

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМЕНИ А.Н. БАХА

На правах рукописи

Филькин Сергей Юрьевич

ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ФОСФОЛИПАЗЫ A2
И ХИМОЗИНА В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *P. PASTORIS*

1.5.4. Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.х.н. Липкин Алексей Валерьевич

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ	
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Экспрессионная система <i>P. pastoris</i> и её особенности	12
1.1.1. Используемые промоторы для масштабируемого получения целевых белков в <i>P. pastoris</i>	15
1.1.2. Используемые препролидерные последовательности для эффективной секреции рекомбинантных белков в <i>P. pastoris</i>	18
1.1.3. Модификация фолдинга белков в экспрессионной системе <i>P. pastoris</i>	19
1.2. Фосфолипаза A2	21
1.2.1. Структура секреторных фосфолипаз A2.....	22
1.2.2. Фосфолипазы A2 яда змей	23
1.2.3. Экспрессия генов фосфолипаз A2	25
1.2.4. Применение фосфолипаз A2 в биотехнологии	26
1.2.5. Фосфолипазы для дегумирования растительных масел.....	27
1.2.6. Использование фосфолипаз A2 в пищевой промышленности	28
1.3. Химозин	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
2.1. Среды, использованные в работе.....	35
2.2. Методы работы с клетками бактерий.....	36
2.2.1. Получение электрокомпетентных клеток бактерий	36
2.2.2. Трансформация клеток <i>E. coli</i> методом электропорации.....	36
2.3. Методы работы с клетками дрожжей.....	37
2.3.1. Получение электрокомпетентных клеток дрожжей	37
2.3.2. Трансформация гена ФЛА2 в <i>P. pastoris</i>	37
2.3.3. Трансформация гена прохимозина быка в <i>P. pastoris</i>	37
2.3.4. Трансформация гена прохимозина белухи в <i>P. pastoris</i>	38
2.3.5. Трансформация сплайсированного варианта гена HAC1 в созданные ранее штаммы продуценты GS115/pPICZα-Chym1, GS115/pVR2-GAP-Chym1	39
2.3.6. Селекция трансформантов <i>P. pastoris</i>	39
2.3.7. Культивирование трансформантов <i>P. pastoris</i>	40
2.3.8. Культивирование штамм-продуцента прохимозина в ферментере	40
2.4. Методы работы с нуклеиновыми кислотами.....	41
2.4.1. Амплификация фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции	41
2.4.2. Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции и лигирование фрагментов ДНК	41
2.4.3. Выделение плазмидной ДНК	41
2.4.4. Электрофорез ДНК в агарозном геле	41
2.4.5. Секвенирование плазмидной ДНК	42

2.4.6.	Анализ на наличие остаточной ДНК	42
2.5.	Создание генетических конструкций	42
2.5.1.	Конструирование вектора pPICZ α -ФЛА2 для экспрессии ФЛА2	42
2.5.2.	Конструирование вектора pPICZ α -Chym1 для экспрессии прохимозина быка ..	42
2.5.3.	Конструирование вектора pPIC9-GAP-HAC1	44
2.5.4.	Конструирование вектора pVR2-G1-Chym1	44
2.5.5.	Конструирование вектора pVR2-GAP-Chym1	44
2.5.6.	Конструирование вектора pSF001 для экспрессии Chym1 в <i>P. pastoris</i> под контролем нативного сигнального пептида mfa1	44
2.5.7.	Конструирование вектора pSF002 для экспрессии Chym1 в <i>P. pastoris</i> под контролем модифицированного сигнального пептида mfa1D	46
2.5.8.	Конструирование вектора pPICZ α - ChymBe для экспрессии прохимозина белухи	46
2.6.	Хроматографические методы работы с белками	46
2.6.1.	Выделение и очистка фосфолипазы TI-Nh	46
2.6.2.	Выделение и очистка секреторной ФЛА2 <i>S. violaceoruber</i> из культуральной жидкости	47
2.6.3.	Выделение и очистка химозина	47
2.7.	Аналитические методы работы с белками	48
2.7.1.	ДСН-электрофорез белков	48
2.7.2.	Масс-спектрометрия. Подтверждение массы белка	49
2.7.3.	Определение N-концевой аминокислотной последовательности TI-Nh	49
2.7.4.	Определение фосфолипазной активности	49
2.7.5.	Определение антикоагулянтной активности TI-Nh	50
2.7.6.	Определение ингибирования TI-Nh в отношении амидолитической активности тромбина	51
2.7.7.	Определение влияния TI-Nh на агрегацию тромбоцитов.	51
2.7.8.	Измерение спектра кругового дихроизма и термостабильности рекомбинантной фосфолипазы A2 из <i>S. violaceoruber</i>	52
2.7.9.	Определение молоко-свертывающей активности химозина	52
2.7.10.	Определение неспецифической протеолитической активности молоко-свертывающих ферментов	52
2.7.11.	Молекулярное моделирование трехмерной структуры и филогенетический анализ	53
2.8.	Статистическая обработка результатов	53
2.9.	Методы получения и анализа метаболомных данных	53
2.9.1.	Экстракция метаболитов из клеток <i>P. pastoris</i>	53
2.9.2.	Детекция вторичных метаболитов методами масс-спектрометрии	54

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	56
3.1. Антикоагулянтная фосфолипаза A2 TI-Nh, ее функциональная характеристика ..	56
3.2. Экспрессия рекомбинантной секреторной фосфолипазы A2 в <i>P. pastoris</i>	67
3.3. Вторичная структура рекомбинантной фосфолипазы A2 и ее термостабильность	73
3.4. Экспрессия рекомбинантного химозина быка в <i>P. pastoris</i>	75
3.4.1. Культивирование рекомбинантного химозина быка в ферментере	77
3.4.2. Очистка рекомбинантного химозина быка	78
3.5. Экспрессия рекомбинантного химозина белухи в <i>P. pastoris</i>	79
3.5.1. Выделение и очистка химозина белухи	80
3.5.2. Ферментативные свойства химозина белухи	81
3.6. Анализ влияния коэкспрессии транскрипционного фактора sHAC1 на уровень продукции рекомбинантного химозина в <i>P. pastoris</i> . Анализ металоболомных данных при продукции рекомбинантного химозина в метилотрофных дрожжах <i>P. pastoris</i>	84
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	91
ВЫВОДЫ	92
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	93
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	95
БЛАГОДАРНОСТИ	109
ПРИЛОЖЕНИЯ	110
Приложение 1. Карты генетических конструкций	110
Приложение 2. Дополнительные данные метаболомных экспериментов	118

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ФЛА2 – фосфолипаза A2
 ФЛА1 – фосфолипаза A1
 ФЛВ – фосфолипаза B
 сФЛА2 – секреторная фосфолипаза
 GRAS – generally recognized as safe, общедоступно распознаваемый как безопасный
 NHEJ – non-homologous end joining, неомологичное соединение концов
 P_{AOX1} – промотор алкогольдегидрогеназы
 P_{GAP} – промотор глицеральдегидфосфатдегидрогеназы
 Mxr1, Prm1, Mit1 – транскрипционные факторы
 TSS – сайт старта трансляции
 UPR – unfolded protein response, ответ клетки на накопление несвернутых белков
 sHAC1 – спласированный вариант транскрипционного фактора HAC1
 ЭР – эндоплазматический ретикулум
 PAF – фактором активации тромбоцитов
 PAF-АН – ацетил-гидролаза фактора активации тромбоцитов
 СНО – линия клеток яичников китайского хомячка
 МСА/РА – соотношение специфической молоко-свертывающей активности к неспецифической протеолитической активности, оценка специфичности молоко-свертывающих ферментов
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 ДСН ПААГ – полиакриламидный гель в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия
 ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
 MALDI – Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, матрично-стимулированная лазерная десорбция и ионизация
 ТФУ – трифторуксусная кислота
 10-pyrene PC – 1-пальминтоил-2-(10-пиренилдеcanoил)-sn-глицеро-3-фосфорилхолин, флуоресцентный субстрат для измерения активности ФЛА2
 БСА – бычий сывороточный альбумин
 ПТВ – протромбиновое время свертывания крови
 АЧТВ – активированное частичное тромбиновое время свертывания крови
 ТВ – тромбиновое время свертывания крови
 K_i – константа ингибирования
 АДФ – аденозинтрифосфат
 IMCU – international milk clotting units, единица молокосвертывающей активности химозина
 OP_{600} – оптическая плотность культуры при длине волны 600 нм
 1-MLCL – монолизокардиолипид
 LPA (16:0/0:0) – лизофосфатидная кислота
 MG (24:1(15Z)/0:0/0:0) – 1-моноацилглицерин
 PS (14:0/15:0) – 1-миристоил-2-пентадеcanoил-sn-глицеро-3-фосфосерин
 PS (10:0/25:1(11Z)) – 1-деcanoил-2-(11Z-пенткозаноил)-фосфосерин
 PC (18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/P-16:0) – 1-(1Z-гексадеканил)-2-(6Z,9Z,12Z,15Z-октадекатетраеноил)-глицеро-3-фосфохолин

РА (18:0/18:1(9Z)) – 1-октадеcanoил-2-(9Z-октадеcanoил)-sn-фосфотидная кислота

РС (14:0/20:3(8Z,11Z,14Z)) – 1-(8Z,11Z,14Z-эйкозатриеноил)-2-тетрадеcanoил-глицеро-3-фосфохолин

РС (18:3(6Z,9Z,12Z)/P-16:0) – 1-(6Z,9Z,12Z-октадекатриеноил)-2-гексадеcanoил-глицеро-3-фосфохолин

РС (18:2(9Z,11Z)/18:2(9Z,11Z)) – 1-(11Z-октадеcanoил)-2-(9Z,12Z-откадеcanoил)-sn-глицеро-3-фосфохолин

РЕ-NMe (14:1(9Z)/22:1(9Z)) – 1,2-ди-(9Z-октадеcanoил)-sn-глицеро-3-фосфо-N-метилэтанолламин

РС (14:1(9Z)/22:2(13Z,16Z)) 1-(9Z-тетрадеcanoил)-2-(13Z,16Z-докосадиеноил)-глицеро-3-фосфохолин

РС (14:0/22:2(13Z,16Z)) – 1-(9Z-тетрадеcanoил)-2-(13Z,16Z-докосадиеноил)- глицеро-3-фосфохолин

ГСВ – грамм сухого веса

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Современная пищевая промышленность испытывает растущую потребность в ферментах, которые способны обеспечивать высокую эффективность и экологичность технологических процессов. Фосфолипаза А2 (ФЛА2) из *Streptomyces violaceoruber* и химозин *Bos taurus* являются промышленными ферментами, которые активно используются в пищевом производстве.

ФЛА2 играет важную роль в эмульгировании яичного желтка при производстве майонеза, соусов, хлебобулочных изделий, а также в процессе очистки растительных масел. Этот фермент улучшает текстуру, стабильность и органолептические свойства продуктов. В качестве натурального источника ФЛА2 используется свиная поджелудочная железа, а также яды змей, которые являются природной библиотеккой для различных белков, в том числе и ФЛА2, и служат источником новых структур и функциональных активностей ФЛА2. Основными источниками биотехнологической ФЛА2 являются штаммы-продуценты нитчатых грибов.

Химозин является ключевым ферментом для створаживания молока при производстве сыра. В качестве натурального источника химозина используются желудки телят. Рекомбинантный химозин, произведенный генетически модифицированными организмами, является альтернативным источником фермента с 1990 года. Доля рекомбинантного химозина в современном мировом производстве составляет 70% и продолжает расти. Повышение доли рекомбинантного химозина снижает экономические издержки, связанные со стоимостью молодого крупного рогатого скота (химозин получают из сычуга телят), также это этически оправдано. Все большее развитие получают различные биохимические подходы, повышающие выход отдельных штамм-продуцентов, а также разработка новых экспрессионных платформ. Метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* (также именуемые по филогенетической классификации как *Komagataella phaffii* с 1995 года) являются одной из таких экспрессионных платформ.

Исследование биохимических и физико-химических свойств рекомбинантной ФЛА2 и химозина имеет большое прикладное значение. Актуальной задачей современной биотехнологии является развитие и разработка принципиально новых и высокоэффективных методов промышленного получения и очистки этих ферментов. Понимание биохимических механизмов ферментативного катализа ФЛА2 и химозина позволяет разработать, как ферменты с улучшенными каталитическими свойствами, так и более эффективные методы получения и очистки данных ферментов.

Системный подход к изучению влияния клеточного метаболизма на уровень продукции рекомбинантных белков дает возможность выявить новые закономерности и разработать подходы, позволяющие увеличить продукцию рекомбинантных ферментов за счет более детального понимания биохимических процессов. Известно, что продукция рекомбинантных белков является нагрузкой на биосинтетический аппарат метилотрофных дрожжей, причем данная нагрузка распределена неравномерно. Механизмы возникновения недостатка отдельных аминокислот при биосинтезе рекомбинантных белков могут быть исследованы при помощи анализа метаболома. Выявление лимитирующих стадий биосинтеза рекомбинантных белков методами метаболомики позволяет оптимизировать процесс ферментации и увеличить выход рекомбинантного белка.

Степень разработанности темы исследования. Тема исследования экспрессии и биопroduкции отдельных рекомбинантных белков в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris* разрабатывается довольно подробно с 90-х годов прошлого века. Возможности для улучшения данной экспрессионной системы не исчерпаны, несмотря на развитие биохимических и молекулярно-биологических методов. Существующие разработанные технологические решения по экспрессии ФЛА2, и по экспрессии химозина в *P. pastoris* не являются окончательными ни по достигнутому уровню продукции, ни по степени оптимизации выделения и очистки. Таким образом необходимо дальнейшее изучение свойств ФЛА2 и химозина для расширения их применения в пищевой промышленности.

Охарактеризованные и описанные в данной работе подходы к выделению и очистке рекомбинантных ферментов имеют прикладное значение и могут быть использованы при масштабировании биопроцессов.

Обнаруженная и описанная ФЛА2 TI-Nh расширяет представление о спектре потенциальных активностей ФЛА2, выделенных из змеиного яда, и эволюционных процессах возникновения различных активностей у структурно сходных групп белков.

Поиск и анализ свойств молоко-свертывающих ферментов у различных видов животных ранее также показал свою эффективность. Обнаруженный и охарактеризованный химозин белухи позволяет лучше понять структурно-функциональные взаимодействия для аспартатных протеаз, обладающих молоко-свёртывающими свойствами.

Цель работы и основные задачи исследования. Целью данной работы является разработка масштабируемых методов биотехнологического синтеза и очистки рекомбинантных ферментов ФЛА2 и химозина, изучение биохимических механизмов их каталитических свойств, подбор условий экспрессии и изучение метаболомных процессов, идущих при экспрессии в метилотрофных дрожжах *P. pastoris*.

В рамках работы были сформулированы следующие задачи:

1. Разработка способа очистки рекомбинантной фосфолипазы A2, продуцируемой метилотрофными дрожжами *P. pastoris*;
2. Исследование каталитических свойств фосфолипазы A2 и влияния двухвалентных катионов на термостабильность рекомбинантной фосфолипазы A2;
3. Выделение, очистка и исследование антикоагулянтных свойств фосфолипазы A2 из яда *Naja haje*;
4. Создание штамм-продуцентов рекомбинантного химозина быка и белухи в метилотрофных дрожжах *P. pastoris*, сравнение их каталитических свойств;
5. Подбор оптимальных условий для продукции рекомбинантных ферментов в метилотрофных дрожжах *P. pastoris* с помощью анализа метаболомных данных.

Научная новизна. Разработаны подходы для масштабируемых процессов выделения и очистки рекомбинантных ФЛА2 и химозина. Впервые проведена характеристика и описание нового белка из группы секреторных фосфолипаз A2, выделенного из ядов змей, с установленными антикоагулянтными свойствами. Также охарактеризован и описан рекомбинантный химозин белухи, выявлены структурные детерминанты, определяющие физико-химическую активность фосфолипаз A2 и химозина,

а также исследованы изменения метаболомного состава при продукции рекомбинантных ферментов в метилотрофных дрожжах *P. pastoris*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные вносят значимый вклад в понимание физико-химических свойств ФЛА2 и химозина. В настоящей работе впервые описан антикоагулянтный белок TINh, относящийся структурно к классу ФЛА2. Это расширяет возможности использования отдельных полипептидных пространственных укладок для создания новых физиологических активностей. Понимание фундаментальных механизмов изменения метаболома в системе *P. pastoris* при экспрессии целевых рекомбинантных белков расширяет наше представление о биохимических механизмах увеличения продуктивности штамм-продуцентов.

ФЛА2 и химозин играют важную роль в пищевой биотехнологии, изучение новых свойств данных ферментов, а также особенностей их биосинтеза в метилотрофных дрожжах *P. pastoris* носит важное значение для народного хозяйства. Применение результатов исследования позволит повысить эффективность производства при биопродукции данных ферментов.

Методология и методы исследования

В основу работы положены стандартные биохимические методы: хроматографические методы очистки, методы определения ферментативной активности. Также использовались методы молекулярной биологии для создания генетических конструкций и экспрессии рекомбинантных белков, биоинформатические методы для структурного анализа и гомологического моделирования при определении структурных детерминант физико-химической активности, а также масс-спектрометрический анализ для измерения удельных концентраций метаболитов при анализе изменений метаболома.

Положения, выносимые на защиту

На защиту выносятся следующие результаты научной деятельности:

1. Разработан масштабируемый метод выделения и очистки рекомбинантной фосфолипазы A2 позволяющий получать конечный препарат с выходом 74%, не содержащий хозяйской ДНК и полностью соответствующий всем требованиям пищевой промышленности. Двухвалентные катионы увеличивают термостабильность рекомбинантной фосфолипазы A2.
2. Из яда египетской кобры *Naja haje* выделена Фосфолипаза A2 TI-Nh. Это первый известный ингибитор тромбина, выделенный из яда змей семейства *Elapidae*, а также первая описанная фосфолипаза A2 из группы IB, обладающая способностью ингибировать тромбин с константой ингибирования 72,8 нМ.
3. Разработан и получен штамм-продуцент *P. pastoris* с системой интеграции гена в хромосому дрожжей, позволяющий производить рекомбинантный химозин *Bos taurus*. Проведена оптимизация условий ферментации и автокатализа.
4. Разработана масштабируемая система выделения и очистки рекомбинантного химозина, позволяющая получать рекомбинантный химозин с выходом в 60%. Полученный фермент

отвечает всем требованиям по безопасности, в том числе по отсутствию хозяйской ДНК и является подходящим для крупномасштабного технологического производства.

5. Разработан и получен штамм-продуцент *P. pastoris* с системой интеграции гена в хромосому дрожжей позволяющий получать рекомбинантный химозин белухи. Аминокислотные замены K221M и K295Q ведут к снижению удельной молокосвертывающей активности химозина.

6. Коэкспрессия спласированного варианта транскрипционного фактора sHAC1 в *P. pastoris* позволяет увеличить уровень биопroduкции рекомбинантного химозина на 50% при использовании P_{AOX1} - промотора.

7. Внутриклеточный баланс НАДН/НАД⁺ изменяется при коэкспрессии транскрипционного фактора sHAC1 в *P. pastoris*.

Личный вклад соискателя

Автором был лично проведен комплекс работ по созданию и отработке методик очистки рекомбинантной ФЛА2 из культуральной жидкости *P.pastoris*; разработана методика очистки антикоагулянтной ФЛА2 из яда *Naja haje* и разработана масштабируемая методика очистки рекомбинантных химозинов быка и белухи из культуральной жидкости *P.pastoris*; определены физико-химические и биохимические свойства ФЛА2 и химозина; проведён отбор и селекция высокопродуктивных клонов штаммов-продуцентов рекомбинантного химозина; разработаны и апробированы подходы для выделения метаболомных фракций *P.pastoris* с последующим анализом. Автором лично были проведены эксперименты *in vitro*. Автор внёс вклад в постановку научных задач, разработку плана экспериментов, а также в последующий анализ и интерпретацию полученных данных.

На защиту вынесены положения и результаты экспериментов, где роль автора была определяющей.

Степень достоверности полученных результатов обеспечена за счет использования в исследовании современных методов биохимии и молекулярной биологии. Эксперименты проводились независимо друг от друга, с использованием положительных и отрицательных контролей. Исследование подтверждено воспроизводимостью значений измерений. Полученные данные проанализированы с использованием современных методов статистической обработки.

Финансовая поддержка

Часть результатов получена при поддержке Центра компетенций НТИ «Молекулярная инженерия в науках о жизни» (договор №70-2021-00304). Часть результатов получена при поддержке программы министерства науки и высшего образования РФ по развитию генетических технологий (соглашение № 075-15-2021-1071).

Публикации и апробация работы

По материалам диссертационной работы опубликовано 8 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Scopus/Web of Science, 6 тезисов докладов на международных и российских конференциях, получено 4 патента.

Отдельные результаты диссертационной работы были представлены на нескольких конференциях, таких как: IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» (2019 г.); 12-ая конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применение» (2019 г.) XXXIX Международная научно-практическая конференция «Химия, физика, биология» (2021 г.); 13-ая конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применение» (2023 г.); XI Российский симпозиум «Белки и пептиды» (2024 г.).

Структура и объем работы

Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы и список опубликованных работ по теме диссертации. Работа изложена на 121 странице, содержит 13 таблиц и 36 рисунков. Список литературы включает 187 ссылок.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы посвящен основным знаниям, изложение которых позволяет понять представленные результаты диссертационной работы. В первом разделе описывается экспрессионная система *P. pastoris* и основные механизмы, лежащие в основе продукции рекомбинантных белков в данной экспрессионной системе.

Вторая часть обзора описывает секреторные фосфолипазы A2, в частности змеиные секреторные ФЛА2, а также ФЛА2, используемые в промышленных приложениях.

Третья часть обзора посвящена химозину и другим молоко-свертывающим ферментам, а также структурно-функциональным детерминантам протеолитического расщепления к-казеина.

1.1. Экспрессионная система *P. pastoris* и её особенности

Метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* (современное название, начиная с 1995 года *Komagataella phaffii* [1]) приобрели популярность и широко используются в качестве «клеточной биофабрики» для экспрессии рекомбинантных белков.

Дрожжи *P. pastoris* являются непатогенными, облигатно аэробными, почкующимися дрожжами. Штаммы *P. pastoris* гаплоидны, половой процесс и образование аскоспор происходит только при нехватке питательных веществ. Данный вид является метилотрофным, так как может расти, используя метанол в качестве единственного источника углерода и энергии. *P. pastoris* не репрессируется глюкозой (Крэбтри-отрицательные дрожжи), что позволяет их клеткам относительно быстро вырастать до высоких плотностей. Время удвоения составляет 2-3 часа при росте на глюкозе или глицерине при температуре 25-30°C [2].

P. pastoris — одноклеточный микроорганизм, преимуществами которого являются высокие уровни экспрессии рекомбинантных белков, простота крупномасштабного культивирования и низкие затраты на культивирование [3,4]. Плотность его клеток может достигать 130 г/л при промышленном производстве, а выход целевого рекомбинантного белка может достигать десятков граммов на литр. Использование экспрессионной системы *P. pastoris* позволяет продуцировать белки как внутриклеточно, и вне клетки. Геном и транскриптом *P. pastoris* хорошо изучен, экспрессионная система *P. pastoris* хорошо справляется с фолдингом белков и посттрансляционными модификациями, в отличие от системы экспрессии *E.coli*.

Еще одним преимуществом экспрессионной системы *P. pastoris* является наличие строгого регулируемого промотора алкогольоксидазы 1 (P_{AOX1}), позволяющему эффективно продуцировать белок в большом количестве [5]. Продукция белков в системе *P. pastoris* получила статус общепризнанно безопасного производства (GRAS), что позволяет производить также безопасные терапевтические белки, применимые в медицине и пищевой промышленности [6]. Также *P. pastoris* имеет собственную систему гликозилирования, что позволяет продуцировать гликопротеины. Олигосахаридные цепи, добавляемые к белкам после трансляции, состоят из остатков маннозы [7,8]. Таким образом, сегодня платформа *P. pastoris* считается «универсальным решением» для регулярного производства рекомбинантных белков как в лабораторных, так и в промышленных масштабах [9].

Интерес к метилотрофным дрожжам и к *P. pastoris* возник в конце 60-х годов с началом изучения, в частности, биотехнологического производства биомассы из нефтепродуктов. В последующем, после Нефтяного кризиса 1973 года, потенциальная рентабельность биопроцессов производства кормового белка из нефти на основе микроорганизмов снизилась, однако возрос интерес к метилотрофным дрожжам, как к биотехнологической платформе. Последующие этапы развития платформы, такие как расшифровка генома [10,11], протеома [12], разработка систем геномного редактирования [13] только упрочили их положение [14].

Хотя *P. pastoris* во многом сходна с «традиционными» дрожжами *S. cerevisiae*, для этих дрожжей характерен целый ряд существенных отличий, которые не только открывают новые возможности, но и создают определенные затруднения при генетических манипуляциях и создании продуцентов целевых белков. Рекомбинантные клоны, полученные путем геномной интеграции, генетически стабильны, однако зачастую трансформанты. Даже клоны, полученные в одном и том же эксперименте, имеют высокую вариабельность и обладают значительными физиологическими отличиями [15]. *P. pastoris* легко подвергается различным генетическим и генно-инженерным манипуляциям, таким как случайный мутагенез, генетическая трансформация интегративными и автономно-реплицирующимися векторами [16-18], генетическая модификация с использованием Cre-Lox системы для сайт-специфической рекомбинации [19]. Тем не менее, существующие подходы не позволяют преодолеть проблемы клональной вариабельности и ряд других имеющихся недостатков этой системы. В результате приходится применять длительные процедуры скрининга для поиска клонов с оптимальными параметрами роста и продуктивности [20]. Одна из причин клональной вариабельности – система негомологичного соединения концов (NHEJ), которая обеспечивает интеграцию чужеродной ДНК в «нецелевых» местах [21]. Клональная вариабельность – ключевой фактор, сдерживающий широкое использование *P. pastoris* для получения многих ценных низкомолекулярных соединений методами метаболической инженерии [22].

Другие актуальные задачи в оптимизации метилотрофных дрожжей как «клеточной платформы» для получения целевых белков и ценных низкомолекулярных соединений состоят, например, в оптимизации центрального метаболизма. Это помогает максимально эффективно использовать доступные клеточные ресурсы для обеспечения энергетически и метаболически «невыгодных» клетке процессов сверхсинтеза чужеродных белков, а также метаболитов и инженерии процессов биосинтеза и экспорта гетерологичных белков для преодоления «узких мест» их трансляции, фолдинга, секреции [23,24].

Создание клеточной биофабрики на базе метилотрофных дрожжей сопряжено с набором объективных трудностей. Синтез *de novo* рекомбинантного белка – метаболически и энергетически затратный процесс, организм дрожжей максимально его избегает, так как это является эволюционным бременем для выживания. Создание и секреция новых рекомбинантных белков забирает энергию от основных целей роста, поддержания и размножения клетки. Создание эффективной экспрессионной системы требует перепрограммирования генетической программы *P. pastoris* с целью отхода от основных эволюционных целей (приспособленность, рост, размножение, выживание) к целям эффективной транскрипции, трансляции целевого белка; его фолдинга и секреции во внешнее пространство; и, наконец, биосинтеза базовых необходимых компонентов целевого секретируемого белка (Рис. 1А). На каждом из отдельных вышеперечисленных

этапов существует свой лимитирующий дефицит, определяющий скорость каждого из процессов транскрипции, трансляции, фолдинга и секреции (**Рис. 1Б**). Создание эффективной экспрессионной системы на базе *P. pastoris* требует ликвидации отдельных дефицитов за счёт глубокой генетической модификации системы и оптимизации биопроцессов при культивировании [25].

Отдельной проблемой при сверхэкспрессии рекомбинантного белка является неправильный фолдинг белка и стресс клетки, связанный с неправильно свернутыми белками. Переработка неправильно свернутого белка снижает энергетическую эффективность клетки и активирует целые каскады реакций на стресс, вызванный неправильно свернутыми(денатурированными) белками [26,27].

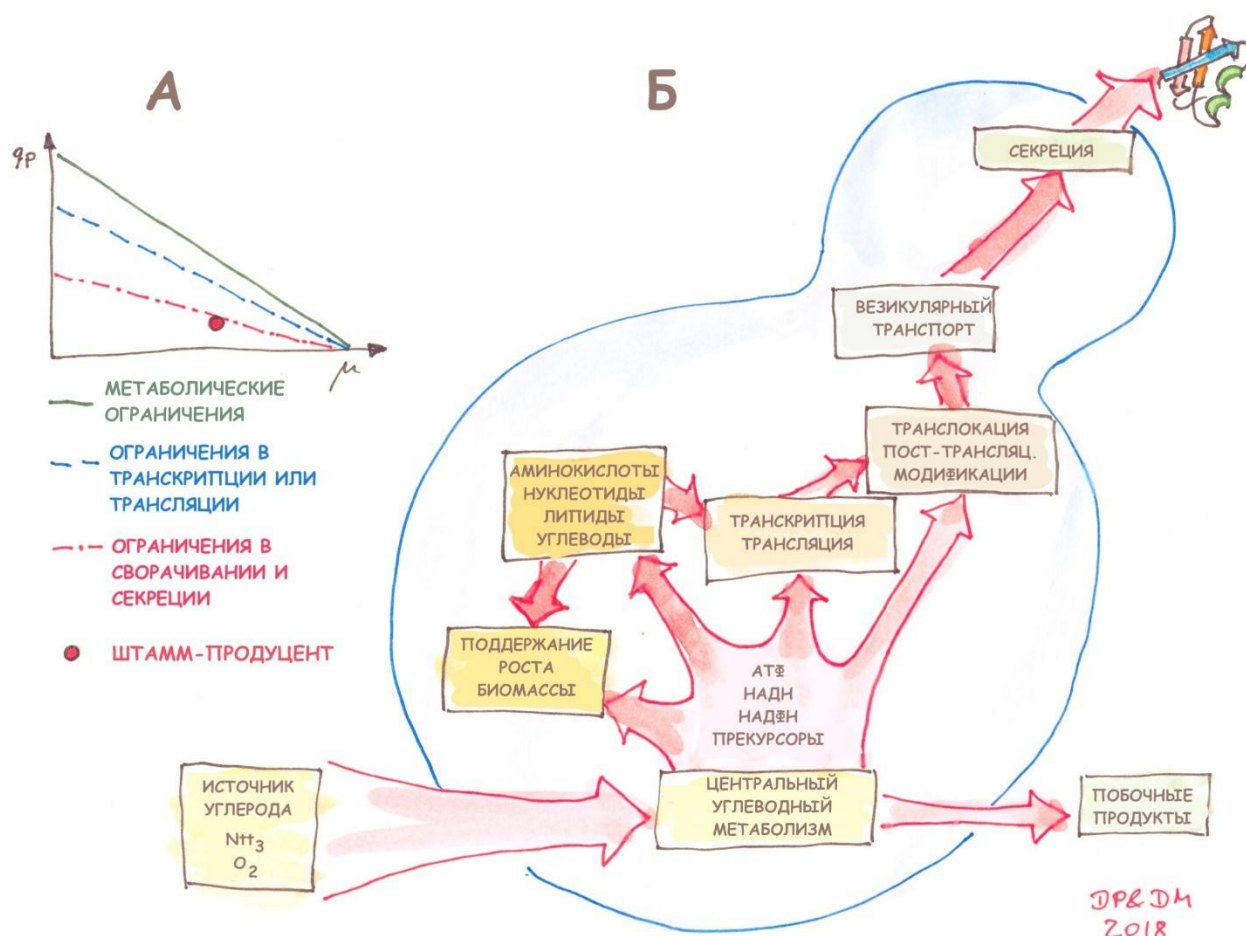


Рис. 1. Схематическое изображение лимитирующих стадий при биопродукции рекомбинантных белков в *P. pastoris* [25]. (А) Эффективность отдельного штамм-продуцента определяется балансом между скоростью роста (μ) и биопродукцией рекомбинантного белка (q_P), которые в свою очередь лимитированы ограничениями в скорости сворачивания и секреции, ограничениями в транскрипции и трансляции, метаболическими ограничениями. (Б) Основные направления баланса метаболитов и энергии в процессе биосинтеза рекомбинантного белка.

В то же время, бурный прогресс геномных и постгеномных исследований метилотрофных дрожжей [11,28-30] и разработка для данных видов методов высокоточного геномного редактирования [13] позволяют надеяться, что для решения многих проблем

эффективной продукции рекомбинантных белков будут найдены рациональные подходы, которые заметно упростят и ускорят получение штаммов с заданными параметрами роста и продуктивности.

1.1.1. Используемые промоторы для масштабируемого получения целевых белков в *P. pastoris*

Существует несколько основных промоторов, используемых для транскрипции генов целевых белков в *P. pastoris*. В качестве индуцируемого промотора используют промотор алкоголь-оксидазы 1 (P_{AOX1}), который индуцируется метанолом и является наиболее используемым промотором в системе *P. pastoris* [16]. Для постоянной экспрессии как правило используется конститутивный промотор глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (P_{GAP}) [31]. Промотор P_{AOX1} обеспечивает строго регулируемую экспрессию, характеризующуюся почти нулевой транскрипционной активностью в условиях репрессии и чрезвычайно высокой активностью при индукции метанолом [5].

Однако токсичность и воспламеняемость метанола, а также повышенное потребление кислорода и выделение тепла индуцированными культурами с высокой плотностью клеток накладывают определенные ограничения на использование метанол-регулируемых промоторов [20]. P_{GAP} обеспечивает конститутивную экспрессию на уровне, на том же уровне как P_{AOX1} , но при этом сокращает длительность и сложность процессов культивирования [32]. Однако из-за невозможности разделения фаз роста культуры и продукции P_{GAP} не годится для экспрессии токсичных для клетки белков. Для тонкой «настройки» экспрессии разработаны варианты P_{AOX1} и P_{GAP} с «заданной» транскрипционной активностью [33]. Коллекция доступных природных и синтетических промоторов с различными регуляторными свойствами и степенями экспрессии была значительно расширена в последнее время [28]. Она включает альтернативные промоторы, индуцируемые метанолом [34], а также другие конститутивные или репрессируемые промоторы [35].

В настоящее время механизмы работы метанол-индуцируемого промотора P_{AOX1} изучены не до конца, и некоторые аспекты активации и передачи сигнала от различных рецепторов остаются неясными [36]. Предполагается, что возможную роль сенсора уровня метанола выполняет белок Wsc. В экспрессионной системе *P. pastoris* реакция P_{AOX1} на метанол положительно регулируется каскадом факторов транскрипции, включая Mit1, Mxr1 и Prm1, которые связываются с различными сайтами связывания промотора P_{AOX1} .

При обнаружении метанола в среде начинается синтез Prm1, который активирует как себя самого, так и Mit1 [36]. В свою очередь, Mit1, обеспечивая механизм обратной связи, подавляет дальнейшую продукцию Prm1, одновременно способствуя экспрессии гена AOX1 (Рис. 2). Транскрипционный фактор Mxr1 тесно связан с репрессией P_{AOX1} , вызванной сменой источника углерода с глюкозы на метанол. Когда в качестве источника углерода используется метанол, Mxr1 переносится из цитоплазмы в ядро, что приводит к дерепрессии P_{AOX1} . В этот момент Prm1 активирует свою собственную экспрессию и экспрессию Mit1, тем самым вызывая сильную активацию P_{AOX1} . Силу промотора P_{AOX1} можно улучшить посредством сверхэкспрессии Mit1, однако Mit1 оказывает ингибирующее действие на экспрессию Prm1 по принципу обратной связи. Таким образом, уровень экспрессии Mit1 нуждается в тонкой настройке для достижения оптимальной

экспрессии генов, контролируемых P_{AOX1} . Кроме того, функционирование P_{AOX1} контролируется двумя репрессорами — Nrg1 и C4qzn3.

Были разработаны и протестированы различные комбинированные стратегии применения данной системы. Так, были созданы штаммы с нокаутами трех транскрипционных факторов: Δ Mit1, Δ Mxr1 и Δ Prm1 [37]. Метанол-индуцируемая коэкспрессия Mxr1 под промотором P_{AOX2} также позволяет увеличить продукцию тестового секретируемого фрагмента антитела на 98% в случае индукции метанолом и на 298% в случае деплеции глицерина в среде [38].

Использование ортологичных промоторов из видов других метилотрофных дрожжей, таких как *Hansenula polymorpha*, также может быть способом увеличения продукции целевого белка. Так, при индукции метанолом промотор гена Hr_{MOX} достиг сходного с P_{AOX1} уровня экспрессии, в то время как промотор Hr_{FMD} превзошел уровень экспрессии при использовании промотора P_{AOX1} в три раза для маркерного белка [39].

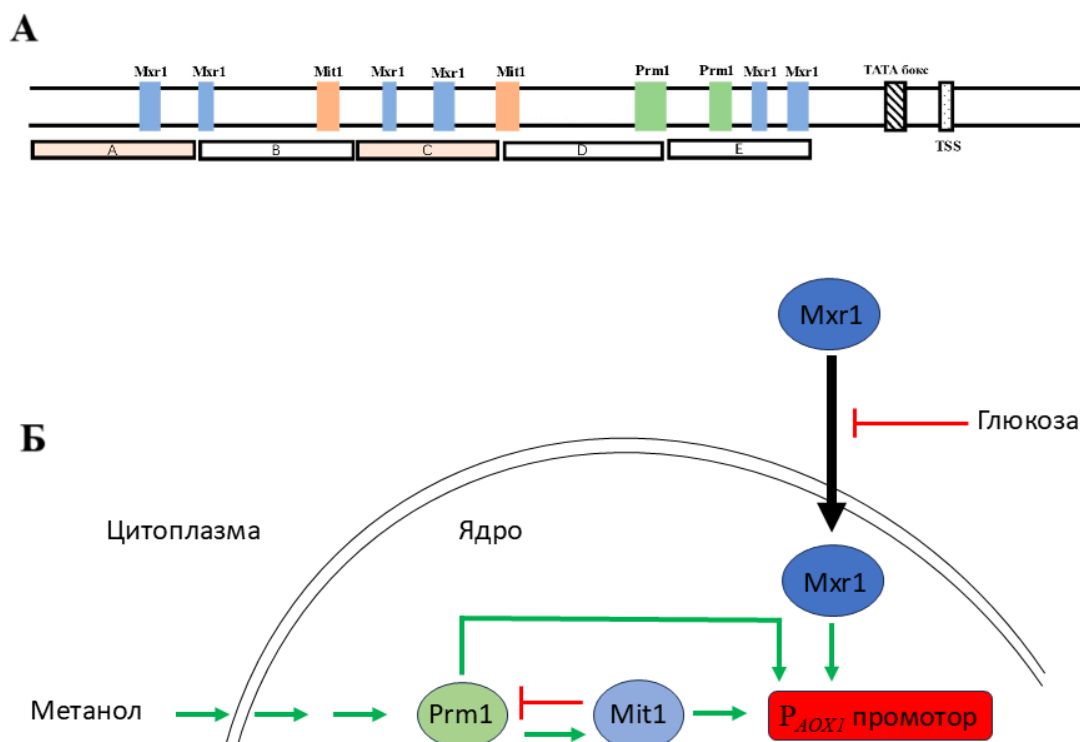


Рис. 2. Регуляция P_{AOX1} промотора. А – структура регуляторных участков P_{AOX1} промотора, активируемых транскрипционными факторами Mxr1, Prm1, Mit1. TSS – сайт старта трансляции. Б – схема активации P_{AOX1} промотора. На схеме отображены три транскрипционных фактора, активирующих транскрипцию P_{AOX1} промотора: Mxr1, Prm1, Mit1. Mxr1 находится в цитоплазме при росте на глюкозе, при истощении глюкозы Mxr1 перемещается из цитоплазмы в ядро и связывается ДНК. Mit1 и Prm1 так же необходимы для активации P_{AOX1} промотора [37]. Все три транскрипционных фактора Mxr1, Mit1, Prm1, являются ДНК-связывающими белками, имеющие в структуре доменов «цинковые пальцы».

Один из вариантов изменения активности промоторов – направленное изменение и редактирование участков связывания с транскрипционными факторами. Для сканирования и определения участков связывания транскрипционных факторов с последующим созданием полусинтетических промоторов с улучшенными свойствами возможно использовать программу «Genomatix Suite». Так был отредактирован промотор P_{ADH2} для увеличения уровня экспрессии [40].

Возможно использование специализированного программного обеспечения, например, программы «MatInspector» для обнаружения отдельных сайтов связывания транскрипционных факторов. Так, на основе промотора P_{GI} был создан полусинтетический промотор P_{GI-3} , активируемый низкими концентрациями глюкозы [41].

Экспрессия факторов транскрипции Mit1, Prm1 и Mxr1 под контролем конститутивных промоторов GAP позволяет активировать промотор P_{AOX1} независимо от метанола [42]. В тоже время, используя метанол-индуцируемые промоторы с неполной дерепрессией позволяет продуцировать рекомбинантные белки на среде с глицерином и глюкозой, например под контролем ортологичного промотора Hр P_{MOX} метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* [43] (Табл. 1).

Табл. 1. Репрессия и дерепрессия для различных промоторов пути MUT у метилотрофных дрожжей в зависимости от источника углерода.

Вид метилотрофных дрожжей	Промотор	Влияние глюкозы, этанола	Влияние глицерина	Влияние метанола	Эффективность индукции глицерином и метанолом
<i>P. pastoris</i>	<i>AOX1</i>	репрессия	репрессия	индукция	Репрессия
	<i>AOX2</i>	репрессия	репрессия	индукция	Репрессия
<i>H. polymorpha</i>	<i>MOX</i>	репрессия	дерепрессия (~ 60–70%)	индукция	индукция (~100%)
	<i>FMD</i>	репрессия	дерепрессия (~60%)	индукция	
<i>C. boidinii</i>	<i>AOD1</i>	репрессия	дерепрессия (~3–30%)	индукция	индукция (~90%)
	<i>FLD</i>	Нет активности	дерепрессия (~20%)	индукция	индукция (~70%)
	<i>FDH</i>	репрессия	Нет активности	индукция	индукция (~30%)
	<i>DAS</i>	репрессия	дерепрессия (~2%)	индукция	индукция (~70%)
<i>P. methanolica</i>	<i>MOD1</i>	репрессия	дерепрессия (~60–70%)	индукция	индукция (~100%)
	<i>MOD2</i>	репрессия	Нет активности	индукция	индукция (~100%)
	<i>FLD</i>	Нет активности	дерепрессия (~20%)	индукция	индукция (~70%)

Компания «Amgen» разработала систему автоиндукции для промотора P_{AOXI} , а также питательную среду для автоиндукции *P. pastoris* при 48-часовом росте [44]. Данная система обладает преимуществами (отсутствие необходимости смены среды при переходе с глюкозы на метанол), что удобно при селекции, и недостатками (удвоенное содержание YNB и биотина).

Также разработаны системы безметанольной индукции P_{AOXI} промотора, работа которых осуществляется за счёт глубокой модификации P_{AOXI} промотора и его регуляторов [45,46].

1.1.2. Используемые препролидерные последовательности для эффективной секреции рекомбинантных белков в *P. pastoris*

Способность эффективно секретировать целевой белок при низком уровне эндогенного белкового экспорта является важным технологическим преимуществом системы *P. pastoris* [47]. Для создания эффективной системы сворачивания и секреции рекомбинантного белка в *P. pastoris* необходима подобранная соответствующим образом препролидерная последовательность отщепляемого сигнального пептида (обычно 15-60 аминокислот), обеспечивающего транслокацию рекомбинантного белка в ЭР. Сигнальный пептид расположен на N-конце белка и содержит три участка: положительно заряженный N-концевой участок (1-5 аминокислот), гидрофобный участок способный к формированию альфа-спиральных участков (7-15 аминокислот) и сильно заряженный C-концевой участок (3-7 аминокислот), несущий сайт распознавания протеазы [48].

Помимо природных сигнальных последовательностей секреции, различные гетерологичные сигнальные пептиды также успешно применяются для секреторной экспрессии в *P. pastoris* [49,50]. Так, часто используют сигнальные последовательности инвертазы 2 (SUC-2) из *S. cerevisiae*, последовательность кислой фосфатазы (PHO1) из *P. pastoris*. Нельзя не отметить использование в качестве эффективного варианта препролидерной последовательности куриного лизоцима [51,52] и K1 киллер токсина [53,54].

Среди сигналов секреции для продукции рекомбинантных белков в *P. pastoris* чаще других используется препролидер α -фактора спаривания *Saccharomyces cerevisiae* (ppMF α 1) [55,56]. Сигнальный пептид MF α состоит из пререгиона (19 аминокислот), затем следует прорегион (66 аминокислот), включая C-концевой двухосновный сайт расщепления эндопептидазой Kex2 (Lys-Arg) [57]. Пререгион имеет типичную сигнальную структуру и направляет транслокацию транслированного белка из цитоплазмы в просвет ЭР.

Процессинг секреторной сигнальной последовательности проходит в три этапа: в эндоплазматическом ретикулуме сигнальные пептидазы удаляют пре-последовательность; затем эндопептидаза Kex2 расщепляет просегмент в области Lys-Arg; в аппарате Гольджи пептидаза Ste13 сегмент Glu-Ala [58]. Предполагается, что про-регион облегчает надлежащий транзит рекомбинантного белка из ЭР в аппарат Гольджи [59].

Оптимизации секреции с использованием α -фактора посвящено множество работ [3,24,47]. В настоящее время ведутся работы по системному улучшению и мутагенезу α -фактора с целью увеличения секреции рекомбинантных белков, за счёт понимания взаимодействий между α -фактором, рекомбинантным целевым белком и секретирующим комплексом клетки [60,61]. Используется несколько подходов для улучшения секреции за

счет модификации α -фактора: оптимизация кодонов α -фактора, направленная эволюция пропептида, мутагенез с большими делециями, конструирование химерных сигнальных последовательностей на основе MF α . В тоже время, распространен и подход с использованием комплексных библиотек препролидерных пептидов для перебора оптимальных вариантов по продуктивности рекомбинантного белка [62,63].

1.1.3. Модификация фолдинга белков в экспрессионной системе *P. pastoris*

Одним из эффективных способов увеличения эффективной продукции рекомбинантных белков в экспрессионной системе *P. pastoris* является устранение издержек и лимитирующих стадий, связанных со сворачиванием и секрецией белка. Устранение лимитирующих стадий, формирующих эффект «бутылочного горлышка», достигается за счёт коэкспрессии молекулярных шаперонов и шаперонинов [64,65]. Примерами таких белков могут являться шапероны KAR2/Bip, протеин-дисульфид изомеразы PDI1, эндоплазматическая тиол-оксидаза Ero1.

KAR2/BiP один из белков-шаперонов семейства Hsp70 связывается с денатурированными белками и вовлекается в регуляцию UPR в эндоплазматическом ретикулуме [66], протеин-дисульфид изомеразы PDI1 катализирует процесс формирования дисульфидных связей [67], в то время как тиол-оксидаза Ero1 участвует в обратном процессе и в случае формирования неправильных дисульфидных связей позволяет повторно их окислить [68].

Дисфункция ЭР, связанная с неспособностью справиться с потоком синтезируемых белков, называется стрессом ЭР и сопровождается накоплением развернутых и неправильно собранных белков в ЭР. В ответ на стресс ЭР в клетках дрожжей запускается программа индукции цитопротекторных генов, так называемый ответ на неправильно свернутые белки (unfolded protein response, UPR) [69]. Внутриклеточный сигнальный путь UPR был первоначально выявлен в ходе передовых исследований с использованием дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в качестве модельного организма. Ire1 — это трансмембранный белок типа I, резидентный в ER, который обладает двойной ферментативной активностью, протеинкиназной и эндорибонуклеазной. При стрессе ЭР происходит самосборка олигомеров Ire1 с последующим автофосфорилированием, что приводит к активации Ire1 в качестве РНКазы, которая сплайсирует транскрипт гена HAC1 (Рис. 3). Сплайсированная форма мРНК HAC1 затем транслируется в фактор транскрипции, который индуцирует ряд генов, таких как KAR2, PDI1 и ERO1, многие из которых поддерживают функции ER и пути секреции белка.

Показано, что коэксперсия гена HAC1 позволяет улучшить продукцию рекомбинантных белков (как и секретируемых, так и мембран-связанных) в различных штаммах дрожжей [27]. Экспрессия транскрипционного фактора HAC1 позволяет уменьшить уровень неправильного фолдинга белков при сверхэкспрессии в *P. pastoris* за счет регуляции экспрессии шаперонов [70].

Некоторые аспекты изменения клеточного состояния при коэкспрессии HAC1 хорошо изучены. Например, хорошо исследованы изменения уровня транскрипции отдельных генов [71], изменение протеома [72]. Метаболические изменения, происходящие

при коэкспрессии HAC1, исследованы хуже, несмотря на значительные изменения в клеточном метаболизме в этих условиях.

Коэкспрессия комплекса шаперонов KAR2/BiP, PD11, Ero1 и регулятора HAC1 широко используется в экспрессионной платформе *P. pastoris* и хорошо зарекомендовала себя во множестве случаев [45,65,73,74]. Однако данная модификация системы фолдинга белков не является универсальным и окончательным решением. В данный момент разрабатываются альтернативные варианты улучшения системы сворачивания и секреции для метилотрофных дрожжей [64,75].

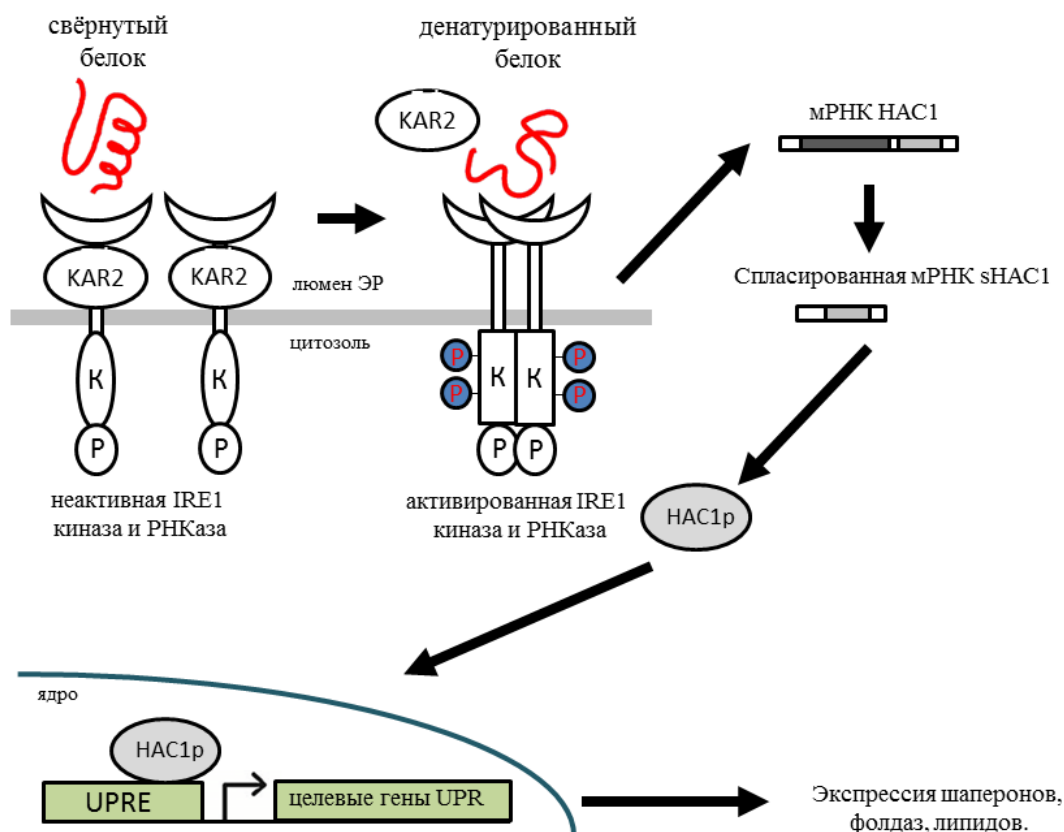


Рис. 3. Механизм активации транскрипции генов сплайсированным вариантом транскрипционного фактора HAC1 под влиянием ответа на неправильно свернутые белки [27]. В состоянии покоя Ire1p присутствует в виде мономера, связанного с белком Kar2/Bip. В случае возникновения стресса на денатурацию белков происходит диссоциация комплекса Ire1p-Kar2 с формированием кластеров Ire1p на мембране ЭР. Прямое взаимодействие денатурированных белков активирует аутофосфорилирование киназных доменов Ire1, что в свою очередь приводит к активации эндорибонуклеазных доменов. эндорибонуклеазных домены Ire1 удаляют интрон в РНК *HAC1* с образованием сплайсированного варианта *sHAC1*. Белок HAC1 активирует транскрипцию генов, кодирующих шапероны, фолдазы и белки синтеза липидов, что в свою очередь, и формирует ответ клетки на неправильно свернутые белки (UPR).

1.1.4. Биоэнергетика и состояние клеточного метаболизма при биопродукции рекомбинантных белков в *P. pastoris*

Для правильного функционирования экспрессионной системы *P. pastoris* важно метаболическое состояние, поддержание эффективного энергетического баланса для создания новых белков, а также наличие достаточного количества энергии и отдельных компонентов для биосинтеза аминокислот и рекомбинантных белков. Один из нерешенных фундаментальных вопросов состоит в том, как отрегулировать биопродукцию рекомбинантных белков таким образом, чтобы не возникало эффекта «бутылочного горлышка» и дефицита отдельных компонентов и энергетических эквивалентов (НАДН/НАД⁺, АТФ).

Исследование и характеристика отдельных компонентов метаболома *P. pastoris* продвинулись в последнее десятилетие. Разработаны методы стандартизации для оценки концентрации отдельных компонентов [76]. Была проведена количественная оценка пула аминокислот в анаэробных и аэробных условиях на различных субстратах [77]. При продукции рекомбинантных белков в *P. pastoris* отмечено снижение пула аминокислот по сравнению с контрольным штаммом. Данное снижение коррелирует с изменением соотношений в аминокислотном составе в тотальном клеточном белке, при этом существенной корреляции с аминокислотным составом рекомбинантного белка выявлено не было. Получена оценка для энергетических затрат при *de novo* синтезе отдельных аминокислотных компонентов [78,79].

Проведены попытки выявить изменения метаболомного состава, связанного с оценкой UPR при продукции рекомбинантного белка. Кроме повышения внутриклеточной концентрации арабитола в ответ на стресс при UPR, других значимых корреляций отмечено не было [80]. Однако сам переход к состоянию, при котором происходит UPR, приводит к трансляционному аресту, что не может не сказаться на уровне продукции рекомбинантного белка в *P. pastoris* [81].

Известны варианты изменения метаболизма *P. pastoris* в области изменения баланса НАДН/НАД⁺. Так, например коэкспрессия рекомбинантной НАД⁺-зависимой формиат-дегидрогеназы из *Candida boidinii* позволила увеличить восстановительный пул НАДН в два раза [82]. Использование в аэробных условиях экспрессии формиат-дегидрогеназы сказывается на продукции метаболитов в восстановленной форме, в том числе и на конечном балансе этанола-ацетата.

1.2. Фосфолипаза A2

Фосфолипазы A2 (ФЛА2, ЕС 3.1.1.4) группа ферментов, катализирующая разрушение эфирной связи в положении sn-2 фосфолипидов, высвобождающие при этом свободные жирные кислоты и соответствующие лизофосфолипиды [83]. ФЛА2 катализируют разрушение фосфолипидов с одновременной продукцией ненасыщенных жирных кислот и лизофосфолипидов, при этом жирные кислоты являются предшественником различных липидных медиаторов, в которые входят простагландины, лейкотриены, тромбоцит-активирующие факторы и множество других соединений.

ФЛА2 могут участвовать в регуляции состава мембран через изменения состава фосфолипидов, регуляции липидной среды путем тонкой настройки баланса между насыщенными и ненасыщенными свободными жирными кислотами. Кроме того, ФЛА2 участвуют в регуляции выработки энергии через высвобождение свободных жирных кислот в качестве субстратов β -окисления.

Суперсемейство ФЛА2 подразделяется на 16 групп, каждая из которых добавлялась хронологически по мере изучения ферментов. На основании функциональной активности ферментов выделяют шесть подсемейств ФЛА2: секреторные (группы I, II, III, V, IX, X, XI, XII, XIII и XIV), цитозольные (группа IV) [84], кальций-независимые (группа VI), ацетилгидролазы фактора активации тромбоцитов (группы VII и VIII) [85], лизосомальные (группа XV) и ФЛА2, специфичные для жировой ткани (группа XVI).

Секреторные, цитозольные и кальций-независимые ФЛА2 играют ключевую роль в механизмах воспаления и развитии аутоиммунных патологий. В свою очередь, ацетилгидролазы фактора активации тромбоцитов, а также лизосомальные и жировые ФЛА2 оказывают влияние на процессы ожирения и атеросклероза.

Классификация семейства ФЛА2 на 16 групп осуществляется с учетом различных характеристик, включая тип организма, степень гомологии аминокислотных последовательностей, молекулярную массу, количество и конфигурацию дисульфидных мостиков, а также другие структурные и функциональные особенности [86,87].

1.2.1. Структура секреторных фосфолипаз A2

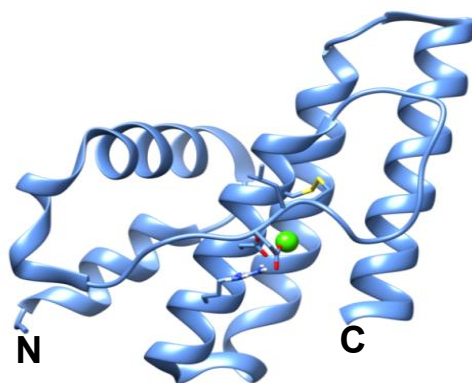


Рис. 4. Трехмерная кристаллическая структура секреторной фосфолипазы A2 *Streptomyces violaceoruber* (PDB ID 1IT4).

Секреторные фосфолипазы A2 (сФЛА2) содержат каталитический сайт, Ca^{2+} -связывающую петлю, сигнальный пептид для секреции, а также двенадцать остатков цистеина, которые образуют шесть внутримолекулярных дисульфидных мостиков с одним или двумя переменными дисульфидными мостиками [88,89]. Каталитический механизм сФЛА2 использует гистидин диады His47-Asp48 в качестве первичного каталитического остатка. С помощью остатка аспартата этот остаток гистидина поляризует молекулу воды, которая затем атакует эфирную связь в положении sn-2 фосфолипида. Ca^{2+} играет прямую роль в этом катализе, поскольку он стабилизирует интермедиат.

Всего выделено 16 групп сФЛА2, которые различаются по первичной структуре и особенностям дисульфидных мостиков. Эти ферменты относятся к глобулярным белкам, несмотря на вариации в аминокислотных последовательностях, их каталитический механизм и структура доменов остаются схожими (**Рис. 4**).

На сегодняшний день установлены кристаллические структуры множества сФЛА2, включая ферменты микробного и растительного происхождения, компоненты яда кобр, а также панкреатические ферменты человека и млекопитающих.

Функциональная активность сФЛА2 связана с их способностью взаимодействовать с липидными мембранами. Эти ферменты проявляют активность на границе раздела фаз, что является их характерной чертой. Представители группы IA способны гидролизовать липиды-цивиттерионы. Мембранно-связывающий участок этих ферментов формируется гидрофобными аминокислотами, такими как Tyr-3, Trp-61, Tyr-63 и Phe-64, что позволяет им проникать в липидный би-слой и получать доступ к субстрату [90].

Известно, что замена аминокислотных остатков в мембранно-связывающем участке может значительно повлиять на свойства ФЛА2. Например, мутация Tyr-31 в ФЛА2 группы V приводит к потере способности связываться с фосфолипидными везикулами [91]. Аналогично, замена Tyr-67 в группе X снижает эффективность связывания в восемь раз, замедляя процесс гидролиза [92].

При взаимодействии с анионными фосфолипидными мембранами сФЛА2 используют как гидрофобные, так и положительно заряженные аминокислоты. В группе II за связывание отвечают Arg-6 и Arg-10, что определяет специфичность ферментов этой группы к анионным везикулам [93]. В отличие от них, сФЛА2 пчелиного яда (группа III) не задействуют положительно заряженные аминокислоты в этом процессе. Исследования показали, что замена пяти положительно заряженных остатков на нейтральные глутамины меняет взаимодействие ФЛА2 с анионными везикулами, а их замена на отрицательно заряженные глутаматы снижает способность связывания в 3000 раз, подчеркивая важность электростатического взаимодействия [94].

ФЛА2 из групп I, II, V и X характеризуются наличием трех удлинённых α -спиралей, двух β -тяжей и консервативного кальций-связывающего участка. В отличие от них, представители XI группы (растительные сФЛА2) не содержат β -тяжей, а группа XIV обладает уникальной пространственной структурой. Группа III отличается особой доменной организацией, тогда как ФЛА2 XIIA имеют специфическую конфигурацию кальций-связывающей петли.

1.2.2. Фосфолипазы A2 яда змей

Все сФЛА2 яда змей принадлежат к группам IA и IIB секретируемых протеиназ. Группа IA встречается в ядах *Elaphidae*, для данной группы характерен дисульфидный мостик Cys11-Cys59. Группа IIB встречается в ядах *Viperidae*, для неё характерно образование дисульфидного мостика через Cys50 [95].

В ядах кобр содержится множество ФЛА2 (описано более тысячи ФЛА2 яда змей), большинство из которых обладает цитотоксическим действием. Однако есть ФЛА2, обладающие специфическим кардиотоксическим, нейротоксическим, миотоксическим, антикоагулянтным или прокоагулянтным действием [96]. Специфичность действия ФЛА2 из

яда змей объясняется сродством к определенным белкам, гликопротеинам на поверхности клеток [97]. Если же у ФЛА2 нет специфической белковой мишени, то, как правило, она обладает неспецифичным цитотоксическим эффектом. Кроме того, показано, что ФЛА2 может одновременно обладать как нейротоксическим, так и антикоагулянтным действием [98].

Фармакологическая активность ФЛА2 как токсинов не зависит напрямую от ферментативной активности. В тоже время высокая фосфолипазная активность позволяет разрушать мембраны в окружении мембранного белка-мишени и усиливать токсический эффект [97]. Существуют механизмы действия, обусловленные прямым агонистическим/антагонистическим действием ФЛА2, не связанным с фосфолипазной активностью. При этом гидролиз фосфолипидов сохраняется, однако не оказывает существенного фармакологического эффекта [99]. ФЛА2 из яда змей являются кальций-зависимыми ферментами [100]. Кроме того, высококонсервативный остаток His48 необходим для осуществления гидролиза фосфолипидов. Алкилирование His48 (например, аликилирование пара-бромфенацил бромидом) приводит к потере фосфолипазной активности [101].

Наиболее известной ФЛА2 с нейротоксическим действием является β -бунгаротоксин. β -бунгаротоксин состоит из двух субъединиц. Субъединица $\beta 1$ является фосфолипазой, субъединица $\beta 2$ – ингибитором типа Кунитц. β -бунгаротоксин ингибирует пресинаптическую передачу никотинэргических нейронов [102,103]. β -бунгаротоксин также связывается с потенциал-зависимым калиевым каналом Kv1.2 [104]. Однако другие ФЛА2 с нейротоксическим действием могут взаимодействовать с другими мишенями. Так тайпоксин связывается с пентраксином и белком TCBP-49 [105], кротоксин с белком CAPT [106], множество других ФЛА2 связывается с рецептором М-типа (белок PLA2R1) [107]. Тайпоксин (состоит из трех субъединиц α β γ , α и β являются структурно ФЛА2) является наиболее токсичным змеиным токсином, LD50 для него составляет $4,8 \times 10^{-11}$ моль/кг для мыши.

Антикоагулянтные ФЛА2 впервые обнаружены Боффа в 1976 г [108]. Принято разделять ФЛА2 на «сильные» антикоагулянты (ингибируют образование сгустка в концентрации ниже 2 мкг/мл), «слабые» (ингибируют в концентрации 3-10 мкг/мл) и не ингибирующие коагуляцию [109]. К сильным относят ФЛА2 из ядов *Naja nigricollis*, *N.m. mossambica*, а также некоторые ФЛА2 из ядов *Vipera sp.*, *Agkistrogon sp.*, *Crotalus sp.* Существует несколько антикоагулянтных ФЛА2, проявляющих свои свойства в концентрации более 15 мкг/мл. Для антикоагулянтных ФЛА2 показано, что их свойства как антикоагулянтов напрямую не коррелируют с фосфолипазной активностью, но при инактивации фосфолипазной активности антикоагулянтные свойства уменьшаются. Показано, что антикоагулянтная активность ФЛА2 коррелирует со способностью находится в липидном бислое. Фосфолипиды играют роль кофактора при активации фактора X, поэтому в присутствии фосфолипидов активация фактора X и протромбина происходит в 1000 раз быстрее [110]. Общего механизма ингибирования для ФЛА2 яда змей не существует, для каждого отдельного белка он индивидуален. Большинство «сильных» фосфолипаз взаимодействует с фактором Ха. Для «слабых» антикоагулянтных фосфолипаз показано ингибирование энтеротеназного комплекса за счет их прямой ферментативной

активности [111], однако, не исключено и наличие других механизмов ингибирования [112]. Для антикоагулянтных ФЛА2 из яда *Naja nigricollis* и *N.m. mossambica* показана гомология фрагмента аминокислотной последовательности 51-77 с последовательностью фактора Va и тканевого фактора. Показано, что замены Glu-54, Lys-55, Gly-57, Lys-75, Lys-77 сильно снижают антикоагуляционные свойства [112]. На основе этих данных и был предложен механизм, по которому ФЛА2 связывает фактор Ха и расщепляет липиды рядом с ним, не давая образоваться активному протромбиназному комплексу.

1.2.3. Экспрессия генов фосфолипаз A2

На ранних этапах технологического получения сФЛА2 получали из поджелудочной железы свиньи, в качестве побочного продукта при очистке инсулина. Однако по мере того, как развивалась биотехнология, инсулин стали получать рекомбинантным образом, а затем и панкреатическую ФЛА2 [113].

Первыми платформами для экспрессии рекомбинантной свиной ФЛА2 стали штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [88]. Позже удалось успешно синтезировать человеческую секреторную ФЛА2 в клетках *E. coli* [89]. При экспрессии в *E. coli* образовывались тельца включения из-за наличия от шести до восьми дисульфидных связей. Для того, чтобы эффективно работать с экспрессией эукариотического ФЛА2 в *E. Coli* использовались системы с использованием мальтозосвязывающего белка (MBP), тиоредоксина и изомеразы дисульфидной связи белка (DsbC) в качестве слитых полипептидных цепочек. Однако эти системы экспрессии требуют дополнительных шагов для устранения составных белков, следовательно, не являются экономичными для практического использования. Поэтому идеальным решением было бы найти и экспрессировать подходящий прокариотический ФЛА2 в *E. coli*, поскольку он имеет небольшое количество дисульфидных связей.

Формирование значительного количества дисульфидных мостиков является фактором, замедляющим синтез рекомбинантной ФЛА2 и снижающим её секрецию. Для преодоления этой проблемы была проведена оптимизация трёхмерной структуры панкреатической ФЛА2 свиного происхождения, после чего модифицированный вариант успешно экспрессировали в системе *Aspergillus*. Дополнительно в структуре данной рекомбинантной ФЛА2 были внесены аминокислотные замены (N117W и D119Y) в С-концевой области, что позволило улучшить её взаимодействие с мицеллами [114].

В дальнейшем был получен штамм-продуцент на основе *A. niger*, который обеспечивал более высокий уровень выработки рекомбинантной свиной ФЛА2, что сделало возможным его промышленное применение [115]. Впоследствии была создана система экспрессии человеческой ФЛА2 на клетках яичников китайского хомячка (CHO) [116].

Первой ФЛА2, идентифицированной в прокариотах, была ФЛА2 из *Streptomyces violaceoruber* A-2688, почвенной бактерии. Это небольшой белок с молекулярной массой 14 кДа, содержащий две дисульфидные связи и требующий Ca^{2+} для каталитической активности. ФЛА2 из *S. violaceoruber* был успешно проэкспрессирован в *E. coli*.

В целом, экспрессионные системы на основе грибов демонстрируют более высокую продуктивность при получении ФЛА2, а гены грибов эффективнее экспрессируются в рекомбинантных системах [117]. В частности, использование *P. pastoris* зарекомендовало

себя как успешная альтернатива бактериальным системам на основе *E. coli* в промышленном производстве рекомбинантной ФЛА2.

В настоящее время применяются различные подходы для биосинтеза секреторных ФЛА2, в том числе ФЛА2 из *S. violaceoruber* [118]. В 2015 году была описана экспрессионная система на основе *P. pastoris* для получения рекомбинантной сФЛА2 из *Streptomyces violaceoruber*. Также проводились исследования, направленные на повышение продуктивности штамма-продуцента путём увеличения числа копий гена (до 4, 8 и 12), что позволило добиться роста уровня продукции фермента в 1,4 раза [119].

1.2.4. Применение фосфолипаз А2 в биотехнологии

Технологические возможности оптимизации белковых последовательностей развиваются, также меняются перспективы применения ФЛА2. Белковая инженерия позволяет разрабатывать индивидуальные ФЛА2, оптимизированные и стабилизированные для конкретных промышленных процессов.

По сравнению с природными лецитинами, лизолецитины полученные при помощи ФЛА2 не только обладают лучшими эмульгирующими свойствами, но и способны формировать стабильные эмульсии в различных технологических процессах. Так полученные при помощи ФЛА2 лизолецитины используются в широком спектре технологических процессов. ФЛА2 находят промышленные приложения в производстве пищи, косметики и фармакологических препаратов. Так, ФЛА2 может использоваться в качестве основного фермента при ферментативной дегумации растительных масел.

Фосфолипаза А2 (ФЛА2) задействована во множестве биологических процессов, что делает её перспективным объектом для разработки лекарственных препаратов. Ингибиторы этого фермента рассматриваются как потенциальные средства для контроля воспалительных процессов, а также лечения атеросклероза, сердечно-сосудистых патологий и онкологических заболеваний. Известно, что уровень экспрессии ФЛА2 возрастает при заболеваниях, сопровождающихся выраженным воспалением, таких как артрит и атеросклероз [120,121].

Создание селективных ингибиторов ФЛА2 может привести к разработке принципиально новых противовоспалительных препаратов [122]. В поиске таких соединений активно применяются методы компьютерного моделирования, благодаря расшифровке кристаллических структур секреторных ФЛА2 [123,124]. Однако терапевтическое применение ингибиторов ФЛА2 осложняется их недостаточной эффективностью, выявленной в доклинических и клинических испытаниях [125]. Кроме того, ингибиторы ФЛА2 обладают широким кругом побочных эффектов, что затрудняет их выход на рынок.

Фосфолипаза PAF-АН (Lp-PLA2) играет важную роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний. Её повышенный уровень рассматривается как возможный индикатор ранних стадий атеросклероза и других сосудистых патологий [126,127]. Однако исследования показали, что связь между концентрацией PAF-АН и прогрессированием данных заболеваний носит сложный, нелинейный характер [124]. Рассматривалась возможность ингибирования PAF-АН, обладающей ацилгидролазной активностью в

отношении фактора активации тромбоцитов, как подхода к лечению атеросклероза. Тем не менее, клинические исследования селективных ингибиторов, включая дарапладиб, не подтвердили их ожидаемую эффективность [128].

Помимо этого, ведутся исследования новых методов применения ФЛА2 в фармакологии. Одним из перспективных направлений является разработка системы доставки пролекарств, основанной на использовании жирорастворимых соединений, активируемых ФЛА2. Такой механизм может значительно улучшить целевую доставку фармакологических агентов в клетки, открывая новые возможности для терапии [129].

1.2.5. Фосфолипазы для дегумирования растительных масел

Во время хранения растительные масла образуют осадок, которые включают в себя множество соединений, причем основной формой являются фосфолипиды. Эти соединения создают множество проблем для переработки и хранения масел для пищевых и непищевых целей. Действительно, присутствие фосфолипидов в пищевых маслах может привести к потемнению масла и появлению неприятного привкуса. Удаление фосфолипидов и других примесей имеет важное значение для производства высококачественного готового масла. Для успешной очистки масла содержание фосфора должно быть снижено до менее 10 мг/кг [130].

Гидратируемые фосфолипиды можно удалить путем водной дегуммации, тогда как негидратируемые формы удаляются либо химическими (т. е. добавлением кислоты или щелочи), либо ферментативными процессами очистки. Классические подходы к дегуммированию состоят из нескольких этапов, предусматривающих использование кислот и значительных объемов воды, что приводит к образованию большого количества побочных продуктов, включая смолы. Помимо этого, применение щелочных реагентов в промышленных масштабах оказывает отрицательное воздействие на окружающую среду [131].

В последнее время ферментативная дегуммация масла привлекает всё больше внимания. Ферментативная дегуммация уже применяется к соевому, подсолнечному, рапсовому, пальмовому и нескольким другим растительным маслам с хорошими результатами [132]. При дегумации растительных масел применяется несколько фосфолипаз, прежде всего ФЛА1, ФЛА2 и ФЛС. Все эти фосфолипазы могут уменьшать количество негидратируемых фосфолипидов, поскольку они расщепляют их на водорастворимые и маслорастворимые фрагменты. Первый процесс ферментативной дегуммации был разработан компанией Roehm and Lurgi в 90-х годах прошлого столетия.

Изначально для ферментативного дегумирования использовалась ФЛА2 из поджелудочной железы свиньи (коммерческий продукт Lecitase, «Novozymes»), однако в дальнейшем стали использоваться более специализированные фосфолипазы, полученные рекомбинантным образом [133].

Микробные рекомбинантные фосфолипазы, подходящие для дегумирования масла, включают в себя химерную ФЛА1 из *T. lanuginosus*/*F. oxysporum* (Lecitase Ultra, «Novozymes»), ФЛА2, полученную из *A. niger* («DSM»), ФЛА2 из *S. violaceoruber* (Lysomax

R, «Danisco»), ФЛС из *B. anthracis* («Verenium») [134, 135]. Внедрение фосфолипаз в процессы очистки растительных масел способствует не только повышению эффективности дегуммирования, но и снижению воздействия на окружающую среду. Ожидается, что выбросы CO₂ могут сократиться на 12 000 тонн в год после повсеместного внедрения ферментативного дегуммирования. Применение ФЛА2 для ферментативного дегуммирования рапсового масла увеличивает выход масла и снижает потери при технологическом процессе [134]. Различные технологии, такие как иммобилизация фосфолипаз могут использоваться для стабилизации ферментов в процессе дегуммирования [135].

1.2.6. Использование фосфолипаз А2 в пищевой промышленности

Фосфолипазы (не ограничиваясь сФЛА2) находят широкое применение в пищевой промышленности [136]. Фосфолипазы находят применение при производстве эмульгаторов, растительных масел, молочных продуктов и в хлебопекарной промышленности [137,138]. На сегодняшний день на рынке представлены различные коммерческие продукты, содержащие ФЛА, среди которых: Lecitase Ultra (производитель «Novonesis» A/S, Дания), Maxaral A2 («DSM», Нидерланды), CakeZyme (смесь амилазы из *B. subtilis* и ФЛА2 из *A. niger*), («DSM», Нидерланды), LysoMax («Genencor», США).

ФЛА2 также находят широкое применение в хлебопекарной промышленности. Для улучшения структуры теста, повышения его качества и увеличения объемов производства используются различные технологические подходы. Один из подходов добавление рекомбинантных ферментов, таких как, амилазы, оксидазы, гемицеллюлазы и протеазы. Примечательно, что около 30% ферментов, применяемых в пищевой промышленности, используется именно в производстве хлебобулочных изделий.

Хотя содержание липидов в тесте относительно невелико (2–2,8% от сухой массы пшеничной муки), они играют важную роль в формировании структуры конечного продукта. Благодаря образованию монослоев на границе фаз газ/жидкость липиды способствуют стабилизации воздушных пузырьков в тесте, влияя на объем выпечки. Однако их природного содержания недостаточно для существенного улучшения структуры теста и качества готовой продукции.

ФЛА2 гидролизуют фосфолипиды и галактолипиды, присутствующие как в муке, так и добавляемые дополнительно, что приводит к образованию лизолипидов. Благодаря своим эмульгирующим свойствам эти соединения улучшают текстуру хлеба и способствуют увеличению его срока хранения. В сравнении с другими липазами фосфолипазы демонстрируют более выраженный эффект в улучшении качества хлебобулочных изделий, что объясняет активный интерес к их применению, особенно к ФЛА1 и ФЛА2. Оптимальная доза фермента подбирается с учетом характеристик муки, типа выпускаемой продукции, технологии производства и состава ингредиентов [139, 140].

В пищевой промышленности липазы и фосфолипазы используются для синтеза сложных эфиров, включая короткоцепочечные сложные эфиры, в качестве ароматизаторов и сложных эфиров сахаров в качестве эмульгаторов. Другие классы эмульгаторов включают частичные глицериды, производимые липазами, такие как моноацилглицерол, диацилглицерол, и лизолецитин, производимый фосфолипазами. Липазы и фосфолипазы

используются в молочной промышленности для ускорения созревания сыра и повышения выхода сыра, соответственно, а в хлебопекарной промышленности для улучшения объема, мягкости и срока годности хлеба и других хлебобулочных изделий. Производство ароматизаторов путем экстракции из фруктов предпочтительнее химического синтеза, поскольку продукт затем может быть маркирован как «натуральный»; однако процесс экстракции влечет за собой высокую стоимость. В то же время использование микробных ФЛА для синтеза ароматических соединений представляет собой хорошее решение, так как это не так дорого, а полученный продукт все еще может быть маркирован как «натуральный».

Переработка молочных продуктов является одной из значимых областей применения фосфолипаз. ФЛА2 помогают стабилизировать жиры молока. Липидные компоненты находятся в молоке в виде жировых глобул, которые стабилизируются фосфолипидами, предотвращающими их коагуляцию. При производстве сухого молока фосфолипиды формируют защитное покрытие на частицах порошка, обеспечивая термостабильность восстановленного молочного продукта. В технологии производства мороженого эти соединения способствуют увеличению его объема и устойчивости, так как продукт представляет собой сложную систему, содержащую липидную фазу, кристаллы льда и незамерзшую белковую часть.

ФЛА2 находят эффективное применение и в сыроделии, в частности, при изготовлении моцареллы. Например, использование промышленного ферментного комплекса YieldMAX, содержащего комбинацию фосфолипаз (ФЛА1, ФЛА2 и ФЛВ), позволило повысить выход сыра на 0,7–3,8%. Гидролиз сырной сыворотки фосфолипазами улучшил выход сыра, не изменив микроструктуру сыра, и привел к созреванию сыра с функциональными свойствами, идентичными традиционному сыру Моцарелла [141].

Еще одним вариантом применения ФЛА2 является добавление фермента к молоку при производстве молока при сверхвысокой температуре. Добавление фермента позволяет уменьшить загрязнения емкостей во время производства молочных продуктов, увеличивает производительность переработки. Фермент FoodPro Cleanline («Danisco A/S», Великобритания) является ФЛА2, однако обладает ацилтрансферазной активностью, что позволяет формировать сложные эфиры. Формирование сложных эфиров за счет поверхностной активности препятствует оседанию карамелизованных белков на поверхности производственной линии [142].

Яичный желток является природным эмульгатором, который широко применяется в пищевой промышленности. Благодаря своим уникальным свойствам, таким как способность образовывать пену, формировать гель, эмульгировать компоненты в тесте и майонезе, а также улучшать текстуру выпечки, он находит обширное применение в различных технологиях пищевого производства. В России и странах Восточной Европы сосредоточено около трети мирового рынка эмульгированных заправок, содержащих яичный желток. В целом, объем их производства в мире составляет около 3 миллионов метрических тонн в год. Состав желтка представлен сложной эмульсией типа масло-вода, включающей 50% воды, 32% липидов и 16% белков. Основную часть липидов (80%) составляет фосфатидилхолин (ФХ), а примерно треть приходится на фосфолипиды. Для улучшения эмульгирующих характеристик желтка в промышленных масштабах используют коммерческие препараты ФЛА2, которые повышают его функциональные свойства и улучшают качество конечных продуктов [134,143].

1.3. Химозин

Производство сыра – один из первых биотехнологических процессов с применением ферментов, разработанный человечеством. Приготовление сыра основано на ферментативной коагуляции молока под действием молокосвертывающих ферментов сычуга крупного рогатого скота. В качестве молокосвертывающих ферментов выступает смесь химозина и пепсина. Химозин и пепсин гидролизуют пептидную связь к-казеина, вызывая дестабилизацию казеиновых мицелл, которые затем агрегируют, формируя творожистый сгусток.

Бычий химозин (сычужный фермент, реннин, EC3.4.23.4) принадлежит к группе ферментов, называемых аспарагиновыми протеазами. Этот фермент синтезируется в четвертом отделе желудка телят и секретируется клетками слизистой оболочки желудка в виде профермента, прохимозина (40,8 кДа). В кислых условиях просвета желудка профермент активируется посредством автокаталитического расщепления 42-аминокислотной N-концевой пропоследовательности [144,145]. Химозин содержит два остатка аспарагиновой кислоты в активном центре, Asp32 и Asp215, которые катализируют селективное расщепление пептидной связи Phe105-Met106 в молекулах к-казеина, стабилизирующих мицеллы молока. Это расщепление приводит к дестабилизации казеиновых мицелл и вызывает свертывание молока. Химозин в отличие от пепсина проявляет более специфическую протеолитическую активность. Это делает бычий химозин подходящим для коагуляции молока для производства сыра.

Долгое время химозин получали натуральным образом из сычуга молодых телят: сычуг измельчали и промывали солью. Полученная таким образом смесь ферментов на 70% состоит из химозина и на 30% из пепсина. Химозин является одним из наиболее изученных ферментов в современной биохимии. Его широкое практическое применение делает его одним из наиболее востребованных рекомбинантных ферментов.

Первая разработанная промышленная методика очистки химозина была разработана в 1874 году Кристианом Хансеном. С тех пор химозин является одним из наиболее охарактеризованных белков. В 90-х годах прошлого века были разработаны методики продукции рекомбинантного химозина быка в грибах *Aspergillus niger* и дрожжах *Kluyveromyces lactis* [146]. Несмотря на то, что в процессе производства сыра используется генетически модифицированный организм, в готовом сыре отсутствует посторонний генетический материал. Доля рекомбинантного химозина на мировом рынке продолжает увеличиваться [144]. В настоящее время более 70% молоко-свертывающих ферментов, применяемых в пищевой промышленности, получают с использованием генетически модифицированных микроорганизмов.

Прохимозин остается преимущественно неактивным, но в кислой среде подвергается автокаталитическому расщеплению, в результате чего превращается в активный химозин. Активация зимогена происходит *in vivo* в полости желудка при pH ниже 2 или *in vitro* в кислых условиях [145]. Пре-фрагмент бычьего пре-прохимозина состоит из 16 аминокислотных остатков, а про-фрагмент состоит из 42 аминокислотных остатков [147,148]. В состоянии активированного фермента химозин содержит 323 аминокислотных

остатка и представлен смесью двух активных изоформ, А и В [148]. Изоформы А и В отличаются лишь одной аминокислотной заменой в положении остатка 244, у изоформы А в данном положении находится аспарагиновая кислота (Asp), у изоформы В – глицин (Gly).

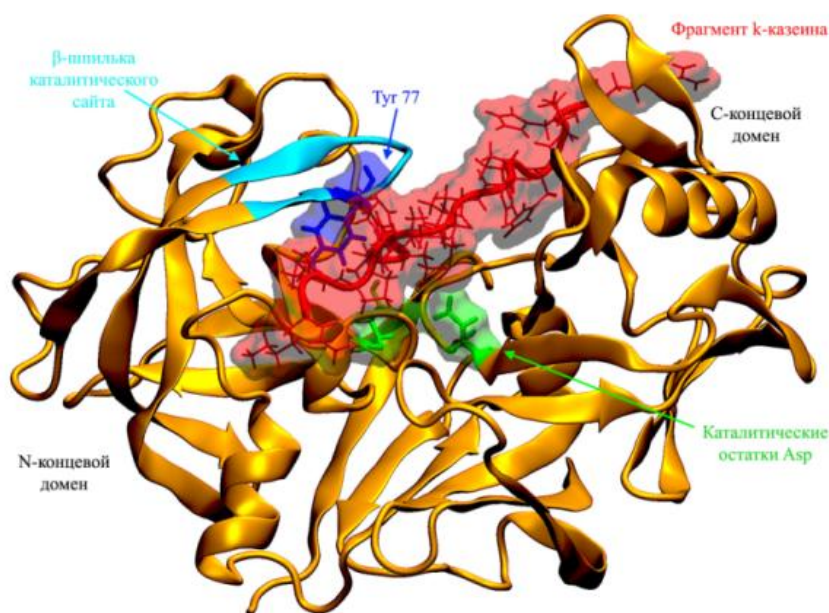


Рис. 5. Модель комплекса связывания трехмерной кристаллической структуры химозина быка *Bos taurus* с κ -казеином [147]. Показано положение N- и С- концевых доменов и ключевые остатки каталитического сайта.

Химозин имеет схожую с пепсином структуру, которая состоит из двух β -цилиндрических доменов, которые в свою очередь состоят из β -слоев. Эволюционно белок возник за счёт дупликации данных β -цилиндрических доменов, так как домены имеют повторяющиеся структурные элементы. Субстрат-связывающая щель и активный центр расположены на границе двух доменов (**Рис. 5**). Активный центр сформирован за счёт двух остатков аспарагиновой кислоты Asp32 и Asp215 (по одному от каждого домена). Каталитический механизм расщепления пептидной связи включает серию переносов протонов, вызванных нуклеофильной атакой молекулы воды [149]. Данный каталитический механизм подтверждён методами нейтронной дифракции [150].

Химозин быка и другие молоко-свертывающие ферменты хорошо исследованы как со стороны структурной биохимии [151], так и со стороны кинетики ферментативного катализа [152]. В настоящее время для получения рекомбинантного химозина широко применяются штаммы-продуценты *A. niger* [145] и *K. lactis* [153]. Создание высокоэффективных штаммов *P. pastoris* для промышленного производства химозина является важной задачей в биотехнологии.

Проведены исследования по экспрессии рекомбинантного прохимозина быка в системе экспрессии *P. pastoris* с оптимизированной последовательностью кодонов [154]. Проведена оптимизация культивирования *P. pastoris* рекомбинантного прохимозина быка при индукции P_{AOX1} промотора [155]. Протестированы различные варианты сред, подходящих для промышленного культивирования, включая глицерин низкой очистки и

виноградный жмых [156]. Однако полученные показатели продуктивности оказались ниже по сравнению с промышленными штаммами-продуцентами на основе *K. lactis* и *A. niger*.

При этом, использование платформы *P. pastoris* для экспрессии секреторных белков имеет ряд преимуществ, таких как GRAS статус для данного типа дрожжей, способность достигать высоких плотностей культуры, наличие меньшего количества примесей в культуральной жидкости, что в свою очередь упрощает процесс очистки.

Система экспрессии *P. pastoris* широко применяется для производства рекомбинантных белков в пищевой промышленности. Сравнительный анализ экспрессии рекомбинантного препрохимозина, прохимозина и химозина буйвола показал, что наибольшего уровня экспрессии удастся добиться при экспрессии зимогена в форме профермента [157]. Экспрессия прохимозина быка позволяет в *P. pastoris* также оптимизировать и масштабировать процессы очистки [158]. Проведена в *P. pastoris* экспрессия рекомбинантного химозина верблюда и альпаки, отличающегося более высокой формой специфичности по отношению к к-казеину [159, 160].

Для множества ферментов, в том числе химозина, активно ведется поиск аналогов и синтетических вариантов с улучшенными характеристиками. В стремлении получить более активные и устойчивые формы химозина, подходящие для применения в пищевой индустрии, были выявлены и внедрены новые рекомбинантные формы этого фермента [161,155].

Наибольшее значение из них имеет химозин верблюда, обладающий повышенной термостабильностью и высокой специфичностью, что выражается в оптимальном соотношении молокосвертывающей и протеолитической активности (МСА/РА). Сравнительный анализ химозинов различных видов показал, что наиболее высокую специфичность проявляли химозины верблюда и альпаки [159, 160], химозин яка проявлял стабильность активности в широком диапазоне pH [162]. Были описаны химозины овцы, яка, верблюдов, марала, альпаки, а также проведен сравнительный анализ их активности [152,157,159-163].

Начиная с 2004 года идёт серьезная работа над улучшением физико-химических свойств рекомбинантного химозина методами рациональной белковой инженерии. В последние годы широко применяется рекомбинантный химозин верблюда, обладающий большей термостабильностью и специфичностью по отношению к к-казеину [163]. На основе рекомбинантного химозина верблюда были созданы модифицированные версии фермента с повышенной специфичностью и стабильностью [164,165].

Несмотря на возросший интерес к исследованию молоко-свертывающих ферментов, химозин белухи не был ранее охарактеризован. Хотя на первый взгляд жвачные животные и китообразные значительно отличаются с эволюционной точки зрения, химозин белухи демонстрирует высокую степень сходства с бычьим химозином по первичной аминокислотной последовательности. (Рис. 6, 7).

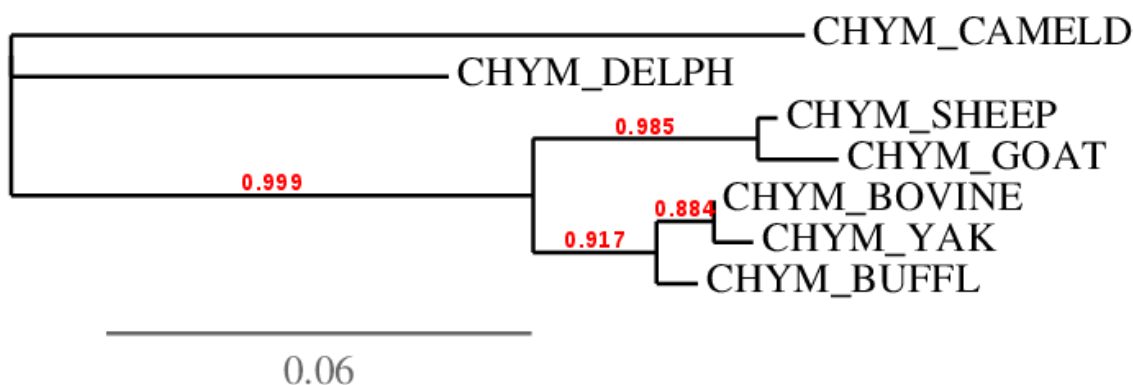


Рис. 6. Филогенетическое дерево химозинов различных видов. Химозин по видам: CHYM_CAMELD *Camelus dromedarius*, CHYM_DELPH *Delphinapterus leucas*, CHYM_SHEEP *Ovis aries*, CHYM_GOAT *Capra aegagrus*, CHYM_BOVINE *Bos taurus*, CHYM_YAK *Bos grunniens*, CHYM_BUFFL *Bubalus bubalis*. Масштаб в соответствии с филогенетической дистанцией.

CHYM_CAMDR	GKVAREPLTSYLD	SQYFGKIYIGTPPQEFTV	V	FDTGSSDLWVPSIYCKSNVCKNHHRFDP	60	
CHYM_DLEUC	GEVASEPLTSYLD	SQYFGKIYIGTPSQEFTV	V	FDTGSSDLWVPSVYCKSDACQNHHRFDP	60	
CHYM_BOVIN	GEVASVPLTNYLD	SQYFGKIYLGTPPQEFTV	L	FDTGSSDFWVPSIYCKSNACKNHQRFDP	60	
CHYM_SHEEP	GEVASVPLTNYLD	SQYFGKIYLGTPPQEFTV	L	FDTGSSDFWVPSIYCKSNACKNHQRFDP	60	
	*: ** ***.*****: ** *****: *****: *****: *: *: *****					
			▼			
CHYM_CAMDR	RKSSTFRNLGKPL	SIHYGTGSMQGLGYD	TVTVSNIVDPNQTVGLSTEQPG	EVFTYSE	EFD 120	
CHYM_DLEUC	SMSSTFQNMGKPL	SIQYGTGSMQGLGYD	TVTVSNIVDHQQT	TVGLSTQEPGD	VFTYSE	EFD 120
CHYM_BOVIN	RKSSTFQNLGKPL	SIHYGTGSMQGLGYD	TVTVSNIVDIQQT	TVGLSTQEPGD	VFTYA	EFD 120
CHYM_SHEEP	RKSSTFQNLGKPL	SIRYGTGSMQGLGYD	TVTVSNIVDIQQT	TVGLSTQEPGD	VFTYA	EFD 120
	*****: *: *****: *****: *: *****: *****: *****: *****: *****: *****					
			▼			
CHYM_CAMDR	GILGLAYPSLASE	YSVPVFDNMMDRHLVARDLFSVYMDRNGQGSMLTLGAIDPSYYTGSL			180	
CHYM_DLEUC	GILGLAYPSLASE	YSVPVFDNMMDRHLVAQDLFSVYLDNRNGQESMLTLGAIDPSYYTGSL			180	
CHYM_BOVIN	GILGMAYPSLASE	YSIPVFDNMMDRHLVAQDLFSVYMDRNGQESMLTLGAIDPSYYTGSL			180	
CHYM_SHEEP	GILGMAYPSLASE	YSVPVFDNMMDRRLVAQDLFSVYMDRSGQGSMLTLGAIDPSYYTGSL			180	
	*****: *****: *****: *: ***: *****: **. ** *****					
			▼			
CHYM_CAMDR	HWVPVTLQQYWQ	FTVDSVTINGVAVACVGGCQAILDTGTS	V	LFGPSSDILKIQMAIGATQ	240	
CHYM_DLEUC	HWIPVTLQKYWQ	FTLDSVTIGGVVACDGGCQAILDTGTS	M	LVGPSSDILNIQMAIGATQ	240	
CHYM_BOVIN	HWVPVTVQQYWQ	FTVDSVTISGVVACEGGCQAILDTGTS	K	LVGPSSDILNIQQAIGATQ	240	
CHYM_SHEEP	HWVPVTLQKYWQ	FTVDSVTISGAVVACEGGCQAILDTGTS	K	LVGPSSDILNIQQAIGATQ	240	
	*: ***: *: *****: *****: *. ** ***** *. *****: ** *****:					
			▼			
CHYM_CAMDR	NRYGEFDVNCGNL	RSMP TVVFEINGRDYPLSPSAYTSKDQGFCTSGFQGDNNSE	L	WILGD	300	
CHYM_DLEUC	NRYGEFDIDCGSL	SMP TVVFEINSRMYPLTPSAYTNQDQGFCTSGFQGENNSQ	Q	WILGD	300	
CHYM_BOVIN	NQYGEFDIDCDNLS	YMP TVVFEINGKMYPLTPSAYTSQDQGFCTSGFQSENHSQ	K	WILGD	300	
CHYM_SHEEP	NQYGEFDIDCDNLS	YMP TVVFEINGKMYPLTPAYTSQEEGFCTSGFQGENHSHQ	Q	WILGD	300	
	*: *****: **. * *****: *: ***: * ** *: *: *****: *: *: *****					
			▼			
CHYM_CAMDR	VFIREYYSVFD	RANNRVGLAKAI			323	
CHYM_DLEUC	VFIREYYSVFD	RANNRVGLAKAV			323	
CHYM_BOVIN	VFIREYYSVFD	RANNLVGLAKAI			323	
CHYM_SHEEP	VFIREYYSVFD	RANNLVGLAKAI			323	

Рис. 7. Выравнивание аминокислотных последовательностей химозинов различных видов. Рассматриваемые варианты химозина: CHYM_CAMELD (*Camelus dromedarius*), CHYM_DELPH (*Delphinapterus leucas*), CHYM_SHEEP (*Ovis aries*). Существенные аминокислотные различия между химозином белухи и быка отмечены жирным шрифтом.

Белуха *Delphinapterus leucas* – это морское млекопитающее семейства нарваловых, значительная часть популяции которого живет в арктических условиях. Молоко морских млекопитающих одно из наиболее жирных по составу, молодые детеныши набирают вес быстро [166]. Кроме того, первичная последовательность казеина белухи близка к казеину быка [167]. С учетом экстремальных условий обитания белухи было выдвинуто предположение о возможных структурных изменениях в последовательности химозина, обусловленных адаптацией к арктической среде.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При проведении экспериментов в качестве компонентов сред, буферных растворов, растворителей, ингибиторов и субстратов использовали реактивы высокой степени очистки, произведенными следующими компаниями: «Bio-Rad», «Biotech», «GE Healthcare», «Sigma-Aldrich», «Thermo Fisher Scientific» (США), «Roche» (Швейцария), «Fermentas» (Литва), «Molecular probes» (Нидерланды), «AppliChem», «Serva», «Acros Organics», «Fluka», «Kuchner» (Германия), «Диа-М», «Евроген», «Криохром», «Люмипроб РУС», «Ренам», «Технология-Стандарт», «Софэкс-Силикон», «Хеликон», «Химмед» (Россия). Для приготовления буферных растворов и сред использовали деионизированную воду высокой степени очистки (не ниже степени чистоты 2 по ГОСТ Р 52501-2005 «Вода для лабораторного анализа»).

2.1. Среды, использованные в работе

LB: 10 г триптона, 10 г NaCl, 5 г дрожжевого экстракта на 1л, pH 7,0. Для получения агаризированной среды для чашек Петри добавляли агар до финальной концентрации 1,6% по массе.

YP: 20 г пептона, 10 г дрожжевого экстракта, pH 7,0. Для получения агаризированной среды для чашек Петри добавляли агар до финальной концентрации 1,6% по массе.

YPD: 20 г пептона, 10 г дрожжевого экстракта, 20 г глюкозы на 1 л, pH 7,0. Для получения агаризированной среды для чашек Петри добавляли агар до финальной концентрации 1,6% по массе.

YPG: 20 г пептона, 10 г дрожжевого экстракта, 20 г пептона, 30 мл глицерина, на 1 л, pH 7,0. Для получения агаризированной среды для чашек Петри добавляли агар до финальной концентрации 1,6% по массе.

MD: 2% глюкозы, 1,34% дрожжевых азотистых оснований, 4×10^{-5} % биотина. Для получения агаризированной среды для чашек Петри добавляли агар до финальной концентрации 1,6% по массе.

BMGY: 1% дрожжевой экстракт, 1% глицерин, 2% пептон, 100 мМ калий-фосфатный буфер pH 6,0, 1,34% дрожжевых азотистых оснований, 4×10^{-5} % биотина. Для получения агаризированной среды для чашек Петри добавляли агар до финальной концентрации 1,6% по массе.

BMMY: 1% дрожжевой экстракт, 1% метанол, 2% пептон, 100 мМ калий-фосфатный буфер pH 6,0, 1,34% дрожжевых азотистых оснований, 4×10^{-5} % биотина. Для получения агаризированной среды для чашек Петри добавляли агар до финальной концентрации 1,6% по массе.

Среда минеральная BSM: глицерин – 70 г, KH_2PO_4 – 9,4 г, микроэлементы PTM1 – 4,86 мл, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 15,7 г, MgSO_4 – 4,6 г, CaCl_2 – 0,35 г, биотин – 4 мг, Пеногаситель «Софэксил-1520» – 0,5 г на 1 л.

Состав раствора микроэлементов PTM1: KI – 207,5 мг/л, MnSO_4 – 760,6 мг/л, Na_2MoO_4 – 484 мг/л, H_3BO_3 – 46,3 мг/л, ZnSO_4 – 5 г/л, FeSO_4 – 12 г/л, H_2SO_4 – 9,2 г/л

2.2. Методы работы с клетками бактерий

При работе с клетками бактерий *E. coli* использовались следующие штаммы, Табл. 2:

Табл. 2. Использованные штаммы *E. coli*

Штамм	Генотип	Источник
DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-92 argF)U169, hsdR17(rk ⁻ mk ⁺), λ^-	Лабораторная коллекция ЛМБ ФИЦ РАН [168]
DH10B	F– mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK λ^- rpsL(Str ^R) nupG	Лабораторная коллекция ЛМБ ФИЦ РАН
XL10-Gold	Tet ^r Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r]	Лабораторная коллекция ЛМБ ФИЦ РАН

2.2.1. Получение электрокомпетентных клеток бактерий

Выращивали ночную культуру штамма-реципиента в 5 мл LB при 37°C. Далее на 5 мл LB брали 200 мкл н/к и подращивали на качалке 2,5 ч при 37°C. Клеточную культуру разделяли на три микропробирки объемом 1,5 мл. Центрифугировали при 4°C, 30 с при 13000 об./мин. Осадок в каждой микропробирке промывали 1 мл ледяной бидистиллированной H_2O (ddH $_2\text{O}$). Промывку повторяли 3 раза. При последней промывке осадки объединяли в одну пробирку: добавляли 50 мкл ddH $_2\text{O}$ в первую микропробирку, ресуспендировали и переносили 50 мкл смеси во вторую, а потом аналогичным образом в третью.

2.2.2. Трансформация клеток *E. coli* методом электропорации

В микропробирку с электрокомпетентной культурой *E. coli* добавляли 1 мкл плазмидной ДНК (0,005 мкг/мкл), затем суспензию переносили в предварительно охлажденную кювету для электропорации «Eppendorf» (Германия), расстояние между электродами 2 мм. Электропорацию проводили с использованием прибора «MicroPulser™ Electroporator» («Bio-Rad», США), устанавливая параметры импульса в соответствии с рекомендациями производителя для *E. coli* (время импульса 4–5 мсек, напряженность

электрического поля 2,5 кВ). После электропорации к клеточной суспензии добавляли 1 мл подогретой среды LB, затем клетки инкубировали при 37°C в течение 2 часов для восстановления. После инкубации суспензию высевали на чашки с агаризованной средой LB, содержащей зеоцин (25 мкг/мл, «Thermo Fisher», США), и инкубировали при 37°C в течение 24 часов.

2.3. Методы работы с клетками дрожжей

При работе с клетками дрожжей использовались следующие штаммы, Табл. 3.

2.3.1. Получение электрокомпетентных клеток дрожжей

Приготовление электрокомпетентных клеток осуществляли согласно протоколу трансформации [169]. Выращивали свежую культуру клеток в 100 мл питательной среды до достижения ОП₆₀₀=1. Полученные клетки отделяли центрифугированием, супернатант удаляли. Клетки ресуспендировали в 80 мл раствора 1 (100 mM LiAc, 10 mM DTT, 0,6 M sorbitol, 10 mM Tris-HCL pH 7,5) и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем клетки осаждали центрифугированием. Трижды ресуспендировали осадок в 15 мл ледяного 1 М сорбитола и центрифугировали, каждый раз отделяя супернатант, для полной отмывки клеток. Отмытый клеточный осадок после центрифугирования ресуспендировали в 1 М ледяном сорбитоле до финальной концентрации 10¹⁰ клеток/мл, разделяя на отдельные аликвоты по 100 мкл. Держали на льду до трансформации (можно хранить при -70°C).

2.3.2. Трансформация гена ФЛА2 в *P. pastoris*

Для трансформации *P. pastoris* применяли штамм X-33 («Thermo Fisher Scientific», США). Выращивание дрожжевых клеток осуществляли в жидкой среде YPD до достижения ОП₆₀₀ 1,4. Вектор pPICZα-ФЛА2 линейаризовали предварительно по рестрикционному сайту *Bst*XI. Трансформация клеток *P. pastoris* проводили методом электропорации с использованием прибора «Micropulser» («Bio-Rad», США), использовали кюветы с межэлектродным расстоянием 0,2 см. Процедура трансформации выполнялась в соответствии с ранее описанным методом [133].

2.3.3. Трансформация гена прохимозина быка в *P. pastoris*

Перед трансформацией вектор pPICZαA, содержащий ген прохимозина быка, линейаризации с использованием рестриктазы *Sac*I. Клетки штамма *GS115* («Thermo Fisher Scientific», США) *P. pastoris* применяли для трансформации.

Электрокомпетентные клетки были подготовлены в соответствии с установленным протоколом трансформации [169]. Электропорацию проводили с использованием прибора «MicroPulser™ Electroporator» («Bio-Rad», США), устанавливая параметры импульса в соответствии с рекомендациями производителя для *P. pastoris* (время импульса 4-5 мсек, напряженность электрического поля 2,0 кВ. использовали кюветы с межэлектродным расстоянием 0,2 см).

После электропорации клетки инкубировали в течение 1 часа при 30°C в 1 мл 1 М сорбитола, затем высевали на чашки с твердой питательной средой YPDS, содержащей 1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 2% глюкозы и 1 М сорбитола, а также с разными концентрациями зеоцина (200, 500, 750, 1000 мкг/мл).

Табл. 3. Используемые штаммы *P. pastoris*

Штамм	Генотип	Источник
<i>X-33</i>	Mut ⁺	Лабораторная коллекция ЛМБ ФИЦ Биотехнологии
<i>GS115</i>	His4 ⁻ , Mut ⁺	Лабораторная коллекция ЛМБ ФИЦ Биотехнологии
<i>X-33/pPICZα-ФЛА2</i>	pPICZα-ФЛА2 (AOX1::ФЛА2;HIS4, Zeo ⁺)	Данная работа
<i>GS115/pPICZα-Chym1</i>	pPICZα-Chym1 (AOX1:: Chym1;HIS4 ⁻ , Zeo ⁺)	Данная работа
<i>GS115/pVR2-GAP-Chym1</i>	pVR2-GAP-Chym1 (<i>his4</i> -) (GAP:: Chym1;HIS4 ⁻ , Zeo ⁺)	Данная работа
<i>GS115/pVR2-G1-Chym1</i>	pVR2-G1-Chym1 (GTH1:: Chym1;HIS4 ⁻ , Zeo ⁺)	Данная работа
<i>GS115/pSF001</i>	pVR2-AOX1-mfa1-Chym1 (AOX1:: Chym1;HIS4 ⁻ , Zeo ⁺)	Данная работа
<i>GS115/pSF002.</i>	pVR2-AOX1-mfa1D-Chym1 (AOX1:: Chym1;HIS4 ⁻ , Zeo ⁺)	Данная работа
<i>GS115/pPICZα-ChymBe</i>	pPICZα-ChymBe (<i>his4</i> -) (AOX1:: ChymBe;HIS4 ⁻ , Zeo ⁺)	Данная работа
<i>GS115/pPICZα-Chym1-HAC1</i>	pPICZα-Chym1(AOX1::), pPIC9-GAP-HAC1(HIS4::), (HIS4, Zeo ⁺)	Данная работа
<i>GS115/pVR2-GAP-Chym1-HAC1</i>	pVR2-GAP-Chym1(GAP::), pPIC9-GAP-HAC1 (HIS4::), (HIS4, Zeo ⁺)	Данная работа

2.3.4. Трансформация гена прохимозина белухи в *P. pastoris*

Метилотрофные дрожжи *P. pastoris* трансформировали с использованием электропорации. Для этого 10 мкг плазмиды pPICZα-ChymBe предварительно линейаризовали при помощи рестриктазы SacI, а затем вводили в электрокомпетентные клетки штамма *GS115*. Электропорацию проводили с использованием прибора «MicroPulser™ Electroporator» («Bio-Rad», США), устанавливая параметры импульса в

соответствии с рекомендациями производителя для *P. pastoris* (время импульса 4-5мсек, напряженность электрического поля 2,0 кВ. использовали кюветы с межэлектродным расстоянием 0,2 см).

После процедуры электропорации клетки высевали на чашки с твердой средой YPDS, содержащей 1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 2% глюкозы и 1 М сорбитола и 200 мкг/мл зеоцина. На последующем этапе скрининга было выбрано 30 трансформантов, которые культивировали в 250 мл колбах, содержащих 50 мл среды BMGY.

2.3.5. Трансформация сплайсированного варианта гена HAC1 в созданные ранее штаммы продуценты GS115/pPICZ α -Chym1, GS115/pVR2-GAP-Chym1

Вектор pPIC9-GAP-HAC1 с встроенным сплайсированным вариантом гена HAC1 был предварительно линейаризован по сайту рестрикции Nco I. Для получения экспрессионных штаммов использовали клетки *GS115*, которые ранее были трансфицированы векторами pPICZ α -Chym и pVR2-GAP-Chym1.

Электрокомпетентные клетки подготавливали в соответствии с протоколом трансформации. После электропорации клетки инкубировали в течение 1 часа при 30°C в 1 мл 1 М сорбитола, затем высевали на чашки с агаризованной средой MD, включающей 2% глюкозы, 1,34% YNB без гистидина, 1,5% агара и 200 мкг/мл зеоцина.

2.3.6. Селекция трансформантов *P. pastoris*

Отобранные трансформанты штамма GS115/pPICZ α -ФЛА2, устойчивые к зеоцину, анализировали на наличие вставки гена ФЛА2 методом ПЦР-скрининга с олигодезоксирибонуклеотидами Р3 и Р4 (Табл. 4). По результатам селекции и ПЦР-скрининга были отобраны клоны с встроенным геном секреторной ФЛА2.

Отобранные трансформанты штамма GS115/pPICZ α -Chym1, устойчивые к зеоцину, анализировали на наличие вставки гена Chym1 методом ПЦР-скрининга с олигодезоксирибонуклеотидами Р5 и Р6 (Табл. 4). По результатам селекции и ПЦР-скрининга были отобраны клоны с встроенным геном прохимозина В.

По результатам культивирования были отобраны клоны с максимальной активностью химозина. От каждого клона было отобрано по 1 мл культуральной жидкости. К 1 мл культуральной жидкости добавляли 100 мкл 1 М HCl, инкубировали 2 ч, затем восстанавливали pH до 5,5 добавлением 90 мкл 1 М NaOH с последующей инкубацией в течение 2 ч. Ферментативную активность каждого отдельного клона определяли путем добавления 100 мкл культуральной жидкости к 1 мл водного раствора восстановленного сухого молока.

Отобранные Mut⁺ трансформанты штамма GS115/pPICZ α -ChymBe, устойчивые к зеоцину, были проанализированы на наличие вставки гена ChymBe при помощи ПЦР с праймерами Р3 и Р4.

По результатам культивирования были отобраны клоны с максимальной активностью химозина. От каждого клона было отобрано по 1 мл культуральной жидкости. К 1 мл культуральной жидкости добавляли 100 мкл 1 М HCl, инкубировали 2 ч, затем восстанавливали pH до 5,5 добавлением 90 мкл 1 М NaOH с последующей инкубацией в

течение 2 ч. Ферментативную активность каждого отдельного клона определяли путем добавления 100 мкл культуральной жидкости к 1 мл водного раствора восстановленного сухого молока.

2.3.7. Культивирование трансформантов *P. pastoris*

Для получения инокулята трансформированные клетки *P. pastoris* выращивали в течение 24 ч при 30 °C и 250 об/мин в шейкере-инкубаторе «Innova 43R» («New Brunswick Scientific», США) в жидкой питательной среде YPD (1% дрожжевой экстракт, 1,5% триптон, 1% глюкоза), до ОП₆₀₀ 1,4. Полученным инокулятом засеивали пробирки со средой YPD (5 мл) в соотношении 1:10, и выращивали при 30°C и 250 об/мин в течение 96 ч. Для трансформантов с интегрированным вектором под промотором P_{AOX1} через каждые 24 ч культивирования добавляли 1% метанола. Для трансформантов с интегрированным вектором под промотором P_{GAP} не производили специальных добавок.

В случае трансформантов с интегрированным вектором под промотором P_{GI} использовали среду YP с добавлением с добавлением подпиточных капсул «Kuhner» (12 мм) с постепенным высвобождением глюкозы и выращивали при 30°C и 250 об/мин в течение 96 ч.

После окончания культивации определялась активность ферментов в культуральной жидкости.

2.3.8. Культивирование штамм-продуцента прохимозина в ферментере

Процесс культивирования штамм-продуцентов ФЛА2, химозина быка, химозина белухи осуществляли в ферментере Biostat B+ («Sartorius», Германия) с общим объемом 6,6 л и рабочим диапазоном 0,4-5 л. Инокуляцию ферментера проводили с использованием колбы (150 мл питательной среды), в которой предварительно выращивали штамм-продуцент в течение 24 часов в шейкер-инкубаторе (30°C, 250 об/мин) на среде BMGY, содержащей 1% дрожжевого экстракта, 1% глицерина, 2% пептона, 1,34% дрожжевых азотистых оснований и 100 мМ калий-фосфатного буфера (pH 6,0).

Ферментация в биореакторе проводилась на минеральной среде BSM с добавлением 70 г/л глицерина, 9,9 г/л KH_2PO_4 , 0,972% PTM1, 15,7 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4,6 г/л MgSO_4 , 0,35 г/л CaCl_2 и 4 мг/л биотина. В качестве пеногасителя применяли 0,1% Софэксил («Софэкс-Силикон», Россия). Температурный режим поддерживали на уровне 30°C. После старта индукции метанолом температура снижалась до 26°C.

Во время роста на среде с глицерином поддерживали pH на уровне 4,0, а после начала индукции метанолом pH регулировали до 5,5. Введение 2% сорбитола осуществляли одновременно с индукцией метанолом, добавляя его через 24 и 48 часов. Метанол вносили каждые три часа, поддерживая его концентрацию в среде на уровне 1%, при этом использовали 50%-й раствор метанола с 2,2% PTM1. Поддержание стабильного значения pH среды внутри ферментера осуществлялась за счет подтитровки 10%-ми растворами NH_4OH и H_2SO_4 .

2.4. Методы работы с нуклеиновыми кислотами

2.4.1. Амплификация фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции

При клонировании для амплификации ДНК и для тестирования полученных конструкций (скрининга) применяли стандартную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с использованием Taq PCR Kit («Евроген», Россия). Амплификацию проводили с помощью прибора T100 Thermal Cycler («Bio-Rad», США). Олигонуклеотиды, использованные для амплификации ДНК, были синтезированы в компании «Евроген».

Реакционная смесь, общим объемом 50 мкл, состояла из: 5 мкл 10x Taq-буфер (10 mM Трис-HCl (pH 8,3) («Fermentas», Литва), 4 мкл MgCl₂ («Fermentas», Литва), 37,5 мкл ddH₂O, 1 мкл dNTP (смесь нуклеотидов) («Fermentas», Литва), 1 мкл каждого из олигонуклеотидных праймеров концентрацией 0,02 нмоль/ мкл Standard («Евроген», Россия), 1 мкл Taq-полимеразы («ThermoFisher», США). Реакционная смесь готовилась в микропробирке Eppendorf 1,5 мл, порядок внесения: в первую очередь добавлялась ddH₂O, а в последнюю - Taq-полимераза. После перемешивания полученная смесь в количестве 49 мкл переносилась в микропробирки «Eppendorf» объемом 0,2 мл. Далее вносилась матрица для амплификации каждого выбранного клона в количестве 1 мкл. Температурный режим и время ПЦР подбирали с учетом длины амплифицируемого фрагмента, а также длины и нуклеотидного состава праймеров.

2.4.2. Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции и лигирование фрагментов ДНК

Реакции рестрикции и лигирования проводились по стандартным протоколам, указанным в качестве рекомендованных производителями используемых ферментов [170].

2.4.3. Выделение плазмидной ДНК

Экстракцию ДНК из агарозного геля после электрофоретического разделения проводили при помощи коммерческого набора Cleanup Standart («Евроген», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

2.4.4. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Для выполнения ДНК-электрофореза использовали агарозный гель с концентрацией 1%, приготовленный на однократном TBE-буфере с добавлением бромистого этидия в концентрации 0,5 мкг/мл. Перед загрузкой в гель пробы смешивали с буфером нанесения в пропорции 1:10. Электрофорез осуществляли в TBE-буфере при напряжении 5 В/см, используя камеру Mini Sub Cell GT («Bio-Rad», США). После завершения разделения, ДНК визуализировали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм.

2.4.5. Секвенирование плазмидной ДНК

Секвенирование плазмидной ДНК выполняли методом Сенгера с использованием автоматического секвенатора ABI PRISM 3730 («Applied Biosystems», США) в Межинститутском ЦКП «Биоинженерия».

2.4.6. Анализ на наличие остаточной ДНК

Анализ на отсутствие примесей ДНК в конечных образцах секреторной ФЛА2 *S. violaceoruber* и химозина подтверждался при помощи ПЦР-теста на ген ФЛА2 и ген химозина Chym1.

Из тестируемых образцов ДНК выделяли с помощью набора реактивов LumiPure DNA gel extraction kit («Lumiprobe», Россия) и использовали в качестве матрицы в реакции ПЦР с праймерами P1/P2 (детекция гена ФЛА2) температура отжига 55 °С, 30 циклов; в реакции ПЦР с праймерами P3/P4 (детекция гена химозина) температура отжига 55 °С, 30 циклов.

2.5. Создание генетических конструкций

Список использованных в работе генетических конструкций приведен в Табл. 5. Карты полученных генетических конструкций приведены в Приложении 1. Список использованных олигонуклеотидов для создания генетических конструкций и проверки интеграции приведен в Табл. 4.

2.5.1. Конструирование вектора pPICZα-ФЛА2 для экспрессии ФЛА2

Для получения штамма-продуцента использовали ген фосфолипазы A2 *S. violaceoruber*, зарегистрированный в GenBank (Sequence ID AY359866.1). В качестве штамма-реципиента были выбраны метилотрофные дрожжи *P. pastoris*, качестве экспрессионного вектора для *P. pastoris* использовали pPICZαA («Thermo Fisher Scientific», США). Для амплификации фрагмента ДНК с геном ФЛА2 использовали праймеры P1 и P2. Фрагмент ДНК, соответствующий гену ФЛА2 длиной 363 пар оснований, встраивали в pPICZαA по сайтам рестрикции *EcoRI/Sall*.

2.5.2. Конструирование вектора pPICZα-Chym1 для экспрессии прохимозина быка

Для получения штамма-продуцента использовали ген прохимозина В *B. taurus* (GenBank: E05472.1). Оптимизация последовательности и химический синтез целевого гена был заказан в компании «Twist Bioscience» (США). Ген был получен в составе вектора pTwist (Amp).

Вектор pPICZαA «Thermo Fisher Scientific» (США) был использован для получения секретируемого прохимозина В. Вектор содержит промотор P_{AOX1} и фактор внеклеточной селекции *S. cerevisiae* [171]. Ген прохимозина В и экспрессионный вектор pPICZαA были

Табл. 4. Список олигонуклеотидов, использованных в работе.

Идентификационный номер	Название	Последовательность (5'-3')
P1	PLA2-F	ATATGAATTCGCTCCAGCAGATAAAC
P2	PLA2-R	ATATGTCGACTCAACCAAAAATCTTTAC
P3	AOX1-F	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
P4	AOX1-R	GCAAATGGCATTCTGACATCC
P5	Chym1-F	GAATTCGCTGAAATTACTAGAATCCCATTG
P6	Chym1-R	CTGGCGGCCGCTTAAATAGC
P7	pPiGAPSac	GGTGAGCTCAGATCTCTGCTACTCTGGTCCCAAGTGAA
P8	F_HAC1	ACAACATCAATTCGAAACACAGATCGCAGAAAATGCC CG
P9	R_HACAge	GTACCGGTACCCAAAAAGAATGAAAACGACCC
P10	HAC1_SPL1	TTGCATCATCCAGCAGCACCATTTACCGCTAATGCA
P11	HAC1_SPL2	GTAAATGGTGCTGCTGGATGATGCAACCGATTGAC
P12	G1Fw	GATAGGATCCCCAAACATTTGCTCCCCCTAGTCTCC
P13	pPiGAPR	TGTTTCGAATTGATAGTTGTTCAATTGATTGAAATAGG G
P14	G1_Rv	GATATTCGAAAACCTCACTGCATCCAAGTG
P15	G1ChyF	CACTTGATGCAGTGAGTTTTCGAATATCAAATG AGATTCCTTCAATTTTACTGC
P16	ChyR	GGTTGTCGACTTAAATAGCTTTAGCCAAACCAAC CA
P17	pGAP115-R-Nde	GATACATATGTGTTTTGATAGTTGTTCAATTGATTGA
P18	pGAP115-F-BglII	TCAGCTCCTTACATTTGCACT
P19	CYM_F	GCTGAAATTACTAGAATCCCA
P20	CYM_R	GTTGTCGACTTAAATAGCTTTAGCCAAACCAACCA
P21	MF α 1-F	CATATGAGATTTCTTCAATTTTACTG
P22	MF α 1-R	GTAATTTTCAGCGAATTCAGCTTCAGCCTCTCTTTCTC
P23	MF α 1DF	GATACATATGAGATTTCCATCTATCTTTAC
P24	MF α 1DR	TGGGATTCTAGTAATTTTCAGCTTCAGCCTCTCTTTGTC CAAAGA

поочередно обработаны эндонуклеазами рестрикции EcoRI и NotI «Thermo Fisher Scientific» (США), после чего лигированы по образовавшимся “липким” концам лигазой фага T4 «Thermo Fisher Scientific» (США).

2.5.3. Конструирование вектора pPIC9-GAP-HAC1

При помощи праймеров P8 и P9 был амплифицирован нативный ген HAC1. ПЦР проводилась на 30 циклах: 98°, 3' (денатурация), 98°, 20"; 58°, 30"; 72°, 80"; (амплификация). Затем были амплифицированы экзон 1 при помощи праймеров P8 и P10 и экзон 2 при помощи праймеров P9 и P11 на 30 циклах: 98°, 3' (денатурация), 98°, 20"; 58°, 30"; 72°, 80"; (амплификация). Объединение GAP-промотора и экзонов проводилось при помощи ПЦР при использовании праймера P7 и праймера P9 на 30 циклах: 98°, 3' (денатурация), 98°, 20"; 58°, 30"; 72°, 80"; (амплификация). Конечным продуктом стал сплайсированный ген HAC1 с GAP-промотором, обладающий функциональной активностью. Сплайсированный ген HAC1 был вставлен в вектор pPIC9K по сайтам рестрикции SacI/AgeI.

2.5.4. Конструирование вектора pVR2-G1-Chym1

При помощи праймеров P12 и P14 амплифицировали нативный промотор *P_{GI}*. Ген Chym1 из вектора pTwist амплифицировали при помощи праймеров P15 и P16. Объединение кодирующей последовательности *P_{GI}* с кодирующей последовательностью Chym1 проводили с использованием метода рекомбинантной ПЦР при помощи праймеров P12 и P16. Полученный фрагмент ДНК выделили, гидролизировали рестриктазами NdeI/SalI и клонировали по сайтам BamHI /XhoI вектор pVR2.

2.5.5. Конструирование вектора pVR2-GAP-Chym1

При помощи праймеров P17/P18 был клонирован нативный промотор *P_{GAP}*. Вектор pSF001 был рестрицирован по сайтам NdeI/BamHI. Затем фрагменты ДНК, кодирующие промотор *P_{GAP}* и рестрицированный фрагмент pSF001 были лигированы T4-лигазой в общий вектор pVR2-GAP-Chym1.

2.5.6. Конструирование вектора pSF001 для экспрессии Chym1 в *P. pastoris* под контролем нативного сигнального пептида *mfa1*

Объединение кодирующей последовательности *mfa1* с кодирующей последовательностью Chym-1 проводили с использованием метода рекомбинантной ПЦР. Для этого сначала на матрице g-блока Chym1 получали фрагмент №1, а на матрице плазмиды pPICZαA получали ПЦР фрагмент №2.

Фрагмент №1, размером 1200 пн, получают с использованием праймеров P19 и P20. Праймер P19 комплементарен N-концевой кодирующей последовательности гена Chym1, а праймер P20 - C-концевой последовательности этого гена и фланкирован сайтом SalI.

Табл. 5. Список использованных векторов.

Вектор	Описание	Источник
pPICZαA	Использовался для создания других векторов	«Invitrogen», США Лабораторная коллекция ЛМБ ФИЦ Биотехнологии
pVR2	Использовался для создания других векторов	Любезно предоставлен группой генетической инженерии грибов ФИЦ Биотехнологии
pPIC9K	Использовался для создания других векторов	«Invitrogen», США Лабораторная коллекция ЛМБ ФИЦ Биотехнологии
pPICZα-ФЛА2	Экспрессия рекомбинантной фосфолипазы A2	данная работа
pPICZα-Chym1	Экспрессия рекомбинантного химозина быка	данная работа
pVR2-GAP-Chym1		данная работа
pVR2-G1-Chym1		данная работа
pSF001	Тестирование эффективности преполимерной последовательности при экспрессии рекомбинантного химозина быка	данная работа
pSF002		данная работа
pPICZα-ChymBe	Экспрессия рекомбинантного химозина белухи	данная работа
pPIC9K-GAP-HAC1	Кокспрессия сплайсированного варианта фактора HAC1	данная работа

Фрагмент №2, размером 226 п.н., получали с использованием праймеров P21/P22. Праймер P21 специфичен к N-концевой кодирующей последовательности *mfa1* плазмиды pPICZαA, а праймер P22, соответственно, к С-концевой последовательности *mfa1*.

Полученные с использованием высокоточной ДНК полимеразы Q5 («New England Biolabs Inc», США) фрагменты №1 и №2 выделяли из агарозного геля и использовали в качестве матрицы в ПЦР реакции. После амплификации 5 мкл ПЦР-смеси анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле, где выявляли гомогенный фрагмент длиной около 1300 п.н. Выделенный из геля фрагмент гидролизовали рестриктазами NdeI/SalI, после чего клонировали в вектор pVR2 по сайтам NdeI/XhoI.

Отбор позитивных клонов с целевой вставкой, демонстрирующих устойчивость к ампициллину, проводился среди трансформантов штамма DH10B методом ПЦР-скрининга.

Клоны с вставкой секвенировали, после чего отбирали плазмиду pSF001, содержащую слитую кодирующую последовательность гена *Chym1* и *mfa1* без неспецифических мутаций, вызванных возможными ошибками ПЦР.

2.5.7. Конструирование вектора pSF002 для экспрессии *Chym1* в *P. pastoris* под контролем модифицированного сигнального пептида *mfa1D*

В качестве источника *mfa1D* использовали синтетический фрагмент ДНК, полученный от компании «Twist Bioscience» (США) и синтезированный методом сборки по Гибсону. Объединение кодирующей последовательности *mfa1D* с кодирующей последовательностью *Chym1* выполняли с использованием рекомбинантной ПЦР. На основе фрагмента *mfa1D* амплифицировали ПЦР-фрагмент длиной 250 п.н. с применением праймеров P23/P24, затем объединяли его с фрагментом №1 гена *Chym1* с помощью рекомбинантной ПЦР с праймерами P23/P20. Полученный ДНК-фрагмент выделяли, расщепляли рестриктазами *NdeI/SalI* и клонировали в вектор pVR2 по сайтам *NdeI/XhoI*.

Отбор клонов с нужной вставкой среди полученных ампициллин-устойчивых трансформантов штамма DH10B проводили методом ПЦР скрининга. Полученные положительные клоны секвенировали и отбирали плазмиду pSF002.

Отбор клонов с целевой вставкой среди ампициллин-устойчивых трансформантов штамма DH10B проводили методом ПЦР-скрининга. Положительные клоны секвенировали, после чего отбирали плазмиду pSF002.

2.5.8. Конструирование вектора pPICZα- *ChymBe* для экспрессии прохимозина белухи

Кодон-оптимизированный вариант гена прохимозина белухи *D. Leucas* (A0A2Y9P896) для *P. pastoris* был синтезирован компанией «Twist Bioscience» (США). Для создания экспрессионного вектора ген *ChymBe* рестрицировали рестриктазами *XhoI/NotI*, после чего лигировали в вектор pPICZαA по тем же сайтам *XhoI/NotI*.

2.6. Хроматографические методы работы с белками

2.6.1. Выделение и очистка фосфолипазы TI-Nh

Для подготовки образца использовали 800 мг высушенного яда кобры *Naja haje*, который растворяли в 1,5 мл деионизированной воды и наносили на гель-фильтрационную колонку (4,5 × 150 см) с сорбентом Sepadex G-50 superfine («Amersham Biosciences», Швеция), предварительно уравновешенную 0,1 М аммонийно-ацетатным буфером при pH 6,2. Элюцию выполняли со скоростью 0,5 мл/мин, собирая фракции по 15 мл и определяя их оптическую плотность при 230 нм.

Объединённый элюат (см. рис. 8А) подвергался концентрированию и обессоливанию методом ультрафильтрации с использованием системы VivaScience («Vivaspin 20», полисульфоновые фильтры, «Sartorius AG», Германия), затем лиофилизировали.

Фракции Nh IV, Nh V и Nh VI, выделенные при гель-фильтрации, содержащие активный антикоагулянт, дополнительно разделяли на ионно-обменной колонке (8 × 250 мм, НЕМА-ВЮ 1000 СМ, пористость 10 мкм, «Tessek», Чешская Республика). Разделение выполняли в 5 мМ Tris-HCl буфере (рН 7,5) с градиентным увеличением концентрации NaCl от 0 до 1 М в течение 100 минут. Полученные активные фракции концентрировали и подвергали обессоливали с использованием ультрафильтрационных устройств VivaScience («VivaSpin 2» и «VivaSpin 6»).

Далее очищенный продукт разделяли методом обращённо-фазовой хроматографии на колонке (4,6 × 250 мм, «Jupiter 5 µm», C-18, размер пор 300 Å, «Phenomenex», США). Хроматографическое разделение проводили методом ВЭЖХ в смеси ТФУ/ацетонитрил/вода с содержанием 0,1% ТФУ («Acros Orgaincs», Германия) с градиентным увеличением ацетонитрила («Криохром», Россия) от 15% до 45% в течение 30 минут. На финальном этапе оставшийся летучий растворитель удаляли с помощью лиофильной сушки.

2.6.2. Выделение и очистка секреторной ФЛА2 *S. violaceoruber* из культуральной жидкости

По окончании культивирования для концентрирования культуральной жидкости использовали мембраны тангенциальной фильтрации Midikros 100 kDa («VWR», США). На следующем этапе выделения для оптимизации очистки рекомбинантной ФЛА2 тестировали различные методы ионнообменной хроматографии. Для катион-обменной хроматографии с сорбентом Sepharose SP Fast Flow «GE Healthcare» (США) использовали в качестве элюента раствор 0,01 М цитрат натрия, элюцию проводили в градиенте NaCl от 0 до 1 М. Для оптимизации условий разделения катион-обменной хроматографии рН варьировали в диапазоне 4,0-5,2. Для анион-обменной хроматографии (HiTrap Q XL) использовали в качестве элюента раствор 0,05 М Tris-HCl рН 8,0, элюцию проводили в градиенте NaCl от 0 до 1 М. На следующем этапе очистки использовали хроматографию гидрофобных взаимодействий (Butyl-Sepharose Fast Flow, «GE Healthcare» (США)), ФЛА2 элюировали 50 мМ Tris-HCl, рН 8,0 в градиенте от 3 М NaCl до 0 М NaCl.

2.6.3. Выделение и очистка химозина

Для двухстадийной очистки рекомбинантного химозина применяли сначала ионообменную хроматографию, затем хроматографию гидрофобных взаимодействий. На первом этапе культуральную жидкость подвергали центрифугированию при 12 000 об/мин в течение 15 минут. Затем её разбавляли в соотношении 1:3 с 50 мМ фосфатным буфером (рН 5,5) и загружали на колонку с DEAE-Sepharose («GE Healthcare», США), предварительно сбалансированную тем же буфером. Элюцию осуществляли с использованием 50 мМ фосфатного буфера (рН 5,5), содержащего 0,3 М NaCl.

К полученным после ионообменной хроматографии фракциям добавляли 5 М NaCl до достижения концентрации 2 М, после чего раствор наносили на колонку с Phenyl-Sepharose («GE Healthcare», США), предварительно уравновешенную 2 М NaCl в 50 мМ Na₂HPO₄ (рН 5,5). Элюцию выполняли 50 мМ Na₂HPO₄ (рН 5,5). Фракции анализировали

методом ДСН-ПААГ электрофореза на наличие очищенного химозина и затем объединяли [160].

2.7. Аналитические методы работы с белками

2.7.1. ДСН-электрофорез белков

Электрофоретический анализ белков осуществляли в денатурирующем полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ) по Лэммли [172]. Концентрацию ФЛА2, химозина быка и белухи определяли денситометрическим методом. ДСН-ПААГ-электрофорез белков проводился в камере для вертикального электрофореза «Mini-PROTEAN Tetra» фирмы «Bio-Rad» (США).

Использовали следующие растворы:

1. 30%-ный раствор акриламида;
2. 1,5 М Трис-буфер, pH 8,8;
3. 1 М Трис буфер, pH 6,8;
4. 10% раствор SDS;
5. Электродный буфер, 5-кратный: 0,125 М Трис-HCl, pH 8,4, содержащий 7,2% глицина и 0,5% SDS. Хранили при 4°C, перед употреблением разбавляли в 5 раз водой;
6. Буфер для образца: 0,02 М Трис-HCl pH 6,8, содержащий 10% глицерина, 3% SDS, 100 мМ дитиотреитол (ДТТ) и 0,05% красителя бромфеноловый синий;
7. Фиксирующий раствор: 40% этанол, содержащий 10% уксусной кислоты;
8. Окрашивающий раствор: 0,3% раствор Coomassie Blue, содержащий 40% этанола (v/v) и 10% уксусной кислоты (v/v);
9. Отмывающий раствор: 10% (v/v) раствор уксусной кислоты;
10. Маркер молекулярного веса - FastRuler Middle Range DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США).

Для приготовления 12% разделяющего геля (10 мл) в мерный стакан последовательно добавляли 3,3 мл воды, 2,5 мл 1,5 М Tris-буфера (pH 8,8), 0,1 мл 10% раствора SDS и 4 мл 30% раствора акриламида. Полимеризацию инициировали, добавляя 4 мкл TEMED («Bio-Rad», США) и 100 мкл свежеприготовленного 10% раствора персульфата аммония. Полученный раствор тщательно перемешивали, после чего заливали между стеклянными пластинами (размер 10×7 см, толщина 1 мм). Для выравнивания поверхности сверху добавляли 1 мл дистиллированной воды. Гель формировался в течение 30 минут.

Для приготовления 3 мл концентрирующего геля в мерный стакан добавляли 2,1 мл дистиллированной воды, 0,38 мл 1 М Tris-буфера (pH 6,8), 0,03 мл 10% раствора SDS и 0,5 мл 30% раствора акриламида. Полимеризацию инициировали внесением 3 мкл TEMED и 30 мкл свежеприготовленного 10% раствора персульфата аммония. Полученный раствор заливали поверх разделяющего геля после удаления воды. Полное формирование геля занимало 30 минут.

После полимеризации в лунки геля загружали 20 мкл образцов, предварительно разведенных в буфере (1:4) и инкубированных при +95°C в течение 10 минут. В отдельные лунки добавляли 5 мкл маркера FastRuler Middle Range DNA Ladder («Thermo Fisher

Scientific», США). Электрофорез выполняли в электродном буфере при напряжении 120 В в течение часа. Затем гель извлекали и помещали в фиксирующий раствор на 10 минут. Для визуализации окрашивали в окрашивающем растворе в течение одного часа.

Для детекции полученных результатов гель помещали в отмывающий раствор на 40-50 минут, периодически подогревая. Фиксацию результатов проводили в системе детекции ChemiDoc («Bio-Rad», США), денситометрический анализ результатов ДСН-ПААГ-электрофореза проводили при помощи программы ImageLab («Bio-Rad», США).

2.7.2. Масс-спектрометрия. Подтверждение массы белка

200 мкг белка TI-Nh растворяли в 500 мкл 0,2 М Tris-HCl буфера pH 8,5, 6 М гуанидин-HCl, добавили 40 мкл 6% р-ра дитиозеритрита и инкубировали 24 ч. при комнатной температуре, контрольная смесь не содержала белка TI-Nh. В реакционную и в контрольную смесь добавили по 12 мкл 4-винилпиридина («Sigma», США) и инкубировали 3 ч. при комнатной температуре.

Реакцию останавливали нанесением на обращённо-фазовую колонку. Выделение пиридилэтилированного белка осуществляли с помощью обращённо-фазовой ВЭЖХ, как описано выше.

Анализируемые препараты TI-Nh растворяли в 0,1% трифторуксусной кислоте в концентрации 0,1 мкг/мкл. Молекулярные массы выделенного соединения и его производных определяли с использованием времяпролетного масс-спектрометра Bruker Reflex III («Bruker», Германия), оснащенного ионным источником на основе матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI). Регистрацию положительно заряженных ионов проводили в режиме отражения, применяя 2,5-дигидроксibenзойную кислоту в качестве матрицы. Анализ масс TI-Nh проводился в Группе протеомных исследований ИБХ РАН.

Анализ масс и подтверждение фрагментов аминокислотной последовательности секреторной ФЛА2 *S. violaceoruber*, химозина быка, химозина белухи проводился в центре коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» ФИЦ Биотехнологии РАН при использовании MALDI-TOF/TOF «UltrafleXtreme» («Bruker», Германия).

2.7.3. Определение N-концевой аминокислотной последовательности TI-Nh

N-концевую аминокислотную последовательность пиридилэтилированного белка TI-Nh определяли с использованием автоматического секвенатора 473A (*Applied Biosystems*, США) при помощи секвенирования путём деградации по методу Эдмана. Полученную последовательность сравнивали с данными из базы UniProt (Швейцария) с помощью программы BLASTP (США).

2.7.4. Определение фосфолипазной активности

Фосфолипазную активность определяли согласно методике [173] с использованием флуоресцентного субстрата 1-пальминтоил-2-(10-пиренилдеcanoил)-sn-глицеро-3-

фосфорилхолина (10-pyrene PC, «Molecular probes», Нидерланды). Для измерения флуоресценции к 1 мл буфера, содержащего 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA добавляли 10 мкл субстрата (конечная концентрация 2 мкМ), 10 мкл 10% раствора БСА (конечная концентрация 0,1%), и 6 мкл 1M CaCl₂ (конечная концентрация 6 mM). Реакцию инициировали добавлением 5 мкл раствора 0,5 мг/мл ФЛА2. В качестве положительного контроля использовали кислую ФЛА2 CM2 из яда кобры *N. kaouthia*. Флуоресценцию детектировали на флуоресцентном спектрофотометре Fluoromax-4 («HORIBA Scientific», Великобритания) ($\lambda_{\text{max}}^{\text{ex}}=345$ нм, $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}=395$ нм).

Активность фосфолипаз A2 рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{2 \times 10^{-4} \times (S - S_0) \times V}{F_{\text{max}}} \quad (1)$$

и нормировали на 1 мг белка, где S –увеличение интенсивности флуоресценции в минуту в присутствии фосфолипазы; S₀ –увеличение интенсивности флуоресценции в минуту в контроле; V – объем добавляемого 0,2 mM 10-pyrene PC, мкл; F_{max} – максимальная интенсивность флуоресценции при добавлении 5 мкг кислой ФЛА2 CM2 из яда кобры *N. kaouthia*.

2.7.5. Определение антикоагулянтной активности TI-Nh

Антикоагулянтную активность устанавливали с помощью теста определения тромбинового времени с использованием нормальной цитратной плазмы крови, очищенного фибриногена человека («Технология-Стандарт», Россия) и тромбина человека («Ренам», Россия).

К 100 мкл раствора фибриногена (3 мг/мл) добавляли 20 мкл изучаемой белковой фракции, инкубировали 5 минут при 37°C. Затем добавляли 20 мкл тромбина 1 U/мл и измеряли время образования сгустка. В контрольную пробу вместо фракции яда *N.haje* добавляли 20 мкл деионизованной воды. Для термостатирования ячейки и определения времени формирования сгустка использовали коагулометр «Minilab 701-M» («Техномедика», Россия).

Аналогичные измерения проводились с нормальной плазмой крови: к 100 мкл нормальной плазмы человека («Ренам», Россия) добавляли 20 мкл изучаемой фракции, инкубировали 5 минут при 37 °C. Затем добавляли 20 мкл тромбина 1 U/мл и измеряли время образования сгустка. Для оценки влияния ионов кальция на активность TI-Nh в отношении тромбинового времени добавляли 20 мкл 30 mM CaCl₂, в контрольный образец 20 мкл 15 mM ЭДТА pH 6,0.

Для изучения влияния времени инкубации на процесс ингибирования, смешивали 20 мкл раствора TI-Nh (концентрация от 7,5 до 37,5 нМ) с 20 мкл фибриногена (3 мг/мл). Реакцию инициировали добавлением 20 мкл тромбина (1 U/мл) при 20°C. Фиксировали время формирования устойчивого сгустка.

Отсутствие влияния антикоагулянтной фракции, активной в отношении тромбинового времени, на внешний и внутренний пути свёртывания крови проверяли на нормальной цитратной плазме крови с помощью тестов определения протромбинового времени («ПГ-4/1», «Ренам», Россия) и частично активированного тромбинового времени («АЧТВ-тест», «Ренам», Россия), соответственно согласно инструкции производителя.

К 100 мкл плазмы добавляли 20 мкл раствора TI-Nh в концентрации от 7,5 до 37,5 нМ и индуцировали образование сгустка. В случае с протромбиновым временем индукция проводилась добавлением 20 мкл 0,3 мг/мл тромбопластин-кальциевого реагента («Ренам», Россия), в случае АЧТВ индукция проводилась добавлением 20 мкл 0,1 мг/мл АЧТВ-реагента (эллаговая кислота, «Ренам», Россия) согласно инструкции производителя.

2.7.6. Определение ингибирования TI-Nh в отношении амидолитической активности тромбина

Подготавливали 3 мМ раствор хромогенного субстрата N-(п-тозил)-Gly-Pro-Arg-п-нитроанилида (GPR-pNA, «Sigma-Aldrich», США), растворенного в 10 мМ имидазольном буфере pH 7,4, с различным содержанием (50-300 нг) ингибитора тромбина TI-Nh в конечном объеме 100 мкл. Контрольный образец не содержал TI-Nh. После этого смесь аккуратно перемешивали и инкубировали 5 минут при 37 °С. Бычий тромбин («Ренам», Россия) до конечной концентрации 1 У/мл добавляли и фиксировали изменение поглощения при длине волны в 405 нм на спектрофотометре каждые 30 сек в пяти различных повторах. Из полученных данных был построен график Лайнвивера-Бёрка с использованием пакета программ OriginPro 7.5 (США). Константа ингибирования K_i для ингибирования по смешанному типу была рассчитана из уравнения [174]:

$$K_i = \frac{C}{\frac{K_m^c V^0}{K_m^0 V^c} - 1} \quad (2)$$

Где C – концентрация TI-Nh, K_m^c и V^c – константа Михаэлиса и V_{max} для каждого значения концентрации TI-Nh соответственно.

2.7.7. Определение влияния TI-Nh на агрегацию тромбоцитов.

Для определения агрегации тромбоцитов получали богатую тромбоцитами плазму (PRP) из крови человека. Кровь брали венопункцией из локтевой вены здоровых доноров. Образцы крови здоровых доноров собирали в пластиковые пробирки, содержащие 3,8% цитрата натрия (1:10 цитрат/кровь, «МиниМед», Россия). Плазму, богатую тромбоцитами (PRP), получали центрифугированием (1000 об./мин в течение 15 мин) образцов крови. Полученную PRP плазму использовали в течение 2 ч после приготовления. Для определения влияния TI-Nh на агрегацию тромбоцитов, 50 мкл раствора, содержащего образец (смесь 0,83 У тромбина с 25 мг TI-Nh), добавляли к 450 мкл PRP, инкубированной в термостатируемой ячейке анализатора агрегации тромбоцитов AR2110 («Solar», Беларусь), и регистрировали светопропускание в течение примерно 4 мин. Затем добавляли 50 мкл

раствора ADP (15 мМ) и продолжали запись. В другой серии экспериментов параметры ингибирования определяли, варьируя количество TI-Nh (от 0,1 до 20 нг). Активность тромбина составляла 17,5 мU/мл, а концентрация тромбоцитов — 2×10^5 клеток/мл.

2.7.8. Измерение спектра кругового дихроизма и термостабильности рекомбинантной фосфолипазы A2 из *S. violaceoruber*

Измерение спектра кругового дихроизма проводилось на спектрометрическом поляриметре Chirascan («Applied Photophysics», Великобритания) в диапазоне длин волн 190-250 нм. Все измерения проводились в буфере 5 мМ КВО₃, pH 8,0 при температуре 25°C. Использовались кварцевые кюветы с длиной оптического пути в 0,1 мм. Концентрация белка при измерении составляла 0,45 мг/мл.

Молярная эллиптичность ($\text{градус} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{децимоль}^{-1}$) определялась по формуле

$$[\theta] = [\theta]_{\text{res}} \frac{M_{\text{res}}}{LC} \quad (3)$$

где C — концентрация белка (мг/мл), L — длина оптического пути (см), $[\theta]_{\text{res}}$ — измеренная эллиптичность (в градусах), M_{res} — средняя эллиптичность на основание (Да).

2.7.9. Определение молоко-свертывающей активности химозина

Для данного эксперимента использовали образцы культуральной жидкости, выделенных ферментов как химозина быка, так и химозина белухи.

Для активации химозина и проверки продуктивности отдельных клонов от каждого выбранного клона после ферментации отбирали по 1 мл среды. В пробу добавляли 100 мкл 1 М HCl, понижая pH до 2,0 и инкубировали в течение 2 часов, после чего pH доводили до 5,5, добавлением 90 мкл 1 М NaOH, затем инкубировали ещё 2 часа. Определение активности химозина проводили по методике, разработанной ранее для оценки молоко-свертывающей активности [133].

Обезжиренное сухое молоко («Промакс», Россия) восстанавливали в виде 26% эмульсии, добавляя 0,5 г/л CaCl₂, и доводили pH до 6,5. Затем молоко перемешивали при 25 °C в течение 30 минут, после чего инкубировали при 37 °C 20 минут. К 1 мл восстановленного молока с содержанием 0,1 г/мл хлорида кальция добавляли 100 мкл культуральной жидкости после активации прохимозина до химозина. Фиксировали время образования сгустка при 37 °C. В качестве положительного контроля использовали стандартный раствор химозина с активностью 600 IMCU/мл («Proquiga», Испания) в различных разбавлениях (0,5, 1, 2, 5, 10, 15, 25, 50 IMCU/мл соответственно).

2.7.10. Определение неспецифической протеолитической активности молоко-свертывающих ферментов

Протеолитическую активность определяли согласно протоколу [160] с незначительными изменениями. 1% казеин («Biottech», США) в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (pH

5,5) использовали в качестве субстрата. Образцы химозина разбавляли раствором субстрата в соотношении 1:4 и инкубировали при 35 °C 0, 30, 60, 90 и 180 мин. Реакцию останавливали добавлением ТХУ. Специфичность фермента определяли через соотношение молоко-свертывающей активности к протеолитической, принимая отношение активностей химозина быка за 1,0.

2.7.11. Молекулярное моделирование трехмерной структуры и филогенетический анализ

Методика гомологичного моделирования трехмерных структур была разработана в соответствии с более ранними работами [175, 176]. Модель рекомбинантного белужьего химозина была построена с помощью программного обеспечения «Modeller 9v12» (США). В качестве шаблона использовалась кристаллографическая структура бычьего химозина 4AA8 [154]. Филогенетический анализ был проведен с помощью программного обеспечения «Clustal Omega» (Великобритания).

2.8. Статистическая обработка результатов

Ферментативная активность клонов была определена на основании пяти независимых измерений. Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием программного обеспечения «Origin 2015» (США). Метаболомные характеристики анализировали в трех повторностях. Количественные показатели представлены в формате средних значений (M) с указанием стандартного отклонения ($\pm$ SD).

2.9. Методы получения и анализа метаболомных данных

2.9.1. Экстракция метаболитов из клеток *P. pastoris*

Для экстракции вторичных метаболитов из клеток *P. pastoris* использовали протокол Klavins [177] с некоторыми изменениями. Образцы для анализа внутриклеточных концентраций метаболитов отбирались из ферментера при помощи перистальтического насоса и силиконового шланга (5 мм диаметр, длина 81 см) на скорости 5 мл/сек. 5 мл культуральной жидкости смешивали с 10 мл охлажденного буфера для квенчирования (-80 °C, 0,125 M Tris-HCl 0,055 M NaCl pH 8,2) при 27°C для каждого образца. После охлаждения 2 мл клеточной суспензии (~10 мг биомассы) отфильтрованы на 0,45 мкм фильтрах из ацетата целлюлозы на вакуумном насосе. Клетки промывали охлажденным 60% метанолом, фильтр переносили на сухой лёд. Биомасса образца определялась в 5 повторных взвешиваниях 2 мл образцов культуры после сушки при 105°C.

Замороженные и отмытые клеточные осадки *P. pastoris* на фильтрах хранились в 15 мл пробирках при -80°C. 4 мл кипящего 75% этанола наливали и тщательно ресуспендировали на вортексе 20 с. Далее пробирки с этанолом ставили на водяную баню 85°C и нагревали в течение 3 минут. Снова перемешивали на вортексе 10 сек и 90 сек нагревали в бане. Снова перемешивали на вортексе 10 сек и 3 мин нагревали в бане. Пробирки помещали на сухой лёд на 3 мин для быстрого охлаждения, затем осадок

осаждали $4,000 \times g$ 10 минут при -20°C . Супернатант переносили в предварительно охлажденные 2 мл пробирки по 1,5 мл. Экстракты были высушены досуха при давлении менее 1 мбар на вакуумной центрифуге.

2.9.2. Детекция вторичных метаболитов методами масс-спектрометрии

После сушки экстракты клеточных осадков *P. pastoris* растворялись в 30 мкл раствора А (0,1% HCOOH в воде) и экстрагированные метаболиты анализировались при помощи масс-спектрометрического анализа. Разделение образцов происходило при помощи ВЭЖХ на обращено-фазовой колонке и нормально-фазовой колонке.

Обращённо-фазовое разделение методом ВЭЖХ с последующим масс-спектрометрическим анализом проводилось на квадрупольно-времетраплетном масс-спектрометре высокого разрешения Impact II («Bruker Daltonik», Germany), оснащённом УВЭЖХ Elute («Bruker Daltonik», Германия). Для разделения использовали обращённо-фазовую колонку Acquity HSS T3 $2,1 \times 100$ мм 1,8 мкм 90 Å («Waters», Ирландия). Использовались следующие параметры хроматографического разделения: скорость потока 0,25 мл/мин, градиентное элюирование от 2% до 100% раствора Б за 15 мин (раствор А: 0,1% раствор HCOOH в воде, раствор Б: 0,1% раствор HCOOH в CH_3CN), температура колонки 40°C , объём вкола 5 мкл. Параметры ионизации и детекции ионов были следующими: ионизация электрораспылением, регистрация в режиме положительных ионов, потенциал на капилляре 4,5 кВ, распыляющий газ – N_2 под давлением 2 бар, осушающий газ – N_2 , скорость подачи 8 л/мин 200°C , диапазон сканирования m/z 20-1500, частота сканирования для полного спектра – 8 Гц, автоматический режим регистрации спектров второго порядка (активация соударением) с динамической частотой регистрации 6-12 Гц, столкновительный газ – N_2 , энергия 20 эВ, автоматическая внутренняя калибровка по кластерам HCOONa . Обработка полученных спектров проводилась с использованием программы Bruker Compass Metaboscpe 4.0.4 («Bruker Daltonik», Германия).

Нормально-фазовое разделение методом ВЭЖХ с последующим масс-спектрометрическим анализом проводилось на квадрупольно-времетраплетном масс-спектрометре высокого разрешения Impact II («Bruker Daltonik», Germany), оснащённом УВЭЖХ Elute («Bruker Daltonik», Германия). Для разделения использовали нормально-фазовую колонку Acquity BEH HILIC $2,1 \times 100$ мм 1,7 мкм 130 Å («Waters», Ирландия). Использовались следующие параметры хроматографического разделения: скорость потока 0,25 мл/мин, градиентное элюирование от 95% до 5% Б за 15 мин (раствор А: 0,1% HCOOH в воде, раствор Б: 0,1% раствор HCOOH в CH_3CN), температура колонки 40°C , объём вкола 5 мкл. Параметры ионизации и детекции ионов были следующими: ионизация электрораспылением, регистрация в режиме положительных ионов, потенциал на капилляре 4,5 кВ, распыляющий газ – N_2 под давлением 2 бар, осушающий газ – N_2 , скорость потока 8 л/мин 200°C , диапазон сканирования m/z 20-1500, частота сканирования для полного спектра – 8 Гц, автоматический режим регистрации спектров второго порядка (активация соударением) с динамической частотой регистрации 6-12 Гц, столкновительный газ – N_2 , энергия 20 эВ, автоматическая внутренняя калибровка по кластерам HCOONa .

Обработка полученных спектров проводилась с использованием программы Compass Metaboscape 4.0.4 («Bruker Daltonik», Германия).

После получения значений интенсивности сигнала для отдельных метаболитов, значения нормировались на массу сухого веса образца, из которого происходила экстракция метаболитов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Антикоагулянтная фосфолипаза A2 TI-Nh, ее функциональная характеристика

В змеином яде присутствует достаточно много различных компонентов, в число которых входят и ФЛА2. Несмотря на структурное сходство ФЛА2 между собой, в змеином яде они выполняют ряд различных функций, начиная от неспецифического цитотоксического действия и основанного на нем специфического действия на мышцы, и заканчивая нейротоксическим и антикоагулянтным действием. Антикоагулянтное действие ФЛА2 достаточно широко представлено в ряду ферментов яда кобр, однако его действие может быть обусловлено различными механизмами. В рамках данной работы удалось найти и охарактеризовать первую антикоагулянтную ФЛА2, которая является ингибитором тромбина.

В ходе скрининга ядов кобр на различные типы биологической активности было установлено, что яд египетской кобры *N. haje* отличается способностью существенно (более чем стократно - с 14,5 секунд до полутора часов) увеличивать тромбиновое время коагуляции нормальной плазмы крови человека. Учитывая важность изучения новых соединений с подобной функцией, было предпринято фракционирование яда египетской кобры с целью выделения индивидуального компонента с указанным типом активности и его наработки для дальнейшей структурной и функциональной характеристики.

Для разделения и очистки компонентов яда использовался набор хроматографических методов (Рис. 8). На первом этапе использовали гель-фильтрационную хроматографию, посредством которой активные фракции отделялись от токсической и высокомолекулярной фракций, затем катионо-обменную хроматографию, позволяющую разделить основные белки фракций по заряду молекул, и окончательную очистку осуществляли обращённо-фазовой хроматографией. На каждом этапе определяли антикоагуляционную активность полученных фракций.

После разделения гель-фильтрационной хроматографией (Рис. 8А, Табл. 6), элюат объединяли в 8 фракций:

Табл. 6. Фракции при очистке гель-фильтрационной хроматографией лиофилизированого яда *Naja haje*.

Номер фракции	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Про-бирки	62-79	80-86	87-91	92-99	100-108	109-124	125-133	125-133

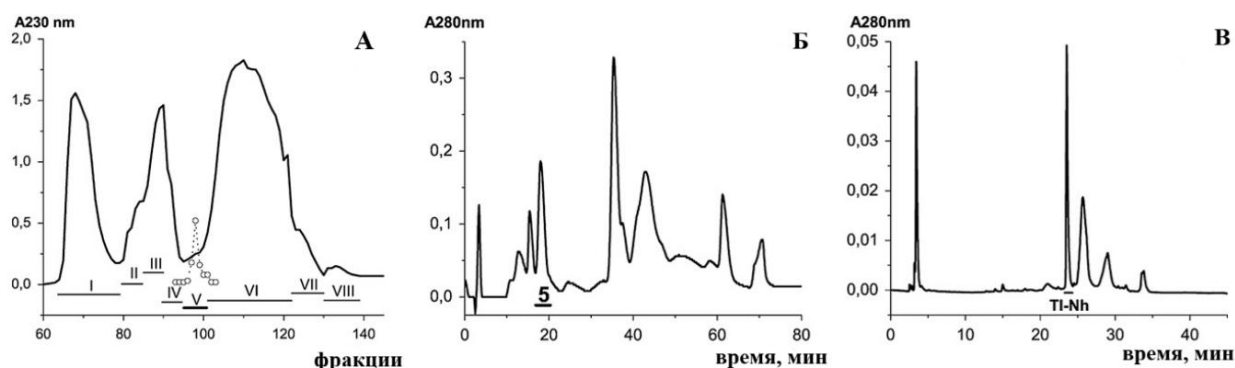


Рис. 8. Хроматографическая очистка TI-Nh. А. Профиль элюции гель-фильтрации (Sephadex G50 sf) цельного лиофилизированного яда египетской кобры. Пунктиром обозначена антикоагулянтная активность. Римскими цифрами обозначен номер фракции. Жирной чертой отмечена активная фракция V, содержащая TI-Nh. Б. Профиль элюции белков фракции Nh.V. на катионо-обменной колонке «НЭМА-БИО 1000 СМ». Чертой отмечен пик «5» - активная фракция. В. Профиль элюции белков фракции Nh.V.5 при обращенно-фазовой хроматографии на колонке «Phenomenex C18». Чертой отмечен пик белка TI-Nh.

После лиофилизации, обессоливания и концентрации фракций I-VIII на полупроницаемых мембранах «VivaScience», активность фракций была проверена в тесте тромбинового времени (с использованием как нормальной плазмы крови человека, так и очищенного фибриногена человека). Лишь 3 фракции: Nh.IV., Nh.V., Nh.VI проявили способность увеличивать тромбиновое время, причем самой активной в обоих вариантах тестирования была фракция Nh.V. Тромбиновое время для этой фракции при разбавлении с шагом разбавления 1/3 было в 4 раза больше, чем для Nh.IV. и Nh.VI.

На следующем этапе фракции Nh.IV., Nh.V., Nh.VI. разделяли с помощью ионно-обменной ВЭЖХ. В результате хроматографии было получено несколько фракций (**Рис. 8Б** для разделения фракции Nh.V.). Определение активности с использованием 1 U/мл тромбина и 3 мг/мл фибриногена показало, что лишь одна фракция (фракция 5, **Рис. 8Б**) обладает антикоагулянтной активностью.

Окончательную очистку активного белка фракции TI-Nh (здесь и далее TI-Nh) осуществляли при помощи обращенно-фазовой хроматографии (**Рис. 8В**). Интересующую активность проявляет белок первого основного пика на хроматограмме, элюированного с колонки при 25% ацетонитрила. На основании хроматографического поведения белка можно сделать заключение о наличии у него основных и, в некоторой степени, гидрофильных качеств. При обнаружении гликозилированных остатков методом окраски геля после SDS-электрофореза (Pierce Glycoprotein Staining Kit, «Thermo Scientific», США) гликозилированных остатков TI-Nh не было обнаружено.

Молекулярная масса полученного белка, определённая методом MALDI масс-спектрометрии, составила 14350 Да (**Рис. 9А**). После пиридилэтилирования белка с полностью восстановленными SH-группами остатков цистеина мол. масса составила 15844 Да. Таким образом, мол. масса изменилась на 1494 Да (**Рис. 9Б**), и (с учётом увеличения

мол. массы на 105,1 Да в расчёте на один добавленный пиридилэтильный остаток) в среднем прореагировало примерно 14 SH-групп на одну молекулу белка.

Таким образом, белок яда египетской кобры, ответственный за ингибирование образования фибринового сгустка, имеет молекулярную массу 14,4 кДа и содержит 14 остатков цистеина в составе единой полипептидной цепи, которые в нативном состоянии, очевидно, образуют семь внутримолекулярных дисульфидных связей. Такая молекулярная масса белка и количество дисульфидных связей характерны для ФЛА2 ядов змей.

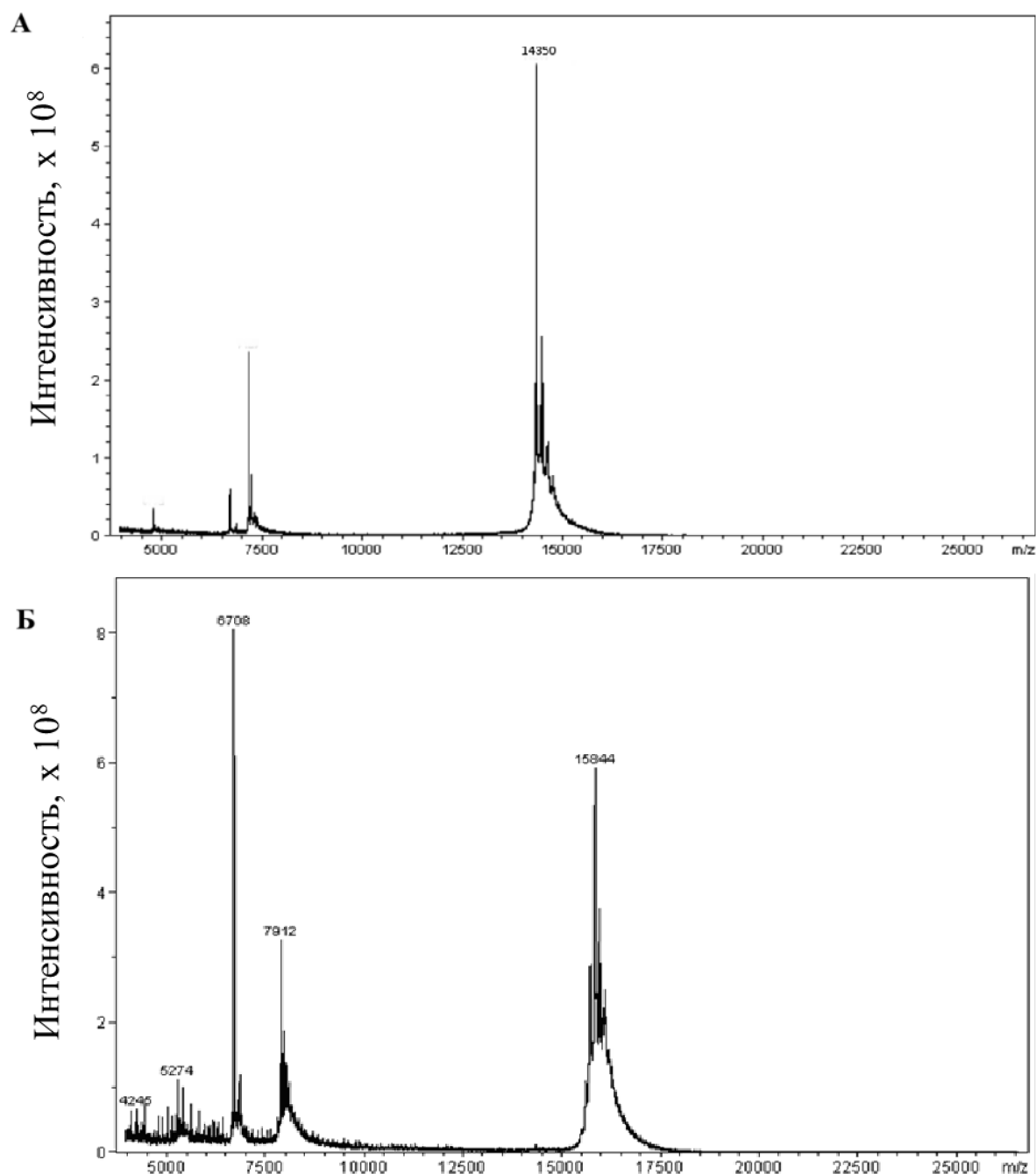


Рис. 9. Детекция и определение количества дисульфидных связей в TI-Nh А - MALDI масс-спектрограмма белка TI-Nh, Б - MALDI масс-спектрограмма белка TI-Nh после пиридилэтилирования. Пик 6708 Да – внутренний стандарт.

После модификации цистеиновых остатков методом пиридилэтилирования была выявлена аминокислотная последовательность N-концевого фрагмента белка. Полученные данные сопоставили с известными белковыми последовательностями, представленными в базе данных «Uniprot» (Швейцария) (Табл. 7).

Табл. 7. Сравнение N-концевых последовательностей белка TI-Nh и известных ФЛА2. Представители родов *Naja*, *Aspidelaps*, *Pseudechis* принадлежат семейству змей *Elaphidae*. *Tetraodon nigroviridis*, *Dicentrarchus labrax* принадлежат классу костистых рыб.

Номер в базе данных Uniprot	Вид источника яда	N-концевая последовательность	Функция белка
TI-Nh	<i>Naja haje</i>	NVYQYRKMLQCAMPNGGP-- FXE	Ингибитор тромбина, ФЛА2
Q91900	<i>Naja sputatrix</i>	NLYQFKNMIQCTVPNRSWWDF AD	Блокатор М-холинорецептора, ФЛА2
Q10756	<i>Naja sputatrix</i>	NLYQFKNMIQCTVPNR-----	ФЛА2 (по сходству)
Q92084	<i>Naja sputatrix</i>	NLYQFKNMIQCTVPNRSWWHF AD	ФЛА2
P00600	<i>Naja melanoleuca</i>	NLYQFKNMIQCTVPNRSWWHF AN	ФЛА2
P07037	<i>Aspidelaps scutatus</i>	NLYQFKNMIQCTVPNRSWWHF AD	ФЛА2
P00596	<i>Naja kaouthia</i>	NLYQFKNMIQCTVPNRSWWDF AD	ФЛА2
Q9PWS2	<i>Naja kaouthia</i>	NLYQFKNMIQCTVPNRSWWDF AD	ФЛА2
Q92086	<i>Naja sputatrix</i>	NLYQFKNMVQCTVPNRSWWDF AD	ФЛА2
Q92085	<i>Naja sputatrix</i>	NLYQFKNMVQCTVPNRSWWHF AD	ФЛА2
Q5G291	<i>Naja sagittifera</i>	NTYQFRNMIQCTVPSRSWWDF AD	Распознает N-ацетилглюкозамин, ФЛА2
P20257	<i>Pseudechis australis</i>	NILQFRKMIQCANKGSRAA- WHY	ФЛА2

Номер в базе данных Uniprot	Вид источника яда	N-концевая последовательность	Функция белка
P04057	<i>Pseudechis australis</i>	NILQFRKMIQCANKGSRAA-WHY	ФЛА2
Q45Z19	<i>Pseudechis australis</i>	NILQFRKMIQCANKGSRAA-WHY	ФЛА2
Q4SE94	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	ALNQFRKMILCVMPDSSPI-FDY	Не определено
Q9YH62	<i>Dicentrarchus labrax</i>	ALNQFRKMILCVMPDSWPV-FDY	Предположительно ФЛА2

Как видно из **Табл. 7**, N-концевая аминокислотная последовательность выделенного белка обладает высокой степенью гомологии с последовательностями других ФЛА2 из яда змей, и в то же время не имеет 100% гомологии ни с одной из них. Видно, что аминокислоты в положении 4, 8, 11 идентичны во всех представленных последовательностях змеиных ФЛА2, а аминокислоты в положении 2, 5, 6, 9, 21 представляют собой консервативные замены. Высококонсервативный остаток Cys-11 характерен для фосфолипаз I группы, что четко указывает на принадлежность TI-Nh к фосфолипазам именно этой группы. Однако, TI-Nh имеет замену остатка Asp-7, консервативного для ФЛА2 I группы ядов змей рода *Naja*, на положительно заряженный остаток лизина, что характерно для фосфолипаз II группы.

Для того, чтобы проверить, действительно ли белок TI-Nh является ФЛА2, мы измерили его фосфолипазную активность (**Табл. 8**). Для измерения активности использовали синтетический флуоресцентно меченный фосфатидилхолин (10-pyrene PC).

При использовании в качестве субстрата 10-pyrene PC белок TI-Nh проявляет низкую активность, сопоставимую с активностью нейротоксичной фосфолипазы β -бунгаротоксина. В целом, это не удивительно, поскольку синтетический флуоресцентный субстрат, использованный в тесте, *a priori* не является природным субстратом. Кроме того, известно, что для разных флуоресцентных субстратов активность одной и той же ФЛА2 может сильно варьировать [173].

Также нельзя исключить, что TI-Nh полностью лишён фосфолипазной активности. Так, белок, структурно отнесенный к ФЛА2 из яда *Bothrops asper* проявляет слабый антикоагулянтный эффект, но не имеет фосфолипазной активности [178]. В то же время, наличие слабой фосфолипазной активности TI-Nh может быть объяснено наличием примеси (доли процента) активной ФЛА2. Так, например, ФЛА2 CM-2 из яда *Naja kaouthia* обладает фосфолипазной активностью, превышающей активность TI-Nh на 5 порядков.

Табл. 8. Сравнение фосфолипазных активностей различных ФЛА2 при использовании в качестве субстрата 10-pyrene PC.

Фосфолипаза	Вид змеи	Активность фосфолипазы, ммоль10-PC/мин*мг
TI-Nh	<i>Naja haje</i>	0,0012
CM-2	<i>Naja kaouthia</i>	165,2
β-бунгаротоксин	<i>Bungarus multicinctus</i>	0,004
PA2	<i>Naja naja</i>	250*
Кротоксин	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	4*

*-по данным [173]

Известно, что целый ряд ФЛА2 из ядов змей обладает цитотоксичностью [179], а некоторые ФЛА2 индуцируют рост нейритов в клетках линии PC-12 феохромоцитомы крысы [180]. Проверка на цитотоксичность и влияние на рост дендритных отростков клеток феохромоцитомы PC-12 показывает, что, в отличие от CM-2, начинающей проявлять цитотоксические свойства уже в концентрации 10^{-8} М, фосфолипаза TI-Nh не проявляет цитотоксической активности на клетки PC-12 при концентрациях вплоть до $1,5 \times 10^{-5}$ М. Однако, в той же степени, что и CM-2, TI-Nh останавливает пролиферацию клеток и вызывает рост нейритов. Индукция роста нейритов белком TI-Nh может рассматриваться как свидетельство наличия фосфолипазной активности у этого белка. Предыдущие исследования продемонстрировали, что лизофосфатидилхолин, который образуется в результате деградации мембранных фосфолипидов под влиянием ФЛА2, способствует росту нейритов [181].

С целью установления механизма антикоагулянтного действия TI-Nh было проведено детальное исследование его влияния на процесс коагуляции. Измерение тромбинового времени в присутствии TI-Nh (**Рис. 10**) показало, что значительное (в 6-10 раз) уменьшение скорости образования сгустка происходит уже при концентрации 20 нМ TI-Nh при концентрации тромбина 1 U/мл и физиологической концентрации фибриногена (3 мг/мл).

Детальное исследование антикоагулянтных свойств TI-Nh показало, что белок специфически ингибирует формирование кровяного сгустка, при этом существенно увеличивается тромбиновое время, а ПТВ и АЧТВ время остаются неизменными (**Рис. 10**). Аналогичные результаты были получены при использовании фибриногена вместо плазмы крови. Поскольку TI-Nh довольно сильно увеличивает тромбиновое время, при этом слабо влияя на ПТВ и АЧТВ, это говорит о высокой специфичности по отношению к тромбину. В то же время другие ингибиторы тромбина в терапевтических концентрациях (как правило в меньших чем у TI-Nh) влияют на ПТВ и АЧТВ.

Использование пара-нитроанилидных субстратов сериновых протеиназ позволило получить количественные данные об ингибиторной активности TI-Nh. Было установлено, что TI-Nh является специфичным ингибитором тромбина и не ингибирует другие сериновые протеазы, такие как трипсин и химотрипсин. Константа ингибирования (K_i) гидролиза синтетического субстрата тромбином быка составила 72,8 нМ. Таким образом, TI-Nh ингибирует действие тромбина, как на синтетические субстраты, так и на фибриноген. Кроме того, тесты проведенные с использованием плазмы крови, обогащенной тромбоцитами, показали, что TI-Nh специфически подавляет тромбин-индуцируемую агрегацию тромбоцитов (IC_{50} 0,2 нМ), не влияя при этом на АДФ-активированную агрегацию.

TI-Nh в низких концентрациях (до 30 нМ) практически не влияет на АЧТВ и протромбиновое время, в то же время, в высоких концентрациях вызывает лишь незначительное увеличение показаний этих тестов (Рис. 10). Это, вероятнее всего, объясняется прямым действием на тромбин, т.е. задержки АЧТВ и протромбинового времени – естественное следствие увеличения тромбинового времени. Фракция яда, содержащая TI-Nh, не оказала значимого воздействия на активацию системы комплемента сыворотки крови ни по классическому, ни по альтернативному пути. Можно утверждать, что TI-Nh избирательно ингибирует формирование фибринового сгустка под действием тромбина, но не влияет на другие ферменты (и их комплексы) каскадов свёртывания крови и системы комплемента, относящиеся, как и тромбин, к сериновым протеазам.

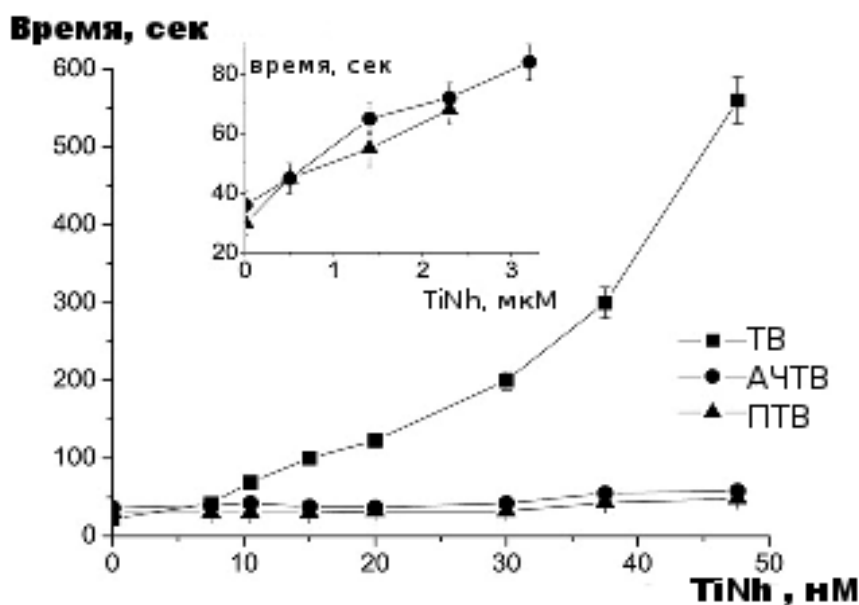


Рис. 10. Зависимость протромбинового (ПТВ), АЧТВ, тромбинового (ТВ) времени образования сгустка от концентрации ингибитора TI-Nh. При измерении тромбинового времени концентрация тромбина - 1 U/мл, концентрация фибриногена - 3 мг/мл. При измерении АЧТВ и протромбинового времени используется цельная плазма.

Предполагается, что исследование влияния TI-Nh на процесс гидролиза низкомолекулярного пептидного хромогенного субстрата тромбином может помочь понять механизм ингибирования. Если скорость расщепления хромогенного субстрата в

присутствии TI-Nh не изменится, это будет свидетельством того, что ингибитор каким-либо образом связывает или модифицирует фибриноген.

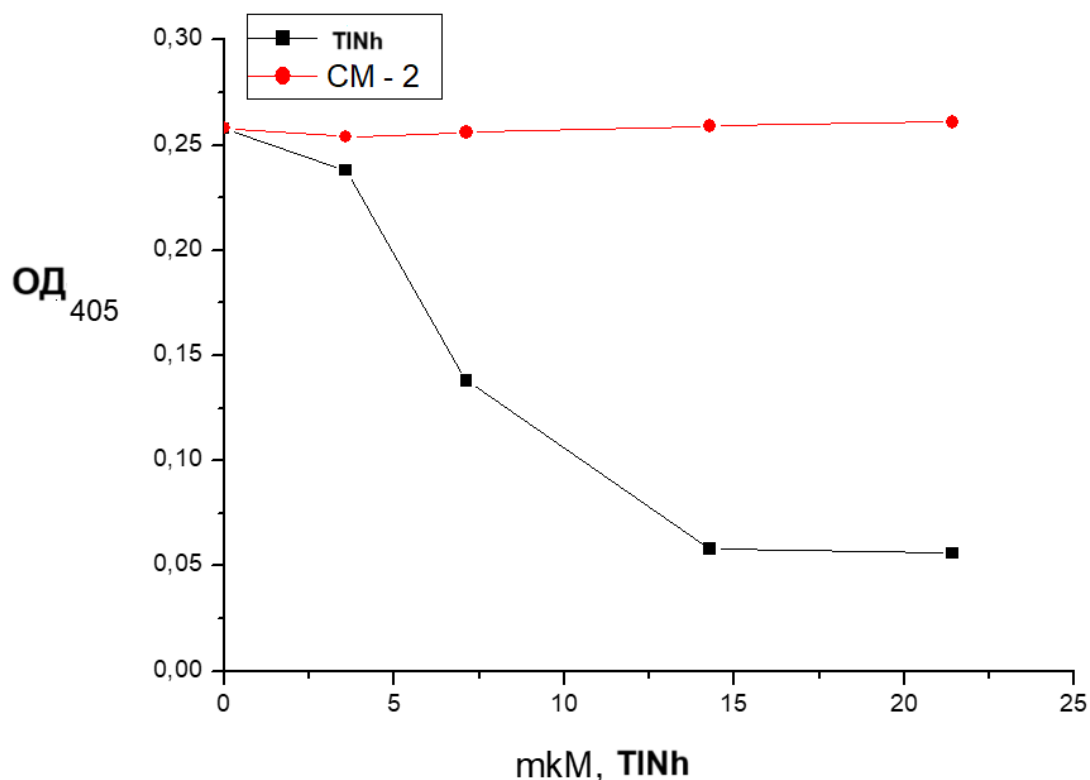


Рис. 11. Изменение активности тромбина в зависимости от концентрации TI-Nh при концентрации N-Tos-Gly-Pro-Arg-pNA 1мМ и концентрации тромбина 0,5 ед./мл. Фосфолипаза A2 CM-2 из яда *Naja kaouthia* использована в качестве отрицательного контроля.

Однако в присутствии TI-Nh активность тромбина по отношению к хромогенному субстрату сильно снизилась (**Рис. 11**), что является фактом, свидетельствующим в пользу механизма, при котором мишенью для данного ингибитора является тромбин и его активный центр или участок связывания фибриногена на тромбине. Влияние кальция на ингибирующую активность не наблюдалось (активность не изменялась ни в присутствии 5 мМ ЭДТА, ни в присутствии 10 мМ CaCl₂).

Чтобы установить тип ингибирования, была определена амидолитическая активность тромбина быка на *p*-нитроанилидном субстрате в отсутствии и в присутствии TI-Nh в двух концентрациях. Графики зависимости обратных величин скорости реакции $1/[V]$ от концентрации субстрата $1/[S]$ приведены на **Рис. 12**. Пересечение всех трёх прямых во втором квадранте координат вблизи оси абсцисс говорит о смешанном типе ингибирования (тип III_i [174]). Это означает, что TI-Nh практически не оккупирует активный центр тромбина. Однако, «чистое» неконкурентное ингибирование встречается редко, поскольку неконкурентный ингибитор влияет на пространственную структуру

фермента. Константа ингибирования K_i была рассчитана для ингибирования по смешанному типу по методу, предложенному в [174], и составила $72,8 \times 10^{-9}$ М.

Чтобы выявить влияние присутствия следов возможных плазменных кофакторов, таких как антитромбин III, на ингибиторный потенциал TI-Nh (примесь которых в коммерческом препарате тромбина не могла быть полностью исключена), измерялась амидолитическая активность тромбина, но с добавлением малых количеств цельной плазмы как источника антитромбина III. Отсутствие значимых изменений в ингибирующей активности TI-Nh говорит о том, что данный ингибитор не требует кофактора, таким образом, TI-Nh является прямым ингибитором тромбина.

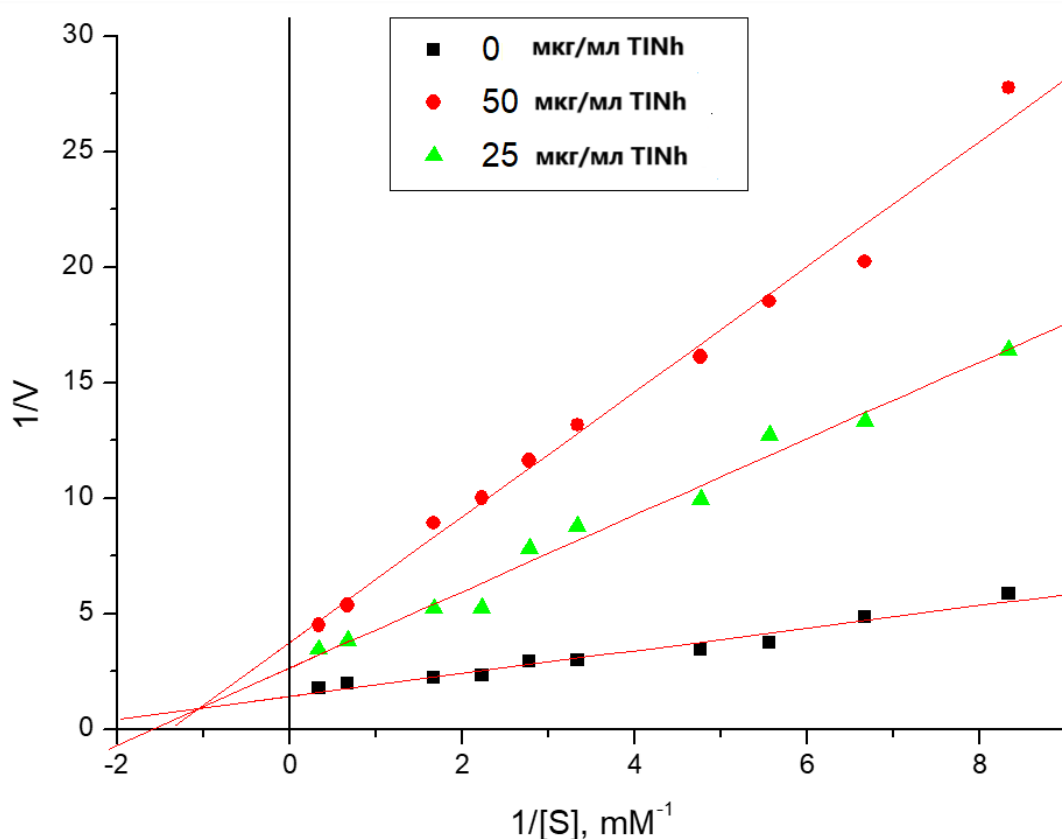


Рис. 12. Зависимость скорости гидролиза хромогенного субстрата (N-Tos-Gly-Pro-Arg-pNA) от его концентрации. Скорость гидролиза измерена при различных концентрациях TI-Nh. Линеаризация в двойных обратных координатах. Каждая точка - среднее от трёх измерений. Полученный результат - $K_i = 72,8 \times 10^{-9}$ М.

На данный момент известно три способа воздействия ФЛА2 из яда змей на агрегацию тромбоцитов. Первый, и самый распространенный - индукция агрегации тромбоцитов за счет высвобождения архидоновой кислоты и предшественников тромбоксана A₂. Второй – наличие бифазного эффекта, в котором на первой стадии происходит обратимая агрегация, впоследствии сменяющаяся ингибированием агрегации, вызываемой архидоновой кислотой, АДФ, коллагеном. Третий – антиагрегационный эффект, частично зависящий от фосфолипазной активности [182].

Ингибиторный эффект TI-Nh не зависит от присутствия ионов Ca^{2+} , в то время как удаление ионов Ca^{2+} из среды критически сказывается на фосфолипазной активности секретируемых фосфолипаз A₂. Таким образом, тромбин-ингибирующие свойства TI-Nh не зависят от фосфолипазной активности. Это в свою очередь не противоречит предположению о существовании неферментативных антикоагулянтных ФЛА₂, тогда как для проявления антикоагулянтных свойств большинству ФЛА₂ требуется наличие ферментативной активности.

Тромбиновое время для богатой тромбоцитами плазмы и плазмы без тромбоцитов не отличалось при одних и тех же концентрациях TI-Nh. Можно считать, что тромбоциты практически не влияют на процесс взаимодействия TI-Nh с тромбином. TI-Nh не оказал влияния на агрегацию тромбоцитов, вызываемую тромбином, в отличие от ботроджарацина, который является сильным ингибитором агрегации тромбоцитов [183]. Не обнаружено также влияния TI-Nh на агрегацию тромбоцитов, вызываемую АДФ или фибриногеном.

Поэтому нельзя с уверенностью сказать, что TI-Nh ингибирует взаимодействие тромбина с PAR-рецепторами, хотя и фибриноген, и PAR связываются с экзосайтом I тромбина. Можно предположить, что это всё-таки происходит, TI-Nh, как ФЛА₂, одновременно индуцирует образование архидоновой кислоты и других предшественников тромбоксана A₂, таким путём восстанавливая скорость агрегации тромбоцитов.

Отдельно следует подчеркнуть высокую удельную активность выделенного белка. Несмотря на низкое содержание в яде (из 800 мг сухого яда удаётся выделить немногим более 400 мкг белка, т.е. около 0,05%), его эффект проявляется как в составе цельного яда, так и в содержащих его фракциях, причем даже в следовых количествах (фракции IV и VI).

Для увеличения в 10 или более раз тромбинового времени 25 мкл нормальной плазмы крови человека, либо эквивалентного количества раствора фибриногена, достаточно присутствия 50 нг выделенного белка, или 2 мкмоль/мл («сильная» антикоагулянтная ФЛА₂ по классификации [184]). Идентичность результатов, полученных с использованием как нормальной плазмы крови, так и очищенного фибриногена, а также практически полное отсутствие влияния на другие сериновые протеазы каскадов системы комплемента и свёртывания крови, позволяет утверждать, что выделен не только высокоактивный, но и высокоспецифичный ингибитор тромбина.

Фосфолипаза TI-Nh была выделена при помощи стандартной трехфазной схемы выделения токсинов из змеиного яда (гель-фильтрация, ионообменная хроматография, обращённо-фазовая хроматография). В результате исследования белка TI-Nh удалось определить его принадлежность к классу ФЛА₂ (методами масс-спектрометрии, ДСН гель-электрофореза, а также по наличию 7 дисульфидных мостиков и по анализу N-концевой последовательности).

Было показано, что TI-Nh специфически ингибирует формирование кровяного сгустка, при это изменяется тромбиновое время, а протромбиновое (ПТВ) и частично-активированное протромбиновое время (АЧТВ) остаются неизменными. Также данные результаты подтверждены тестами на тромбин-фибриногенной системе. Для того чтобы

локализовать мишень данной ФЛА2 были проделаны тесты на пара-нитроанилидных субстратах, в результате которых было показано, что TI-Nh является специфичным ингибитором тромбина с константой ингибирования $K_i=72,8$ нМ, но при этом не ингибирует другие сериновые протеазы, такие как трипсин и химотрипсин. Проверка ферментативной и цитотоксической активности показала, что в отличие от большинства ФЛА2 TI-Nh обладает относительно слабой ферментативной активностью.

Кроме того, проведенные тесты на фракциях крови, обогащенных тромбоцитами, показали, что TI-Nh специфически подавляет тромбин-индуцируемую агрегацию тромбоцитов, не влияя при этом на АДФ-активированную агрегацию тромбоцитов (**Рис. 13**).

TI-Nh довольно сильно увеличивает тромбиновое время, при этом слабо влияет на протромбиновое время и АЧТВ, что говорит о высокой специфичности по отношению к тромбину. Так, другие ингибиторы тромбина влияют на ПТВ и АЧТВ в терапевтических концентрациях. Интересно также и то, что TI-Nh ингибирует действие тромбина во всех направлениях – как на синтетические субстраты, так и на фибриноген.

Таким образом, выделенный белок является антикоагулянтной ФЛА2, но по механизму действия его можно считать уникальным среди антикоагулянтных ФЛА2. Это первая ФЛА2, которая ингибирует образование сгустка фибрина на стадии гидролиза фибриногена тромбином, также это первая обнаруженная ФЛА2, ингибирующая тромбин. При этом, белок не влияет ни на внутренний, ни на внешний путь активации свертывания крови, и не влияет на образование протромбина, что свидетельствует в пользу механизма ингибирования без участия фосфолипазной активности. Последнее подтверждается тем, что в системе очищенных белков тромбин-фибриноген, не содержащей фосфолипидов, выделенный белок TI-Nh так же активен, как и в случае использования цельной плазмы крови. Также не влияет на силу ингибирующего эффекта добавление ЭДТА, хотя удаление ионов кальция из среды является критическим для проявления фосфолипазной активности. При этом добавление TI-Nh к уже сформированному сгустку не приводит к его заметным изменениям.

Ингибиторный эффект TI-Nh не зависит от присутствия ионов Ca^{2+} , в то время как удаление ионов Ca^{2+} из среды критически сказывается на фосфолипазной активности секреторных ФЛА2. По-видимому, тромбин-ингибирующие свойства не зависят от фосфолипазной активности. Это в свою очередь не противоречит данным Kini [184] о существовании неферментативных антикоагулянтных фосфолипаз в противовес

большинству ферментативных. Таким образом, TI-Nh во всех отношениях является уникальной фосфолипазой.

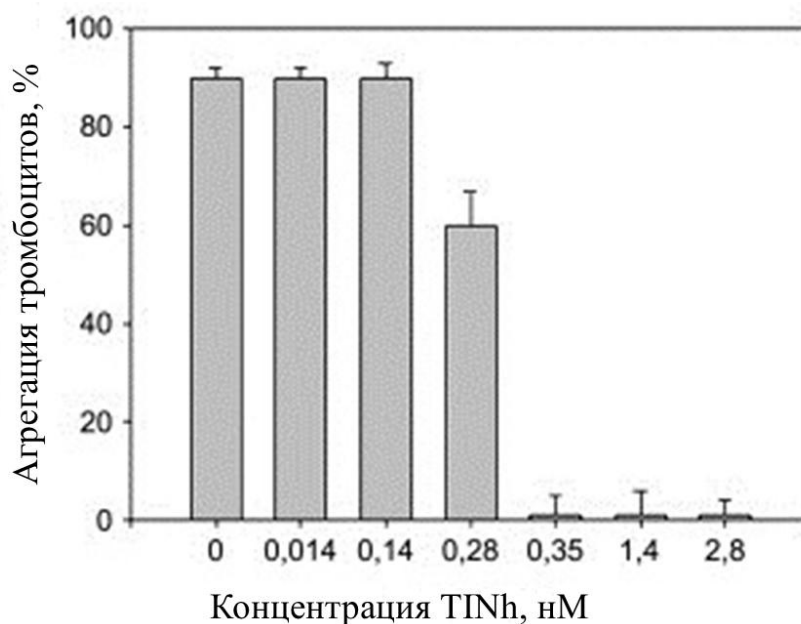


Рис. 13. Ингибирование агрегации тромбоцитов под действием TI-Nh.

TI-Nh не проявляет цитолитической активности. При проявлении специфического эффекта ингибирования тромбина в концентрациях до 15 мкМ не наблюдалось цитотоксических эффектов, характерных для других ФЛА2 яда змей. Несмотря на низкий уровень ферментативной активности, он способен вызывать нейрональную дифференцировку клеток феохромоцитомы РС-12. Возможно, нейрональная дифференцировка в данном случае происходит через альтернативный механизм, не зависящий от ферментативных свойств TI-Nh [180].

3.2. Экспрессия рекомбинантной секреторной фосфолипазы A2 в *P. pastoris*

Сконструированный вектор pPICZα-ФЛА2 был линейаризован по сайту рестрикции BstXI, после чего проведена трансформация компетентных клеток штамма X-33 *P. pastoris*. В результате отбора получено 30 клонов, содержащих вектор pPICZα-ФЛА2, которые были перенесены на чашки с питательной средой YPDS, содержащей зеонин (200 мкг/мл). Для подтверждения интеграции вставки в геном отобранные клоны X-33/pPICZα-ФЛА2 *P. pastoris* анализировали методом ПЦР.

Оптимизация условий культивирования X-33/pPICZα-ФЛА2 позволила достичь высокой продукции целевого ФЛА2, что делает данный штамм перспективным для промышленного применения. В культуральной жидкости уровень активности рекомбинантной ФЛА2 составил 2,2 ед./мл. В результате подобранных условий производства штамма-продуцента удалось достичь значительного выхода целевого продукта, который составил 20% от общего белка клеточной массы.

Методы анионообменной хроматографии проявили себя значительно лучше по сравнению с методами катионообменной хроматографии.

После концентрирования при помощи тангенциальной фильтрации, был получен следующий препарат (**Рис. 14**). Для него характерно содержание большого количества примесей (~40-50% по денситометрическому анализу).

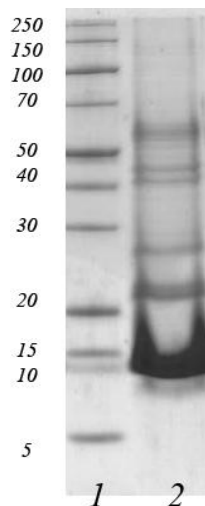


Рис. 14. Электрофореграмма ФЛА2 после тангенциальной фильтрации. 1 - маркеры молекулярного веса, кДа; 2 – препарат ФЛА2 после тангенциальной фильтрации. Полоса ФЛА2 соответствует молекулярной массе в 14 кДа.

Для выделения рекомбинантной ФЛА2 из культуральной жидкости планировалось применение катионообменной хроматографии (**Рис. 15**). В связи с этим был проведен подбор наиболее подходящих условий для хроматографического разделения с использованием носителя Sepharose SP Fast Flow.

В ходе экспериментов тестировались различные параметры элюирования, включая буферные растворы на основе 0,01 М цитрата натрия с уровнем pH в диапазоне от 4,0 до 5,2, чтобы определить оптимальные условия для эффективного разделения компонентов.

К фильтрату добавляли 50 эквивалентных объемов 0,1 М раствора цитрата натрия 5,2. Колонку уравнивали 0,01 М цитратом натрия pH 5,2. Элюцию проводили раствором 0,01 М цитрата натрия pH 5,2 в градиенте 0-1 М NaCl. Наилучшие результаты по выходу целевого продукта показал буфер 0,01 М цитрата натрия с pH 5,2 (**Рис. 15А**). Часть белка не адсорбировалась на колонке, что приводило к потере целевого продукта (**Рис. 15Б**).

В литературе описано использование анионообменной хроматографии для разделения и очистки гомологичных ФЛА2 [116,185]. В случае ФЛА2 из *S. violaceoruber*, использование анионообменной хроматографии так же оказалось эффективным. Полученный после тангенциальной фильтрации раствор ФЛА2 разбавляли 30-кратным объемом буфера 20 mM Tris-HCl pH 8,0 и наносили на хроматографическую колонку Sepharose Q Fast Flow. Элюцию проводили 20 mM Tris-HCl pH 8,0 в градиенте 0-1 М NaCl. Разделение с использованием анионообменной смолы оказалось значительно более эффективным по сравнению с использованием катионообменной смолы, обеспечивая чистоту препарата на уровне ~70–75%.

При 10-кратном разбавлении раствора ФЛА2 после тангенциальной фильтрации целевой продукт оставался в неадсорбированных фракциях. Для повышения его выхода в не адсорбированных фракциях в качестве буфера А использовали 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 8,0. В этих условиях примеси эффективно адсорбировались на хроматографическую колонку (**Рис. 16А**), тогда как ФЛА2 не связывалась с сорбентом (**Рис. 16Б**). Чистота фракций, содержащих целевой продукт, достигала ~80% по белку.

Анионообменная хроматография позволила удалить крупные белковые примеси из препарата ФЛА2, однако в препарате сохранялся белок с молекулярной массой 27 кДа, не идентифицированный методами масс-спектропии в качестве побочного продукта. Возможно, эта примесь представляет собой SDS-зависимый димер фосфолипазы [186]. Для

дальнейшей очистки использовали метод хроматографии на основе гидрофобных взаимодействий, применяя сорбент Butyl-Sepharose Fast Flow.

Фракции, не адсорбировавшиеся в ходе анионообменной хроматографии, объединяли, затем добавляли 8,7 г NaCl на 50 мл раствора (до достижения концентрации хлорида натрия 3 М NaCl) и наносили на колонку со скоростью 1 мл/мин. Элюирование осуществлялось 20 мМ раствором Tris-HCl pH 8,0 (раствор Б), при градиентном снижении содержания хлорида натрия. Очищенный препарат ФЛА2 содержался во фракциях, собранных в интервале 65–100% раствора Б (**Рис. 17А**).

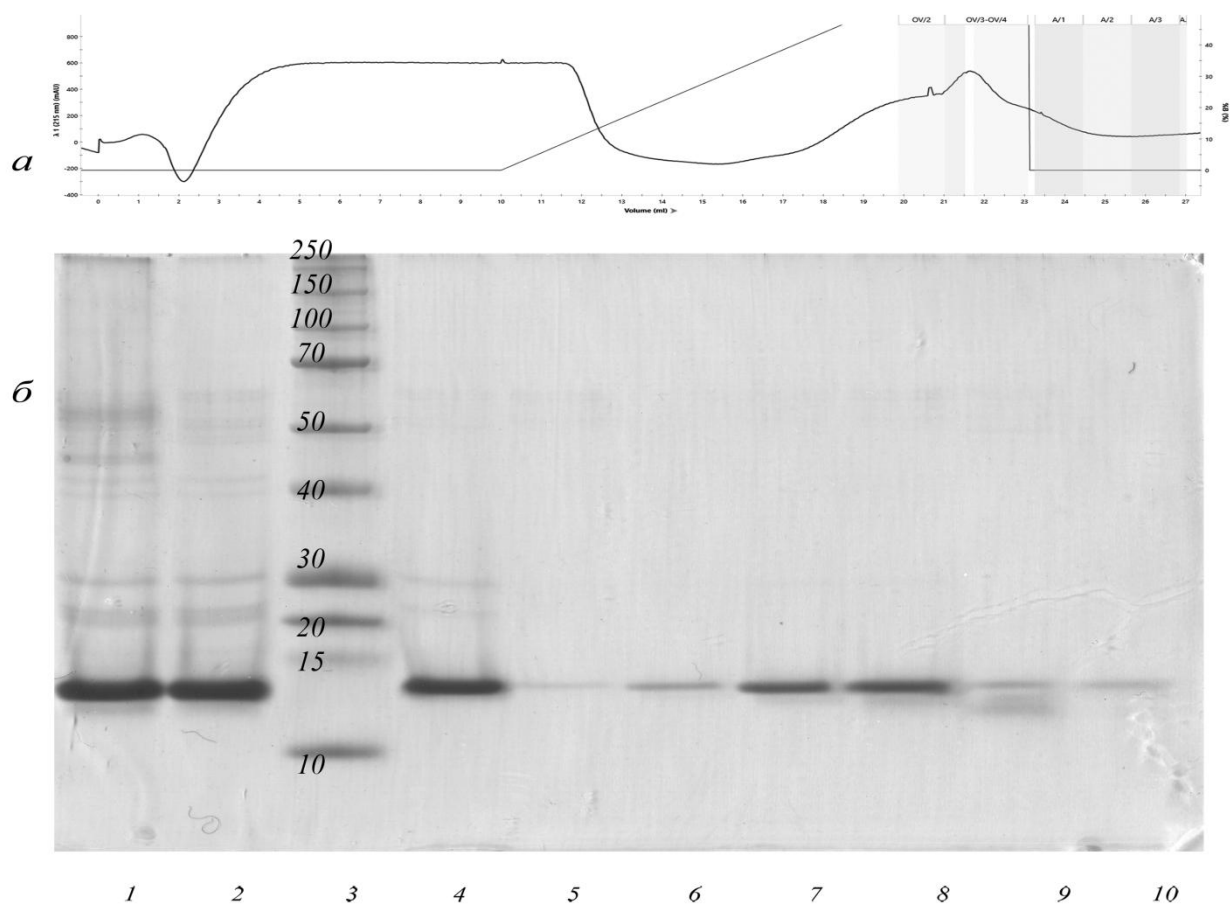


Рис. 15. Хроматографическая очистка ФЛА2 на сорбенте Sepharose SP Fast Flow. Хроматограмма (А) и электрофореграмма (Б) фракций по ходу очистки. 1 – препарат ФЛА2 после тангенциальной фильтрации, 2 - препарат ФЛА2 перед нанесением на колонку с Sepharose SP Fast Flow, 3 – маркеры молекулярного веса, кДа, 4 – не адсорбировавшаяся фракция, сошедшая с колонки с 3 по 12 мл; 5 – 10 – фракции, сошедшие с колонки в 15, 17, 19, 21, 23, 25 мл элюата соответственно. Полоса ФЛА2 соответствует молекулярной массе в 14 кДа.

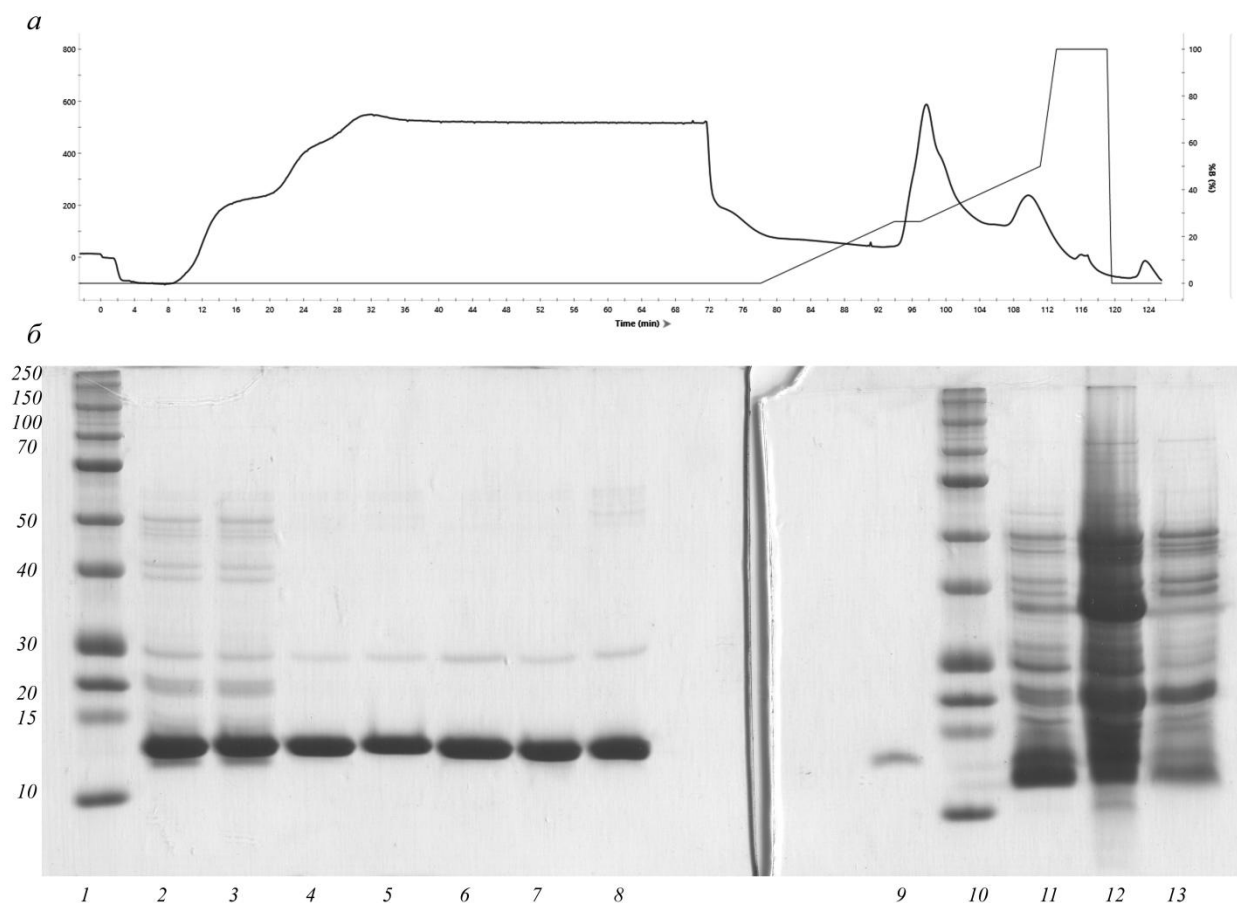


Рис. 16. Хроматографическая очистка ФЛА2 на колонке с Sepharose Q Fast Flow. Хроматограмма (А) и электрофореграммы (Б) фракций. 1, 5 – маркеры молекулярного веса, кДа; 2 – препарат ФЛА2 после тангенциальной фильтрации; 3 – препарат ФЛА2 перед нанесением на колонку Sepharose Q Fast Flow, 4 – не адсорбированная фракция с 20 по 70 мл; 6-8 – фракции, вышедшие в 100, 110 и 115 мл. Полоса ФЛА2 соответствует молекулярной массе в 14 кДа. 1, 2 – профиль элюции белка и градиент NaCl соответственно.

По данным денситометрического анализа, метод гидрофобной хроматографии позволил достичь высокой степени очистки (~90%), значительно уменьшить количество примесных белков и повысить концентрацию ФЛА2 (**Рис. 17Б, Табл. 9**). Максимальные потери целевого белкового продукта наблюдались при концентрировании на мембранных фильтрах. В результате проведения двух стадий хроматографии удалось добиться значительной степени очистки ФЛА2 (90%).

После очистки ферментативная активность ФЛА2 составила 210 ед./мл. Дополнительно была проведена оценка воспроизводимости метода хроматографического разделения (**Рис. 18**). Результаты подтвердили стабильность применяемых методик, что позволяет адаптировать данный процесс для масштабного производства.

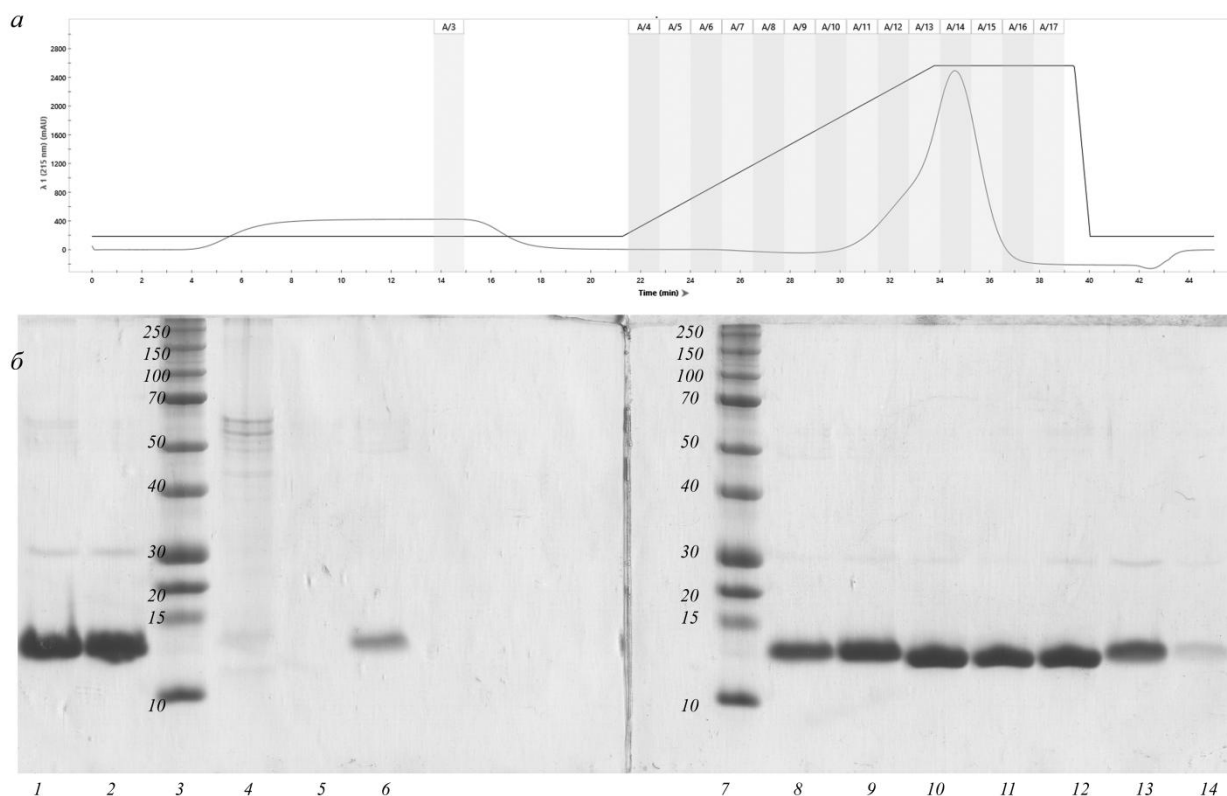


Рис. 17. Хроматографическая очистка препарата ФЛА2 на сорбенте Butyl-Sepharose Fast Flow. Хроматорграмма (А) электрофореграммы (Б) фракций после гидрофобной хроматографии. 1 – препарат ФЛА2 перед нанесением на колонку с Butyl-Sepharose Fast Flow; 2,4 маркеры молекулярного веса, кДа; 3 – не адсорбировавшаяся фракция – 10–32 мл; 5, 6 – фракции с колонки в 65 и 70 мл соответственно. Полоса ФЛА2 соответствует молекулярной массе в 14 кДа. 1, 2 – профиль элюции белка и градиент NaCl соответственно.

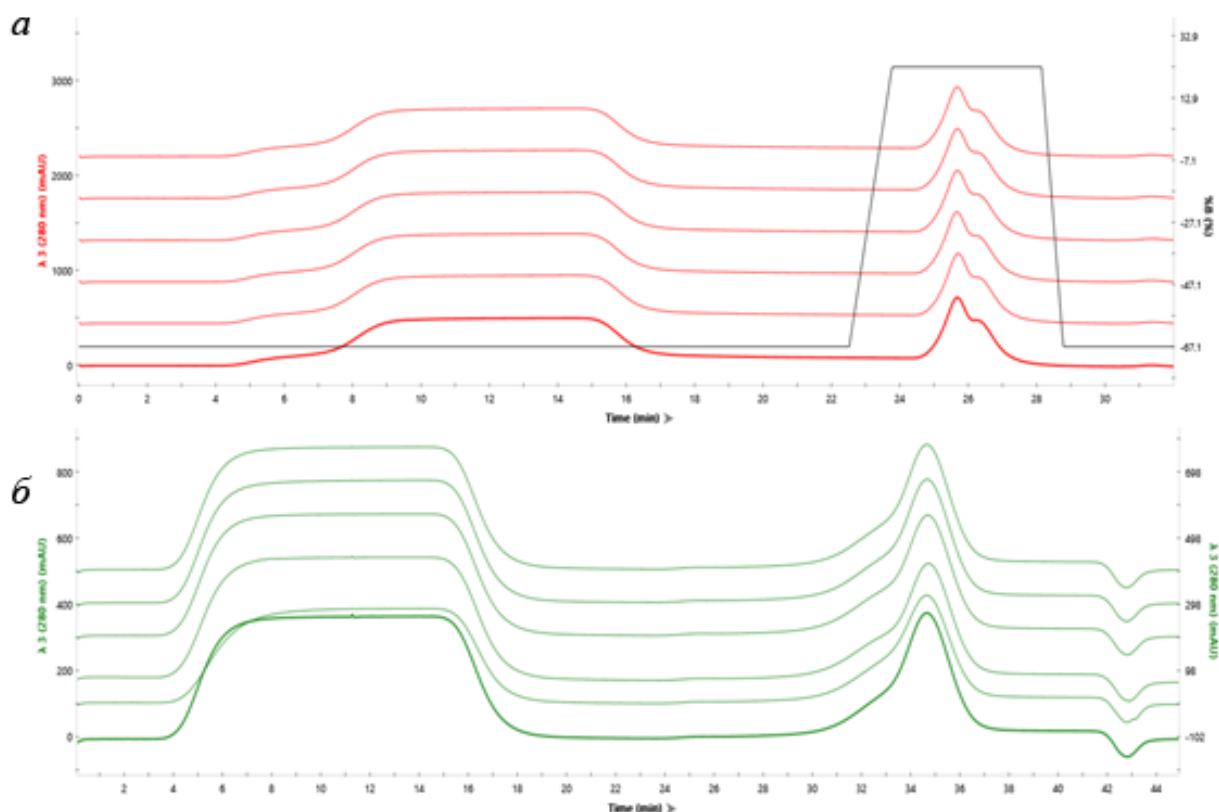


Рис. 18. Воспроизводимость анионообменной хроматографии при очистке ФЛА2 на сорбенте HiTrap Q XL(а) и хроматографии гидрофобных взаимодействий на Butyl-Sepharose FF(б). 1,2- профиль элюции белка и градиент NaCl соответственно.

Табл. 9. Сравнение эффективности различных этапов очистки секреторной ФЛА2 *S. violacearuber*. из культуральной жидкости *P. pastoris*.

Стадия очистки	Активность, ед./мл	Общее количество белка, мг.	Удельная активность, ед./мг	Выход, %	Чистота препарата ФЛА2 (по белку), %
Супернатант	9,5±2	125 ± 12,5	17,9 ± 2,5	100%	20%
Тангенциальное фильтрование и концентрирование, 100кДа	41,2±2,3	45 ± 4,5	44,9±3,2	90 ± 9	50-55%
Анионообменная хроматография	49,5±4,5	28,1 ± 2,8	65,2 ± 3,8	82 ± 8	80%
Хроматография гидрофобных взаимодействий	210±5	22,5 ± 2,3	73,3 ± 3	74 ± 7,4	90–95%

3.3. Вторичная структура рекомбинантной фосфолипазы A2 и ее термостабильность

Для подтверждения сохранения вторичной структуры рекомбинантной ФЛА2 методом кругового дихроизма были произведены измерения спектра кругового дихроизма в диапазоне длин волн от 180 до 260 нм (**Рис. 19**). Данный спектр соответствует соотношению элементов вторичной структуры как 75% α -спираль, 5% β -изгиб и 20 % относится к нерегулярной структуре. Исходя из кристаллической структуры данного белка (PDB ID 1LWB) соотношение элементов вторичной структуры распределено как 64% α -спираль, 11% β -изгиб и 25% относится к нерегулярной структуре (расчёт был проведен при помощи программы «PROCHECK»).

Для дальнейшего изучения термостабильности полученного белка, были проанализирован спектр кругового дихроизма в диапазоне температур от 20°C до 90°C при фиксированном значении pH 8.0 с добавлением различных двухвалентных катионов. Удалось подтвердить термостабильность рекомбинантной ФЛА2 вплоть до значений в 55°C независимо от присутствия или отсутствия различных двухвалентных катионов (**Рис. 20**).

Частичная денатурация и изменение вторичной структуры начинается при температуре выше 40°C. При увеличении температуры до значений выше 57°C происходит денатурация α -спиральных структур. Так, уже при температуре 60°C α -спиральные структуры составляют лишь 4,7% процентов всей вторичной структуры, при 70°C – 4,8%. Также заметна стабилизация вторичной структуры в присутствии двухвалентных катионов, прежде всего Ca^{2+} , выполняющего важную роль в катализе. При сравнении влияния радиуса гидратации двухвалентного катиона на термостабильность рекомбинантной ФЛА2, установлено, что на наибольшая термостабильность наблюдается при использовании Ba^{2+} и постепенно снижается в ряду $\text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$ (**Рис. 20**).

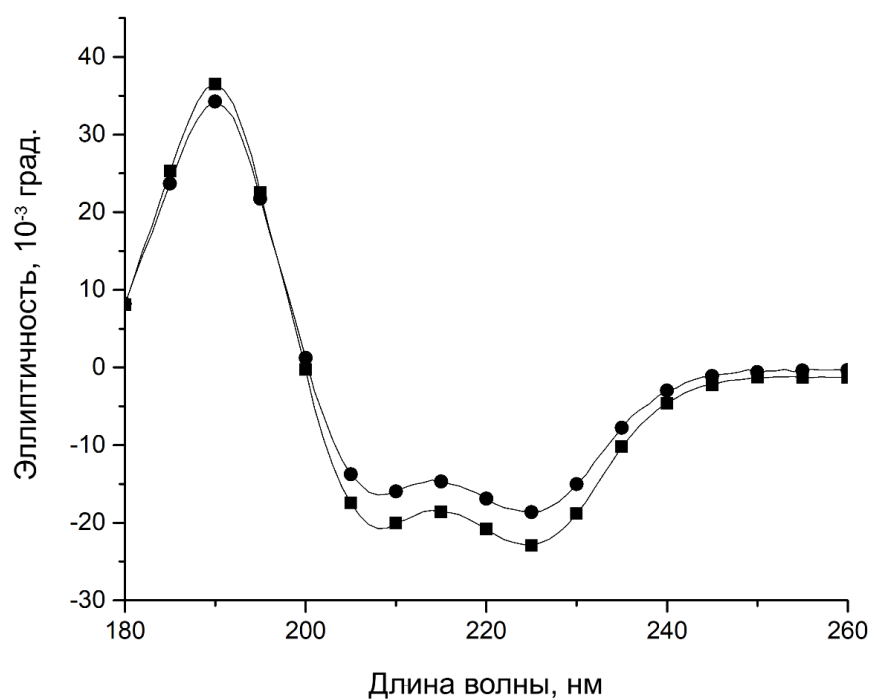


Рис. 19. Спектрограмма кругового дихроизма рекомбинантной ФЛА2 в различных буферных системах.

● – 5 мМ КВО₃, рН 8,0 ■ – 5 мМ КВО₃, рН 8,0, 1 мМ СаСl₂.

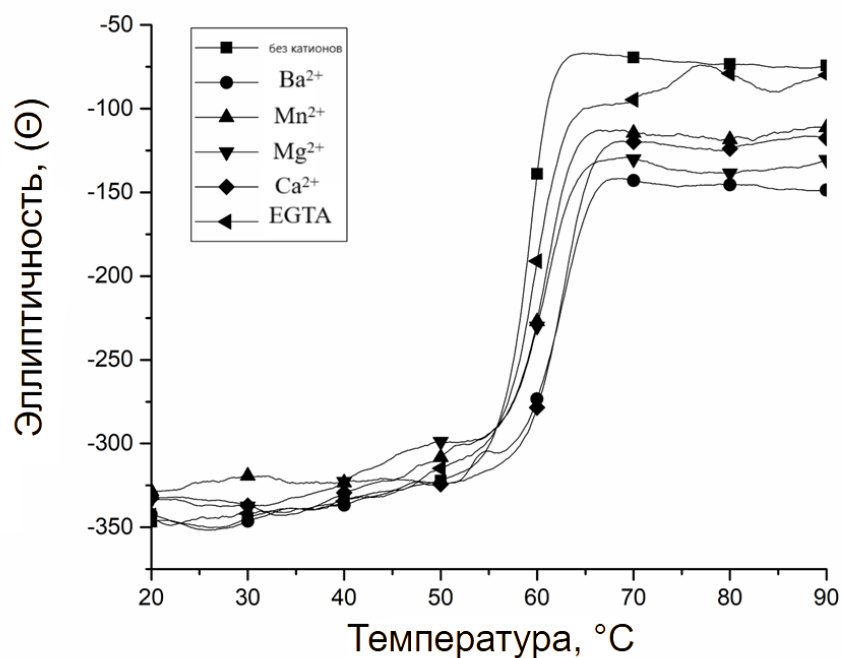


Рис. 20. Термостабильность рекомбинантной ФЛА2 в присутствии различных двухвалентных катионов. ■ – без добавления двухвалентных катионов, ● – 5мМ BaCl₂, ▲ – 5мМ MnCl₂, ▼ – 5мМ MgCl₂, ◆ – 5мМ CaCl₂, ◄ – 5мМ EGTA. Ba²⁺ Mn²⁺ Mg²⁺ Ca²⁺ EGTA

3.4. Экспрессия рекомбинантного химозина быка в *P. pastoris*

Для создания штамма-продуцента рекомбинантного химозина производилась оптимизация продукции химозина. Исследование проводилось поэтапно и включало: подбор наиболее эффективного промотора, определение оптимальной препролидерной последовательности для улучшения секреции, совершенствование системы сворачивания и секреции белков путем коэкспрессии транскрипционного фактора sHAC1, а также оптимизацию состава культуральной среды и условий ферментации. После этого оптимизировался процесс активации зимогена, выделения и очистки рекомбинантного химозина для того, чтобы сделать возможным масштабирование процесса.

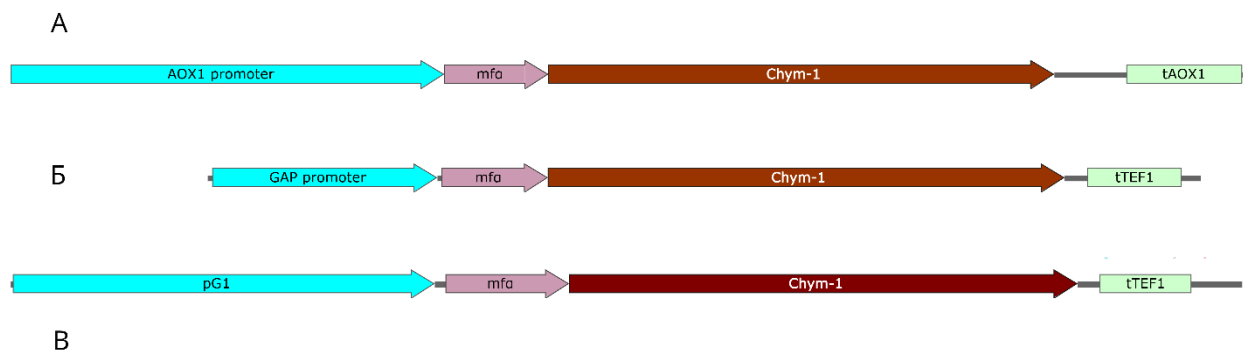


Рис. 21. Основные варианты кодирующих частей интегративных векторов, использованных для тестирования эффективности работы промоторов при экспрессии рекомбинантного химозина *Bos taurus*: А – pPIC α -Chym1 для проверки P_{AOX1}, Б – pVR2-GAP-Chym1 P_{GAP}, В - pVR2-G1-Chym1 для проверки P_{GI}.

Были созданы три варианта интегративных векторов (**Рис. 21**), предназначенных для экспрессии кодон-оптимизированного гена прохимозина В быка *Bos taurus*, использовались три различных варианта промотора: индуцибельный P_{AOX1} (индукция осуществляется метанолом), конститутивный P_{GAP} (индукция происходит на среде с глицерином и глюкозой), индуцибельный P_{GI} (индукция происходит при понижении концентрации глюкозы).

Полученные векторы трансформировали по отдельности в штамм *P. pastoris* GS115. Отобранные после трансформации клоны, содержащие ген прохимозина под разными промоторами и обозначенные как GS115/pPIC α -Chym1, GS115/pVR2-GAP-Chym1 и GS115/pVR2-G1-Chym1, проверяли методом ПЦР-скрининга для подтверждения наличия вставки. У более чем 75% полученных клонов была зафиксирована ферментативная активность в диапазоне 0,1–5 IMCU/мл. Наиболее активные клоны химозина выделяли при концентрации зеоцина 750 мкг/мл.

Оценка продуктивности различных вариантов проводилась в пробирках объемом 15 мл. Для оптимизации условий культивирования в колбах Эрленмейера было выбрано по

шесть клонов с наибольшей активностью химозина для каждого вида генетической конструкции.

Культивирование проводили в 250 мл колбах Эрленмейера (250 об/мин, 30°C) в течение 72 часов в 50 мл в среде YPD. Штаммы GS115/pPIC α -Chym1 индуцировали добавлением 50%-ого раствора метанола до конечной концентрации метанола в культуральной среде 1%. Штаммы GS115/pVR2-GAP-Chym1 осуществляли продукцию прохимозина без индуктора, в штаммах GS115/pVR2-G1-Chym1 индукция осуществлялась за счет постепенного высвобождения глюкозы из подпиточных капсул (12 мм, «Kuhner», Германия).

Сравнение полученных результатов приведено на **Рис. 22**. Максимальной продуктивности прохимозина в 80 мкг/мл и 100 мкг/мл удалось добиться при использовании промоторов P_{GAP} и P_{AOXI} соответственно. Промотор P_{G1} проявил себя значительно хуже и далее работы с ним не производились. В качестве основного рабочего промотора использовался P_{AOXI} и в дальнейшем оптимизация условий проводилась для него.

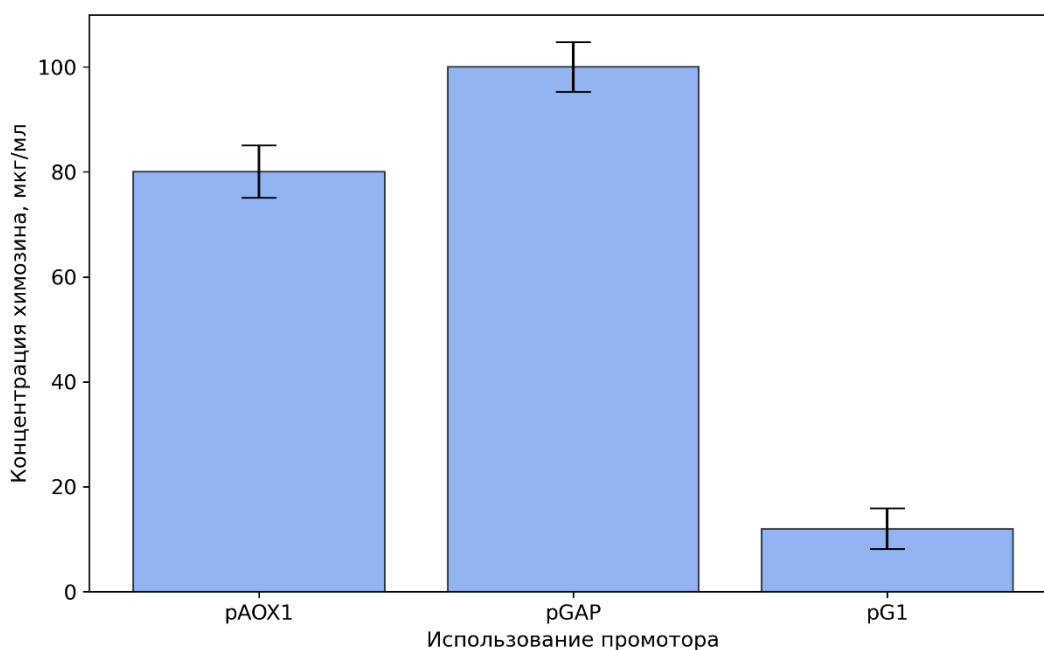


Рис. 22. Сравнение эффективности использования промоторов P_{AOXI} , P_{GAP} , P_{G1} при экспрессии рекомбинантного химозина быка. Сравнение эффективности промоторов проводилось при индукции промоторов P_{AOXI} , P_{GAP} , P_{G1} в 250 мл колбах и при культивировании 72 ч. Для тестирования промоторов P_{AOXI} , P_{GAP} использовали среду YPD, для тестирования промотора P_{G1} среду YP с добавлением подпиточных капсул «Kuhner» (12 мм) с постепенным высвобождением глюкозы.

Далее была проведена работа с целью выявления оптимальной препролидерной последовательности, обеспечивающей максимальную эффективность при секрети рекомбинантного прохимозина. Для этого на основе вектора pVR2 были созданы два

вектора pSF001 и pSF002, содержащие ген химозина быка под контролем промотора P_{AOX1} . Вектор pSF001 содержал нативный препролидерный пептид *mfa1* альфа-фактора *S. cerevisiae*. Вектор pSF002 содержал модифицированный препролидерный пептид *mfa1D*. Векторы pSF001 и pSF002 были трансформированы в штамм GS115 *P. pastoris* в результате чего были получены отдельные клоны GS115/pSF001 и GS115/pSF002. Было установлено, что клоны, использовавшие для секреции препролидерный *mfa1D* оказались более эффективными (Рис. 23).

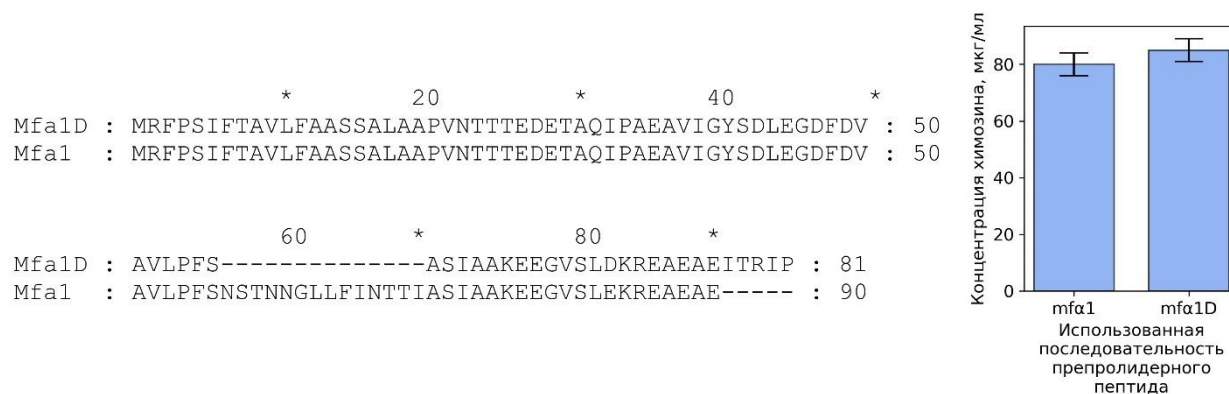


Рис. 23. Сравнение эффективности использования векторов с нативной (*mfa1*) и модифицированной (*mfa1D*) препролидерной последовательностью. Использование вектора с препролидерной последовательностью *mfa1D* позволяет увеличить продуктивность штамм-продуцента на 7,5% по сравнению с нативной препролидерной последовательностью.

После трансформации были отобраны клоны, содержащие ген прохимозина, и обозначены как GS115/pSF002. Клоны штамма GS115/pSF002 проверены методом ПЦР-скрининга на наличие целевой вставки, затем проводилась оценка их способности к свёртыванию молока. Более 75% клонов демонстрировали молокосвёртывающую активность в диапазоне 0,1–5 IMCU/мл. Наибольшие показатели активности химозина были зафиксированы у клонов, полученных при концентрации зеоцина 750 мкг/мл.

Для определения оптимальных условий культивирования в колбах были выбраны шесть наиболее активных клонов GS115/pSF002. При их выращивании (250 об/мин, 30°C) в течение 96 часов с добавлением 50% раствора метанола до конечной концентрации 1% в культуральной среде активность достигала 12,5 IMCU/мл. Внесение 1% аскорбиновой кислоты в среду ВММУ не влияло на тотальную активность химозина. Однако добавление 2 г/л сорбитола в ВММУ с одним из изучаемых клонов приводило к увеличению активности до 20 IMCU/мл. Этот клон был выбран для дальнейшей оптимизации условий ферментации.

3.4.1. Культивирование рекомбинантного химозина быка в ферментере

Культивирование штамма-продуцента GS115/pSF002 в ферментере проводилось до достижения ОП₆₀₀, равного 285. После индукции метанолом значительных изменений оптической плотности не наблюдалось. В целях повышения выхода химозина тестировались различные режимы ферментации и варианты дополнительных компонентов

в питательной среде. Наилучший результат по продукции рекомбинантного химозина 105 мг/л был получен при 96-часовой ферментации с добавлением 2 г/л раствора сорбитола дважды — на 24-м и 48-м часах (Рис. 24). Данный уровень продукции сопоставим с результатами аналогичных исследований [155].

Использование сорбитола в качестве дополнительного компонента является одной из эффективных стратегий увеличения экспрессии белка при работе с P_{AOX1} -промотором [187]. Такой подход особенно актуален для штаммов-продуцентов с мультикопийной вставкой гена. Оптимизация соотношения метанол/сорбитол способствовала усилению углеродного метаболизма и увеличению биомассы, что привело к более высокому выходу химозина.

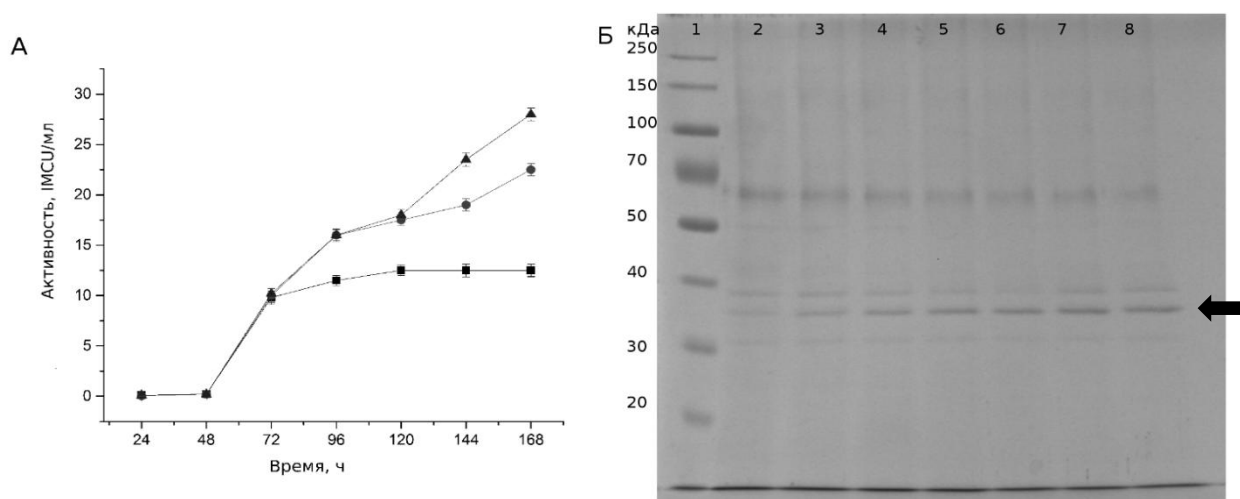


Рис. 24. Культивирование GS115/pSF002 в ферментере. А – профиль активности химозина. Время рассчитано от начала индукции. Образцы анализировались каждые 24 ч. ■ – минеральная среда, ● – минеральная среда с двукратным добавлением сорбитола 1 г/л, ▲ – минеральная среда с двукратным добавлением сорбитола 2 г/л. Б – Электрофореграмма ферментации химозина. 1 – маркеры молекулярного веса, кДа, 2-8 – 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 120 ч, 144ч, 168 ч от начала индукции метанолом. Полоса, соответствующая зрелой форме химозина указана стрелкой.

3.4.2. Очистка рекомбинантного химозина быка

После завершения ферментационного процесса культуральную жидкость отделяли от клеточной массы путем центрифугирования, после чего проводили активацию химозина. Для этого в 400 мл культуральной жидкости добавляли 40 мл 1 М HCl, доводя pH до 2,0. В этих условиях происходила автокаталитическая активация прохимозина с отщеплением N-концевого пептида. Через 2 часа инкубации pH среды восстанавливали до 5,5, добавляя 40 мл 1 М NaOH.

Культуральную жидкость очищали методом анионообменной хроматографии с использованием DEAE-Sepharose. Были определены оптимальные условия разведения для наилучшего связывания химозина с сорбентом. Разведение культуральной жидкости в соотношении 1:3 с 50 мМ фосфатным буфером (pH 5,5), что обеспечило наилучшую эффективность связывания химозина с сорбентом. Элюцию проводили за счет увеличения

ионной силы, элюировали 50 мМ Na₂HPO₄ 1 М NaCl pH 5,5. В результате проведенной анионообменной хроматографии удалось сконцентрировать химозин в 5 раз и значительно снизить уровень примесей.

На следующем этапе очистки использовали хроматографическую колонку с Phenyl-Sephарозе объемом 5 мл. В раствор химозина добавляли 5 М NaCl до достижения конечной концентрации соли 2 М. Перед элюцией колонку предварительно уравнивали 50 мМ раствором Na₂HPO₄ с 2 М NaCl pH 5,5. Элюировали 50 мМ Na₂HPO₄ pH 5,5 [158]. Хроматография гидрофобных взаимодействий позволила в итоге получить получали раствор химозина с уровнем чистоты 85–90% (Табл. 10). Суммарные потери белка на всех стадиях активации, выделения и очистки составляли 38% (Табл. 10).

Табл. 10. Стадии выделения и очистки химозина быка.

Стадии очистки	Общее количество химозина, мг	Активность химозина, IMCU/мл	Удельная активность химозина, IMCU/мг белка	Выход химозина по белку, % от начального количества	Чистота препарата по белку, %
Супернатант	44	5	7,8	100	30
Супернатант после активации	43,1	42±5	66	95	32
Анион-обменная хроматография	34,5	264±10	152	72	60
Хроматография гидрофобных взаимодействий	31,5	1009±12	220	62	85-90

3.5. Экспрессия рекомбинантного химозина белухи в *P. pastoris*

Для эксперимента использовали ген прохимозина белухи (ChymBe), синтезированный компанией «Twist Bioscience» (США). Аминокислотную последовательность данного гена отобрана из базы данных Uniprot (A0A2Y9P896). Ген ChymBe был вставлен в плазмидный вектор pPIC α , экспрессия гена контролировалась промотором P_{AOX1}. Для обеспечения секреции рекомбинантного прохимозина использовали препролидерную последовательность α -фактора mfa1 из *S. cerevisiae*.

Для трансформации применяли электрокомпетентные клетки GS115, а отбор трансформантов проводили на чашках Петри с твердой средой YPD, содержащей зеонин в концентрации 100–200 мкг/мл. В результате скрининга было выбрано 30 колоний трансформантов GS115/pPIC α -ChymBe, которые культивировали в 50 мл среды BMGY в колбах Эрленмейера объемом 250 мл. По истечении 84 часов индукции 1% метанолом проводился анализ культуральной жидкости на содержание химозина и его молокосвертывающую активность.

Процесс активации прохимозина осуществляли путем снижения pH до 2,0, следуя методике активации прохимозина (**Рис. 25**). Активность химозина белухи составила 3 IMCU/мл, а его концентрация – 50 мг/л, что значительно ниже по сравнению с аналогичными параметрами бычьего химозина, полученного при идентичных условиях экспрессии. Для дальнейшего масштабирования продукции прохимозина белухи в биореакторе был выбран трансформант с наибольшей активностью. Достоверность полученного прохимозина белухи подтверждали методом MALDI-масс-спектрометрии, за счет соответствия молекулярной массе и наличия уникальных аминокислотных замен.

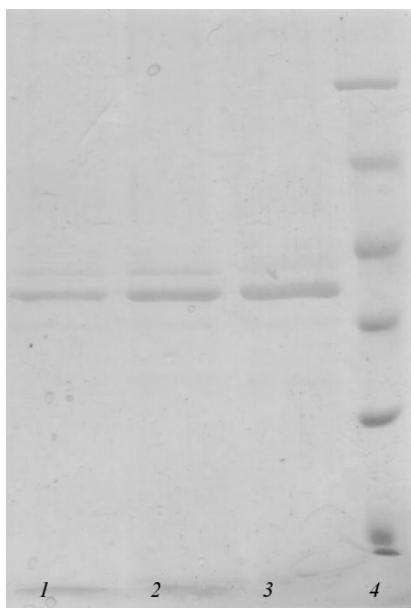


Рис. 25. Биосинтез химозина белухи в биореакторе в ходе ферментации pPIC α -ChymBe. Уровень продукции белка показан на электрофореграмме. 1-3: 24, 48, 72 ч. от начала индукции метанолом, 4: маркеры молекулярной массы 116, 66,2, 45, 35, 25, 18,4, 10 кДа соответственно.

Производство прохимозина белухи в ферментере осуществлялось согласно описанию в материалах и методах. Производство прохимозина осуществлялось в три стадии: рост основной биомассы, культивирование с подпиткой метанолом/сорбитолом, культивирование с подпиткой метанолом. Культивирование основной биомассы осуществлялось в 2 л минеральной среды и длилось 22 часа. На данном этапе ОП₆₀₀ достигло значения в 290 и после чего началась индукция с подпиткой 1% метанолом и 2% сорбитола, индукция длилась 48 ч. В течение индукции метанолом концентрация белка достигла значения 80 мг/л, при этом сухой вес клеток достиг 120 г/л. Молоко-свертывающая активность составила 5 IMCU/мл, что значительно ниже значений, достигнутых при ферментации химозина быка (Раздел 3.4.2.).

3.5.1. Выделение и очистка химозина белухи

Создание штамм-продуцента химозина белухи *P. pastoris* позволяет проверить ранее разработанный метод для выделения рекомбинантного химозина для выделения химозина белухи *D. leucas*.

Выделение химозина производилось в несколько этапов: активация понижением pH, нейтрализация, очистка при помощи анион-обменной хроматографии, очистка при помощи хроматографии гидрофобных взаимодействий. После культивации, культуральную жидкость отделяли центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин на 4°C. Далее 2 л культуральной жидкости активировали путем понижения pH до 2,0 добавлением 1 М HCl, затем восстанавливали pH до 5,5 добавлением 1 М NaOH в течение 2 ч. Далее раствор активированного химозина разбавляли 1:3 50 мМ натрий-фосфатным буфером pH 5,5 и получали химозин двух стадийной хроматографией с использованием DEAE-сефарозы и фенил-сефарозы. Результаты всех стадий очистки приведены в **Табл. 11**.

Табл. 11. Стадии выделения и очистки химозина белухи.

Стадия очистки	Общее количество химозина, мг	Активность химозина, IMCU/мл	Специфическая активность, IMCU/мг	Выход химозина по белку, %	Чистота препарата по белку, %
Супернатант	42	5	5	100	30
Анион-обменная хроматография	30,2	66±10	37	71	60
Хроматография гидрофобных взаимодействий	25,2	230±12	55	60	85-90

3.5.2. Ферментативные свойства химозина белухи

Очищенные рекомбинантные химозины, полученные из *B. taurus* и *D. leucas*, показали молокосвертывающую активность на уровне 220 IMCU/мг и 53 IMCU/мг соответственно. У химозина белухи данный показатель оказался ниже, чем у химозина быка, тогда как его протеолитическая активность была выше. Соотношение молокосвертывающей и протеолитической активности (МСА/РА) у химозина быка составило 1,0, тогда как у химозина белухи оно оказалось ниже 0,2. Сравнение с данными, полученными ранее для химозина других животных, показало наличие более специфичных вариантов, таких как химозины, выделенные у верблюда [161] и альпаки [162].

Оптимальный pH для химозина белухи был установлен на уровне 6,0 (**Рис. 26**), что немного выше значений, характерных для химозина быка (5,5–5,8). Температурный оптимум для рекомбинантного химозина белухи составил 35 °С, что соответствует аналогичному показателю у бычьего химозина (**Рис. 27**). При этом максимальная активность химозина белухи наблюдалась при более низкой концентрации кальция по сравнению с бычьим (**Рис. 28**), что может быть обусловлено адаптацией белух к условиям морской среды.

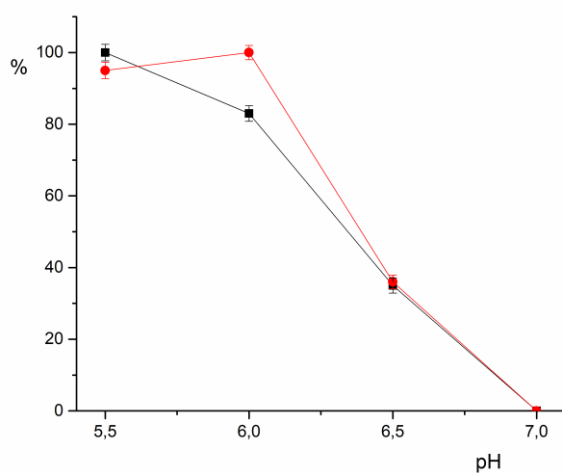


Рис. 26. Влияние pH на относительную молоко-свертывающую активность. Черная линия соответствует химозину быка rChym *B. taurus*, а красная – химозину белухи rChymBe *D. leucas*.

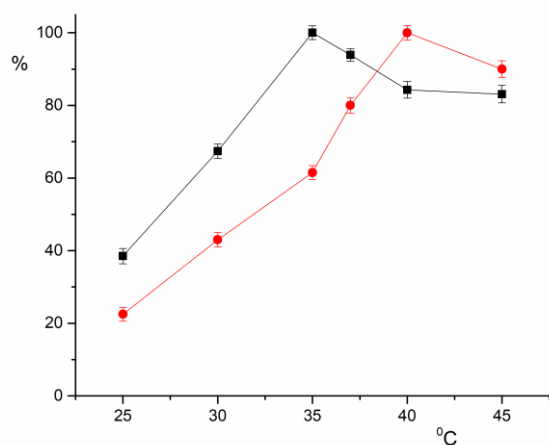


Рис. 27. Исследование зависимости относительной молокосвертывающей активности от температуры. Черная линия соответствует химозину быка rChym *B. taurus*, а красная – химозину белухи rChymBe *D. leucas*.

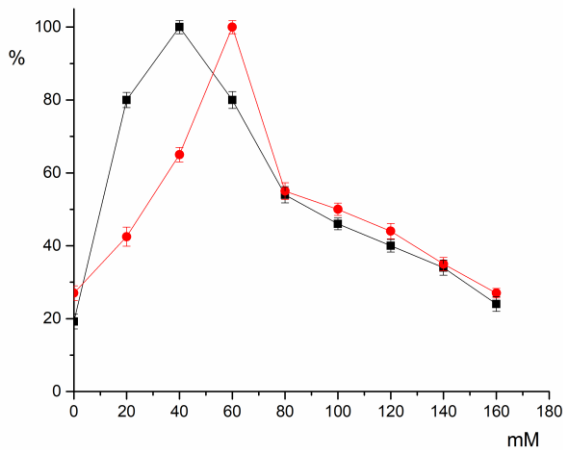


Рис. 28. Исследование зависимости относительной молокозвертывающей активности от концентрации хлорида кальция. Черная линия соответствует химозину быка rChym *B. taurus*, а красная – химозину белухи rChymBe *D. leucas*.

Вероятно, аминокислотные замены K221M и K295Q оказывают значительное влияние, ухудшая взаимодействие химозина с казеиновыми мицеллами (**Рис. 29**). Также у рекомбинантного химозина белухи наблюдается повышенная неспецифическая активность, что ограничивает его применение в пищевой промышленности. Снижение способности к связыванию казеиновых мицелл может быть связано и с уменьшением общего поверхностного заряда белужьего химозина в сравнении с бычьим [151]. В отличие от химозина верблюда (+22) и быка (+15), общий заряд химозина белухи составляет +13. Также низкая специфическая активность может объясняться особенностями аминокислотного состава казеина белухи.

Целью данного исследования было получение рекомбинантного химозина белухи *Delphinapterus leucas* с экспрессией в метилотрофных дрожжах *P. pastoris* и изучение его физико-химических характеристик с точки зрения возможного применения в пищевой промышленности. Полученный штамм-продуцент демонстрировал продуктивность 50 мг/л, однако удельная активность белужьего химозина оказалась существенно ниже, чем у бычьего, составив 53 IMCU/мг. Вероятно, причиной этого являются аминокислотные замены K221M и K295Q, снижающие способность химозина взаимодействовать с отрицательно заряженными казеиновыми мицеллами. При этом его высокая протеолитическая активность делает его малоприспособленным для использования в пищевой промышленности.

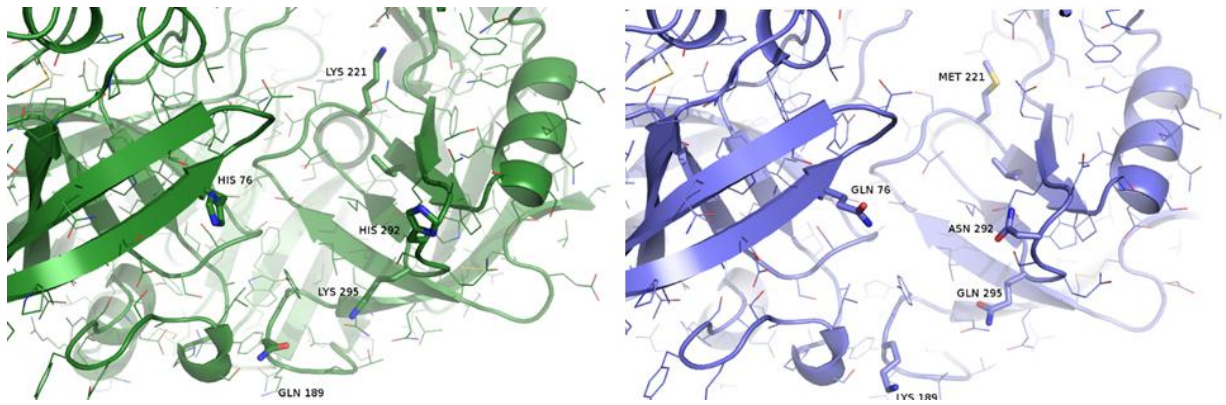


Рис. 29. Трехмерные структуры сайтов связывания химозина быка (выделена зеленым, 4AA8) и белухи (выделена синим, авторская модель, созданная в программе Modeller 9v12). Позиции значимых аминокислотных замен K221M, K295Q в сайте связывания казеина указаны на рисунке.

3.6. Анализ влияния коэкспрессии транскрипционного фактора sHAC1 на уровень продукции рекомбинантного химозина в *P. pastoris*. Анализ металоболомных данных при продукции рекомбинантного химозина в метилотрофных дрожжах *P. pastoris*

Известно, что сверхэкспрессия гена HAC1 способствует усилению процессов экспорта и созревания целевых белков в рекомбинантных штаммах дрожжей и грибов за счет усиления UPR.

В ходе работы создавали вектор pPIC9-GAP-HAC1, содержащий сплайсированный вариант гена sHAC1. Вектор pPIC9-GAP-HAC1 трансформировали в штаммы-продуценты химозина GS115/pPICzα-Chym1 и GS115/pVR2-GAP-Chym1, работающие под промоторами P_{AOX1} и P_{GAP} соответственно, для тестирования эффекта коэкспрессии sHAC1 на данные штаммы. В результате селекции на минимальной среде MD в присутствии 200 мкг/мл зеоцина отбирали штаммы GS115/pPICzα-Chym1-HAC1, GS115/pVR2-GAP-Chym1-HAC1. В результате анализа продуцентов установили, что продукция рекомбинантного химозина выросла на 50% в случае использования P_{AOX1} -промотора и на 20% в случае P_{GAP} промотора (Рис. 30).

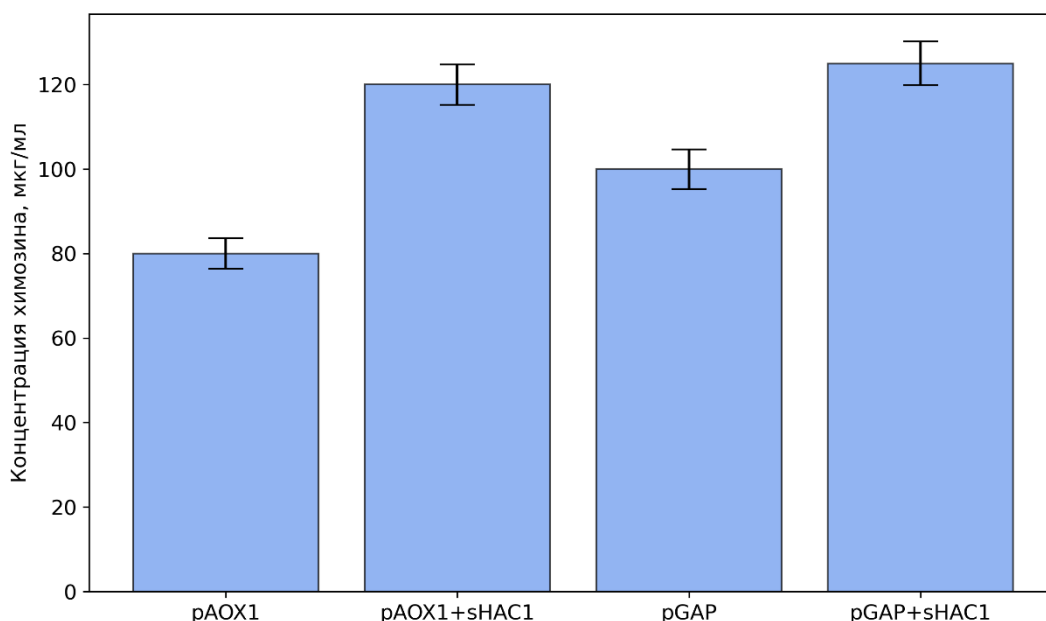
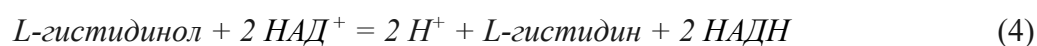


Рис. 30. Влияние коэкспрессии сплайсированного варианта транскрипционного фактора HAC1 на уровень продукции рекомбинантного химозина быка при использовании промоторов P_{AOX1} и P_{GAP} в штаммах *P. pastoris* GS115/pPICzα-Chym1(*his4*-), GS115/pPICzα-Chym1-HAC1(*his4*+) и GS115/pVR2-GAP-Chym1(*his4*-), GS115/pVR2-GAP-Chym1-HAC1(*his4*+) соответственно.

В ходе данных измерений удалось получить сравнительную характеристику концентрации метаболитов в ходе культивирования штамма-продуцента химозина GS115/pPICzα-Chym1. Полученные значения концентрации аминокислот (**Рис. 31**, Приложение 2, **Табл. 12**) не отличаются значительным образом от результатов, полученных ранее другими исследователями [76, 77]. Поскольку в данном исследовании не производилось дериватизации аминокислот, точно определить концентрации небольших по массе/заряду аминокислот (глицина и аланина) не представляется возможным.

Однако очевидно, что имеются изменения концентраций в пуле гистидин/гистидинол при использовании штамм-продуцентов GS115(*his4*-), GS115/pPICzα-Chym1(*his4*-), GS115/pPICzα-Chym1-HAC1(*his4*+) (**Рис. 32**).

При экспрессии рекомбинантного химозина не обнаружено значимого недостатка отдельных аминокислот. Предполагается, что при отсутствии эффекта «бутылочного горлышка» в случае нехватки отдельных критических метаболитов, таких как аминокислоты, на уровень продукции рекомбинантного химозина влияет общий энергетический/синтетический потенциал клетки (НАДФН/НАДФ⁺, НАДН/НАД⁺). Однако данное положение нуждается в проверке дополнительными исследованиями метаболома при экспрессии других рекомбинантных белков. Гистидинол-дегидрогеназа, кодируемая геном *HIS4*, катализирует следующую химическую реакцию:



Очевидно, что восстановление гена *HIS4* позволяет не только изменить клеточный баланс гистидина, но и поменять восстановительный баланс в пуле НАДН/НАД⁺.

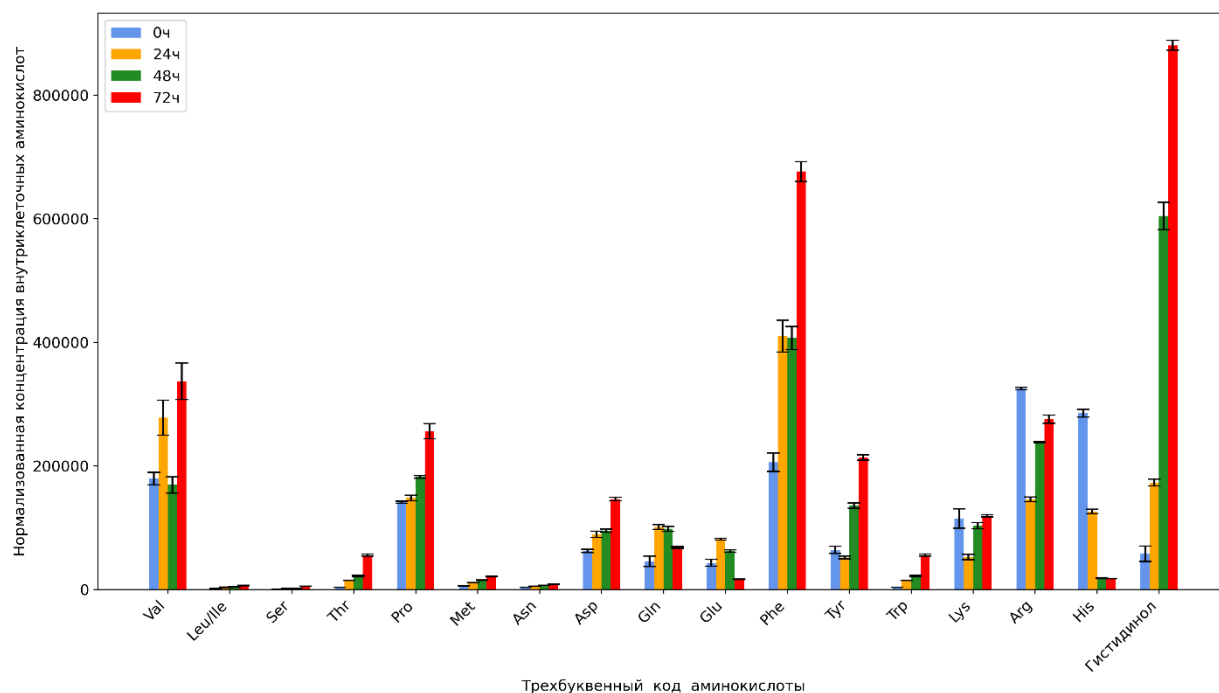


Рис. 31. Нормализованные концентрации внутриклеточных метаболитов штамма-продуцента GS115/pPICα-Chym1 в ходе культивирования с течением времени (0, 24, 48, 72 ч). Поскольку использовался штамм *his4*- видно уменьшение концентрации гистидина и увеличение концентрации гистидинола. Детектируемые концентрации лейцина/изолейцина, треонина и орнитина при этом значительно меньше концентраций других аминокислот.

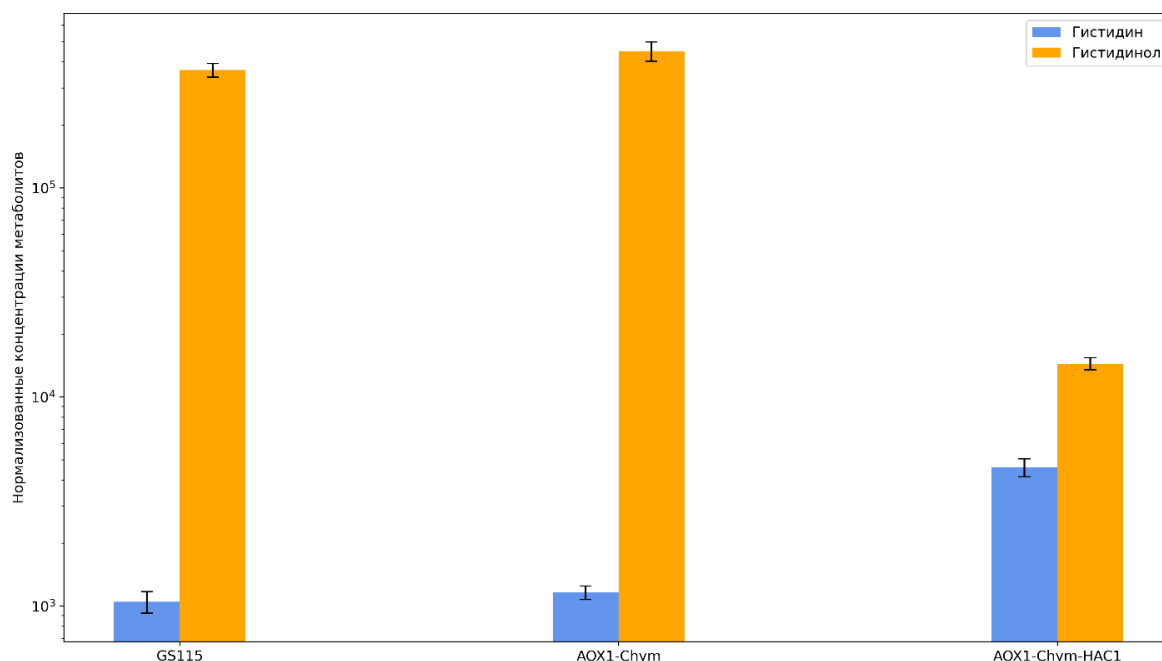


Рис. 32. Нормализованные концентрации метаболитов различных штамм-продуцентов после 72 ч культивации. GS115 (*his4*-) – штамм, не продуцирующий рекомбинантный химозин. GS115/pPIC α -Chym1 (*his4*-), GS115/pPIC α -Chym1-HAC1 (*his4*+) – штаммы, продуцирующие рекомбинантный химозин.

Значительно меняются концентрации метаболитов глутатионowego шунта при изменении основного источника углерода (**Рис. 33**). Это может быть напрямую связано с той ролью, которую играет глутатионный шунт в окислении метанола и доставке энергетических эквивалентов НАДН/НАД⁺ из пероксисомы в цитоплазму (**Рис. 34**).

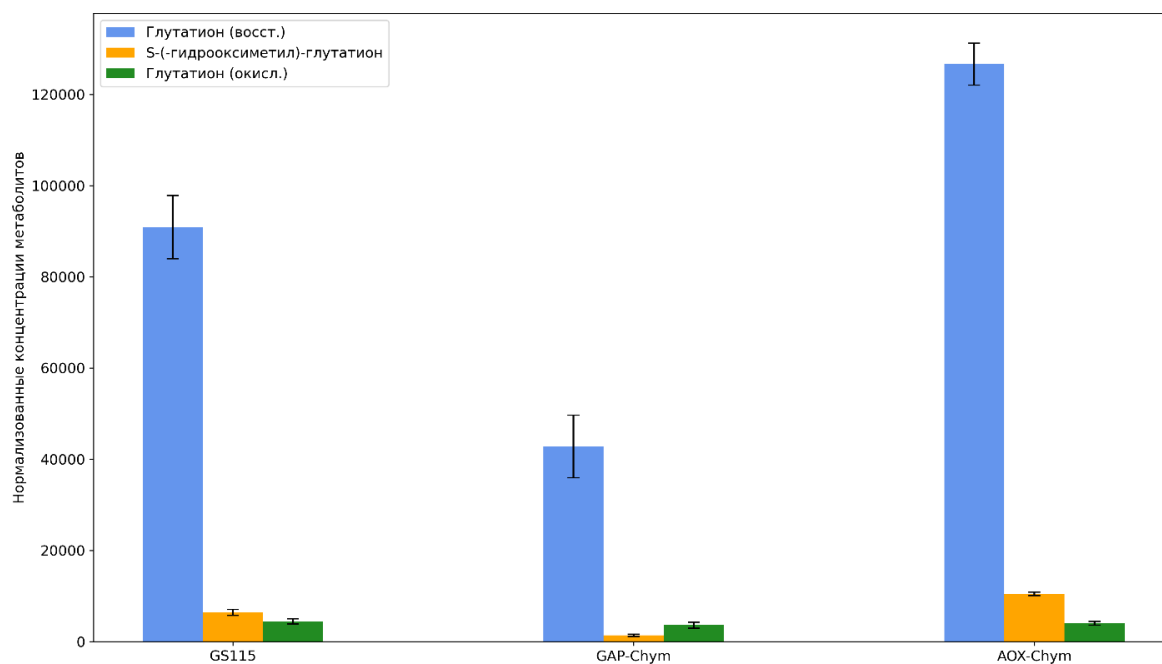


Рис. 33. Изменения концентраций глутатионowego шунта в различных штаммах в зависимости от источника углерода. Штаммы GS115 и GS115/pPIC α -Chym1 (экспрессия рекомбинантного белка под контролем P_{AOX1} промотора) культивировали на минеральной

среде с 1% метанолом, GS115/pVR2-Chym1 (экспрессия рекомбинантного белка под контролем промотора GAP) на минеральной среде с 10% глюкозой.

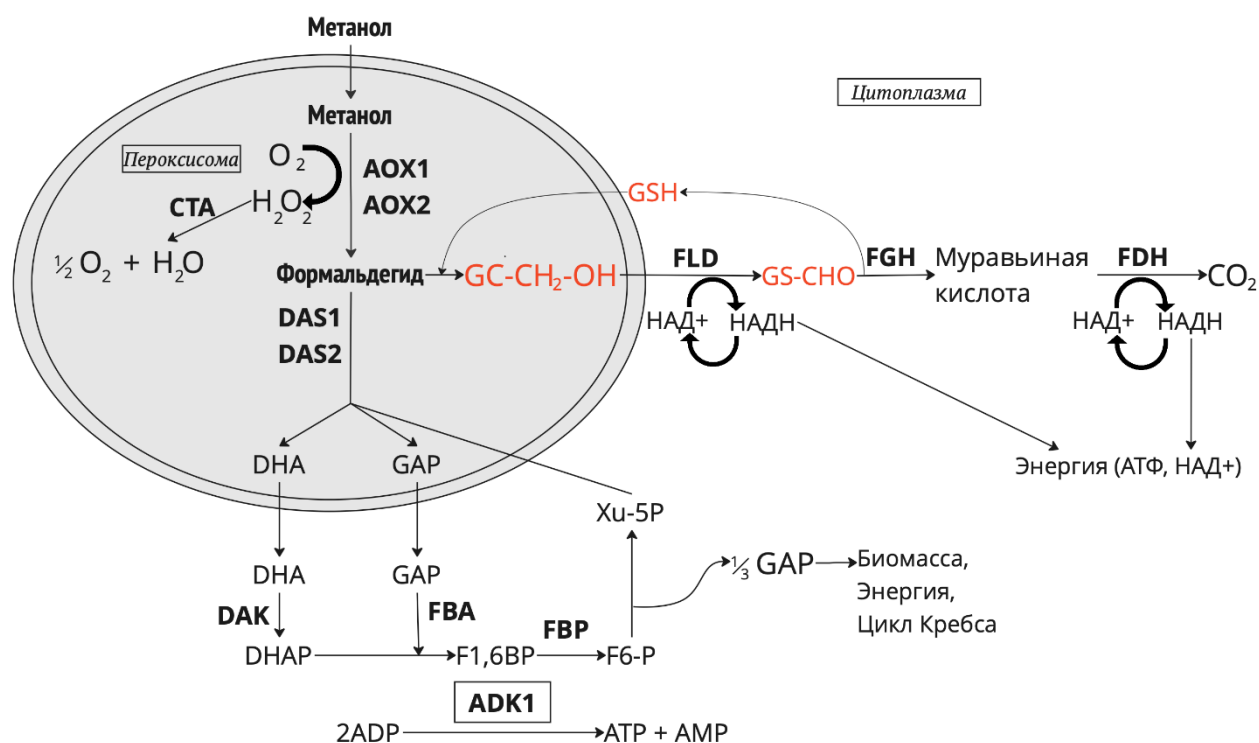


Рис. 34. Биохимический путь утилизации метанола. Выделена роль глутатионового шунта, вовлечённого в восстановление НАДН/НАД⁺.

При коэкспрессии сплайсированного варианта sHAC1 было замечено несколько критических изменений в концентрациях внутриклеточных метаболитов, прежде всего изменение пула НАДН/НАД⁺ (**Рис. 35**), что крайне важно для синтетических возможностей клетки. Ранее показано, что коэкспрессия sHAC1 приводит к значительному увеличению эндоплазматического ретикулума и биосинтезу мембран [72]. По анализу метаболомных данных штаммов GS115/pPICzα-Chym1 и GS115/pPICzα-Chym1-HAC1 также заметно увеличение концентраций промежуточных метаболитов биосинтеза фосфолипидов (**Рис. 36**), таких как производные фосфотидилсерина PS(14:0/15:0), PS(10:0/25:1), фосфотидилолина PC(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/P-16:0), PC(14:0/20:3(8Z,11Z,14Z)), PC(18:3(6Z,9Z,12Z)/P-16:0), PC(18:2(9Z,11Z)/18:2(9Z,11Z)), PC(14:1(9Z)/22:2(13Z,16Z)), PC(14:0/22:2(13Z,16Z)), фосфотидилэтаноламина PE-NMe(14:1(9Z)/22:1(9Z)), фосфотидной кислоты PA(18:0/18:1(9Z)). Коэкспрессия sHAC1 может быть использована при создании штамм-продуцентов липидных вторичных метаболитов на основе *P. pastoris*.

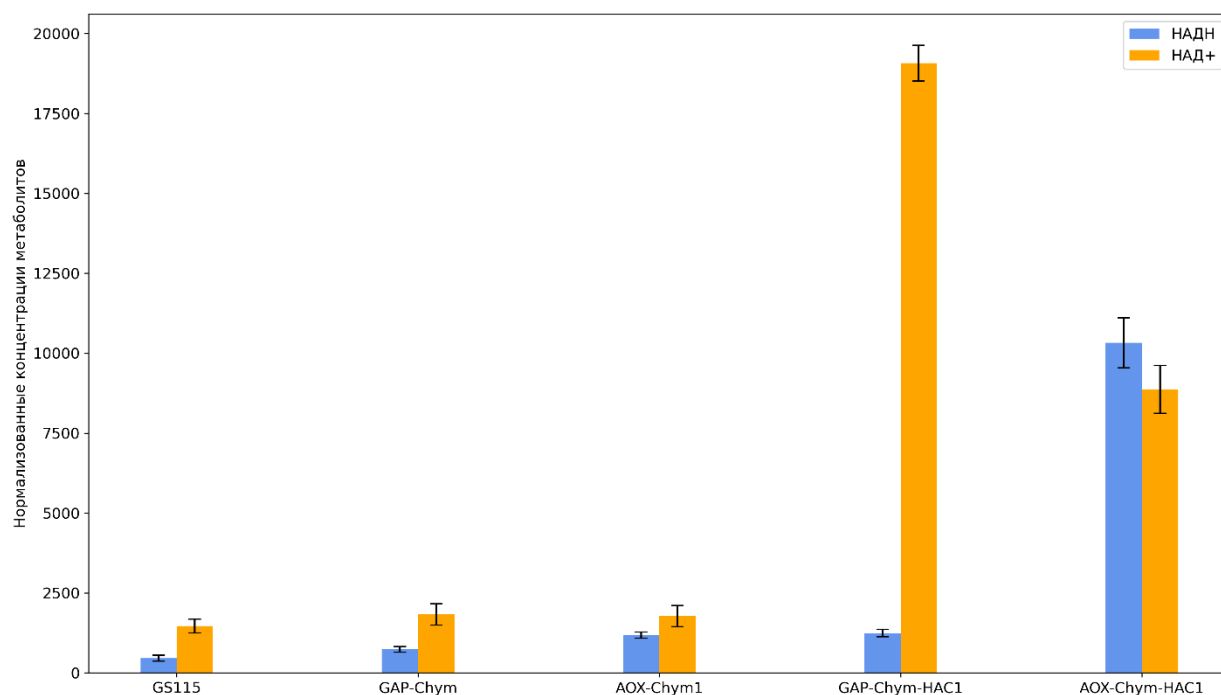


Рис. 35. Изменения концентраций пула НАДН/НАД⁺ в различных штаммах *P. pastoris*. Штаммы GS115, GS115/pPIC α -Chym1, GS115/pPIC α -Chym1-HAC1 (экспрессия рекомбинантного белка под контролем промотора P_{AOX1}) культивировали на минеральной среде с 1% метанолом. GS115/pVR2-Chym1 GS115/pVR2-Chym1-HAC1 (экспрессия рекомбинантного белка под контролем промотора GAP) культивировали на минеральной среде с 10% глюкозой. Заметно увеличение пула НАДН/НАД⁺ при коэкспрессии sHAC1, однако при активации P_{AOX1} и коэкспрессии sHAC1 очевидно увеличение восстановительного потенциала НАДН/НАД⁺, используемого в биосинтетических процессах, в том числе и синтезе рекомбинантных белков.

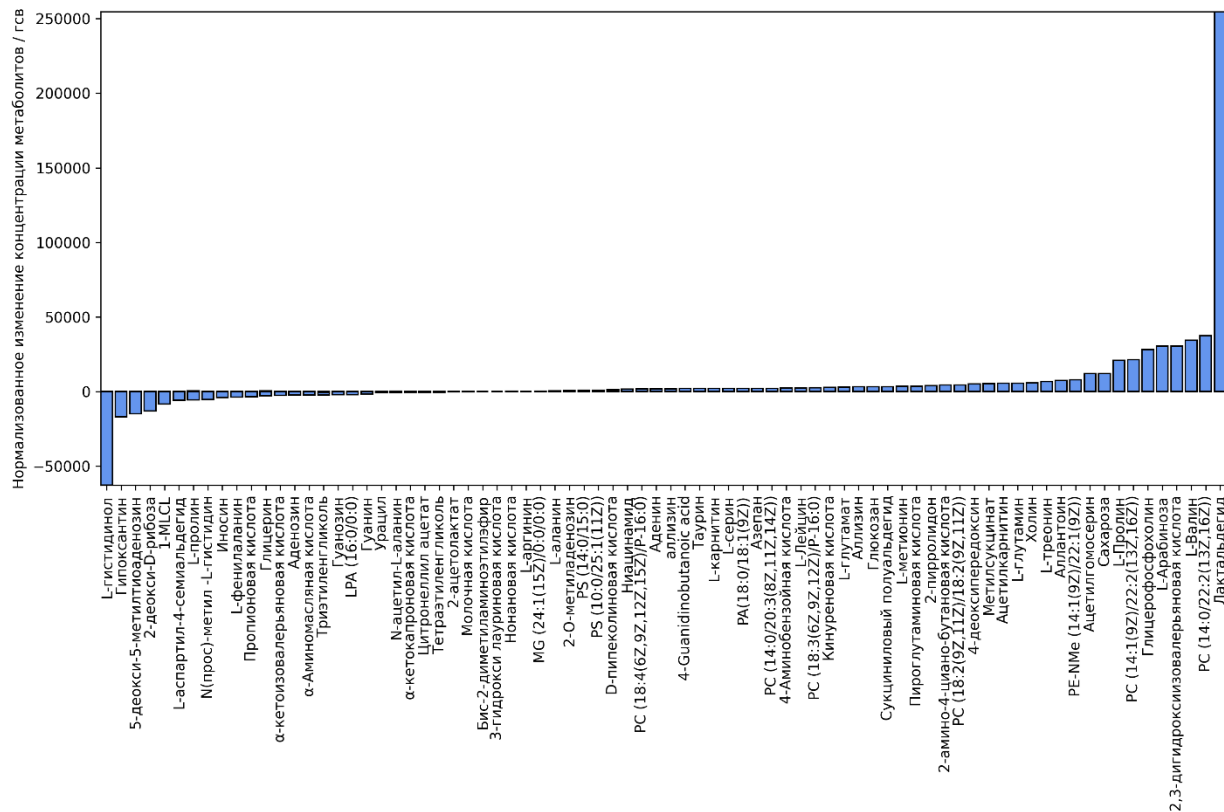


Рис. 36. Изменение концентраций отдельных метаболитов при коэкспрессии sHAC1 между штаммами. GS115/pPICzα-Chym1, GS115/pPICzα-Chym1-HAC1 (экспрессия рекомбинантного белка под контролем промотора P_{AOXI}) культивировали на минеральной среде с 1% метанолом (Приложение 2, Табл. 13).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение экспрессионной системы *P. pastoris* (*K. phaffii*) позволяет добиваться высоких выходов при биотехнологическом синтезе рекомбинантных ферментов (секреторной ФЛА2 и химозина), а также использовать относительно несложные масштабируемые методы очистки. Потенциал данной экспрессионной системы до конца не раскрыт. Однако, используя различные методологические подходы, прежде всего омиксные технологии, для анализа биохимических процессов и определения лимитирующих факторов, в будущем возможно значительно увеличить продуктивность данной экспрессионной системы. Разработка таких штаммов является приоритетным направлением современной биотехнологии.

Использование системы экспрессии *P. pastoris*, работающей под контролем промотора АОХ1, индуцируемого метанолом, активно применяется в различных технологических процессах, связанных с получением ферментов для промышленности. Тем не менее, в будущем возможно создание штамм-продуцентов рекомбинантных ФЛА2 и химозина в системе экспрессии *P. pastoris* с использованием “сильного” промотора, не требующего использования метанола в качестве индуктора.

В данной работе показаны результаты по разработке систем экспрессии ФЛА2. Так же представлен двухэтапный надежный воспроизводимый метод очистки рекомбинантной ФЛА2, позволяющий производить высокоочищенный фермент (~95%) с концентрацией не менее 3 мг/мл и активностью 220 ед/мл.

В ходе выполнения проекта был получен высокоэффективный рекомбинантный штамм метилотрофных дрожжей *P. pastoris*, продуцирующий функционально активный рекомбинантный прохимозин *B. taurus*; подобраны условия автокаталитической активации прохимозина до химозина; разработан метод очистки и концентрирования рекомбинантного химозина до 4 мг/мл (1000 IMCU/мл).

Автором был получен штамм-продуцент метилотрофных дрожжей *P. pastoris*, экспрессирующий рекомбинантный химозин белухи (*D. leucas*) с продуктивностью 50 мг/л. Однако его специфическая активность оказалась значительно ниже, чем у бычьего химозина, и составила 53 IMCU/мг. При этом химозин белухи характеризуется высокой неспецифической протеолитической активностью, что делает его неприменимым для использования в пищевой промышленности.

В работе было проанализировано влияние коэкспрессии фактора sHAC1 на уровень продукции рекомбинантного химозина быка *B. taurus*, был проведен анализ изменений метаболома, показаны основные метаболические изменения, связанные с сверхэкспрессией рекомбинантного химозина и влиянием транскрипционного фактора sHAC1 на метаболом.

ВЫВОДЫ

1. Разработан и апробирован масштабируемый метод выделения и очистки рекомбинантной ФЛА2, экспрессированной в *P. pastoris*. Полученный конечный препарат не содержит хозяйской ДНК и является пригодным для использования в промышленных целях. Конечный выход продукта составил 74%. Показана роль двухвалентных катионов в увеличении термостабильности рекомбинантной ФЛА2.
2. Выделена ФЛА2 TI-Nh из яда египетской кобры *Naja haje*, способная ингибировать тромбин. Данный белок принадлежит к группе IB ФЛА2. Это первый ингибитор тромбина, выделенный из яда змей семейства *Elapidae* и первая описанная ФЛА2, способная ингибировать тромбин. Константа ингибирования тромбина составила 72,8 нМ.
3. Получен промышленный штамм-продуцент рекомбинантного химозина быка в *P. pastoris* с системой интеграции гена в хромосому дрожжей, проведена оптимизация условий ферментации и автокатализа.
4. Разработана масштабируемая система выделения и очистки рекомбинантного химозина, использованы простые этапы получения, делающие данную технологию экономически целесообразной. Полученный фермент отвечает всем требованиям по биобезопасности, в том числе по отсутствию хозяйской ДНК и является пригодным для крупномасштабного технологического производства. Конечный выход целевого продукта составил 60%.
5. Создан штамм-продуцент рекомбинантного химозина белухи в *P. pastoris*. Определены детерминанты для улучшения удельной активности методами белковой инженерии.
6. Проведен анализ влияния коэкспрессии транскрипционного фактора sHAC1 на уровень продукции рекомбинантного химозина в *P. pastoris*. При коэкспрессии sHAC1 показано увеличение биопroduкции химозина на 50% при использовании P_{AOX1} - промотора.
7. Показано изменение баланса НАДН/НАД⁺ при коэкспрессии sHAC1, что может быть использовано в дальнейшем для увеличения продукции рекомбинантного химозина в *P. pastoris* методами метаболической инженерии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в международных рецензируемых журналах:

1. Osipov A.V., **Filkin S.Y.**, Makarova Y.V., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. A new type of thrombin inhibitor, noncytotoxic phospholipase A2, from the *Naja haje* cobra venom // *Toxicon*. – 2010. – V. 55. – №. 2-3. – P. 186-194.
2. Frahm S., Slimak M.A., Ferrarese L., Santos-Torres J., Antolin-Fontes B., Auer S., **Filkin S.**, Pons S., Fontaine J.F., Tsetlin V., Maskos U., Ibañez-Tallon I. Aversion to nicotine is regulated by the balanced activity of $\beta 4$ and $\alpha 5$ nicotinic receptor subunits in the medial habenula. // *Neuron*. – 2011. – V. 70. – №. 3. – P. 522-535.
3. Vulfius C.A., Kasheverov I.E., Starkov V.G., Osipov A.V., Andreeva T.V., **Filkin S.Y.**, Gorbacheva E.V., Astashev M.E., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. Inhibition of nicotinic acetylcholine receptors, a novel facet in the pleiotropic activities of snake venom phospholipases A2 // *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – №. 12. – P. e115428.
4. **Filkin S.Y.**, Chertova N.V., Zenin A.A., Lipkin A.V., Sichev A.A., Bityak D.S., Sadykhov E.G., Popov V.O., Fedorov A.N. Expression, purification and biophysical characterization of recombinant *Streptomyces violaceoruber* phospholipase PLA2 overproduced in *Pichia pastoris* // *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. – 2020. – V. 50. – №. 6. – P. 549-555.
5. **Филькин С. Ю.**, Чертова Н.В., Зенин А.А., Липкин А.В., Садыхов Э.Г., Фёдоров А.Н. Разработка масштабируемого метода выделения и очистки рекомбинантной секреторной фосфолипазы А2 при экспрессии в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris* // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2019. – Т. 55. – №. 6. – С. 578-585.
6. **Filkin S.Y.**, Lipkin A.V., Fedorov A.N. Phospholipase superfamily: structure, functions, and biotechnological applications // *Biochemistry (Moscow)*. – 2020. – V. 85. – P. 177-195.
7. **Filkin S.Y.**, Chertova N.V., Vavilova E.A., Zatsepin S.S., Eldarov M.A., Sadykhov E.G., Fedorov A.N., Lipkin A.V. Optimization of the production method for recombinant chymosin in the methylotrophic yeast *Komagataella phaffii* // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2020. – V. 56. – P. 657-661.
8. **Филькин С.Ю.** Чертова Н.В., Зацепин С.С., Садыхов Э.Г., Федоров А.Н., Липкин А.В. Получение химозина белухи (*Delphinapterus leucas*) в метилотрофных дрожжах *Komagataella phaffii* и характеристика рекомбинантного фермента // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2021. – Т. 57. – №. 3. – С. 228-234.

Патенты.

1. **Филькин С.Ю.**, Зенин В.А., Чертова Н.В., Липкин А.В., Федоров А.Н. Способ очистки рекомбинантного ферментного препарата фосфолипазы А2 из штамма продуцента *Pichia pastoris*. Патент на изобретение RU2746563 С1, 15.04.2021
2. **Филькин С.Ю.**, Федоров А.Н., Липкин А.В., Чертова Н.В. Получение гена фосфолипазы А2 с измененным оптимумом рН путем удаления сайтов гликозилирования. Патент на изобретение RU2766448, 15.03.2022.

3. Эльдаров М.А., **Филькин С.Ю.**, Федоров А.Н., Липкин А.В., Садыхов Э.Г., Чертова Н.В. Способ микробиологической продукции химозина быка с использованием рекомбинантного штамма *Pichia pastoris*, содержащего синтетический ген варианта химозина с коэкспрессией фактора sHAC1. Патент на изобретение RU2769175, 29.03.2022.
4. Эльдаров М.А., **Филькин С. Ю.**, Федоров А.Н., Липкин А. В., Садыхов Э. Г., Чертова Н. В. Способ микробиологического синтеза прохимозина быка с использованием рекомбинантного штамма *Pichia pastoris* содержащего синтетический ген варианта препрохимозина с модифицированной сигнальной последовательностью секреции. Патент на изобретение RU2779307, 06.09.2022.

Тезисы докладов:

1. **Филькин С.Ю.**, Чертова Н.В., Зенин А.А., Липкин А.В., Садыхов Э.Г., Федоров А.Н. Выделение и очистка рекомбинантной секреторной фосфолипазы А2 при экспрессии в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris*. // IX Российский симпозиум "Белки и пептиды". Материалы симпозиума. – 2019. – С. 141.
2. Чертова Н.В., **Филькин С.Ю.**, Липкин А.В., Федоров А.Н. Разработка технологии рекомбинантного фермента фосфолипазы А2 для пищевой промышленности. // 12-ая Международная конференция "Биокатализ: фундаментальные исследования и применения". Сборник материалов конференции. – 2019. – С. 126.
3. Чертова Н.В., **Филькин С.Ю.**, Федоров А.Н. Разработка и получение рекомбинантных штамм-продуцентов химозина в метилотрофных дрожжах *Komagataella phaffii*. // XXXIX Международная научная-практическая конференция "Химия, физика, биология, математика: теоретические и прикладные исследования". Сборник статей по материалам конференции. – 2020. – С. 11-15.
4. Князева К.Э., **Филькин С.Ю.**, Чертова Н.В., Зацепин С.С., Эльдаров М.А., Липкин А.В., Федоров А.Н. Разработка и получение рекомбинантных штамм-продуцентов рекомбинантного химозина в *Pichia pastoris*. // X Российский симпозиум «Белки и пептиды». Материалы симпозиума. – 2021. – С. 131.
5. **Филькин С.Ю.**, Чертова Н.В., Князева К.Э., Цедилин А.М., Липкин А.В., Федоров А.Н. Высокоэффективная система получения рекомбинантных ферментов фосфолипазы А2 и химозина метилотрофных дрожжах *P. pastoris*. // 13-ая Международная конференция "Биокатализ: фундаментальные исследования и применения". Сборник материалов конференции. – 2023. – С. 147.
6. Липкин А.В., **Филькин С.Ю.**, Макарова А.О., Морозкина Е.В., Шлыкова Д.С., Ахременко Д.Д., Волков И.Ю., Юркова М.С., Плеханова Н.С., Федоров А.Н. Разработка технологий производства рекомбинантных белков- проблемы промышленной адаптации и масштабирования. // XI Российский симпозиум "Белки и пептиды". Материалы симпозиума. – 2024. – С. 307.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yamada Y., Matsuda M., Maeda K., Mikata K. 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*). // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 1995. – V. 59. – № 3. – P. 439-444.
2. Heisteringer L., Gasser B., Mattanovich D. Microbe Profile: *Komagataella phaffii*: a methanol devouring biotech yeast formerly known as *Pichia pastoris* // Microbiology. – 2020. – V. 166. – № 7. – P. 614-616.
3. Ahmad M., Hirz M., Pichler H., Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2014. – V. 98. – № 12. – P. 5301–5317.
4. Gasser B., Prielhofer R., Marx H., Maurer M., Nocon J., Steiger M., Puxbaum V., Sauer M., Mattanovich D. *Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research. // Future microbiology. – 2013. – V. 8. – № 2. – P. 191-208.
5. Cregg J.M., Cereghino J.L., Shi J., Higgins D.R. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. // Molecular Biotechnology. – 2000. – V. 16. – № 1. – P. 23-52.
6. McNeil B., Archer D., Giavasis I., Harvey L. Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals. // Elsevier. – 2013.
7. Singh S., Gras A., Fiez-Vandal C., Martinez M., Wagner R., Byrne B. Large-scale production of membrane proteins in *Pichia pastoris*: The production of G protein-coupled receptors as a case study // Methods in Molecular Biology. – 2012. – V. 866. – P. 197-207.
8. Laukens B., De Visscher C., Callewaert N. Engineering yeast for producing human glycoproteins: where are we now? // Future microbiology. – 2015. – V. 10. – № 1. – P. 21-34.
9. Bill R.M. Playing catch-up with *Escherichia coli*: Using yeast to increase success rates in recombinant protein production experiments. // Frontiers in Microbiology. – 2014. – V. 5. – P. 85.
10. Brady J. R., Whittaker C. A., Tan M. C., Kristensen D.L., Ma D., Dalvie N.C., Love K.R., Love J.C. Comparative genome-scale analysis of *Pichia pastoris* variants informs selection of an optimal base strain // Biotechnology and Bioengineering. – 2020. – V. 117. – № 2. – P. 543-555.
11. Sturmberger L., Chappell T., Geier M., Krainer F., Day K.J., Vide U., Trstenjak S., Schiefer A., Richardson T., Soriaga L., Darnhofer B., Birner-Gruenberger R., Glick B.S., Tolstorukov I., Cregg J., Madden K., Glieder A. Refined *Pichia pastoris* reference genome sequence. // Journal of biotechnology. – 2016. – V. 235. – P. 121-31.
12. Dragosits M., Stadlmann J., Albiol J., Baumann K., Maurer M., Gasser B., Sauer M., Altmann F., Ferrer P., Mattanovich D. The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris* // Journal of Proteome Research. – 2009. – V. 8. – № 3. – P. 1380-1392.
13. Weninger A., Hatzl A.-M., Schmid C., Vogl T., Glieder A. Combinatorial optimization of CRISPR/Cas9 expression enables precision genome engineering in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* // Journal of Biotechnology. – 2016. – V. 235. – P. 139-149.

14. Zha J., Liu D., Ren J., Liu Z., Wu X. Advances in Metabolic Engineering of *Pichia pastoris* Strains as Powerful Cell Factories // Journal of Fungi (Basel, Switzerland). – 2023. – V. 9. – № 10. – P. 1027.
15. Schwarzhans J.P., Wibberg D., Winkler A., Luttermann T., Kalinowski J., Friehs K. Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization // Microbial Cell Factories. – 2016. V.15. – № 1. – P. 84.
16. Cregg J.M., Barringer K.J., Hessler A.Y., Madden K. R. *Pichia pastoris* as a host system for transformations // Molecular and cellular biology. – 1985. – V. 5. – № 12. – P. 3376-3385.
17. Gu Y., Gao J., Cao M., Dong C., Lian J., Huang L., Cai J., Xu Z. Construction of a series of episomal plasmids and their application in the development of an efficient CRISPR/Cas9 system in *Pichia pastoris* // World journal of microbiology & biotechnology. – 2019. – V. 35. – № 6. – P. 79.
18. Nakamura Y., Nishi T., Noguchi R., Ito Y., Watanabe T., Nishiyama T., Aikawa S., Hasunuma T., Ishii J., Okubo Y., Kondo A. A Stable, Autonomously Replicating Plasmid Vector Containing *Pf**ilichia pastoris* Centromeric DNA // Applied and environmental microbiology. – 2018. – V. 84. – № 15. – P. e02882-17.
19. Pan R., Zhang J., Shen W.-L., Tao Z.-Q., Li S.-P., Yan X. Sequential deletion of *Pichia pastoris* genes by a self-excisable cassette. // FEMS yeast research. – 2011. – V. 11. – № 3. – P. 292-298.
20. Looser V., Lüthy D., Straumann M., Hecht K., Melzoch K., Kovar K. Effects of glycerol supply and specific growth rate on methanol-free production of CALB by *P. pastoris*: functional characterization of a novel promoter // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2017. – V. 101. – P. 3163-3176.
21. Schwarzhans J.P., Wibberg D., Winkler A., Luttermann T., Kalinowski J., Friehs K. Non-canonical integration events in *Pichia pastoris* encountered during standard transformation analysed with genome sequencing // Scientific Reports. – 2016. – V. 6. – P. 38952.
22. Kelwick R., MacDonald J. T., Webb A. J., Freemont. P. Developments in the tools and methodologies of synthetic biology // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2014. – V.2. – A. 60.
23. Zahrl R. J., Peña D. A., Mattanovich D., Gasser B. Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris* // FEMS yeast research. – 2017. – V.17(7).
24. Yang Z., Zhang. Z. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review // Biotechnology advances – 2018. – V.36. – № 1. – P. 182-195.
25. Peña D. A., Gasser B., Zanghellini J., Steiger M.G., Mattanovich D. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* // Metabolic Engineering. – 2018. – V. 50. – P. 2-15.
26. Geiler-Samerotte K.A., Dion M.F., Budnik B.A., Wang S.M., Hartl D.L., Drummond D.A. Misfolded proteins impose a dosage-dependent fitness cost and trigger a cytosolic unfolded protein response in yeast // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2011. – V. 108. – № 2. – P. 680-685.

27. Guerfal M., Ryckaert S., Jacobs P.P., Ameloot P., van Craenenbroeck K., Derycke R., Callewaert N. The HAC1 gene from *Pichia pastoris*: characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins // Microbial Cell Factories. – 2010. – V. 9. – P. 49.
28. Wagner J. M., Alper H. S. Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances // Fungal Genetics and Biology. – 2016. – V. 89. – P. 126-136.
29. Chung K., Selvarasu S., Andrea C., Ryu J., Lee H., Ahn J., Lee H., Lee D.-Y. Genome-scale metabolic reconstruction and in silico analysis of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for strain improvement. // Microbial cell factories. – 2010. – V. 9. – № 1. – P. 50.
30. Schwarzhans J.-P., Luttermann T., Geier M., Kalinowski J., Friehs K. Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris*. // Biotechnology advances. – 2017. – V. 35. – № 6. – P. 681-710.
31. Vogl T., Glieder A. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production // New Biotechnology. – 2013. – V. 30. – № 4. – P. 385-404.
32. Waterham H.R., Digan M.E., Koutz P.J., Lair S.V., Cregg J.M. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. // Gene. – 1997. – V. 186. – № 1. – P. 37-44.
33. Qin X., Qian J., Yao G., Zhuang Y., Zhang S., Chu J. GAP promoter library for fine-tuning of gene expression in *Pichia pastoris*. // Applied and environmental microbiology. – 2011. – V. 77. – № 11. – P. 3600-3608.
34. Vogl T., Sturmberger L., Kickenweiz T., Wasmayer R., Schmid C., Hatzl A.M., Gerstmann M.A., Pitzer J., Wagner M., Thallinger G.G., Geier M., Glieder A. A toolbox of diverse promoters related to methanol utilization: functionally verified parts for heterologous pathway expression in *Pichia pastoris* // ACS synthetic biology. – 2016. – V. 5. – № 2. – P. 172-186.
35. Portela R.M.C., Vogl T., Kniely C., Fischer J.E., Oliveira R., Glieder A. Synthetic Core Promoters as Universal Parts for Fine-Tuning Expression in Different Yeast Species // ACS Synthetic Biology. – 2017. – V. 6. – № 3. – P. 471-484.
36. Ohsawa, S., Yurimoto H., Sakai Y. Novel function of Wsc proteins as a methanol-sensing machinery in the yeast *Pichia pastoris* // Molecular Microbiology. – 2017. – V. – № 2. – P. 349-363.
37. Wang X., Wang Q., Wang J., Bai P., Shi L., Shen W., Zhou M., Zhou X., Zhang Y., Cai M. Mit1 Transcription Factor Mediates Methanol Signaling and Regulates the Alcohol Oxidase 1 (AOX1) Promoter in *Pichia pastoris* // Journal of Biological Chemistry. – 2016. – V. 291. – № 12. – P. 6245-6261.
38. Zhang C., Ma Y., Miao H., Tang X., Xu B., Wu Q., Mu Y., Huang Z. Transcriptomic Analysis of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) GS115 During Heterologous Protein Production Using a High-Cell-Density Fed-Batch Cultivation Strategy. // Frontiers in Microbiology. – 2020. – V. 11. – P. 463.

39. Vogl T., Fischer J.E., Hyden P., Wasmayer R., Sturmberger L., Glieder A. Orthologous promoters from related methylotrophic yeasts surpass expression of endogenous promoters of *Pichia pastoris*. // *AMB Express*. – 2020. – V. 10. – № 1. – P. 38.
40. Ergün B. G., Gasser B., Mattanovich B., Çalık P. Engineering of *alcohol dehydrogenase 2* hybrid-promoter architectures in *Pichia pastoris* to enhance recombinant protein expression on ethanol. // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2019. – V. 116. – № 10. – P. 2674-2686.
41. Prielhofer R., Reichinger M., Wagner N., Claes K., Kiziak C., Gasser B., Mattanovich D. Superior protein titers in half the fermentation time: Promoter and process engineering for the glucose-regulated *GTH1* promoter of *Pichia pastoris*. // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2018. – V. 115. – № 10. – P. 2479-2488.
42. Vogl T., Sturmberger L., Fauland P.C., Hyden P., Fischer J.E., Schmid C., Thallinger G.G., Geier M., Glieder A. Methanol independent induction in *Pichia pastoris* by simple derepressed overexpression of single transcription factors. // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2018. – V. 115. – № 4. – P. 1037-1050.
43. Mombeni M., Arjmand S., Siadat S.O.R., Alizadeh H., Abbasi A. pMOX: a new powerful promoter for recombinant protein production in yeast *Pichia pastoris*. // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2020. – V. 139. – P. 109582.
44. Lee J.Y., Chen H., Liu A., Alba B.M., Lim A.C. Auto-induction of *Pichia pastoris* AOX1 promoter for membrane protein expression. // *Protein Expression and Purification*. – 2017. – V. 137. – P. 7-12.
45. De Groeve, M., Laukens B., Schotte P. Optimizing expression of Nanobody® molecules in *Pichia pastoris* through co-expression of auxiliary proteins under methanol and methanol-free conditions. // *Microbial Cell Factories*. – 2023. – V. 22. – № 1. – P. 135.
46. Vogl T., Sturmberger L., Fauland P.C., Hyden P., Fischer J.E., Schmid C., Thallinger G.G., Geier M., Glieder A. Methanol independent induction in *Pichia pastoris* by simple derepressed overexpression of single transcription factors. // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2018. – V. 115. – № 4. – P. 1037-1050.
47. Damasceno L.M., Huang C.J., Batt C.A. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2012. – V. 93. – №1. – P. 31–39.
48. Owji H., Nezafat N., Negahdaripour M., Hajiebrahimi A., Ghasemi Y. A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications. // *European Journal of Cell Biology*. – 2018. – V. 97. – № 6. – P. 422-441.
49. Liang S., Li C., Ye Y., Lin Y. Endogenous signal peptides efficiently mediate the secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. // *Biotechnology letters*. – 2013. – V. 35. – № 1. – P. 97-105.
50. Puxbaum V., Mattanovich D., Gasser B. Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris*. // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2015. – V. 99. – №7. – P. 2925–2938.

51. Tsuchiya Y., Fujisawa H., Nakayama K., Nagahora H., Jigami Y. Effect of chicken lysozyme signal peptide alterations on secretion of human lysozyme in *Saccharomyces cerevisiae*. // Biochemistry and Cell Biology. – 1993. – V. 71. – № 7-8. – P. 401-405.
52. Tsuchiya Y., Morioka K., Shirai J., Yokomizo Y., Yoshida K. Gene design of signal sequence for effective secretion of protein. // Nucleic Acids Symposium Series. – 2003. – V. 3. – № 1. – P. 261-262.
53. Cartwright C.P., Zhu Y.S., Tipper D.J. Efficient secretion in yeast based on fragments from K1 killer preprotoxin. // Yeast (Chichester, England). – 1992. – V. 8. – № 4. – P. 261-272.
54. Viña-Gonzalez J., Gonzalez-Perez D., Ferreira P., Martinez A.T., Alcalde M. Focused Directed Evolution of Aryl-Alcohol Oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* by Using Chimeric Signal Peptides. // Applied and Environmental Microbiology. – 2015. – V. 81. – № 18. – P. 6451-6462.
55. Brake A.J., Merryweather J.P., Coit D.G., Heberlein U.A., Masiarz F.R., Mullenbach G.T., Urdea M.S., Valenzuela P., Barr P.J. Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1984. – V. 81. – № 15. – P. 4642-4646.
56. Ahn J., Jang M.-J., Ang K.S., Lee H., Choi E.-S., Lee D.-Y. Codon optimization of *Saccharomyces cerevisiae* mating factor alpha prepro-leader to improve recombinant protein production in *Pichia pastoris*. // Biotechnology Letters. – 2016. – V. 38. – № 12. – P. 2137-2143.
57. Dancourt J., Barlowe C. Protein sorting receptors in the early secretory pathway. // Annual review of biochemistry. – 2010. – V. 79. – P. 777-802.
58. Fuller R.S., Sterne R.E., Thorner J. Enzymes required for yeast prohormone processing. // Annual review of physiology. – 1988. – V. 50. – P. 345-362.
59. Delic M., Valli M., Graf A.B., Pfeffer M., Mattanovich D., Gasser B. The secretory pathway: exploring yeast diversity. // FEMS microbiology reviews. – 2013. – V. 37. – № 6. – P. 872-914.
60. Lin-Cereghino G.P., Stark C.M., Kim D., Chang J., Shaheen N., Poerwanto H., Agari K., Moua P., Low L.K., Tran N. The effect of α -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. // Gene. – 2013. – V. 519. – № 2. – P. 311-317.
61. Chahal S., Wei P., Moua P., Park S.P.J., Kwon J., Patel A., Vu A.T., Catolico J.A., Tsai Y.F.T., Shaheen N. Structural characterization of the α -mating factor prepro-peptide for secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. // Gene. – 2017. – V. 598. – P. 50-62.
62. Obst U., Lu T.K., Sieber V. A Modular Toolkit for Generating *Pichia pastoris* Secretion Libraries // ACS synthetic biology. – 2017. – V. 6. – № 6. – P. 1016-1025.
63. Prielhofer R., Barrero J.J., Steuer S., Gassler T., Zahrl R., Baumann K., Sauer M., Mattanovich D., Gasser B., Marx H. GoldenPiCS: a Golden Gate-derived modular cloning system for applied synthetic biology in the yeast *Pichia pastoris*. // BMC Systems Biology. – 2017. – V. 11. – № 1. – P. 123.
64. Barone G.D., Emmerstorfer-Augustin A., Biundo A., Pisano I., Coccetti P., Mapelli V., Camattari A. Industrial Production of Proteins with *Pichia pastoris*—*Komagataella phaffii*. // Biomolecules. – 2023. – V. 13. – № 3. – P. 441.

65. He H., Wu S., Mei M., Ning J., Li C., Ma L., Zhang G., Yi L. A Combinational Strategy for Effective Heterologous Production of Functional Human Lysozyme in *Pichia pastoris*. // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – V. 8. – P. 118.
66. Rose M.D., Misra L.M., Vogel J.P. Rose, M.D. KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. // *Cell*. – 1989. – V. 57. – № 7. – P. 1211-1221.
67. Farquhar R., Honey N., Murant S.J., Bossier P., Schultz L., Montgomery D., Ellis R.W., Freedman R.B., Tuite M.F. Protein disulfide isomerase is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Gene*. – 1991. – V. 108. – № 1. – P. 81-89.
68. Hudson, D.A., Gannon S.A., Thorpe C. Oxidative protein folding: from thiol-disulfide exchange reactions to the redox poise of the endoplasmic reticulum // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2015. – V. 80. – P. 171-182.
69. Mori K. The unfolded protein response: The dawn of a new field. // *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*. – 2015. – V.91 – № 9 – P. 469–480.
70. Gasser B., Maurer M., Gach J., Kunert R., Mattanovich D. Engineering of *Pichia pastoris* for improved production of antibody fragments. // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2006. – V. 94. – № 2. – P. 353-361.
71. Moon H.-Y., Cheon S.A., Kim H., Agaphonov M.O., Kwon O., Oh D.-B., Kim J.-Y., Kang H.A. *Hansenula polymorpha* Hac1p Is Critical to Protein N-Glycosylation Activity Modulation, as Revealed by Functional and Transcriptomic Analyses. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2015. – V. 81. – № 20. – P. 6982-6993.
72. Lin X., Liang S., Han S., Zheng S., Ye Y., Lin Y. Quantitative iTRAQ LC-MS/MS proteomics reveals the cellular response to heterologous protein overexpression and the regulation of HAC1 in *Pichia pastoris*. // *Journal of Proteomics*. – 2013. – V. 91. – P. 58-72.
73. Raschmanová H., Weninger A., Knežlik Z., Melzoch K., Kovar K. Engineering of the unfolded protein response pathway in *Pichia pastoris*: enhancing production of secreted recombinant proteins. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2021. – V. 105. – № 11. – P. 4397-4414.
74. Huang M., Gao Y., Zhou X., Zhang Y., Cai M. Regulating unfolded protein response activator HAC1p for production of thermostable raw-starch hydrolyzing α -amylase in *Pichia pastoris*. // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. – 2017. – V. 40. – № 3. – P. 341-350.
75. Zahrl R.J., Prielhofer R., Burgard J., Mattanovich D., Gasser B. Synthetic activation of yeast stress response improves secretion of recombinant proteins. // *New Biotechnology*. – 2023. – V. 73. – P. 19-28.
76. Carnicer M., Canelas A.B., Ten Pierick A., Zeng Z., van Dam J., Albiol J., Ferrer P., Heijnen J.J., van Gulik W. Development of quantitative metabolomics for *Pichia pastoris*. // *Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society*. – 2012. – V. 8. – № 2. – P. 284-298.
77. Carnicer M., Ten Pierick A., van Dam J., Heijnen J.J., Albiol J., van Gulik W., Ferrer P. Quantitative metabolomics analysis of amino acid metabolism in recombinant *Pichia pastoris* under different oxygen availability conditions. // *Microbial Cell Factories*. – 2012. – V. 11. – P. 83.

78. Heyland J., Fu J., Blank L. M., Schmid A. Quantitative physiology of *Pichia pastoris* during glucose-limited high-cell density fed-batch cultivation for recombinant protein production. // Biotechnology and bioengineering. – 2010. – V. 107. – № 2. – P. 357-368.
79. Nie Y., Huang M., Lu J., Qian J., Lin W., Chu J., Zhuang Y., Zhang S. Impacts of high β -galactosidase expression on central metabolism of recombinant *Pichia pastoris* GS115 using glucose as sole carbon source via (^{13}C) metabolic flux analysis. // Journal of Biotechnology. – 2014. – V. 187. – P. 124-134.
80. Tredwell G.D., Aw R., Edwards-Jones B., Leak D.J., Bundy J.G. Rapid screening of cellular stress responses in recombinant *Pichia pastoris* strains using metabolite profiling. // Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. – 2017. – V. 44. – № 3. – P. 413-417.
81. Edwards-Jones B., Aw R., Barton G.R., Tredwell G.D., Bundy J.G., Leak D.J. Translational arrest due to cytoplasmic redox stress delays adaptation to growth on methanol and heterologous protein expression in a typical fed-batch culture of *Pichia pastoris*. // PloS One. – 2015. – V. 10. – № 3. – P. e0119637.
82. Berrios-Rivera S.J., Bennett G.N., San K.-Y. Metabolic Engineering of *Escherichia coli*: Increase of NADH Availability by Overexpressing an NAD^+ -Dependent Formate Dehydrogenase. // Metabolic Engineering. – 2002. – V. 4. – № 3. – P. 217-229.
83. Литвиенко Н.М., Кисель М.А. Эндогенные фосфолипазы A2. Структура и функции. // Наука и техника, 1991.
84. Leslie C.C. Cytosolic phospholipase A2: physiological function and role in disease. // Journal of lipid research. – 2015. – Cytosolic phospholipase A2. – V. 56 – № 8. – P. 1386-402.
85. Murakami M. Lipoquality control by phospholipase A2 enzymes. // Proceedings of the Japan Academy, Series B. – 2017. – V. 93. – № 9. – P. 677-702.
86. Antonopoulou G., Barbayianni E., Magrioti V., Cotton N., Stephens D., Constantinou-Kokotou V., Dennis E.A., Kokotos G. Structure-activity relationships of natural and non-natural amino acid-based amide and 2-oxoamide inhibitors of human phospholipase A(2) enzymes. // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2008. – V. 16. – № 24. – P. 10257-10269.
87. Schaloske R.H., Dennis E.A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. // Biochimica Et Biophysica Acta. – 2006. – V. 1761. – № 11. – P. 1246-1259.
88. van den Bergh C.J., Bekkers A.C., De Geus P., Verheij H.M., de Haas G.H. Secretion of biologically active porcine prophospholipase A2 by *Saccharomyces cerevisiae*. Use of the prepro sequence of the alpha-mating factor. // European Journal of Biochemistry. – 1987. – V. 170. – № 1-2. – P. 241-246.
89. Kramer R.M., Hession C., Johansen B., Hayes G., McGray P., Chow E.P., Tizard R., Pepinsky R.B. Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2. // The Journal of Biological Chemistry. – 1989. – V. 264. – № 10. – P. 5768-5775.
90. Burke J. E., Dennis E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. // Journal of lipid research. – 2009. – V. 50. – № Supplement. – P. S237-S242.
91. Han S.K., Kim K.P., Koduri R., Bittova L., Munoz N.M., Leff A.R., Wilton D.C., Gelb M.H., Cho W. Roles of Trp31 in high membrane binding and proinflammatory activity of human

group V phospholipase A2. // The Journal of Biological Chemistry. – 1999. – V. 274. – № 17. – P. 11881-11888.

92. Bezzine S., Bollinger J.G., Singer A.G., Veatch S.L., Keller S.L., Gelb M.H. On the binding preference of human groups IIA and X phospholipases A2 for membranes with anionic phospholipids. // The Journal of Biological Chemistry. – 2002. – V. 277. – № 50. – P. 48523-48534.

93. Pan Y.H., Bahnson B.J. Structure of a premicellar complex of alkyl sulfates with the interfacial binding surfaces of four subunits of phospholipase A2. // Biochimica Et Biophysica Acta. – 2010. – V. 1804. – № 7. – P. 1443-1448.

94. Bollinger J.G., Diraviyam K., Ghomashchi F., Murray D., Gelb M.H. Interfacial binding of bee venom secreted phospholipase A2 to membranes occurs predominantly by a nonelectrostatic mechanism. // Biochemistry. – 2004. – V. 43. – № 42. – P. 13293-13304.

95. Armugam A., Gong N., Li X., Siew P.Y., Chai S.C., Nair R., Jeyaseelan K. Group IB phospholipase A2 from *Pseudonaja textilis*. // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2004. – V. 421. – № 1. – P. 10-20.

96. Oliveira A.L., Viegas M.F., da Silva S.L., Soares A.M., Ramos M.J., Fernandes P.A. The chemistry of snake venom and its medicinal potential // Nature Reviews Chemistry. – 2022. – V. 6. – № 7. – P. 451-469.

97. Kini R.M., Evans H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. // Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology. – 1989. – V. 27. – № 6. – P. 613-635.

98. Kumar J.R., Basavarajappa B.S., Vishwanath B.S., Gowda T.V. Biochemical and pharmacological characterization of three toxic phospholipase A2s from *Daboia russelii* snake venom. // Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP. – 2015. – V. 168. – P. 28-38.

99. Mounier C.M., Luchetta P., Lecut C., Koduri R.S., Faure G., Lambeau G., Valentin E., Singer A., Ghomashchi F., Béguin S., Gelb M.H., Bon C. Basic residues of human group IIA phospholipase A2 are important for binding to factor Xa and prothrombinase inhibition comparison with other mammalian secreted phospholipases A2. // European Journal of Biochemistry. – 2000. – V. 267. – № 16. – P. 4960-4969.

100. Kini R.M., Evans H.J. Correlation between the enzymatic activity, anticoagulant and antiplatelet effects of phospholipase A2 isoenzymes from *Naja nigricollis* venom / R. M. Kini, // Thrombosis and Haemostasis. – 1988. – V. 60. – № 2. – P. 170-173.

101. Yang C.C. Chemical modification of the histidine residue in basic phospholipase A2 from the venom of *Naja nigricollis*. // Biochimica Et Biophysica Acta. – 1980. – V. 614. – № 2. – P. 373-388.

102. Strong P.N., Goerke J., Oberg S.G., Kelly R.B. beta-Bungarotoxin, a pre-synaptic toxin with enzymatic activity. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1976. – V. 73. – № 1. – P. 178-182.

103. Ueno E., Rosenberg P. Mechanism of action of beta-bungarotoxin, a presynaptically acting phospholipase A2 neurotoxin: its effect on protein phosphorylation in rat brain synaptosomes. //

- Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology. – 1996. – V. 34. – № 11-12. – P. 1219-1227.
104. Schmidt R.R., Betz H. The beta-bungarotoxin-binding protein from chick brain: binding sites for different neuronal K⁺ channel ligands co-fractionate upon partial purification. // FEBS letters. – 1988. – V. 240. – № 1-2. – P. 65-70.
 105. Dodds D., Schlimgen A.K., Lu S.Y., Perin M.S. Novel reticular calcium binding protein is purified on taipoxin columns. // Journal of Neurochemistry. – 1995. – V. 64. – № 5. – P. 2339-2344.
 106. Krizaj I., Faure G., Gubensek F., Bon C. Re-examination of crotoxin-membrane interactions. // Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology. – 1996. – V. 34. – № 9. – P. 1003-1009.
 107. Copic A., Vucemilo N., Gubensek F., Krizaj I. Identification and purification of a novel receptor for secretory phospholipase A(2) in porcine cerebral cortex. // The Journal of Biological Chemistry. – 1999. – V. 274. – № 37. – P. 26315-26320.
 108. Boffa M.C., Boffa G.A. A phospholipase A2 with anticoagulant activity. II. Inhibition of the phospholipid activity in coagulation. // Biochimica Et Biophysica Acta. – 1976. – V. 429. – № 3. – P. 839-852.
 109. Saikia D., Mukherjee A.K. Anticoagulant and Membrane Damaging Properties of Snake Venom Phospholipase A2 Enzymes. // Snake Venoms – Dordrecht: Springer Netherlands. – 2017. – P. 87-104.
 110. The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X / G. van Diejen, G. Tans, J. Rosing, H. C. Hemker // The Journal of Biological Chemistry. – 1981. – V. 256. – № 7. – P. 3433-3442.
 111. Kini R.M., Evans H.J. The role of enzymatic activity in inhibition of the extrinsic tenase complex by phospholipase A2 isoenzymes from *Naja nigricollis* venom. // Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology. – 1995. – V. 33. – № 12. – P. 1585-1590.
 112. Kini R.M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. // Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology. – 2005. – V. 45. – № 8. – P. 1147-1161.
 113. Корнеева О.С., Анненков В.А. Получение ферментного препарата липазы методом рекомбинантных ДНК. // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК–продукты здорового питания. – 2014. – № 3.
 114. Janssen M.J., Burghout P.J., Verheij H.M., Slotboom A.J., Egmond M.R. Introduction of a C-terminal aromatic sequence from snake venom phospholipases A2 into the porcine pancreatic isozyme dramatically changes the interfacial kinetics. // European Journal of Biochemistry. – 1999. – V. 263. – № 3. – P. 782-788.
 115. Roberts I.N., Jeenes D.J., MacKenzie D.A., Wilkinson A.P., Sumner I.G., Archer D.B. Heterologous gene expression in *Aspergillus niger*: a glucoamylase-porcine pancreatic phospholipase A2 fusion protein is secreted and processed to yield mature enzyme. // Gene. – 1992. – V. 122. – № 1. – P. 155-161.

116. Stadel J.M., Jones C., Livi G.P., Hoyle K., Kurdyla J., Roshak A., McLaughlin M.M., Pfarr D.A., Comer S., Strickler J. Recombinant human secretory phospholipase A2: purification and characterization of the enzyme for active site studies. // Journal of molecular recognition: JMR. – 1992. – V. 5. – № 4. – P. 145-153.
117. Nevalainen K.M.H., Te'o V.S.J., Bergquist P.L. Heterologous protein expression in filamentous fungi. // Trends in Biotechnology. – 2005. – V. 23. – № 9. – P. 468-474.
118. Matoba Y., Kumagai T., Sugiyama M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of *Streptomyces* phospholipase A2 in a calcium-binding form. // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2000. – V. 82. – № 1-4. – P. 221-223.
119. Yu X.-W., Sun W.-H., Wang Y.-Z., Y. Xu Identification of novel factors enhancing recombinant protein production in multi-copy *Komagataella phaffii* based on transcriptomic analysis of overexpression effects. // Scientific Reports. – 2017. – V. 7. – № 1. – P. 16249.
120. Boilard E., Lai Y., Larabee K., Balestrieri B., Ghomashchi F., Fujioka D., Gobezie R., Coblyn J.S., Weinblatt M.E., Massarotti E.M., Thornhill T.S., Divangahi M., Remold H., Lambeau G., Gelb M.H., Arm J.P., Lee D.M. A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A2 in immune complex-mediated arthritis. // EMBO molecular medicine. – 2010. – V. 2. – № 5. – P. 172-187.
121. Rosenson R.S., Hurt-Camejo E. Phospholipase A2 enzymes and the risk of atherosclerosis. // European Heart Journal. – 2012. – V. 33. – № 23. – P. 2899-2909.
122. Quach N.D., Arnold R.D., Cummings B.S. Secretory phospholipase A2 enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. // Biochemical pharmacology. – 2014. – V. 90. – № 4. – P. 338-348.
123. Брагина Н.А., Чупин В.В., Булгаков В.Г., Шальнев А.Н. Липидные ингибиторы фосфолипазы А2. // Биоорганическая химия. – 1999. – Т. 25. – № 2. – С. 83-96.
124. Thompson W., Oslund R.C., Bollinger J., Ewing H., Gelb M.H. High-Throughput Assay of Secreted Phospholipases A 2 Inhibitors. // Lipases and Phospholipases. – Springer, 2012. – P. 149-158.
125. Fraser H., Hislop C., Christie R.M., Rick H.L., Reidy C.A., Chouinard M.L., Eacho P.I., Gould K.E., Trias J. Varespladib (A-002), a secretory phospholipase A2 inhibitor, reduces atherosclerosis and aneurysm formation in ApoE^{-/-} mice. // Journal of Cardiovascular Pharmacology. – 2009. – V. 53. – № 1. – P. 60-65.
126. O'Donoghue M.L., Braunwald E., White H.D., Lukas M.A., Tarka E., Steg P.G., Hochman J.S., Bode C., Maggioni A.P., Im K., Shannon J.B., Davies R.Y., Murphy S.A., Crugnale S.E., Wiviott S.D., Bonaca M.P., Watson D.F., Weaver W.D., Serruys P.W., Cannon C.P., SOLID-TIMI 52 Investigators, Steen D.L. Effect of darapladib on major coronary events after an acute coronary syndrome: the SOLID-TIMI 52 randomized clinical trial. // JAMA. – 2014. – V. 312. – № 10. – P. 1006-1015.
127. Wilensky R.L., Macphee C.H. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and atherosclerosis. // Current Opinion in Lipidology. – 2009. – V. 20. – № 5. – P. 415-420.

128. Li J., Wang H., Tian J., Chen B., Du F. Change in lipoprotein-associated phospholipase A2 and its association with cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndrome. // *Medicine*. – 2018. – V. 97. – № 28. – P. e11517.
129. Markovic M., Ben-Shabat S., Keinan S., Aponick A., Zimmermann E.M., Dahan A. Molecular Modeling-Guided Design of Phospholipid-Based Prodrugs. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – V. 20. – № 9.
130. Borrelli G., Trono D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. // *International journal of molecular sciences*. – 2015. – V. 16. – № 9. – P. 20774-20840.
131. Dijkstra A.J. Enzymatic degumming. // *European Journal of Lipid Science and Technology*. – 2010. V. 112. – № 11. – P. 1178-1189.
132. Cerminati S., Paoletti L., Aguirre A., Peirú S., Menzella H.G., Castelli M.E. Industrial uses of phospholipases: current state and future applications. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2019. – V. 103. – № 6. – P. 2571-2582.
133. Liu A., Yu X.-W., Sha C., Xu Y. *Streptomyces violaceoruber* phospholipase A2: expression in *Pichia pastoris*, properties, and application in oil degumming // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2015. – V. 175. – № 6. – P. 3195-3206.
134. Yang B., Wang Y.-H., Yang J.-G. Optimization of enzymatic degumming process for rapeseed oil. // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 2006. – V. 83. – № 7. – P. 653-658.
135. Yu D., Ma Y., Jiang L., Walid E., He S., He Y., Xiaoyu Z., Zhang J., Hu L. Stability of soybean oil degumming using immobilized phospholipase A(2). // *Journal of Oleo Science*. – 2014. – V. 63. – № 1. – P. 25-30.
136. Fernandes P. Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. // *Enzyme research*. – 2010. – V. 2010. – P. 862537.
137. Raveendran S., Parameswaran B., Ummalyma S.B., Abraham A., Mathew A.K., Madhavan A., Rebello S., Pandey A. Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. // *Food Technology and Biotechnology*. – 2018. – V. 56. – № 1. – P. 16-30.
138. De Maria L., Vind J., Oxenbøll K.M., Svendsen A., Patkar S. Phospholipases and their industrial applications. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2007. – V. 74. – № 2. – P. 290-300.
139. Casado V., Martín D., Torres C., Reglero G. Phospholipases in food industry: a review. // *Lipases and Phospholipases*. – Springer, 2012. – P. 495-523.
140. Madoery R., Gattone C.G., Fidelio G. Bioconversion of phospholipids by immobilized phospholipase A2. // *Journal of Biotechnology*. – 1995. – V. 40. – № 3. – P. 145-153.
141. Lilbaek H.M., Broe M.L., Høier E., Fatum T.M., Ipsen R., Sørensen N.K. Improving the yield of Mozzarella cheese by phospholipase treatment of milk. // *Journal of Dairy Science*. – 2006. – V. 89. – № 11. – P. 4114-4125.

142. Берестова А.В., Зинюхин Г.Б., Межуева Л.В. Особенности технологии пищевых масложировых эмульсий функционального назначения. // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2014. – № 1 (162). – P. 150-155.
143. Kararay A., Gargouri Y., Verger R., Bezzine S. Phospholipase A2 purification and characterization: a case study. // Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) – 2012. – V. 861. – P. 283-297.
144. Kumar A., Grover S., Sharma J., Batish V. K. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions // Critical Reviews in Biotechnology. – 2010. – V. 30. – № 4. – P. 243-258.
145. Szecsi P. B. Chapter 5 – Chymosin. // Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition) – Academic Press, 2013. – P. 37-42.
146. Bodie E.A., Armstrong G.L., Dunn-Coleman N.S. Strain improvement of chymosin-producing strains of *Aspergillus niger* var. *awamori* using parasexual recombination. // Enzyme and Microbial Technology. – 1994. – V. 16. – № 5. – P. 376-382.
147. Ansari S.M., Coletta A., Kirkeby Skeby K., Sørensen J., Schiøtt B., Palmer D.S. Allosteric-Activation Mechanism of Bovine Chymosin Revealed by Bias-Exchange Metadynamics and Molecular Dynamics Simulations. // The Journal of Physical Chemistry. B. – 2016. – V. 120. – № 40. – P. 10453-10462.
148. Pedersen V.B., Christensen K.A., Foltmann B. Investigations on the Activation of Bovine Prochymosin. // European Journal of Biochemistry. – 1979. – V. 94. – № 2. – P. 573-580.
149. Suguna K., Padlan E.A., Smith C.W., Carlson W.D., Davies D.R. Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: implications for a mechanism of action. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1987. – V. 84. – № 20. – P. 7009-7013.
150. Coates L., Erskine P.T., Wood S.P., Myles D.A., Cooper J.B. A neutron Laue diffraction study of endothiapepsin: implications for the aspartic proteinase mechanism. // Biochemistry. – 2001. – V. 40. – № 44. – P. 13149-13157.
151. Langholm Jensen J., Mølgaard A., Navarro Poulsen J.C., Harboe M.K., Simonsen J.B., Lorentzen A.M., Hjernø K., van den Brink J.M., Qvist K.B., Larsen S. Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties. // Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography. – 2013. – V. 69. – № 5. – P. 901-913.
152. Бельнская С.В., Балабова Д.В., Белов А.Н., Коваль А.Д., Щербаков Д.Н., Ельчанинов В.В. Основные биохимические свойства рекомбинантных химозинов. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56. – № 4. – P. 315-326.
153. van den Berg J.A., van der Laken K.J., van Ooyen A.J., Renniers T.C., Rietveld K., Schaap A., Brake A.J., Bishop R.J., Schultz K., Moyer D. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. // BioTechnology (Nature Publishing Company). – 1990. – V. 8. – № 2. – P. 135-139.
154. Nosedá D.G., Recúpero M.N., Blasco M., Ortiz G.E., Galvagno M.A. Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris*

under AOX1 promoter // Protein Expression and Purification. – 2013. – V. 92. – № 2. – P. 235-244.

155. Nosedá D.G., Blasco M., Recúpero M., Galvagno M.Á. Bioprocess and downstream optimization of recombinant bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under methanol-inducible AOXI promoter. // Protein Expression and Purification. – 2014. – V. 104. – P. 85-91.

156. Nosedá D.G., Recúpero M., Blasco M., Bozzo J., Galvagno M.Á. Production in stirred-tank bioreactor of recombinant bovine chymosin B by a high-level expression transformant clone of *Pichia pastoris*. // Protein Expression and Purification. – 2016. – V. 123. – P. 112-121.

157. Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichia pastoris*. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2008. – V. 56. – № 22. – P. 10606-10610.

158. Филькин С. Ю., Чертова Н.В., Вавилова Е.А., Зацепин С.С., Эльдаров М.А., Липкин А.В., Федоров А.Н. Оптимизация метода получения рекомбинантного химозина в метилотрофных дрожжах *Komagataella phaffii*. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56. – № 6. – С. 571-576.

159. Wang N., Wang K.Y., Li G., Guo W., Liu D. Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris*. // Protein Expression and Purification. – 2015. – V. 111. – P. 75-81.

160. Belenkaya S.V., Rudometov A.P., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Kriger A.V., Belov A.N., Koval A.D., Elchaninov V.V. Biochemical Properties of Recombinant Chymosin in Alpaca (*Vicugna pacos* L.). // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2018. – V. 54. – № 6. – P. 569-576.

161. Беленькая С.В., Щербаков Д.Н., Балабова Д.В., Белов А.Н., Коваль А.Д., Ельчанинов В.В. Получение рекомбинантного химозина марала (*Cervus elaphus sibiricus severtzov*) в прокариотической системе экспрессии и изучение комплекса его биохимических свойств, важных для сыроделия. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56. – № 6. – С. 561-570.

162. Ersöz F., Inan M. Large-scale production of yak (*Bos grunniens*) chymosin A in *Pichia pastoris* // Protein Expression and Purification. – 2019. – V. 154 P. 126-133.

163. Kappeler S.R., van den Brink H.J.M., Rahbek-Nielsen H., Farah Z., Puhan Z., Hansen E.B., Johansen E. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2006. – V. 342. – № 2. – P. 647-654.

164. Jaeckel C., Lund M., Hansen E.F., Riisberg L., Jeppesen I., Van Den Brink J.M. Variants of chymosin with improved properties. 2016. RU2740317C2.

165. Пушкарев В.А., Мусина О.Н., Беленькая С.В., Щербаков Д.Н., Коваль А.Д., Белов А.Н., Ельчанинов В.В. Термостабильность и параметры кинетики Михаэлиса-Ментен инженерного варианта рекомбинантного химозина северного оленя (*Rangifer tarandus*). // Сыроделие и маслоделие. – 2023. – № 3. – С. 42-44.

166. Oftedal O.T. The evolution of milk secretion and its ancient origins. // Animal. – 2012. – V. 6. – № 3. – P. 355-368.

167. Manguy J., Shields D.C. Implications of kappa-casein evolutionary diversity for the self-assembly and aggregation of casein micelles. // Royal Society Open Science. – 2019. – V. 6. – № 10. – P. 190939.
168. Grant S.G., Jessee J., Bloom F.R., Hanahan D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1990. – V. 87. – № 12. – P. 4645-4649.
169. Invitrogen Corp. EasySelect *Pichia* Expression Kit. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ α in *Pichia pastoris*. – 2010.
170. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Third edition. – Cold Spring Harbor, N.Y. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
171. Higgins D.R. Cregg J. M. *Pichia* protocols. – Springer, 1998.
172. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // Nature. – 1970. – V. 227. – № 5259. – P. 680-685.
173. Radvanyi F., Jordan L., Russo-Marie F., Bon C. A sensitive and continuous fluorometric assay for phospholipase A2 using pyrene-labeled phospholipids in the presence of serum albumin. // Analytical Biochemistry. – 1989. – V. 177. – № 1. – P. 103-109.
174. Krupyanko V.I. Corrected equations for calculation of constants in enzyme inhibition and activation. // Biochemistry (Moscow). – 2007. – V. 72. – № 4. – P. 380-391.
175. Frahm S., Slimak M.A., Ferrarese L., Santos-Torres J., Antolin-Fontes B., Auer S., Filkin S., Pons S., Fontaine J.-F., Tsetlin V., Maskos U., Ibañez-Tallon I. Aversion to nicotine is regulated by the balanced activity of $\beta 4$ and $\alpha 5$ nicotinic receptor subunits in the medial habenula. // Neuron. – 2011. – V. 70. – № 3. – P. 522-535.
176. Vulfius C.A., Kasheverov I.E., Starkov V.G., Osipov A.V., Andreeva T.V., Filkin S.Y., Gorbacheva E.V., Astashev M.E., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. Inhibition of nicotinic acetylcholine receptors, a novel facet in the pleiotropic activities of snake venom phospholipases A2. // PloS One. – 2014. – V. 9. – № 12. – P. e115428.
177. Klavins K., Neubauer S., Al Chalabi A., Sonntag D., Haberhauer-Troyer C., Russmayer H., Sauer M., Mattanovich D., Hann S., Koellensperger G. Interlaboratory comparison for quantitative primary metabolite profiling in *Pichia pastoris*. // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2013. – V. 405. – № 15. – P. 5159-5169.
178. Díaz C., Lomonte B., Zamudio F., Gutiérrez J.M. Purification and characterization of myotoxin IV, a phospholipase A2 variant, from *Bothrops asper* snake venom. // Natural Toxins. – 1995. – V. 3. – № 1. – P. 26-31.
179. Soares, A.M., Giglio J.R. Chemical modifications of phospholipases A2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. // Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology. – 2003. – V. 42. – № 8. – P. 855-868.
180. Makarova Y.V., Osipov A.V., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. Influence of phospholipases A2 from snake venoms on survival and neurite outgrowth in pheochromocytoma cell line PC12. // Biochemistry (Moscow). – 2006. – V. 71. – № 6. – P. 678-684.

181. Masuda S., Murakami M., Takanezawa Y., Aoki J., Arai H., Ishikawa Y., Ishii T., Arioka M., Kudo I. Neuronal expression and neuritogenic action of group X secreted phospholipase A2. // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – V. 280. – № 24. – P. 23203-23214.
182. Huang M.Z., Gopalakrishnakone P., Kini R.M. Role of enzymatic activity in the antiplatelet effects of a phospholipase A2 from *Ophiophagus hannah* snake venom. // *Life Sciences*. – 1997. – V. 61. – № 22. – P. 2211-2217.
183. Zingali R.B., Jandrot-Perrus M., Guillin M.C., Bon C. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. // *Biochemistry*. – 1993. – V. 32. – № 40. – P. 10794-10802.
184. Kini R.M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. // *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*. – 2005. – V. 45. – № 8. – P. 1147-1161
185. Osipov A.V., Filkin S.Y., Makarova Y.V., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. A new type of thrombin inhibitor, noncytotoxic phospholipase A2, from the *Naja haje* cobra venom. // *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*. – 2010. – V. 55. – № 2-3. – P. 186-194.
186. Matsui T., Kamata S., Ishii K., Maruno T., Ghanem N., Uchiyama S., Kato K., Suzuki A., Oda-Ueda N., Ogawa T., Tanaka Y. SDS-induced oligomerization of Lys49-phospholipase A2 from snake venom. // *Scientific Reports*. – 2019. – V. 9. – № 1. – P. 2330.
187. Jungo C., Schenk J., Pasquier M., Marison I.W., von Stockar U. A quantitative analysis of the benefits of mixed feeds of sorbitol and methanol for the production of recombinant avidin with *Pichia pastoris*. // *Journal of Biotechnology*. – 2007. – V. 131. – № 1. – P. 57-66.

БЛАГОДАРНОСТИ

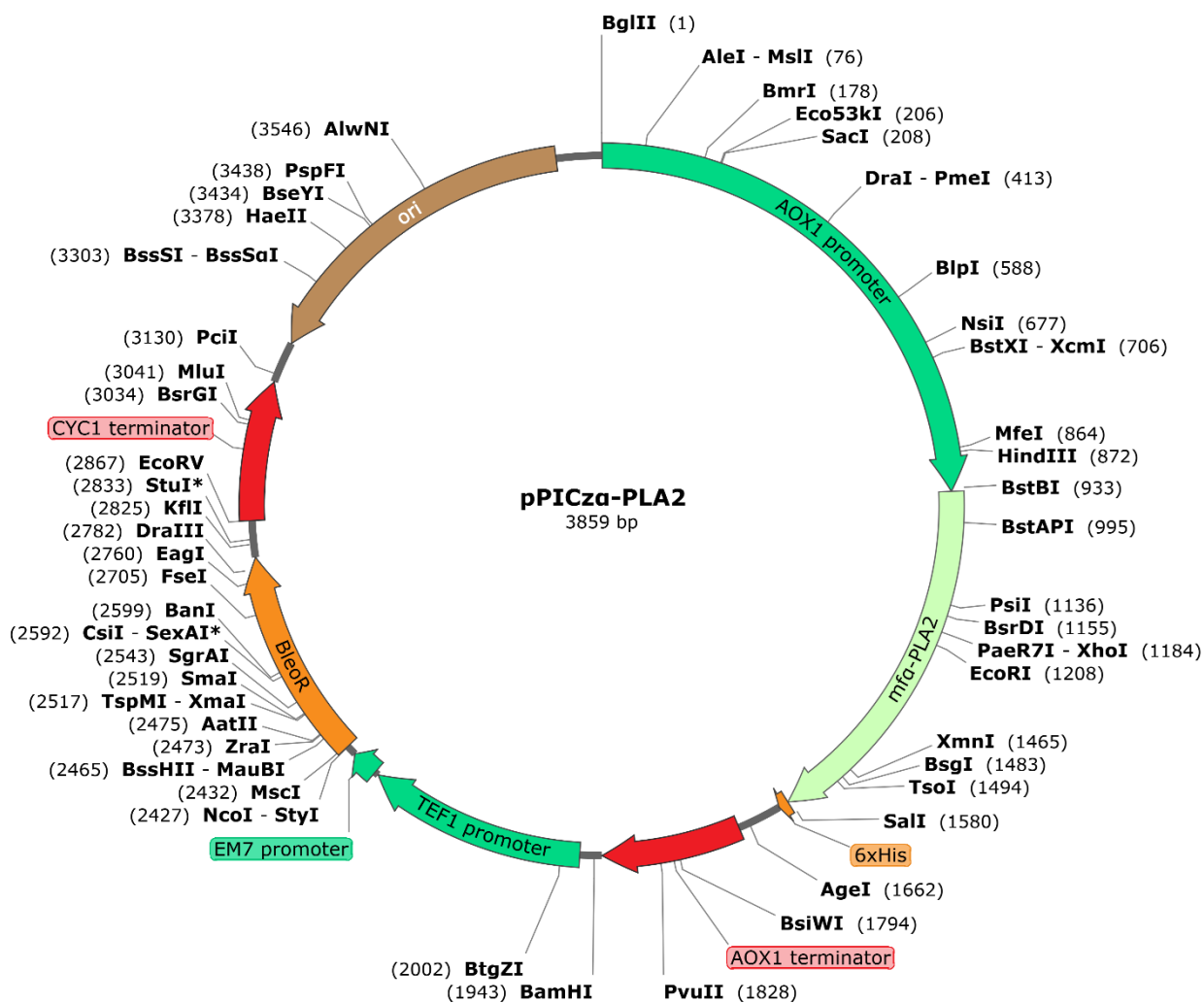
Данная работа не была бы выполнена без безмерной поддержки моих коллег и семьи. Огромная благодарность всем сотрудникам лаборатории молекулярной токсикологии ИБХ РАН, лаборатории молекулярной биотехнологии ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, всем сотрудникам Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии»

При проведении исследований использовали оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии Наук.

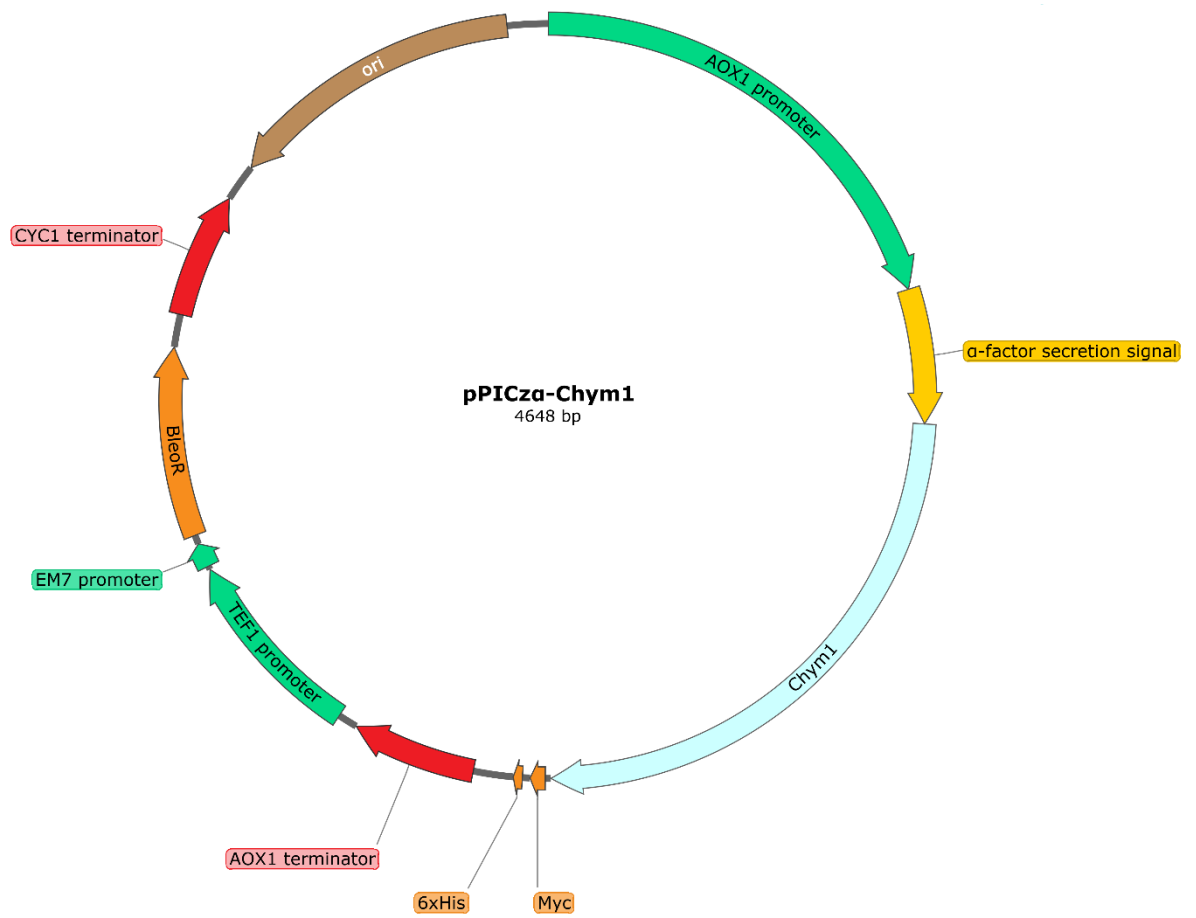
ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Карты генетических конструкций

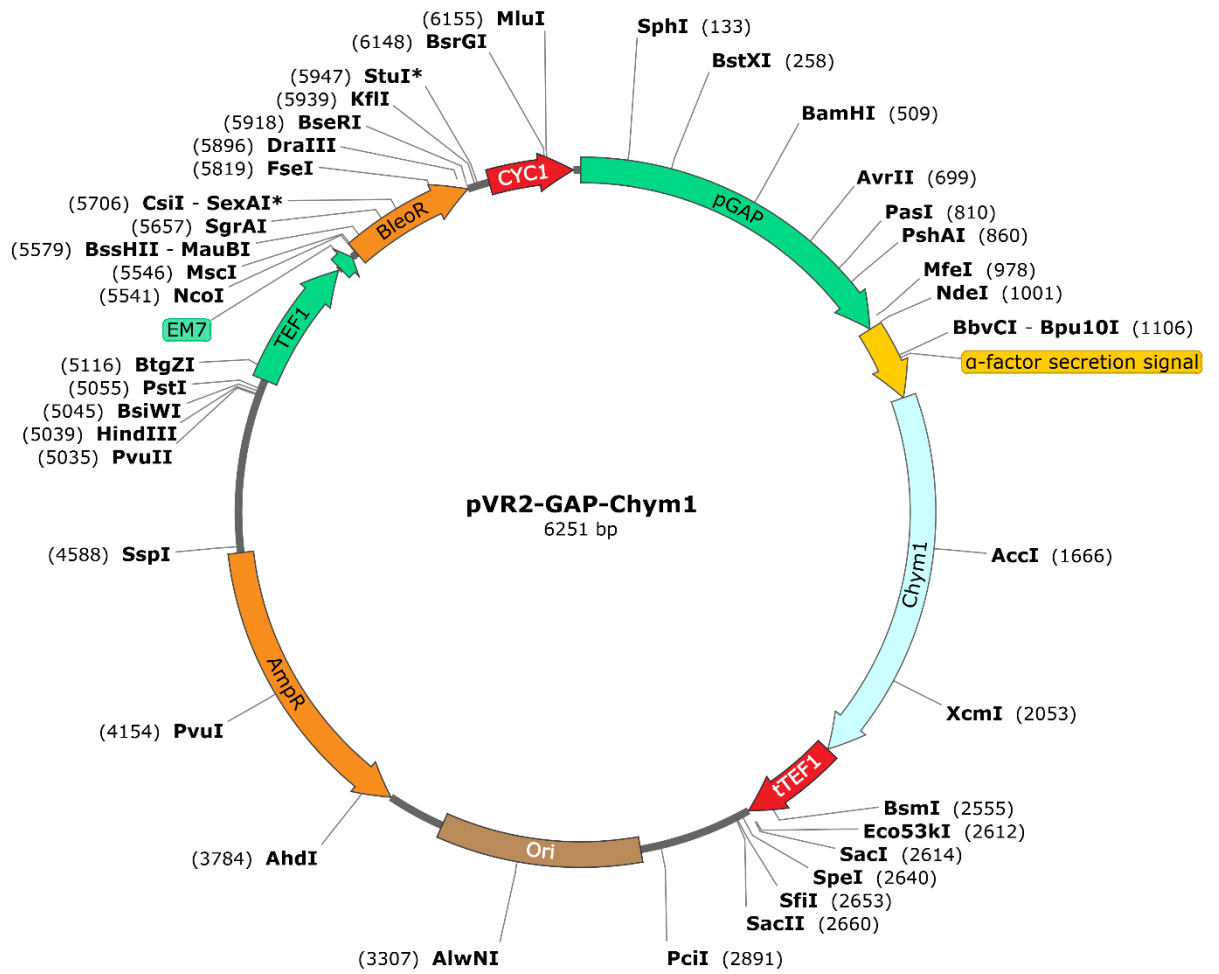
1) Карта вектора pPICza-ФЛА2 для экспрессии рекомбинантной фосфолипазы A2.



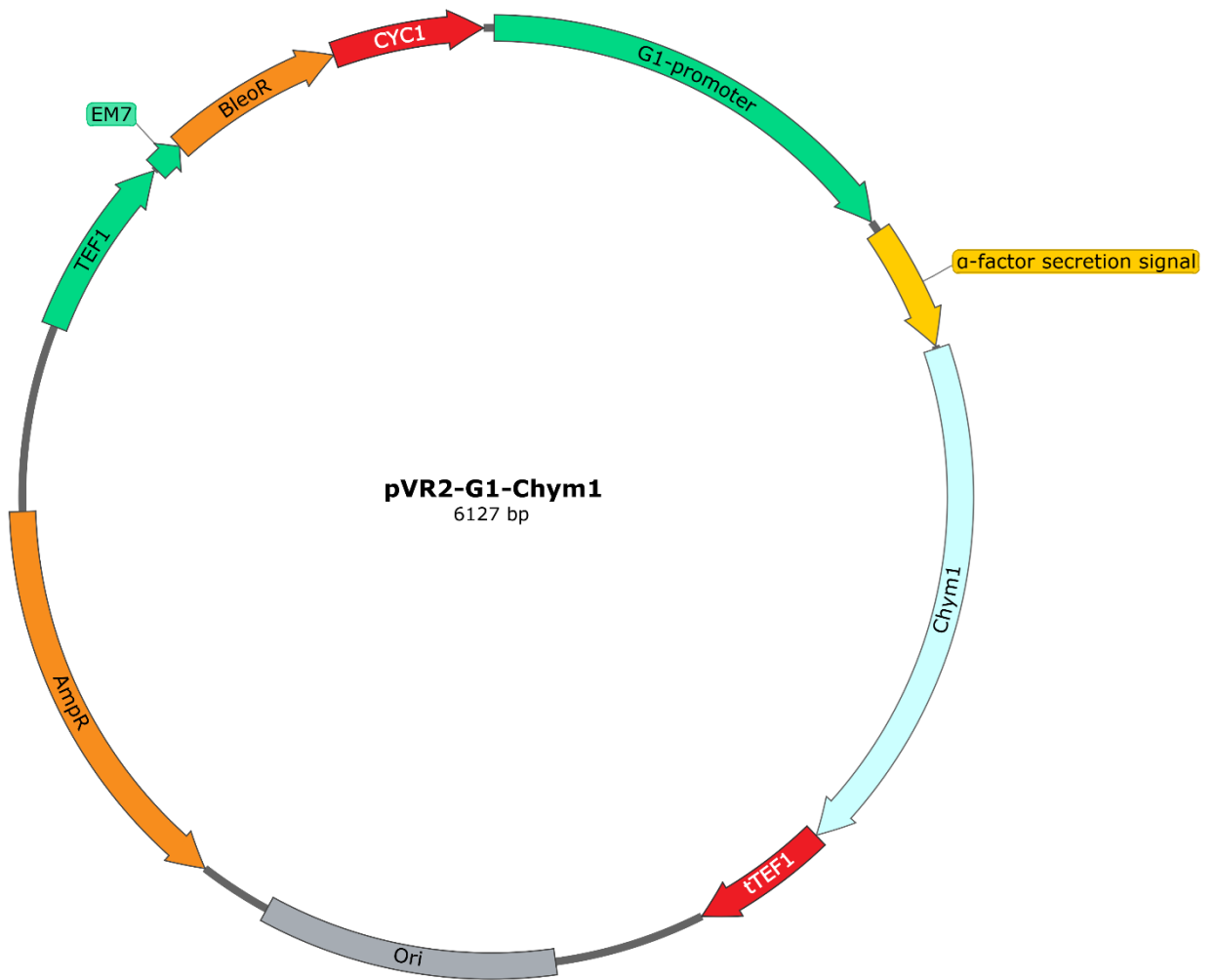
- 2) Карта вектора pPICZ α -Chym1 для экспрессии рекомбинантного химозина под P_{AOX1}-промотором.



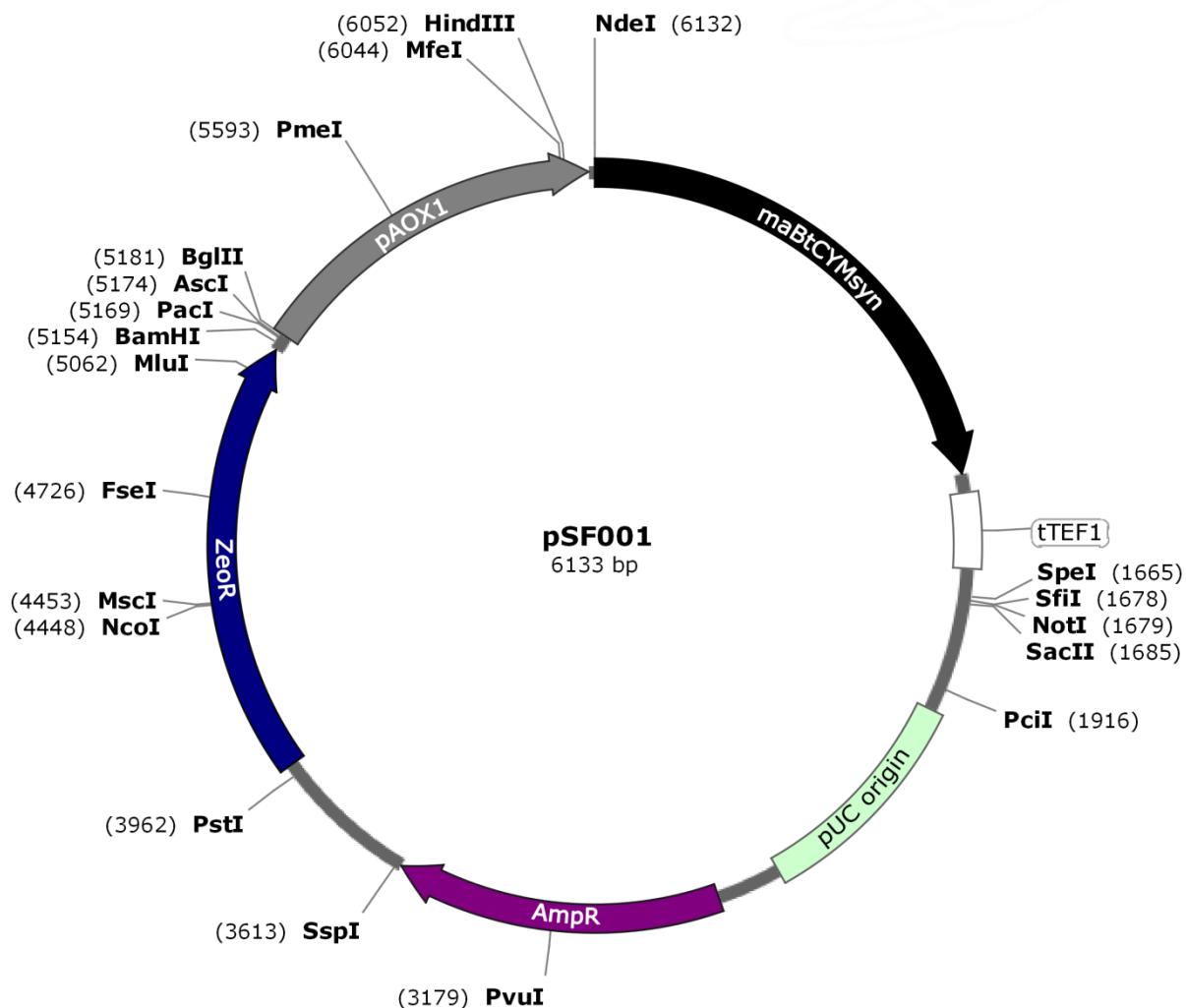
- 3) Карта вектора pVR2-GAP-Chym1 для экспрессии рекомбинантного химозина под P_{GAP} -промотором.



- 4) Карта вектора pVR2-pG1Chym1 для экспрессии рекомбинантного химозина под GTN1 промотором.

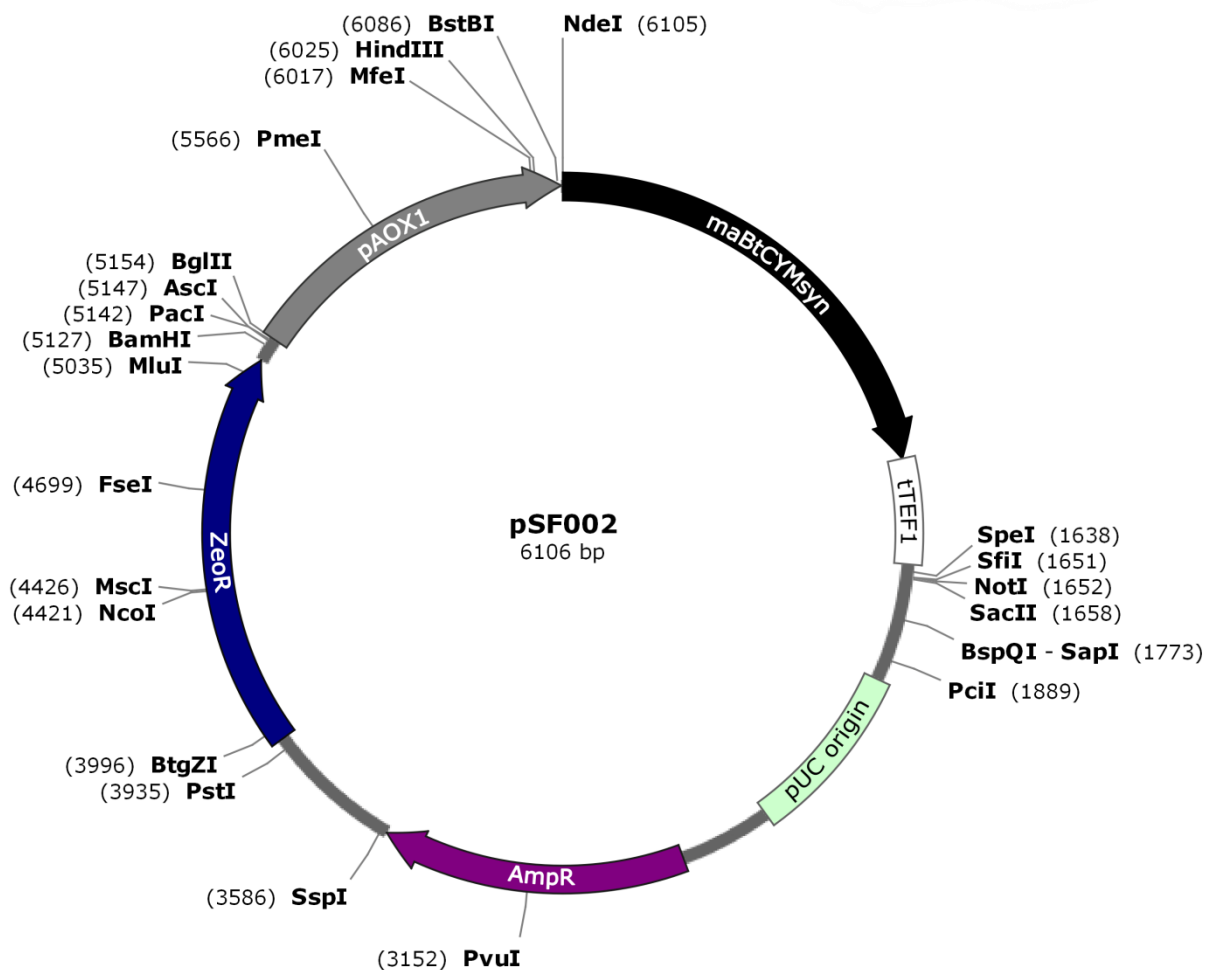


5) Карта вектора SF001.

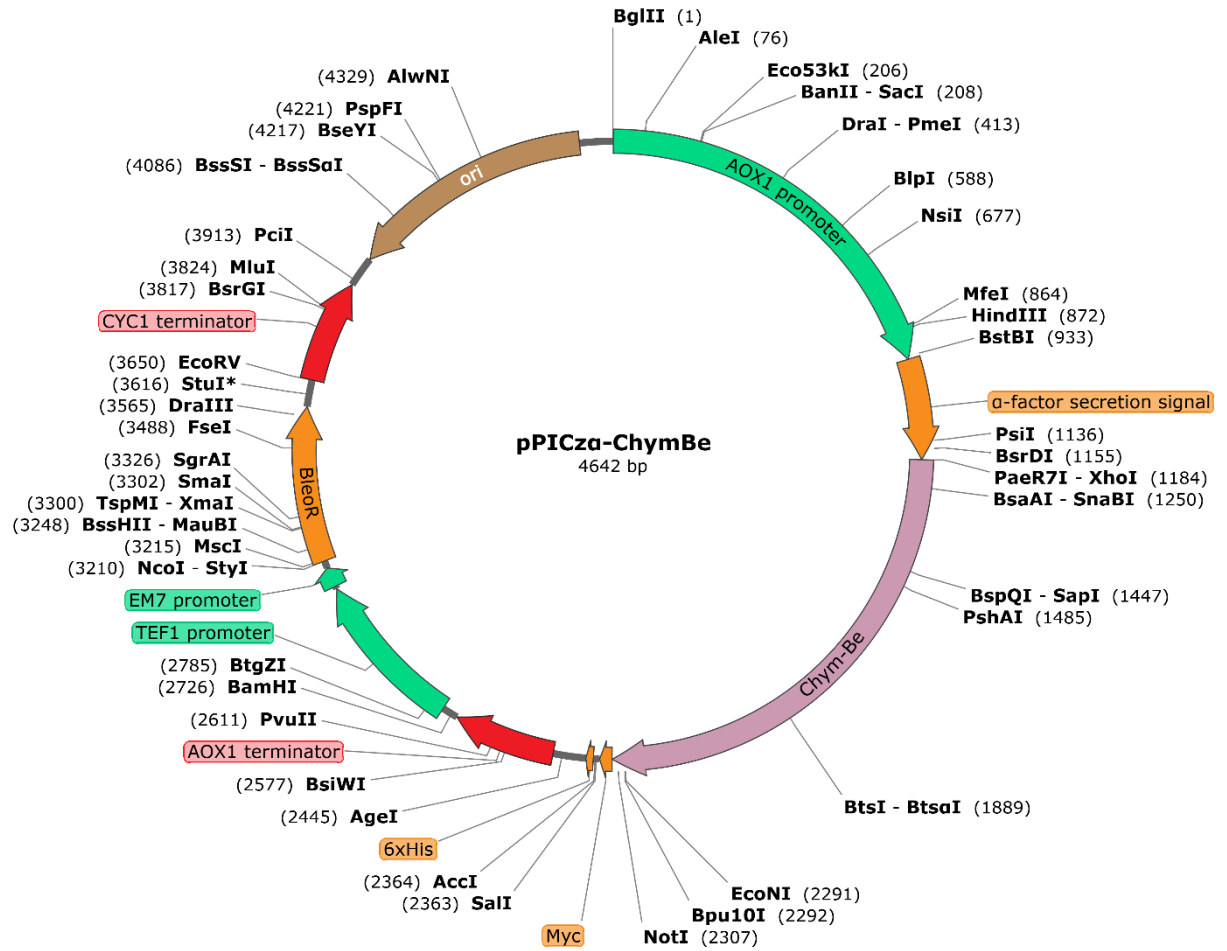


Вектор pSF001 размером 6251 пар оснований использовали для экспрессии рекомбинантного химозина (Пример 3). Он состоит из элементов вектора pVR2 (промотора гена AOX1, терминатора гена tTEF1, участка начала плазмидной репликации, маркерных генов устойчивости к Ампициллину (AmpR), зеоцину (ZeoR)) и кодирующей области, состоящей из слитых участков нативного сигнального пептида mfa1 и варианта гена Chym1.

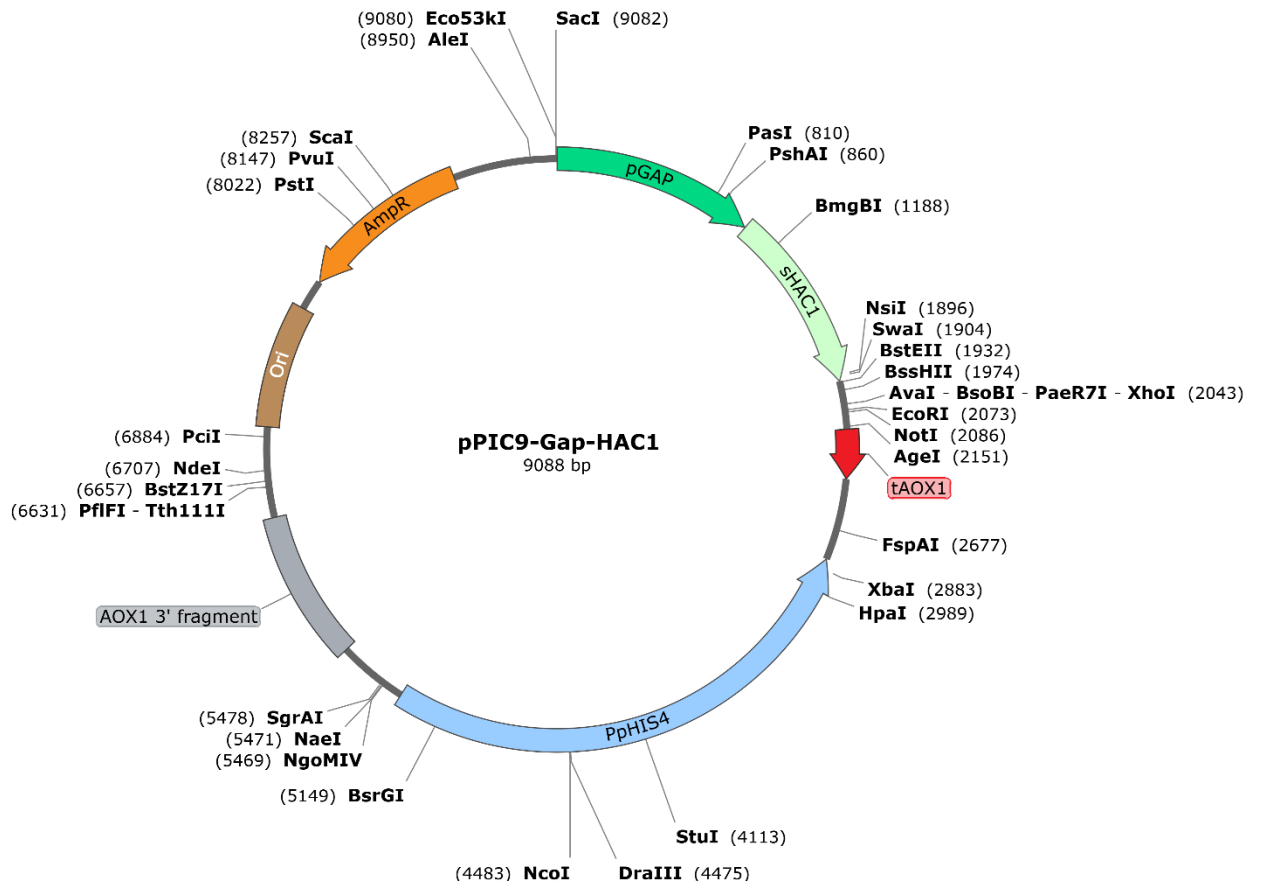
6) Карта вектора SF002.



Вектор pSF002 размером 6106 пар оснований использовали для экспрессии рекомбинантного химозина (Пример 4). Он состоит из элементов вектора pVR2 (промотора гена AOX1, терминатора гена tTEF1, участка начала плазмидной репликации, маркерных генов устойчивости к Ампициллину (AmpR), зеоцину (ZeoR)) и кодирующей области, состоящей из слитых участков модифицированного сигнального пептида mfa1D и варианта гена Chym-1.

7) Карта вектора pPICZ α -ChymBe.

8) Карта вектора pPic9K-GAP-HAC1 для экспрессии сплайсированного варианта транскрипционного фактора HAC1



Приложение 2. Дополнительные данные метаболомных экспериментов

Табл. 12. Относительное изменение внутриклеточных концентраций аминокислот при культивировании штамм-продуцента GS115/pPIC α -Chym1.

Трехбуквенный код аминокислоты	Индекс	Время удержания, мин	m/z	Формула	0 ч	24 ч	48 ч	72 ч	Относительная внутриклеточная концентрация, мкмоль/ГСВ [77]
Ala	-	-	-	-	-	-	-	-	23,5
Val	117,07907 Da 76,40 s	1,27	118,0 8634	C ₅ H ₁₁ NO ₂	119 476	278 095	169 079	336 761	1,97
Leu/Ile	131,09492 Da 208,71 s	3,48	132,1 0220	C ₆ H ₁₃ NO ₂	146 8	346 4	388 3	640 8	1,48
Arg	174,11169 Da 63,73 s	1,06	175,1 1896	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	325 272	145 836	238 226	275 580	
Thr	119,05386 Da 66,39 s	1,11	118,0 4658	C ₄ H ₉ N O ₃	550	112 7	136 8	321 7	3,94
Pro	115,06349 Da 71,29 s	1,19	116,0 7077	C ₅ H ₉ N O ₂	141 187	147 913	182 097	256 007	10,8
Asn	132,05357 Da 65,05 s	1,08	133,0 6085	C ₄ H ₈ N 2O ₃	344 4	514 8	638 2	802 6	7,1
Asp	133,03652 Da 63,13 s	1,05	132,0 2924	C ₄ H ₇ N O ₄	624 31	891 62	950 22	146 389	26,4
Met*	165,04632 Da 72,00 s	1,20	166,0 5359	C ₅ H ₁₁ NO ₃ S	572 9	107 54	150 65	211 67	0,97
Glu	147,05321 Da 72,35 s	1,21	148,0 6048	C ₅ H ₉ N O ₄	429 83	812 88	621 36	162 87	200
Phe	165,07902 Da 84,56 s	1,41	166,0 8630	C ₉ H ₁₁ NO ₂	205 724	409 910	406 844	676 453	0,51
Gln	146,06914 Da 67,45 s	1,12	147,0 7641	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	455 81	101 233	846 10	679 61	177
Lys	146,10559 Da 54,92 s	0,92	147,1 1286	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	114 698	526 55	103 062	119 087	12,8
His	155,06950 Da 57,54 s	0,96	156,0 7678	C ₆ H ₉ N 3O ₂	285 282	126 156	181 19	176 50	7,4
Гистидинол	141,09050 Da 53,84 s	0,90	142,0 9753	C ₆ H ₁₁ N ₃ O	578 68	172 847	604 523	880 654	

Трехбуквенный код аминокислоты	Индекс	Время удержания, мин	m/z	Формула	0 ч	24 ч	48 ч	72 ч	Относительная внутриклеточная концентрация, мкмоль/ГСВ [77]
Tyr	181,07396 Da 78,68 s	1,31	182,0 8124	C ₉ H ₁₁ NO ₃	639 78	517 08	135 710	213 437	0,8
Trp	204,09016 Da 360,19 s	6,00	205,0 9743	C ₁₁ H ₁₁ 2N ₂ O ₂	341 8	146 06	214 50	555 71	0,24
Ser	105,04125 Da 65,57 s	1,09	104,0 3397	C ₃ H ₇ N O ₃	317	152 6	169 6	505 3	

Табл. 13. Относительное изменение концентраций отдельных метаболитов при коэкспрессии sHAC1 между штаммами GS115/pPICza-Chym1, GS115/pPICza-Chym1-HAC1 (экспрессия рекомбинантного белка под контролем промотора AOX1) при культивации на минеральной среде с 1% метанолом.

Название метаболита	Относительное изменение концентраций отдельных метаболитов
L-гистидиномол	-62688,00
Гипоксантин	-16869,33
5-деокси-5-метилтиоаденозин	-14860,67
2-деокси-D-рибоза	-13058,67
1-MLCL	-8414,67
L-аспартил-4-семиальдегид	-5726,67
N(прос)-метил -L-гистидин	-5325,33
Инозин	-3818,67
L-фенилаланин	-3611,33
Пропионовая кислота	-3355,33
Глицерин	-2660,67
α -кетоиовалерьяновая кислота	-2488,67
Аденозин	-2294,67
α -Аминомасляная кислота	-2192,00
Триэтиленгликоль	-2190,00
Гуанозин	-1988,67
LPA (16:0/0:0)	-1950,67
Гуанин	-1669,33

Название метаболита	Относительное изменение концентраций отдельных метаболитов
Урацил	-747,33
2-деокси-D-рибоза	-734,67
N-ацетил-L-аланин	-620,67
α -кетокaproновая кислота	-502,67
Цитронеллил ацетат	-478,00
Триэтиленгликоль	-463,33
Тетраэтиленгликоль	-425,33
2-ацетолактат	-269,33
Молочная кислота	-139,33
Бис-2-диметиламиноэтилэфир	-50,67
3-гидрокси лауриновая кислота	64,00
Нонановая кислота	72,67
L-аргинин	140,67
N-ацетил-L-аланин	161,33
Нонановая кислота	199,33
MG (24:1(15Z)/0:0/0:0)	215,33
N-ацетил-L-аланин	263,33
L-аланин	492,67
2-O-метиладенозин	824,00
PS (14:0/15:0)	959,33
PS (10:0/25:1(11Z))	1094,00
D-пипеколиновая кислота	1212,67
L-треонин	1458,00
Ниацинамид	1682,00
PC (18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/P-16:0)	1823,33
Аденин	1998,00
аллизин	2031,33
4-Guanidinobutanoic acid	2039,33
Таурин	2045,33
L-карнитин	2066,00
L-серин	2138,67
PA(18:0/18:1(9Z))	2157,33
Азепан	2193,33
PC (14:0/20:3(8Z,11Z,14Z))	2245,33
4-Аминобензойная кислота	2391,33
L-Лейцин	2438,67
PC (18:3(6Z,9Z,12Z)/P-16:0)	2577,33
Кинуреновая кислота	2873,33
L-глутамат	2969,33
Аллизин	3326,00

Название метаболита	Относительное изменение концентраций отдельных метаболитов
Глюкозан	3328,00
Сукциниловый полуальдегид	3394,67
L-метионин	3443,33
Пироглутаминовая кислота	3654,67
2-пирролидон	4066,67
2-амино-4-циано-бутановая кислота	4536,00
РС (18:2(9Z,11Z)/18:2(9Z,11Z))	4558,67
4-деоксипередоксин	5257,33
Метилсукцинат	5418,00
Ацетилкарнитин	5665,33
L-глутамин	5694,00
Холин	5752,00
L-треонин	6769,33
Аллантоин	7435,33
РЕ-NMe (14:1(9Z)/22:1(9Z))	7947,33
2-деокси-D-рибоза	9842,67
Ацетилгомосерин	12084,00
Сахароза	12226,00
L-Пролин	20889,33
РС (14:1(9Z)/22:2(13Z,16Z))	21548,67
Глицерофосфохолин	28202,00
L-Арабиноза	30458,00
2,3-дигидроксиизовалерьяновая кислота	30548,67
L-Валин	34384,67
РС (14:0/22:2(13Z,16Z))	37463,33
Лактальдегид	254686,67