

Филькин Сергей Юрьевич

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

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2025 г.

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биотехнологии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научный руководитель:

старший научный сотрудник
лаборатории молекулярной биотехнологии ФИЦ Биотехнологии» РАН
кандидат химических наук
Липкин Алексей Валерьевич

Официальные оппоненты:

Яненко Александр Степанович, доктор биологических наук, профессор, заместитель руководителя Комплекса по научной работе (Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий) Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Солонин Александр Сергеевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной микробиологии Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований» Российской академии наук».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Защита состоится « » ____ 2025 года в ____ на заседании Диссертационного совета 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2025 года.

Учёный секретарь диссертационного совета 24.1.233.01,
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 библиотекой 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.

Список сокращений

ФЛА2 – фосфолипаза A2,

ТВ – тромбиновое время свертывания крови

ПТВ – протромбиновое время свертывания крови,

АЧТВ – активированное частичное тромбиновое время свертывания крови,

SDS – додецилсульфат натрия,

сФЛА2 – секреторная фосфолипаза A2 *Streptomyces violaceoruber*,

sNAC1 – сплайсированный вариант транскрипционного фактора NAC1,

AOX1 – алкогольоксидаза 1,

GAP – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа,

ОП₆₀₀ – оптическая плотность культуры при длине волны 600 нм,

IMCU – international milk clotting units, единица молокосвертывающей активности химозина

MCA/PA – соотношение специфической молоко-свертывающей активности к неспецифической протеолитической активности, оценка специфичности молоко-свертывающих ферментов,

UPR – unfolded protein response, ответ клетки на накопление несвернутых белков,

НАДН – Никотинамидадениндинуклеотид, восстановленный,

НАД⁺ – Никотинамидадениндинуклеотид, окисленный.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Антикоагулянтная фосфолипаза A2 TI-Nh, ее функциональная характеристика

В диссертации помимо исследования экспрессии рекомбинантной секреторной ФЛА2 и анализа ее биохимических свойств, производился биохимический скрининг и исследование природных ФЛА2 из различных источников.

Скрининг сырых ядов кобр показал, что только яд *Naja haje* обладал способностью увеличивать тромбиновое время в стандартном коагулометрическом тесте, не изменяя при этом протромбиновое время (ПТВ) и активированное частично тромбиновое время (АЧТВ). С целью поиска токсинов, обладающих антикоагулянтной активностью, было проведено фракционирование яда кобры *N. haje*. Для выделения индивидуального соединения, обладающего антитромбиновой активностью, провели фракционирование яда с использованием трех стадий жидкостной хроматографии, включавших гель-фильтрацию, ионообменную и обращено-фазную хроматографию. В результате из яда был выделен белок TI-Nh с молекулярной массой 14,5 кДа, обладающий способностью ингибировать тромбин. Исследование выделенного белка методами белковой химии и масс-спектрометрии показало, что он представляет собой ФЛА2. Следует отметить, что фосфолипазная активность TI-Nh на несколько порядков ниже классических ФЛА2 яда змей. Детальное исследование антикоагулянтных свойств TI-Nh показало, что белок специфически ингибирует формирование кровяного сгустка, при этом существенно увеличивается тромбиновое время, а ПТВ и АЧТВ остаются неизменными (Рис. 1). 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-нитроанилидного субстрата 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. Кинетические исследования TI-Nh показали, что этот белок является тромбиновым ингибитором смешанного типа.

Проверка цитотоксической активности показала, что в отличие от большинства ФЛА2 ядов змей, TI-Nh не обладает цитолитической активностью.

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 секретрируемых ФЛА2. Таким образом, тромбин-ингибирующие свойства TI-Nh не зависят от фосфолипазной активности. Это в свою очередь не противоречит предположению о существовании неферментативных антикоагулянтных фосфолипаз, тогда как для проявления антикоагулянтных свойств большинству ФЛА2 требуется наличие ферментативной активности.

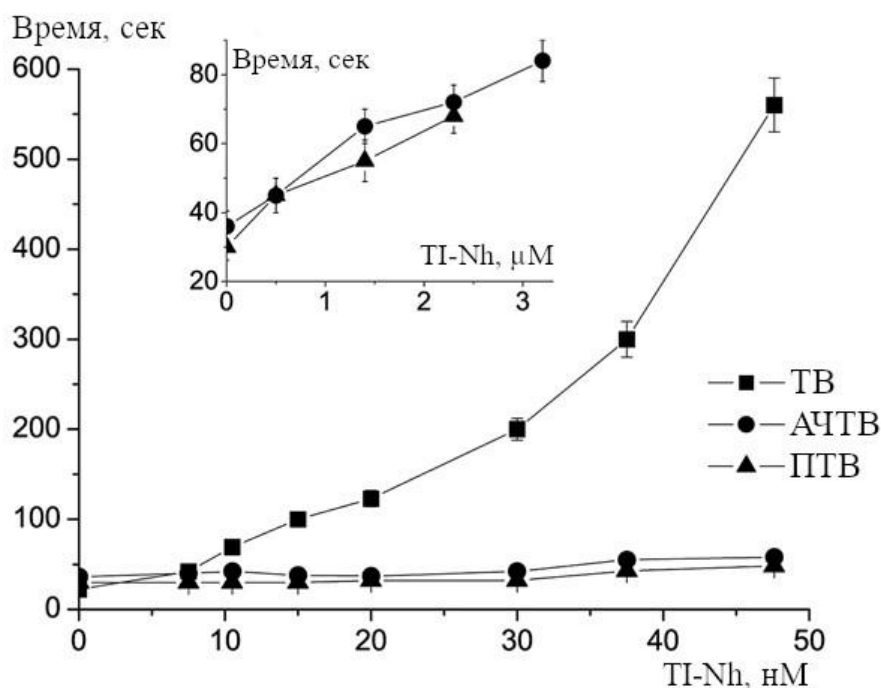


Рис. 1. Зависимость протромбинового (ПТВ), АЧТВ, тромбинового (ТВ) времени образования сгустка от концентрации ингибитора TI-Nh. При измерении тромбинового времени концентрация тромбина - 1 U/мл, концентрация фибриногена - 3 мг/мл. При измерении АЧТВ и протромбинового времени используется цельная плазма.

Таким образом, новый белок, выделенный из яда египетской кобры *N. haje*, может ингибировать фибриногенолитическую и амидолитическую активности тромбина, а также его способность вызывать агрегацию тромбоцитов. Это – первый ингибитор тромбина, выделенный из яда змей семейства *Elapidae*. Выделенный белок является селективным ингибитором смешанного типа. Новый белок принадлежит к группе фосфолипаз IV. Впервые показано, что ФЛА2 способна ингибировать тромбин.

Разработка масштабируемого метода очистки рекомбинантной секреторной ФЛА2, продуцируемой метилотрофными дрожжами *P. pastoris*. Исследование влияния двухвалентных катионов на термостабильность рекомбинантной ФЛА2

Для создания штамма-продуцента ФЛА2 из *Streptomyces violaceoruber*, применяемой для промышленной ферментативной дегумации растительного масла, использовали экспрессионную систему *Pichia pastoris*.

Вектор pPICZα-ФЛА2, несущий кодон-оптимизированный ген сФЛА2, линейаризовали по сайту *Bst*XI и проводили трансформацию компетентных клеток *P. pastoris*. Было получено более 30 клонов с интегрированным вектором pPICZα-ФЛА2. Эти клоны перенесли на чашки YPDS с зеоцином (200 мкг/мл) и проверяли на наличие вставки методом ПЦР.

Были подобраны оптимальные условия культивирования рекомбинантного штамма X-33 pPICZα-ФЛА2. Уровень активности рекомбинантной сФЛА2 в культуральной жидкости составил 2,2 ед/мл.

В результате подобранных условий культивирования штамма-продуцента были получены высокие выходы (20% по суммарному клеточному белку) целевого продукта. Максимальные потери целевого белкового продукта наблюдались при концентрировании на мембранных фильтрах. В процессе проведения двух стадий хроматографии удалось добиться значительной

степени очистки сФЛА2 (90%). Методы анионообменной хроматографии проявили себя значительно лучше по сравнению с методами катионообменной хроматографии.

После концентрирования при помощи тангенциальной фильтрации, был получен препарат, содержащий большое количество примесей (~40-50% по денситометрическому анализу). Для очистки целевого продукта предполагалось использовать катионообменную хроматографию. Для этого был проведен поиск оптимальных условий хроматографического разделения на катионном сорбенте Sepharose SP Fast Flow.

В рамках поиска оптимального разделения рассматривались буферы для элюции 0,01 М цитрата натрия с рН в диапазоне от 4 до 5,2. К фильтрату добавляли 50 эквивалентных объемов 0,1 М раствора цитрата натрия рН 5,2. Колонку уравнивали 0,01 М цитратом натрия рН 5,2. Элюцию проводили раствором 0,01 М цитрата натрия рН 5,2 в градиенте от 0 до 1 М NaCl. Наилучшие результаты по выходу целевого продукта показал буфер 0,01 М цитрата натрия с рН 5,2. Часть белка не адсорбировалась на колонке, что приводило к потере целевого продукта.

В литературе описано использование анионообменной хроматографии для разделения и очистки гомологичных ФЛА2. В случае сФЛА2 из *Streptomyces violaceoruber*, использование анионообменной хроматографии так же оказалось эффективным. Полученный после тангенциальной фильтрации раствор ФЛА2 разбавляли 30 кратным объемом буфера 20 mM Tris-HCl рН 8,0 и наносили на хроматографическую колонку с сорбентом Sepharose Q Fast Flow. Элюцию проводили 20 mM Tris-HCl рН 8,0 в градиенте 0-1 М NaCl. Эффективность разделения была значительно лучше, чем при хроматографическом разделении на катионообменной смоле, чистота препарата составила 70-75%.

При 10-кратном разбавлении раствора сФЛА2 после тангенциальной фильтрации целевой продукт выходил в не адсорбировавшихся фракциях. Для увеличения выхода сФЛА2 в не адсорбировавшихся фракциях в качестве буфера нанесения использовали буфер 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, рН 8,0. При этом примеси адсорбировались на хроматографическую колонку. Чистота фракций, содержащий целевой продукт была ~80% по тотальному содержанию белка. сФЛА2 не связывалась с колонкой, при этом примеси адсорбировались на хроматографической колонке.

С помощью анионообменной хроматографии препарат сФЛА2 удалось избавить от более крупных белковых примесей. Однако, осталась белковая примесь с молекулярной массой 27 кДа. Присутствующая примесь, соответствующая белку в области 27 кДа может являться SDS-зависимым димером сФЛА2. После анионообменной хроматографии проводили хроматографию гидрофобных взаимодействий. Для это был использован сорбент Butyl-Sepharose Fast Flow. Не адсорбировавшиеся фракции после анионообменной хроматографии объединяли, добавляли 8,7 г NaCl на 50 мл фракций (до 3 М NaCl) и наносили при скорости потока 1 мл/мин на хроматографическую колонку. Элюцию проводили 20 mM Tris-HCl рН 8,0, понижая содержание хлорида натрия. Фракции собирали в диапазоне 65-100% раствора Б. Данные фракции содержали высокоочищенный препарат сФЛА2.

Гидрофобная хроматография позволила избавиться от подавляющего большинства примесных продуктов, добиться высокой (~90% по данным денситометрического анализа) степени очистки, а также сконцентрировать образец. После очистки активность полученной сФЛА2 соответствовала ферментативной активности в 210 ед./мл.

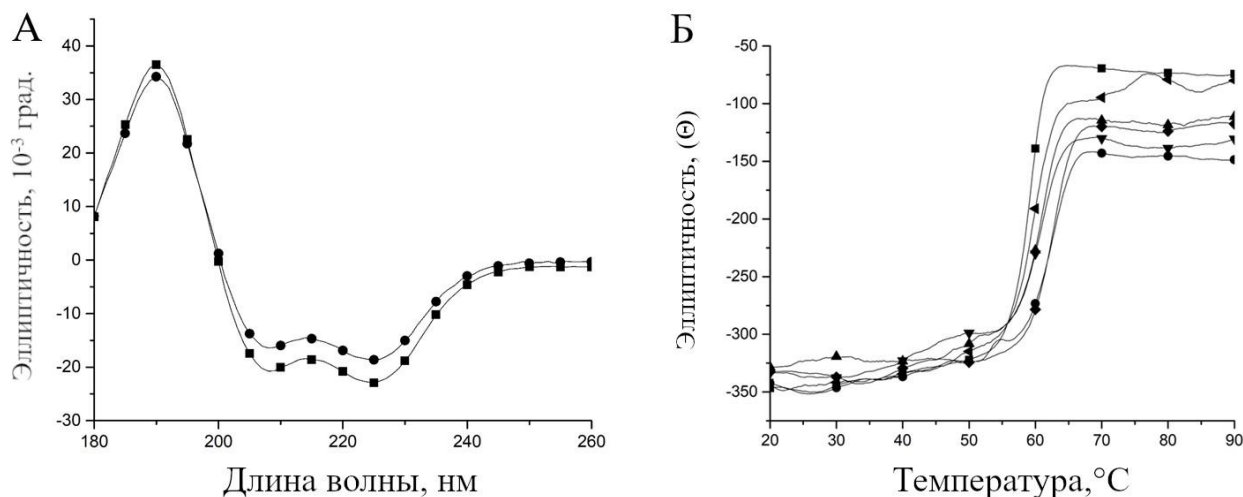


Рис. 2. (А) Спектрограмма кругового дихроизма рекомбинантной сФЛА2 в различных буферных системах. ● – 5 мМ KVO_3 , pH=8,0 ■ – 5 мМ KVO_3 , pH=8,0, 1 мМ CaCl_2 . (Б) Термостабильность рекомбинантной ФЛА2 в присутствии различных двухвалентных катионов. ■ – без добавления двухвалентных катионов, ● – 5мМ BaCl_2 , ▲ – 5мМ MnCl_2 , ▼ – 5мМ MgCl_2 , ◆ – 5мМ CaCl_2 , ◄ – 5мМ EGTA.

Для подтверждения сохранения вторичной структуры рекомбинантной сФЛА2 были произведены измерения спектра кругового дихроизма в диапазоне длин волн от 180 до 260 нм (**Рис. 2А**). Данный спектр соответствует соотношению элементов вторичной структуры как 75% α -спираль, 5% β -изгиб и 20 % относиться 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% относиться к нерегулярной структуре (расчёт был проведен при помощи программы PROCHECK).

Для более детального понимания, насколько полученный белок является термостабильным, был проанализирован спектр кругового дихроизма в диапазоне температур от 20°C до 90°C при фиксированном значении pH 8,0 при добавлении различных двухвалентных катионов. Удалось подтвердить термостабильность рекомбинантной сФЛА2 вплоть до значений в 55°C, независимо от присутствия или отсутствия различных двухвалентных катионов (**Рис. 2Б**).

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. При температуре 60°C α -спиральные структуры составляют лишь 4,7% всей вторичной структуры, при 70°C – 4,8%. Также заметна стабилизация вторичной структуры в присутствии двухвалентных катионов, прежде всего Ca^{2+} , который играет важную роль в катализе. При сравнении влияния радиуса гидратации двухвалентного катиона на термостабильность рекомбинантной сФЛА2, заметно, 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. 2Б**).

Создание и оптимизация штамма-продуцента рекомбинантного химозина быка в метилотрофных дрожжах *P. pastoris*, Разработка масштабируемого метода очистки химозина

В процессе создания штамма-продуцента рекомбинантного химозина производилась оптимизация продукции рекомбинантного белка. Работа проводилась в несколько этапов: осуществлялся поиск наиболее эффективного промотора, осуществлялся поиск оптимальной препролидерной последовательности для улучшения секреции, производились исследования по улучшению системы сворачивания и секреции белков за счет коэкспрессии транскрипционного фактора sHAC1, осуществлялась оптимизация состава культуральной жидкости и процесса ферментации. После этого оптимизировался процесс активации зимогена, выделения и очистки рекомбинантного химозина для того, чтобы сделать возможным масштабирование.

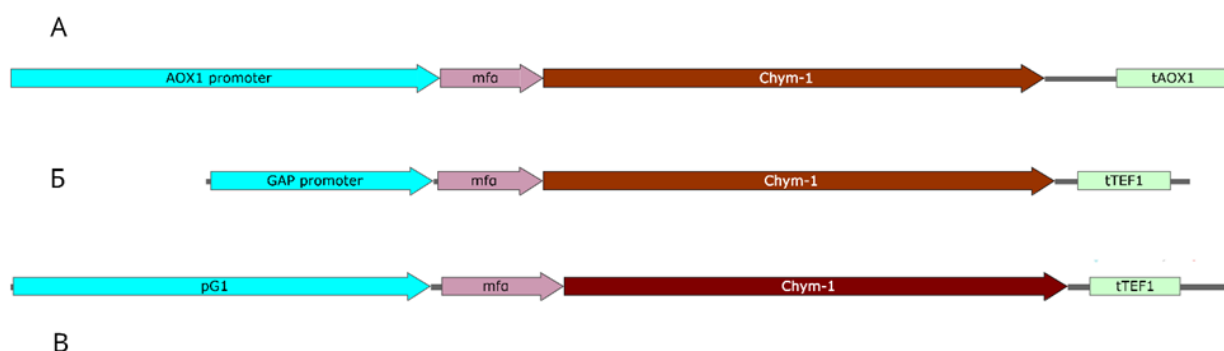


Рис. 3. Основные варианты кодирующих частей интегративных векторов, использованных для тестирования эффективности работы промоторов при экспрессии рекомбинантного химозина *Bos taurus*: (А) – pPICzα-Chym1 для проверки P_{AOX1} , (Б) – pVR2-GAP-Chym1 – P_{GAP} , (В) – pVR2-G1-Chym1 – P_{G1} .

Были созданы три варианта интегративных векторов (**Рис. 3**), предназначенных для экспрессии кодон-оптимизированного гена прохимозина 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_{G1} (индукция происходит при понижении концентрации глюкозы).

Полученными векторами трансформировали по отдельности в штамм *P.pastoris* GS115. Отобранные после трансформации клоны, несущие ген прохимозина, названные соответственно GS115/pPICzα-Chym1, GS115/pVR2-GAP-Chym1, GS115/pVR2-G1-Chym1 проанализировали ПЦР-скринингом на наличие вставки. Более 75% клонов с интегрированными генетическими конструкциями проявляли ферментативную активность в диапазоне 0,1-5 IMCU/мл. Клоны с наибольшей активностью химозина были получены при концентрации зеоцина 750 мкг/мл.

Проверка продуктивности отдельных клонов осуществлялась в 15 мл пробирках. Для подбора оптимальных условий культивирования в колбах Эрленмейера были отобраны 6 клонов с максимальной активностью химозина для каждого из вариантов. Культивирование проводили в 250 мл колбах Эрленмейера (250 об/мин, 30°C) в течение 72 часов в 50 мл в среде YPD. Штаммы GS115/pPICzα-Chym1 индуцировали добавлением 50%-ого раствора метанола до конечной концентрации метанола в культуральной среде 1%. Штаммы GS115/pVR2-GAP-Chym1 продуцировали прохимозин 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 4**. Максимальной продуктивности прохимозина в 80 мкг/мл и 100 мкг/мл удалось добиться при использовании промоторов P_{GAP} и P_{AOX1} соответственно. Промотор P_{GI} проявил себя значительно хуже и далее работы с ним не производились. В качестве основного рабочего промотора использовался P_{AOX1} . В дальнейшем оптимизация условий проводилась для него.

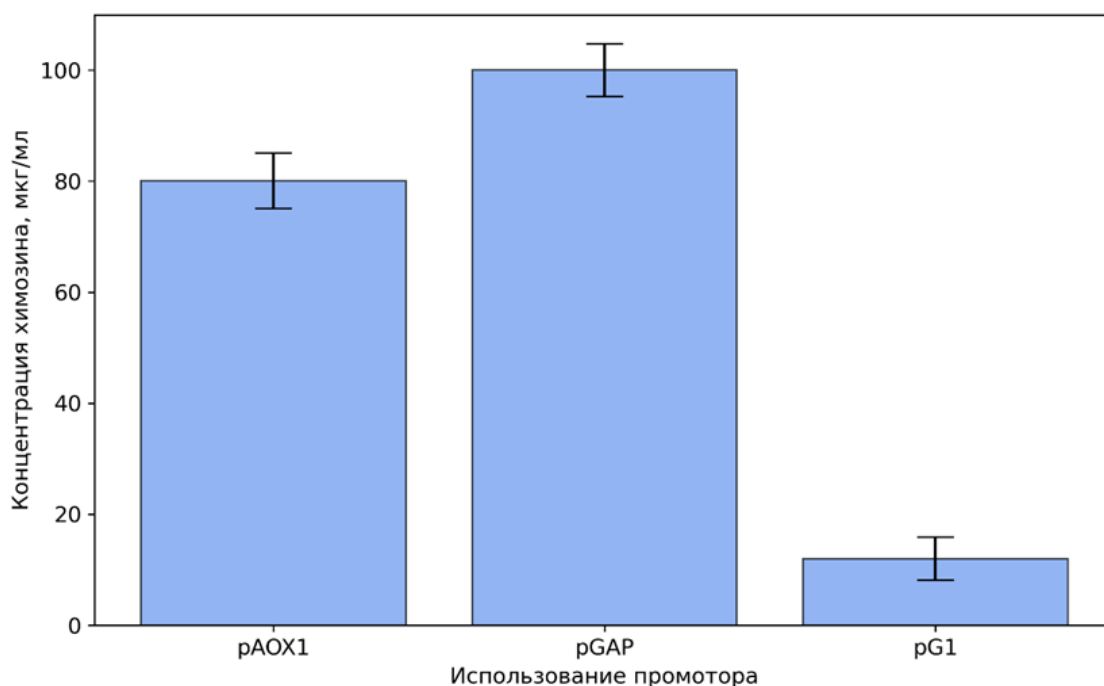


Рис. 4. Сравнение эффективности использования промоторов P_{AOX1} , P_{GAP} , P_{GI} при экспрессии рекомбинантного химозина быка. Сравнение эффективности промоторов проводилось при индукции промоторов P_{AOX1} , P_{GAP} , P_{GI} в 250 мл колбах и при культивировании 72 ч. Для тестирования промоторов P_{AOX1} , P_{GAP} использовали среду YPD, для тестирования промотора P_{GI} 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 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 с препролидерной последовательностью пептида mfa1D оказались более эффективными. Использование вектора с препролидерной последовательностью mfa1D позволяет увеличить продуктивность штамм-продуцента на 7,5% по сравнению с нативной препролидерной последовательностью (**Рис. 5**).

При культивировании в 250 мл колбах Эрленмейера (250 об./мин, 30°C) в течении 96 часов ферментативная активность штамма GS115/pSF002 была на уровне 12,5 IMCU/мл. Индукция в

среде ВММУ с добавлением 1% аскорбиновой кислоты не меняла активность конечного препарата. Однако, добавление 2 г/л сорбитола в среду ВММУ с одним из выбранных клонов повышало активность конечного препарата до 20 IMCU/мл. Отобранный клон GS115/pSF002 в дальнейшем использовался для оптимизации культивирования в ферментере.

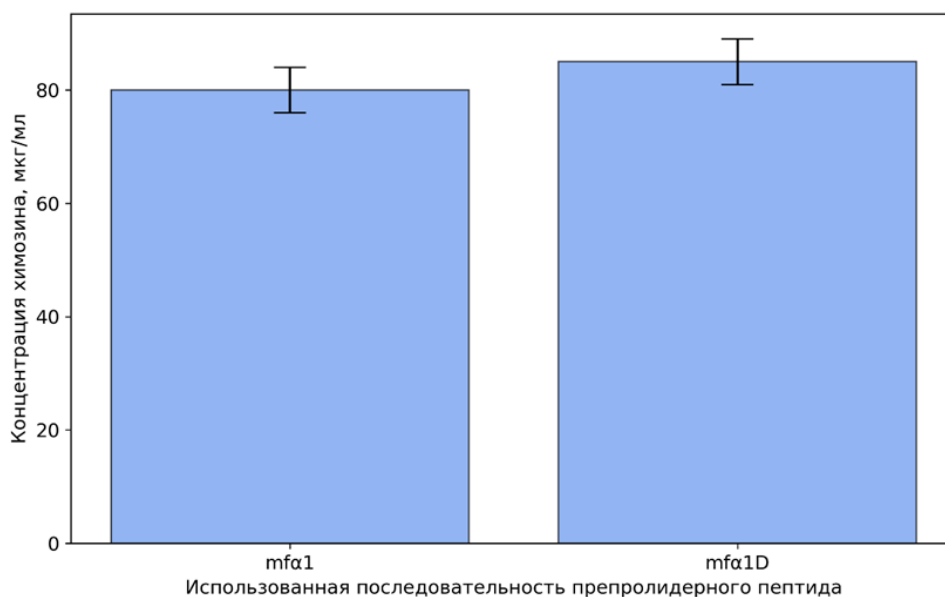


Рис. 5. Сравнение эффективности использования векторов с нативной (mfα1) и модифицированной (mfα1D) препролидерной последовательностью.

Дрожжи штамма-продуцента GS115/pSF002 выращивали в ферментере до ОП₆₀₀, равной 285. При этом ОП₆₀₀ после индукции метанолом значительно не менялась. Для повышения выхода конечного продукта были протестированы различные режимы ферментации и варианты добавок к основной среде. Максимальный выход продукта (105 мг/л) наблюдался при ферментации GS115/pSF002 в течении 96 часов с двукратным добавлением раствора сорбитола 2 г/л через 24 ч и 48 ч. Добавка сорбитола – одна из стратегий повышения уровня экспрессии при использовании *P_{AOXI}* промотора. Такая стратегия характерна прежде всего для штаммов-продуцентов с мультикопийной вставкой гена целевого продукта. Оптимизация соотношения метанол/сорбитол позволила добиться более высокого уровня продукции химозина за счет улучшения углеродного метаболизма и увеличения биомассы (**Рис. 6**).

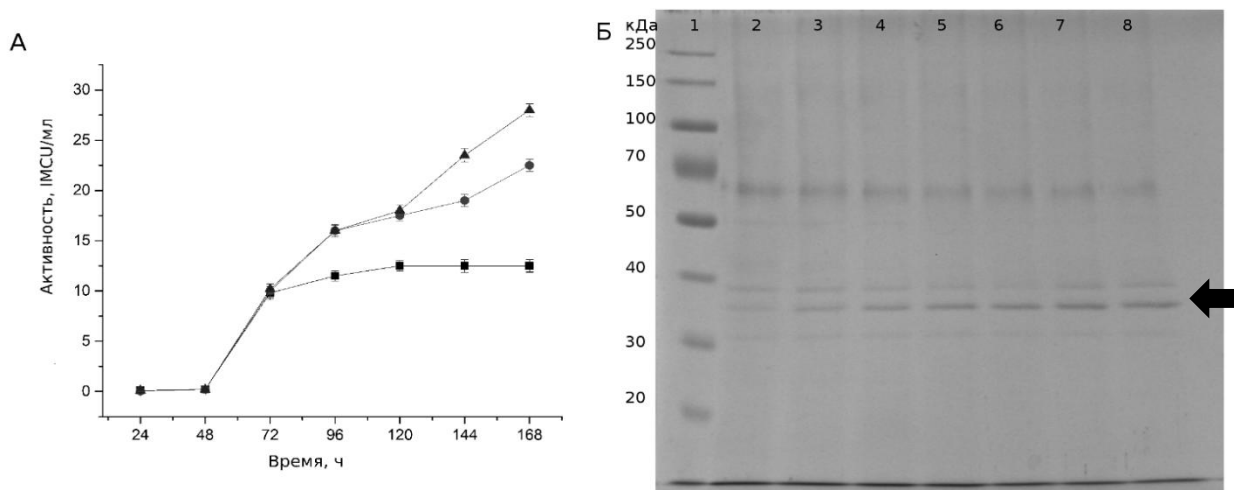


Рис. 6. Культивирование GS115/pPIC α -Chym1 в ферментере. А – профиль активности химозина. Время рассчитано от начала индукции. Образцы анализировались каждые 24 ч., ■ – минеральная среда, ● - минеральная среда с двукратным добавлением сорбитола 1 г/л, ▲ – минеральная среда с двукратным добавлением сорбитола 2 г/л. Б – Электрофореграмма ферментации химозина. 1 – маркеры молекулярного веса, кДа, 2-8 – 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 120 ч, 144 ч, 168 ч от начала индукции метанолом. Полоса, соответствующая зрелой форме химозина указана стрелкой.

Выделение и очистка рекомбинантного химозина

Полученную после ферментации культуральную жидкость отделяли от клеточной массы методом центрифугирования и проводили рН-зависимую активацию химозина. Для этого к 400 мл культуральной жидкости добавляли 40 мл 1 М НСl до значения рН 2,0. При низких значениях рН происходила автокаталитическая активация прохимозина до химозина с отщеплением N-концевого 42-членного пептида. После 2 ч инкубации рН восстанавливали до значения 5,5 добавлением 40 мл 1 М NaOH.

Культуральная жидкость очищалась при помощи анионообменной хроматографии на сорбенте DEAE-Sepharose. Были подобраны оптимальные условия разбавления в соотношении 1:3 культуральной жидкости 50 мМ фосфатным буфером рН 5,5, при котором удалось добиться максимального выхода по связыванию химозина с хроматографическим сорбентом. В результате проведенной анионообменной хроматографии раствор химозина удалось сконцентрировать в 5 раз и избавиться от большинства примесей.

Для следующего этапа очистки использовали хроматографическую колонку с носителем Phenyl-Sepharose объемом 5 мл. К раствору химозина добавляли 5 М раствор NaCl до конечной концентрации соли 2,0 М. Хроматографическую колонку с сорбентом Phenyl-Sepharose предварительно уравнивали 50 мМ раствором Na₂HPO₄, рН 5,5, с 2,0 М NaCl. После проведения элюции получали раствор химозина со степенью очистки в 85-90%. Суммарные потери по белку на всех этапах активации, выделения и очистки составляли 40%. Конечный образец удалось сконцентрировать в 44 раза, при этом удельная активность полученного химозина составила 220 IMCU/мг, что соответствует нативному химозину быка (**Табл. 1**).

Полученный рекомбинантный химозин быка обладал физико-химическими свойствами, сопоставимыми с природным химозином. При этом рекомбинантный химозин проявлял

максимальную активность в диапазоне 30-38°C. Наибольшую ферментативную активность рекомбинантный химозин проявлял при диапазоне pH 5,5-5,8. Хранение очищенного фермента при температуре 4°C в течение 30 дней приводило к незначительной потере активности. При этом хранение при температуре 20°C в течение 30 дней приводило к потере 30% активности.

В ходе выполнения работы был получен высокоэффективный рекомбинантный штамм метилотрофных дрожжей *P. pastoris*, продуцирующий рекомбинантный прохимозин и подобраны условия автокаталитической активации прохимозина до химозина. Для рекомбинантного химозина разработан метод очистки и концентрирования до 4 мг/мл (1000 IMCU/мл). Используются простые этапы получения, делающие данную технологию экономически целесообразной. Полученный рекомбинантный фермент отвечает всем требованиям по биобезопасности, в том числе по отсутствию хозяйской ДНК и является подходящим для крупномасштабного пищевого производства.

Табл. 1. 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

Создание штамм-продуцента рекомбинантного химозина белухи в метилотрофных дрожжах *P. pastoris*. Сравнение каталитических свойств рекомбинантных химозинов быка и белухи

Для множества ферментов, включая химозин, происходит постоянный поиск природных аналогов и синтетических полипептидов с улучшенными свойствами. Поиск более активных и стабильных форм химозина других видов для нужд пищевой промышленности привел к открытию и использованию новых форм и аналогов рекомбинантного химозина. Прежде всего это относится к открытию химозина верблюда, который обладает большей термостабильностью и специфичностью (демонстрирует наилучшее отношение молокосвертывающей активности к протеолитической МСА/РА). Стоит также отметить, что химозин яка обладает высокой стабильностью при более широком диапазоне pH. Среди химозинов, выделенных из других видов животных, охарактеризованных ранее – химозин овцы, буйвола, яка, одногорбого и

двугорбого верблюдов. Так же, ранее охарактеризованы химозин альпаки и марала. Но несмотря на возросший интерес к исследованию химозинов, химозин белухи не был ранее охарактеризован.

В данной работе использовался ген прохимозина белухи *ChymBe*, синтезированный «Twist Bioscience», США. Аминокислотная последовательность гена была взята из Uniprot (A0A2Y9P896). Далее ген *ChymBe* переклонировали в плазмиду pPIC α под контролем *P_{AOXI}* промотора. Препролидерную последовательность альфа-фактора *mfa1* из *S. cerevisiae* использовали для секреции рекомбинантного прохимозина. Электрокомпетентные клетки GS115 использовались для трансформации, селекция трансформантов происходила на чашках с твердой средой YPD при концентрации зеоцина в 100-200 мкг/мл. Для дальнейшего скрининга было отобрано 30 трансформантов GS115/pPIC α -*ChymBe*, которые выращивали в 50 мл среды BMGY в 250 мл колбах. После 84 часов индукции, культуральную жидкость проверяли на наличие химозина и его молоко-свертывающую активность. Прохимозин предварительно активировался понижением pH до 2,0, согласно ранее отработанной методике для прохимозина быка. Активность химозина белухи составила 3 IMCU/мл, концентрация рекомбинантного химозина белухи составила 50 мг/л, что значительно меньше, чем для химозина быка, экспрессированного при тех же условиях. Клон трансформанта с максимальной активностью и наиболее высокой концентрацией белка использовали для продукции прохимозина белухи в лабораторном ферментере. Аминокислотную последовательность рекомбинантного прохимозина белухи подтверждалась при помощи MALDI-масс-спектрометрии.

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% сорбитолом, 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 ниже значений, достигнутых при ферментации химозина быка.

Выделение и очистка проводилась согласно методике, разработанной ранее для очистки химозина быка. 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 mM натрий-фосфатным буфером pH 5,5 и рекомбинантный химозин белухи выделяли с помощью двух стадийной хроматографии с использованием DEAE-сефарозы и Phenyl-сефарозы.

Очищенные рекомбинантные химозины из *B. taurus* и *D. leucas* обладали молоко-свертывающей активностью в 220 IMCU/мг и 53 IMCU/мг соответственно. Специфическая молоко-свертывающая активность рекомбинантного химозина белухи была ниже, чем у химозина быка, при этом протеолитическая активность химозина белухи была выше. Соотношение молоко-свертывающей активности к протеолитической МСА/РА для химозина быка составило 1,0. При этом расчетное значение МСА/РА для химозина белухи было ниже 0,2. Из сравнения с более ранними результатами, полученными для других видов, известно о существовании более специфичных вариантов химозина, таких как химозин верблюда и альпаки.

Для химозина белухи был определен оптимум pH 6,0. Это значение pH немного выше оптимального значения для химозина быка (5,5-5,8). Значение температурного оптимума для рекомбинантного химозина белухи соответствует 35°C, что сходно с таковым у химозина быка. Активность химозина белухи была максимальной при чуть более низкой концентрации кальция по сравнению с химозином быка, что может быть связано с морской средой обитания белухи.

Возможно, что аминокислотные замены K221M и K295Q являются критически важными, значимыми и ведут к ухудшению связывания казеиновых мицелл с химозином (**Рис. 7**). В дополнение к этому рекомбинантный химозин белухи обладает более высокой неспецифической активностью, что ухудшает потенциал его использования в пищевой промышленности. Также весьма вероятно, что снижение специфической активности к казеиновым мицеллам связано со снижением общего поверхностного заряда рекомбинантного химозина белухи по сравнению с таковым для химозина быка. По сравнению с сильно положительно заряженным химозином верблюда (общий заряд +22) и быка (+15), заряд химозина белухи ниже (+13). Также низкая специфическая активность рекомбинантного химозина белухи связана с заменами в казеине белухи.

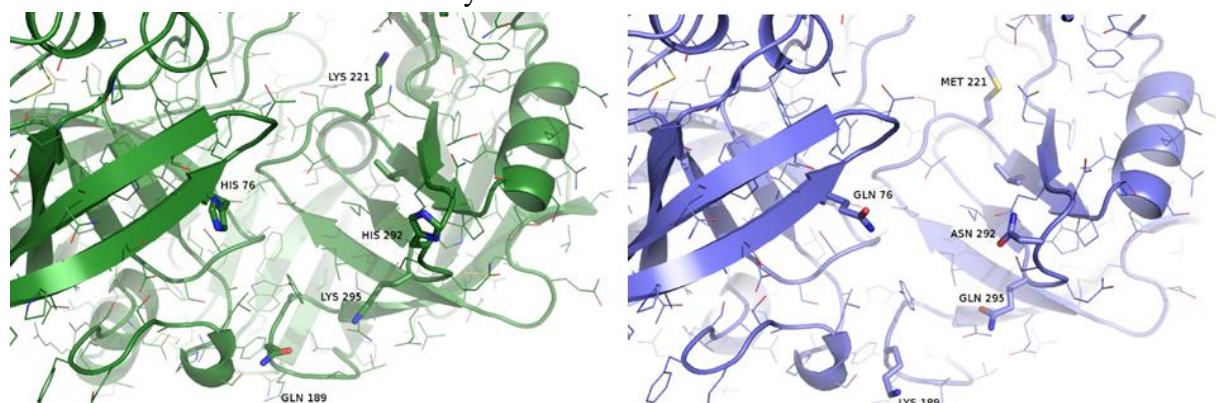


Рис. 7. Трехмерные структуры сайтов связывания химозина быка (выделена зеленым, 4AA8) и белухи (синим выделена авторская модель, созданная в программе Modeller 9v12). Позиции значимых аминокислотных замен K221M, K295Q в сайте связывания казеина указаны на рисунке.

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

Оверэкспрессия целевых белков в клетках дрожжей зачастую приводит к накоплению неправильно свернутых и дефектных белков в цитоплазме и эндоплазматическом ретикулуме. В результате процессы деления клеток, биосинтеза и экспорта белков замедляются, активируются различные стрессовые ответы, в том числе, протеасом-зависимая деградация неправильно свернутых белков и так называемый ответ клетки на неправильно свернутые белки (unfolded protein response - UPR). UPR вызывает арест трансляции, деградацию дефектных белков, накопление шаперонов. Индуктором UPR генов является фактор транскрипции HAC1. Показано, что сверхэкспрессия гена HAC1 стимулирует процессы экспорта и созревания целевых белков в рекомбинантных штаммах дрожжей и грибов.

В ходе работы был сконструирован вектор pPIC9-GAP-HAC1, содержащий сплайсированный вариант гена sHAC1. Вектор pPIC9-GAP-HAC1 трансформировали в штаммы-продуценты химозина GS115/pPIC α -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/pPIC α -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. 8).

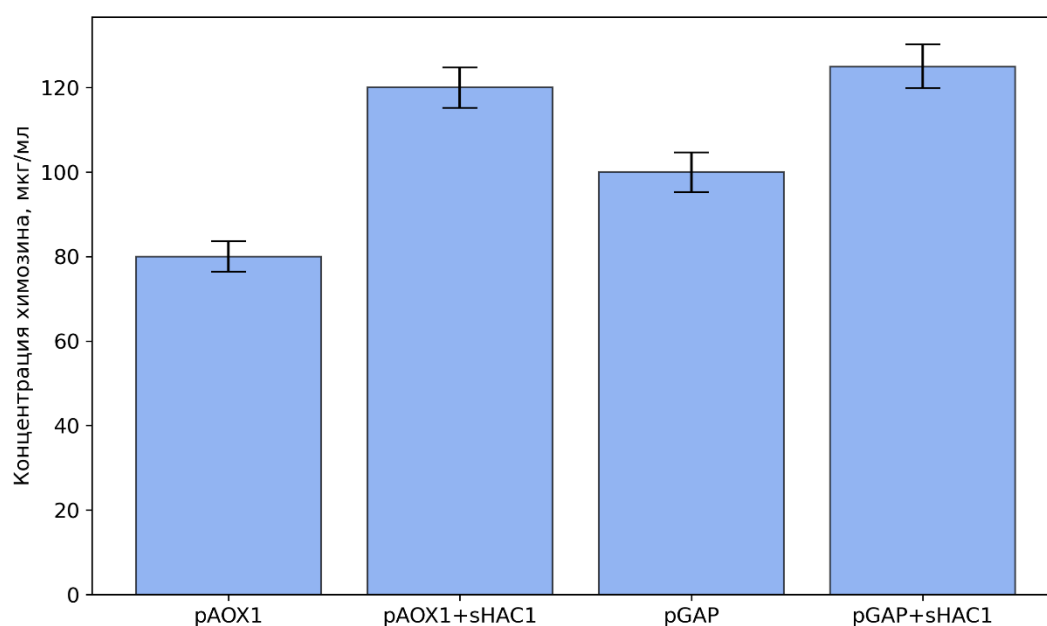


Рис. 8. Влияние коэкспрессии сплайсированного варианта транскрипционного фактора HAC1 на уровень продукции рекомбинантного химозина быка при использовании промоторов P_{AOX1} и P_{GAP} в штаммах *P. pastoris* GS115/pPIC α -Chym1(*his4*-), GS115/pPIC α -Chym1-HAC1(*his4*+) и GS115/pVR2-GAP-Chym1(*his4*-), GS115/pVR2-GAP-Chym1-HAC1 (*his4*+) соответственно.

Для детального понимания и изучения изменения физиологического состояния данных штаммов-продуцентов был проведен анализ метаболома методами масс-спектрометрического анализа.

В ходе данного анализа удалось получить сравнительную характеристику концентрации метаболитов в процессе культивирования штамма-продуцента химозина GS115/pPIC α -Chym1. Полученные значения концентрации аминокислот не отличаются значительным образом от результатов, полученных ранее другими исследователями (Рис. 9). Поскольку в данном исследовании не производилось дериватизации аминокислот, точно определить концентрации небольших по массе/заряду аминокислот (глицина и аланина) не представлялось возможным. Однако очевидно, что имеются изменения концентраций в пуле гистидин/гистидиол при использовании штамм-продуцентов GS115 (*his4*-), GS115/pPIC α -Chym1 (*his4*-), GS115/pPIC α -Chym1-HAC1 (*his4*+) (Рис. 10).

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.

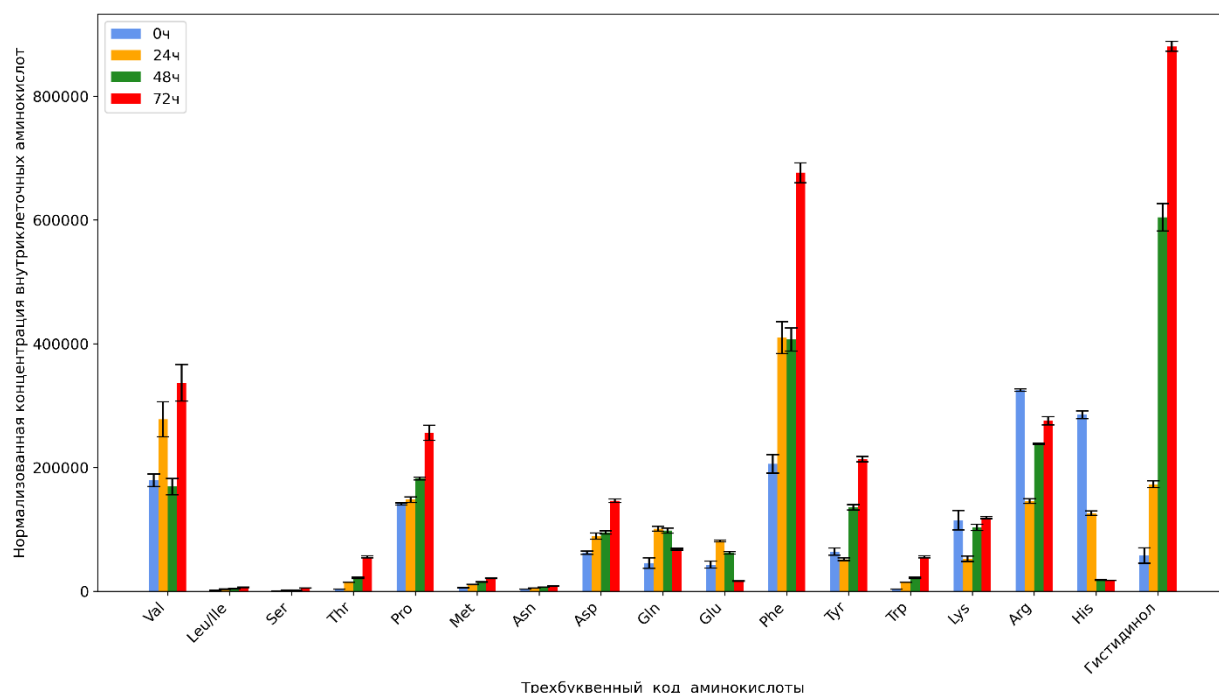


Рис. 9. Нормализованные концентрации внутриклеточных метаболитов штамма-продуцента GS115/pPICα-Chym1 в ходе культивирования с течением времени (0, 24, 48, 72 ч).

Поскольку использовался штамм *his4*- видно уменьшение концентрации гистидина и увеличение концентрации гистидинола. Детектируемые концентрации лейцина/изолейцина, треонина и серина при этом значительно меньше концентраций других аминокислот.

Значительно меняются концентрации метаболитов глутатионового шунта при изменении основного источника углерода (Рис. 11). Это может быть напрямую связано с той ролью, которую играет глутатионовый шунт в окислении метанола и доставке энергетических эквивалентов НАДН/НАД⁺ из пероксисомы в цитоплазму

При коэкспрессии сплайсированного варианта sHAC1 было замечено несколько критических изменений в концентрациях внутриклеточных метаболитов, прежде всего изменение пула НАДН/НАД⁺ (Рис. 12), что крайне важно для синтетических возможностей клетки. Ранее в литературе показано, что коэкспрессия sHAC1 приводит к значительному увеличению эндоплазматического ретикулума и биосинтезу мембран. По анализу метаболомных данных штаммов GS115/pPICα-Chym1 и GS115/pPICα-Chym1-HAC1 также заметно увеличение концентраций промежуточных метаболитов биосинтеза фосфолипидов, в частности отдельных производных фосфотидилсерина, фосфотидилхолина и фосфотидилэтаноламина.

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.

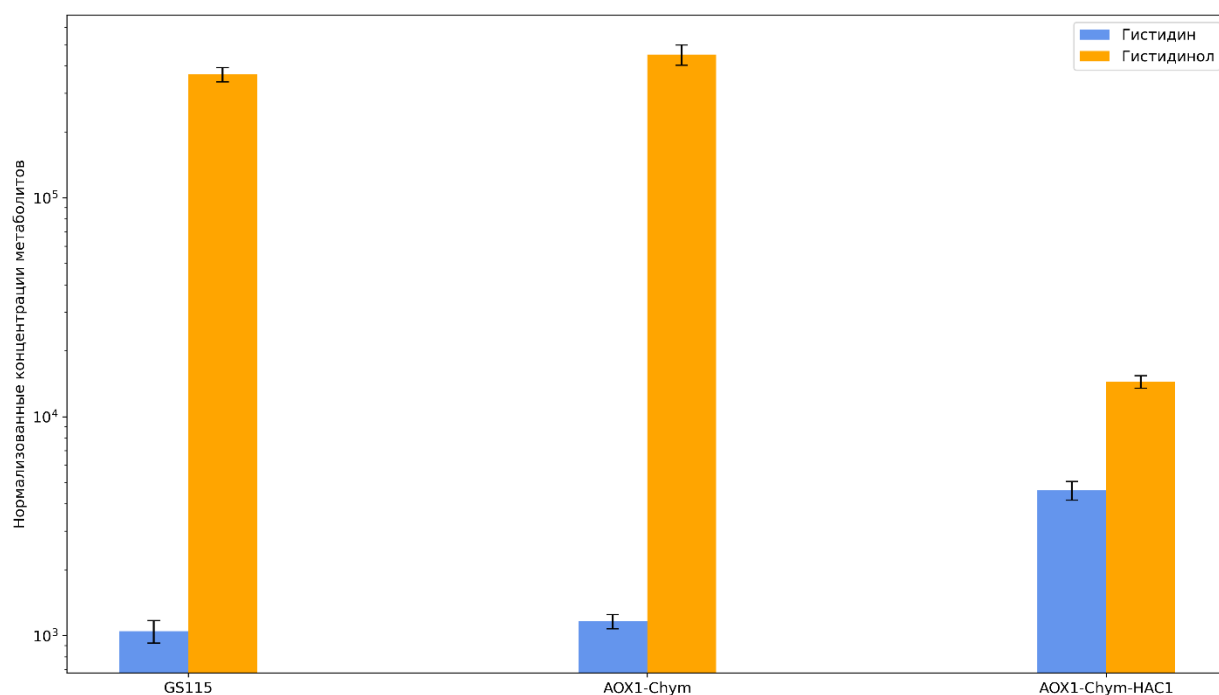


Рис. 10. Нормализованные концентрации метаболитов различных штамм-продуцентов после 72 ч культивации. GS115 (*his4*⁻) – исходный штамм. GS115/pPICZα-Chym1 (*his4*⁻), GS115/pPICZα-Chym1-HAC1(*his4*⁺) – штаммы, продуцирующие рекомбинантный химозин.

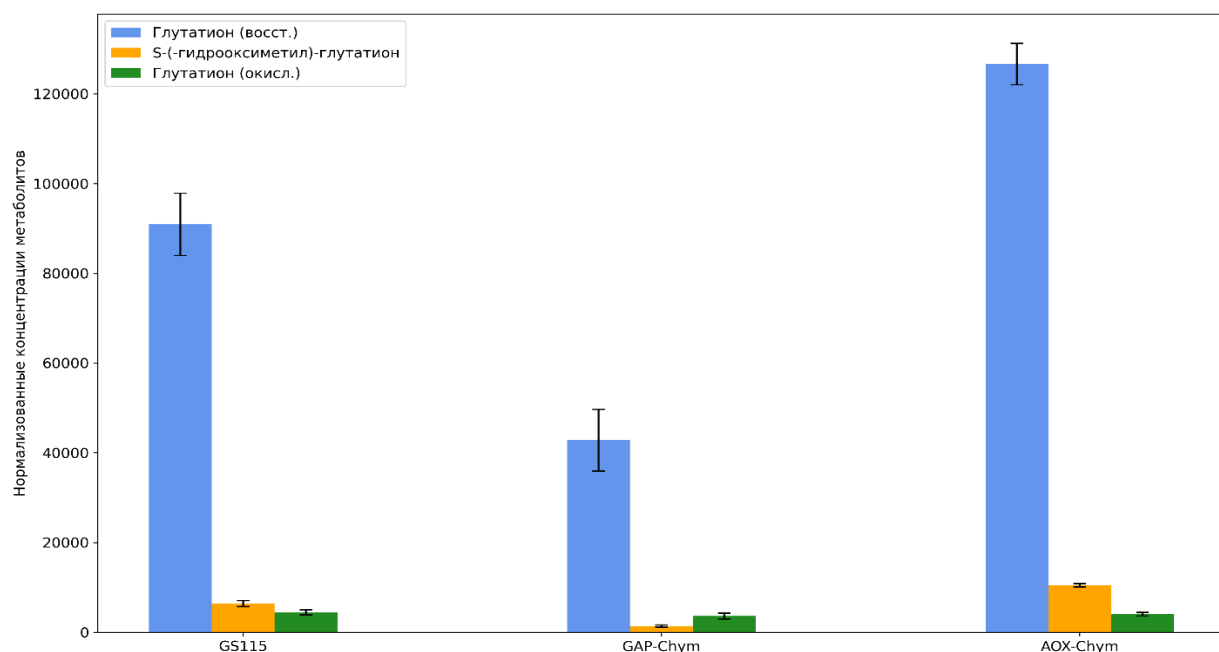


Рис. 11. Изменения концентраций метаболитов глутатионового шунта в различных штаммах в зависимости от источника углерода. Штаммы GS115 и GS115/pPICZα-Chym1 (экспрессия рекомбинантного белка под контролем промотора P_{AOX1}) культивировали на минеральной среде с 1% метанолом, GS115/pVR2-GAP-Chym1 (экспрессия рекомбинантного белка под контролем промотора GAP) на минеральной среде с 10% глюкозой.

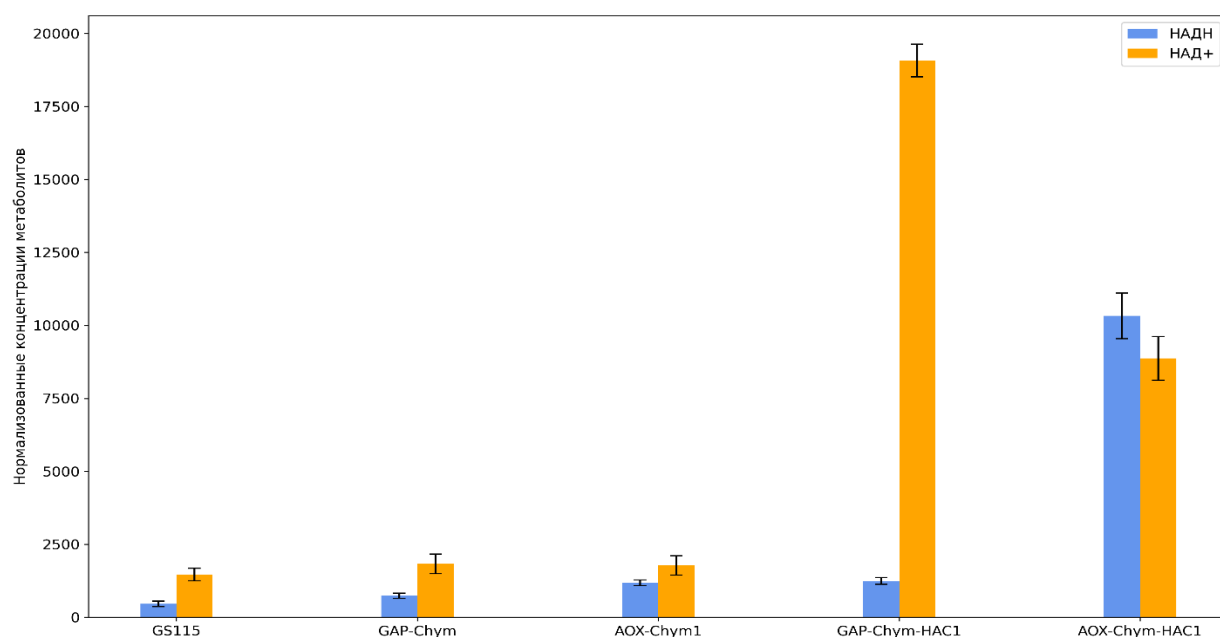


Рис. 12. Изменения концентраций пула НАДН/НАД⁺ в различных штаммах *P. pastoris*. Штаммы GS115, GS115/pPICZα-Chym1, GS115/pPICZα-Chym1-HAC1 (экспрессия рекомбинантного белка под контролем промотора P_{AOX1}) культивировали на минеральной среде с 1% метанолом. GS115/pVR2-GAP-Chym1 и GS115/pVR2-GAP-Chym1-HAC1 (экспрессия рекомбинантного белка под контролем промотора GAP) культивировали на минеральной среде с 10% глюкозой.

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 AOX1, 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 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. IF 2,8, Q3.
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. IF 16,2, Q1.
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. IF 3,7, Q1.
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. IF 2,9, Q3.
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 A2 при экспрессии в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris* // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2019. – Т. 55. – №. 6. – С. 578-585. IF 0,8, Q3.
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. IF 2,8, Q2.
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. IF 0,8, Q3.
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. IF 0,8, Q3.

Патенты:

1. **Филькин С.Ю.**, Зенин В.А., Чертова Н.В., Липкин А.В., Федоров А.Н. Способ очистки рекомбинантного ферментного препарата фосфолипазы A2 из штамма продуцента *Pichia pastoris*. Патент на изобретение RU2746563 C1, 15.04.2021
2. **Филькин С.Ю.**, Федоров А.Н., Липкин А.В., Чертова Н.В. Получение гена фосфолипазы A2 с измененным оптимумом pH 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 A2 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 A2 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 A2 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.