

УДК 579.6:579.25

## Влияние суперэкспрессии генов *HAC1* из *Pichia pastoris* и *Saccharomyces cerevisiae* на продукцию гетерологичных фитазы и ксиланазы в *P. pastoris*

© 2019 Т. Л. ГОРДЕЕВА<sup>1,\*</sup>, Л. Н. БОРЩЕВСКАЯ<sup>1</sup>, А. Н. КАЛИНИНА<sup>1</sup>, С. П. СИНЕОКИЙ<sup>1</sup>, М. Д. КАШИРСКАЯ<sup>2</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

<sup>2</sup>АО «Биоамид», Саратов, 410033

\*e-mail: tatiana.gordeeva@mail.ru

Поступила в редакцию 26.09.2019 г.

После доработки 21.10.2019 г.

Принята к публикации 28.10.2019 г.

Исследовано влияние суперэкспрессии генов *HAC1* из *Pichia pastoris* и *Saccharomyces cerevisiae* на продукцию клетками *P. pastoris* гетерологичных ферментов: фитазы *Escherichia coli* и ксиланазы *Raenibacillus brasiliensis*. Гены, кодирующие фитазу и ксиланазу, были оптимизированы по кодоновому составу и экспрессированы под регуляцией промотора АОХ1 в клетках *P. pastoris*, в результате были получены многокопийные штаммы. При культивировании в пробирках продуктивность полученных штаммов составила 927 ед/мл фитазной активности и 1401 ед/мл ксиланазной активности. Показано, что при суперэкспрессии гена *HAC1* из *P. pastoris* продукция фитазы увеличивается на 46%, а ксиланазы на 41%. Коэкспрессия *HAC1* из *S. cerevisiae* позволила увеличить продукцию фитазы на 28%, а ксиланазы на 20%. Полученные данные могут быть использованы для успешного конструирования промышленных штаммов-продуцентов на основе *P. pastoris*.

**Ключевые слова:** фитаза, ксиланаза, активатор транскрипции Hac1p, UPR, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*,

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-6-57-66

В последние десятилетия штаммы на основе *Pichia (Komagataella) pastoris* все чаще используют в промышленности для производства различных секреторных ферментов, в частности гетерологичных фитазы и ксиланазы, которые представляют большую ценность для кормопроизводства [1–4].

Фитазы (мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфат фосфогидролазы) гидролизуют содержащийся в растениях фитат (мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфат), который, будучи хелатирующим агентом, связывает минеральные вещества и белки в недоступные для переваривания комплексы [5]. Фитазы высвобождают неор-

ганический фосфат из фитата, значительно повышая усвоение фосфора и минеральных веществ в желудочно-кишечном тракте животных [6].

Ксиланазы (эндо-1,4-β-D-ксиланазы) катализируют гидролитическое расщепление 1,4-β-ксилозидных связей в ксилане – основном представителе трудногидролизуемых некрахмалистых полисахаридов, содержащихся в зерне. Введение ксиланаз в корма способствует повышению усвояемости питательных веществ корма, улучшению микробиологической среды кишечника благодаря снижению вязкости перевариваемого субстрата [7].

Для успешного конструирования высокопродуктивных штаммов используют различные

*Список сокращений:* ИАП РАН – Институт аналитического приборостроения Российской академии наук; ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени; ЭР – эндоплазматический ретикулум; DNS – 3,5-динитросалициловая кислота; UPR (unfolded protein response) – система ответа клетки на несвернутый белок.

подходы, в частности интеграцию в состав хромосомы многокопийных вставок целевых генов, оптимизированных по кодоновому составу, под контролем эффективных и сильных промоторов. Оптимизация кодонов в генах и увеличение их копияемости в хромосоме, как правило, ускоряют синтез рекомбинантных белков в клетке. Однако корреляция между продуктивностью штамма и копияемостью гена, кодирующего целевой фермент, наблюдается только при небольшом числе копий гена в хромосоме [8]. Большое число копий гетерологичных генов, как правило, не приводит к существенному росту продуктивности, так как высокий уровень их экспрессии вызывает накопление неправильно свернутых рекомбинантных белков в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Это перегружает секреторный аппарат клетки *P. pastoris* и запускает систему ответа клетки на несвернутый белок (UPR – unfolded protein response) [9]. В результате повышается уровень транскрипции генов, кодирующих шапероны ЭР, вспомогательные белки фолдинга и внутриклеточного транспорта, а также другие белки, способствующие процессингу гетерологичных белков в ЭР [10, 11]. Таким образом, лимитирующими стадиями процесса внеклеточной продукции гетерологичных белков клетками *P. pastoris* являются фолдинг и секреция в ЭР [8, 12].

Обнаружено, что Hac1p – активатор транскрипции генов ответа клетки на несвернутый белок – облегчает процессинг и секрецию белков в *Aspergillus niger var. awamori* [13], *Saccharomyces cerevisiae* [14] и *P. pastoris* [10]. Для инициации синтеза Hac1p мРНК *HAC1* подвергается сплайсингу, как в клетках *P. pastoris*, так и *S. cerevisiae*, образуя мРНК *HAC1<sup>i</sup>* (*i*-индуцированная) [15, 16]. Активный Hac1p запускает экспрессию нескольких генов UPR [17, 18] и изменяет физиологическое состояние клеток, создавая более подходящие условия для фолдинга и секреции белков в ЭР [19]. Одним из подходов к повышению продукции секреторных белков в *P. pastoris* является сверхэкспрессия гена *HAC1<sup>i</sup>*, как из *P. pastoris*, так и из *S. cerevisiae*, что позволяет увеличить продукцию некоторых гетерологичных ферментов в 1,4–11,1 раз [20].

Однако на сегодняшний день остается неясным, сверхэкспрессия какого гена *HAC1<sup>i</sup>*, из *P. pastoris* или *S. cerevisiae*, сильнее влияет на продукцию секреторных гетерологичных белков в *P. pastoris*. Кроме того, сообщалось, что коэкспрессия *HAC1<sup>i</sup>* в *P. pastoris* может по-разному влиять на продукцию гетерологичных белков: повышать, снижать и не оказывать никакого эффекта [15]. Таким образом, важной задачей остается

изучение влияния сверхэкспрессии *HAC1<sup>i</sup>* из различных источников на продукцию промышленно важных белков в *P. pastoris*.

Цель работы – установить из какого источника (*P. pastoris* или *S. cerevisiae*) сверхэкспрессия гена *HAC1<sup>i</sup>* сильнее влияет на продукцию секреторных гетерологичных белков в *P. pastoris*, а также каково влияние коэкспрессии *HAC1<sup>i</sup>* на продукцию гетерологичных белков.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Реактивы

Триптон, пептон, дрожжевой экстракт, глюкоза, глицерин были получены из компании «Диа-М» (Россия), все ферменты для молекулярных работ – от фирмы «Fermentas» (Литва), фитат натрия (Sigma-Aldrich, США), ксилан бука (ROTH, Германия), соли и другие реагенты (все реактивы отечественного производства марки х.ч. или ч.д.а.) – от фирмы «Химмед» (Россия).

### Штаммы и среды

Для стандартных генно-инженерных работ (конструирование плазмиды, наработка плазмидной ДНК) использовали штамм *E. coli* XL-1 Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]*). Культуру растили при 37 °С на среде LB (г/л): триптон – 10, дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 5; при необходимости добавляли 100 мкг/мл ампициллина (Sigma-Aldrich, США).

Штаммы *P. pastoris* ВКПМ Y-4334 (*his4<sup>-</sup>*) и *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1334 были получены из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ ГосНИИгенетика). Культуры дрожжей растили при 30 °С на среде YPD (г/л): пептон – 20, дрожжевой экстракт – 15, глюкоза – 20. Все плотные среды содержали агар в концентрации 20 г/л.

Для отбора трансформантов *P. pastoris* использовали минимальную среду M9 следующего состава (г/л): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 6, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 3, NaCl – 0,5, NH<sub>4</sub>Cl – 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,65, CaCl<sub>2</sub> – 0,111, агар – 20, глюкоза – 20. В среду добавляли также витамины и микроэлементы согласно инструкциям [21]. Гистидин добавляли в среду M9 до конечной концентрации 50 мкг/мл.

### Оптимизация последовательностей генов, кодирующих фитазу и ксиланазу

В качестве исходной нуклеотидной последовательности гена *phyEc* (*appA*), кодирующего фитазу из *E. coli*, использовали последовательность,

приведенную в международной базе данных GenBank под номером CP031919.1. В качестве исходной нуклеотидной последовательности гена *xyll*, кодирующего ксиланазу *Paenibacillus brasiliensis*, использовали последовательность, приведенную в международной базе данных GenBank под номером MK014302.

Оптимизированные последовательности генов *phyEc-mod* и *xyll-op* были разработаны в соответствии с частотами встречаемости кодонов в дрожжах *P. pastoris* [22]. Для дизайна и анализа полученных последовательностей на процентное содержание GC-пар и удаление AT-богатых областей использовали программы <https://eu.idtdna.com/CodonOpt>, <https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis>. Полученные последовательности представлены на рис. S1, S2 (дополнительный материал).

### Конструирование интегративных экспрессионных кассет

Для получения интегративных экспрессионных кассет, содержащих в своем составе гены *phyEc-mod* и *xyll-op*, использовали следующие генетические элементы: модифицированный индуцибельный промотор PАОХ1 [8] и терминатор транскрипции ТТАОХ1 *P. pastoris*, сигнал секреции  $\alpha$ -MF *S. cerevisiae*, селективный маркер *HIS4* под контролем дрожжевого промотора TEF, область интеграции NS (фрагмент гена, кодирующего 18S рРНК), сайты lox66 и lox71, ген *cre* под контролем промотора PАОХ1 *P. pastoris*. Источниками ДНК-фрагментов генетических элементов служили векторы pP10 [23], pPIC9 $\alpha$  [24], padh1-nmt1-Cre [25]. ДНК-фрагменты генетических элементов сшивали методом ПЦР с перекрывающимися праймерами или «fusion»-ПЦР [26] и лигировали с ДНК вектора pPIC9 $\alpha$ , расщепленного эндонуклеазой рестрикции BglIII [24]. В результате был сконструирован вектор pPMF-Cre.

Гены с оптимизированным нуклеотидным составом *phyEc-mod* и *xyll-op* синтезировали в НИЦ «Курчатовский институт»–ГосНИИгенетика (Россия) методом, описанным в работе Гордеевой с соавт. [27], затем клонировали по сайтам EcoRI и NotI в состав вектора pPMF-Cre и получали плазмиды pPMF-Cre-Phy и pPMF-Cre-Xyl. Полученные рекомбинантные плазмиды расщепляли эндонуклеазой рестрикции BglIII и получали интегративные экспрессионные кассеты Cre-Phy и Cre-Xyl.

Для получения интегративных экспрессионных кассет, содержащих в своем составе гены *HAC1<sup>i</sup>* из *P. pastoris* и *HAC1<sup>i</sup>* из *S. cerevisiae* методом «fusion»-ПЦР [15, 28], создавали сплайсированные варианты генов *HAC1<sup>i</sup>*. В качестве матрицы использовали хромосомную ДНК штаммов

*P. pastoris* и *S. cerevisiae*. Далее ДНК-фрагменты генов *HAC1<sup>i</sup>* и промотора PGAP сшивали методом «fusion»-ПЦР, клонировали по сайтам BamHI, NotI в состав вектора pPIC9 $\alpha$  и получали плазмиды pPIC9 $\alpha$ -HAC1-Pp и pPIC9 $\alpha$ -HAC1-Sc. Рекомбинантные плазмиды расщепляли эндонуклеазами рестрикции BamHI и BglIII и получали интегративные экспрессионные кассеты HAC1-Pp и HAC1-Sc.

Выделение хромосомной ДНК проводили с использованием набора реagens ДНК-экспресс («Синтол», Россия). Выделенные продукты ПЦР очищали с помощью набора GeneJET Gel Extractin Kit (#КО692; Fermentas, Литва). Все стандартные генно-инженерные манипуляции (обработка ДНК ферментами, лигирование, трансформация клеток *E. coli*) проводили по методикам сборника [29].

### Получение рекомбинантных многокопийных штаммов-продуцентов

Экспрессионные кассеты Cre-Phy и Cre-Xyl трансформировали в клетки *P. pastoris* согласно протоколу Kit #28662 (Invitrogen). Трансформанты отбирали по способности расти на минимальной среде M9 без источника гистидина. Наличие интеграционных кассет Cre-Phy и Cre-Xyl в составе хромосомы трансформантов определяли методом ПЦР с использованием пар праймеров: PhyEc-mod-F/PhyEc-mod-R и XylPb-mod-F/XylPb-mod-R (табл. 1).

Отбор наиболее продуктивного штамма проводили по следующей схеме. Для приготовления инокулята штаммы выращивали в течение 24 ч в 3 мл жидкой питательной среды YPD при аэрации 250 об/мин и 30 °С. Затем полученным инокулятом засеивали пробирки (объемом 50 мл), содержащие 5 мл среды YP с 10 г/л глюкозы в соотношении 1:10, и выращивали при тех же условиях в течение 24 ч. Далее в течение трех суток ежедневно добавляли 1% метанола. Клетки осаждали центрифугированием при 14000 g, супернатант анализировали на наличие фитазной или ксиланазной активности.

Штаммы, продуцирующие фитазу или ксиланазу, отбирали и рассевали до отдельных колоний на плотной полной среде YPD. Выросшие колонии пересевали на плотные минимальные среды M9 в присутствии или в отсутствие гистидина. Колонии, потерявшие способность расти на минимальной среде без гистидина, отбирали и снова проводили трансформацию кассет Cre-Phy и Cre-Xyl, как описано выше. Процедуру повторяли несколько раз, отбирая на каждом этапе наиболее продуктивные трансформанты и ауксотрофные по гистидину многокопийные штаммы-продуценты ксиланазы (штамм XYL) и фитазы (штамм PHY).

**Праймеры, использованные в работе**  
The primers used

Праймер	Последовательность (5'–3')	Праймер	Последовательность (5'–3')
PhyEc-mod-F	caatcagaaccgcaacttaaa	Ph-Z	(FAM)-tgcagctggcttagctccaga-RTQ1
PhyEc-mod-R	ttatagactacaggcaggta	X-F	actggttctccaacagaact
XylPb-mod-F	tctggtggaactactctgt	X-R	gtacaaagccaagtaaccgt
XylPb-mod-R	taacgttagaagaaccagaa	X-Z	(FAM)-acgctggtgttgggctcca-RTQ1
Ref-F	cgaagctggtgcaaatgca	Gpp-F	tagaaatgtcttgggtctctgt
Ref-R	ggctgtctggcttctcttc	Hpp-R	ctattcctggaagaatacaaaagt
Ref-Z	(ROX)-cctccaggagggttacagagaa-(BHQ2)	Hsc-F	tagtaattcgcaatcgaact
Ph-F	cagatgttgatgaacgtacac	Hsc-R	tgaattgtcaaaagggtagact
Ph-R	tcagcctgagtatggacagt		

### Определение относительного числа копий генов *phyEc-mod* и *xyl1-op*

Относительное количество копий генов *phyEc-mod* и *xyl1-op* в дрожжевых штаммах определяли при помощи ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) на приборе АНК-32 (ИАП РАН) методом  $\Delta Ct$  [30], рассчитывая разницу между значениями  $Ct$  референсного гена *AOX1*, представленного в геноме в одной копии, и исследуемого гена. Для референсного гена были синтезированы праймеры Ref-F, Ref-R и зонд Ref-Z, меченный флуорофором ROX и гасителем флуоресценции BHQ-2; для генов *phyEc-mod* и *xyl1-op* – праймеры Ph-F, Ph-R и X-F, X-R, а также зонды Ph-Z и X-Z, меченные флуорофором FAM и гасителем флуоресценции RTQ-1. Последовательности праймеров приведены в табл. 1.

Для проведения ПЦР-РВ использовали набор реактивов ПЦР-Микс («Синтол»). В реакционную смесь вносили по 5 пМ каждого праймера и зонда, 2 мкл матрицы, общий объем реакционной смеси доводили до 25 мкл ddH<sub>2</sub>O. В качестве матрицы использовали хромосомную ДНК штаммов ХУЛ и РНУ. ПЦР-РВ проводили по следующей программе: первоначальное плавление цепей ДНК при 95 °С в течение 300 с, далее 37 циклов по 15 с при 95 °С и 40 с при 60 °С. ПЦР проводили в четырех повторах. Относительное количество продукта, образовавшегося в процессе ПЦР, рассчитывали по формуле:  $P \sim (1+E)^n$ , где  $P$  – относительное количество продукта,  $E$  – средняя эффективность цикла,  $n$  – число циклов.

### Получение трансформантов, содержащих гены *HAC1<sup>i</sup>* из *P. pastoris* и *S. cerevisiae*

Экспрессионные кассеты HAC1-Prp и HAC1-Sc трансформировали в клетки многокопийных штаммов ХУЛ и РНУ – продуцентов ксиланазы и фита-

зы – согласно протоколу Kit #28662 («Invitrogen»). Трансформанты отбирали по способности расти на минимальной среде М9 без источника гистидина. Наличие интеграционных кассет HAC1-Prp и HAC1-Sc в составе хромосомы трансформантов определяли методом ПЦР с использованием пар праймеров: Gpp-F/Hpp-R и Hsc-F/Hsc-R.

Из полученных на основе штаммов ХУЛ и РНУ трансформантов отбирали по 40 штук: 20 трансформантов, содержащих в составе хромосомы ген *HAC1<sup>i</sup>* из *P. pastoris*, и 20 с геном *HAC1<sup>i</sup>* из *S. cerevisiae*. Ферментацию трансформантов проводили, как описано в разделе «Получение рекомбинантных многокопийных штаммов-продуцентов». В конце ферментации клетки осаждали центрифугированием, супернатанты анализировали на наличие фитазной или ксиланазной активности.

### Определение фитазной активности

Фитазную активность определяли по накоплению в реакционной смеси свободного фосфат-иона, детектируемого модифицированным методом Фиске–Субарроу [31]. 100 мкл раствора фермента (супернатанта) инкубировали с 900 мкл раствора субстрата (2%-ный фитат натрия в 0,2 М ацетатном буфере, рН 4,0) при 37 °С в течение 30 мин. Количество освобожденного неорганического фосфата анализировали, добавляя 1 мл свежеприготовленного реагента: смесь 4 объемов 1,5%-ного молибдата аммония в 5,5%-ной (об.) серной кислоте и 1 объема 2,5%-ного водного раствора сульфата железа (II) – и измеряя оптическую плотность раствора при длине волны 700 нм на спектрофотометре Versamax reader (Molecular Devices, США). За единицу фитазной активности принимали количество фермента, способного высвободить из фитата натрия 1 мкмоль/мин неорганического фосфата.

### Определение ксиланазной активности

Определение ксиланазной активности проводили в пробе объемом 100 мкл, содержащей 50 мкл 1%-ного раствора ксилана бука в качестве субстрата в 0,5 М ацетатном буфере (рН 6,0) и 50 мкл раствора фермента (супернатанта). Инкубацию проводили при 50 °С в течение 10 мин.

Редуцированные сахара определяли по реакции с 3,5-динитросалициловой кислотой (DNS-методом) с использованием глюкозы в качестве стандарта [32]. За единицу активности фермента принимали количество, требуемое для образования 1 мкмоль редуцированных сахаров за 1 мин.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Получение многокопийных штаммов-продуцентов фитазы и ксиланазы

Получение многокопийных штаммов необходимо для достижения в клетке высокого уровня экспрессии генов, кодирующих гетерологичные белки. Такой уровень экспрессии гетерологичных генов приводит к накоплению в ЭР неправильно свернутых белков и перегружает секреторный аппарат клетки, что дает возможность оценить влияние суперэкспрессии гена *HAC1<sup>i</sup>*, кодирующего *HAC1<sup>r</sup>* – активатор транскрипции генов, – на фолдинг и секрецию гетерологичных ферментов.

Для экспрессии гетерологичных генов в системе метилотрофных дрожжей *P. pastoris* разработана экспрессионная кассета, в состав которой включен ген, кодирующий фитазу *E. coli* или ксиланазу *P. brasiliensis*, под мощным индукбельным промотором *PAOX1*, терминатор транскрипции *TТАOX1* *P. pastoris*, сигнальная последовательность  $\alpha$ -фактора *S. cerevisiae* для эффективной секреции белков, плечо для интеграции *NS* – фрагмент гена, кодирующего область 18S рРНК, – а также фланкированная сайтами *lox66* и *lox71* кассета с селективным геном-маркером *HIS4* под контролем дрожжевого *TEF*-промотора

и ген *cre*, кодирующий рекомбиназу бактериофага P1, под контролем промотора *PAOX1* *P. pastoris* (рис. 1).

Представленная генетическая конструкция позволяет проводить отбор трансформантов на минимальных средах, не содержащих в своем составе гистидин. Высокоуровневая экспрессия целевых генов, выщепление маркерного гена и гена, кодирующего рекомбиназу *Cte*, при индукции метанолом за счет использования *cre-lox*-системы бактериофага P1 дают возможность проводить последовательную интеграцию экспрессионных кассет в состав хромосомы штамма-реципиента. Кроме того, многокопийность вставок достигается с помощью последовательности *NS*, используемой в качестве плеча для интеграции ДНК, таким образом, интеграцию кассет в состав хромосомы осуществляют по локусам гена, кодирующего 18S рРНК, которых в *P. pastoris* насчитывается около 20 копий [23, 33].

Используя последовательные серии трансформации, индукции, отбора наиболее продуктивных клонов и выщепления маркерного гена, мы получили высокопродуктивные ауксотрофные по гистидину штаммы РНУ и ХУЛ, секретирующие соответственно фитазу *E. coli* и ксиланазу *P. brasiliensis*. Продуктивность штамма РНУ в полной среде YPD при культивировании в пробирках составила 635 ед/мл фитазной активности, а штамма ХУЛ – 978 ед/мл ксиланазной активности.

### Определение числа копий гетерологичных генов в штаммах РНУ и ХУЛ

Число копий гетерологичных генов, кодирующих фитазу *E. coli* и ксиланазу *P. brasiliensis*, в хромосомах штаммов РНУ и ХУЛ определяли методом относительной количественной оценки  $\Delta Ct$  при проведении ПЦР-РВ. В качестве референсного гена использовали последовательность гена *AOX1*, кодирующего алкогольоксидазу и представленного в единственной копии в хромосоме *P. pastoris*. В качестве контроля была

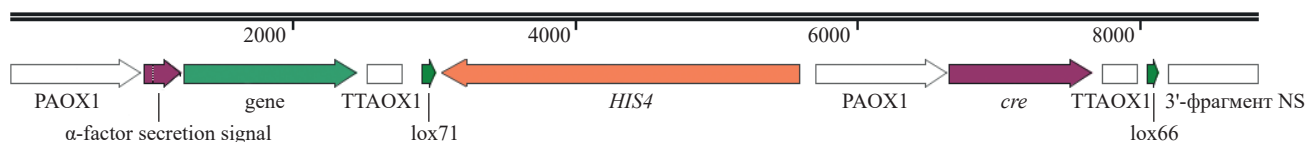


Рис. 1. Экспрессионная кассета для получения многокопийных штаммов *P. pastoris*. Gene – гетерологичный ген *phyEc-mod* или *xyll-op*

Fig. 1. Expression cassette for obtaining multi-copy *P. pastoris* strains, where gene is the heterologous *phyEc-mod* or *xyll-op*

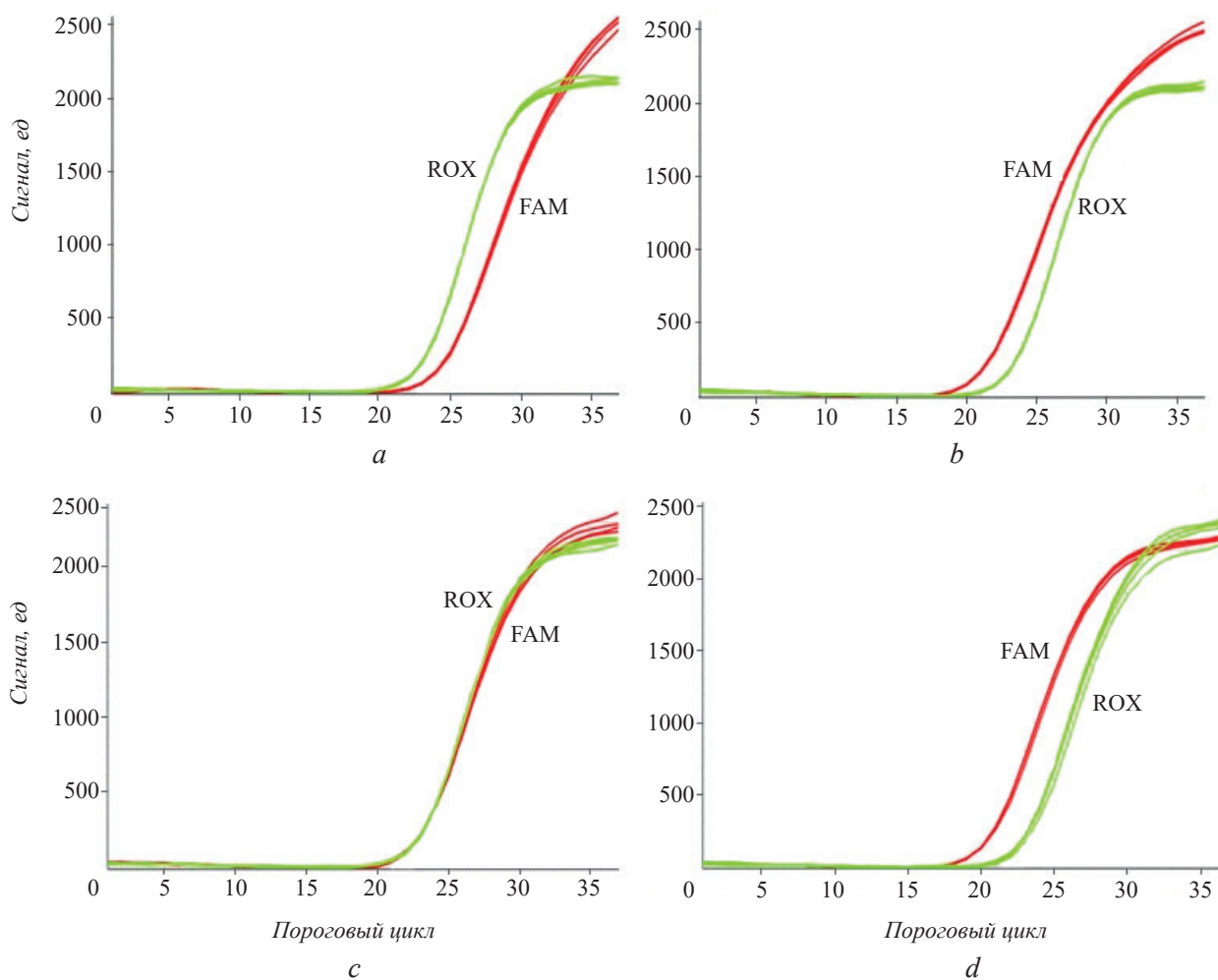
использована хромосомная ДНК, выделенная из исходного штамма *P. pastoris* ВКПМ У-4334. Эффективность реакции ( $E$ ) для генов, кодирующих фитазу, ксиланазу и алкогольоксидазу, составила соответственно 98%, 92% и 92%, что удовлетворяет критериям приемлемости. Кривые амплификации, полученные в результате проведения ПЦР-РВ, показаны на рис. 2.

В результате обработки данных, представленных на рис. 2, были вычислены средние значения пороговых циклов контрольного образца и исследуемого образца. Значение  $\Delta C_t$  для гена *phyEc-mod* составило 3,5 цикла, а для *xyll-op* – 2,51, что соответствует числу циклов ( $n$ ). Учитывая, что рост сигналов на начальной стадии ПЦР происходит по экспоненциальному закону [34], мы рассчи-

тали относительное содержание продукта ( $P$ ). Для генов *phyEc-mod* и *xyll-op* значение  $P$  составило 10,9 и 5,1 соответственно. Это значит, что на 1 копию референсного гена *AOX1* приходится 11 копий гена, кодирующего фитазу, и 5 копий гена, кодирующего ксиланазу. Таким образом, показано, что в хромосоме штамма РНУ содержится 11 копий гена *phyEc-mod*, а в хромосоме штамма ХУЛ – 5 копий гена *xyll-op*.

### Влияние сверхэкспрессии генов *HAC1* из *P. pastoris* и *S. cerevisiae* на продукцию гетерологических ферментов

Для изучения влияния избыточной экспрессии генов *HAC1* из *P. pastoris* и *S. cerevisiae* на продукцию гетерологических белков: фитазы и



**Рис. 2.** Графики зависимости сигналов флуоресценции от номера температурного цикла. *a, c* – контрольный образец (смесь синтетических контролей: гена *phyEc-mod* и гена *AOX1* (*a*), гена *xyll-op* и гена *AOX1* (*c*) в соотношении 1:1); *b, d* – исследуемый образец: ген *phyEc-mod* и ген *AOX1* (*b*), ген *xyll-op* и ген *AOX1* (*d*). Канал ROX – ген *AOX1*, канал FAM – гены *phyEc-mod* и *xyll-op*

**Fig. 2.** Graphs of the dependence of fluorescence signals on the temperature cycle number. *a* – Control sample (1:1 mixture of synthetic controls of the *phyEc-mod* gene (FAM channel) and *AOX1* gene (ROX channel)); *b* – test sample, *phyEc-mod* gene (FAM channel) and *AOX1* gene (ROX channel); *c* – control sample (1:1 mixture of synthetic controls of the *xyll-op* gene (FAM channel) and *AOX1* gene (ROX channel)); *d* – test sample, *xyll-op* gene (FAM channel) and *AOX1* gene (ROX channel)

ксилаказы – в штаммах РНУ и ХУЛ соответственно, в них были трансформированы экспрессионные кассеты, которые содержали маркерный ген *HIS4*, восстанавливающий способность штаммов расти на минимальных средах без гистидина, и сплайсированные варианты генов *HAC1<sup>i</sup>* под контролем сильного конститутивного промотора PGAP. Промотор PАОХ1 не использовали, так как его индукция инициирует синтез активатора транскрипции Hac1p, что может негативно влиять на выход целевого белка.

Для сравнения влияния двух различных генов *HAC1<sup>i</sup>* на фолдинг и секрецию гетерологичных белков получали трансформанты, содержащие равное число копий генов *HAC1<sup>i</sup>* (преимущественно 1–2 копии). Для этой цели в экспрессионной кассете в качестве плечей для интеграции использовали ДНК-фрагменты, кодирующие области гена *АОХ1*, содержащегося в единственной копии в хромосоме *P. pastoris*. При трансформации ДНК аналогичных линейаризованных векторов обычно происходит встраивание одной копии гена в хромосому, хотя неспецифическая множественная интеграция наблюдается приблизительно в 10% случаев и при этом число копий не контролируется [35]. С целью снизить вероятность получения трансформантов, содержащих множественные копии гена *HAC1<sup>i</sup>*, для трансформации брали 1 мкг ДНК. Известно, что количество ДНК в образце для трансформации в *P. pastoris* может влиять на результаты. Так, при высоком содержании трансформируемой ДНК (более 2 мкг) повышается вероятность мультикопийной интеграции; а в исследованиях,

проведенных с репортерными плазмидами семейства pPrT4, показано, что трансформация 1 мкг ДНК линейаризованного вектора приводит к получению клонов с приблизительно одинаковым уровнем экспрессии [36–39].

В результате проведенных экспериментов отобрали по 40 трансформантов, полученных на основе штаммов РНУ и ХУЛ, 20 из которых содержали ген *HAC1<sup>i</sup>* из *S. cerevisiae* и 20 – ген *HAC1<sup>i</sup>* из *P. pastoris*. Трансформанты культивировали в пробирках, синтез ферментов индуцировали метанолом. Количественное определение фитазной и ксиланазной активности проводили по методикам, представленным в соответствующих разделах главы «Условия эксперимента». Результаты приведены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, коэкспрессия генов *HAC1<sup>i</sup>*, как из *P. pastoris*, так и из *S. cerevisiae*, приводила к повышению продукции фитазы и ксиланазы клетками *P. pastoris*. Из литературных данных известно, что коэкспрессия гена *HAC1<sup>i</sup>* из *S. cerevisiae* в *P. pastoris* позволяет увеличить продукцию фитазы *Citrobacter amalonaticus* в 6-копийном штамме на 40% [8], а Fab-фрагмента антитела – в 1,3 раза [40]. Коэкспрессия гена *HAC1<sup>i</sup>* из *P. pastoris* повышала продукцию белка miL10 в 2,2 раза, транс-сиалидазы *Trypanosoma cruzi* – в 2,1 раза [15], а  $\alpha$ -амилазы *Geobacillus* sp. 4j в 12-копийном штамме – в 11,1 раза [20]. Однако увеличения продуктивности в 11,1 раз смогли добиться только путем множественной интеграции *HAC1<sup>i</sup>* в состав хромосомы. Таким образом, степень увеличения продуктивности штаммов при коэкспрессии генов *HAC1<sup>i</sup>* в *P. pastoris* варьирует

Таблица 2

**Влияние сверхэкспрессии генов *HAC1<sup>i</sup>* из различных источников на продукцию гетерологичных белков, фитазы и ксиланазы, в штаммах *P. pastoris***

The effect of overexpression of *HAC1<sup>i</sup>* genes from various sources on the production of heterologous phytase and xylanase in *P. pastoris*

Характеристики	Штамм			
	РНУ		ХУЛ	
Гетерологичный фермент	фитаза		ксилаказа	
Продуктивность штамма, ед/мл	635		978	
Источник гена <i>HAC1<sup>i</sup></i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. pastoris</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. pastoris</i>
Средняя продуктивность трансформантов, ед/мл	814 ± 18	927 ± 14	1175 ± 16	1401 ± 19
Относительное увеличение продуктивности, %	28	46	20	41

Примечание: Продуктивность штамма определяли по ферментативной активности целевого белка в культуральной жидкости (см. раздел «Условия эксперимента»).

Note: The strain productivity was determined as an enzymatic activity of the target protein in culture liquid (see section «Experimental conditions»).

в широком диапазоне, что может быть связано как с видом гетерологичного фермента, так и с особенностями условий культивирования.

Таким образом, впервые изучено и проведено сравнение влияния суперэкспрессии генов *HAC1* из *P. pastoris* и *S. cerevisiae* на продукцию гетерологичных ферментов – фитазы *E. coli* и ксиланазы *P. brasiliensis* – в многокопийных штаммах *P. pastoris*. Сконструированы многокопийные штаммы-продуценты фитазы *E. coli* и ксиланазы *P. brasiliensis*, проведена оценка их продуктивности при культивировании в пробирках. Проведенное сравнение влияния генов *HAC1<sup>i</sup>* различного происхождения на продукцию многокопийных штаммов в единых условиях показало (табл. 2), что наиболее существенное влияние оказала суперэкспрессия гена *HAC1<sup>i</sup>* из *P. pastoris*, что позволило увеличить продукцию гетерологичных фитазы и ксиланазы на 46 и 41%, а также получить штаммы с 927 ед/мл фитазной активности и 1401 ед/мл ксиланазной активности. Полученные данные могут быть использованы для конструирования эффективных промышленных штаммов-продуцентов на основе *P. pastoris*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (проекты RFMEFI57917X0145 и RFMEFI60717X0180) с использованием УНУ – Национального биоресурсного центра «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатowski институт» – ГосНИИгенетика. Авторы выражают признательность научному сотруднику ООО «Синтол» Никулину А.В. за оказанную помощь в проведении ПЦР в реальном времени.

#### Дополнительный материал

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

#### ЛИТЕРАТУРА

- Zahl R.J., Peña D.A., Mattanovich D., Gasser B. Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res.*, 2017, 17(7), 1–15. doi: 10.1093/femsyr/fox068.
- Daly R., Hearn M.T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recogn.*, 2005, 18, 119–138. doi: 10.1002/jmr.687
- Safder I., Khan S., Islam I., et al. *Pichia pastoris* expression system: a potential candidate to express protein in industrial and biopharmaceutical domains. *Biomed. Lett.*, 2018, 4(1), 1–14.
- Ingelmann C.J., Witzig M., Möhring J., et al. Effect of supplemental phytase and xylanase in wheat-based diets on prececal phosphorus digestibility and phytate degradation in young turkeys. *Poult. Sci.*, 2018, 97(6), 2011–2020. doi: 10.3382/ps/pey030
- Rimbach G., Pallauf J., Moehring J. Effect of dietary phytate and microbial phytase on mineral and trace element bioavailability. *Curr. Top. Nutraceutical Res.*, 2008, 6(3), 131–144.
- Dersjant-Li Y., Awati A., Schulze H., Partridge G. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *J. Sci. Food Agric.*, 2015, 95, 878–896. doi: 10.1002/jsfa.6998.
- Mathlouthi N., Lalles J.P., Lepercq P., et al. Xylanase and beta-glucanase supplementation improve conjugated bile acid fraction in intestinal contents and increase villus size of small intestine wall in broiler chickens fed a rye-based diet. *J. Anim. Sci.*, 2002, 80, 2773–2779.
- Li C., Lin Y., Zheng X., et al. Combined strategies for improving expression of *Citrobacter amalonaticus* phytase in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol.*, 2015, 15, 88. doi: 10.1186/s12896-015-0204-2
- Hohenblum H., Gasser B., Maurer M., et al. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, 85, 367–375. doi: 10.1002/bit.10904
- Puxbaum V., Mattanovich D., Gasser B. Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, 99, 2925–2938. doi: 10.1007/s00253-015-6470-z
- Gasser B., Maurer M., Rautio J., et al. Monitoring of transcriptional regulation in *Pichia pastoris* under protein production conditions. *BMC Genomics*. 2007, 19(8), 179. doi: 10.1186/1471-2164-8-179.
- Cudna R.E., Dickson A.J. Endoplasmic reticulum signaling as a determinant of recombinant protein expression. *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, 81(1), 56–65. doi: 10.1002/bit.10445
- Valkonen M., Ward M., Wang H., et al. Improvement of foreign-protein production in *Aspergillus niger* var. *awamori* by constitutive induction of the unfolded protein response. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69, 6979–6986. doi: 10.1128/aem.69.12.6979-6986.2003
- Valkonen M., Penttilä M., Saloheimo M. Effects of inactivation and constitutive expression of the unfolded-protein response pathway on protein production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69, 2065–2072. doi: 10.1128/aem.69.4.2065-2072.2003



15. Guerfal M., Ryckaert S., Jacobs P.P., et al. The *HAC1* gene from *Pichia pastoris*: characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins. *Microb. Cell Factories*, 2010, 9, 49. doi: 10.1186/1475-2859-9-49
16. Payne T., Hanfrey C., Bishop A.L., et al. Transcript-specific translational regulation in the unfolded protein response of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 2008, 582, 503–509. doi: 10.1016/j.febslet.2008.01.009
17. Kaufman R.J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.*, 1999, 13, 1211–1233.
18. Travers K.J., Patil C.K., Wodicka L., et al. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*, 2000, 101, 249–258. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80835-1
19. Krainer F.W., Gerstmann M.A., Darnhofer B., et al. Biotechnological advances towards an enhanced peroxidase production in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.*, 2016, 233, 181–189. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.07.012.
20. Huang M., Gao Y., Zhou X., et al. Regulating unfolded protein response activator HAC1p for production of thermostable raw-starch hydrolyzing alpha-amylase in *Pichia pastoris*. *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, 2017, 40, 341–350. doi: 10.1007/s00449-016-1701-y.
21. Бабьева И.П., Голубев В.И. Методы выделения и идентификации дрожжей. М.: Пищевая промышленность, 1979, 48.
22. Zhao X., Huo K., Li Y. Synonymous codon usage in *Pichia pastoris*. *Chin. J. Biotechnol.*, 2000, 16, 308–311.
23. Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Бавыкина Н.Б. и др. Интегративный плазмидный вектор для экспрессии генов в дрожжах. Патент РФ 2388823 Оpubл. 10.05.2010. Бюл. №13.
24. Гордеева Т. Л., Борщевская Л. Н., Калинина А.Н. и др. Сравнительный анализ эффективности экспрессии генов бактериальных фитаз в дрожжах *Pichia pastoris* в чашечном тесте. *Биотехнология*, 2017, 33(6), 83–88. doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-83-88.
25. Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Вустин М.М. и др. Способ модификации дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* с помощью Ste-1ox системы бактериофага P1, трансформант, полученный таким способом, и способ микробиологического синтеза молочной кислоты. Патент РФ 2652877 Оpubл. 03.05.2018 Бюл. № 13.
26. Horton R.M., Hunt H.D., Ho S.N., et al. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 1989, 77, 61–68.
27. Gordeeva T.L., Borschevskaya L.N., Sineoky S.P. Improved PCR-based gene synthesis method and its application to the *Citrobacter freundii* phytase gene codon modification. *J. Microbiol. Methods*, 2010, 81(2), 147–152. doi: 10.1016/j.mimet.2010.02.013.
28. Xia X. Translation control of *HAC1* by regulation of splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, 20(12), 2860. doi: 10.3390/ijms20122860.
29. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL, 1989, 4–1626.
30. Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени. Москва: БИНОМ, 2011, 223.
31. Chen C.C., Wu P.H., Huang C.T., et al. A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase. *Enzyme Microb. Technol.*, 2004, 35(4), 315–320. doi: 10.1016/j.enzmictec.2004.05.007.
32. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 1959, 31(3), 426–428.
33. Marx H., Mecklenbrauker A., Gasser B., et al. Directed gene copy number amplification in *Pichia pastoris* by vector integration into the ribosomal DNA locus. *FEMS Yeast Res.*, 2009, 9, 1260–1270.
34. Белов Д.А., Петров Д.Г., Белов Ю.В., Князьков Н.Н., Киселев И.Г. Экспериментальное определение параметров амплификации полимеразной цепной реакции анализатора нуклеиновых кислот. *Научное приборостроение*, 2016, 26(1), 34–40.
35. Cereghino J.L., Cregg J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2000, 24(1), 45–66. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x
36. Vogl T., Sturmberger L., Kickenweiz T., et al. A toolbox of diverse promoters related to methanol utilization: functionally verified parts for heterologous pathway expression in *Pichia pastoris*. *ACS Synth. Biol.*, 2016, 5, 172–186. doi: 10.1021/acssynbio.5b00199
37. Portela R.M.C., Vogl T., Kniely C., et al. Synthetic core promoters as universal parts for fine-tuning expression in different yeast species. *ACS Synth. Biol.*, 2017, 6, 471–484. doi: 10.1021/acssynbio.6b00178
38. Vogl T., Ruth C., Pitzer J., et al. Synthetic core promoters for *Pichia pastoris*. *ACS Synth. Biol.*, 2014, 3, 188–191. doi: 10.1021/sb400091p.
39. Vogl T., Gebbie L., Palfreyman R. W., Speight R. Effect of plasmid design and type of integration event on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2018, 84(6), e02712–e02717.
40. Gasser B., Maurer M., Gach J., et al. Engineering of *Pichia pastoris* for improved production of antibody fragments. *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 94, 353–361. doi: 10.1002/bit.20851

## Effect of Overexpression of the *HAC1* Genes from *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae* on the Heterologous Phytase and Xylanase Production by *P. pastoris*

T. L. GORDEEVA<sup>1,\*</sup>, L. N. BORSHCHEVSKAYA<sup>1</sup>, A. N. KALININA<sup>1</sup>, S. P. SINEOKY<sup>1</sup>,  
and M. D. KASHIRSKAYA<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>BIOAMID Closed Joint Stock Co., Saratov, 410033 Russia

\*e-mail: tatiana.gordeeva@mail.ru

Received September 26, 2019

Revised October 21, 2019

Accepted October 28, 2019

**Abstract**—Effect of overexpression of the *HAC1* genes from *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae* on the production of heterologous enzymes, *Escherichia coli* phytase and *Paenibacillus brasilensis* xylanase, in *P. pastoris* cells has been studied. Codon composition of the phytase and xylanase encoding genes was optimized, and the genes were expressed in *P. pastoris* under the control of AOX1 promoter. The obtained multi-copy strains produced *in vitro* 927 U/mL phytase and 1,401 U/ml xylanase activity. Overexpression of the *HAC1* gene from *P. pastoris* was shown to increase the phytase and xylanase production by 46% and 41%, respectively. Overexpression of *HAC1* from *S. cerevisiae* increased the phytase production by 28% and xylanase by 20%. Data obtained could be helpful in the construction of industrial enzyme-producing strains based on *P. pastoris*.

**Key words:** phytase, xylanase, Hac1p transcription activator, UPR, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*

**Acknowledgements**—The work was carried out using Multipurpose Scientific Installation All-Russian Collection of Industrial Microorganisms National Bioresource Center, NRC «Kurchatov Institute» – GosNIIgenetika. The authors are grateful to A.V. Nikulin (Sintol LLC, Russia) for the assistance in the real-time PCR experiments.

**Funding**—The work was financially supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Unique Identifiers of the Projects are RFMEFI57917X0145 and RFMEFI60717X0180).

**Supplementary materials**—The online version of this paper contains supplementary materials available free of charge at <http://www.biotechnology-journal.ru>

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-6-57-66