

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 602.3; 602,6; 604,6

Оптимизация экспрессии гена 1,3-1,4-β-глюканазы *Rhizomucor miehei* в дрожжах *Komagataella kurtzmanii*© 2019 А.Ю. МАТВЕЕВА¹, И.И. ГУБАЙДУЛЛИН¹, А.С. ФЕДОРОВ¹, Д.Г. КОЗЛОВ^{1,*}¹ФГБУ 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 04.09.2019 г.

После доработки 12.09.2019 г.

Принята к публикации 23.09.2019 г.

Проведена оптимизация ключевых функциональных элементов вектора (промоторной, лидерной и терминаторной областей), обеспечивающих экспрессию целевого гена 1,3-1,4-β-глюканазы *Rhizomucor miehei* в дрожжах *Komagataella kurtzmanii*. Показано, что в составе вектора в клетках реципиентного штамма *K. kurtzmanii* Y727his4 промоторные области гена *AOX1* дрожжей *Komagataella pfaffii* (бывш. *Pichia pastoris*) и *K. kurtzmanii* обеспечивали равный уровень экспрессии целевого гена, т.е. оказались полностью взаимозаменяемыми. Это означает, что генетические конструкции, ранее разработанные для биосинтеза рекомбинантных белков в *K. pfaffii*, будут обеспечивать эффективную экспрессию и в дрожжах *K. kurtzmanii*. Среди пяти проанализированных лидерных последовательностей статус наиболее высокоэффективных элементов подтвердили лидерный пептид MF4I, использованный в работе в виде варианта mif4I, содержавшего одну аминокислотную замену, а также лидерный пептид maxHH, содержавший удвоенную про-область белка Hsp150 дрожжей *S.cerevisiae*. Их эффективность в 1,7 раза превысила показатель стандартной лидерной области альфа-фактора дрожжей и на 20% – показатели второй группы искусственных лидеров. В то же время, как было установлено, среди всех функциональных элементов вектора наиболее сильное влияние на экспрессию целевого гена оказал выбор терминаторной области. При этом лучшими терминаторными элементами оказались производные области терминации транскрипции гена *AOX1*, а разница в уровне экспрессии целевого гена с использованием разных терминаторов составила примерно 4,5 раза. На основании анализа полученных данных был экспериментально определен оптимальный состав ключевых функциональных элементов вектора экспрессии, включавший промоторную и терминаторную области гена *AOX1* дрожжей, а также один из вариантов искусственных лидеров mif4I или maxHH.

Ключевые слова: β-глюканаза, *Komagataella kurtzmanii*, дрожжи, секреция, штамм-продуцент

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-3-11

В настоящее время *Komagataella pfaffii* (бывш. *Pichia pastoris* [1]) приобрела статус одной из наиболее эффективных и продвинутых эукариотических систем экспрессии генов [2–5]. Множество разнообразных белковых препаратов были произведены с использованием *K. pfaffii* [6, 7]. Ряд из них был коммерциализован, получив разрешение для медицинского использования (<https://pichia.com/science-center/commercialized-products/>).

Интерес к биотехнологическому использованию *K. pfaffii* способствовал увеличению таксономических исследований дрожжей различных видов рода *Komagataella* и росту числа новых природных штаммов, пригодных для разработки экспрессионных систем [1, 8–10]. В частности, в ходе таких исследований был выявлен новый вид дрожжей *Komagataella kurtzmanii* [8, 9], родственный *K. pfaffii*, на базе которого была разработана

Список сокращений: Bgl3 – 1,3-1,4-β-глюканаза *Rhizomucor miehei*; КЖ – культуральная жидкость

оригинальная система экспрессии генов [11, 12]. Поскольку разработанная система *K. kurtzmanii* зарекомендовала себя как конкурентоспособная, и в отдельных случаях превосходящая возможности *P. pastoris* [11], интерес к ее использованию стимулировал исследования, нацеленные на оптимизацию ее отдельных конструктивных элементов.

На сегодняшний день следующие классические элементы векторов экспрессии являются составной частью метанол-индуцируемой системы экспрессии генов для секретиции в дрожжах *K. pfaffii*: 1) промотор гена *AOX1*, отвечающий за организацию транскрипции целевых генов; 2) лидерная пре-прообласть альфа-фактора дрожжей *S. cerevisiae*, отвечающая за направление целевых белков по секреторному пути клеток; 3) область терминации транскрипции гена *AOX1* (*aoxT*), отвечающая за корректное полиаденилирование и стабильность мРНК целевого гена.

Настоящее исследование посвящено оптимизации каждого из трех элементов вектора экспрессии, разработанного для использования в дрожжах *K. kurtzmanii* [11].

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Целевым (и одновременно репортерным) белком в исследовании служила 1,3-1,4-β-глюканазы *Rhizomucor miehei* [13–15], названная *Bgl3*. Интерес к биосинтезу *Bgl3* в дрожжах *K. kurtzmanii* был связан с физико-химическими свойствами этого фермента [13–15], определяющими высокий потенциал его промышленного использования [13, 16]

Базовым вектором экспрессии служил *pRH93-AOX1_{Y727}* [11]. Вектор экспрессии, содержащий клонированный ген белка *Bgl3*, был назван *pRH727-AOX727*. Схематически структура базового вектора экспрессии *pRH727-AOX727*, использованного для интеграции целевых генов в геном реципиентного штамма дрожжей, приведена на рис. 1. Анализ экспрессии гена белка *Bgl3* проводили в клетках реципиентного штамма дрожжей *K. kurtzmanii* *Y727his4* [11].

Нуклеотидная последовательность синтетического фрагмента ДНК, кодирующая белок *Bgl3*, приведена на рис. S1 (Дополнительный материал).

Фрагменты ДНК, кодирующие альтернативные структурные элементы вектора экспрессии *pRH727-AOX727*, получали с помощью ПЦР. Матрицами для амплификации соответствующих нуклеотидных последовательностей служила геномная ДНК штамма ВКПМ *Y-727*.

Использование в качестве матрицы ДНК плазмиды *pRIC9* (Invitrogen) обеспечило получение элемента *pAOX115*. Последовательности праймеров, использованных для ПЦР, приведены в табл. 1

Амплификацию плазмид осуществляли в клетках штамма *E. coli* Top10 (Invitrogen).

Трансформацию клеток реципиентного штамма дрожжей *Y727his4* осуществляли согласно описанной в работе [11].

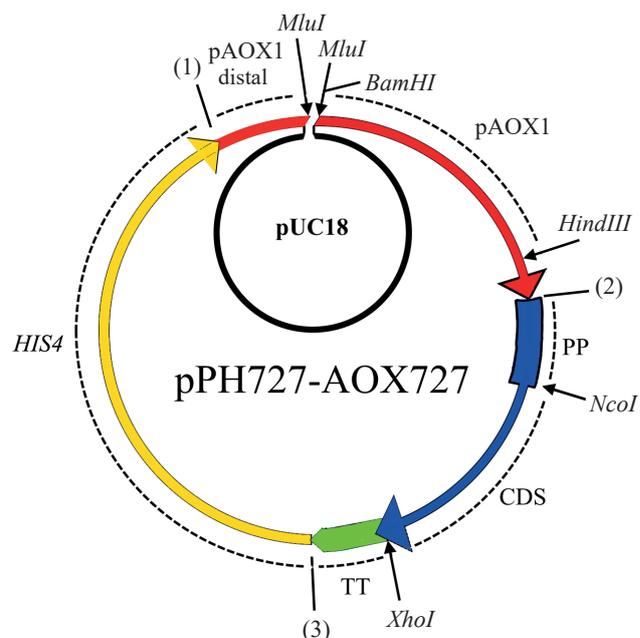


Рис. 1. Карта вектора *pRH727-AOX727* с фрагментами ДНК. *pAOX1 distal* – дистальная часть промотора *AOX1*; *AOX1* (*pAOX1*) – основная часть промотора; *PP*, *CDS* – последовательности лидерной области (*artHH*) и структурного гена целевого белка *Bgl3*, соответственно; *TT* – область терминации транскрипции целевого гена; ген *HIS4* *K. Kurtzmanii* – селективный маркер при отборе дрожжевых трансформантов; *pUC18* – последовательность бактериальной плазмиды, обеспечивающей репликацию вектора в клетках *E. coli* и устойчивость плазмидосодержащих клеток к антибиотику ампициллину. Локализация некоторых сайтов рестрикции (*MluI*, *BamHI*, *HindIII*, *NcoI*, *XhoI*). (1–3) – сайты лигирования *BamHI/BglII*

Fig. 1. Map of vector *pRH727-AOX727*. The map illustrates the following DNA fragments: distal part of the promoter *AOX1* (*pAOX1 distal*); the main part of the promoter *AOX1* (*pAOX1*); sequences of leader region (*RR*) and structural gene (*CDS*) for *Bgl3* protein; region of transcription termination of the target gene (*TT*); *HIS4* gene of *K. kurtzmanii*, which served as a selective marker for selection of yeast transformants; the sequence of bacterial plasmid *pUC18*, providing replication of the vector in *E. coli* cells and resistance of plasmids containing cells to the antibiotic ampicillin. The map also shows the localization of some restriction sites (*MluI*, *BamHI*, *HindIII*, *NcoI*, *XhoI*). Numbers show *BamHI/BglII* ligation sites

Последовательности праймеров, использованных для ПЦР-амплификации функциональных элементов вектора pRH727

Primer sequences used for PCR amplification of the pRH727 vectors functional elements

Праймер	Первичная последовательность (5'→3')
N629**	aaggtaccagatctagccatggttgatcctcgaataattagtggtttttgatcttctcaa
N666**	atatacgcgattggatcccgcctcattccaattccttcta
N699	cctgctcgagccagtttgctgtccaaa
N700	gaaatattggtgtgggaaccaagcgagaga
gapT-dir	taactcgagttgatgtgaaatagctgaaa
gapT-rev	gtcgacgagtgaaagcctggttaga
aoxT2-dir	ctcgagaaaagagaggctgaagctggccgcgaatt
aoxT2-rev	gtcgaccgtacgagaagaacaaaatga
aoxT3-dir	atatctcgagtaataagaggatgtagaattg

Трансформанты культивировали в течение 72 ч на ротационном шейкере со скоростью 300 об./мин при температуре 29 °С. Для культивирования использовали среду YPgM следующего состава, %: дрожжевой экстракт – 1 (BioSpringer, 0207), пептон соевый – 2 (Amresco, P140), глицерин – 0,5 (Panreac), метанол – 1 (метанол ГОСТ 2222-95 вносили в среду при засеве дрожжей и далее с периодичностью каждые 24 ч до конечной концентрации 1%).

Электрофорез образцов культуральной жидкости (КЖ) дрожжей, содержащих Bgl3, проводили, как было описано ранее [17].

Активность Bgl3 измеряли, как описано [18]. Измерения проводили в 0,1М натрий-ацетатном буфере pH 4,7 при температуре 42 °С. Реакционная смесь содержала 2 объема 1%-ного раствора β-глюкана ячменя (Megazame, США) и 1 объем образца КЖ дрожжей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**Выбор альтернативных функциональных элементов вектора экспрессии**

Вектор экспрессии содержал в своем составе промоторную область гена *AOX1* штамма ВКПМ Y-727 (pAOX727), слитую с последовательностью ДНК, кодирующей репортерный белок Bgl3, секрецию которого направляла лидерная область artHH (см. рис. 1).

Особенностью вектора являлась интеграция в геном дрожжей без бактериальной части. С этой целью последовательность бактериальной плазмиды pUC18 [19], отвечающая за амплификацию вектора в клетках *E. coli*, была размещена в составе вектора в виде инсерции в сайте узнавания рестриктазы *MluI* (бывш. сайт *SacI*), локализован-

ном в дистальной области промотора гена *AOX1*. Обработка векторной ДНК рестриктазой *MluI* непосредственно перед трансформацией обеспечивала удаление бактериальной ДНК и направляла интеграцию вектора в локус промотора гена *AOX1* генома дрожжей.

Промоторные элементы

Фрагмент ДНК, содержащий промоторный элемент pAOX115, амплифицировали с использованием праймеров N666 и N629 (табл. 1). Амплифицированный *BamHI/HindIII* фрагмент ДНК был использован для замещения аналогичного фрагмента ДНК в векторе pRH727-AOX727 (см. рис.1). В результате замещения был получен вектор pRH727-AOX115.

Векторы pRH727-AOX727 и pRH727-AOX115 использовали для сравнительного анализа эффективности промоторных элементов гена *AOX1* дрожжей *P. pastoris* (pAOX115) и *K. kurtzmanii* (pAOX727).

Терминаторные элементы

Недавно были опубликованы результаты масштабного исследования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, обнаружившего высокую зависимость стабильности мРНК и уровня экспрессии генов от области терминации транскрипции [20]. В этой связи представлялось целесообразным исследовать потенциальный эффект терминаторов транскрипции в клетках *K. kurtzmanii*.

С другой стороны, часто в составе векторов экспрессии используются области терминации транскрипции целевых генов в виде фрагментов ДНК, имеющих избыточный размер. В частности, это справедливо для вектора pPIC9 (Invitrogen),

служившего прототипом вектора рРН727. В этой связи в настоящей работе оптимизация терминального элемента вектора включала не только исследование сравнительной эффективности разных областей, но и минимизацию их размера. С этой целью в исследовании были использованы потенциально бифункциональные элементы hisP и garT, содержащие в своем составе помимо целевой терминальной области одного гена также промоторную область другого, находящегося рядом гена, а также были получены и исследованы укороченные варианты терминальной области aoxT2 и aoxT3.

В частности, при конструировании базового вектора рРН727 (рис. 1) в результате амплификации с использованием праймеров N699 и N700 в состав промоторной области гена *HIS4* был включен фрагмент ДНК, содержащий область терминации транскрипции хромосомного гена *PAS_chr1-4_0159*, расположенного в геноме дрожжей перед *HIS4* (GenBank). Такой вариант промоторной области гена *HIS4* был назван hisP и в составе вектора рРН727-АОХ727 он использовался одновременно и для организации транскрипции гена *HIS4*, и для терминации транскрипции целевого гена (рис. 1).

Аналогичную структуру имел фрагмент ДНК, кодирующий терминальный элемент garT гена *GAP* дрожжей *K. kurtzmanii*, амплифицированный с использованием праймеров garT-dir и garT-rev (табл. 1). Этот элемент также относился к бифункциональным, и помимо терминатора транскрипции гена *GAP*, он содержал в своем составе промоторную область хромосомного гена *PAS_chr2-1_0436* (GenBank), которая в результате клонирования в вектор рРН727-АОХ727 могла направлять экспрессию гена *HIS4*.

Фрагмент ДНК, названный aoxT2, содержал в своем составе терминальную область гена *AOX1*, локализованную между встречно направленными генами *AOX1* и *PAS_chr4_0820* (GenBank) дрожжей *K. kurtzmanii*. Фрагмент aoxT2 был получен путем амплификации с использованием праймеров aoxT2-dir и aoxT2-rev (см. табл. 1). Особенностью терминальной области aoxT2 являлось присутствие в ее составе 3'-концевой части структурного гена *AOX1*. Сходной структурной организацией обладал соответствующий терминальный элемент в составе коммерческого вектора рPIC9 (Invitrogen), хотя он был несколько большего размера.

В составе фрагмента ДНК, полученного путем амплификации с использованием праймеров aoxT3-dir и aoxT2-rev (см. табл. 1) и названного aoxT3, содержалась укороченная терминальная

область гена *AOX1* дрожжей *K. kurtzmanii*. Она отличалась от aoxT2 отсутствием 3'-концевой части структурного гена *AOX1*.

Амплифицированные последовательности, содержавшие в своем составе терминальные области garT, aoxT2 и aoxT3, были клонированы в виде *XhoI/SalI*-фрагментов ДНК в сайт *XhoI* вектора рРН727-АОХ727. В результате клонирования были получены векторы рРН727-garT, рРН727-aoxT2 и рРН727-aoxT3.

Лидерные области

В дополнение к стандартной лидерной области альфа-фактора дрожжей *S. cerevisiae*, называемой preF, в настоящей работе использовали лидерную область artHH, содержащую искусственный сигнальный пептид preA [21], слитый с удвоенной про-областью proHsp150sc [22].

Также синтезировали последовательность ДНК, кодирующую лидерную область, названную mif4I, 97 из 98 аминокислотных остатков которой были идентичны остаткам известной лидерной области MF4I – одной из наиболее эффективных в дрожжах *Pichia* [23, 24]. В качестве производной последовательности ДНК, кодирующей лидерную область mif4I, сконструировали последовательность ДНК, кодирующую лидерную область maxF4, отличающуюся от mif4I заменой трех аминокислотных остатков из 98, а также выбором кодонов (codon bias). Первичные последовательности ДНК и кодируемые ими аминокислотные последовательности лидеров mif4I, preF и maxF4 приведены на рис. 2.

Последовательность ДНК, кодирующая гибридную пре-прообласть maxHH, была получена путем генетической рекомбинации между последовательностями ДНК, кодирующими лидеры maxF4 и artHH. Рекомбинация была проведена с использованием уникального внутреннего сайта узнавания рестриктазы *PstI*. Гибридная лидерная область maxHH содержала сигнальный пептид max и удвоенную прообласть proHsp150sc.

В составе векторов серии рРН727 замена последовательностей ДНК, кодирующих различные лидерные области, производилась путем рекомбинации по сайту узнавания рестриктазы *NcoI* (см. рис. 1).

Сравнительный анализ эффективности альтернативных элементов вектора экспрессии

Отражением активности отдельных элементов и системы экспрессии в целом в настоящей работе служил уровень экспрессии гена репортерного

и количественного определения уровня экспрессии гена целевого белка Bgl3. Результаты обработки полученных данных приведены на рис. 3.

На рис. 4 показаны результаты выборочного электрофоретического анализа образцов КЖ, которые хорошо согласуются с результатами, представленными на рис. 3. Для культивирования выбирали по три случайных трансформанта каждого штамма.

Как показали полученные результаты, в зависимости от выбора функциональных элементов вектора уровень экспрессии целевого гена Bgl3 различался почти в 7 раз (см. рис. 3). При этом большинству исследованных элементов соответствовали показатели, находившиеся в нижней части спектра активности системы, то есть далеко от границы потенциальной области нелинейности (см. рис. 3). Это обеспечивало корректность заключений о сравнительной эффективности отдельных элементов вектора экспрессии, сделанных на основе анализа полученных данных.

Согласно полученным данным промотеры pAOX115 и pAOX727 обеспечивали одинаковую эффективность экспрессии целевого гена (см. рис. 3). При этом, как известно, промотеры различались между собой несколькими нуклеотидными заменами [http://www.genetika.ru/aaa%20Ucheniy%20Sovet/2014/Tyurin/2014_04_Tyurin_fulltext.pdf]. Две из них (Т=>А в положении -622 и G=>А в положении -843 относительно стартового кодона АТГ) локализовались в последовательностях ключевых сайтов промотера гена *AOX1*, участвующих в связывании регуляторного белка Mxl1p [25]. В этой связи, данные о равной активности промоторов pAOX115 и pAOX727 в клетках штамма Y727 *K. kurtzmanii*, свидетельствовавшие о нейтральном статусе выявленных нуклеотидных замен, противоречили представлениям о функциональной роли указанных сайтов. Тем не менее, они однозначно свидетельствовали о взаимозаменяемости промоторов AOX115 и AOX727 и гарантировали высокую

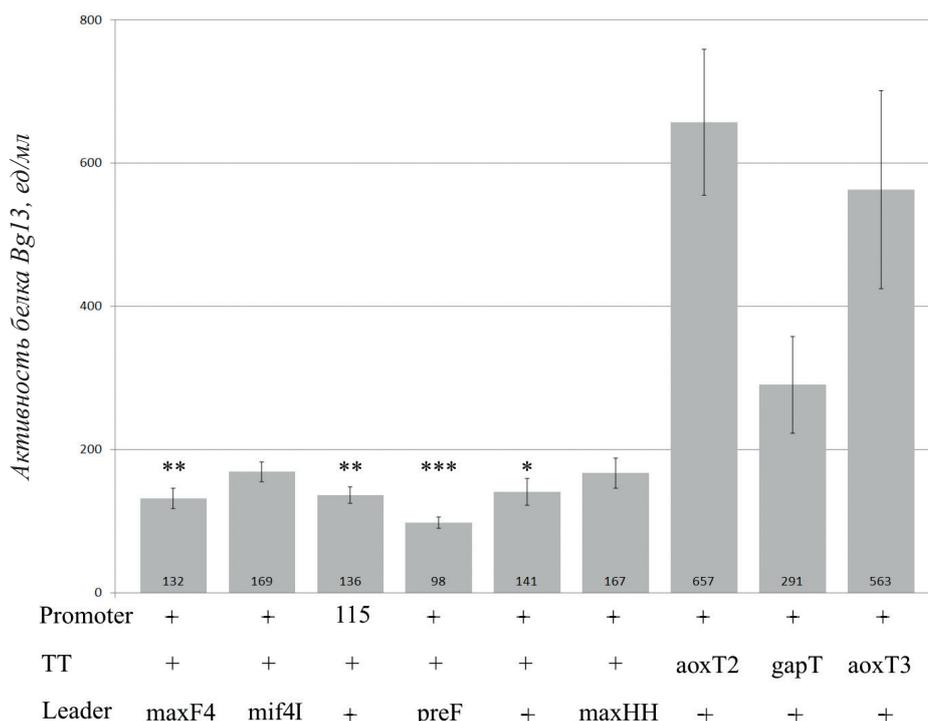


Рис. 3. Активность репортерного белка Bgl3 в КЖ дрожжей в зависимости от выбора функциональных элементов вектора. Средние величины измеренных значений активности Bgl3 приведены у основания столбцов гистограммы. Показаны среднеквадратичные отклонения результатов измерения активности. Promoter – промоторные области (+ (pAOX727), 115 (pAOX115)); TT – терминаторные области (+ (hisP); Leader – лидерные области (+ (artHH)). Статистически значимая разница в активности лидера mif4I и других лидеров: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Fig. 3. Activity of Bgl3 reporter protein in yeast culture liquid, depending on the choice of functional elements of the expression vector. The average values of the Bgl3 activity are given at the base of the histogram columns. Standard deviations of activity measurement results are shown. The legend of the functional elements is following – the promoter region (Promoter): + (pAOX727), 115 (pAOX115); + (hisP) terminator region (TT); + (artHH) – leader region (Leader). The results of the evaluation of the statistical significance of the difference in the activity of the leader mif4I and other leaders (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) are shown

эффективность экспрессии конструкций, разработанных для *K. pfaaffii*, в клетках штамма Y727 *K. kurtzmanii*.

Сравнительный анализ лидерных элементов показал (см. рис. 3), что наиболее эффективными из них были mif4I, практически идентичный известному высокоэффективному лидеру MF4I [23, 24], и maxНН, содержащий удвоенную про-область proHsp150sc [22]. Оба лидера обеспечили одинаково высокий уровень секреции целевого белка Bgl3, который в 1,7 раза превосходил показатель стандартного лидера prfF (см. рис. 3). По сравнению со стандартным лидером высокую активность показали и два других искусственных лидера artНН и maxF4, родственных maxНН и mif4I, соответственно. Их эффективность лишь на 20% уступала показателям лучших лидеров и при этом достоверно превосходила эффективность стандартного лидера prfF (см. рис. 3). Тем самым полученные результаты подтвердили пра-

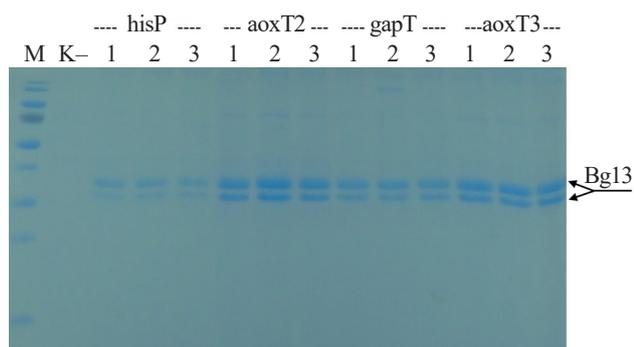


Рис. 4. Электрофоретический анализ образцов КЖ, полученных в результате культивирования штаммов дрожжей *K. kurtzmanii*, различающихся областью терминации транскрипции гена Bgl3 в составе вектора экспрессии. Над дорожками указаны три трансформанта (1–3) каждого использованного терминатора. Показано положение двух форм целевого белка Bgl3 различающихся, вероятно, уровнем гликозилирования. Маркерами молекулярного веса (М) служили предокрашенные белки (Pierce-26616). На дорожки наносили образцы, содержавшие 5 мкл КЖ. Отрицательным контролем (К-) служил реципиентный штамм *K. kurtzmanii*

Fig. 4. Electrophoretic analysis of culture liquid samples. Culture liquids were obtained by cultivation of yeast strains *K. kurtzmanii*, differing in the transcription termination region of the Bgl3 gene used in the expression vector. 3 random transformants of each strain were selected for cultivation. The name of the terminators is given above the lanes. The position of two forms of Bgl3 target protein (differing, probably, by the level of glycosylation) is shown. The molecular weight markers are prestained proteins (Pierce-26616). Samples containing 5 μ L of culture liquid were applied to the tracks. Recipient strain of *K. kurtzmanii* was used as negative control (K-)

вильность решений, взятых за основу при конструировании искусственных лидеров [23, 22].

Несмотря на высокий интерес к результатам сравнения активности промоторов и различных лидеров, наибольшее удивление вызвали данные, показавшие значительное влияние областей терминации транскрипции на эффективность экспрессии целевого гена. (см. рис. 3). Ранее похожий эффект был обнаружен в дрожжах *S. cerevisiae* и был связан с влиянием областей терминации транскрипции на стабильность мРНК целевого гена [20]. Очевидно, обнаруженный эффект может трактоваться в терминах позитивного (стабилизация) или негативного (дестабилизация) влияния терминаторов на стабильность мРНК и уровень экспрессии целевого гена. Принимая за основу первую интерпретацию, можно говорить о том, что область hisP обладала наихудшими терминаторными свойствами, область gapT обеспечила умеренное повышение активности, а наиболее эффективными оказались производные области терминации транскрипции гена *AOX1* – варианты aoxT2 и aoxT3 (см. рис. 3). При этом терминатор aoxT2 был эффективнее терминатора hisP в 4,5 раза.

Таким образом, проведенное исследование позволило экспериментально установить оптимальный набор функциональных элементов вектора экспрессии pRH727, обеспечивающий наибольшую эффективность экспрессии и секреции гена целевого белка Bgl3 в дрожжах *K. kurtzmanii*, включающий: промоторную и терминаторную области гена *AOX1* дрожжей *K. kurtzmanii*, а также искусственную лидерную область mif4I или maxНН. Причем наиболее весомый вклад в достижение максимального уровня экспрессии обеспечил именно терминаторный элемент (aoxT2).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI60717X0179) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

Дополнительный материал

Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте журнала <http://www.biotechnology-journal.ru>

ЛИТЕРАТУРА

1. Kurtzman C.P. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 36, 1435–1438. doi: 10.1007/s10295-009-0638-4
2. Gasser B., Prielhofer R., Marx H., et al. *Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research. *Future Microbiol.*, 2013, 8(2), 191–208. doi: 10.2217/fmb.12.133.v
3. Ahmad M., Hirz M., Pichler H., Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98, 5301–5317. doi: 10.1007/s00253-014-5732-5
4. Zahrl R.J., Peña D.A., Mattanovich D., Gasser B. Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res.*, 2017, 17(7), fox068. doi: 10.1093/femsyr/fox068
5. Peña D.A., Gasser B., Zanghellini J., et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metabolic Engineering*, 2018, 50, 2–15. doi: 10.1016/j.ymben.2018.04.017
6. Rabert C., Weinacker D., Pessoa A. Jr, Fariás J.G. Recombinant proteins for industrial uses: utilization of *Pichia pastoris* expression system. *Brazilian J. Microbiology*, 2013, 44(2), 351–356. doi: 10.1590/S1517-83822013005000041
7. Juturu V., Wu J.C. Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: latest research progress and applications. *Chembiochem.*, 2018, 19(1), 7–21. doi: 10.1002/cbic.201700460.
8. 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. doi: 10.1007/s10482-013-9956-7
9. Naumov G.I., Kondratieva V.I., Meshcheryakova E.V., Naumova E.S. Taxonomic genetics of methylotrophic yeast genus *Komagataella*: new biological species *K. kurtzmanii*. *Genetika*, 2016, 52(4), 431–435.
10. Naumov G.I., Naumova E.S., Boundy-Mills K.L. Description of *Komagataella mondaviorum* sp. nov., a new sibling species of *Komagataella (Pichia) pastoris*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2018, 111(7), 1197–1207. doi: 10.1007/s10482-018-1028-6.
11. 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. Опубл. 20.07.2014, бюл. №20. Истекает 12.02.2033.
12. Tyurin O., Gubaidullin I., Cheperegin S., et al. The new expression system based on a novel yeast species of the genus *Komagataella*. 2013a, 38-th FEBS Congress, Saint-Petersburg, Russia, July 6-11, p.256. doi: 10.1111/febs.12340
13. Boyce A., Walsh G. Production, purification and application-relevant characterisation of an endo-1,3(4)- β -glucanase from *Rhizomucor miehei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 76, 835–841. doi: 10.1007/s00253-007-1058-x
14. Tang Y., Yang S., Yan Q., Zhou P., Cui J., Jiang Z. Purification and characterization of a novel β -1,3-1,4-glucanase (lichenase) from thermophilic *Rhizomucor miehei* with high specific activity and its gene sequence. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60, 2354–2361. doi: 10.1021/jf2049799
15. Yang S.Q., Xiong H., Yang H.Y., et al. High-level production of β -1,3-1,4-glucanase by *Rhizomucor miehei* under solid-state fermentation and its potential application in the brewing industry. *J. Appl. Microbiol.*, 2014, 118, 84–91. doi: 10.1111/jam.12694
16. Chaari F., Chaabouni S.E. Fungal β -1,3-1,4-glucanases: Production, properties and biotechnological applications. *J. Sci. Food Agric.*, 2019, 99(6), 2657–2664. doi: 10.1002/jsfa.9491.
17. Чеперегин С.Э., Санникова Е.П., Малышева А.В. и др. Высокоактивные модифицированные варианты рекомбинантной фосфолипазы A2 *Streptomyces violaceoruber* для эффективного биосинтеза в дрожжах. *Биотехнология*, 2019, 35(3), 30–41. doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-3-30-41
18. Miller G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3), 426–428.
19. Yanish-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 1985, 33, 568–572.
20. Curran K.A., Karim A.S., Gupta A., Alper H.S. Use of expression-enhancing terminators in *Saccharomyces cerevisiae* to increase mRNA half-life and improve gene expression control for metabolic engineering applications. *Metab. Eng.*, 2013, 19, 88–97. doi: 10.1016/j.ymben.2013.07.001.
21. Kazachenko K. Yu., Efremov B. D., Kozlov D. G. Activities of elements of the yeast α -factor precursor leader at different stages of somatropin secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2014, 50(9), 829–834. doi: 10.1134/S000368381409004X.
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. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2013b, 49(7), pp 656–659. doi: 10.1134/S0003683813070065.
23. Xiong A.S., Yao Q.H., Peng R.H. High level expression of a synthetic gene encoding *Peniophora lycii* phytase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 72, 1039e1047. doi: 10.1007/s00253-006-0384-8

24. Ma X., Liu Y., Li Q., et al. Expression, purification and identification of a thermolysin-like protease, neutral protease I, from *Aspergillus oryzae* with the *Pichia pastoris* expression system. *Protein Expression Purification*, 2016, 128, 52e59. doi: 10.1016/j.pep.2016.08.008
25. Kranthi B.V., Kumar R., Kumar N.V., Rao D.N., Ranganathan P.N. Identification of key DNA elements involved in promoter recognition by Mxr1p, a master regulator of methanol utilization pathway in *Pichia pastoris*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1789(6–8), 460–468. doi: 10.1016/j.bbagr.2009.05.004.

Optimization of the Expression of 1,3-1,4-β-glucanase Gene from *Rhizomucor miehei* in the *Komagataella kurtzmanii* yeast

A.Yu. MATVEEVA¹, I.I. GUBAIDULLIN¹, A.S. FEDOROV¹, and D.G. KOZLOV^{1,*}

¹Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center «Kurchatov Institute» (NRC «Kurchatov Institute» – GOSNIIGENETIKA), Moscow, 117545, Russia

*e-mail: dg_kozlov@genetika.ru

Received September 4, 2019

Revised September 12, 2019

Accepted September 23, 2019

Abstract—Key functional elements of the vector (promoter, leader and terminator regions) that provide the expression of a target 1,3-1,4-β-glucanase gene from *Rhizomucor miehei* in the *Komagataella kurtzmanii* yeast have been optimized. It was shown that the promoter regions of the gene *AOX1* from the *Pichia pastoris* yeast currently reclassified as *Komagataella phaffii* and from *K. kurtzmanii* yeast as parts of a vector provided equal levels of expression of the target gene in the cells of the recipient strain *K. kurtzmanii* Y727his4, i.e. they were completely interchangeable. This means that genetic constructs that were previously developed for the biosynthesis of recombinant proteins in *K. phaffii* are able to provide an effective expression in the *K. kurtzmanii* yeast. The leader peptide MF4I (used as a variant of mif4I containing one amino acid substitution) and the leader peptide maxHH (containing the double pro-region of the Hsp150 protein from *Saccharomyces cerevisiae*) confirmed the status of the most powerful elements among the five leader sequences analyzed. Their efficiency was 1.7 times higher than that of the standard leader from the yeast alpha-factor, and by 20% higher than the characteristics of the second group of artificial leaders. At the same time, it was found that, the choice of the terminator region had the strongest influence on the expression of the target gene among all of the vector functional elements. The best terminator elements were variants derived from the transcription termination region of the *AOX1* gene, and the difference in the expression level of the target gene using different terminators was approximately 4.5 times. Based on the analysis of the obtained data, the optimal composition of the key functional elements of the expression vector was determined; it included the promoter and terminator regions of the *AOX1* yeast gene and one of the artificial leaders, mif4I or maxHH.

Key words: β-glucanase, *Komagataella kurtzmanii*, yeast, secretion, strain producer

Funding—The work was financially supported by the Ministry of Science and Higher education of the Russian Federation (Unique Project Identifier RFMEFI60717X0179) using the Unique Scientific Facility of the National Bio-Resource Center «All-Russian Collection of Industrial Microorganisms», NRC «Kurchatov Institute» – GOSNIIGENETIKA

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-3-11