и регуляция гена алкогольоксидазы АОХ, промотор которого предполагалось использовать в качестве ключевого элемента новой системы экспрессии.

С целью первичного исследования регуляции промотора АОХ1 в клетках штамма ВКПМ Y-727 был проведен следующий качественный эксперимент. В качестве контрольного штамма сравнения использовали штамм *K. pfaffii* GS115.

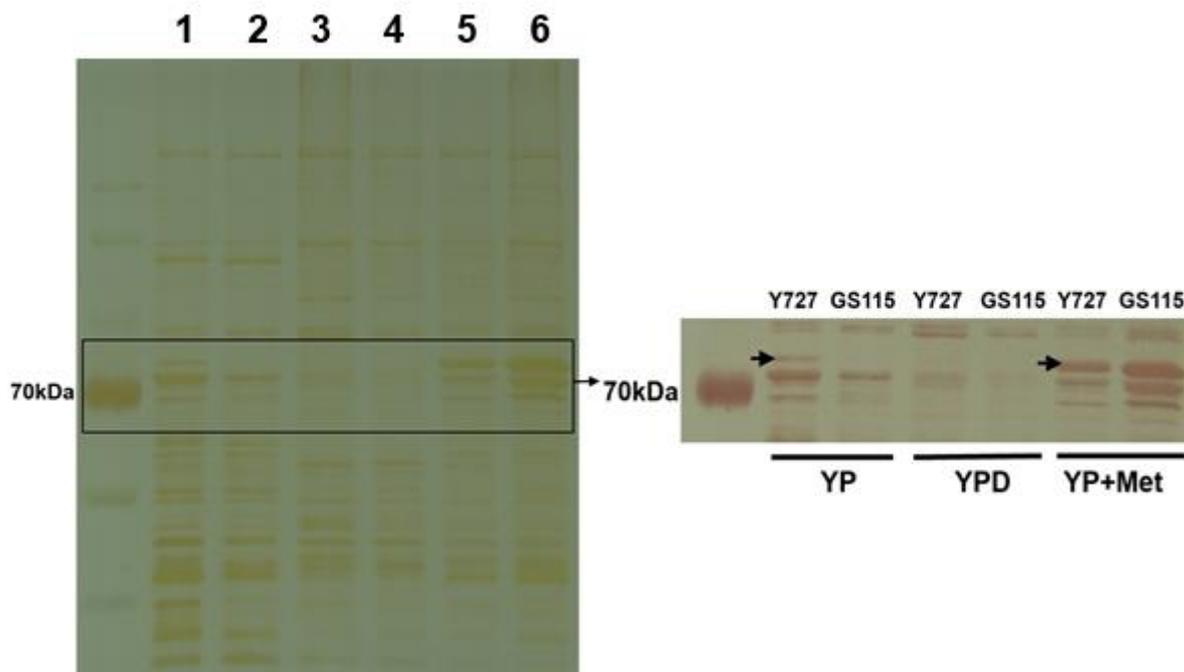
Клетки анализируемых штаммов выращивали до экспоненциальной фазы роста на жидких средах следующего состава: YPD - с репрессирующим промотором АОХ1 источником углерода – глюкозой; YPM - с индуцирующим АОХ1 источником углерода - метанолом, YP – без источника углерода.

Таким образом, условия роста на среде YPD обеспечивали катаболитную репрессию генов АОХ в клетках обоих штаммов; на среде YPM – индукцию АОХ1, и на среде YP - имитировали условия истощения репрессирующего источника углерода.

Образцы соответствующих клеточных лизатов анализировали с помощью электрофореза в денатурирующих восстанавливающих условиях в 12% полиакриламидном геле [Laemmli., 1970]. Известно, что в условиях индукции экспрессия алкоголь оксидазы (АОХ) может достигать 30% суммарного клеточного белка, т.е. данному ферменту должен соответствовать мажорный сигнал, соответствующий молекулярной массе 72кДа [13]. Интенсивность этого сигнала коррелирует с активностью промотора АОХ в соответствующих условиях культивирования клеток.

Из данных электрофореграммы, представленных на рис.2, видно, что у обоих штаммов гены АОХ репрессированы в условиях роста на среде с глюкозой (YPD), и активированы при росте клеток на среде с метанолом (YPM). В то же время в условиях роста, имитировавших истощение углеродного субстрата, ясно различимая полоса АОХ наблюдалась только в образце штамма ВКПМ Y-727, и отсутствовала у штамма GS115.

Согласно известным данным, в условиях дерепрессии уровень активности АОХ1 в клетках штамма GS115 не превышает 2% от индуцированного уровня [12], что не позволяло зафиксировать алкоголь оксидазу в клетках штамма GS115 в виде различимого сигнала в условиях анализа (рис.2). В то же время, и в тех же условиях сравнительная интенсивность сигнала АОХ в образце штамма ВКПМ Y-727 достигала 15-20% относительно метанол-индуцированного уровня (сравнить дорожки №№1 и 5).



**Рисунок 3.** Электрофореграмма клеточных лизатов штамма ВКПМ Y-727 и *K.paffii* GS115. Стрелками указан сигнал, которому соответствует фермент алкоголь оксидаза. На дорожки 1-6 наносили лизаты следующих клеточных культур: (1) штамм ВКПМ Y-727 на среде YP; (2) штамм GS115 на среде YP; (3) штамм ВКПМ Y-727 на среда YPD; (4) штамм GS115 на среде YPD; (5) штамм ВКПМ Y-727 на среде YPM; (6) штамм GS115 на среде YPM.

Таким образом, экспериментальные данные указали на то, что особенностью штамма ВКПМ Y-727 является способность к автоиндукции промотора АОХ в условиях истощения репрессирующего углеродного субстрата. Данный эффект

послужил одним из факторов, усиливших интерес к штамму Y-727, поскольку имел важное технологическое значение и мог быть использован для решения одной из задач работы – разработки безметанольного способа индукции гетерологичных генов.

## 2.2 Исследования таксономических и основных фенотипических характеристик штамма ВКПМ Y-727

С целью изучения возможной принадлежности штамма ВКПМ Y-727 к одному из известных видов метилотрофных дрожжей, кроме традиционно используемых ростовых тестов на различных субстратах, было проведено молекулярно-генетическое сравнение по маркерам, принятым для классификации дрожжей [52]. Были исследованы следующие нуклеотидные последовательности:

- домена D1/D2 26S субъединицы рибосомальной РНК
- локуса ITS1-5.8S-ITS2 рибосомальной РНК
- фактора элонгации трансляции EF-1 $\alpha$
- субъединицы RPB1 РНК полимеразы II
- митохондриальной малой субъединицы рРНК Mito SSU rRNA

При этом, учитывалось, что рибосомальный локус ITS был рекомендован, как наиболее достоверный для межвидовой диверсификации грибов [93].

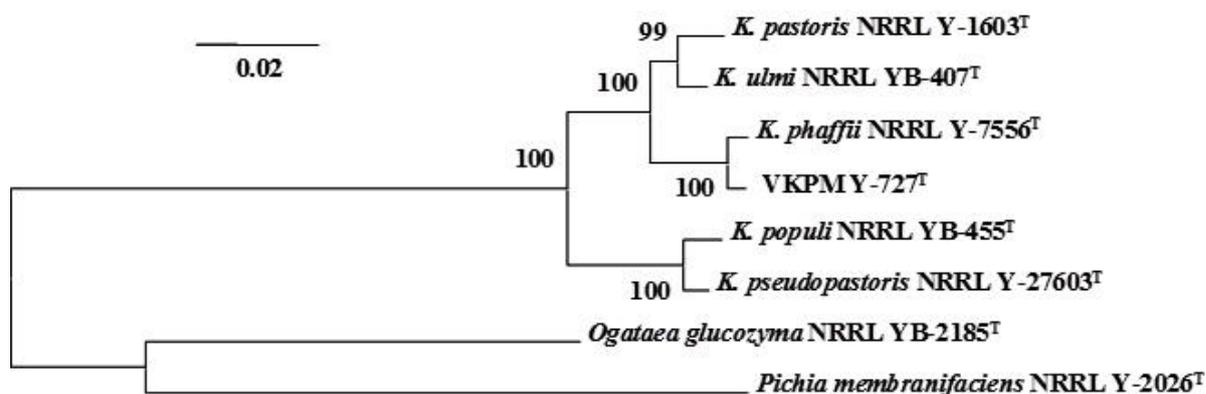
Было проведено сравнение со следующими родственными штаммами рода *Komagataella*: *Komagataella pastoris*, *Komagataella pseudopastoris*, *Komagataella phaffii*, *Komagataella populi* and *Komagataella ulmi*.

**Таблица 3. Попарное сравнение анализируемых последовательностей у родственных штаммов рода *Komagataella* [52]**

Species pair		<i>K. phaffii</i>	<i>K. populi</i>	<i>K. pseudopastoris</i>	<i>K. ulmi</i>	ВКПМ Y-727
<i>K. pastoris</i>	D1/D2	6s + 4i	4s + 6i	7s + 4i	7s + 3i	5s + 3i
	ITS1-5.8S-ITS2	21s + 11i	18s + 9i	33s + 14i	23s + 21i	21s + 8i
	EF-1 $\alpha$	10s	28s	23s	3s	10s
	RPB1	55s	83s	82s	21s	52s
	Mt SSU	23s + 19i	21s + 19i	33s + 10i	24s + 19i	24s + 19i
<i>K. phaffii</i>	D1/D2		6s + 6i	7s + 6i	4s + 3i	4s + 1i
	ITS1-5.8S-ITS2		24s + 8i	32s + 5i	21s + 14i	13s + 9i
	EF-1 $\alpha$		33s	27s	13s	4s
	RPB1		97s	94s	52s	9s
	Mt SSU		23s + 24i	23s + 19i	1s	1s
<i>K. populi</i>	D1/D2			3s	5s + 7i	5s + 5i
	ITS1-5.8S-ITS2			23s + 12i	35s + 10i	21s + 13i
	EF-1 $\alpha$			13s	29s	32s

	RPB1	11s	73s	93s
	Mt SSU	7s + 17i	22s + 24i	22s + 24i
<i>K. pseudopastoris</i>	D1/D2		6s + 7i	6s + 5i
	ITS1-5.8S-ITS2		20s + 15i	29s + 4i
	EF-1 $\alpha$		24s	27s
	RPB1		74s	90s
<i>K. ulmi</i>	Mt SSU		22s + 19i	22s + 19i
	D1/D2			4s + 4i
	ITS1-5.8S-ITS2			16s + 16i
	EF-1 $\alpha$			13s
	RPB1			49s
	Mt SSU			0

Условные обозначения: D1/D2 LSU rRNA – нуклеотидная последовательность 18S и 26S рибосомальной РНК (341 п.о.); ITS1-5.8S-ITS2 – нуклеотидная последовательность локуса рибосомальной РНК (277 п.о.); EF-1 $\alpha$  - нуклеотидная последовательность фактора элонгации трансляции (876 п.о.); RPB1 – нуклеотидная последовательность субъединицы RPB1 РНК полимеразы II (828 п.о.) ; Mt SSU rRNA – нуклеотидная последовательность митохондриальной малой субъединицы рибосомальной РНК (630 п.о.); s – нуклеотидные замены ; i – делеции/вставки.



**Рисунок 3. Филогенетическое дерево рода *Komagataella*[52].** Условные обозначения: шкала «0.02» графически отображает 20 различающихся нуклеотидов в анализируемой последовательности из 1000 нуклеотидов на горизонтальных ветвях графика. Тем самым, показана степень родства между анализируемыми видами.

В результате исследования было установлено, что наиболее высокий уровень гомологии сравниваемых нуклеотидных последовательностей был у анализируемого штамма ВКПМ Y-727 и типового штамма *K. phaffii* (NRRL Y-7556) (таблица 3, рис.3). Например, в последовательности D1/D2 LSU rRNA было выявлено только 4 нуклеотидные замены и одна вставка; в локусе фактора элонгации трансляции EF-1 $\alpha$  - только 4 замены, а в локусе ITS1-5.8S-ITS2 всего 13 нуклеотидных замен и 9 делеций/вставок, в то время, как различия в этом локусе с другими видами составляли до 35 замен.

С целью уточнения данных молекулярно-генетического анализа были проведены сравнительные ростовые тесты. Ростовые тесты проводились в соответствии с рекомендациями, установленными коллекцией CBS. Данные по исследованию ассимиляции различных источников углерода и азота приведены в таблице 4.

**Таблица 4. Физиологические характеристики видов *Komagataella* [52]**

Субстрат	ВКПМ Y-727	<i>K. pastoris</i>	<i>K. phaffii</i>	<i>K. populi</i> <sup>c</sup>	<i>K. pseudopastoris</i> <sup>d</sup>	<i>K. ulmi</i> <sup>c</sup>
глюкоза	+	+	+	+	+	+
галактоза	-	-	-	-	-	-
D-глюкозамин	-	-	-	-	-	-
D-рибоза	-	-	-	-	-	-
D-ксилоза	-	-	-	-	s	-
L-арабиноза	-	-	-	-	-	-
D-арабиноза	-	-	-	-	s/-	-
L-рамноза	+	+	+	+	+	+
сахароза	-	-	-	-	-	-
мальтоза	-	-	-	-	-	-
трегалоза	-	+	+	+	+	+
метил- $\alpha$ -D-гликозид	-	-	-	-	-	-
целлобиоза	-	-	-	-	-	-
арбутин	-	-	-	n	-	n
мелибиоза	-	-	-	-	-	-
лактоза	-	-	-	-	-	-
раффиноза	-	-	-	-	-	-
инулин	-	-	-	-	-	-
крахмал	-	-	-	-	-	-
глицерин	+	+	+	+	+	+
эритритол	-	-	-	-	-	-
рибитол	-	-	-	-	-	-
ксилитол	-	-	-	n	-	n
L-арабитол	-	-	-	n	-	n
D-маннитол	-	+	+	+	+	+
галактитол	-	-	-	-	-	-
мио-инозитол	-	-	-	-	-	-
2-кето-D-глюконат	-	-	-	-	-	-
D-глюконат	-	-	-	-	-	-
D-галактуронат	-	-	-	n	-	n
DL-лактат	+	+	+	w	+	+
сукуинат	+	+	+	+	+	+
цитрат	-	-	-	-	-	-
метанол	+	+	+	+	+	+
этанол	+	+	+	+	+	+
N-ацетил-D-глюкозамин	-	-	-	-	-	-
нитрат	-	-	-	-	-	-
нитрит	-	-	-	n	-	n
этиламин	+	+	+	n	+	n
L-лизин	+	+	+	n	+	n
глюкозамин	-	-	-	n	-	n
имидазол	-	-	-	n	-	n
без витаминов	-	-	-	-	+/w	-
циклогексимид	+	+	+	n	+	n
0.1%						
уксусная кислота	-	-	-	n	-	n
1%						

Условные обозначения: - отсутствие роста; + наблюдался рост; w – слабый рост, s - медленный рост; n – нет данных. с - данные из источника [113], d – данные из источника [114].

Согласно полученным данным ростовых тестов, все пять анализируемых видов рода *Komagataella* и штамм ВКПМ Y-727 являлись фенотипически очень близкими, так что данных по ростовым тестам было недостаточно для классификации нового штамма. Однако, в качестве особенности штамма Y-727 можно выделить отсутствие роста на трегалозе и D-маннитолу.

В экспериментах по ассимиляции источников азота было установлено, что клетки штамма Y-727 эффективно утилизируют аминокислоты, серноокислый аммоний, азотноокислый аммоний [52].

Таким образом, проведенные исследования подтверждают морфологическую и фенотипическую идентичность штаммов *K.kurtzmanii* Y-727 и *K.phaffii* GS115.

Результаты молекулярно-генетического анализа в совокупности с результатами ростовых тестов, подтвердили принадлежность штамма дрожжей ВКПМ Y-727 к роду *Komagataella*, и в то же время, позволили отнести его к новому виду. По согласованию с выдающимся исследователем в области генетики и молекулярной биологии метилотрофных дрожжей Клетусом Пауль Курцманом, данному виду было присвоено имя *Komagataella kurtzmanii* [52].

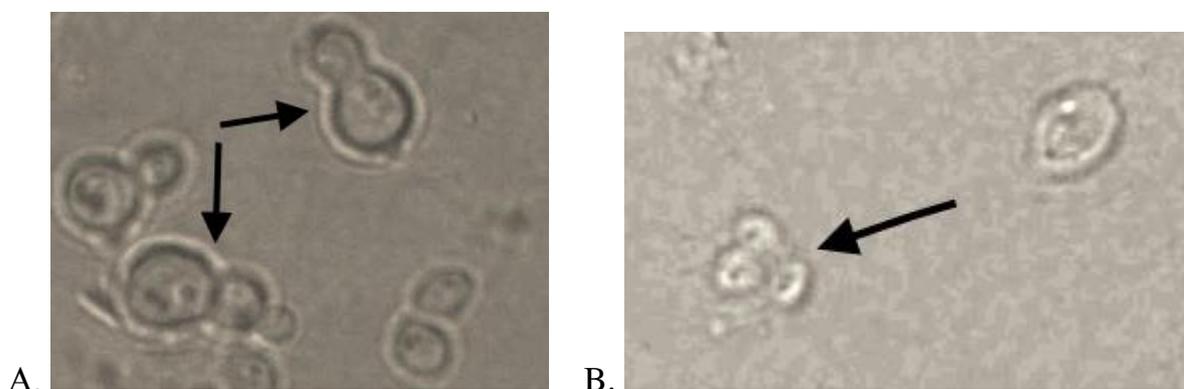
### 2.3 Морфологические, физиологические и ростовые характеристики

Для того, чтобы удостовериться, может ли штамм Y-727 являться эффективным реципиентом, с точки зрения ростовых характеристик, а также для описания морфологических и некоторых физиологических особенностей данного штамма, были проведены опыты по кинетики роста в сравнении со штаммом GS115, микроскопия клеток Y-727, опыты по спорообразованию и скрещиваемости.

Было установлено, что при культивировании при температуре 28<sup>0</sup>С в течение 48 часов на агаризованной среде YPD следующего состава (мас.%): пептон-2, дрожжевой экстракт -1, глюкоза – 2, агар -2, вода – остальное, клетки имеют овальную форму, 3 – 4 мкм в диаметре. Клетки почкуются, при этом почкование истинное, многостороннее (рис.4 А). Истинного мицелия не образуют.

Принимая во внимание почкование и конъюгацию клеток – штамм является гомоталличным. По всей видимости, штамм *K.kurtzmanii* Y-727 имеет схожий с *K.phaffii* GS115 тип спаривания, поскольку при скрещивании ауксотрофных производных штаммов *K.kurtzmanii* Y-727 и *K.phaffii* GS115 на ацетатной агаризованной среде, были отобраны прототрофные гибриды на минимальной среде [52].

С целью получения возможности проведения генетических манипуляций через спорообразование, были подобраны следующие условия для споруляции. Споруляция происходит при инкубации культуры на агаризованной среде следующего состава (мас.%): хлорид калия - 1.0, ацетат натрия - 0.5, глюкоза - 1.0, агар – 2.0, вода – остальное. Аски имеют тетраэдрическую форму, включают 4 аскоспора (рис.4 В).



**Рисунок 4. Микроскопический анализ клеток *Komagataella kurtzmanii* ВКПМ Y-727. А** – почкующиеся клетки, рост при 29<sup>0</sup>С, на агаризованной среде YPD. В – аскоспоры. Инкубация на среде для спорулирования, 29<sup>0</sup>С.

Для определения морфологических признаков, были визуально описаны колонии данного штамма. На агаризованной среде YPD колонии светло-бежевого цвета с ровным краем, матовой поверхностью, линзовидным профилем и пастообразной консистенцией.

При росте в жидкой среде YPD состава (мас.%): пептон-2, дрожжевой экстракт - 1, глюкоза – 2, вода–остальное, при 28<sup>0</sup>С в течение 24 ч культивирования - жидкость мутная, осадок белый, коагуляции не наблюдается, пристеночных пленок не образует.

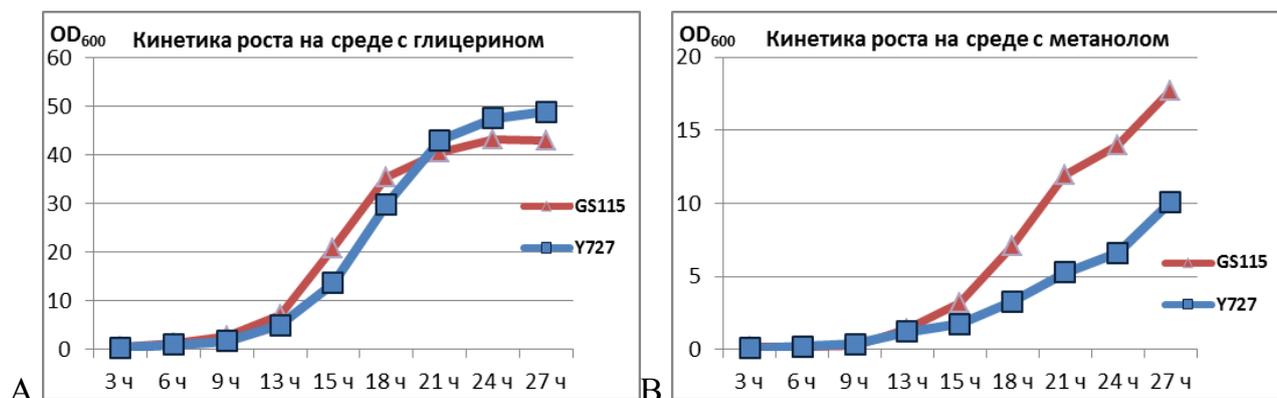
Физиолого-биохимические признаки: данный вид является факультативным анаэробом. Температура роста - 20-30<sup>0</sup>С (оптимум – 29<sup>0</sup>С). рН среды культивирования - 5,8-7,4 (оптимум - 7,0). В качестве отличительной особенности данного штамма можно отметить отсутствие роста при температуре более 31<sup>0</sup>С.

Показано, что длительное хранение штамма Y-727 обеспечивает помещение клеток в 30% водном растворе глицерина в морозильную камеру с температурой  $-70^{\circ}\text{C}$  [92]. Экспериментально доказана возможность хранения штамма на агаризованной среде YPD в течение 3 месяцев при  $+4^{\circ}\text{C}$ .

Очевидно, что для того, чтобы быть конкурентоспособной - разрабатываемая система экспрессии должна базироваться на штамме, обладающем сравнимой с основным конкурентом скоростью роста на основных ферментационных средах.

С целью исследования кинетики роста было проведено культивирование штаммов Y-727 и GS115 на средах с глицерином и метанолом, обычно используемых для набора биомассы и индукции синтеза целевого белка, соответственно, при типовом двухстадийном процессе ферментации [115].

Клетки двух штаммов были инокулированы с начальной плотностью  $\text{OD}_{600}=0,1$  в пробирки с жидкой средой : YPG состава (мас.%): пептон-2, дрожжевой экстракт -1, глицерин – 1, вода–остальное; и YPM состава (мас.%): пептон-2, дрожжевой экстракт - 1, метанол – 1, вода–остальное. Культуру растили в термостатируемой качалке при 250 об/мин, при температуре  $29^{\circ}\text{C}$ . Измерения проводили каждые 3 часа путем асептического отбора проб из каждой пробирки с последующим измерением оптической плотности культуры  $\text{OD}_{600}$ .



**Рисунок 5. Кинетика роста штаммов *K.kurtzmanii* Y-727 и *K.phaffii* GS115. А. На среде с глицерином (YPG) в качестве источника углерода. В. На среде с метанолом (YPM) в качестве источника углерода.**

Как видно из графиков на рис.5, анализируемый штамм обладает идентичной скоростью роста на глицерине, но практически в 2 раза медленнее утилизирует метанол. Последнее обстоятельство коррелировало с данными, представленными на

рис.2, свидетельствующими о примерно 2-кратной разнице в уровне экспрессии алкоголь оксидазы АОХ в клетках штамма Y-727 по сравнению с GS115 (рис.2).

Таким образом, полученные данные указывали на то, что в условиях ферментации клетки базового штамма Y-727 способны обеспечить высокую, сравнимую с основным конкурентом скорость роста на этапе быстрого набора биомассы.

#### **2.4 Клонирование и анализ нуклеотидной последовательности промотора АОХ1 штаммов *K.kurtzmanii* Y-727 *K.phaffii* GS115**

Очевидно, что для разработки патентно-чистой системы экспрессии на основе штамма *K.kurtzmanii* Y-727 необходимо было клонировать и использовать оригинальные генетические элементы этого штамма. В качестве основных промоторных элементов для разработки новой системы экспрессии были выбраны наиболее мощный регулируемый промотор АОХ1, наиболее мощный конститутивный промотор GАР и промотор средней силы СУС1 в качестве вспомогательного.

Как было показано выше, ближайшим родственным штаммом по отношению к *K.kurtzmanii* Y-727 является штамм *K.phaffii* GS115 – производный NRRL Y-11430. В связи с чем, было целесообразно провести сравнение промоторных областей и их регуляцию, с помощью оценки уровня экспрессии репортерного гена (*lacZ*) в различных условиях именно данных штаммов.

Данные секвенирования и выравнивания нуклеотидных последовательностей клонированных промоторов АОХ1 *K.kurtzmanii* ВКПМ Y727 и *K.phaffii* GS115 (Invitrogen, США) приведен на рис.6.

Проведенный анализ показал, что:

1) Промотор алкоголь оксидазы АОХ1 штамма *K. kurtzmanii* Y727 (рис.6) отличается от промотора штамма *K.phaffii* GS115 – ближайшего аналога следующими нуклеотидными заменами: G->A в положении 27, С->А в положении 31, Т->А в положении 33, А->G в положении 60, G->А в положении 93, G->А в положении 111, С->Т в положении 163, G->А в положении 168, Т->А в положении 314, G->А в положении 442, А->Т в положении 482, С->Т в положении 528, А->Т в положении 571, Т->G в положении 731, G->А в положении 792, С->G в положении 802.

		1		50
AOX1-GS115	(1)	TAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGCCATCCGACATC		
AOX1-Y727	(1)	TAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATAAAAACA	TTTTGCCATCCGACATC	
		51		100
AOX1-GS115	(51)	CACAGGTCCATTCTCACACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGATACA		
AOX1-Y727	(51)	CACAGGTCCGTTCTCACACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGATACA		
		101		150
AOX1-GS115	(101)	CTAGCAGCAGGCCGTTGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCC	TCAA	
AOX1-Y727	(101)	CTAGCAGCAGACCGTTGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCC	TCAA	
		151		200
AOX1-GS115	(151)	CACCCACTTTTGCATCGAAAAACCAGCCCAGTTATTGGGCTTGATTGGA		
AOX1-Y727	(151)	CACCCACTTTTGTATCAAAAAACCAGCCCAGTTATTGGGCTTGATTGGA		
		201		250
AOX1-GS115	(201)	GCTCGCTCATTCCAATTCCTTCTATTAGGCTACTAACACCATGACTTTAT		
AOX1-Y727	(201)	GCTCGCTCATTCCAATTCCTTCTATTAGGCTACTAACACCATGACTTTAT		
		251		300
AOX1-GS115	(251)	TAGCCTGTCTATCCTGGCCCCCTGGCGAGGTTTCATGTTTGTATTATTTCC		
AOX1-Y727	(251)	TAGCCTGTCTATCCTGGCCCCCTGGCGAGGTTTCATGTTTGTATTATTTCC		
		301		350
AOX1-GS115	(301)	GAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCCGAACATCACTCCAGATGAGGGCT		
AOX1-Y727	(301)	GAATGCAACAAGCACCGCATTACACCCGAACATCACTCCAGATGAGGGCT		
		351		400
AOX1-GS115	(351)	TTCTGAGTGTGGGTTCAAATAGTTTCATGTTCCCAAATGGCCAAAAC		
AOX1-Y727	(351)	TTCTGAGTGTGGGTTCAAATAGTTTCATGTTCCCAAATGGCCAAAAC		
		401		450
AOX1-GS115	(401)	GACAGTTTAAACGCTGTCTTGGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCA		
AOX1-Y727	(401)	GACAGTTTAAACGCTGTCTTGGAACCTAATATGACAAAAGCATGATCTCA		
		451		500
AOX1-GS115	(451)	TCCAAGATGAACTAAGTTTGGTTCGTTGAAAAGCTAACGGCCAGTTGGTC		
AOX1-Y727	(451)	TCCAAGATGAACTAAGTTTGGTTCGTTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTC		
		501		550
AOX1-GS115	(501)	AAAAAGAACTTCCAAAAGTCGGCATA	CGTTTGTCTTGTGGTATTGA	
AOX1-Y727	(501)	AAAAAGAACTTCCAAAAGTCGGCATA	CGTTTGTCTTGTGGTATTGA	
		551		600
AOX1-GS115	(551)	TTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCTCTCTA		
AOX1-Y727	(551)	TTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCTCTCTA		
		601		650
AOX1-GS115	(601)	TCGCTTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAACAC		
AOX1-Y727	(601)	TCGCTTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAACAC		
		651		700
AOX1-GS115	(651)	CCGCTTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGAT		
AOX1-Y727	(651)	CCGCTTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGAT		
		701		750
AOX1-GS115	(701)	TCTGGTGGGAATACTGCTGATAGCCTAACGTTCATGATCAAAATTTAACT		
AOX1-Y727	(701)	TCTGGTGGGAATACTGCTGATAGCCTAACGTTCATGATCAAAATTTAACT		
		751		800
AOX1-GS115	(751)	GTTCTAACCCCTACTTGACAGCAATATATAAACAGAAGGAACTGCCCCG		
AOX1-Y727	(751)	GTTCTAACCCCTACTTGACAGCAATATATAAACAGAAGGAACTGCCCCG		
		801		850
AOX1-GS115	(801)	TTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTTATAATTGCG		
AOX1-Y727	(801)	TTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTTATAATTGCG		
		851		900
AOX1-GS115	(851)	ACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGGATTTAACGACTTTTAAACGACAACT		
AOX1-Y727	(851)	ACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGGATTTAACGACTTTTAAACGACAACT		
		901	930	
AOX1-GS115	(901)	TGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTCG		
AOX1-Y727	(901)	TGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTCG		

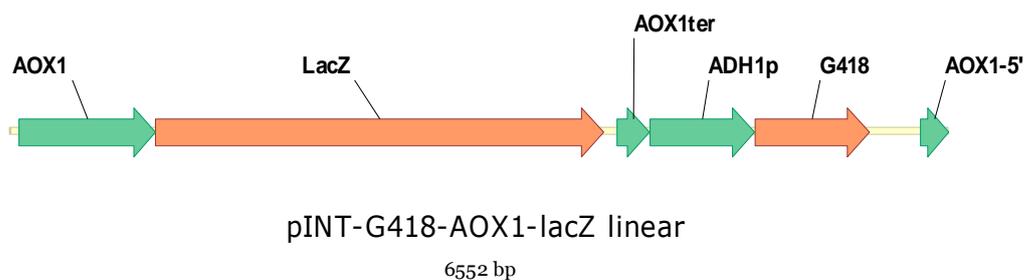
**Рисунок 6. Выравнивание нуклеотидных последовательностей промотора AOX1 штаммов *K.kurtzmanii* Y-727 и *K.phaffii* GS115.** В рамке обведены области связывания активатора транскрипции Mxr1p с промотором. Мутации, локализованные в областях связывания Mxr1p промотора Y-727 подсвечены красным цветом.

Как было упомянуто в литературном обзоре (глава 1.9), выявленные области связывания активатора транскрипции Mxr1p содержат мотив 5' CYCC (3' GGRG) (где Y=C/T, R=G/A). Следует отметить, что в нуклеотидной последовательности промотора AOX1 штамма Y-727 присутствуют мутации (G->A в положении 93 и T->A в положении 314), локализованные именно в данных областях (рис.6). Можно было предположить, что наличие мутаций оказывает влияние на связывание активатора транскрипции с промотором AOX1, что в свою очередь обуславливает различия в регуляции промоторов в клетках Y-727 и GS115. Для изучения регуляции промотора AOX1 было проведено исследование по измерению уровня экспрессии репортерного гена в клетках штаммов Y-727 и GS115, находящегося под контролем данного промотора.

## 2.5 Сравнительное исследование регуляции активности промоторов AOX1, в клетках штаммов Y-727 и GS115.

Для определения количественной характеристики уровня dereпрессии и активации промотора AOX1 в штамме Y-727 был проведен опыт по измерению активности β-галактозидазы, ген которой (*lacZ*) был клонирован в экспрессионный вектор под контроль промотора AOX1, клонированного из генома штаммов Y727 и GS115 соответственно (рис.7).

Каждый из промоторов AOX1 из штаммов *K.kurtzmanii* ВКПМ Y727 и *K. phaffii* GS115 был клонирован в плазмиду, содержащую ген *lacZ* (β-галактозидазы). По уровню активности продуцируемой β-галактозидазы можно оценить силу промотора каждого из анализируемых штаммов.



**Рисунок 7. Карта плазмиды pINT-G418-AOX1<sub>Y727/GS115</sub>-lacZ.** G418 - ген устойчивости к антибиотику kanMX; ADH1 – промотор для регуляции экспрессии гена G418; AOX1term– терминатор гена AOX1; lacZ - ген β-галактозидазы; AOX1 – промотор AOX1, клонированный из штаммов Y-727 и GS115, для векторов pINT-G418-AOX1<sub>Y727</sub>-lacZ и pINT-G418-AOX1<sub>GS115</sub>-lacZ соответственно; AOX1-5' – 5' область гена AOX1.

Линеаризованными фрагментами данных плазмид (рис.7) были трансформированы 2 штамма *K.kurtzmanii* Y-727 и *K.pfaffii* GS115. Отбор трансформантов проводили по признаку устойчивости к антибиотику G418. Кассета для интеграции содержала ген kanMX – ген устойчивости к антибиотику G418 под контролем промотора ADH1, клонированного из дрожжей *S.cerevisiae*. Было показано, что данный промотор обеспечивает необходимый для отбора трансформантов уровень экспрессии kanMX в клетках Y-727 и GS115 на селективной среде (данные не приведены). В результате отбора трансформантов на агаризованной среде YPD, содержащей антибиотик G418 (500 мкг/мл агаризованной среды), были получены штаммы *K.kurtzmanii* Y-727/pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-lacZ и *K.pfaffii* GS115/ pINT-AOX1<sub>GS115</sub>-lacZ - продуценты β-галактозидазы.

Клетки анализируемых штаммов выращивали до середины логарифмической фазы роста в пробирках со средой трех видов YPD - с репрессирующим AOX1 источником углерода - глюкозой, YPM – с индуцирующим AOX1 источником углерода – метанолом, YP - без источника углерода (Материалы и методы, глава 7.7.1).

#### Оценка уровня активности β-галактозидазы

Оценку активности промоторов в клетках анализируемых штаммов осуществляли по уровню активности β-галактозидазы, содержащейся в соответствующих клеточных лизатах [89]. Из приведенных в табл. 5 и на рис.9 данных видно, что активность β-галактозидазы в клеточном лизате культуры штамма *K.kurtzmanii* Y727/pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ, выращенной на среде YP (без углеродного субстрата и индуктора – метанола) составляет около 70% активности β-галактозидазы в лизате этой же культуры, выращенной на среде YPM (содержащей метанол). Полученные данные подтверждает активацию промотора AOX1 у штамма *K.kurtzmanii* Y-727 в условиях роста, имитирующих истощение углеродного субстрата, без использования метанола.

Таблица 5. Активность  $\beta$ -галактозидазы продуцируемой клетками штамма *K.kurtzmanii* Y-727 и штамма *K.pfaffii* GS115.

Штамм / Среда	Активность бета-галактозидазы (М.Е.)		
	YP	YPM	YPD
<i>K.kurtzmanii</i> Y727	1784,0	2668,0	0,0
	1613,0	2124,0	0,0
<b>Среднее</b>	<b>1698,5</b>	<b>2396,0</b>	<b>0,0</b>
<i>Ср. кв. откл.</i>	<i>120,9</i>	<i>384,7</i>	<i>0,0</i>
<i>K.pfaffii</i> GS115	621,0	2205,0	0,0
	988,0	2541,0	0,0
<b>Среднее</b>	<b>804,5</b>	<b>2373,0</b>	<b>0,0</b>
<i>Ср. кв. откл.</i>	<i>259,5</i>	<i>237,6</i>	<i>0,0</i>

Диаграмма на рис.8 иллюстрирует измерения активности  $\beta$ -галактозидазы, приведенные в табл.5. Уровень активности  $\beta$ -галактозидазы у обоих штаммов в присутствии метанола отличается незначительно.

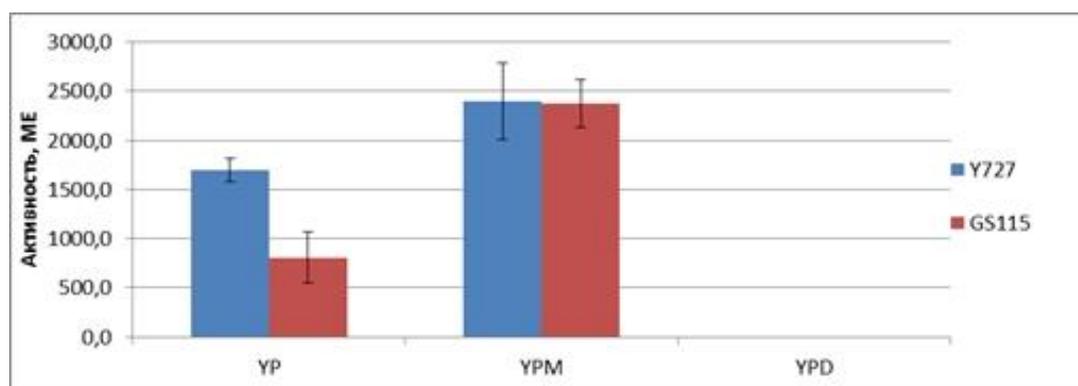


Рисунок 8. Уровень активности бета-галактозидазы, продуцируемой клетками штамма *K.kurtzmanii* ВКПМ Y-727 и штамма *K.pfaffii* GS115. По вертикальной оси – шкала активности в Миллеровых единицах [89]. Голубые столбцы соответствуют активности фермента в лизате клеток штамма *K.kurtzmanii* Y727, розовые столбцы соответствуют активности фермента в лизате клеток штамма *K.pfaffii* GS115. На диаграмме планками отображено стандартное отклонение по результатам измерения активности у двух клонов.

Высокий уровень активности промотора AOX1 при автоиндукции может быть обусловлен наличием мутаций в промоторе AOX1 штамма Y-727 в областях связывания активатора транскрипции Mxr1p. Однако, при этом, наличие мутаций в этих областях не влияет на активность промотора в условиях индукции.

Эффект автоиндукции представляется важным в аспекте использования данного штамма в качестве реципиента для гетерологичной экспрессии. Таким образом,

использование данного промотора в штамме *K.kurtzmanii* Y-727 позволяет частично решить проблему безметанольной индукции промотора AOX1, в случае роста культуры до высоких плотностей на репрессирующем субстрате и последующей активации промотора по истощению субстрата.

## 2.6 Клонирование и анализ нуклеотидной последовательности промоторов GAP штаммов *K.kurtzmanii* Y-727 *K.phaffii* GS115

Данные секвенирования и выравнивания нуклеотидных последовательностей клонированных промоторов GAP штаммов *K.kurtzmanii* ВКПМ Y-727 и *K.phaffii* GS115 приведены на рис.9.

2) Промотор глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы GAP штамма *K.kurtzmanii* Y-727 отличается от промотора штамма *K.phaffii* GS115 – ближайшего аналога следующими нуклеотидными заменами: G->A в положении 61, C->T в положении 85, A->C в положении 180, C->T в положении 200, T->C в положении 201, A в положении 208, A-G в положении 210, T->C в положении 240, делецией CT в положении 244-245, G->A в положении 413, T->C в положении 450.

		1	50
GAP-GS115	(1)	CTTTTTGTAGAAATGTCTTGGTGTCCCTCGTCCAATCAGGTAGCCATCTC	
GAP-Y727	(1)	CTTTTTGTAGAAATGTCTTGGTGTCCCTCGTCCAATCAGGTAGCCATCTC	
		51	100
GAP-GS115	(51)	TGAAATATCTGGCTCCGTTGCAACTCCGAACGACC	TGCTGGCAACGTAAA
GAP-Y727	(51)	TGAAATATCTAGCTCCGTTGCAACTCCGAACGACT	TGCTGGCAACGTAAA
		101	150
GAP-GS115	(101)	ATTCTCCGGGTA AAAACTTAAATGTGGAGTAATGGAACAGAAACGTCTC	
GAP-Y727	(101)	ATTCTCCGGGTA AAAACTTAAATGTGGAGTAATGGAACAGAAACGTCTC	
		151	200
GAP-GS115	(151)	TTCCSTTCTCTCTCCTTCCACCGCCCGTTA	CCGTCCCTAGGAAATTTTAC
GAP-Y727	(151)	TTCCSTTCTCTCTCCTTCCACCGCCCGTT	CCGTCCCTAGGAAATTTTAT
		201	250
GAP-GS115	(201)	TCTGCTG-GAGAGCTTCTTCTACGGCCCCCTTGCAGCAA	TGCTCTTCCCA
GAP-Y727	(201)	CTGCTGAGGAGAGCTTCTTCTACGGCCCCCTTGCAGCAA	CGCT--TCCCA
		251	300
GAP-GS115	(250)	GCATTACGTTGCGGGTAAAACGGAGGTCGTGTACCCGACCTAGCAGCCCA	
GAP-Y727	(249)	GCATTACGTTGCGGGTAAAACGGAGGTCGTGTACCCGACCTAGCAGCCCA	
		301	350
GAP-GS115	(300)	GGGATGGAAAAGTCCCGGCCGTCGCTGGCAATAATAGCGGGCGGACGCAT	
GAP-Y727	(299)	GGGATGGAAAAGTCCCGGCCGTCGCTGGCAATAATAGCGGGCGGACGCAT	
		351	400
GAP-GS115	(350)	GTCATGAGATTATTGGAAACCACCAGAATCGAATATAAAAGGCGAACACC	
GAP-Y727	(349)	GTCATGAGATTATTGGAAACCACCAGAATCGAATATAAAAGGCGAACACC	
		401	450
GAP-GS115	(400)	TTTCCCAATTTTGTTTCTCCTGACCCAAAGACTTTAAATTTAATTTAT	T
GAP-Y727	(399)	TTTCCCAATTTTAGTTTCTCCTGACCCAAAGACTTTAAATTTAATTTAT	C
		451	484
GAP-GS115	(450)	TGTCCSTATTTCAATCAATTGAACAACSTATCAAA	
GAP-Y727	(449)	TGTCCSTATTTCAATCAATTGAACAACSTATCAAA	

**Рисунок 9. Выравнивание нуклеотидных последовательностей промотора GAP штаммов *K.kurtzmanii* Y727 и *K.pfaffii* GS115.**

Можно предположить, что имеющиеся замены и делеции в промоторе штамма Y-727, могут оказывать влияние на регуляцию промотора GAP.

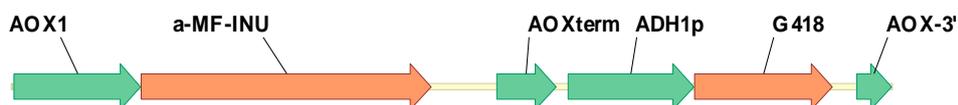
Для изучения влияния данных мутаций на регуляцию и активность промотора GAP штамма Y-727 был проведен опыт по измерению активности репортерного секретируемого белка – инулазы. При этом, было получено 4 варианта продуцентов, в двух из которых ген инулазы находился под контролем промотора AOX1 в клетках Y-727 и GS115 в других двух – под контролем промотора GAP в клетках Y-727 и GS115.

Инулаза - фермент, используемый в пищевой промышленности для получения фруктозы, путем расщепления  $\beta$ -гликозидных связей инулина (полифруктозного углевода растительного происхождения). Выбор этого репортерного белка определялся наличием у инулазы легко измеряемой инвертазной активности, а также тем, что клетки штамма *K. kurtzmanii* Y727 и штамма *K.pfaffii* GS115 не усваивают сахарозу и инулин (табл.4), т.е. не продуцируют собственную инвертазу, что значительно упрощало интерпретацию результатов измерений.

## **2.7 Сравнительное исследование регуляции активности промоторов AOX1, GAP в клетках штаммов Y-727 и GS115**

Анализ эффективности продукции инулазы проводили на основе свойств данного фермента расщеплять  $\beta$ -гликозидные связи фруктофуранозидов, образуя, тем самым, восстанавливающие сахара. Например, при расщеплении сахарозы получают восстанавливающие сахара фруктоза и глюкоза [15].

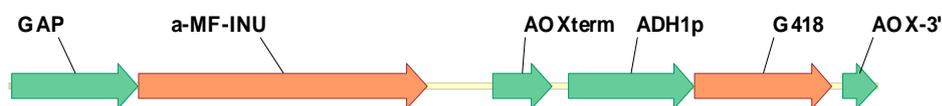
Для получения штаммов-продуцентов инулазы были сконструированы 4 плазмиды, 2 из которых предназначены для трансформации штамма *K. kurtzmanii* Y-727: **pINT-G418-GAP<sub>Y727</sub>-INU** и **pINT-G418-AOX1<sub>Y727</sub>-INU**; а две другие – для трансформации штамма *K. pfaffii* GS115 : **pINT-G418-GAP<sub>GS115</sub>-INU**; **pINT-G418-AOX1<sub>GS115</sub>-INU** (рис.10 А,В). Для обеспечения секреции инулазы в культуральную жидкость лидерный пептид  $\alpha$ -фактора ( $\alpha$ -MF) клонировали в одну ранку считывания с геном инулазы.



pINT-G418-AOX1-INU linear

5099 bp

A.



pINT-G418-GAP-INU-linear

5047 bp

B.

**Рисунок 10. А. Линеаризованная плаزمида pINT-G418-AOX1<sub>Y727/GS115</sub>-INU; В. Линеаризованная плазмида pINT-G418-GAP<sub>Y727/GS115</sub>-INU.**  $\alpha$ -MF-INU – ген инулазы, слитый в одной рамке считывания с лидерным пептидом  $\alpha$ -MF; AOX1 – промотор AOX1 из штаммов Y-727 и GS115; GAP – промотор GAP из штаммов Y-727 и GS115; AOXterm – терминатор AOX1; ADH1p – промотор гена ADH из дрожжей *S.cerevisiae*; G418 – ген kanMX; AOX-3' – 3' область промотора AOX1.

В качестве реципиентных штаммов использовали штамм *K. kurtzmanii* Y-727 и штамм *K. pfaffii* GS115, в качестве контрольного. При этом, экспрессия гена инулазы регулируется промотором AOX1 или GAP в каждом из анализируемых штаммов-продуцентов.

В результате, получены следующие штаммы-продуценты инулазы:

*Komagataella kurtzmanii* Y-727 / pINT-G418-GAP<sub>Y727</sub>-INU

*Komagataella kurtzmanii* Y-727 / pINT-G418-AOX1<sub>Y727</sub>-INU

*Komagataella pfaffii* GS115 / pINT-G418-GAP<sub>GS115</sub>-INU

*Komagataella pfaffii* GS115 / pINT-G418-AOX1<sub>GS115</sub>-INU

Клетки штаммов-продуцентов, в которых экспрессия инулазы регулировалась промотором GAP инокулировали в среду YPD (с глюкозой). Клетки штаммов-продуцентов, в которых экспрессия инулазы регулировалась промотором AOX1 инокулировали в среду YPM (с метанолом). Клетки выращивали до середины логарифмической фазы роста, после чего оценивали активность промоторов в клетках анализируемых штаммов по уровню активности инулазы, содержащейся в соответствующих осветленных культуральных жидкостях (Материалы и методы, глава 7.7.3).

Из полученных данных, представленных в табл. 6 и на рис.11, видно, что в случае экспрессии под контролем промотора AOX1 активность инулазы в штамме *K. kurtzmanii* Y727 / **pINT-G418-AOX1<sub>Y727</sub>-INU** выше более, чем в 2 раза, по сравнению с контрольным штаммом *K. pfaffii* GS115 / **pINT-G418-AOX1<sub>GS115</sub>-INU**. И наоборот, в случае регуляции гетерологичной экспрессии промотором GAP, активность продуцируемой инулазы больше у штамма *K. pfaffii* GS115 / **pINT-G418-GAP<sub>GS115</sub>-INU**, по сравнению с *K.kurtzmanii* Y727 / **pINT-G418-GAP<sub>Y727</sub>-INU**.

Таблица 6. Активность инулазы, ед/мл/1 о.е.

Активность инулазы, ед/мл/1 о.е.		
	Промотор GAP	Промотор AOX1
<b>Y727</b>	0,44	0,35
	0,48	0,43
<b>Среднее</b>	<b>0,46</b>	<b>0,39</b>
<i>Ст. откл.</i>	<i>0,0</i>	<i>0,1</i>
<b>GS115</b>	1,11	0,18
	0,97	0,16
<b>Среднее</b>	<b>1,04</b>	<b>0,17</b>
<i>Ст. откл.</i>	<i>0,1</i>	<i>0,0</i>

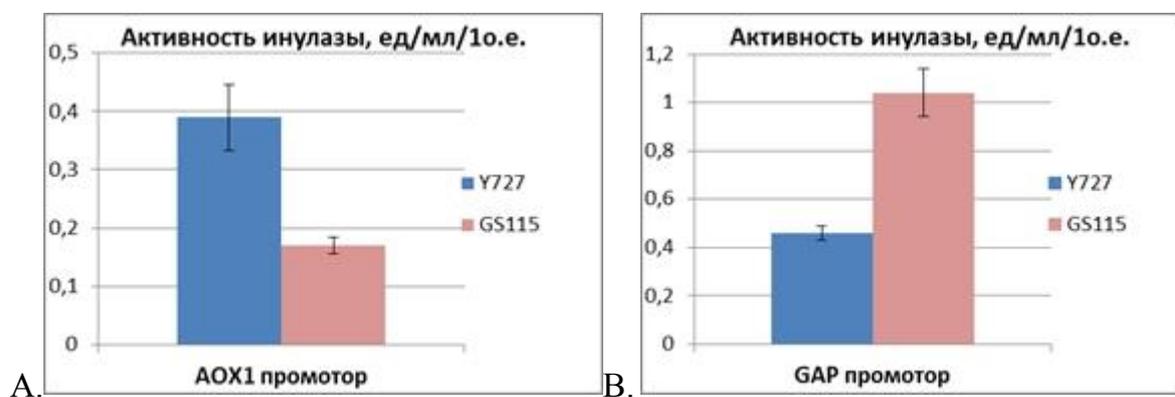


Рис. 11 А. Активность инулазы, в случае экспрессии гена под контролем промотора AOX1. В. Активность инулазы, в случае экспрессии гена под контролем промотора GAP. Планками отображено стандартное отклонение по измерениям активности двух клонов.

Полученные результаты также подтверждают секреторные возможности штамма Y-727. При этом, в случае использования промотора AOX1 для гетерологичной экспрессии, продуктивность штамма Y-727 более, чем в 2 раза превышает

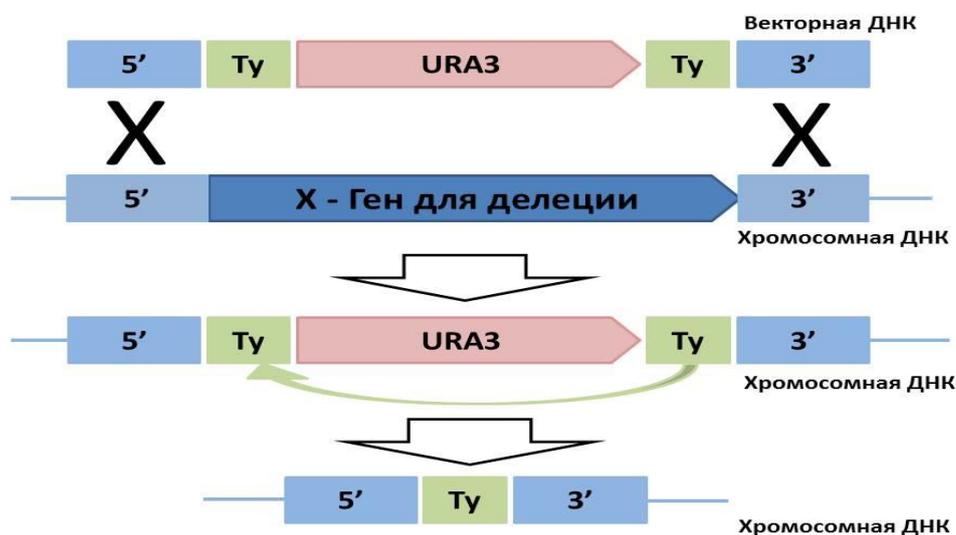
продуктивность GS115, чего не проявлялось в отношении внутриклеточно продуцируемой  $\beta$ -галактозидазы (глава 2.6, табл. 5). Однако, в случае использования промотора GAP продуктивность штамма Y-727 была более, чем в 2 раза ниже, чем у GS115. Данный опыт продемонстрировал утверждение в главе 1.10 литературного обзора о влиянии промотора, регулирующего экспрессию целевого гена, на продукцию целевого белка.

### 3. Получение ауксотрофных мутантов

Традиционно в дрожжевых системах экспрессии реализуется схема селекции трансформантов, основанная на комплементации мутантного ауксотрофного фенотипа реципиентного штамма путем введения гена соответствующего селективного маркера. Одна из наиболее удобных систем комплементации основана на использовании гена URA3, кодирующего оротидин-5-фосфат декарбоксилазу, фермент, участвующий в синтезе *de novo* пиримидиновых оснований. Мутанты по гену URA3 способны расти на среде с добавлением фтороротовой кислоты (5'-FOA), т.к. не обладают активностью оротидин-5-фосфат декарбоксилазы и не расщепляет субстрат (5'-FOA) с освобождением токсичного для клетки фторурацила [75]. Таким образом, полученные мутанты должны обладать фенотипом *ura<sup>-</sup>*. При этом, клетки, несущие ауксотрофную мутацию *ura3*, зависят от поступления производных урацила из питательной среды, но одновременно приобретают способность к росту на среде, содержащей 5'-FOA, что позволяет отбирать мутантов *ura3* на селективной среде (YPD + 5'-FOA). Такой же подход применялся для получения урациловых ауксотрофов *K. phaffii* [92].

Получение ауксотрофных мутации в клетках реципиентного штамма производилось путем замещения нативного гена трансформирующим клетки фрагментом ДНК, заключающим ген URA3 и фланкирующие этот ген дублированные последовательности гетерологичной ДНК (в настоящей работе использовались последовательности структурного гена *TuA* ретротранспозона *Tu1*). Последующий отбор *ura3* мутантов производилось таким образом, чтобы в удалении гена URA3 был задействован механизм рекомбинации между дублированными последовательностями гетерологичной ДНК. Таким образом, в результате рекомбинационного удаления селективного маркера сконструированная ауксотрофная

мутация оказывалась маркированной специфическим фрагментом гетерологичной ДНК. Тем самым предусматривалось, что впоследствии фрагменты гетерологичной ДНК могут быть использованы в качестве мишеней для направления интеграции целевых экспрессионных кассет (рис.12).



**Рисунок 12. Схематическое изображение способа получения мутантов**

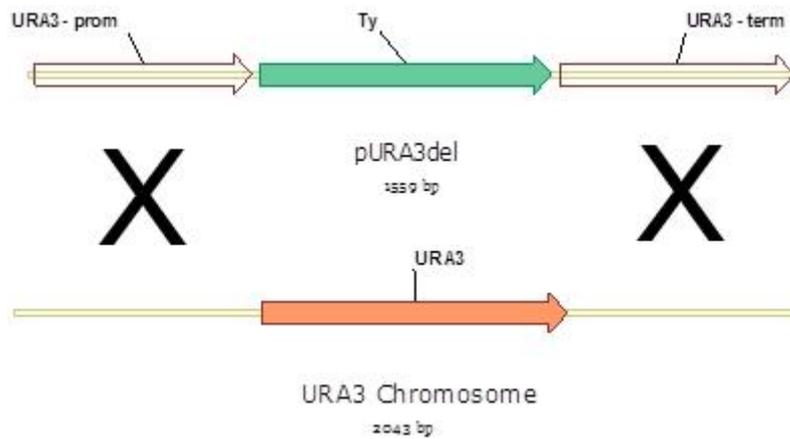
Реализация данного способа отбора мутантов *ura3* позволяет получать многократные мутации в случае повторных трансформаций фрагментами ДНК, содержащими ген *URA3*, фланкированный дублированными последовательностями гетерологичной ДНК.

Данный принцип был положен в основу получения коллекции ауксотрофных производных штамма *Y-727* в настоящей работе. Его использование позволило получить реципиентные штаммы, маркированные множественными ауксотрофными мутациями. В качестве мишеней для получения ауксотрофных мутантов были выбраны следующие гены: *URA3*, *HIS4*, *ARG4*, *ADE2*.

### **3.1 Получение штамма *K.kurtzmanii* Y727ura3<sup>mut</sup>**

Для получения мутантов *K.kurtzmanii* Y727ura3<sup>mut</sup> была проведена трансформация штамма дикого типа кассетой, которая обеспечивала делецию нативного гена *URA3* за счет сайт-специфической рекомбинации. Кассета

представляла собой ПЦР-фрагмент локуса URA3 геномной ДНК штамма Y-727, в составе которого была произведена протяженная делеция в области структурного гена URA3 (рис.13).



**Рисунок 13. Схема делеции гена URA3 кассетой pURA3del.** URA3-prom, URA3-term – плечи, направляющие интеграцию в локус URA3; Ty – фрагмент ретротранспозона Ty1 дрожжей *S.cerevisiae*; URA3 – ген оротидин-5-фосфат декарбоксилазы геномной ДНК.

Исходный штамм *K.kurtzmanii* Y727 трансформировали полученным фрагментом плазмиды pURA3del с целью получения мутантных клонов по гену URA3. Отбор мутантных клонов проводили на селективных чашках YPD, содержащих 5-фтороротидиновую кислоту (5'-FOA), в концентрации 500 мкг/мл агаризованной среды. В результате селекции было отобрано около 200 клонов, обладавших способностью расти в присутствии 5'-FOA.

С целью подтверждения фенотипа  $ura^{-}$  отобранные клоны были проверены на способность роста на синтетической агаризованной среде YNB состава (мас.%) (0,17 yeast nitrogen base (Difco), 0,5 сульфат аммония, 0,4 глюкоза, 2 агароза, остальное – вода) в зависимости от добавления в среду урацила в концентрации 50 мкг/мл среды. Было показано, что среди отобранных клонов только 8 имели фенотип  $ura^{-}$ .

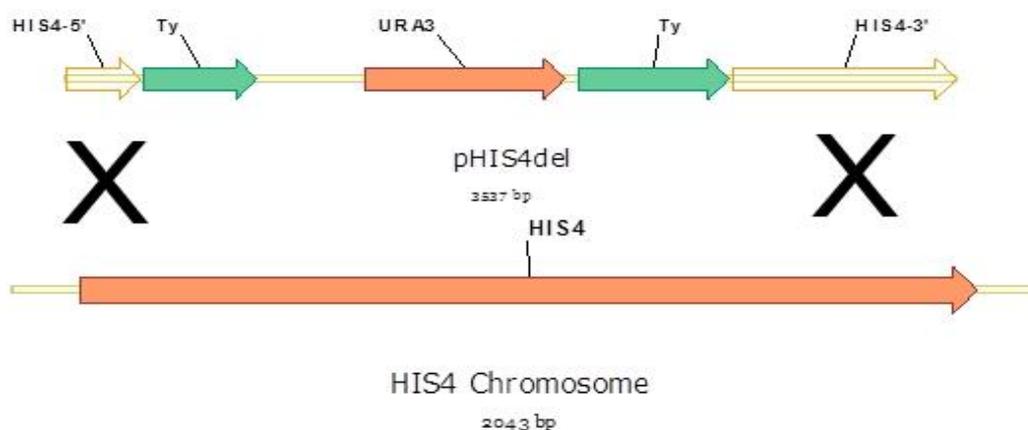
С помощью ПЦР было исследовано состояние локуса URA3 отобранных восьми клонов Y-727ura3 с фенотипом  $ura^{-}$ . Было установлено, что ни один из отобранных клонов не являлся истинным трансформантом, т.е. не содержал кассету pURA3del. Таким образом, во всех случаях были отобраны спонтанные мутанты. По всем другим фенотипическим и морфологическим признакам полученные мутанты не отличались от клонов исходного штамма.

У отобранных восьми клонов Y-727ura3 проведено исследование частоты реверсий. С этой целью полученные мутанты культивировали на среде YPD с добавлением урацила в течение 48 часов. Культуру отмывали от среды и  $\sim 10^8$  клеток высевали на чашки с минимальной средой (YNB) без урацила. Ни для одного из анализируемых трансформантов не было зафиксировано появление ревертантов. Соответственно, частота спонтанных реверсий составляла  $< 1/10^8$ . Для дальнейшей работы был отобран один клон.

Полученный мутантный штамм Y727 ura3<sup>mut</sup> был использован в качестве штамма реципиента для трансформации кассетами, включающими ген URA3 в качестве селективного маркера.

### 3.2 Получение штамма *K.kurtzmanii* Y727 ura3<sup>mut</sup>his4Δ

С целью получения штамма с двойной ауксотрофностью по урацилу и гистидину, был сконструирован вектор pHIS4del. Фрагмент данного вектора обеспечивал делецию нативного гена HIS4 (кодирующего фермент гистидинолдегидрогеназу, участвующую в синтезе гистидина) при трансформации штамма Y727 ura3<sup>mut</sup> (рис.14). В состав вектора pHIS4del был включен ген URA3 штамма *K. Phaffii* GS115, фланкированный дуплицированными фрагментами ДНК структурного гена TyA ретротранспозона Ty1 дрожжей *S.cerevisiae*. Гомологичные плечи, направлявшие интеграцию фрагмента вектора pHIS4del в геном дрожжей были получены путем амплификации фрагментов геномной ДНК локуса HIS4 дрожжей *K.kurtzmanii* Y727.

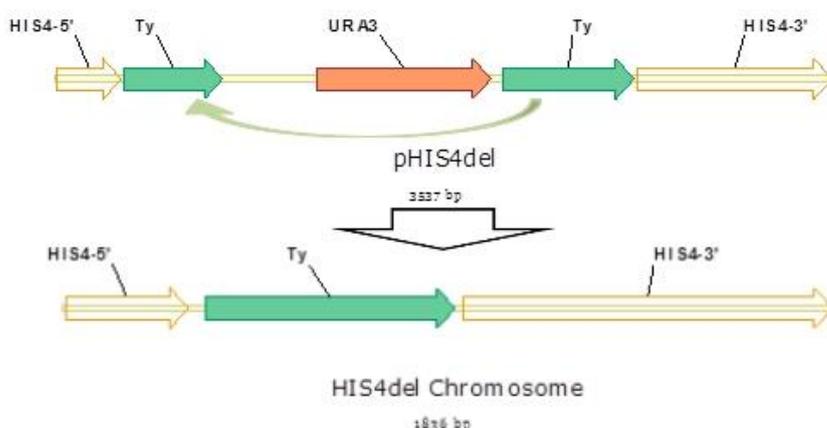


**Рисунок 14. Схема делеции гена HIS4 касетой pHIS4del.** HIS4-5',HIS4-3' – плечи, направляющие интеграцию в локус HIS4; URA3 –ген URA3 штамма *K. Phaffii* GS115; Ty – фрагменты ретротранспозона Ty1 дрожжей *S.cerevisiae*; HIS4 – ген гистидинолдегидрогеназы геномной ДНК.

Фрагмент вектора pHIS4del (рис.14) был использован для трансформации клеток штамма Y727 *ura3<sup>mut</sup>*. Трансформанты отбирали по способности к росту на синтетической среде YNB с добавкой гистидина (Материалы и методы, глава 7.3).

Полученные в результате трансформации клоны были исследованы на наличие у них фенотипа *his4*. С этой целью был проанализирован рост этих клонов на синтетической агаризованной среде YNB в зависимости от добавления в среду гистидина в концентрации 50 мкг/мл среды. У десяти клонов, продемонстрировавших искомый фенотип, было исследовано состояние локуса HIS4 при помощи ПЦР, с целью проверки корректности интеграции фрагмента вектора pHIS4del и замещения нативного гена HIS4. Проверка подтвердила правильную интеграцию с замещением у всех десяти клонов (данные не приведены). Один из отобранных клонов был назван Y727 *his4*-Ty и был использован далее для получения штамма Y727 *ura3<sup>mut</sup>his4Δ*.

В состав фрагмента вектора pHIS4del, использованного при получении штамма Y727 *his4*-Ty входили дублицированные фрагменты ДНК - Ty, фланкировавшие ген селективного маркера URA3. Организация этих фрагментов ДНК в виде прямых повторов допускала возможность их участия в спонтанной гомологичной рекомбинации, которая должна была сопровождаться выщеплением селективного маркера (рис.15).



**Рисунок 15. Схема выщепления селективного маркера URA3.** HIS4-5',HIS4-3' – плечи, направлявшие интеграцию в локус HIS4; URA3 – ген URA3 штамма *K. Phaffii* GS115; Ту – фрагменты ретротранспозона Ту1 дрожжей *S.cerevisiae*;

С целью поиска клеток дрожжей, в которых произошла указанная рекомбинация, клетки исходного штамма Y727 his4-Ту многократно пассировали в 5 мл богатой среды YPD, выращивая культуры после каждого пересева в течение 24 часов. После проведения трех пассажей  $10^9$  клеток высеяли на чашки с агаризованной средой YPD, содержащей 5-фтороротовую кислоту в концентрации 500 мкг/мл среды, для отбора клонов с искомым фенотипом his-ura-, не способный к росту на среде без гистидина и урацила.

В результате ПЦР анализа полученных клонов было найдено 2 клонa, геном которых содержал искомую делецию в локусе гена HIS4 (данные не приведены). В результате делеции полученный штамм приобрел генотип Ura3, и вместе с тем значительная часть структурного гена HIS4 оказалась замещена фрагментом гетерологичной ДНК.

Один из найденных клонов был назван штаммом *K. kurtzmanii* Y727 ura3<sup>mut</sup>his4Δ. Полученный штамм может быть использован для трансформации векторами, содержащими в качестве селективных маркеров гены URA3 или HIS4, с последующим отбором трансформантов на соответствующих селективных средах.

### **3.3 Получение штамма *K.kurtzmanii* Y727his4Δ**

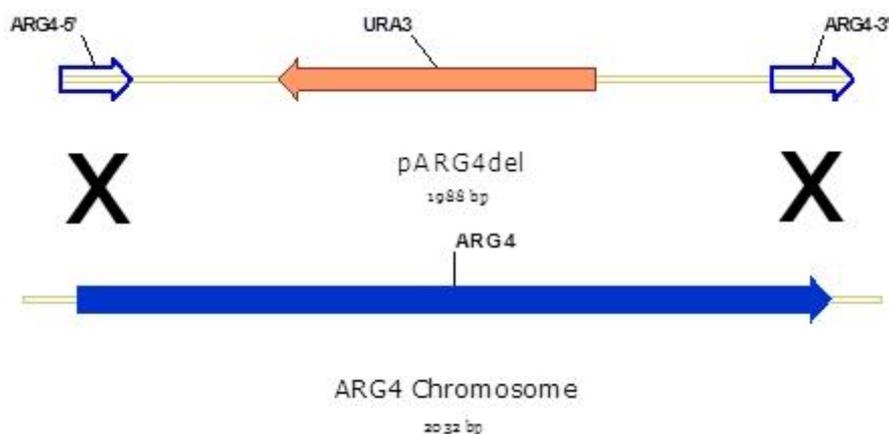
С целью получения искомого штамма *K.kurtzmanii* Y727his4Δ клетки штамма *K.kurtzmanii* Y727ura3<sup>mut</sup>his4Δ трансформировали фрагментом ДНК, заключавшим ген URA3 дрожжей *K.kurtzmanii*. Фрагмент ДНК, использованный для трансформации был получен в результате ПЦР-амплификации геномной ДНК с использованием высокоточной полимеразы Tersus (Евроген) и праймеров Pr1\_URA3 и Pr2\_URA3 (Материалы и методы, глава 7.6.5).

Отбор трансформантов производили на агаризованной среде YNB с гистидином, в концентрации 50 мкг/мл среды. В результате трансформации был получен штамм *K. kurtzmanii* Y727his4Δ. Полученный штамм может использоваться для трансформации

векторами, содержащими в качестве селективного маркера ген HIS4, с последующим отбором трансформантов на минимальной среде.

### 3.4 Получение штамма *K.kurtzmanii* Y727arg4Δhis4Δ

С целью получения штамма с двойной ауксотрофностью по аргинину и гистидину, был сконструирован вектор pARG4del. Фрагмент данного вектора обеспечивал делецию нативного гена ARG4 (кодирующего фермент аргининсукцинатлиазу, участвующую в синтезе аргинина) при трансформации штамма Y727 ura3<sup>mut</sup>his4Δ (рис.16). В состав вектора pARG4del был включен ген URA3 штамма Y727, фланкированный плечами ARG4-5', ARG4-3', направлявшими интеграцию фрагмента вектора pARG4del в локус ARG4 генома дрожжей. Плечи были получены путем амплификации фрагментов геномной ДНК локуса ARG4 дрожжей *K.kurtzmanii* Y727 с помощью праймеров pr1\_ARG4, pr2\_ARG4, pr3\_ARG4, pr4\_ARG4 (Материалы и методы, глава 7.6.4)



**Рисунок 16.** Схема делеции гена ARG4 кассетой pARG4del. ARG4-5', ARG4-3' – плечи, направляющие интеграцию в локус ARG4; URA3 – ген URA3; ARG4 – ген аргининсукцинатлиазы геномной ДНК.

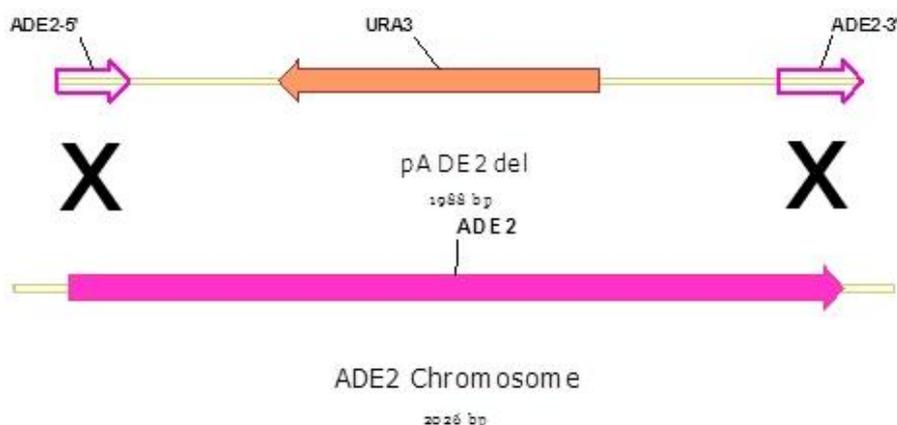
Штамм *K.kurtzmanii* Y727ura3<sup>mut</sup>his4Δ трансформировали линейаризованным фрагментом вектора pARG4del (рис. 16). Полученные в результате трансформации клоны были исследованы на наличие у них фенотипа his4arg4. С этой целью был проанализирован рост этих клонов на синтетической агаризованной среде YNB в

зависимости от добавления в среду гистидина и аргинина в концентрации 50 мкг/мл среды. У десяти клонов, продемонстрировавших искомый фенотип, было исследовано состояние локуса ARG4 при помощи ПЦР, с целью проверки корректности интеграции фрагмента вектора pARG4del и замещения нативного гена ARG4. Проверка подтвердила правильную интеграцию с замещением у всех десяти клонов (данные не приведены). Один из отобранных клонов был назван Y727arg4Δhis4Δ.

Полученный ауксотрофный по гистидину и аргинину штамм *K. kurtzmanii* Y727arg4Δhis4Δ пригоден для получения продуцентов путем трансформации векторами, содержащими в качестве селективного маркера гены HIS4 или ARG4.

### 3.5 Получение штамма *K. kurtzmanii* Y727ade2Δhis4Δ

Для получения штамма с двойной ауксотрофностью по аргинину и гистидину, был сконструирован вектор pADE2del. Фрагмент данного вектора обеспечивал делецию нативного гена ADE2 (кодирующего фермент фосфорибозиламиноимидазол карбоксилазу, участвующую в синтезе аденина) при трансформации штамма Y727 ura3<sup>mut</sup>his4Δ (рис.17). В состав вектора pADE2del был включен ген URA3 штамма Y727, фланкированный плечами ADE2-5', ADE2-3', направлявшими интеграцию фрагмента вектора pADE2del в локус ADE2 генома дрожжей. Плечи были получены путем амплификации фрагментов геномной ДНК локуса ADE2 дрожжей *K.kurtzmanii* Y727 с помощью праймеров pr1\_ADE2, pr2\_ADE2, pr3\_ADE2, pr4\_ADE2 (Материалы и методы, глава 7.6.6).



**Рисунок 17.** Схема делеции гена ADE2 касетой pADE2del. ADE2-5', ADE2-3' – плечи, направляющие интеграцию в локус ADE2; URA3 – ген URA3; ADE2 – ген фосфорибозиламиноимидазол карбоксилазы геномной ДНК.

Штамм *K.kurtzmanii* Y727ura3<sup>mut</sup>his4Δ трансформировали линейаризованным фрагментом вектора pADE2del (рис. 17). Полученные в результате трансформации клоны были исследованы на наличие у них фенотипа his4ade2. С этой целью был проанализирован рост этих клонов на синтетической агаризованной среде YNB в зависимости от добавления в среду гистидина и аденина в концентрации 50 мкг/мл среды. У десяти клонов, продемонстрировавших искомый фенотип, было исследовано состояние локуса ADE2 при помощи ПЦР, с целью проверки корректности интеграции фрагмента вектора pADE2del и замещения нативного гена ADE2. Проверка подтвердила правильную интеграцию с замещением у всех десяти клонов (данные не приведены). Один из отобранных клонов был назван Y727ade2Δhis4Δ.

Полученный ауксотрофный по гистидину и аденину штамм *K. kurtzmanii* Y727ade2Δhis4Δ пригоден для получения продуцентов путем трансформации векторами, содержащими в качестве селективного маркера гены HIS4 или ADE2.

Таким образом, в результате генно-инженерных работ были сконструированы 5 ауксотрофных производных базового штамма *K.kurtzmanii* Y727 (табл.7). Некоторые из этих штаммов были использованы для конструирования штаммов-продуцентов модельных белков и определения экспрессионных возможностей новой системы экспрессии.

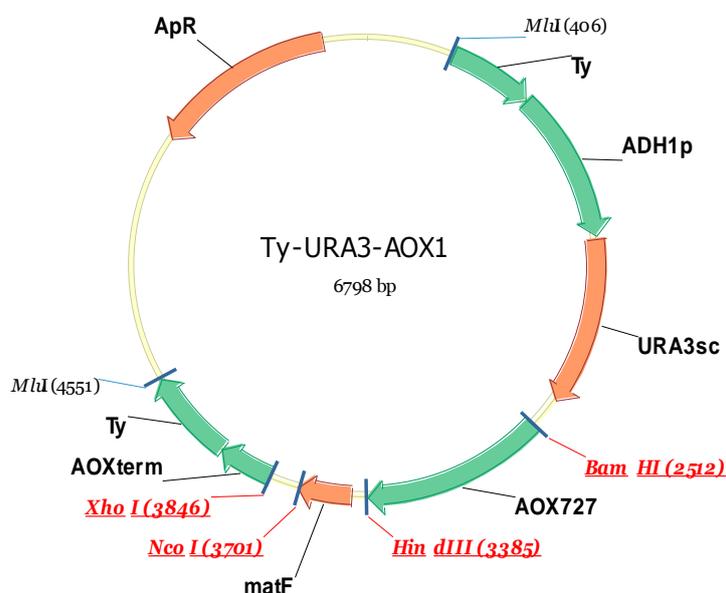
**Таблица 7. Генотипы и фенотипы ауксотрофных производных штамма Y727**

Штамм	Генотип	Фенотип
Y727ura3 <sup>mut</sup>	<i>ura3</i>	Ura <sup>-</sup>
Y727ura3 <sup>mut</sup> his4Δ	<i>his4, ura3</i>	Ura <sup>-</sup> , His <sup>-</sup>
Y727his4Δ	<i>his4</i>	His <sup>-</sup>
Y727arg4Δhis4Δ	<i>arg4, his4</i>	Arg <sup>-</sup> , His <sup>-</sup>
Y727ade2Δhis4Δ	<i>ade2, his4</i>	Ade <sup>-</sup> , His <sup>-</sup>

## 3.6 Конструирование экспрессионных векторов

### 3.6.1 Базовый вектор Ty-URA3-AOX1

Для трансформации штаммов Y-727ura3<sup>mut</sup> и Y727ura3<sup>mut</sup>his4Δ был сконструирован базовый экспрессионный вектор Ty-URA3-AOX1. Данный вектор содержал ген URA3 в качестве селективного маркера (рис. 18). Ген URA3 был клонирован из генома дрожжей *S. cerevisiae* и помещен под контроль промотора ADH1p, также клонированного из генома дрожжей *S. cerevisiae*. Экспрессия гена URA3 под контролем данного промотора обеспечивала комплементацию урациловой ауксотрофности. Такая организация селекции обеспечивала возможность визуальной детекции многокopiesных трансформантов по размеру колоний на чашке с селективной средой (данные не приведены). Линеаризованный фрагмент плазмиды, использованный для трансформации был фланкирован фрагментами структурного гена ретротранспозона Ty из дрожжей *S.cerevisiae* (глава 3.1, рис. 13), что обеспечивали направленную интеграцию данного фрагмента, а также возможность встраивания нескольких копий линеаризованного фрагмента по принципу «голова в хвост».



**Рисунок 18.** Карта плазмиды Ty-URA3-AOX1. Ty – фрагменты структурного гена ретротранспозона Ty из дрожжей *S.cerevisia* – плечи, направляющие интеграцию; ADH1p – промотор алкогольдегидрогеназы 1 из дрожжей *S.cerevisia*; URA3sc – ген оротидин декарбоксилазы из дрожжей

*S.cerevisia*; AOX1 – промотор алкогольоксидазы 1 из дрожжей Y-727; matF – сигнальный пептид  $\alpha$ -MF. AOXterm – терминатор гена алкогольоксидазы из дрожжей Y-727. ApR – ген  $\beta$ -лактамазы.

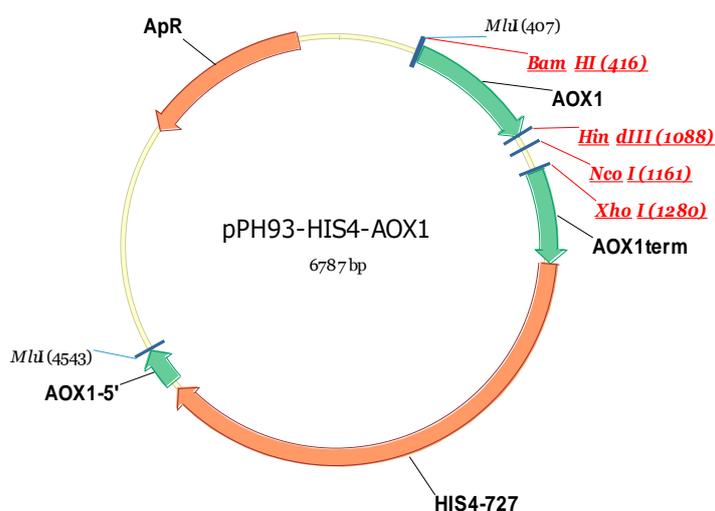
Экспрессия целевого гена, для которого предусмотрена возможность клонирования по сайтам NcoI / XhoI, находилась под контролем промотора AOX1. Для обеспечения секреции целевого белка в культуральную жидкость, лидерный пептид  $\alpha$ -MF был клонирован в одну рамку считывания с целевым геном.

Данный вектор был использован при получении штамма-производителя VEGF (глава 4.3).

### 3.6.2 Базовый вектор pRH93-HIS4-AOX1

Для трансформации штаммов Y-727his4 $\Delta$  и Y727ura3<sup>mut</sup>his4 $\Delta$  был сконструирован базовый экспрессионный вектор pRH93-HIS4-AOX1. Данный вектор содержал ген HIS4 в качестве селективного маркера, клонированный с собственной регуляторной областью из генома штамма Y-727 (рис. 19).

При картировании гена HIS4 после амплификации, было обнаружено присутствие сайтов рестрикции NcoI, BamHI, традиционно используемых для генно-инженерных работ. Для удаления данных сайтов был произведен сайт-специфический мутагенез с помощью ПЦР и праймеров prHIS4mut1, prHIS4mut2, prHIS4mut3, prHIS4mut4 (Материалы и методы, глава 7.6.8).



**Рисунок 19. Карта плазмиды pPH93-HIS4-AOX1.** HIS4 – ген гистидинол дегидрогеназы с собственной регуляторной областью из штамма Y-727. AOX1 – промотор алкогольоксидазы 1 из дрожжей Y-727; AOX1term – терминатор гена AOX1 из дрожжей Y-727. ApR – ген β-лактамазы.

Экспрессия целевого гена находилась под контролем промотора AOX1. Для терминации транскрипции была использована терминаторная область гена AOX1, клонированная из генома штамма Y-727. В случае необходимости обеспечения секреции целевого белка в культуральную жидкость, лидерный пептид α-MF мог быть клонирован по сайтам HindIII / NcoI в одну рамку считывания с целевым геном. Линеаризация вектора в результате рестрикции по сайтам MluI обеспечивала интеграцию полученного фрагмента в локус AOX1 за счет фланкирования 5' областью гена AOX1.

Данный вектор был использован при получении штамма-продуцента человеческого сывороточного альбумина (HSA) а также поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) (глава 4.1, 4.2).

### 3.7 Оптимизация протокола трансформации

Исходя из известных данных [61], наиболее эффективным методом трансформации метилотрофных дрожжей является метод электропорации. Для получения более высокого выхода трансформантов, была проведена оптимизация протокола электропорации для штамма Y-727.

С этой целью были выбраны ключевые вариабельные параметры: плотность культуры, буфер для инкубации клеток, напряжение импульса электрического разряда (табл.8). В результате сочетания данных параметров было испытано 18 вариантов протоколов.

**Таблица 8. Вариабельные параметры электропорации**

OD <sub>600</sub>	Буферы для инкубации	Напряжение импульса
1,0	A: [YPD; 0,2M HEPES; 25mM DTT ; pH 8.0]	1.5 kV
1,5	B: [10mM bicine-NaOH, 3% (v/v) ethylene glycol, 5% (v/v) DMSO, 1M Sorbitol, 100mM DTT, pH 8.3]	2.0 kV
2,5	C: [10 mM Tris-HCl, 100mM LiOAc, 0,6M Sorbitol, 10 mM DTT, pH7.5]	

Штамм Y-727his4Δ использовали в качестве модельного штамма для трансформации линейризованным фрагментом базового вектора pPH93-HIS4-AOX1. Отбор трансформантов проводили на чашках с минимальной агаризованной средой YNB. Учитывая, что для каждого протокола было использовано одинаковое количество клеток и равное количество трансформирующей ДНК, по количеству колоний на чашке можно было оценивать эффективность каждого протокола.

В результате проведенного эксперимента было установлено, что самый высокий выход трансформантов -  $3 \times 10^2$  получили при оптической плотности культуры до  $OD_{600}=1,5$ , использовании для инкубации буфера C и напряжении импульса 1,5 кВ.

Таким образом, для получения штаммов-продуцентов на основе штамма Y-727 использовали оптимизированный протокол трансформации.

#### **4. ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ НА ОСНОВЕ *K.kurtzmanii* Y-727**

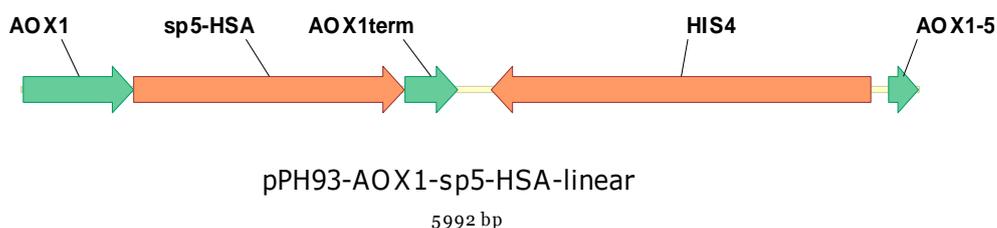
##### **4.1 Получение штамма *K.kurtzmanii* Y-727his4Δ/ pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HSA - продуцента человеческого сывороточного альбумина**

Для оценки штамма *K.kurtzmanii* Y-727, как продуцента рекомбинантного человеческого сывороточного авльбумина было предложено использовать для сравнения штамм *K.phaffii* GS115, в качестве контрольного штамма продуцента. Таким образом, для получения двух продуцентов, на основе двух разных штаммов, требовалось создать 2 идентичные генетические конструкции; трансформировать готовыми конструкциями штаммы реципиенты; отобрать трансформанты, и в конечном итоге, оценить экспрессионные возможности двух сравниваемых штаммов. Основываясь на опубликованных результатах [88], было решено создать генетические конструкции, предусматривающие секрецию альбумина в культуральную жидкость. Для этого ген искусственного лидерного пептида и ген альбумина клонировали в одну рамку считывания, для обеспечения секреции.

Для качественной оценки продукции альбумина использовали электрофорез в полиакриамидном геле культуральных жидкостей штаммов продуцентов в

денатурирующих условиях. Для количественной оценки продуцируемого белка использовали метод иммуоферментного анализа (ИФА).

Для получения двух продуцентов сывороточного альбумина были сконструированы 2 плазмиды **pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HSA** и **pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HSA** (рис.20). Для обеспечения секреции альбумина в культуральную жидкость ген альбумина поместили в одну рамку считывания с искусственным лидерным пептидом (аминокислотный состав: MRLLLLLLLLLPAALG). Полученными плазмидами трансформировали штаммы *K.kurtzmanii* Y-727 и *K.pfaffii* GS115 соответственно.



**Рисунок 20. А. Экспрессионный вектор pPH93-AOX1<sub>Y727/GS115</sub>-HSA. В. Линеаризованный экспрессионный вектор pPH93-AOX1<sub>Y727/GS115</sub>-HSA.** AOX1-5' – 5' область гена AOX1; AOX1 – промотор гена AOX1 штамма Y-727 / GS115; sp5-HSA – ген человеческого сывороточного альбумина с искусственным лидерным пептидом; AOXterm – терминатор гена AOX1; HIS4 – ген гистидинол дегидрогеназы с собственной регуляторной областью (штамма Y-727 / GS115).

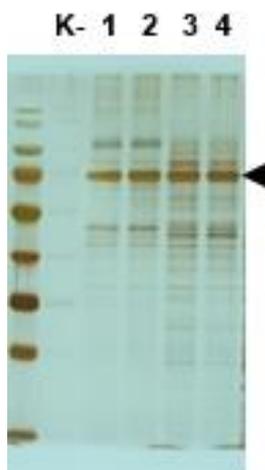
В результате трансформации и отбора трансформантов получили следующие штаммы продуценты сывороточного альбумина:

*K. kurtzmanii* Y-727his4Δ/ **pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HSA**

*K. pfaffii* GS115/ **pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HSA**

Клетки штаммов-продуцентов выращивали в пробирках со средой YP<sub>g</sub>M с метанольной индукцией (Материалы и методы, глава 7.7.2), после чего анализировали уровень продукции HSA в культуральной жидкости.

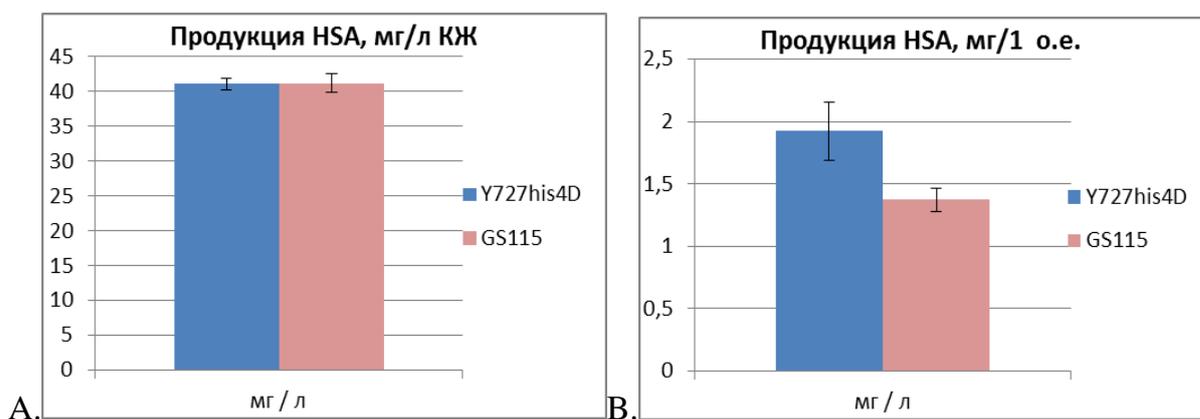
Для подтверждения секреции продуцируемого альбумина в культуральную жидкость, образцы культуральной жидкости были проанализированы с помощью электрофореза в денатурирующих восстанавливающих условиях в 12% полиакриламидном геле [Laemmli., 1970]. На рис. 21 представлена электрофореграмма культуральных жидкостей двух клонов каждого из продуцентов *K.kurtzmanii* Y-727his4Δ/pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HSA и *K.pfaffii* GS115/pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HSA.



**Рисунок 21.** Электрофореграмма культуральных жидкостей двух клонов, каждого из продуцентов альбумина *K.kurtzmanii* Y727his4Δ/pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HSA и *K.pfaffii* GS115/pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HSA. (К-) культуральная жидкость Y727his4Δ; (1) культуральная жидкость Y727his4Δ/pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HSA #1; (2) культуральная жидкость Y727his4Δ/pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HSA #2; (3) культуральная жидкость GS115/pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HSA #1 (4) культуральная жидкость GS115/pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HSA #2; Стрелкой указан сигнал, соответствующий молекулярной массе человеческого сывороточного альбумина (~67 кДа).

Измерения концентрации альбумина в культуральной жидкости проводили методом иммуноферментного анализа на твердой подложке. В качестве подложки использовали стандартный планшет для иммуноферментного анализа с предварительно сорбированными человеческими поликлональными антителами к HSA. Данные антитела, конъюгат - человеческие поликлональные антитела к HSA, меченные пероксидазой хрена, стандарт для калибровки, а также хромоген ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) входили в стандартный набор Albumin, Human, BioAssay ELISA Kit (производства United States Biological, США). Анализ проводили по протоколу, описанному в инструкции к набору.

Выход целевого белка составил 41,12 (+/-0,8) мг/л культуральной жидкости или 1,93 (+/-0,2) мг на 1 оптическую единицу) для штамма *K. kurtzmanii* Y727his4Δ, и 41,19 (+/-1,4) мг/л культуральной жидкости или 1,38 (+/-0,1) мг на 1 оптическую единицу для контрольного штамма *K.pfaffii* GS115 (рис. 22 А,В).



**Рисунок 22 А. Продукция сывороточного альбумина (HSA), нормированная на объем культуральной жидкости.** По вертикальной оси – количество HSA в мг на 1 л культуральной жидкости. **В. Продукция сывороточного альбумина HSA, нормированная на единицу оптической плотности.** По вертикальной оси – количество HSA в мг на единицу оптической плотности культуры (OD=1 при  $\lambda=600\text{nm}$ ). Голубой столбец соответствует количеству HSA в культуральной жидкости штамма *K.kurtzmanii* ВКПМ Y-727. Розовый столбец соответствует количеству HSA в культуральной жидкости штамма *K.pfaffii* GS115. Планками отображено стандартное отклонение по измерениям у двух клонов.

**Таблица 8. Продукция HSA, нормированная на 1 л культуральной жидкости и на 1 ед. оптической плотности культуры.**

Продуктивность HSA		
	мг / л	мг / 1 о.е.
Y727his4Δ	41,66	2,09
	40,55	1,76
<b>Среднее</b>	<b>41,105</b>	<b>1,925</b>
<i>Ст. откл.</i>	0,8	0,2
GS115	40,23	1,31
	42,14	1,44
<b>Среднее</b>	<b>41,185</b>	<b>1,375</b>
<i>Ст. откл.</i>	1,4	0,1

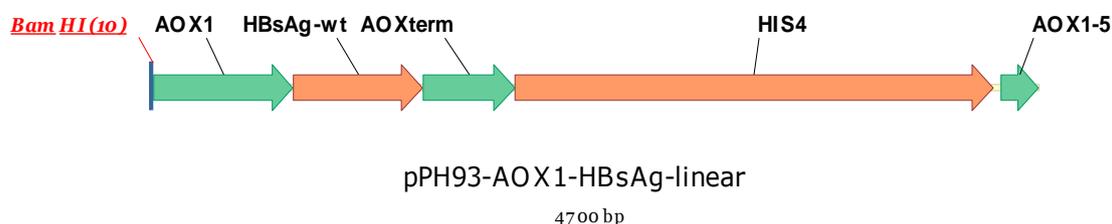
Данные, представленные в таблице 8 и на рис. 22 (А,В), свидетельствуют о том, что при нормировании на объем культуральной жидкости штамм продуцент *K. kurtzmanii* Y-727his4Δ/ **pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HSA** не уступает продуценту *K. pfaffii* GS115/ **pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HSA**, а при нормировании на оптические единицы даже превосходит его по продуктивности.

Таким образом, было подтверждено, что на основе штамма *K. kurtzmanii* Y727his4Δ может быть получен достаточно эффективный продуцент рекомбинантного сывороточного альбумина.

#### 4.2 Получение продуцента внутриклеточного белка поверхностного антигена вируса гепатита В

Как было упомянуто в литературном обзоре, штамм *K. pfaffii* GS115 использовался как реципиент для создания продуцента внутриклеточного HBsAg [96]. Поэтому для оценки нашего штамма в качестве продуцента внутриклеточного рекомбинантного белка, было решено создать 2 продуцента поверхностного антигена вируса гепатита – на основе *K. kurtzmanii* Y727his4Δ и, в качестве контроля, на основе штамма *K. pfaffii* GS115.

Для создания продуцентов HBsAg были сконструированы 2 плазмиды **pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HbsAg** и **pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HbsAg**, в которых ген HbsAg [20] находился под контролем промоторов AOX1 из штаммов *K. kurtzmanii* Y727 и *K. pfaffii* GS115 соответственно (рис. 23).



**Рисунок 23 А. Плазмида pPH93-AOX1<sub>Y727</sub> / GS115-HBsAg. В. Линеаризованная плазмида pPH93-AOX1<sub>Y727</sub> / GS115-HBsAg.** AOX1-5' – 5' область гена AOX1; AOX1 – промотор гена AOX1 штамма Y-727 / GS115; HBsAg – ген поверхностного антигена вируса гепатита В дикого типа; AOXterm – терминатор гена AOX1; HIS4 – ген гистидинол дегидрогеназы с собственной регуляторной областью (штамма Y-727 / GS115).

В качестве реципиентных штаммов для трансформации линеаризованными фрагментами векторов pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HbsAg и pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HbsAg используют штамм *K. kurtzmanii* Y-727his4Δ и штамм *K. pfaffii* GS115 соответственно.

В результате трансформации и отбора трансформантов получили 2 штамма-продуцента HBsAg: *Y-727his4Δ/pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HBsAg* и *K. pfaffi* *GS115/pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HbsAg*.

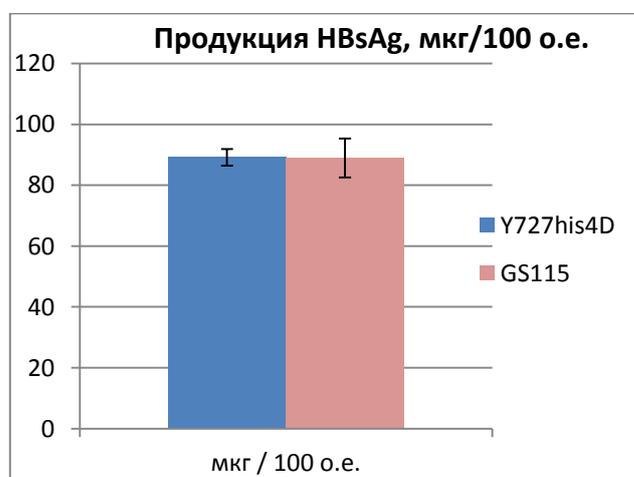
Клетки штаммов выращивали на среде YPgM в течение 72 часов с метанольной индукцией (Материалы и методы, глава 7.7.4), после чего анализировали содержание рекомбинантного HBsAg в клеточных лизатах культур.

Для определения уровня продукции использовали метод иммуоферментного анализа на твердой подложке. Количественно данные нормированы на 100 оптических единиц и приведены на рис.24 и в таблице 9, из которых видно, что продукция поверхностного антигена вируса гепатита В одинакова у обоих сравниваемых штаммах в пределах погрешности измерения.

**Таблица 9. Продукция HBsAg, мкг/100 о.е.**

Продукция HBsAg	
	мкг / 100 о.е.
Y727his4Δ	87,2
	91,1
<b>Среднее</b>	<b>89,15</b>
<i>Ст.откл.</i>	2,8
GS115	93,5
	84,4
<b>Среднее</b>	<b>88,95</b>
<i>Ст. откл.</i>	6,4

Продукция HBsAg, нормированная на 100 оптических единиц (OD<sub>600</sub>)



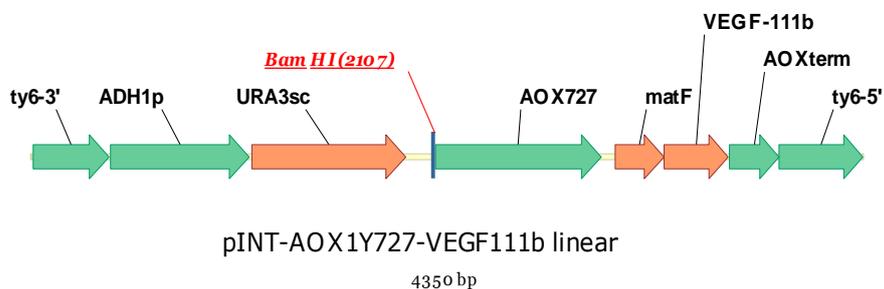
**Рис. 24** Диаграмма продукции HBsAg, нормированной на 100 оптических единиц (OD<sub>600</sub>)

Из полученных данных видно, что штамм *K. kurtzmanii* Y727his4Δ может обеспечивать сравнимый со штаммом *K. pfaffii* GS115 уровень синтеза и внутриклеточного накопления рекомбинантного HBsAg.

### 4.3 Получение продуцента рекомбинантного эндотелиального фактора роста (VEGF)

Для создания продуцента VEGF был синтезирован искусственный ген VEGF<sub>111b</sub>, с одной аминокислотной заменой (Asn75->Gln), т.к. в 77-ом положении следует треонин, что явилось бы сигналом N-гликозилирования аспарагина. Лидерный пептид α-MF был клонирован в одну рамку считывания с геном VEGF<sub>111b</sub>, что обеспечивало секрецию рекомбинантного ростового фактора в культуральную жидкость. Для регуляции экспрессии целевого гена использовали промотор AOX1.

Для создания продуцента секретируемого VEGF<sub>111b</sub> на основе штамма *K. kurtzmanii* Y727 была сконструирована плаزمиды pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-VEGF<sub>111b</sub> (рис. 25).

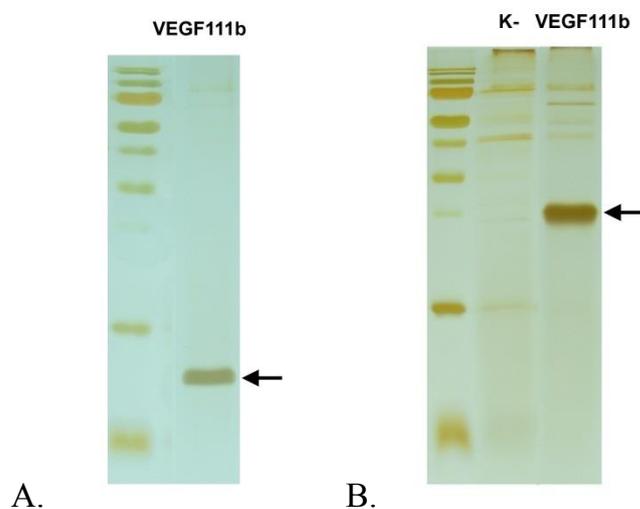


**Рисунок 25.** Линейризованный фрагмент плазмиды плазмиды pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-VEGF<sub>111b</sub> для трансформации. Ty – фрагменты структурного гена ретротранспозона Ty из дрожжей *S.cerevisia* – плечи, направляющие интеграцию; ADH1p – промотор алкогольдегидрогеназы 1 из дрожжей *S.cerevisia*; VEGF-111b – ген сосудисто-эндотелиального фактора роста; URA3sc – ген оротидин декарбоксилазы из дрожжей *S.cerevisia*; AOX1 – промотор алкогольоксидазы 1 из дрожжей Y-727; matF – сигнальный пептид α-MF. AOXterm – терминатор гена алкогольоксидазы из дрожжей Y-727.

Линейризованным фрагментом данной плазмиды (рис. 25) трансформировали штамм *K.kurtzmanii* Y-727 ura3<sup>mut</sup>his4Δ. В результате трансформации и отбора трансформантов получили штамм продуцент VEGF<sub>111b</sub> : *K. kurtzmanii* Y727/pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-VEGF<sub>111b</sub>.

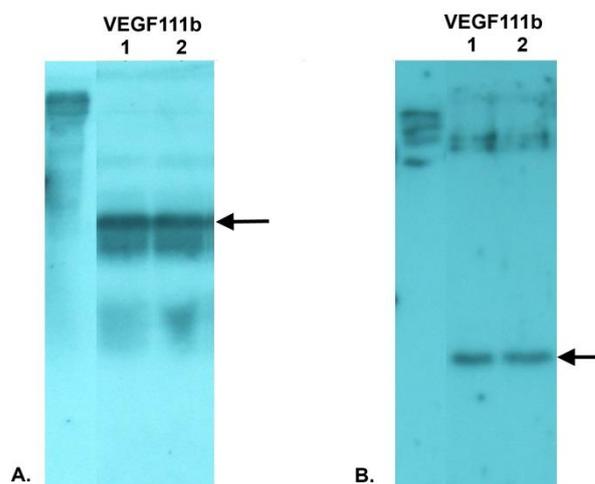
Клетки штаммов-продуцентов выращивали в пробирках со средой YPgM с метанольной индукцией (Материалы и методы, глава 7.7.5), после чего анализировали уровень продукции VEGF в культуральной жидкости.

Для подтверждения экспрессии гена VEGF<sub>111b</sub> в клетках *K.kurtzmanii* Y727 и секреции продукта в культуральную жидкость – образцы культуральной жидкости анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (рис. 26 А,В). При этом, судя по сигналу на электрофореграмме, секретируемый VEGF<sub>111b</sub> образовывал гомодимер в невосстанавливающих условиях (рис.26 В).



**Рисунок 26. А. Электрофореграмма культуральной жидкости *K. kurtzmanii* Y727/pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-VEGF<sub>111b</sub> в восстанавливающих условиях. В. Электрофореграмма культуральной жидкости *K. kurtzmanii* Y727/pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-VEGF<sub>111b</sub> в невосстанавливающих условиях**

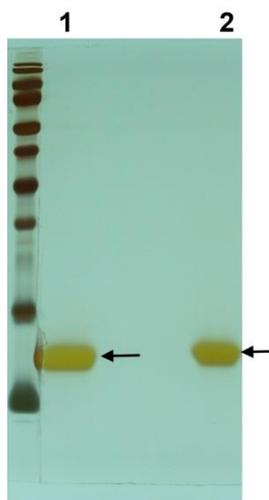
Помимо анализа с помощью электрофореза, образцы культуральной жидкости двух клонов штамма продуцента *K. kurtzmanii* Y727/pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-VEGF<sub>111b</sub> были проанализированы с помощью вестерн блота (рис. 27 А,В). В качестве первичных антител использовали коммерчески-доступный препарат Бевацизумаб, представляющий собой гуманизированные моноклональные антитела к VEGF.



**Рисунок 27 А. Вестерн блот образцов культуральной жидкости двух клонов *K. kurtzmanii* Y727/pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-VEGF<sub>111b</sub> в невосстанавливающих условиях. В. Вестерн блот образцов культуральной жидкости двух клонов *K. kurtzmanii* Y727/pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-VEGF<sub>111b</sub> в восстанавливающих условиях**

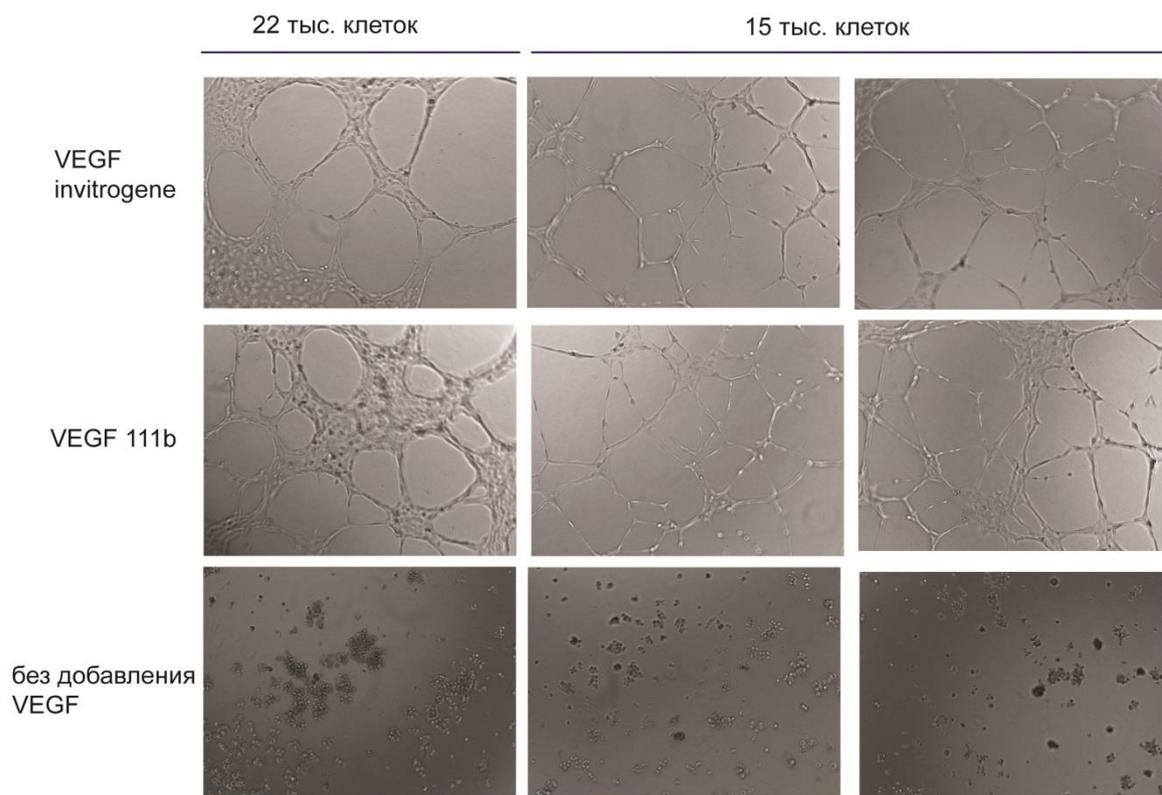
Данные, представленные на рис. 27 подтверждают димеризацию секретируемого VEGF<sub>111b</sub>.

На основе опубликованных данных [106] была разработана методика очистки, основанная на двухстадийной хроматографии. Первая стадия представляла собой аффинную хроматографию осветленной культуральной жидкости на сорбенте Ni-NTA, и основана на специфическом связывании рекомбинантного VEGF<sub>111b</sub>, находящегося в культуральной жидкости, с матрицей за счет присутствия в самой структуре белка двух следующих друг за другом аминокислотных остатков гистидина, в 11-ом и 12-ом положении. Вторая стадия очистки состояла в обесоливание препарата на колонке с сорбентом Sephadex 25 (колонка CD-10), полученного после первой стадии. На электрофореграмме (рис. 28) представлены результаты данной методики очистки.



**Рисунок 28.** Электрофореграмма VEGF<sub>111b</sub> после выделения (15% ПААГ). (1) VEGF<sub>111b</sub> после очистки на Ni-NTA агарозе; (2) VEGF<sub>111b</sub> после обессоливания, с буфере PBS.

Для проверки биологической активности выделенного белка, образцы VEGF<sub>111b</sub> были протестированы в институте Общей Генетики РАН (под руководством С.Л. Киселева) на формирование капилляроподобных структур. Опыт проводился на клеточной линии HUVEC (человеческие эндотелиальные клетки), на матрикеле. В качестве положительного контроля использовался препарат VEGF<sub>165a</sub> (Invitrogen), в концентрации 20 нг/мкл. Анализируемый препарат VEGF<sub>111b</sub> брали в такой же концентрации. Результаты опыта представлены на рис. 29.



**Рисунок 29. Формирование капилляроподобных трубчатых структур клетками HUVEC.**

Концентрация добавляемых факторов роста (VEGF (Invitrogen), VEGF<sub>111b</sub>) составляет 20 нг/мкл. Клетки брали в двух концентрациях 22 тыс. клеток и 15 тыс. клеток на 50 мкл матригеля.

Видно, что исследуемый образец поддерживает формирование сосудов с чуть большей эффективностью в сравнении с контрольным образцом. В экспериментальных точках, не содержащих VEGF, формирование капилляроподобных структур не наблюдалось.

Таким образом, можно сделать вывод, что в данной модельной системе выделенный VEGF<sub>111b</sub> обладает биологической активностью. При этом, продукция данного ростового фактора составляет приблизительно 45 мг на 1 литр культуральной жидкости, при культивировании в колбах на богатой среде.

#### **4.4 Оценка эффективности системы экспрессии в условиях ферментации в биореакторе**

С целью оценить эффективность системы экспрессии в условиях ферментации в биореакторе в сравнении со штаммом GS115, была проведена ферментация двух

модельных штаммов-продуцентов альбумина: *K. kurtzmanii* Y-727his4Δ/ pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HSA / Ty-URA3-AOX1-HSA (содержащий 2 копии гена HSA) и *K. pfaffii* GS115/ pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HSA (содержащий 1 копию гена HSA).

Для получения двухкопийного штамма-продуцента *K. kurtzmanii* Y-727his4Δ/ pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HSA / Ty-URA3-AOX1-HSA был сконструирован вектор Ty-URA3-AOX1-HSA на основе базового вектора Ty-URA3-AOX1 путем клонирования гена HSA. Линеаризованным фрагментом полученного вектора был трансформирован штамм-продуцент *K. kurtzmanii* Y-727his4Δ/ pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HSA. В результате отбора трансформантов был отобран 1 клон, содержащий 2 копии гена HSA (данные по отбору двухкопийного клона не приведены).

Ферментация двух штаммов-продуцентов проводилась параллельно в двух биореакторах, при одинаковых параметрах. Общее время ферментации составило 168 часов. В течение первых 54 часов проводили подпитку глицерином для наращивания биомассы, затем прекращали подпитку глицерином и включали подпитку метанолом для индукции промотора AOX1. Более подробно условия ферментации описаны в разделе Материалы и методы (глава 7.7.7).

В течение ферментации отбирали пробы двух культур для последующего анализа культуральных жидкостей в помощью электрофореза в денатурирующих условиях. Результаты анализа приведены на рис. 30.

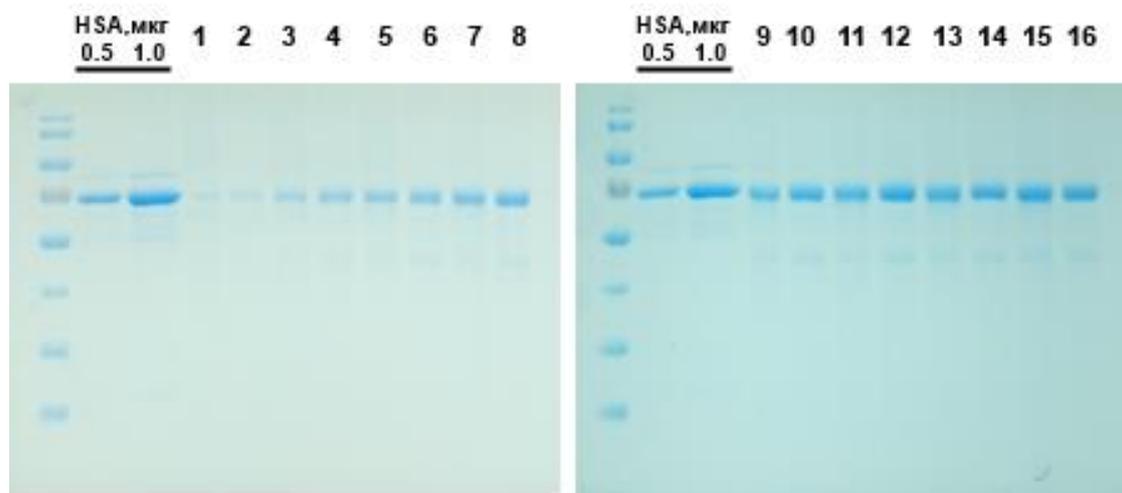


Рисунок 30. Электрофореграмма культуральной жидкости *K. kurtzmanii* Y-727his4Δ/ pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HSA/Ty-URA3-AOX1-HSA и *K. pfaffii* GS115/ pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HSA.

- |                    |                       |
|--------------------|-----------------------|
| 1. GS115 (54,5 ч)  | 9. GS115 (102,5 ч)    |
| 2. Y-727 ; (54,5ч) | 10. Y-727 ; (102,5 ч) |
| 3. GS115 (71,5ч)   | 11. GS115 (121,5 ч)   |
| 4. Y-727 (71,5 ч)  | 12. Y-727 (121,5 ч)   |
| 5. GS115 (78,5 ч)  | 13. GS115 (142,5 ч)   |
| 6. Y-727 (78,5 ч)  | 14. Y-727 (142,5 ч)   |
| 7. GS115 (95,5 ч)  | 15. GS115 (168,5 ч)   |
| 8. Y-727 (95,5ч )  | 16. Y-727 (168,5 ч)   |

Как видно из данных электрофореграммы, сигналы на дорожке №2,4 более интенсивные по сравнению с сигналами на дорожках №1,3, что свидетельствует о том, что биосинтез альбумина в клетках штамма Y-727 начинался раньше по сравнению с клетками штамма GS115.

По окончанию ферментации (дорожки №15,16 – 168,5 часов) количество продуцируемого альбумина в клетках штаммах Y-727 и GS115 оказалось примерно одинаковым. По оценке, проведенной в результате сканирования и нормирования сигналов электрофореграммы при помощи программы TotalLab, количество продуцируемого альбумина составило около 2 мг/мл осветленной культуральной жидкости для штамма Y-727 и GS115.

Таким образом, было показано, что результаты, полученные при использовании новой экспрессионной системы в условиях ферментации на модельном белке – HSA, сопоставимы с результатами полученными при использовании коммерческой системы экспрессии на штамме GS115.

### **5.1 Поиск альтернативного индуктора промотора АОХ1**

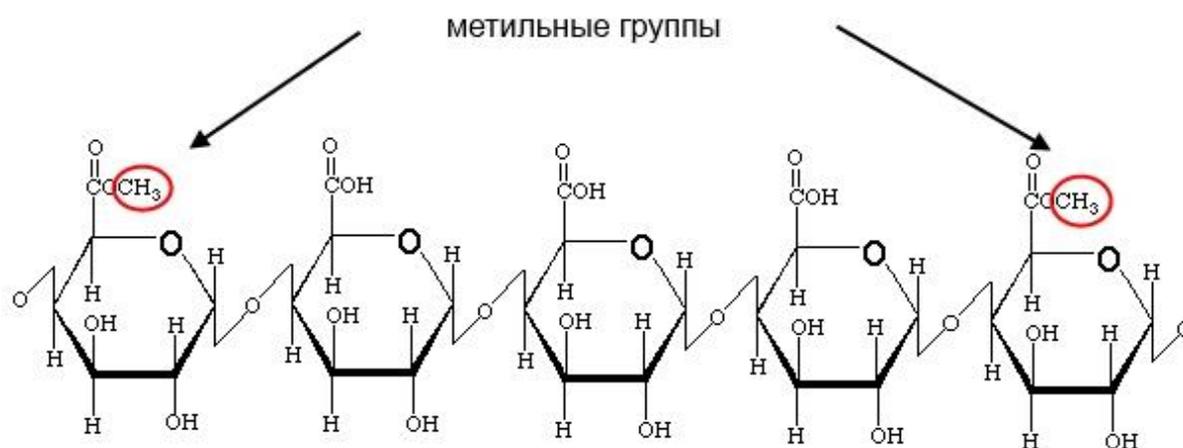
Как уже рассматривалось в литературном обзоре, одним из существенных недостатков экспрессионной системы, основанной на метилотрофных дрожжах, является необходимость использования токсичного и огнеопасного метанола для индукции промотора АОХ1. Данное обстоятельство особенно важно в условиях биотехнологического производства, где при соблюдении норм Российского законодательства [53,54], использование метанола практически становится невозможным.

В этой связи одна из актуальных задач настоящей работы была направлена на поиск альтернативного индуктора, способного заменить метанол. С этой целью были

проведены испытания многочисленных соединений, в том числе тех, в составе которых содержались метильные группы (напр. метиловые эфиры аминокислот, диметиловый эфир и др.). В числе проверенных соединений были этанол, аланин, сорбитол, маннитол, соли уксусной кислоты, сахара (арабиноза, галактоза, рамноза и др.).

В результате проведенного исследования было установлено, что все испытанные соединения, поддерживающие рост дрожжей, относились к категории катаболитных репрессоров промотора AOX1 и не обладали никаким индукционным потенциалом (данные не приведены).

В то же время было установлено, что одним из редких индукторов промотора AOX1 является пектин. Пектин содержится в больших количествах в высших растениях, фруктах и представляет собой гетерополисахарид, в основе которого  $\alpha$ -1,4-D-полигалактуроновая кислоты (рис. 31).

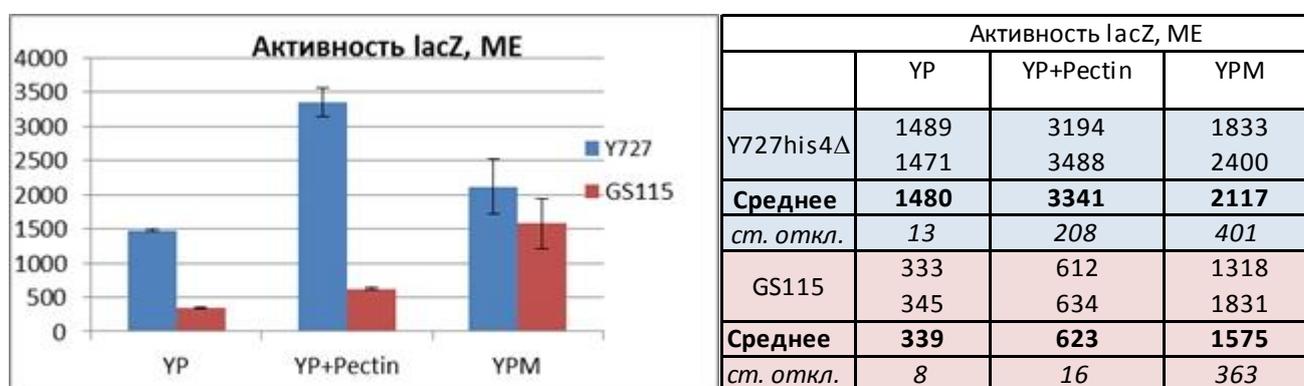


**Рисунок 31.** Упрощенная структура пектина (в природе пектины отличаются разнообразием боковых цепей включающих L-рамнозу, L-арабинозу, D-галактозу)

Часть карбоксильных групп D-галактуроновой кислоты этерифицирована метанолом. В соответствие с числом таких групп, пектины характеризуются степенью этерификации, которая может составлять 80-90% [107]. Многие дрожжи, в том числе и некоторые метилотрофные виды (напр. *P. methanolica*, *C. boidinii*), способны утилизировать пектин за счет эндогенных ферментов метилэстеразы (ЕС 3.1.1.11), пектинлиазы (ЕС 4.2.2.10), полигалактуроназы (ЕС 3.2.1.15) [108].

Путем проведения ростового теста было установлено отсутствие способности штаммов *K. kurtzmanii* Y727 и *K. phaffii* GS115 использовать пектин в качестве единственного источника углерода.

Однако, при этом, пектин вызывал индукцию промотора AOX1. Опыт был проведен с использованием штаммов *K. kurtzmanii* Y-727/pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ и *K. phaffii* GS115/pINT-AOX1<sub>GS115</sub>-LacZ с репортерным геном lacZ, находящимся под контролем промотора AOX1. Клетки штаммов были инокулированы в среду YP - без добавления субстрата; YPP – содержащую 1% (m/v) пектин; YPM – содержащую 1% (v/v) метанол. Была измерена активность β-галактозидазы, находящейся под контролем промотора AOX1, в клеточных лизатах культур (рис.32).



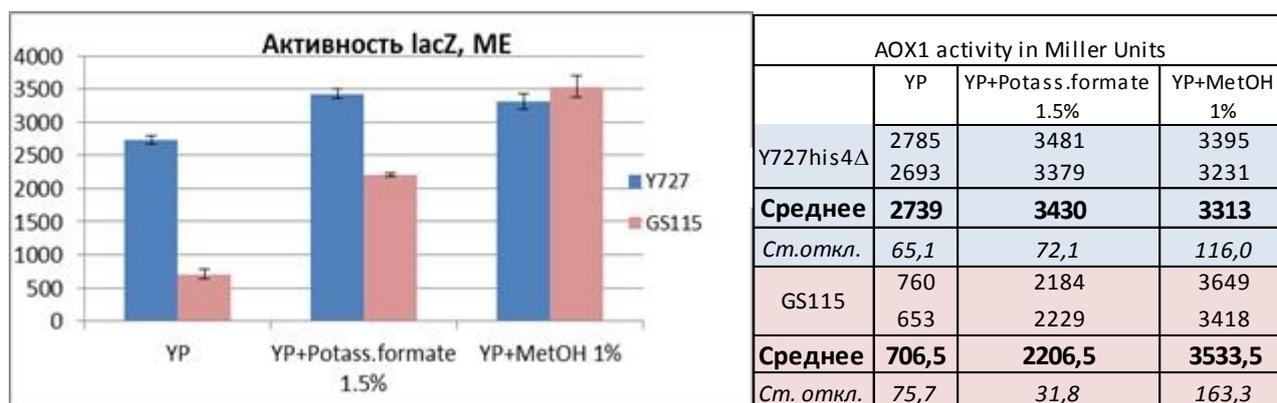
**Рисунок 32.** Активность бета-галактозидазы, измеренная лизате клеткок *K. kurtzmanii* Y-727/pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ и *K. phaffii* GS115/pINT-AOX1<sub>GS115</sub>-LacZ. По вертикальной оси – шкала активности в Миллеровых единицах [89]. Голубые столбцы соответствуют активности фермента в лизате клеток штамма *K.kurtzmanii* Y727, розовые столбцы соответствуют активности фермента в лизате клеток штамма *K.phaffii* GS115. На диаграмме планками отображено стандартное отклонение по результатам измерения активности у двух клонов.

Из полученных данных можно предположить, что штаммы *K. kurtzmanii* Y-727 и *K. phaffii* GS115 секретируют фермент, обладающий метилэстеразной активностью, обеспечивающий таким образом поступление в клетки некоторое количество индуктора. Однако метанола, образующегося в результате действия гипотетических ферментов, видимо, не достаточно для того, чтобы эффективно поддерживать рост культур.

Поскольку использование пектина не принесло ожидаемого эффекта в полной мере, а также в связи с рядом технических сложностей при его использовании (высокая вязкость концентрированных растворов), поиск подходящих индуцирующих АOX1 субстратов был продолжен.

Другим найденным субстратом оказался формиат. Способность формиата индуцировать АOX1 была охарактеризована с использованием репортерных штаммов *K. kurtzmanii* Y727/pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ и *K.pfaffii* GS115/pINT-AOX1<sub>GS115</sub>-LacZ с репортерным геном lacZ, находящимся под контролем промотора АOX1.

Клетки штаммов были инокулированы в среду YP - без добавления субстрата; YPF – содержащую 1,5% (m/v) формиата калия; YPM – содержащую 1% (v/v) метанол. Клетки выращивали до середины экспоненциальной фазы роста. Для оценки уровня индукции промотора АOX1 была измерена активность β-галактозидазы, находящейся под контролем промотора АOX1, в клеточных лизатах культур [89]. Результаты измерений представлены на рис.33.



**Рисунок 33.** Активность бета-галактозидазы, измеренная лизате клеткок *K. kurtzmanii* Y727/pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ и *K.pfaffii* GS115/pINT-AOX1<sub>GS115</sub>-LacZ. По вертикальной оси – шкала активности в Миллеровых единицах [89]. Голубые столбцы соответствуют активности фермента в лизате клеток штамма *K.kurtzmanii* Y-727, розовые столбцы соответствуют активности фермента в лизате клеток штамма *K.pfaffii* GS115. На диаграмме планками отображено стандартное отклонение по результатам измерения активности у двух клонов.

Полученные данные свидетельствовали о том, что формиат действительно индуцировал промотор АOX1, причем уровень индукции составлял примерно 80-100% от уровня метанольной индукции. Было сделано предположение, что, являясь последним интермедиатом в метаболическом пути диссимиляции метанола (рис.2),

часть экзогенного формиата может быть восстановлена до метанола эндогенными ферментами FLD и АОХ, по аналогии с процессом метаногенеза [110] и, тем самым, индуцировать промотор АОХ1.

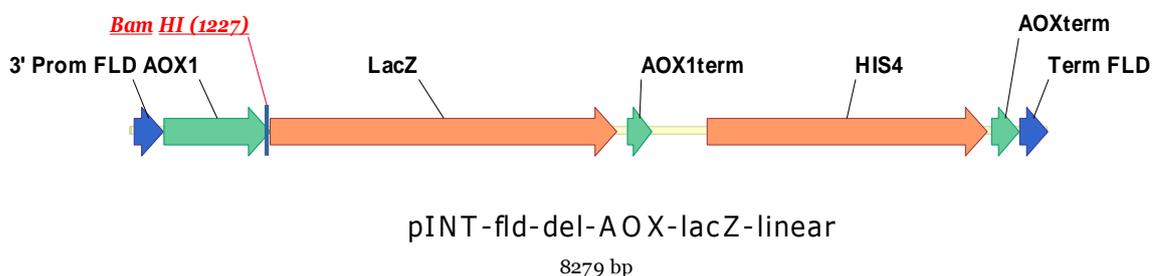
Формиат окисляется на последнем этапе диссимиляции метанола, NAD-зависимой формиатдегидрогеназой, с образованием углекислого газа и 1 эквивалента NADH. Таким образом, можно предположить, что формиат не является выгодным источником энергии, при этом, по имеющимся на сегодняшний день данным, формиат вряд ли может быть непосредственным источником углерода, поскольку является конечным метаболитом в цепочке диссимиляции метанола. Однако, проведенный опыт по росту клеток *K.kurtzmanii* Y-727 а также *K.pfaffii* GS115 на минимальной агаризованной среде с формиатом калия, как единственным источником углерода (энергии), подтвердил возможность медленного роста на формиате (данные не представлены).

## 5.2 Исследование механизма индукции промотора АОХ1

Полученные данные об индукции промотора АОХ1 формиатом дают основания предполагать, что какое-то количество метанола может образовываться в клетке из формиата, который затем индуцирует промотор АОХ1; либо, наличие какого-то промежуточного метаболита, являющегося непосредственным индуктором промотора АОХ1. Для подтверждения гипотезы о непосредственном участии метанола в индукции промотора АОХ1 был сконструирован мутантный штамм, содержащий делецию гена формальдегид дегидрогеназы FLD. Таким образом, в клетках мутантного штамма метаболический путь утилизации метанола искусственно прерывался, что исключало возможность синтеза метанола в клетке из экзогенного формиата (рис. 2). Соответственно, можно было ожидать, что экзогенный формиат не сможет индуцировать промотор АОХ1, в то время как экзогенный метанол продолжит оказывать индуцирующее действие.

Для получения более достоверных данных опыт проводили на клетках двух штаммов *K.kurtzmanii* Y-727 а также *K.pfaffii* GS115. Чтобы получить штаммы *K.kurtzmanii* Y-727/*fld* $\Delta$ -АОХ1<sub>Y727</sub>-LacZ и *K.pfaffii* GS115/*fld* $\Delta$ -АОХ1<sub>GS115</sub>-LacZ были

сконструированы 2 плазмиды: **pINT-fldΔ-AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ** и **pINT-fldΔ-AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ**, содержащие репортерный ген *lacZ* (рис. 34). Данными плазмидами трансформировали штаммы *K.kurtzmanii* Y-727his4Δ и *K.pfaffii* GS115 соответственно.



**Рисунок 34. Линейризованный фрагмент плазмиды pINT-fldΔ-AOX1<sub>Y727</sub> / GS115-lacZ.** 3'Prom FLD, TermFLD – плечи, направляющие интеграцию; AOX1 – промотор гена AOX1 штамма Y-727 / GS115; *lacZ* – ген β-галактозидазы; AOXterm – терминатор гена AOX1; HIS4 – ген гистидинол дегидрогеназы с собственной регуляторной областью (штамма Y-727 / GS115).

В результате трансформации штаммов-реципиентов *K.kurtzmanii* Y-727his4Δ и *K.pfaffii* GS115 линейризованными фрагментами плазмид pINT-fldΔ-AOX1<sub>Y727</sub> / GS115-lacZ (рис. 34) получили модифицированные штаммы *K. kurtzmanii* Y-727/fldΔ-AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ и *K.pfaffii* GS115/fldΔ-AOX1<sub>GS115</sub>-LacZ, в которых ген FLD делегирован и замещен линейризованным фрагментом плазмиды pINT-fldΔ-AOX1<sub>Y727</sub> / GS115-lacZ (рис. 34). Делеция гена у отобранных трансформантов была подтверждена при помощи ПЦР.

В полученных модифицированных штаммах экспрессия гена *lacZ* регулируется промотором AOX1. Для качественной проверки индукции промотора AOX1 клетки анализируемых штаммов штрихами высевали на полиэфирную мембрану, которая была помещена на агаризованную минимальную среду YN, содержащую метанол (YNM) либо формиат (YNF). После подраста штрихов в течение суток клетки на мембране пермеабелизовали трехкратным замораживанием-оттаиванием. Далее мембрану инкубировали в буфере, содержащем X-gal, в качестве субстрата для β-галактозидазы. Таким образом, в случае индукции промотора AOX1 и экспрессии гена *lacZ*, клетки должны были окрашиваться в синий цвет (рис. 35).

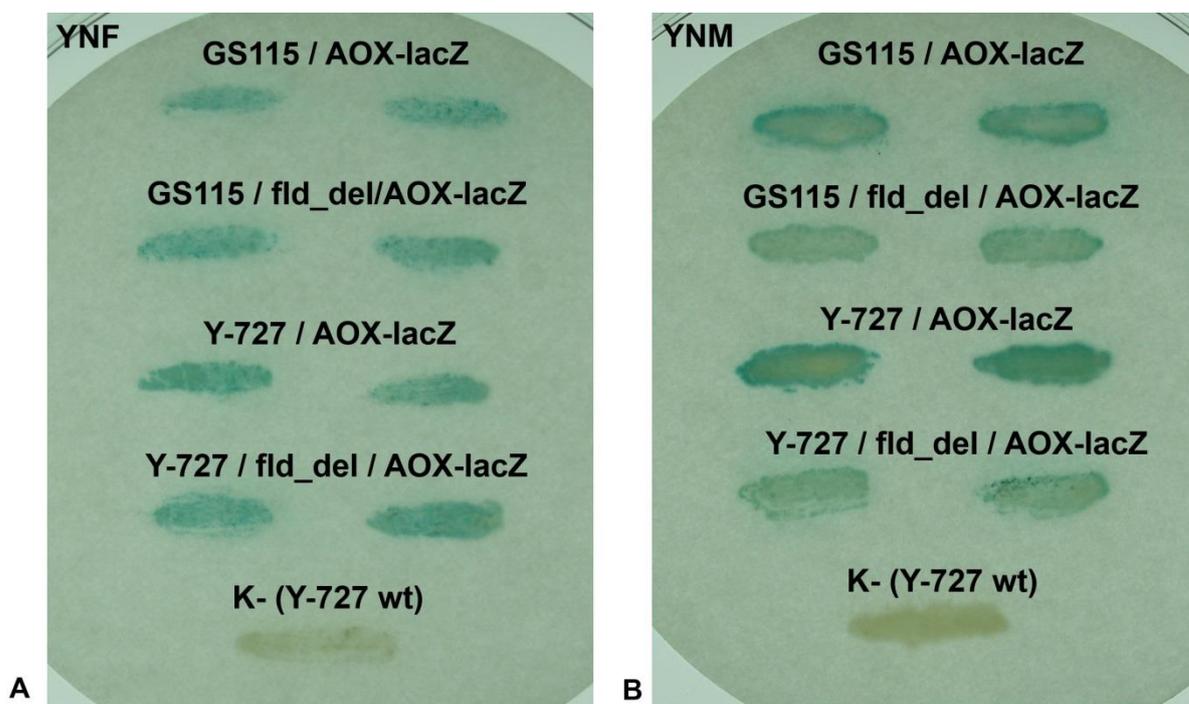


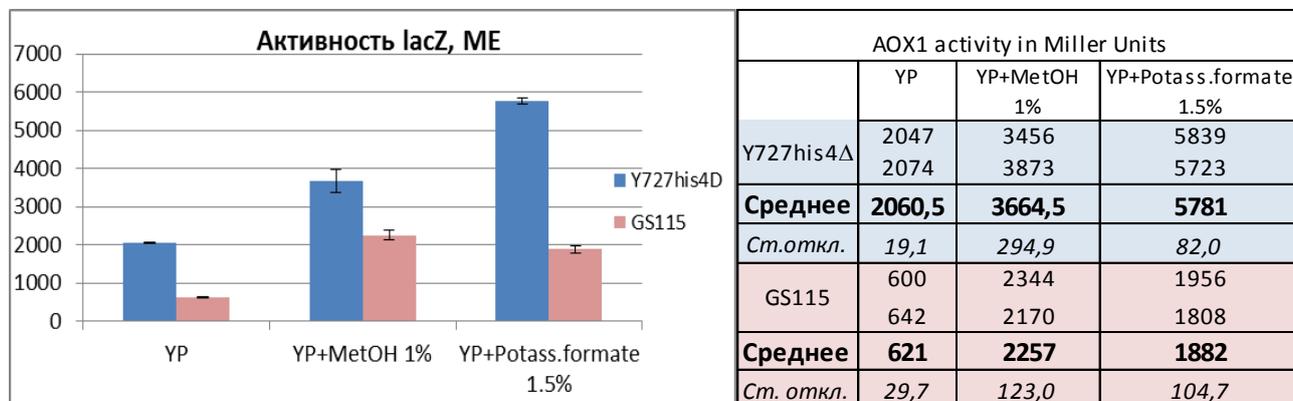
Рисунок 35. Мембрана со штрихами мутантов по гену FLD: *K. kurtzmanii* Y-727/*fld* $\Delta$ -AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ и *K. pfaffii* GS115/*fld* $\Delta$ -AOX1<sub>GS115</sub>-LacZ и трансформантов с нативным геном FLD *K. kurtzmanii* Y-727/AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ и *K. pfaffii* GS115/AOX1<sub>GS115</sub>-LacZ. А – на среде YNF (1,5% (m/v) формиат калия. В – на среде YNM (1% (v/v) метанол.

Ожидалось, что при росте на среде с формиатом калия промотор AOX1 не будет активирован. Но, как видно на фотографии, представленной на рис. 35, штрихи мутантных штаммов по FLD, также как и обычных трансформантов с нативным геном FLD, окрашены в синий цвет. Соответственно, это позволяло сделать вывод об активности промотора AOX1 в мутантах как на среде с метанолом (рис. 35 В), так и на среде с формиатом калия (рис. 35 А).

Данные результаты дают основание полагать, что в клетках метилотрофных дрожжей существует альтернативный, неспецифический путь восстановления формиата до метанола, кроме уже известного. Либо существует промежуточный метаболит, который является непосредственным индуктором промотора AOX1.

С целью количественного определения активности промотора AOX1 в различных условиях культивирования, клетки мутантных штаммов были инокулированы в среду YP - без добавления субстрата; YPM – содержащую 1% (v/v) метанол; YPF – содержащую 1,5% (m/v) формиата калия. Клетки выращивали до

середины экспоненциальной фазы роста. Для оценки уровня индукции промотора AOX1 была измерена активность бета-галактозидазы, находящейся под контролем промотора AOX1, в клеточных лизатах [89]. Результаты измерений представлены на рис.36.



**Рисунок 36. Активность бета-галактозидазы, измеренная лизате клеток *K. kurtzmanii* Y-727fldΔ-AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ и *K.pfaffii* GS115/fldΔ-AOX1<sub>GS115</sub>-LacZ.** По вертикальной оси – шкала активности в Миллеровых единицах [89]. Голубые столбцы соответствуют активности фермента в лизате клеток штамма *K.kurtzmanii* Y-727, розовые столбцы соответствуют активности фермента в лизате клеток штамма *K.pfaffii* GS115. На диаграмме планками отображено стандартное отклонение по результатам измерения активности у двух клонов.

Выяснилось, что делеция гена FLD (формальдегид дегидрогеназы) в дрожжах вида *K.kurtzmanii* Y-727 и *K.pfaffii* (GS115) оказывает влияние на регуляцию ферментов метаболического пути утилизации метанола. Как видно из данных, представленных на рис.36, существенно возрастает уровень индукции промотора AOX, как при метанольной, так и при формиатной индукции. При этом, в случае добавления формиата, уровень индукции AOX промотора возрастает примерно в 2 раза от уровня индукции в диком штамме.

Таким образом, было установлено, что мутация, снижающая скорость метаболизма метанола в клетках дрожжей, вызывает усиление индукции промотора AOX1 на средах с метанолом или формиатом. Данный эффект может быть использован при выборе реципиентного штамма для конструирования штамма-производителя, с целью получения более высокого выхода целевого белка.

## **Выводы:**

1. Классифицирован и описан новый вид метилотрофных дрожжей *K. kurtzmanii* ВКПМ Y-727.
2. Разработана новая система экспрессии на основе нового вида метилотрофных дрожжей *K. kurtzmanii* ВКПМ Y-727, включающая ауксотрофные штаммы производные Y-727, оригинальные экспрессионные вектора с элементной базой из штамма Y-727.
3. Показана эффективность данной системы на модельных штаммах-продуцентах:  $\beta$ -галактозидазы, инулазы; человеческого сывороточного альбумина, поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), человеческого сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF<sub>111b</sub>).
4. Найден альтернативный метанолу безопасный и дешевый индуктор промотора AOX1 – соль муравьиной кислоты. Показано, что в клетках дрожжей *K.kurtzmanii* Y-727 и *K.pfaffii* GS115 формиат калия обеспечивает практически такой же уровень активации промотора AOX1, как и метанол.
5. Показано влияние делеции гена FLD на регуляцию ферментов метаболического пути метанола.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 6. МАТЕРИАЛЫ

#### *Штаммы дрожжей:*

*K. kurtzmanii* ВКПМ У-727

*K. phaffii* GS115 (Invitrogen, США)

#### *Бактериальные штаммы:*

Для генной инженерии и амплификации плазмид использовали штамм *E.coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac*), (Stratagene)

#### *Ферменты:*

T4-ДНК-лигаза (Fermentas, #EL0014), T4-полинуклеотидкиназа (Fermentas, #EK0031), Taq ДНК-полимераза (Fermentas), буферы для эндонуклеаз рестрикции (Fermentas), буфер для T4-ДНК-лигазы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), эндонуклеазы рестрикции NcoI, XhoI, BamHI, MluI (Fermentas).

#### *Буферы и растворы:*

##### Буферы и растворы для электрофореза ДНК:

50xTAE (50-кратный буфер для электрофореза ДНК в агарозе):

2 М трис-ацетат, pH 8,0, 1 М Na-ацетат, 0,9 М NaCl, 50 мМ ЭДТА

##### Буферы и растворы для белкового электрофореза в денатурирующих условиях:

40% акриламид/1,3% N,N'-метилен-бисакриламид в воде

Буфер для приготовления образцов - 125 мМ трис-HCl, pH 6,8, 3% SDS,

20% глицерин, 3% 2-меркаптоэтанол, 0,05% бромфеноловый синий

Буфер для разделяющего геля - 375 мМ трис-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS

Буфер для концентрирующего геля - 125 мМ трис-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS

### 7. МЕТОДЫ

#### **7.1 Условия культивирования штаммов:**

### Культивирование *E. coli*

Для отбора трансформантов *E.coli* XL1-Blue по признаку устойчивости к ампициллину в среду LB добавляли ампициллин в концентрации 100 мкг/мл.

Отбор трансформантов *E.coli* XL1-Blue проводили на чашках Петри с агаризованной средой LB, которая содержит на 1 л дистиллированной воды:

бакто-триптон – 10 г

- Юг

дрожжевой экстракт - 5 г

NaCl – 10 г

агар – 20 г

Для выращивания штамма *E.coli* XL1-Blue использовали жидкую среду LB, которая содержит на 1 литр дистиллированной воды:

бакто-триптон – 10 г

- Юг

дрожжевой экстракт - 5 г

NaCl – 10 г

Клетки бактерий выращивали в пробирках с жидкой средой LB при постоянной аэрации на термостатируемой качалке (250 об/мин) в течение 15 часов. Клетки отделяли центрифугированием на настольной центрифуге (5000 g, 3 мин).

## **7.2 Методы генной инженерии**

### Получение компетентных клеток XL1-Blue:

Среду LB (50 мл) засеивали 0,25 мл ночной культуры штамма XL1-Blue и выращивали при 30°C с аэрацией до оптической плотности  $OD_{600}=0,5 - 0,7$ . Полученную суспензию охлаждали во льду 10 мин (все последующие операции проводили при температуре около 0°C) и центрифугировали в стерильных стаканах 15 мин при 4000g при 4°C. Осадок суспендировали в 25 мл 0,1 М хлорида кальция, инкубировали 0,5 ч, центрифугировали и затем суспендировали в 5 мл 0,1 М хлорида кальция, содержащего 20% глицерина. Суспензию компетентных клеток расфасовывали по 0,2 мл и хранили при -70°C.

### Трансформация клеток XL1-Blue:

Суспензию компетентных клеток *E.coli* штамма XL1-Blue (200 мкл) размораживали во льду и добавляли 0,05 мкг плазмиды. Инкубировали во льду 1 ч,

затем выдерживали 2 мин при 42°C (тепловой шок), далее помещали в лед на 10 мин, добавляли 1 мл среды LB и инкубировали 1 ч при 37°C на термостатируемом шейкере. Суспензию рассеивали на селективные чашки (Amp 100 мкг/мл) с LB-агаром, и помещали на инкубацию при 37°C на 15 часов.

#### Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli*

Выделение плазмидной ДНК из *E. coli* проводили методом щелочного лизиса (Birnboim a. Doli, 1979). Для получения препаративных количеств плазмидной ДНК после щелочного лизиса и нейтрализации проводили переосаждение с помощью изопропанола (Маниатис и др., 1984).

#### Методы молекулярного клонирования

Для создания рекомбинантных плазмидных ДНК использовали стандартные методы молекулярного клонирования (Маниатис и др., 1984). Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции, обработку фрагментом Кленова и лигирование проводили в буферах и условиях, рекомендованных фирмой-изготовителем ферментов («Fermentas», Литва )

#### Электрофорез ДНК

Электрофорез ДНК проводили в 1% агарозном геле в TAE буфере pH 7.5-7.8. ДНК окрашивали бромистым этидием.

#### Выделение фрагментов ДНК из агарозных гелей.

Выделение фрагментов ДНК из агарозных гелей проводили с помощью набора для экстрагирования ДНК фирмы «QIAGEN», следуя рекомендациям фирмы-производителя.

#### Полимеразная цепная реакция

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) применяли для амплификации генов, необходимых для создания конструкций, а также для подтверждения наличия чужеродных генов в геноме клеток хозяев. Реакцию проводили с использованием Taq-полимеразы производства Fermentas (г. Вильнюс) в амплификаторе Mastercycler (Eppendorf).

Перед проведением ПЦР матрицу (плазмидную или хромосомную ДНК) предварительно денатурировали нагреванием при 94 °C в течение 3 мин. Реакцию проводили в течение 25-30 циклов по следующей программе: плавление цепей ДНК

при 94 °С в течение 30 сек, отжиг праймеров (температура зависела от нуклеотидного состава праймеров) в течение 30 сек, элонгация при 70 °С в течение 1-2 мин (в зависимости от длины амплифицируемого фрагмента). После окончания ПЦР пробу инкубировали при 70 °С в течение 5 мин.

### **7.3 Культивирование дрожжей**

Отбор трансформантов на чашках Петри:

Для отбора трансформантов использовали минимальную агаризованную среду, которая содержит на 1 л дистиллированной воды:

Yeast nitrogen base (Amresco) – 1,7 г

сульфат аммония - 5 г

глюкоза – 4 г

агар – 20 г

В соответствии с ауксотрофностью используемых штаммов – добавляли либо урацил – 50 мг, либо гистидин – 50 мг

#### Культивирование на богатой среде:

Клетки дрожжей выращивали на богатых средах YPD, YPG, YPM, YPF. Состав сред:

YPD содержит на 1 литр дистиллированной воды: соевый пептон (Pepton 140, Amresco) – 20 г; дрожжевой экстракт (0207, Springer) - 10 г; глюкоза – 20 г

YPG содержит на 1 литр дистиллированной воды: соевый пептон (Pepton 140, Amresco) – 20 г; дрожжевой экстракт (0207, Springer) - 10 г; глицерин – 20 г

YPM содержит на 1 литр дистиллированной воды: соевый пептон (Pepton 140, Amresco) – 20 г; дрожжевой экстракт (0207, Springer) - 10 г; метанол – 10 г

YpgM содержит на 1 литр дистиллированной воды: соевый пептон (Pepton 140, Amresco) – 20 г; дрожжевой экстракт (0207, Springer) - 10 г; глицерин – 5 г; метанол – 10 г

YPF содержит на 1 литр дистиллированной воды: соевый пептон (Pepton 140, Amresco) – 20 г; дрожжевой экстракт (0207, Springer) - 10 г; формиат калия – 15 г

Клетки дрожжей засеивали с чашки Петри (YPD) в соответствующую богатую жидкую среду при постоянной аэрации на термостатируемой качалке (250 об/мин) в

течение 15-24 часов. Клетки отделяли центрифугированием на настольной, либо напольной центрифуге (5000 g, 3 мин).

#### Трансформация дрожжей плазмидной ДНК:

Дрожжи выращивали в 50 мл жидкой среды YPD до середины логарифмической фазы роста  $OD_{600}=0,3-0,6$ . Клетки отделяли центрифугированием на настольной, либо напольной центрифуге (5000 g, 3 мин). Осадок промывали буфером 1 М сорбитолом и суспендировали в 5 мл смеси : 10 mM Трис-НСl; 0,6 М сорбитол; 0,2 М ацетат лития; 10 mM дитиотреитол, рН 7.5). Инкубировали с течение 40 мин, далее собирали клетки центрифугированием (5000 g, 3 мин). Далее все процедуры проводили в ледяной бане. Осадок ресуспендировали в 1 М сорбитоле для получения суспензии с концентрацией  $10^9$  клеток на 1 мл. 40 мкл суспензии помещали с кювету для электропорации (0.2 см, Biorad). Электропорацию проводили на приборе MicroPulser (Biorad) при следующих параметрах: напряжение импульса 1,5 кВ, время импульса 4 мс.

Осадок ресуспендировали в 50 мкл 1 М сорбитола и высевали на селективную среду для отбора трансформантов. Клетки инкубировали при  $29^{\circ}\text{C}$  в течение 3-5 суток.

### **7.4 Методы работы с белками**

#### Определение концентрации белка (Bradford, 1976)

Концентрацию белка измеряли по методу Брэдфорда

#### Электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (Laemmli, 1970)

Электрофоретическое разделение белков проводили в 4% концентрирующем и 12-18% разделяющем ПААГ в присутствии ДСН в трис-глициновом буфере. Для приготовления проб, к белковому раствору добавляли 2-МЭ до 5%, ДСН до 2%, глицерин до 20%, бромфеноловый синий до 0,01%; пробы нагревали до  $96^{\circ}\text{C}$  в течении 5 минут, после чего вносили в лунки для разделения. После завершения электрофореза гель окрашивали либо при помощи набора Silver Staining Kit (Promega), либо красителем Coomassie G-250. Окрашивание при помощи набора Silver Staining Kit проводилось по протоколу производителя. Окрашивание красителем Coomassie

проводилось по следующему протоколу: гель помещали в водный раствор 30%(v/v) этанола и 10%(v/v) уксусной кислоты на 20 минут и затем проявляли в водном растворе 0,15 %(m/v) Coomassie G-250 в 25%(v/v) изо-пропаноле и 10%(v/v) уксусной кислоте. Гель отмывали в 10 %(v/v) уксусной кислоте.

#### Электроперенос белков с полиакриламидного геля на нитроцеллюлозу

Неокрашенный гель после электрофореза помещали на 15 минут в буфер для переноса (25 мМ трис-HCl, 190 мМ глицин, pH 8,3, 20 % метанол). Электроперенос выполняли в течение 1 час при напряжении 100 В. Нитроцеллюлозный фильтр с иммобилизованными белками использовали в реакции со специфическими антителами для выявления VEGF.

#### Иммуноблот со специфическими антителами

Буфер TBS: 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 150 мМ NaCl

Буфер TBST: 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 150 мМ NaCl, 0,1% твин-20

Нитроцеллюлозную мембрану с иммобилизованными на нем белками промывали дважды в буфере TBST; затем инкубировали в буфере TBST+1%BSA в течение 2 ч при температуре 4<sup>0</sup>C; промывали дважды TBS; затем инкубировали с гуманизированными моноклональными антителами к человеческому VEGF (Бевацизумаб, в разведении 1:1000, т.е. 25 мкг/мл) в буфере TBST; после чего трижды промывали буфером TBST и инкубировали со вторичными мышиными антителами, мечеными пероксидазой хрена (HRP), 1 ч при комнатной температуре. Промывали трижды буфером PBST. Проявляли мембрану с помощью набора для ECL Western Blotting Substrate (Pierce) по протоколу производителя.

#### Иммуноферментный анализ HSA

Буфер PBS: 58 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 68мМ NaCl, pH 7.8

Буфер PBST: 58 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 68мМ NaCl, 0,1% Tween20, pH7.8

Иммуноферментный анализ проводили в 96-луночной плашке для ИФА (Grenier). В лунки наносили по 100 мкл раствора мышинных антител к HSA (подложечных антител) в PBS (в разведении 1500). Плашку инкубировали на шейкере Biosan при 60 об./мин в течение 60 мин при комнатной температуре. После инкубации ячейки промывали 3 раза 150 мкл буфера PBST. Далее в лунки наносили по 150 мкл блокирующего раствора – PBS + 1%BSA. Плашку инкубировали на шейкере Biosan при 60 об./мин в течение 60 мин при комнатной температуре. После инкубации ячейки промывали 5 раз 150 мкл буфера PBST. Далее в лунки наносили по 100 мкл образцов культуральной жидкости, в нескольких разведениях. Для каждого разведения использовали по 2 лунки. Также, для калибровки наносили стандарт: раствор HSA в PBS, в концентрациях 50, 25, 20, 15, 10, 5 и 2 нг/мл – также в 2 лунки каждой концентрации. Плашку инкубировали на шейкере Biosan при 60 об./мин, в течение 60 мин, при комнатной температуре. После инкубации каждую лунку промывали 5 раз 150 мкл буфера PBST. Далее наносили раствор конъюгата кроличьих антител с пероксидазой хрена в буфере PBST + 1%BSA по 100 мкл в лунку. Плашку инкубировали на шейкере Biosan при 60 об./мин в течение 60 мин при комнатной температуре. После инкубации плашку промывали 5 раз 150 мкл буфера PBST. Для начала реакции в лунку наносили 150 мкл раствора 2 мг субстрата OPD (ортофенилендиамина) в буфере : на 15 мл воды 150 мкл 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 150 мкл 3М ацетата натрия pH 5.2). Плашку инкубировали до появления окраски в лунках. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 10%(v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Значения оптической плотности снимали на «Анализаторе иммуноферментных реакций УНИПЛАН», фильтр 492нм.

## **7.5 Выделение и очистка VEGF**

### Выделение VEGF на Ni-NTA агарозе

Буфер А: 50мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300мМ NaCl, pH7.8

Буфер В: 50мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300мМ NaCl, 10 mM Imidazole, pH7.8

Буфер С: 50мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300мМ NaCl, 50 mM Imidazol, pH7.8

Культуральную жидкость осветляли центрифугированием (5 мин, 3000g). Супернатант разбавляли в 3 раза в буфере А для нанесения на колонку с Ni-NTA агарозой (Qiagen). Разбавленную КЖ наносили на колонку со скоростью 0.3 мл/мин;

далее промывали 10 мл буфера В. Элюировали 3 мл буфера С со скоростью 0.5 мл/мин. Собирали фракции по 0.5 мл.

#### Обессоливание VEGF на колонке с сорбентом Sephadex 25

Буфер PBS: 58 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 68мМ NaCl, pH 7.8

Элюат, полученный после выделения на Ni-NTA агарозе наносили на колонку с сорбентом Sephadex 25 при атмосферном давлении. Далее элюировали тем же объемом буфера PBS.

#### Опыт по биологической активности VEGF. Тест на формирование сосудов

Линия клеток, используемая для теста:

В качестве тест системы использовали HUVEC человека на 4 пассаже. Клетки были разморожены, культивировались в среде для HUVEC (DMEM/F12, 15%FBS, заменимые аминокислоты, меркаптоэтанол, пеницилин-стрептомицин), с добавлением VEGF, EGF, IGF, FGF (Invitrogen) по 20 нг/мл каждого до достижения 70% монослоя. Производилась смена среды на среду для HUVEC без факторов роста, клетки инкубировались ночь.

Описание используемого метода: Tube Formation Assay основан на способности эндотелиальных клеток формировать трёхмерные капилляроподобные трубчатые структуры при культивировании на Matrigel BD. Tube Formation Assay представляет собой модельную систему для изучения ингибиторов и активаторов ангиогенеза.

Был проведён Tube Formation Assay для концентрации VEGF 20 нг/мл, в качестве положительного контроля использован VEGF производства Invitrogen в концентрации 20 нг/мл. В качестве отрицательного – точки без добавления VEGF.

Использовали следующие концентрации клеток HUVEC 15x10<sup>3</sup> и 22x10<sup>3</sup> клеток на лунку. Каждую экспериментальную точку делали в 2-х повторах.

Постановка эксперимента:

1. Добавляли 50 мкл Matrigel на каждую лунку 96-луночной плашки.
2. Инкубировали 30 мин при 37<sup>0</sup>С
3. Добавляли 15x10<sup>3</sup> клеток HUVEC и 22x10<sup>3</sup> клеток HUVEC в объёме 50 мкл

4. Добавляли 50 мкл. среды для HUVEC, содержащей 20 нг/мл каждого из опытных и контрольный образцов VEGF (из расчёта на конечный объём 100 мкл)
5. Инкубировали 8 часов в CO<sub>2</sub> -инкубаторе с содержанием 5% CO<sub>2</sub> при 37° С.
6. Визуально оценивали формирование капилляроподобных структур.

## 7.6 Конструирование плазмид

### 7.6.1 Конструирование плазмид pINT-G418-AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ; pINT-G418-AOX1<sub>GS115</sub>-LacZ

Сконструированы две плазмиды: плазида pINT-G418-AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ, предназначенная для интеграции в геном штамма *K.kurtzmanii* ВКПМ Y727 и плазида pINT-G418-AOX1<sub>GS115</sub>-lacZ, предназначенная для интеграции в геном штамма *K.pfaffii* GS115. Обе плазмиды содержат элементы, необходимые для их амплификации в клетках *E.coli*: ген β-лактамазы (в качестве селективного маркера), бактериальный репликон из плазмиды pUC19 для обеспечения поддержания определенного уровня копийности плазмиды. Для проведения последующей процедуры трансформации дрожжевых клеток и экспрессии целевого гена lacZ (бета-галактозидазы), оба вектора содержат следующие элементы: ген kanMX, обеспечивающий устойчивость к антибиотику G418, находящийся под контролем промотора ADH1 - в качестве селективного маркера; ген lacZ [17], находящийся под контролем промотора AOX1<sub>727</sub> (для штамма Y727) либо AOX<sub>GS115</sub> (штамма GS115), клонированного из штамма *K.kurtzmanii* ВКПМ Y727, либо из штамма *K.pfaffii* GS115, соответственно), терминатор AOX1 (рис.4 А). Промотор AOX1<sub>727</sub> и AOX<sub>GS115</sub> получали при помощи ПЦР, в качестве матрицы использовали геномную ДНК штамма *K.kurtzmanii* ВКПМ Y727 либо *K.pfaffii* GS115, соответственно. Праймеры:

pr1\_AOX1 5'-ttcgtcgactaacatccaagacgaaaggtt

pr2\_AOX1 5'-aaggtaccagatctagccatgggttgatccttcgaataattagttgtttttgatcttctca

Терминатор AOX1 получали при помощи ПЦР, в качестве матрицы использовали геномную ДНК штамма *K.kurtzmanii* Y-727 либо *K.pfaffii* GS115, соответственно, праймеры

pr\_AOXter-5' aatctcgaggattccagaatgccatttcct

pr\_AOXter-3' gttgacgcgtgcacaaacgaacgtctcactt

Интегрируемая часть плазмиды после линейаризации фланкирована областями для встраивания в определенный локус генома – эндогенный промотор AOX1 (рис.4 В). Для линейаризации плазмиды, исходные плазмиды pINT-G418-AOX1<sub>Y727</sub>-lacZ и pINT-G418-AOX1<sub>GS115</sub>-lacZ обработаны эндонуклеазами рестрикции PstI, XhoI (Thermo Fisher Scientific Inc.).

### 7.6.2 Конструирование плазмиды pURA3del

Вектор содержит элементы, необходимые для его амплификации в клетках *E.coli*: ген β-лактамазы (в качестве селективного маркера), бактериальный репликон из плазмиды pUC19 для обеспечения поддержания определенного уровня копийности плазмиды. Ген URA3 получили при помощи ПЦР, используя в качестве матрицы геномную ДНК данного штамма, и праймеры

pr1\_URA3 : 5'-gataacgcggttgacgaattgactaaagttct

pr2\_URA3 : 5'-gataacgcggttgacgaattgactaaagttct

Полученный с помощью ПЦР ген клонировали в плазмиду. Далее в полученной плазмиде была искусственно нарушена рамка считывания гена URA3. После обработки плазмиды рестриктазой MluI получали фрагмент, содержащий фланги гена URA3, так, что при интеграции данного фрагмента в геном трансформируемого штамма – инактивировался нативный ген URA3, что приводило к мутации штамма по синтезу урацила.

### 7.6.3 Конструирование плазмиды pHIS4del

Вектор pHIS4del содержит элементы, необходимые для его амплификации в клетках *E.coli*: ген β-лактамазы (в качестве селективного маркера), бактериальный репликон из плазмиды pUC19 для обеспечения поддержания определенного уровня копийности плазмиды. Ген HIS4 амплифицировали при помощи ПЦР. В качестве матрицы использовали геномную ДНК из штамма *K. pastoris* ВКПМ Y-727, праймеры:

pr1\_HIS4 5'-ttcactcgtggatctataattgaacatgacatttccttgctacct;

pr2\_HIS4 5'-agatgccggttagatctatcgaat

Полученный с помощью ПЦР ген клонировали в исходную плазмиду. Ген URA3 получили при помощи ПЦР, используя в качестве матрицы геномную ДНК данного штамма, и праймеры:

pr1\_URA3 5'-gataacgcgcttgacgaattgactaaagttct

pr2\_URA3 5'-gataacgcgcttgacgaattgactaaagttct

Экспрессия клонированного в плазмиду гена URA3 находится под контролем эндогенного промотора URA3. Ген URA3 с промотором фланкирован последовательностями из области, кодирующей белок ТуА ретротранспозона Ту1, клонированными из дрожжей *S.cerevisiae* [19]. Полученную конструкцию клонировали в середину гена HIS4 (уже клонированного в плазмиду), так, что она оказалась в окружении 5' и 3' областей гена HIS4.

#### 7.6.4 Конструирование плазмиды pARG4del

Вектор pARG4del содержит элементы, необходимые для его амплификации в клетках *E.coli*: ген β-лактамазы (в качестве селективного маркера), бактериальный репликон из плазмиды pUC19 для обеспечения поддержания определенного уровня копийности плазмиды. Данный вектор содержит ген URA3, находящийся под контролем нативного промотора, и фланкированный 5' и 3' областями гена ARG4, использованными для направления интеграции данного фрагмента непосредственно в локус ARG4. 5' и 3' области гена ARG4 получали при помощи ПЦР (Рис 5 А). В качестве матрицы использовали геномную ДНК штамма *K.kurtzmanii* ВКПМ Y727, праймеры:

pr1\_ARG4 5'-tctaacgcgctgtagctaggtgtttaccctgattaga

pr2\_ARG4 5'-ggatcctatctcgagtcgagatgctagcactaagatagctggaataagtttaga

pr3\_ARG4 5'-tagtgctagcatctccggactcgagataggatccatccattgactcccgtttga

pr4\_ARG4 5'-gataacgcgctagatctcaattgtatgtactataacagttt

#### 7.6.5 Получение ПЦР продуктов для комплементации мутации в гене URA3

Для ПЦР использовали праймеры:

Pr1\_URA3 5'-gataacgcggttgacgaattgactaaagtctt

Pr2\_URA3 5'-atttacgcgtactccttgagtctggctcaaa

В качестве матрицы для ПЦР использовали геномную ДНК из штамма *K.kurtzmanii* ВКПМ Y-727.

### 7.6.6 Конструирование плазмиды pADE2del

Вектор pADE2del содержит элементы, необходимые для его амплификации в клетках *E.coli*: ген β-лактамазы (в качестве селективного маркера), бактериальный репликон из плазмиды pUC19 для обеспечения поддержания определенного уровня копийности плазмиды. Данный вектор содержит ген URA3, находящийся под контролем нативного промотора - фланкирован 5' и 3' областями гена ADE2 (фермента фосфорибозиламиноимидазол карбоксилазы), использованными для направления интеграции данного фрагмента непосредственно в локус ADE2 (Рис. 6 А). 5' и 3' области гена ADE2 получали при помощи ПЦР. В качестве матрицы использовали геномную ДНК штамма *Komagataella kurtzmanii* Y-727, праймеры:

pr1\_ADE2 5'-tactaacgcgtgacgaaagtaggcaattagttgt

pr2\_ADE2 5'-ctcgagtatggatcctccggagatcccgggacatgtgagctttgaaaatatctaactgt

pr3\_ADE2 5'-acatgtcccgggatctccggaggatccatactcgagtcacggtgttctgtcaag

pr4\_ADE2 5'-agtaacgcgtagatcttgaatagaatagattagaaaaaa

### 7.6.7 Конструирование базового вектора Ty-URA3-AOX1

Экспрессионный вектор Ty-URA3-AOX1 содержит элементы, необходимые для его амплификации в клетках *E.coli*: ген β-лактамазы (в качестве селективного маркера), бактериальный репликон из плазмиды pUC19 для обеспечения поддержания определенного уровня копийности плазмиды.

Для трансформации дрожжевых клеток и экспрессии целевого гена, вектор содержит следующие элементы: ген URA3 – оротидин декарбоксилазы, клонированный из генома дрожжей *S.cerevisiae*, в качестве селективного маркера. Для регуляции экспрессия гена URA3, был клонирован промотор ADH1 из генома дрожжей *S.cerevisiae*. Было подтверждено, что уровень экспрессии гена обеспечивает синтез

необходимого количества оротидин декарбоксилазы, причем эндогенный фермент обеспечивает комплементацию урациловой ауксотрофности штамма Y-727ura3<sup>mut</sup> и Y-727ura3<sup>mut</sup>his4Δ (данные не приведены).

Для регуляции экспрессии целевого гена был клонирован промотор AOX1 из генома штамма Y-727 по сайтам BamHI / HindIII (праймеры pr\_AOXter-5' aatctcgaggattccagaatgccatttgcct; pr\_AOXter-3' gttgacgcgtgcacaacgaacgtctcactt). Для обеспечения терминации транскрипции целевого гена была клонирована терминаторная область гена AOX1 из штамма Y-727 (праймеры: pr1\_AOX1 5'-ttcgtcgactaacatccaagaacgaaagggt; pr2\_AOX1 5'-aaggtaccagatctagccatggtttgatccttccaataattagttgtttttgatcttctcaa).

Для клонирования целевого гена в базовый вектор было предусмотрено использование сайтов рестрикции NcoI / XhoI либо HindIII / XhoI. В результате линейаризации данного вектора путем обработки эндонуклеазой рестрикции MluI, получался фрагмент, фланкированный последовательностью Tu (ранее использованной при делеции гена URA3). Таким образом, интеграция была направлена в локус URA3.

### 7.6.8 Конструирование базового вектора pPH93-HIS4-AOX1

Экспрессионный вектор **pPH93-HIS4-AOX** содержит элементы, необходимые для его амплификации в клетках *E.coli*: ген β-лактамазы (в качестве селективного маркера), бактериальный репликон из плазмиды pUC19 для обеспечения поддержания определенного уровня копийности плазмиды. Для трансформации дрожжевых клеток и экспрессии целевого гена, вектор содержит следующие элементы: ген HIS4 - гистидинол дегидрогеназы, клонированного из генома штамма *K. kurtzmanii* ВКПМ Y-727, в качестве селективного маркера.

Промотор AOX1 клонирован из генома штамма *K. kurtzmanii* ВКПМ Y-727. Терминаторную область гена AOX1 клонировали также из генома штамма *K. kurtzmanii* ВКПМ Y-727.

Для клонирования целевого гена в базовый вектор было предусмотрено использование сайтов рестрикции NcoI / XhoI либо HindIII / XhoI.

Интегрируемая часть плазмиды фланкирована областями для встраивания в определенный локус генома – эндогенным промотором AOX1 и 5' областью промотора. Для получения линейаризованного фрагмента для трансформации вектор обрабатывали эндонуклеазой рестрикции MluI.

#### **7.6.9 Конструирование плазмиды pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HSA и pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HSA**

Экспрессионный вектор **pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HSA** был получен клонированием гена целевого белка – альбумина (HSA) в одну рамку считывания с искусственным сигнальным пептидом sp5 для обеспечения секреции (аминокислотный состав: MRLLLLLLLLLLPAALG) в базовый вектор pPH93-HIS4-AOX1 по сайтам HindIII / XhoI. Экспрессия целевого гена находилась под контролем промотора AOX1<sub>Y727</sub>, клонированного из генома штамма *K.kurtzmanii* ВКПМ Y-727. Для получения линейаризованной части плазмиды, предназначенной для трансформации дрожжей *K. kurtzmanii* ВКПМ Y727, исходную плазмиду pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HSA обрабатывали эндонуклеазой рестрикции MluI (Рис. 7 А,В).

Экспрессионный интегративный вектор **pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HSA** содержит те же элементы, что и pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HSA, за исключением гена HIS4 - гистидинол дегидрогеназы, клонированного из *K. pfaffii* GS115 (в качестве матрицы для ПЦР использовали геномную ДНК штамма *K. pfaffii* GS115, праймеры pr1\_HIS4, pr2\_HIS4), и промотора AOX1<sub>GS115</sub>, клонированного также из *K. pfaffii* GS115. Для получения линейаризованной части плазмиды, предназначенной для трансформации дрожжей *K. pfaffii* GS115, исходную плазмиду pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HSA обрабатывают эндонуклеазой рестрикции MluI (Рис. 10 А,В).

#### **7.6.10 Конструирование плазмиды pINT-G418-GAP<sub>Y727</sub>-INU, pINT-G418-AOX1<sub>Y727</sub>-INU и pINT-G418-GAP<sub>GS115</sub>-INU, pINT-G418-AOX1<sub>GS115</sub>-INU**

Было сконструировано 4 экспрессионных интеграционных вектора, отличающихся способом регуляции экспрессии гена целевого белка – инулазы. Экспрессионный вектор **pINT-G418-GAP<sub>Y727</sub>-INU** содержит элементы, необходимые для его амплификации в клетках *E.coli*: ген β-лактамазы (в качестве селективного

маркера), бактериальный репликон из плазмиды pUC19 для обеспечения поддержания определенного уровня копийности плазмиды. Для трансформации дрожжевых клеток и экспрессии целевого гена, вектор содержит следующие элементы: ген kanMX - в качестве селективного маркера, находящийся под контролем промотора ADH1, клонированного из генома дрожжей *S.cerevisiae* (праймеры: pr\_ADH1-5-aaagatctccatccttttgtgttcc; pr\_ADH1-3-tatctcatatacaatcaagaacgaagataaatcatgt); ген целевого белка – инулазы, клонированный из *Kluveromyces marxianus* [14], находящийся под контролем промотора GAP<sub>Y727</sub>, клонированного из *K. kurtzmanii* ВКПМ Y-727, терминатор AOX1. Для обеспечения секреции инулазы, лидерную пре-про-область  $\alpha$ -MF клонировали в одну рамку считывания с геном инулазы. Промотор GAP получили с помощью ПЦР, в качестве матрицы использовали геномную ДНК штамма *K.kurtzmanii* Y-727, праймеры

pr1\_GAP 5'-aggaagctttttgtagaaatgtcttgg

pr2\_GAP 5'-ataggtacctgcagccatgtagatctttgatagttgttcaattgattgaaata

Для получения линейаризованной части плазмиды, предназначенной для трансформации, исходную плазмиду pINT-G418-GAP<sub>Y727</sub>-INU обрабатывают эндонуклеазой рестрикции MluI. Интегрируемая часть плазмиды фланкирована областями для встраивания в определенный локус генома – эндогенный промотор AOX1. Экспрессионный вектор pINT-G418-GAP<sub>GS115</sub>INU содержит те же элементы, что и предыдущий вектор, за исключением промотора GAP<sub>GS115</sub>, клонированного из *K. paffii* GS115 (рис.10). Промотор GAP получили с помощью ПЦР, в качестве матрицы использовали геномную ДНК штамма *K. paffii* GS115, праймеры:

pr1\_GAP : 5'-aggaagctttttgtagaaatgtcttgg

pr2\_GAP : 5'-ataggtacctgcagccatgtagatctttgatagttgttcaattgattgaaata

При обработке эндонуклеазой рестрикции MluI, линейаризованный фрагмент также встраивается в локус генома AOX1.

Экспрессионный вектор pINT-G418-AOX1<sub>Y727</sub>-INU содержит элементы, необходимые для его амплификации в клетках *E.coli*: ген  $\beta$ -лактамазы (в качестве селективного маркера), бактериальный репликон из плазмиды pUC19 для обеспечения поддержания определенного уровня копийности плазмиды. Для трансформации дрожжевых клеток и экспрессии целевого гена, вектор содержит следующие элементы:

ген *kanMX* - в качестве селективного маркера находящийся под контролем промотора *ADH1*, клонированного из генома дрожжей *S.cerevisiae*; ген целевого белка – инулазы, клонированный из *Kluyveromyces marxianus* [14], также слитый с лидерным пептидом  $\alpha$ -MF в одну рамку считывания, находящийся под контролем промотора *AOX1*<sub>Y727</sub>, клонированного из *K. Kurtzmanii* ВКПМ Y727; терминатор *AOX1*. Для получения линейаризованной части плазмиды, предназначенной для трансформации, исходную плазмиду *pINT-G418-AOX1*<sub>Y727</sub>-*INU* обрабатывают эндонуклеазой рестрикции *MluI*. Интегрируемая часть плазмиды фланкирована областями для встраивания в определенный локус генома – эндогенный промотор *AOX1*. Экспрессионный вектор *pINT-G418-AOX1*<sub>GS115</sub>-*INU* содержит те же элементы, что и предыдущий вектор, за исключением промотора *GAP*<sub>GS115</sub>, также клонированного из *K. pfaffii* GS115. При обработке эндонуклеазой рестрикции *MluI*, линейаризованный фрагмент также встраивается в локус *AOX1* (рис.10).

Таким образом было получено 4 плазмиды, две из которых:

***pINT-G418-GAP***<sub>Y727</sub>-***INU*** и ***pINT-G418-AOX1***<sub>Y727</sub>-***INU*** - предназначены для трансформации штамма *K. kurtzmanii* Y727his4 $\Delta$  и отличаются между собой только промоторами (*AOX1* и *GAP*), управляющими экспрессией целевого гена инулазы у штамма *K. kurtzmanii* Y-727his4 $\Delta$  (рис.10 А,В).

***pINT-G418-GAP***<sub>GS115</sub>-***INU***; ***pINT-G418-AOX1***<sub>GS115</sub>-***INU*** - предназначены для трансформации штамма *K. pfaffii* GS115 и отличаются между собой также только промоторами (*AOX1* и *GAP*), регулирующими экспрессию целевого гена инулазы у штамма *K. pfaffii* GS115 (рис.10 А,В).

#### 7.6.11 Конструирование плазмид ***pPH93-AOX1***<sub>GS115</sub>-***HbsAg*** и ***pPH93-AOX1***<sub>Y727</sub>-***HbsAg***

Экспрессионный вектор *pPH93-AOX1*<sub>GS115</sub>-*HbsAg* содержит элементы, необходимые для его амплификации в клетках *E.coli*: ген  $\beta$ -лактамазы (в качестве селективного маркера), бактериальный репликон из плазмиды *pUC19* для обеспечения поддержания определенного уровня копийности плазмиды. Для трансформации дрожжевых клеток и экспрессии целевого гена, вектор содержит следующие элементы: ген *HIS4* - гистидинол дегидрогеназы, клонированного из штамма GS115 с

промоторной частью, в качестве селективного маркера; ген целевого белка – поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) [20] находящийся под контролем промотора AOX1, терминатор GAP, клонированные из штамма GS115. Интегрируемая часть плазмиды фланкирована областями для встраивания в определенный локус генома – эндогенный промотор AOX1. Для получения линейаризованной части плазмиды, предназначенной для трансформации, исходную плазмиду pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HBsAg обрабатывают эндонуклеазой рестрикции MluI.

Экспрессионный вектор pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HBsAg содержит элементы, необходимые для его амплификации в клетках *E.coli*: ген β-лактамазы (в качестве селективного маркера), бактериальный репликон из плазмиды pUC19 для обеспечения поддержания определенного уровня копийности плазмиды. Для трансформации дрожжевых клеток и экспрессии целевого гена, вектор содержит следующие элементы: ген HIS4 - гистидинол дегидрогеназы, клонированного из заявляемого штамма с промоторной частью, в качестве селективного маркера; ген целевого белка – HBsAg, находящийся под контролем промотора AOX1, терминатор GAP, клонированные из штамма *K. kurtzmanii* Y-727 (праймеры pr1\_GAPterm – taactcgagttgtatgtgaaatagctgaaa; pr2\_GAPterm – gttcaattatagatctacgagtgaa). Интегрируемая часть плазмиды фланкирована областями для встраивания в определенный локус генома – эндогенный промотор AOX1. В результате обработки эндонуклеазой рестрикции MluI плазмиды pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HBsAg получают линейаризованную часть плазмиды, предназначенную для трансформации реципиентного штамма.

#### **7.6.12 Конструирование плазмид pINT-fldΔ-AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ; pINT-fldΔ-AOX1<sub>GS115</sub>-LacZ**

Сконструированы две плазмиды: плазида pINT-fldΔ-AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ и плазида pINT-fldΔ-AOX1<sub>GS115</sub>-lacZ предназначенная для интеграции в геном и разрушения гена FLD штаммов *K.kurtzmanii* ВКПМ Y-727 и *K.pfaffii* GS115 соответственно. Обе плазмиды содержат элементы, необходимые для их амплификации в клетках *E.coli*: ген β-лактамазы (в качестве селективного маркера), бактериальный репликон из плазмиды pUC19 для обеспечения поддержания определенного уровня копийности

плазмиды. Для проведения последующей процедуры трансформации дрожжевых клеток и экспрессии целевого гена *lacZ* (бета-галактозидазы), оба вектора содержат следующие элементы: ген *HIS4* (гистидинолдегидрогеназы) клонированный из штаммов Y-727 и GS115 соответственно, находящийся под контролем собственного промотора - в качестве селективного маркера; ген *lacZ* [17], находящийся под контролем промотора *AOX1<sub>727</sub>* (для штамма Y727) либо *AOX<sub>GS115</sub>* (штамма GS115), клонированного из штамма *K.kurtzmanii* ВКПМ Y727 , либо из штамма *K.pfaffii* GS115, соответственно), терминатор *AOX1* (рис.4 А). Промотор *AOX1<sub>727</sub>* и *AOX<sub>GS115</sub>* получали при помощи ПЦР, в качестве матрицы использовали геномную ДНК штамма *K.kurtzmanii* ВКПМ Y-727 либо *K.pfaffii* GS115, соответственно. Праймеры:

pr1\_AOX1 5'-ttcgtcgactaacatccaagacgaaaggtt

pr2\_AOX1 3'-aaggtaccagatctagccatgggttgatcctcgaataattagttgtttttgatcttctca

Терминатор *AOX1* получали при помощи ПЦР, в качестве матрицы использовали геномную ДНК штамма *K.kurtzmanii* ВКПМ Y-727 либо *K.pfaffii* GS115, соответственно. Праймеры

pr\_AOXter-5' aatctcgaggattccagaatgccatttgcct

pr\_AOXter-3' gttgacgcgtgcacaacgaacgtctcactt

Интегрируемая часть плазмиды после линейаризации фланкирована областями для встраивания в определенный локус генома и разрушения гена *FLD* (рис.22 В).

Фланкирующие области получали при помощи ПЦР, в качестве матрицы использовали геномную ДНК штамма *K.kurtzmanii* ВКПМ Y727 либо *K.pfaffii* GS115. Праймеры:

pr\_FLD\_prom-5' tcaagctttgagataacagagttgggtaa

pr\_FLD\_prom-3' tacgcgtcagtcgactagatctgtgaatatcaagaattgtatga

pr\_FLD\_term-5' agatctagtcgactgacgcgtaggatcccgactgtaccggtaattgtt

pr\_FLD\_term-3' tcctcgagacttagtgcatagtaatcaca

Для линейаризации плазмиды, исходные плазмиды *pINT-fldΔ-AOX1<sub>Y727</sub>-lacZ* и *pINT-fldΔ-AOX1<sub>GS115</sub>-lacZ* обработаны эндонуклеазами рестрикции *HindIII*, *XhoI* (Thermo Fisher Scientific Inc.).

### 7.6.13 Конструирование плазмиды *pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-VEGF<sub>111b</sub>*

Плазмида была получена путем клонирования гена VEGF<sub>111</sub>b по сайтам рестрикции NcoI / XhoI в базовый вектор Ту-URA3-AOX1 так, что клонированный в одну рамку считывания с геном VEGF<sub>111</sub>b лидерный пептид  $\alpha$ -MF – обеспечивал секрецию синтезируемого белка в культуральную среду.

Ген VEGF<sub>111</sub>b был синтезирован из олигонуклеотидов в компании Евроген.

## 7.7 Получение модифицированных штаммов и штаммов-продуцентов

### 7.7.1 Получение штаммов продуцентов: *K. kurtzmanii* Y-727/pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ ; *K.pfaffii* GS115/pINT-AOX1<sub>GS115</sub>-LacZ

#### *Трансформация и культивирование*

Для трансформации линейризованными фрагментами векторов pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ и pINT-AOX1<sub>GS115</sub>-LacZ взяли штаммы *K.kurtzmanii* Y-727 и *K.pfaffii* GS115 соответственно.

В результате проведения процесса трансформации по стандартному протоколу [16] и отбора трансформантов на агаризованной среде YPD с добавлением антибиотика G418 (в концентрации 800 мкг/мл – для GS115 и 200 мкг/мл для Y-727), получили 2 штамма продуцента бета-галактозидазы: *K. kurtzmanii* Y-727/pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ и контрольный *K.pfaffii* GS115/pINT-AOX1<sub>GS115</sub>-LacZ, в которых ген Lac-Z (бета-галактозидазы) находится под контролем промоторов AOX1, клонированных из соответствующих сравниваемых штаммов. Затем выбрали по 2 клона каждого штамма. Инокулят анализируемых клонов поместили в пробирки с 5 мл среды трех видов YPD с репрессирующим AOX1 источником углерода - глюкозой, YPM – с индуцирующим AOX1 источником углерода – метанолом, YP - без источника углерода. Культуру выращивали в ротационном шейкере-термостате (250 об/мин), при температуре 28<sup>0</sup>С. По истечении 14 часов клетки отделяли центрифугированием в настольной центрифуге, при 3000g. Собранную биомассу разрушали с помощью стеклянных шариков на дезинтеграторе MP FastPrep для получения клеточного лизата и последующего измерения активности  $\beta$ -галактозидазы по стандартному протоколу [89].

### **7.7.2 Получение штаммов-продуцентов человеческого сывороточного альбумина *K. kurtzmanii* Y727his4Δ/ pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HSA и *K. pfaffii* GS115/ pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HSA**

#### *Трансформация*

Получение продуцентов секретируемого в культуральную среда белка (человеческого сывороточного альбумина, HSA) с использованием штамма *K. kurtzmanii* ВКПМ Y727 и в качестве контрольного штамма *K. pfaffii* GS115. В качестве реципиентных штаммов используют штамм *K. kurtzmanii* Y727his4Δ и штамм *K. pfaffii* GS115. Данные штаммы трансформировали линейаризованными фрагментами плазмид pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HSA и pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HSA. В результате гомологичной рекомбинации фланкирующих областей линейаризованных векторов и эндогенных промоторных областей AOX1, происходила интеграция линараризованных фрагментов в геномы штаммов-реципиентов. Трансформантов отбирали на селективной агаризованной среде YNB без аминокислот. Получили штаммы, продуцирующие рекомбинантный человеческий сывороточный альбумин.

#### *Культивирование и анализ*

Для проведения опыта выбрали по 2 клона каждого штамма. Инокулят анализируемых клонов был помещен в пробирки с 5 мл среды YPgM. Культуру выращивали в течение 62 часов в ротационном шейкере-термостате (250 об/мин), при температуре 28<sup>0</sup>С. Каждые 24 часа проводили индукцию метанолом, путем асептического добавления 50% раствора метанола в пробирки, до конечной концентрации 0,5% (v/v). По истечении 62 часов биомассу отделяли центрифугированием в настольной центрифуге, при 3000g. Супернатант отделяли декантированием, и использовали для электрофореза в денатурирующих условиях и для ИФА.

### **7.7.3 Получение штаммов-продуцентов инулазы**

***Komagataella kurtzmanii* Y727 / pINT-G418-GAP<sub>Y727</sub>-INU**

***Komagataella kurtzmanii* Y727 / pINT-G418-AOX1<sub>Y727</sub>-INU**

***Komagataella pfaffii* GS115 / pINT-G418-GAP<sub>GS115</sub>INU**

***Komagataella pfaffii* GS115 / pINT-G418-AOX1<sub>GS115</sub>INU**

*Трансформация*

Штаммы *K.kurtzmanii* Y-727 и *K.pfaffii* GS115 трансформировали линейризованными фрагментами векторов **pINT-G418-GAP<sub>Y727</sub>INU**; **pINT-G418-AOX1<sub>Y727</sub>INU** и **pINT-G418-GAP<sub>GS115</sub>INU**; **pINT-G418-AOX1<sub>GS115</sub>INU** соответственно. В результате проведения процесса трансформации по стандартному протоколу [16] и отбора трансформантов на агаризованной среде YPD с добавлением антибиотика G418 (в концентрации 800 мкг/мл – для GS115 и 200 мкг/мл для Y-727) получили штаммы, продуцирующие инулазу: *K. kurtzmanii* ВКПМ Y-727 / **pINT-G418-GAP<sub>Y727</sub>INU**; *K. kurtzmanii* ВКПМ Y-727 / **pINT-G418-AOX1<sub>Y727</sub>INU** и *K. pfaffii* GS115 / **pINT-G418-GAP<sub>GS115</sub>INU**; *K. pfaffii* GS115 / **pINT-G418-AOX1<sub>GS115</sub>INU**.

*Культивирование и анализ*

Для проведения опыта выбрали по 2 клон каждого штамма. Инокулят анализируемого клон *K. kurtzmanii* Y-727 / **pINT-HIS4-GAP<sub>Y727</sub>INU** или *K. pfaffii* GS115 / **pINT-HIS4-GAP<sub>GS115</sub>INU** был помещен в пробирки с 5 мл среды YPD, а инокулят клон *K. kurtzmanii* ВКПМ Y-727 / **pINT-HIS4-AOX1<sub>Y727</sub>INU** или *K. pfaffii* GS115 / **pINT-HIS4-AOX1<sub>GS115</sub>INU** - в пробирки с 5 мл среды YPM .

Культуру выращивали в течение 15 часов в ротационном шейкере-термостате (250 об/мин), при температуре 28<sup>0</sup>С до. По достижению оптической плотности OD<sub>600</sub>~2.0-3.0 осаждали биомассу центрифугированием в настольной центрифуге, при 3000g. Супернатант отделяли декантированием и использовали для измерения активности инулазы.

Активность секретируемой инулазы определяли в культуральной жидкости, с использованием сахарозы в качестве субстрата. Инулаза гидролизует β-гликозидную связь, в результате чего образуется восстанавливающий углевод – глюкоза. Количество образовавшейся глюкозы позволяет судить об активности фермента инулазы. Количество глюкозы измеряют по оптической плотности (при λ=492нм) реакционной смеси, после добавления 3,5-динитросалициловой кислоты, которая восстанавливается до 3-амино-5-нитросалициловой кислоты, меняя окраску [15]. Активность инулазы представлена в единицах. 1 единица активности – такое количество фермента, которое

освобождает 1 мкмоль глюкозы за 1 мин, нормированное на 1 мл культуральной жидкости и далее на 1 оптическую единицу (OD<sub>595</sub>) культуры.

#### 7.7.4 Получение продуцентов HBsAg: *K. kurtzmanii* Y727his4Δ/pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HBsAg и *K. pfaffii* GS115/pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HBsAg

##### *Трансформация*

В качестве реципиентных штаммов используют штамм *K. kurtzmanii* Y727his4Δ и в качестве контрольного штамм *K. pfaffii* GS115.

В результате трансформации штамма *K. kurtzmanii* Y-727his4Δ линейризованным фрагментом плазмиды pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HBsAg, с последующим отбором трансформантов на селективной агаризованной среде, получили штамм-продуцент штамм *K. kurtzmanii* Y-727his4Δ/pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HBsAg, синтезирующий поверхностный антиген вируса гепатита В.

В результате трансформации штамма *K. pfaffii* GS115 линейризованным фрагментом плазмиды pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HBsAg, с последующим отбором трансформантов на селективной агаризованной среде YNB, получили штамм-продуцент штамм *K. pfaffii* GS115/pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HBsAg, синтезирующий поверхностный антиген вируса гепатита В.

##### *Определение уровня продукции поверхностного антигена вируса гепатита В*

Для проведения опыта выбрали по 2 клон каждого штамма. Инокулят анализируемых клонов был помещен в пробирки с 5 мл среды YPgM. Культуру выращивали в течение 72 часов в ротационном шейкере-термостате (250 об/мин), при температуре 28<sup>0</sup>С. Каждые 24 часа проводили индукцию метанолом, путем асептического добавления 50% раствора метанола в пробирки, до конечной концентрации 0,5%(v/v). По истечении 72 часов биомассу осаждали центрифугированием в настольной центрифуге, при 3000g.

Для определения уровня продукции использовали метод иммуноферментного анализа на твердой подложке. В качестве подложки использовали стандартный планшет для иммуноферментного анализа с предварительно сорбированными человеческими поликлональными антителами к HBsAg. Данный планшет, конъюгат -

мышинные моноклональные антитела к HBsAg, меченные пероксидазой хрена, а также хромоген ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) входили в стандартный набор «Гепастрип» (пр-во ООО «Ниармедик плюс») для определения HBsAg в сыворотке крови.

Осажденные клетки разрушали в буфере (10мМ фосфатный буфер, 500мМ NaCl, 10 мМ ЭДТА, 2 мМ PMSF, 1% Tween 20, pH 7.2) с помощью стеклянных шариков (Sigma) на дезинтеграторе FastPrep 24 (фирмы MP). Анализировали количество HBsAg в полученном лизате. В качестве стандарта для калибровки использовали отраслевой стандартный образец HBsAg вируса гепатита В (кат.№ В-331, ООО «Научно-производственное объединение Диагностические системы»). Количество HBsAg в тотальном лизате клонов определяли по интенсивности поглощения реакционной смеси при длине волны  $\lambda=492$  нм.

#### **7.7.5 Получение штамма-продуцента *K. kurtzmanii* Y727 / pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-VEGF<sub>111b</sub>**

##### *Трансформация*

В качестве реципиентных штаммов используют штамм *K. kurtzmanii* Y-727ura3<sup>mut</sup>his4Δ. В результате трансформации штамма *K. kurtzmanii* Y-727ura3<sup>mut</sup>his4Δ линейаризованным фрагментом плазмиды pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-VEGF<sub>111b</sub>, с последующим отбором трансформантов на селективной агаризованной среде (YNB + гистидин 50мкг/мл агаризованной среды), получили штамм-продуцент штамм *K. kurtzmanii* Y-727/pINT-AOX1<sub>Y727</sub>-VEGF<sub>111b</sub>, синтезирующий рекомбинантный сосудисто-эндотелиальный фактор роста (VEGF<sub>111</sub>).

##### *Культивирование и анализ*

Для проведения опыта выбрали 2 клон штамма. Инокулят анализируемых клонов был помещен в пробирки с 5 мл среды YPgM, следующего состава (мас.%): пептон-2, дрожжевой экстракт-1, глицерин 0,5, метанол-0,5 (v/v), вода – остальное). Культуру выращивали в течение 62 часов в ротационном шейкере-термостате (250 об/мин), при температуре 28<sup>0</sup>С. Каждые 24 часа проводили индукцию метанолом, путем асептического добавления 50% раствора метанола в пробирки, до конечной

концентрации 0,5% (v/v). По истечении 62 часов биомассу отделяли центрифугированием в настольной центрифуге, при 3000g. Супернатант отделяли декантированием, и использовали для электрофореза в денатурирующих условиях, вестерн блота и хроматографической очистки.

#### **7.7.6 Получение мутантных штаммов-продуцентов: *K. kurtzmanii* Y727/fldΔ-AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ ; *K.pfaffii* GS115/fldΔ-AOX1<sub>GS115</sub>-LacZ**

##### *Трансформация и культивирование*

Штаммы *K.kurtzmanii* Y-727his4Δ и *K.pfaffii* GS115 трансформировали линейризованными фрагментами плазмид pINT-fldΔ-AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ и pINT-fldΔ-AOX1<sub>GS115</sub>-LacZ соответственно.

В результате проведения процесса трансформации по стандартному протоколу [16] и отбора трансформантов, получили 2 штамма продуцента бета-галактозидазы: *K.kurtzmanii* Y727/fldΔ-AOX1<sub>Y727</sub>-LacZ и *K.pfaffii* GS115/fldΔ-AOX1<sub>GS115</sub>-LacZ, в которых ген FLD делетирован замещением (рис.22 В). Ген Lac-Z (бета-галактозидазы) находится под контролем промоторов AOX1, клонированных из соответствующих сравниваемых штаммов. Для проведения анализа выбрали по 2 клона каждого штамма. Встраивание кассеты и делецию гена FLD подтверждали с помощью ПЦР, с использованием праймеров

pr\_FLD\_prom-5' tcaagctttgagataacagagttgggtaa

pr2\_AOX1 3'-aaggtaccagatctagccatggtttgatccttgaataattagttgtttttgatcttctca

Полученные при помощи ПЦР фрагменты подтвердили корректность встраивания вектора и делецию гена FLD (данные не приведены).

Делеция гена FLD была также подтверждена фенотипическими признаками полученных клонов, которые были высеяны на агаризованную среду YPD, содержащую 5мМ формальдегид. В качестве отрицательного контроля на ту же среду были посеяны клетки штаммов реципиентов : *K.kurtzmanii* Y727his4Δ и *K.pfaffii* GS115. Клоны с делетированным геном FLD не дали подростка, в отличие от штаммов реципиентов, вследствие токсичного действия формальдегида [111].

Отобранные клоны были инокулированы в среду YP - без добавления субстрата; YPM – содержащую 1% (v/v) метанол; YPF – содержащую 1,5% (m/v) формиат калия. Культуру выращивали в ротационном шейкере-термостате (250 об/мин), при температуре 28<sup>0</sup>С. По истечении 14 часов клетки отделяли центрифугированием в настольной центрифуге, при 3000g и разрушали с помощью стеклянных шариков на дезинтеграторе MP FastPrep для получения клеточного лизата и последующего измерения активности β-галактозидазы [89].

### 7.7.7 Проведение ферментации

Для подготовки инокулята клетки двух штаммов *K. kurtzmanii* Y-727his4Δ/**pPH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HSA** / Ty-URA3-AOX1-HSA и *K. pfaffii* GS115/**pPH93-AOX1<sub>GS115</sub>-HSA** засеяли с чашки YPD в колбы с 50 мл жидкой среды YPD. Культуру выращивали в ротационном шейкере-термостате (250 об/мин), при температуре 28<sup>0</sup>С в течение 14 часов. При этом оптическая плотность OD<sub>600</sub> составила 36,0 для штамма Y-727 и 28,0 для штамма GS115.

Полученный инокулят каждого штамма асептически внесли в объем биореактора Braun. Состав среды и подпитки приведен в табл.

Таблица . Состав среды и подпитки для ферментации

Начальный состав среды , г/л		Состав подпитки, г/л
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	1,4
биотин	0,0004	
тиамин		0,2
ПАБК	0,0002	
витамин B2	0,0002	
витамин B1	0,0004	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0005	0,0002
CuSO <sub>4</sub>	0,00004	0,005
KJ	0,0001	0,01
KCl		3,7
FeCl <sub>3</sub>	0,0002	
FeSO <sub>4</sub>		0,2
NaMoO <sub>4</sub>	0,0002	0,0006
MnSO <sub>4</sub>	0,0004	0,02
ZnSO <sub>4</sub>	0,0004	0,07
MgSO <sub>4</sub>	0,5	2,3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12,34	0,9
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,28	
CaCl <sub>2</sub>	0,1	0,3
NaCl	1,0	
дрожжевой экстракт	20,0	5,0
<b>глицерин</b>	<b>5,0</b>	<b>560 (мл/л)</b>
<b>метанол</b>		<b>50% (v/v)</b>

Ферментация проводилась в течение 168 часов, при постоянной аэрации со скоростью 955 об/мин и статлируемым рН~5.5. В течение первых 54 часов подпитка с глицерином составляла 7 мл/час. Далее, до окончания ферментации проводилась подпитка с метанолом, также 7 мл/час.

### Список научно-технической литературы

1. Daly R, Milton TW Hearn (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. J.Mol.Recognit. 18: 119-138
2. Narhi LO, Arakawa T, Strickland TW. (1991). The effect of carbohydrate on the structure and stability of erythropoietin. J. Biol. Chem. 266: 23022–23026.
3. Macauley-Patrick S, Fazenda ML (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. Yeast 22: 249-270
4. Balamurugan V, Reddy GR (2006) *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins—Vaccines. Indian Journal of Biotechnology (6): 175-186
5. Gellissen G (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54(6): 741-750
6. Kurtzman CP (2009) Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. J Ind Microbiol Biotechnol 36:1435–1438
7. Bhattacharya P, Pandey G (2007) Production and purification of recombinant human granulocyte–macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) from high cell density cultures of *Pichia pastoris*. Bioprocess and Biosystems Engineering 30(5): 305-312
8. Zhang H, Yuan QP (2007) Cloning and secretion expression of hepcidin in *Pichia pastoris*. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 23(3): 381-385

9. Yurimoto H (2011) Yeast Methylophony: Metabolism, Gene Regulation and Peroxisome Homeostasis. Hindawi Publishing Corporation International Journal of Microbiology Article ID 101298
10. Conde R, Cueva R (2004) A Search for Hyperglycosylation Signals in Yeast Glycoproteins. The journal of biological chemistry (42): 43789–43798
11. Hartner A, Glieder A (2006) Regulation of methanol utilization pathway genes in yeasts. Microbial Cell Factories 2006, 5:39
12. Tschopp JF, Brust PF, Cregg JM (1987) Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in Pichia pastoris. Nucleic Acids Res. 15:3859–3876.
13. Cregg JM, Barringer KJ Pichia pastoris as a Host System for Transformations. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 1985, 3376-3385
14. Бревнова Е.Э., Козлов Д.Г. Штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* – продуцент фруктозы из инулина, 1998, Биотехнология, 1, 12-20
15. Berezin IV, Rabinovich ML Study of Applicability of quantitative kinetic spectrophotometric method for glucose determination, 1997, Biokhimiya, 42:1631-1637
16. Shixuan Wu, Geoffrey J. Letchworth High efficiency transformation by electroporation of Pichia pastoris pretreated with lithium acetate and dithiothreitol, BioTechniques, 2004, 36:152-154
17. Rose M, Botstein D Construction and use of gene fusions lacZ (b-galactosidase) which are expressed in yeast. Meth. Enzymol. 101:167-180
18. Oka A Sugisaki H Takanami M Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903 JOURNAL J. Mol. Biol. 147 (2), 217-226 (1981)
19. Марченко А.Н., Козлов Д.Г., Свирцевская Е.В., Беневоленский С.В. Использование N-конца белка TuA для создания гибридных вирусоподобных частиц. Биотехнология 2001, № 2, 3-11
20. Чеперегин С.Э., Арман И.П., Грановский Н.Н. "Оптимизация экспрессии гена поверхностного антигена вируса гепатита В в дрожжах", Мол. генетика, микробиология, вирусология, 1990, V.5, 17-20
21. Zhao DM, Wang M, Mu XJ, Sun ML, Wang XY Screening, cloning and overexpression of Aspergillus niger phytase (phyA) in Pichia pastoris with favourable characteristics. Lett Appl Microbiol. 2007 Nov; 45(5): 522-8.

22. Romanos MA, Scorer CA, Clare J.J. Foreign gene expression in yeast. *Yeast* 1992. V.8, 423-488.
23. Parent SA, Fenimore CM, Bostian KA Vector systems for the expression, analysis and cloning of DNA sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1985. V.1, 83-138
24. Hinnen A, Hicks JB, Fink GR Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*- 1978.- V.75, 1929-1933
25. Lopes TS, Klootwijk J, Veenstra AE et al. High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: a new vector for high-level expression. *Gene*, 1989, V.79, 199-206.
26. Lohr et. al Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *The FASEB Journal*, 1995, vol.9, 777-787
27. Lin J, Panigraphy D et al. Production process for recombinant human angiostatin in *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2000, 24, 31–35
28. Chambers A., Tsang J.S.H., Stanway C. et al. Transcriptional control of the *Saccharomyces cerevisiae* PGK gene by RAP1. *Mol. Cell. Biol.*, 1989, V.9, 5516-5524
29. Flores C, Rodriguez C et al. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 2000, V.24, 507-529
30. Gancedo J Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998, V.62, 334-361.
31. Bennetzen J, Hall B The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 1982, V.257, 3018-3025.
32. Chambers A Phosphoglycerate kinase. In: *Yeast Sugar Metabolism. Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Application*. Eds.: Zimmermann F.K., Entian K.D. Tehnomic, Lancaster 1997, 141-156
33. Nonaka G, Ishikawa T et al. Genetic analysis of growth inhibition of yeast cells caused by expression of *Aspergillus oryzae* RNase T1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000, V.64. 2152-2158
34. Lohr D., Venkov P. et al. Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *The FASEB journal*, 1995, V.9, 777-787
35. Spencer J, Spencer D Genetic improvement of industrial yeasts. *Annu. Rev. Microb.* 1983, V.37, 121-142

36. Ana Tavern, Branka Jelicic et al. Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO reports*, 2006, V.7, No.5, 496-499
37. Ronen Marmostein, Michael Carey et al. DANN recognition by GAL4: structure of protein-DANN complex. *Nature*, 1992, V.356, 408-415
38. Hirst M, Kobor MS et al. GAL4 is regulated by the RNA polymerase II holoenzyme-associated cyclindependent protein kinase SRB10/CDK8. *Mol Cell*, 1999, V.3, 673-678
39. Rohde JR, Trinh J et al. Multiple signals regulate GAL transcription in yeast. *Mol Cell Biol*, 2000, V.20, 3880–3886
40. Eckart MR, Bussineau CM Quality and authenticity of heterologous proteins synthesis in yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1996, V.7, 525-530
41. Ng DT, Brown JD et al. Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol*. 1996, V.134, 269-278
42. Fuller RS, Sterne RE, et al. Enzymes required for yeast prohormone processing *Ann. Rev. Physiol.*, 1988, V.50, 345-362
43. Yamamoto Y, Taniyama Y Engineering of the Hydrophobic Segment of the Signal Sequence for Efficient Secretion of Human Lysozyme by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1987, V.149, No2, 431-436
44. Degryse E, Dietrich M et al. Addition of a dipeptide spacer significantly improves secretion of ovine trophoblast interferon in yeast. *Gene*, 1992, V.118, 47-53
45. Tanaka H, Okuno T, Moriyama S Acidophilic Xylanase from *Aureobasidium pullulans*: Efficient Expression and Secretion in *Pichia pastoris* and Mutational Analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2004, V.98, No5, 338-343
46. Yang L, Dong W Expression and Purification of Natural N-Terminal Recombinant Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor from *Pichia pastoris*. *Biol. Pharm. Bull.*, 2008, V.31(9), 1680—1685
47. Ogata K, Nishikawa H. et al. A yeast capable of utilizing methanol. *Agric. Biol. Chem.*, 1969, V.33, 1519-1520
48. Cereghino JL, Cregg JM Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol.Rev*, 2000, V.24, 45-66

49. Liachko I, Youngblood RA et al. High-resolution mapping, characterization, and optimization of autonomously replicating sequences in yeast. *Genome Res.*, 2013, V.23(4), 698-704
50. Clarke L, Carbon J Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature*, 1980, V.257, 504-509
51. Kim MD, Rhee SK Enhanced production of anticoagulant hirudin in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by chromosomal delta-integration. *J. Biotechnol.*, 2001, V.85, 41-48.
52. Naumov GI, Naumova ES et al. *Komagataella kurtzmanii* sp. nov., a new sibling species of *Komagataella (Pichia) pastoris* based on multigene sequence analysis
53. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 12 июля 2011 г. N 99 г. Москва "Об утверждении СП 2.3.3.2892-11 "Санитарно-гигиенические требования к организации и проведению работ с метанолом"
54. Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации 4.1. Методы контроля. Химические факторы, определение концентраций химических веществ в воздухе. Газохроматографическое определение метанола в воздухе. Методические указания МУК 4.1.1046а-01 Выпуск 2, Минздрав России, Москва 2002
55. Boteva R, Visser AJ et al. Conformational transitions accompanying oligomerization of yeast alcohol oxdase, a peroxisomal flavoenzyme. *Biochemistry*, 1999, V.38, 5034-5044
56. Negruta O, Csutak O et al. Methylotrophic yeasts: diversity and methanol metabolism. *Romanian Biotechnological Letters*, 2010, V.15, 5369-5376
57. Veenhuis, M., et al., The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2006, 1763(12), 1453-1462
58. Троценко Ю.А. Метилотрофные эукариоты. *Успехи микробиологии*, 1983, V. 18, 18-37.

59. Sibirny AA et al. Reactions of Direct Formaldehyde Oxidation to Co<sub>2</sub> Are Nonessential for Energy Supply of Yeast Methylo-trophic Growth. Archives of Microbiology, 1990, 154(6), 566-575
60. Sakai Y et al. Yap1-Regulated Glutathione Redox System Curtails Accumulation of Formaldehyde and Reactive Oxygen Species in Methanol Metabolism of *Pichia pastoris*. Eukaryotic Cell, 2009, 8(4), 540-549
61. Падкина М.В. Сравнительный анализ экспрессии гетерологичных генов в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris* и изучение условий повышения продукции рекомбинантных белков. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, Санкт-Петербург, 2005
62. Yurimoto, H., N. Kato, and Y. Sakai, Assimilation, dissimilation, and detoxification of formaldehyde, a central metabolic intermediate of methylo-trophic metabolism. Chemical Record, 2005, 5(6), 367-375
63. Couderc R, Baratti J Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*. Purification and properties of alcohol oxidase. Agric. Biol. Chem., 1980, V.44, 2279-2289
64. Lin-Cereghino GP, Godfrey L et al. Mxr1p, a Key Regulator of the Methanol Utilization Pathway and Peroxisomal Genes in *Pichia pastoris*. Molecular and Cellular Biology, 2006, Feb., 883-897
65. Kranthi BV, Kumar R et al. Identification of key DNA elements involved in promoter recognition by Mxr1p, a master regulator of methanol utilization pathway in *Pichia pastoris*. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, 1789, 460-468
66. Leonardo M. Damasceno et al. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011, DOI 10.1007
67. Cregg JM, Madden KR Development of the methylo-trophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. Dev. Ind. Microbiol., 1988, V.29, 33-41
68. Sudbery PE The expression of recombinant proteins in yeast. Curr. Opin. Biotechnol., 1996, V.7, 517-524
69. Yamada Y, Maeda K et al. The phylogenetic relationships of the hat-shaped ascospore-forming, nitrate-assimilating *Pichia* species, formerly classified in the genus *Hansenula Sydow et Sydow*, based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs

(Saccharomycetaceae): the proposals of three new genera, *Ogataea*, *Kuraishia*, and *Nakazawaea*. Biosci Biotechnol Biochem, 1994, V.58, 1245–1257

70. Yamada, Y., Matsuda et al. The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Komagataella* gen. nov. (*Saccharomycetaceae*). Biosci Biotechnol Biochem, V.59, 439–443

71. Kurtzman CP Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, V.55, 973-976

72. Kurtzman CP Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigenesequence analysis. J Ind Microbiol Biotechnol, 2009, V.36, 1435-1438

73. Li Pingzuo et al. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. Appl. Biochem Biotechnol, 2007, V.142, 105-124

74. Krainer FW et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. Microbial Cell Factories, 2012, 11-22

75. Cregg J The *Pichia* System. Keck Graduate Institute, Claremont, California

76. Luttk MA et al. The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. J. Biol. Chem., 1998, V.273, 24529-24534

77. Joseph-Horne T, Hollomon DW et al. Fungal respiration: a fusion of standart and alternative components. Biochim. Biophys. Acta., 2001, V.1504, P.179-195

78. Leschinskaya IB Contemporary Industrial Microbiology. Соросовский образовательный журнал, 2000, Т.6, №4, 14-18

79. Waterham HR, Cregg JM Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. Gene 1997, V.186, 37–44

80. Goodrick JC, Xu M, et al. High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. Biotechnol Bioeng., 2001, V.74, 492–497

81. Yu ZL, Wu XJ et al. Enhancement of the production of SAM by overexpression of SAM synthetase in *Pichia pastoris*. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao* (Shanghai), 2003 V.35, 127–132
82. Sears IB, O'Connor J et al. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast*, 1998, V.14, 783–790
83. Vassileva A, Chugh DA et al. Expression of hepatitis B surface antigen in the methyotrophic yeast *P. pastoris* using the GAP promoter. *J Biotechnol*, 2001 V.88, 21–35
84. Schen S, Cregg JM et al. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1998, V.216, 93-102
85. Resina D, Cos O et al. Developing high cell density fed-batch cultivation strategies for heterologous protein production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated FLD1 Promoter. *Biotechnol Bioeng*, 2005, V. 91(6), 760–767
86. Peters TJ All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. 1996, San Diego; Academic Press.
87. Hamilton-Wessler, M., et al., Mechanism of protracted metabolic effects of fatty acid acylated insulin, NN304, in dogs: retention of NN304 by albumin. *Diabetologia*, 1999, V.42(10), 1254-63
88. Murasugi A. Secretory expression of human protein in the Yeast *Pichia pastoris* by controlled fermentor culture. *Recent Pat Biotechnol.*, 2010, Vol.4(2), 153-66
89. Rose M, Botstein D Construction and use of gene fusions lacZ (b-galactosidase) which are expressed in yeast. *Meth. Enzymol.*, V.101, 167-180
90. Sorensen HP, Mortensen KK Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. 2005, *J Biotechnol*, V.115(2), 113-128
91. Gopal GJ, Kumar A Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. 2012, *Protein J*, V.32(6), 419-425
92. Higgins DR, Cregg JM *Pichia* Protocols. 1998, *Methods in Molecular Biology*, V.103
93. Schoch CL, Seifert KA Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, V.109, 6241–6246

94. Tiollais P, Pourcel C, Dejean A The hepatitis B virus. *Nature*, 1985, V.317, 489-495
95. Друца В.Л., Буданов М.В., Борисова В.Н. и др. Рекомбинантная плазмидная ДНК PDES20, кодирующая поверхностный антиген вируса гепатита В (HBSAG/AYW) штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, содержащий рекомбинантную плазмидную ДНК PDES20 - продуцент поверхностного антигена вируса гепатита В (HBSAG/AYW). Патент РФ RU 2088664 C1.-МКИ С 12 N 15/51, 1997
96. Vans AL, Lunsdorf H Physiological response of *Pichia pastoris* GS115 to methanol-induced high level production of the Hepatitis B surface antigen: catabolic adaptation, stress responses, and autophagic processes. *Microbial Cell Factories*, 2012, V.11, 103
97. Woolard J, Wen-Ying W et al. VEGF165b, an Inhibitory Vascular Endothelial Growth Factor Splice Variant: Mechanism of Action, In vivo Effect On Angiogenesis and Endogenous Protein Expression. *Cancer research* 64, 2004, 7822–7835
98. Rosana D. Meyer, David B. Sacks, Nader Rahimi (2008) IQGAP1-Dependent Signaling Pathway Regulates Endothelial Cell Proliferation and Angiogenesis. *PLoS ONE* vol.3, 3848
99. Arindel S.R. Maharaj and Patricia A. D'Amore (2007) Roles for VEGF in adult. *Microvasc res.*, 2007, V.74, 100-113
100. Konstantin V. Stoletov, Kirsty E. Ratcliffe, Bruce I. Terman (2002) Fibroblast growth factor receptor substrate 2 participates in vascular endothelial growth factor-induced signaling. *The FASEB journal*, 2002, Vol.16, 1283-1285
101. Hiroko Bando Vascular Endothelial Growth Factor and Bevacizumab in Breast Cancer. *Breast Cancer*, 2007, V.2, No.14, 163-173
102. Chung R, Foster BK The potential role of VEGF-induced vascularisation in the bony repair of injured growth plate cartilage. *J. Endocrinol.*, 2014, V.221(1), 63-75
103. Geuties PJ, Nillesen ST Cloning, large-scale production, and purification of active dimeric rat vascular endothelial growth factor (rrVEGF-164). *Protein Expr Purif*, 2010, V. 69(1), 76-82

104. Mineur P, Colige AC, et al. Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents. *The Journal of Cell Biology*, 2007, V.179, No.6, 1261-1273
105. Catena R, Larzabal L et al. VEGF121b and VEGF165b are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. *Molecular Cancer* 2010, V.9, 320-334
106. Mohanraj D, Olson T et al. A Novel Method to purify Recombinant Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF121) Expressed in Yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995, V.215, No.2, 750-757
107. Debra Mohnen Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 2008, V.11, 266-277
108. Nakagawa T, Miyaji T A Methylotrophic Pathway Participates in Pectin Utilization by *Candida boidinii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 4253-4257
109. Cregg JM, Cereghino JL Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Molecular biology*, 2000, V.16, 23-52
110. Crable BR, Plugge CM Formate Formation and Formate Conversion in Biological Fuels Production. *Enzyme Research*, 2011, V. 2011, 532-536
111. Sunga AJ, Cregg J The *Pichia pastoris* formaldehyde dehydrogenase gene (FLD1) as a marker for selection of multicopy expression strains of *P. pastoris*. *Gene*, 2004, V.330, 39-47
112. Sudbery P.E. The expression of recombinant proteins in yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1996, V.7, 517-524
113. Kurtzman CP *Komagataella populi* sp. nov. and *Komagataella ulmi* sp. nov., two new methanol assimilating yeasts from exudates of deciduous trees. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2012, V. 101, 859–868
114. Dlačny D, Tornai-Lehoczki J, *Pichia (Komagataella) pseudopastoris* sp. nov., a new yeast species from Hungary. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2003, V. 83, 327–332
115. Geoff P Lin Cereghino, Joan Lin Cereghino Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, V.13, 329-332
116. Tyurin O.V., Gubaydullin I.I., Cheperegin S.E., Efremov B.D., Kozlov D.G. Amplification of leader proregions as a mean to increase the secretion of antibody fragments

in the *Pichia pastoris* yeast. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2013, V. 49(7), 656-659