

УДК 602.3; 602.6; 604.6

## Высокоактивные модифицированные варианты рекомбинантной фосфолипазы A2 *Streptomyces violaceoruber* для эффективного биосинтеза в дрожжах

© 2019 С.Э. ЧЕПЕРЕГИН<sup>1</sup>, Е.П. САННИКОВА<sup>1</sup>, А.В. МАЛЫШЕВА<sup>1</sup>, Ф.А. КЛЕБАНОВ<sup>1</sup>, Д.Г. КОЗЛОВ<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика), Москва, 117545

\*e-mail: dg\_kozlov@genetika.ru

Поступила в редакцию 11.12.2018 г.

После доработки 22.02.2019 г.

Принята к публикации 30.04.2019 г.

Фосфолипаза A2 (PLA2) применяется в различных отраслях промышленности, в частности, широко используется для улучшения эмульгирующих свойств яичного желтка. В настоящее время в России PLA2 не производится и является одним из наиболее востребованных и дорогостоящих ферментов. Основным препятствием на пути разработки дрожжевых продуцентов является токсичность высокоактивных PLA2, опосредованная их действием на фосфолипиды клеточных мембран. В этой связи ранее выполненные разработки дрожжевых продуцентов касались получения низкоактивных PLA2. В настоящей работе исследована возможность биосинтеза в дрожжах высокоактивной PLA2 штамма A-2688 *S. violaceoruber*. С целью увеличения эффективности экспрессии были сконструированы модифицированные варианты данного фермента, включавшие определенные аминокислотные замены, N- и C-концевые удлинения, а также инактивированные сайты N-гликозилирования. В результате исследований были отобраны модифицированные производные PLA2, удельная активность которых при сходной эффективности секреции, минимум, на порядок превосходила показатели ранее полученных низкоактивных PLA2. Отобранные варианты характеризовались пониженным сродством к ионам кальция Ca<sup>2+</sup>, что, вероятно, обуславливало их низкую токсичность на этапе биосинтеза и возможность активации их в искусственных условиях, в том числе на яичном желтке, путем внесения в реакционные смеси ионов кальция. Представляется, что полученные варианты способны значительно удешевить применение PLA2 в отраслях промышленности, допускающих использование повышенных концентраций ионов кальция.

**Ключевые слова:** рекомбинантная фосфолипаза A2, *Streptomyces violaceoruber*, дрожжи, секреция, штамм-продуцент

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-3-30-41

Фосфолипаза A2 (PLA2) является одним из наиболее дорогостоящих ферментов на рынке ферментных препаратов. В пищевой промышленности ее применяют для улучшения качества майонеза, дегуммирования растительных масел, изготовления хлебобулочных изделий, молочных продуктов, а также при производстве сыра [1, 2]. Другими областями применения PLA2 являются текстильная промышленность, кормо-

производство и парфюмерия, а также синтез искусственных фосфолипидов, востребованных, в частности, в фармакологии [3–5]. Интенсивное использование PLA2 ожидают в топливно-энергетической промышленности для получения биодизеля [6]. В России PLA2 не производится, что служит дополнительным стимулом к разработке штаммов-продуцентов и технологии получения данного фермента.

**Список сокращений:** K<sub>D</sub> – константа диссоциации кальция Ca<sup>2+</sup>; PLA2 – фосфолипаза A2; *pla2* – ген, кодирующий биосинтез фосфолипазы A2; КЖ – культуральная жидкость

Выбор организма-хозяина для биосинтеза рекомбинантной PLA2 обуславливался преимуществами дрожжевых систем экспрессии: прогрессивным уровнем их разработки и возможностью удешевить производство за счет секреции PLA2. Препятствием на пути получения эффективных дрожжевых продуцентов является токсичность высокоактивных вариантов PLA2, связанная с их действием на фосфолипиды клеточных мембран. В этой связи все ранее разработанные дрожжевые продуценты, например PLA2 индийской кобры *Naja naja naja* [7] или PLA2 штамма 2917 *S. violaceoruber* [5], позволяли получить ферменты с относительно низкой специфической активностью (30 и 170 ед/мг, соответственно).

В настоящей работе за основу для конструирования дрожжевых продуцентов была выбрана высокоактивная PLA2 штамма A-2688 *S. violaceoruber*, специфическая активность которой превышает 1000 ед/мг [8]. Экспрессию PLA2 анализировали в клетках реципиентных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Komagataella kurtzmanii* (аналог *Komagataella (Pichia) pastoris* [9]).

Целью исследования была разработка модифицированных PLA2, обладающих одновременно высоким уровнем секреции в дрожжах и высокой удельной активностью, минимум на порядок превосходящей показатели ранее полученных низкоактивных ферментов [5, 7].

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Штаммы и условия культивирования

В работе использовали реципиентный штамм  $\beta$ -0 ( $\alpha$  *ura3 ura3 leu2 trp1 his3 his4 SUC2+STA2 sta10 GAL+*) дрожжей *S. cerevisiae* (ГосНИИГенетика, Москва), производный двух родительских штаммов DBY747 (ATCC 204659) и YBS618 [10].

Трансформанты штамма  $\beta$ -0 получали с использованием литий ацетата [11]. Полученные трансформанты культивировали на жидкой среде YPDG (дрожжевой экстракт – 1%; бactoпептон – 2%; глюкоза – 2%; галактоза – 2%) в течение 46 ч до стационарной фазы роста с использованием ротационного шейкера со скоростью 250 об/мин при температуре 30 °C (если не указано иное).

Также в работе использовали реципиентный штамм дрожжей Y727his4 $\Delta$  *K. kurtzmanii* [9, 12]. Трансформацию клеток штамма Y727his4 $\Delta$  и культивирование полученных трансформантов осуществляли, как описано [12].

### Конструирование плазмидных ДНК

Конструирование рекомбинантных ДНК осуществляли с использованием стандартного набора методов [13]. Фрагменты ДНК амплифицировали с помощью ПЦР с использованием ДНК-полимеразы Phusion (ThermoFisher Scientific, #F-530S). Сайт-направленный мутагенез ДНК осуществляли, как описано [14]. Все ферменты от фирмы ThermoFisher Scientific. Для амплификации плазмидных ДНК использовали штамм *E. coli* TOP10 (Invitrogen).

Для экспрессии генов фосфолипазы в клетках реципиентного штамма  $\beta$ -0 *S. cerevisiae* конструировали бирепликонные плазмиды, содержавшие в качестве селективного маркера ген *URA3*. Плазмиды конструировали на основе вектора pPDX3 [15], являющегося производным вектора pPDX [16]. В составе плазмид серии pPDX3 экспрессия генов фосфолипазы находилась под контролем промотора *GAL1* дрожжей *S. cerevisiae*.

Для экспрессии генов фосфолипазы в клетках реципиентного штамма Y727his4 $\Delta$  *K. kurtzmanii* конструировали интегративные плазмиды, содержавшие в качестве селективного маркера ген *HIS4*. Плазмиды конструировали на основе вектора pRH93-AOX1<sub>Y727</sub>-HSA [12], переименованного в pRH727-artHSA. В составе плазмид серии pRH727 экспрессия генов фосфолипазы находилась под контролем промотора *AOX1* дрожжей *K. kurtzmanii*.

### Гель-электрофорез белков культуральной жидкости

Электрофорез белков культуральной жидкости дрожжей проводили в 15%-ном полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях с использованием системы Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad, #165-8000), согласно инструкции. Использовали предокрашенные белковые маркеры (Pierce-26616).

Концентрирование белков из образцов КЖ осуществляли как было описано ранее [17].

### Определение активности PLA2

**Чашечный тест.** Качественный анализ ферментативной активности различных вариантов фосфолипазы A2 в образцах культуральной жидкости дрожжей проводили с использованием чашечного теста.

Для выполнения теста в чашки Петри разливали среду следующего состава (мас.%): бактоагар (214010, Becton, Dickinson and Company, США) – 1,5; лецитин соевый (Lecigran 1000P,

Cargill, Германия) – 1; раствор 1М кальция хлорида (С-3882, Sigma Chemical CO, США) – 1; тритон Х-100 (37240, Serva, Германия) – 0,8; раствор 1М трис-НСl (рН 8,0) (Sigma, США) – 8. Приготовление этой среды проводили в следующем порядке. Соевый лецитин смешивали с расчетным количеством воды и полученную суспензию обрабатывали диспергатором IKA T18 digital Ultra Turrax (Германия) на максимальных оборотах в течение 2 мин. Затем в диспергированную смесь вносили растворы трис-НСl и тритона и добавляли агар. Полученную суспензию перемешивали и стерилизовали путем автоклавирования. По окончании автоклавирования раствор снова тщательно перемешивали, стараясь не допускать пенообразования, и охлаждали до температуры +50 °С. В остуженный раствор вносили кальций, снова перемешивали и разливали по 25 мл на чашку Петри диаметром 90 мм. Чашки с полученной агаризованной тест-средой хранили при температуре +4 °С до ее использования.

Для выполнения анализа активности, используя подходящий стерильный инструмент, в агаре залитых чашек делали сквозные лунки диаметром 3 мм и объемом 20 мкл. В сделанные лунки вносили равные объемы (по 15 мкл) исследуемых образцов культуральной жидкости дрожжей. В качестве калибровочных стандартов использовали водные растворы фосфолипазы «DENAZYME PLA2» (Nagase Corporation) с известной активностью, называемой в данной работе «PLA2 Nagase».

Чашки инкубировали в термостате при температуре +50 °С до появления прозрачных зон подходящего размера. Чашки фотографировали. Размер зон исследуемых образцов сравнивали с размером зон калибровочных растворов «PLA2 Nagase», и на основании сравнения производили количественную оценку активности фосфолипазы А2 в каждом исследуемом образце.

Тест обладал высокой чувствительностью и разрешающей способностью и позволял регистрировать активность в области от 1 ед/мл до 100 ед/мл.

#### **Инструментальное определение активности на яичном желтке**

Активность вариантов фосфолипазы А2 измеряли с использованием рН-метра модели Mettler Toledo MP 220 рН Meter (Швейцария). Субстратом для измерения активности служил яичный желток, разбавленный деионизованной водой в соотношении 1 : 1.

Реакционная смесь содержала 400 мкл субстрата и 20 мкл тестируемого образца, содержащего фосфолипазу А2. Смесь инкубировали в

микропробирках при постоянной температуре +37 °С в термостате ТЕРМО 24 (БИОКОМ, Россия). Используя рН-метр, фиксировали начальное значение кислотности реакционной смеси сразу после добавления образца дрожжевой культуральной жидкости, содержащей фосфолипазу А2. Последующие измерения проводили в течение 1 ч через каждые 20 мин после начала реакции. Измеренные значения  $\Delta$ рН использовали для вычисления средней величины скорости реакции  $\Delta$ рН/мин. Активность PLA2 в образце культуральной жидкости вычисляли, сравнивая среднюю величину скорости реакции  $\Delta$ рН/мин для опытного образца и для калибровочного раствора «PLA2 Nagase» с активностью 50 ед/мл.

#### **Инструментальное определение активности в стандартных условиях с использованием рН-титратора**

Для измерения активности вариантов фосфолипазы А2 в образцах культуральной жидкости дрожжей инструментальным методом использовали рН-титратор Mettler Toledo DL50 Graphix (Швейцария). Субстратом для измерения активности служил соевый лецитин.

Готовили реакционную смесь следующего состава (мас.%): лецитин соевый – 1; раствора 1М хлорид кальция – 1; тритон Х-100 – 1. Для приготовления этой смеси соевый лецитин смешивали с расчетным количеством воды, раствора хлорида кальция и тритона. Полученную суспензию обрабатывали диспергатором IKA T18 digital Ultra Turrax при скорости 25 тыс. об./мин в течение 2 мин. Полученную мелкодисперсную смесь отстаивали, дожидаясь выхода пузырьков воздуха, и использовали в течение 8 ч. Измерение активности проводили при постоянной температуре +37 °С. рН-стабирование осуществляли, фиксируя величину рН 7,0. Титрование производили с использованием раствора 0,05 М NaOH. Для построения калибровочной кривой использовали калибровочные образцы «PLA2 Nagase» с известной активностью.

#### **Разработка тестов для анализа активности PLA2**

Для получения калибровочных данных в чашечном тесте, а также при определении активности PLA2 инструментальными методами использовали стандартные образцы «PLA2 Nagase» с известной активностью. Содержание белка в коммерческом препарате «PLA2 Nagase», измеренное по методу Брэдфорда, составило 3,5 мг/мл. С учетом паспортных данных активности образца (10000–12000 ед/мл) расчетное

значение удельной активности «PLA2 Nagase» в концентрате было принято равным 3000 ед/мг.

**Синтез структурного гена низкоактивной PLA2**

Из источников информации известны два варианта PLA2 *S. violaceoruber* [5, 8]. Из них PLA2 штамма А-2688 характеризовалась высокой удельной активностью, не менее 1000 ед/мг (<http://wayback.archiveit.org/7993/20171031055659/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/UCM263914.pdf>), тогда как опубликованная величина активности PLA2 штамма 2917 составляла всего 170 ед/мг [5]. При этом информация об экспрессии и секреции в дрожжах раскрыта лишь для низкоактивного варианта [5].

В связи с тем, что целью работы являлся вариант PLA2, обладающий одновременно эффективной секрецией и высокой активностью, представлялось целесообразным в качестве отправной точки иметь контрольный образец фермента, обладающего в полной мере хотя бы одним из двух качеств. В этой связи для синтеза была выбрана последовательность ДНК структурного гена *pla2*, кодирующего низкоактивный вариант белка PLA2 штамма 2917 *S. violaceoruber*, способность к эффективной секреции которого в дрожжах была продемонстрирована ранее [5].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

При проектировании синтетического гена из последовательности ДНК были исключены все протяженные (> 4 нт подряд) поли-А и -Т участки, а также участки, содержащие известные последовательности, встречающиеся в областях терминации транскрипции дрожжевых генов [18, 19]. Также при проектировании гена предпочтение отдавалось компромиссным кодонам, наиболее часто встречающимся в высокоэкспрессируемых генах одновременно *E. coli* и дрожжей [20, 21]. На завершающем этапе из последовательности синтетической ДНК были исключены некоторые сайты рестрикции. В составе результирующего фрагмента ДНК структурному гену PLA2 предшествовала нуклеотидная последовательность, кодирующая короткий линкерный дипептид SerGly, облегчающий процессинг секретируемого белка (рис. 1).

**Низкоактивная PLA2 эффективно продуцируется в дрожжах. Влияние лидеров**

С целью экспрессии в клетках *S. cerevisiae* и *K. kurtzmanii* синтезированный ген *pla2* был клонирован в векторах серии рPDX3 и рPH727 под контролем промоторов GAL1 и AOX1, соответственно. Помимо промоторных областей векторы указанных

GGA	<u>TCC</u>	GGA	GCT	CCT	GCC	GAC	AAG	CCT	CAG	GTC	CTG	GCC	AGT	TTC	ACC	48
	<b>Ser</b>	<b>Gly</b>	Ala	Pro	Ala	Asp	Lys	Pro	Gln	Val	Leu	Ala	Ser	Phe	Thr	
			1				5					10				
CAG	ACC	AGT	GCC	AGT	TCT	CAG	AAC	GCC	TGG	CTG	GCT	GCC	AAC	CGT	AAC	96
Gln	Thr	Ser	Ala	Ser	Ser	Gln	Asn	Ala	Trp	Leu	Ala	Ala	Asn	Arg	Asn	
	15					20					25					
CAG	AGT	GCC	TGG	GCT	GCC	TAC	GAG	TTC	GAC	TGG	AGT	ACC	GAC	TTG	TGT	144
Gln	Ser	Ala	Trp	Ala	Ala	Tyr	Glu	Phe	Asp	Trp	Ser	Thr	Asp	Leu	Cys	
	30				35				40					45		
TCT	CAG	GCC	CCT	GAC	AAC	CCT	TTC	GGT	TTC	CCT	TTC	AAC	ACC	GCC	TGT	192
Ser	Gln	Ala	Pro	Asp	Asn	Pro	Phe	Gly	Phe	Pro	Phe	Asn	Thr	Ala	Cys	
				50					55					60		
GCC	CGT	CAT	GAC	TTC	GGT	TAC	CGT	AAC	TAC	AAG	GCT	GCC	GGT	AGT	TTC	240
Ala	Arg	His	Asp	Phe	Gly	Tyr	Arg	Asn	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gly	Ser	Phe	
			65				70						75			
GAC	GCC	AAC	AAG	AGT	CGT	ATC	GAC	AGT	GCC	TTC	TAC	GAG	GAC	ATG	AAG	288
Asp	Ala	Asn	Lys	Ser	Arg	Ile	Asp	Ser	Ala	Phe	Tyr	Glu	Asp	Met	Lys	
		80					85					90				
CGT	GTC	TGT	ACT	GGT	TAC	ACC	GGT	GAG	AAG	AAC	ACC	GCC	TGT	AAC	AGT	336
Arg	Val	Cys	Thr	Gly	Tyr	Thr	Gly	Glu	Lys	Asn	Thr	Ala	Cys	Asn	Ser	
	95					100					105					
ACC	GCC	TGG	ACC	TAC	TAC	CAG	GCC	GTC	AAG	ATC	CTG	TAA	<u>CTCGAG</u>			381
Thr	Ala	Trp	Thr	Tyr	Tyr	Gln	Ala	Val	Lys	Ile	Leu	***				
					115						120					

**Рис. 1.** Последовательность синтетического фрагмента ДНК, включающего структурный ген фосфолипазы А2. Подчеркнуты концевые сайты BamHI и XhoI. Жирным шрифтом выделена последовательность N-концевого линкерного дипептида SerGly

**Fig. 1.** Synthetic DNA fragment enclosing the phospholipase A2 structural gene. The end sites BamHI and XhoI are underlined. The N-terminal linker sequence SerGly is highlighted in bold type

серий содержали последовательности ДНК, кодирующие лидерные последовательности preF, matFF, preFFF, matH и matHH, включающие нативный (pre, MRFPSIFTAVLFAASSALA) или модифицированный (mat, MRFPSIFTAVLFAAPAALG) сигнальные пептиды  $\alpha$ -фактора дрожжей *S. cerevisiae* и одиночные, удвоенные или утроенные прообласти  $\alpha$ -фактора (F) или белка Hsp150 (H) дрожжей *S. cerevisiae* [22]. Во всех случаях (кроме preF\*) лидерные последовательности обеспечивали секрецию в дрожжах зрелых производных PLA2, на N-конце которых содержался линкерный дипептид SerGly (рис. 1). В конструкции preF\* из состава синтезируемого белка линкерный дипептид был удален. В результате проведенного клонирования были получены экспрессионные плазмиды, которые позволили провести скрининг и отобрать лидерные последовательности, способные направлять секрецию PLA2 с наибольшей эффективностью.

С целью анализа секреции PLA2 сконструированные плазмиды были введены в клетки реципиентных штаммов дрожжей  $\beta$ -0 *S. cerevisiae* и Y727his4 $\Delta$  *K. kurtzmanii*, и полученные трансформанты были выращены в условиях галактозной и метанольной индукции, соответственно.

Проведенный анализ культуральной жидкости (КЖ) трансформантов (5 мкл КЖ трансформантов *S. cerevisiae* и 50 мкл КЖ трансформантов *K. kurtzmanii*) подтвердил высокий уровень секреции PLA2 в клетках обоих видов дрожжей (рис. 2). Согласно оценке, при культивировании в колбах уровень продукции PLA2 в дрожжах *S. cerevisiae* достигал 250 мг/л, что определялось высокой копийностью репликативных векторов, содержащих ген PLA2. Столь высокий уровень экспрессии в сочетании с отсутствием заметного лизиса клеток следовало расценивать как следствие низкой токсичности данного варианта PLA2 для клеток дрожжей. Следует также отметить, что использование в составе секретируемого белка линкерного дипептида способствовало увеличению эффективности созревания и секреции PLA2 в клетках дрожжей (сравнить дорожки preF\* и preF на рис. 2a).

При этом, как и следовало ожидать [5], в КЖ трансформантов *S. cerevisiae* и *K. kurtzmanii* PLA2 обнаруживался в негликозилированной и гликозилированной 1-кратно и 2-кратно формах (рис. 2a), причем соотношение между гликоформами PLA2 не было постоянным, а изменялось, в зависимости от выбора лидерного полипептида и от вида дрожжей. Так, например, на рис. 2a видно, что в дрожжах *S. cerevisiae* при использовании мономерных прообластей (preF и matH) в спектре гликоформ

PLA2 преобладали дважды гликозилированные формы (2x), а увеличение размерности прообластей (matFF, preFFF, matHF и matHH) вызывало перераспределение PLA2 в пользу менее гликозилированных форм (ng и 1x). В то же время в дрожжах *K. kurtzmanii* влияние лидерных областей на распределение PLA2 между различными гликоформами практически не проявлялось (рис. 2a, справа).

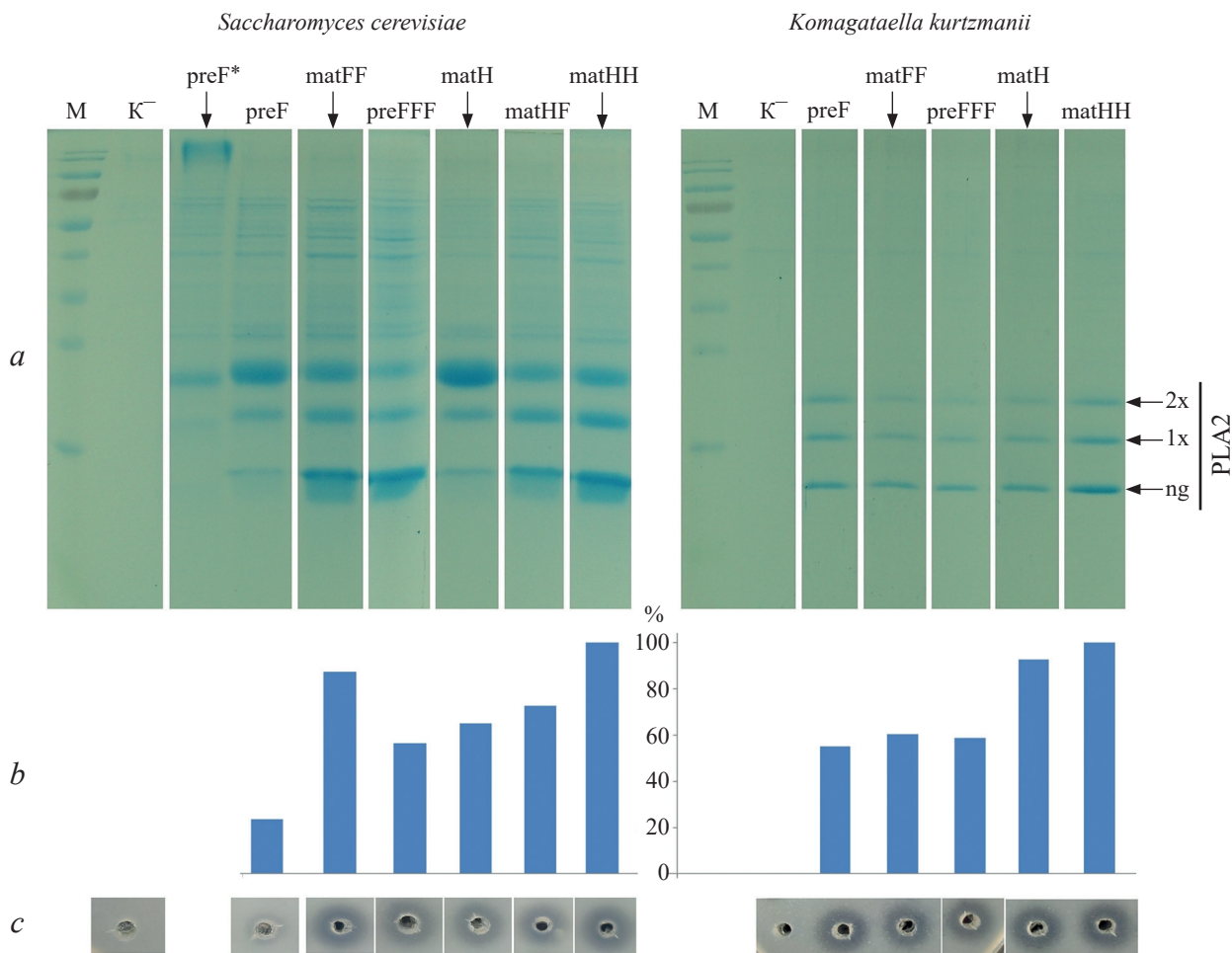
Анализ активности PLA2 в образцах КЖ трансформантов, выполненный с использованием рН-титратора (рис. 2b) или чашечного теста (рис. 2c), показал, что наибольшей эффективностью в обоих видах дрожжей обладал лидер matHH. При этом активность PLA2 в образцах КЖ соответствующих трансформантов *S. cerevisiae* составляла около 50 ед. С учетом ранее данной оценки уровня секреции белка (до 250 мг/л), специфическая активность PLA2 в КЖ трансформантов *S. cerevisiae* оценивалась в 200 ед/мг, что близко к активности PLA2, синтезированной в *K. pastoris* (170 ед/мг) [5].

Как показывают данные, приведенные на рис. 2, результаты измерения активности (рис. 2b и 2c) хорошо коррелировали с общим уровнем секреции PLA2, но не с соотношением ее гликоформ (рис. 2a), что может служить косвенным подтверждением ранее сделанного вывода об отсутствии влияния углеводных модификаций на активность данного варианта PLA2 [6].

В то же время измерения активности полученных образцов, выполненные с использованием яичного желтка, в том числе с использованием различных концентраций кальция, показали практически полную неспособность PLA2 осуществлять гидролиз данного субстрата. К числу возможных причин такого результата может быть отнесена зависимость активности PLA2 от состава субстратной смеси, например, от присутствия в ее составе тритона X-100, не используемого при измерении активности на яичном желтке.

Полученный результат являлся критически важным, поскольку означал невозможность эффективного промышленного использования PLA2 для улучшения эмульгирующих свойств яичного желтка или для дегуммирования растительных масел, не допускающих применения тритона X-100. Становилась очевидной необходимость модификации фермента.

Исходя из заключения о том, что высокий уровень экспрессии текущего варианта PLA2 базировался на его низкой токсичности для клеток дрожжей, следовало ожидать, что модификации будут сопровождаться увеличением токсичности и, как следствие, снижением секреции. Поэтому в дальнейшем для оценки модифицированных



**Рис. 2.** Влияние лидерных последовательностей на секрецию и специфическую активность PLA2 в КЖ дрожжей, оцененную инструментальным методом (*a, b*) и с помощью чашечного теста (*c*). *a* – электрофореграмма образцов: М – маркеры молекулярной массы белков, К – отрицательный контроль, стрелками показаны негликозилированная (ng) и гликозилированные 1-кратно (1x) и 2-кратно (2x) изоформы PLA2; *b* – гистограмма относительных среднеарифметических значений активности PLA2 в КЖ дрожжей (за 100% принята активность PLA2 в образцах matHH). Стандартное отклонение показателей активности PLA2 в образцах *S. cerevisiae* не превышало 10%, а в образцах *K. kurtzmanii* – 25% относительно среднеарифметических значений.

**Fig. 2.** The influence of the leader sequences on the secretion and specific activity of PLA2 in the yeast cell culture fluid evaluated by instrumental method (*a, b*) and by plate test (*c*). *a* – electrophoregram of samples: M – markers of molecular weight of proteins, K – negative control, arrows show non-glycosylated (ng) and glycosylated 1-fold (1x) and 2-fold (2x) isoforms of PLA2; *b* – histogram of the relative arithmetic mean values of the activity of PLA2 in yeast (activity of PLA2 in samples matHH was taken as 100%). The standard deviation of indicators of activity of the PLA2 in the samples *S. cerevisiae* did not exceed 10%, and in *K. kurtzmanii* samples – 25% relative to arithmetic means.

вариантов PLA2 в качестве организма-хозяина использовались дрожжи *S. cerevisiae*, продемонстрировавшие более высокий базовый уровень секреции, а лидерным полипептидом служил наиболее эффективный вариант matHH.

**Инактивация сайтов N-гликозилирования. Оценка влияния углеводных модификаций на активность и секрецию PLA2**

Как уже говорилось, полученные результаты, в том числе [5], свидетельствовали об отсутствии влияния углеводных модификаций на активность

PLA2. В то же время эффект мог опосредоваться субстратом и затрагивать иные физико-химические свойства PLA2 (термостабильность, рН-оптимум и т.п.). Оставалось неизвестным, какие именно сайты в составе PLA2 подвергались углеводной модификации, а наличие трех гликоформ затрудняло оценку секреции и специфической активности целевого белка. Прояснение данных вопросов требовало целенаправленной инактивации сайтов N-гликозилирования и получения полностью негликозилированного варианта PLA2 (PLA2ng).

На основании данных рентгеноструктурного анализа [23] с целью инактивации отдельных потенциальных сайтов N-гликозилирования были сконструированы следующие мутантные варианты PLA2:

Инактивированный сайт

- PLA2(N29Q) и PLA2(S31A) .....N<sub>29</sub>QS(#1)
- PLA2(N80Q) и PLA2(S82A) .....N<sub>80</sub>KS(#2)
- PLA2(N108Q) .....N<sub>108</sub>ST(#3)

Мутантные гены были получены с использованием сайт-направленного ПЦР-опосредованного мутагенеза и экспрессированы в дрожжах *S. cerevisiae* и *K. kurtzmanii* аналогично базовому варианту PLA2. Секретция мутантных PLA2 направлялась лидером matНН. Результаты анализа секретции и оценки активности мутантных производных PLA2 в сравнении с исходным вариантом PLA2 (WT) показаны на рис. 3. На дорожки был нанесен суммарный белок из 5 мкл КЖ трансформантов *S. cerevisiae* и из 50 мкл КЖ трансформантов *K. kurtzmannii*.

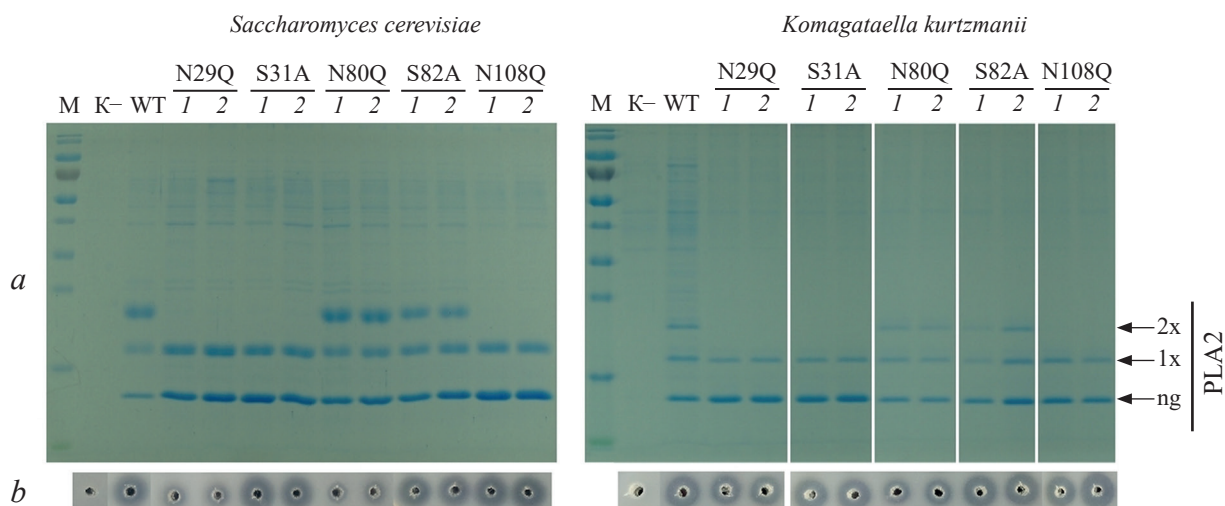
Как показали данные электрофореза (рис. 3a), профиль N-гликозилирования исходной немодифицированной PLA2 в дрожжах *S. cerevisiae* и *K. kurtzmanii* полностью совпадал: в обоих случаях очевидное изменение состава гликоформ вызывали мутации в сайтах N<sub>29</sub>QS(#1) и N<sub>108</sub>ST(#3), но не N<sub>80</sub>KS(#2). Это однозначно свидетельствовало

о том, что только сайты N<sub>29</sub>QS(#1) и N<sub>108</sub>ST(#3), но не N<sub>80</sub>KS(#2) подвергались мажорному N-гликозилированию в дрожжах *S. cerevisiae* и *K. Kurtzmanii*. В то же время глубокое контрастирование электронных фотографий полученных электрофореграмм свидетельствовало о возможности минорного гликозилирования сайта N<sub>80</sub>KS(#2).

Следует заметить, что, хотя ни одна из пяти сконструированных мутаций, в том числе вызвавших изменение профиля гликозилирования, практически не влияла на уровень секретции PLA2 в дрожжах *S. cerevisiae* и *K. Kurtzmanii* (рис. 3a), две из пяти замен (N29Q и N80Q) опосредовали заметное снижение специфической активности мутантных белков, при этом указанное снижение активности в меньшей степени проявлялось в образцах *K. kurtzmanii* по сравнению с образцами *S. cerevisiae* (рис. 3b).

Основываясь на полученных данных, в состав полностью негликозилируемого варианта PLA2ng были включены мутации во всех трех сайтах S31A, S82A, N108Q. Анализ экспрессии PLA2ng в дрожжах *S. cerevisiae* и *K. kurtzmanii* показал, что подобно одиночным мутантам тройной мутант PLA2ng не имел существенных особенностей в уровне экспрессии и специфической активности, в том числе на яичном желтке, по сравнению с исходным гликозилированным вариантом PLA2 (см. ниже).

Однако, при этом полностью негликозилируемый тройной мутант PLA2ng был более удобен



**Рис. 3.** Анализ секретции (a) и оценка активности (b) мутантных производных PLA2, содержащих инактивированные сайты N-гликозилирования (N29Q, S31A, N80Q, S82A, N108Q). 1, 2 – образцы КЖ от независимо полученных клонов соответствующих трансформантов. WT – исходный (немутантный) вариант PLA2. Остальные обозначения см. рис. 2

**Fig. 3.** Secretion analysis (a) and activity assessment (b) of mutant PLA2 derivatives containing inactivated N-glycosylation sites (N29Q, S31A, N80Q, S82A, N108Q). 1, 2 – samples of cell culture fluid from independently derived clones of the respective transformants. WT – original (non-mutant) variant of PLA2. Other designations see in Fig. 2.

для выполнения электрофоретического анализа производных PLA2 и оценки функциональной роли последующих модификаций.

#### Анализ замен S46T и L121(FG)

Исследования, результаты которых представлены в предыдущих разделах, касались анализа гликозилирования, секреции и активности низкоактивного и нетоксичного варианта PLA2, экспрессия которого в дрожжах была показана ранее [5]. Вместе с тем за рамками исследований оставался альтернативный высокоактивный вариант PLA2 [8], составляющий основу коммерческого ферментного препарата «PLA2 Nagase» (Nagase Corporation). Во избежание путаницы этот вариант был назван нами PLA22.

Согласно опубликованным данным [5, 8], PLA22 отличался от PLA2 двумя аминокислотными заменами S46T и L121(FG), локализованными в центральной и терминальной С-концевой частях белка, соответственно. При этом о потенциальном участии остатка треонина-46 в стабилизации активной конформации свидетельствовали результаты рентгеноструктурного анализа белка [23], а высокий консерватизм дипептида FG отмечался при сравнительном анализе последовательностей грибных PLA2 [24].

Для того чтобы уточнить функциональную роль каждой из указанных мутаций, были сконструированы и экспрессированы в дрожжах *S. cerevisiae* и *K. kurtzmanii* соответствующие производные PLA2, содержащие одиночные мутации S46T или L121(FG). В результате было показано, что замена остатка серина на остаток треонина в позиции 46 не оказывала влияния на секрецию и/или активность PLA2 в дрожжах (данные не приведены).

В то же время следствием замены L121(FG) в составе PLA2 (PLA22) стали многочисленные эффекты, в том числе и не относящиеся к секреции белка в дрожжах: 1) затруднения в получении трансформантов и наработке плазмидной ДНК в *E. Coli*; 2) снижение выхода трансформантов при использовании реципиентных штаммов дрожжей, допускающих «протекание» промотора; 3) лизис дрожжей, осуществляющих экспрессию фосфолипазы A2 (при практически недетектируемом уровне продукции белка). В последнем случае наличие клеточного лизиса не позволяло однозначно соотнести активность белка в КЖ с процессом его активной секреции. Совокупность перечисленных эффектов была интерпретирована как проявление чрезвычайно высокой токсичности ферментов, содержащих С-концевую замену

L121(FG), для клеток *E. coli* и дрожжей. На этом основании дальнейшая разработка дрожжевых продуцентов PLA22 (и PLA22ng) представлялась нецелесообразной.

Таким образом, с точки зрения получения и последующего использования дрожжевых продуцентов, варианты PLA2 и PLA22 не представляли интереса для последующей разработки, в связи с проявлением полярных несбалансированных свойств:

- варианты PLA2 и PLA2ng характеризовались высокой эффективностью секреции и низкой токсичностью, однако обладали низкой удельной активностью и были неспособны эффективно гидролизовать фосфолипиды яичного желтка;
- варианты PLA22 и PLA22ng являлись высокотоксичными ферментами и характеризовались крайне низким уровнем продукции в дрожжах.

Следующим шагом исследования стала попытка осуществить модификацию и получить оптимальный вариант PLA22, обладающий компромиссными характеристиками активности, токсичности и эффективности секреции.

#### Анализ секреции и активности модифицированных вариантов PLA2

В соответствии с заявленным направлением исследований, в число рассматриваемых вариантов были включены обратимые (действующие на этапе биосинтеза и секреции) и необратимые (постоянные) модификации PLA22. Образцами обратимых модификаций служили природные N- и/или С-концевые прообласти грибных PLA2 [24].

В частности, в числе модификаций PLA22 рассматривались процессируемые и непроцессируемые N- и С-концевые удлинения (N- и С-концевые прообласти), в том числе N-гликозилируемые, а также С-концевые замены FG=>YG и FG=>WG. В ряде случаев функцию прообластей опосредовали цельные белки, например сывороточный альбумин человека или варианты интеинов.

В качестве механизмов активации обратимо-модифицированных PLA22 были использованы следующие процессы: 1) внутри- или внеклеточный процессинг, в том числе под действием протеиназы клеточной стенки *Yps1 in vivo* или трипсина *in vitro*; 2) дегликозилирование *in vitro* с использованием дегликозидаз Endo F и PNGase F; 3) интеин-зависимый N- и С-концевой процессинг; 4) различные комбинации перечисленных процессов.

В результате проведенных исследований из числа N-концевых модификаций не было выявлено ни одного отвечающего запросу варианта. В то же время наилучшие перспективы обнаружили два варианта



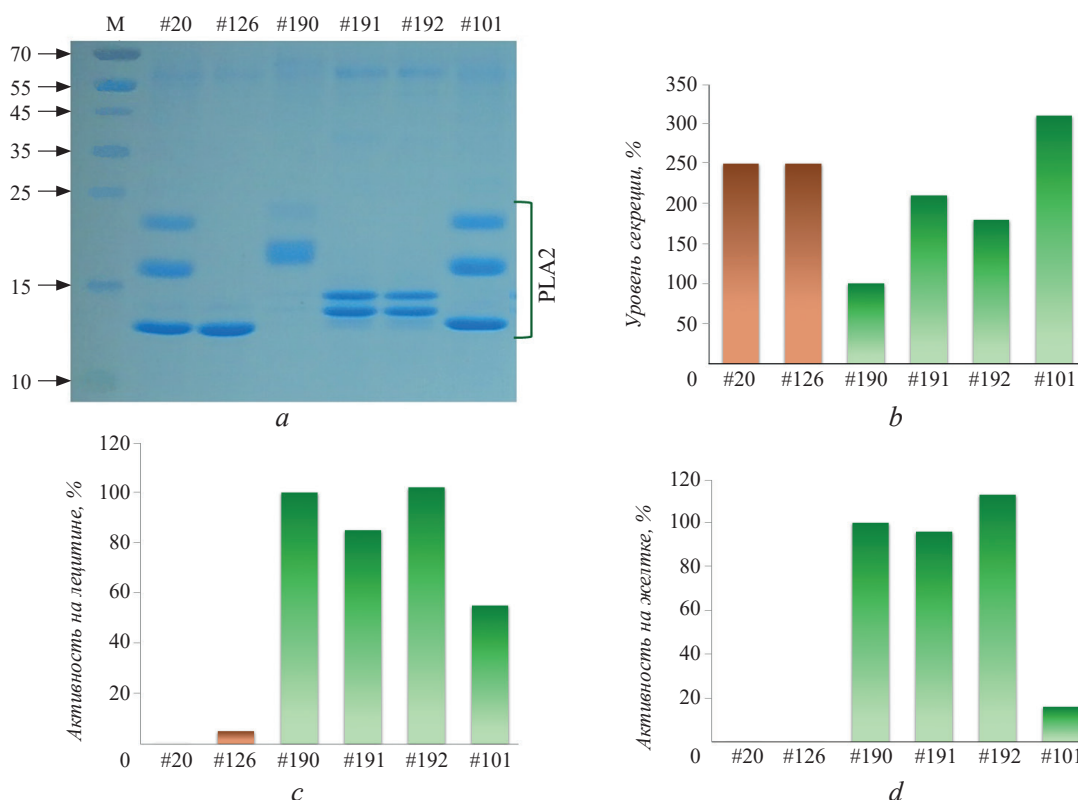
необратимых С-концевых модификаций: С-концевая замена FG=>YG и С-концевое удлинение 4 (С4-удлинение и PLA22[C4]) (рис. 4). Указанные модификации вводились в состав гликозилированной PLA22 и негликозилированной PLA22ng, и соответствующие гены экспрессировались в дрожжах *S. cerevisiae* аналогично предыдущим вариантам.

Как показали полученные результаты, уровень секреции модифицированных ферментов PLA22[YG], PLA22[C4], PLA22ng[C4] был чрезвычайно высок и практически не уступал низкоактивным вариантам (рис. 5а и 5б). В то же время их специфическая активность в 10–20 раз превышала показатели низкоактивных PLA2 и PLA2ng (рис. 5с).

PLA22 :           ...QAVKIFG-COOH  
 PLA22 [YG] :    ...QAVKI**YG**-COOH  
 PLA22 [C4] :    ...QAVKIFG**TRAIQDGLWWVEEGKRQKRLNYLLEKSL**-COOH

**Рис. 4.** Аминокислотные последовательности С-концевых областей исходного варианта PLA22 и двух наиболее перспективных модифицированных вариантов. Полу жирным шрифтом выделены С-концевые модификации

**Fig. 4.** Amino acid sequences of the C-terminal regions of the original version of PLA22 and the two most promising modified variants. C-terminal modifications are bold



**Рис. 5.** Характеристики модифицированных PLA2: а – электрофорез образцов КЖ, содержащих модифицированные PLA2, б – относительный уровень секреции, %, с – активность, измеренная в присутствии Тритона X-100, %, d – относительная активность, измеренная на яичном желтке с добавлением 10 мМ Са<sup>2+</sup>, %. На рисунках b, c и d за 100% были приняты соответствующие показатели варианта #190. Активность на яичном желтке относительно активности в стандартных условиях (присутствие Тритона X-100) не превышала 16%. М – маркер молекулярной массы белков. Производные низкоактивной PLA2 (коричневые столбики) [5]: #20 – PLA2 (исходный), #126 – PLA2ng. Производные высокоактивной PLA2 (зеленые столбики) [8]: #190 – PLA22[C4], #191 – PLA22ng[C4], #192 – PLA22ngT46S[C4], #101 – PLA22[YG]. Стандартные отклонения показателей активности и секреции производных PLA2 не превышали 15% относительно среднеарифметических значений

**Fig. 5.** The characteristics of the modified PLA2: a – electrophoresis of cell culture fluid samples containing modified PLA2; b – relative secretion level, %; c – activity measured in the presence of Triton X-100, %; d – relative activity measured on egg yolk with the addition of 10 mm Ca<sup>2+</sup>, %. In figures b, c and d, the corresponding values for variant #190 were taken as 100%. The activity on the egg yolk relative to the activity under standard conditions (the presence of Triton X-100) did not exceed 16%. M – marker of molecular weight of proteins. Derived low-level PLA2 (brown bars) [5]: #20 – PLA2 (native), #126 – PLA2ng. Derivatives of highly active PLA2 (green bars) [8]: #190 – PLA22[C4], #191 – PLA22ng[C4], #192 – PLA22ngT46S[C4], #101 – PLA22[YG]. Standard deviations of activity and secretion of PLA2 derivatives did not exceed 15% relative to the arithmetic mean values

Таким образом, в результате С-концевых модификаций сконструированные ферменты сохранили способность к эффективной секреции в дрожжах, и в то же время их специфическая активность возросла более, чем на порядок, вплотную приблизившись к показателю «PLA2 Nagase». Тем самым полученные модифицированные варианты, безусловно, приближались к заявленным целям разработки.

В то же время, будучи высокоактивными, модифицированные ферменты секретировались крайне эффективно и при этом не вызывали замедления роста клеток и заметного клеточного лизиса (рис. 5), т.е. проявляли себя подобно низкоактивным PLA2 и PLA2ng. Другим отличием от высокоактивной «PLA2 Nagase» являлась зависимость активности модифицированных ферментов от добавки экзогенного кальция. Так, например, при измерении на яичном желтке препарат «PLA2 Nagase» обнаруживал высокую активность даже в отсутствие добавок кальция, в то время как модифицированные PLA22[C4] и PLA22ng[C4], а также PLA2 и PLA2ng в этих условиях показывали строго нулевую активность. С другой стороны, в присутствии 10 мМ кальция на желтке наблюдалась мощная активация модифицированных PLA22[C4] и PLA22ng[C4] (до 20% от уровня активности в рН-титраторе), тогда как PLA2 и PLA2ng сохраняли прежнюю, практически нулевую активность, а PLA22[YG] активировалась крайне незначительно (рис. 5d).

Эти результаты указывали на существенные отличия высокоактивных модифицированных PLA22[C4] и PLA22ng[C4] от высокоактивной «PLA2 Nagase». В попытках прояснить природу этих отличий, было проведено сравнение констант диссоциации кальция  $K_D$  модифицированных ферментов и «PLA2 Nagase» (рис. 6).

В результате проведенных измерений значение  $K_D$  «PLA2 Nagase» составило 4,7 мМ, что соответствовало опубликованным величинам (4,5 мМ при 25 °С и 5,3 мМ при 35 °С) [8]. В то же время  $K_D$  модифицированных ферментов PLA22[C4], PLA22ng[C4] и PLA22[YG] оказался примерно в 2 раза выше: 10,2; 9,5 и 8,1, соответственно (рис. 6).

Анализ полученных данных позволил предположить, что в условиях конкуренции с клеточными фосфолипидами и фосфолипидами яичного желтка за связывание кальция снижение сродства могло опосредовать эффект вымывания кальция из активного центра модифицированных ферментов и, как следствие снижение их активности. В соответствии с альтернативной интерпретацией С-концевые модификации могли вызывать снижение активности ферментов за счет усиления их ингибирования продуктами реакции. Результатом любого из этих сценариев могло стать резкое снижение активности и токсичности модифицированных PLA22, что привело к значительному улучшению их секреции в дрожжах и одновременно к заметному ухудшению их

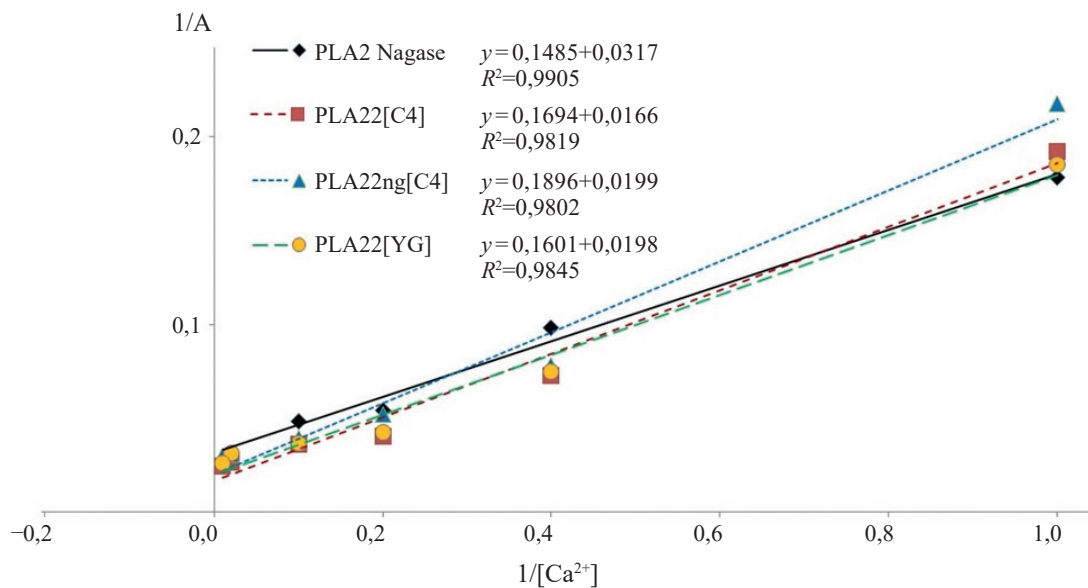


Рис. 6. Зависимость активности модифицированных вариантов PLA2 и «PLA2 Nagase» от концентрации ионов кальция. Зависимости представлены в обратных координатах  $1/A$  и  $1/[Ca^{2+}]$

Fig. 6. The dependence of the activity of modified versions of PLA2 and «PLA2 Nagase» on the concentration of calcium ions. The dependences are represented in the inverse coordinates  $1/A$  and  $1/[Ca^{2+}]$

потребительских характеристик. Выбор между этими двумя моделями требует проведения дополнительных исследований.

Тем не менее, полученные результаты свидетельствуют о том, что модифицированные ферменты обладают способностью к чрезвычайно эффективному биосинтезу в клетках дрожжей и к многократной активации ионами кальция, вносимыми в состав реакционных смесей. В этой связи, модифицированные PLA<sub>2</sub>, безусловно, могли бы использоваться в отраслях промышленности, допускающих создание условий для реализации их активности.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Настоящая работа была инициирована ООО «Инновационный центр «Бирюч – новые технологии». Выполнение работы было поддержано в рамках Государственного задания №595-00004-18 ПР.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бакланов К.В. Совершенствование технологии майонеза, *Масложировая промышленность*, 2008, 4, 34–36.
2. Plückthun, A., Dennis, E.A. Acyl and phosphoryl migration in lysophospholipids: importance in phospholipids synthesis and phospholipase activity, *Biochemistry*, 1982, 21, 1743–1750.
3. De Maria L., Vind J., Oxenbøll K. M., Svendsen A., Patkar S. Phospholipases and their industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 74, 290–300. doi: 10.1007/s00253-006-0775-x
4. Hoogevest P., Wendel A. The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2014, 116 (9), 1088–1107. doi: 10.1002/ejlt.201400219.
5. Liu A., Yu X.-W., Sha C., Xu Y. *Streptomyces violaceoruber* phospholipase A2: expression in *Pichia pastoris*, properties, and application in oil degumming. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2015, 175(6), 3195–3206. doi: 10.1007/s12010-015-1492-7
6. Cesarini S., Pastor F.I.J., Nielsen P.M., Diaz P. Moving towards a competitive fully enzymatic biodiesel process, 2015, *Sustainability*, 7(6), 7884–7903. doi: 10.3390/su7067884
7. Lefkowitz L.J., Deems R.A., Dennis E.A. Expression of Group IA Phospholipase A2 in *Pichia pastoris*: Identification of a Phosphatidylcholine Activator Site Using Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry*, 1999, 38, 14174–14184.
8. Sugiyama M., Ohtan K., Izuhara M., Koike T., Suzuki K., Imamura S., Misaki H. A Novel Prokaryotic Phospholipase A2. Characterization, gene cloning, and solution structure. *J. Biol. Chemistry*, 2002, 277(22), 20051–20058.
9. Naumov G.I., Naumova E.S., Tyurin O.V., Kozlov D.G. *Komagataella kurtzmanii* sp. nov., a new sibling species of *Komagataella (Pichia) pastoris* based on multigene sequence analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2013, 104, 339–347.
10. Kartasheva N.N., Kuchin S.V., Benevolensky S.V. Genetic aspects of carbon catabolite repression of the STA2 glucoamylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1996, 12, 1297–1300.
11. Gietz R.D., Schiestl R.H. Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc.*, 2007, 2 (1), 35–37. doi: 10.1038/nprot.2007.14
12. Патент РФ №2522479, 20.05.2014. Тюрин О.В., Козлов Д.Г., Чеперегин С.Э., Губайдуллин И.И., Ефремов Б.Д., Клебанов Ф.А. Применение штамма дрожжей *Komagataella pastoris* в качестве реципиента для конструирования продуцентов целевого белка. Заявка № 2013105753/10, 12.02.2013. Оpubл. 20.07.2014, бюл. №20. Истекает 12.02.2033.
13. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982, 545
14. Urban A., Neukirchen S., Jaeger K.E. A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(11), 2227–2228.
15. Patent RU №2460795, 10.09.2012. Kazachenko K.J., Kozlov D.G., Ezdakov I.N., Gubajdullin I.I., Cheperegin S.E., Efremov B.D. Method for microbiological synthesis of secreted human somatotropin and yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* – secreted human somatotropin producer. Application №2011127647/10, 06.07.2011. Date of publication: 10.09.2012, Bull. №25. Expires 06.07.2031.
16. Marchenko A.N., Kozlov D.G., Svirshchevskaya E.V., Viskova N.Y., Benevolensky S.V. The p1 Protein of the Yeast Transposon Ty1 Can Be Used for the Construction of Bi-Functional Virus-Like Particles. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, 5(2), 97–104.
17. Kozlov D. G., Yagudin T. A. Antibody fragments may be incorrectly processed in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 2008, 30, 1661–1663. doi: 10.1007/s10529-008-9739-9
18. Graber J.H., Cantor C.R., Mohr S.C., Smith T.F. Genomic detection of new yeast pre-mRNA 3-end-processing signals. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(3), 888–894.
19. van Helden J., del Olmo M., Pérez-Ortín J.E. Statistical analysis of yeast genomic downstream sequences reveals putative polyadenylation signals. *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28(4), 1000–1010.
20. Akashi H. Translational selection and yeast proteome evolution. *Genetics*, 2003, 164(4), 1291–1303.
21. Welch M., Govindarajan S., Ness J.E., et al. Design parameters to control synthetic gene expression in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 2009, 4(9), e7002. doi: 10.1371/journal.pone.0007002
22. Tyurin O.V., Gubaydullin I.I., Cheperegin S.E., et al. Amplification of leader proregions as a mean to increase the secretion of antibody fragments in the *Pichia pastoris* yeast. *Biotechnologiya*, 2012, (3), 48–52.

23. Matoba Y., Katsube Y., Sugiyama M. The crystal structure of prokaryotic phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biological Chemistry*, 2002, 277 (22), 20059–20069.
24. Patent WO/2004/097012, 11.11.2004. Stringer M.A., Fatum T.M., Patkar S.A. Phospholipase and method of producing it. Application PCT/DK2004/000279, 23.04.2004. Date of publication: 10.09.2012

## Highly Active Modified Variants of Recombinant Phospholipase A<sub>2</sub> from *Streptomyces violaceoruber* for Effective Biosynthesis in Yeasts

S.E. CHEPEREGIN<sup>1</sup>, E.P. SANNIKOVA<sup>1</sup>, A.V. MALYSHEVA<sup>1</sup>, F.A. KLEBANOV<sup>1</sup>, D.G. KOZLOV<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center «Kurchatov Institute» (NRC «Kurchatov Institute» - GOSNIIGENETIKA), 117545, Moscow Russia

\*e-mail: dg\_kozlov@genetika.ru

Received December 11, 2018

Revised February 22, 2019

Accepted April 30, 2019

**Abstract**—The capacity of yeast to produce the highly active variants of PLA<sub>2</sub> has been confirmed. The high-active variants were based on the original enzyme from the strain A-2688 of *Streptomyces violaceoruber*. To reduce the enzyme toxicity and to increase its expression, various approaches were tested including point mutations, construction of artificial N- and/or C-end pro-regions, hybridization with other proteins and engineering or inactivation of glycosylation sites. As a main result, the modified PLA<sub>2</sub> enzymes were obtained which have the same secretion level as their low-active predecessors, but specific activity of which was at least tenfold higher. As the main feature, the selected mutants were characterized by a lower affinity for Ca<sup>2+</sup> that probably accounts for their low toxicity (and high expression capacity) at the stage of biosynthesis and their ability to activate under special conditions, e.g. during the egg yolk fermentation. The data obtained can provide a basis for the cost reduction of highly active PLA<sub>2</sub> enzyme preparations in industries where the application of high calcium concentrations is allowed.

**Key words:** recombinant phospholipase A<sub>2</sub>, *Streptomyces violaceoruber*, yeasts, secretion, producer strain

**Funding**—The work was initiated by the Innovation Center Biriuch –New Technologies, Ltd., and was supported within the framework of the State Assignment no. 595-00004-18 PR.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-3-30-41