



УДК 577.151.7:57.088.2

ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА РАРС НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *Pichia pastoris*

© 2025 г. С. К. Комаревцев*, Ю. С. Лаптева**, Р. Х. Зиганшин*, В. В. Фарофонова**,
В. Н. Степаненко***, А. А. Осмоловский****,
К. А. Мирошников*, ****, Е. В. Локтюшов**, #

* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** ФГБУН ФИЦ “Пуцинский научный центр биологических исследований РАН”,
Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН,
Россия, 142290 Пуцино, просп. Науки, 3

*** ФГАОУ ВО “Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова”
Минздрава России,

Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8/2

**** ФГБОУ ВО “Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова”,
биологический факультет,

Россия, 119234 Москва, ул. Ленинские горы, 1/12

Поступила в редакцию 15.05.2025 г.

После доработки 27.05.2025 г.

Принята к публикации 28.05.2025 г.

Дрожжи *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) нашли широкое применение в пищевой и фармацевтической промышленности как микробные клеточные фабрики рекомбинантных белков за способность к гетерологической сверхэкспрессии многих целевых белков, в том числе протеолитических ферментов. Протеаза-активатор протеина С (РАРС) плазмы крови из микромицета *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D потенциально может быть внедрена в терапевтическую практику в качестве фибринолитического лекарственного средства, а также в диагностические системы для анализа свертываемости крови в роли основного компонента, активирующего протеин С. Для решения задач по применению протеазы-активатора протеина С в медицине и ветеринарии важно иметь надежную систему продукции рекомбинантного фермента. Такая система продукции может быть создана на основе дрожжей. Цель данной работы заключалась в создании штамма-продуцента РАРС на основе дрожжей *P. pastoris* и демонстрации успешной продукции и секреции протеолитического фермента в культуральную жидкость. Нами был сконструирован вектор, несущий ген *parc*. Этим вектором были трансформированы дрожжи *P. pastoris*, проведена селекция трансформантов на среде, содержащей антибиотик зеоксин. При помощи селекции на агаризованной среде с казеином, а также анализа культуральной жидкости методом белкового электрофореза в ПААГ были отобраны наиболее эффективные клоны-продуценты целевого фермента. Исследована динамика накопления активной формы РАРС в культуральной жидкости после индукции белкового синтеза при глубинном культивировании продуцирующего клона в колбе. LC-MS-анализ подтвердил присутствие фермента в культуральной среде, а также показал, что его накопление происходит в зрелой ферментативно активной форме. Полученный в результате работы штамм-продуцент может быть использован для дальнейшего получения экспериментальных промышленных партий фермента на биотехнологических производствах, поддерживающих проведение дрожжевой ферментации.

Ключевые слова: РАРС, дрожжевая экспрессия, *Pichia pastoris*

DOI: 10.31857/S0132342325050235

Сокращения: РАРС – фибринолитическая протеаза-активатор протеина С плазмы крови из микромицета *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D; КЖ – культуральная жидкость; CDS – кодирующая часть гена (coding sequence).

Автор для связи: (тел.: +7 (920) 758-89-36; эл. почта: zhenyaloktushov@gmail.com).

ВВЕДЕНИЕ

Протеолитические ферменты повсеместно распространены в биосфере. Они присутствуют во всех живых организмах, где участвуют в разнообразных процессах жизнедеятельности, например, в клеточной сигнализации, клеточной дифференциации, катаболизме белков [1, 2]. Протеазы считаются наиболее важным классом промышленных ферментов и составляют почти 60% от общего объема продаж ферментов в мире [3]. Протеазы применяются в пищевой, фармацевтической, легкой и других отраслях промышленности. Источники протеаз для промышленности – представители четырех царств живой природы. К широко применяемым протеазам животного происхождения относят, например, пепсин, трипсин, химозин; к протеазам растительного происхождения – папаин, фицин, бромелаин; к протеазам микробного происхождения – субтилизин, термолизин, кератиназу. В настоящее время микробиологический способ получения протеолитических ферментов все более широко применяется в промышленности, особенно фармацевтической, где предъявляются высокие требования к чистоте препаратов и стараются максимально снизить риски вирусной контаминации и потенциальной иммуногенности. Например, для трипсина получены четыре штамма-продуцента на основе *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces griseus* и *Pichia pastoris*, относящиеся к разным таксономическим группам микроорганизмов [4].

Протеолитические ферменты в зависимости от строения активного центра можно разделить на шесть классов: сериновые, треониновые, глутаминовые, аспарагиновые, цистеиновые и металлопротеазы [5]. Протеаза, экспрессируемая микромицетом *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D, относится к классу протеиназа-К-подобных субтилизиновых сериновых протеолитических ферментов. Данная протеаза стала объектом нашего исследования, т.к. она потенциально способна растворять тромбы и поэтому может быть внедрена в терапевтическую практику в качестве фибринолитического лекарственного средства. Ранее нами было показано, что эта протеаза способна активировать протеин С плазмы крови [6, 7], один из наиболее важных белков – факторов антикоагулянтной (противосвертывающей) системы крови. Синтез этого белка происходит в печени в форме зимогена и зависит от витамина К. Протеин С

находится в постоянной циркуляции в крови в неактивированном состоянии [8]. Устойчивость к активированному протеину С – гемостатическое расстройство, приводящее к повышенному риску венозного тромбоза, включая тромбоз глубоких вен и тромбоэмболию легочной артерии. Диагностика на резистентность к активированному протеину С может проводиться в автоматизированном режиме с использованием коммерческого набора для анализа свертывания крови на основе протеазы из яда гадюки Рассела [9]. Анализ активности протеина С плазмы крови, ключевым компонентом которого выступает протеаза-активатор из змеиного яда, назначают при различных заболеваниях сердечно-сосудистой системы, сепсисе, гемодиализе, во время приема антикоагулянтных препаратов, а также при подготовке к беременности [9, 10]. Нами было продемонстрировано, что протеаза, экспрессируемая микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D, может выполнять схожую функцию и поэтому выступает перспективным кандидатом для использования в медицине и ветеринарии, представляет собой более дешевую в получении альтернативу активаторам протеина С из змеиных ядов [11]. Кроме того, недавно была обнаружена способность данного фермента к эффективному разрушению биопленок, образуемых микроорганизмами *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* [12].

Протеаза-активатор протеина С (protease-activator of protein C, сокращенно РАРС) плазмы крови синтезируется в виде белка-предшественника, состоящего из трех частей: сигнальной последовательности (Met¹–Ala²¹), функция которой заключается в секреции фермента из клетки в культуральную среду; пропептидного домена или I9-домена (Pro²²–Asp¹²²), необходимого для корректного сворачивания полипептидной цепи в процессе созревания фермента; протеазного домена или S8-домена (Ala¹²³–Ala⁴⁰⁴), содержащего аминокислотную последовательность зрелой формы протеазы. Зрелая форма РАРС (Ala¹²³–Ala⁴⁰⁴) имеет два кальций-связывающих центра, стабилизирующих ее молекулу. Активный центр РАРС включает в себя каталитическую триаду (рис. 1), сформированную аминокислотными остатками Asp¹⁶³, His¹⁹⁴ и Ser³⁵⁰ [13].

Ген, кодирующий РАРС из *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, имеет сложную организацию (рис. 2). Ген от старт-кодона до стоп-кодона содержит

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование вектора для экспрессии и секреции белка PAPC в клетках *P. pastoris*.

Разработка продуцента рекомбинантного белка начинается с создания плазмидной конструкции, несущей целевой ген под контролем регулируемого промотора. В данной работе сконструирован вектор pD912-AFSnoEAEA-PAPC для экспрессии и секреции рекомбинантного белка PAPC в клетках *P. pastoris*. Карта вектора представлена на рис. 3. Кодировочная часть гена (CDS) *papc* состоит из трех частей. Первая кодирует лидерный (сигнальный) пептид AFSnoEAEA, отвечающий за секрецию белка в культуральную жидкость (КЖ); вторая – пропептидный домен, обеспечивающий правильный фолдинг в процессе созревания PAPC; третья – зрелый белок PAPC, обладающий протеолитической активностью. На рис. 4 приведены выровненные аминокислотные последовательности рекомбинантной протеазы PAPC, продуцируемой *P. pastoris* (rPAPC), нативного белка PAPC из *A. ochraceus* BKM-F4104D (nPAPC) и зрелой формы фермента (mPAPC). Из сравнения последовательностей видно, что отличие наблюдается в лидерном пептиде. Наиболее часто используемым для успешной

секреции рекомбинантных белков в *P. pastoris* служит сигнальный пептид AFS (MFα). Поэтому в нашей работе мы заменили сигнальный пептид PAPC из *A. ochraceus* BKM F-4104 на AFS (MFα) с некоторыми модификациями. На основании опыта работы с *P. pastoris* было замечено, что тетрапептид EAEA часто не отщепляется дрожжевой протеазой STE от целевого белка, поэтому в нашем случае лидерный пептид – AFSnoEAEA – не содержит последовательности тетрапептида EAEA. При этом стоит отметить, что в процессе секреции целевых белков в КЖ дрожжевая протеаза KEX *P. pastoris* очень активна в отношении последовательности AFSnoEAEA и всегда отщепляет лидерную последовательность AFSnoEAEA, оканчивающуюся трипептидом EKR.

Ген, кодирующий PAPC, в экспрессионном векторе pD912-AFSnoEAEA-PAPC находится под контролем сильного индуцибельного промотора AOX1. Индуктором в данном случае выступает метанол. Стоит отметить, что нуклеотидная последовательность гена *papc* не была специально оптимизирована с учетом частоты встречаемости кодонов под *P. pastoris*.

Таким образом, на первом этапе был сконструирован вектор pD912-AFSnoEAEA-PAPC

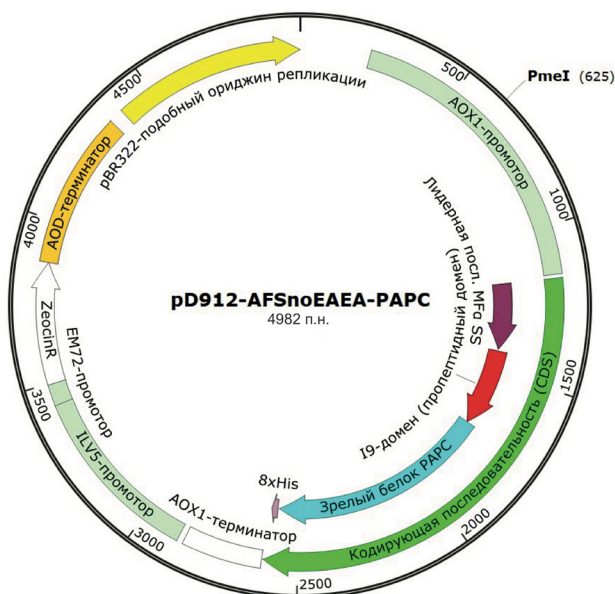


Рис. 3. Схема вектора pD912-AFSnoEAEA-PAPC, содержащего ген *PAPC* под контролем промотора AOX1, высококопийный бактериальный ориджин репликации и кассету, отвечающую за устойчивость к антибиотику зеоцину. Таким образом, ген *Zeocin^R* (*bleo^R*, *zeo^R*) – одновременно бактериальный и дрожжевой маркер селекции, что достигается за счет того, что ген *Zeocin^R* находится под контролем сразу двух промоторов: ILV5 и EM72. Указана рестриктаза PmeI, гидролиз по сайту которой приводит к линеаризации вектора.

rPAPC	MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVL PFSNSTN	60
nPAPC	-----MP---SFK	5
mPAPC	-----	0
rPAPC	NGLLFINTTIAASIAAKEEGVSLEKRMAPVENTRRASEKIAGKYIVTFKNGIDTAKIEQHT	120
nPAPC	QTL LLLGA-----MLPAVFGAPVENTRRASEKIAGKYIVTFKNGIDTAKIEQHT	54
mPAPC	-----	0
rPAPC	TWATNIHKRNLAARRDGSDDSDLVPGIEKKFKIKDFAAYFGSFDDSTIEEIRKSADVAHIE	180
nPAPC	TWATNIHKRNLAARRDGSDDSDLVPGIEKKFKIKDFAAYFGSFDDSTIEEIRKSADVAHIE	114
mPAPC	-----	0
rPAPC	EDQVWHLDA LTTQTGATWGLGSISHKGESSTSYVYDSSAGEGTGYVVDTGINVDHSEFG	240
nPAPC	EDQVWHLDA LTTQTGATWGLGSISHKGESSTSYVYDSSAGEGTGYVVDTGINVDHSEFG	174
mPAPC	-----ALTTQTGATWGLGSISHKGESSTSYVYDSSAGEGTGYVVDTGINVDHSEFG	52

rPAPC	GRASLAYNAVGGQHVDSVGHGTHVAGTIGGKTYGVSKKANLLSVKVFQGESSTSIILDG	300
nPAPC	GRASLAYNAVGGQHVDSVGHGTHVAGTIGGKTYGVSKKANLLSVKVFQGESSTSIILDG	234
mPAPC	GRASLAYNAVGGQHVDSVGHGTHVAGTIGGKTYGVSKKANLLSVKVFQGESSTSIILDG	112

rPAPC	YNWAANDIVSKSRTGKAAILSLGGGYSYAFNQAVENAFDEGVLTVVAAGNENSAGNTS	360
nPAPC	YNWAANDIVSKSRTGKAAILSLGGGYSYAFNQAVENAFDEGVLTVVAAGNENSAGNTS	294
mPAPC	YNWAANDIVSKSRTGKAAILSLGGGYSYAFNQAVENAFDEGVLTVVAAGNENSAGNTS	172

rPAPC	PASAPNALTVAASTNRNARASFSGYGVVDVFAPGQDIKSAWIGGSSATNTISGTSMATP	420
nPAPC	PASAPNALTVAASTNRNARASFSGYGVVDVFAPGQDIKSAWIGGSSATNTISGTSMATP	354
mPAPC	PASAPNALTVAASTNRNARASFSGYGVVDVFAPGQDIKSAWIGGSSATNTISGTSMATP	232

rPAPC	HIVGLAIYQLALEGLTSPAAVTKRIKELATSGVVDVKGSPNLLAYNGAALEHHHHHHHH	480
nPAPC	HIVGLAIYQLALEGLTSPAAVTKRIKELATSGVVDVKGSPNLLAYNGAA-----	404
mPAPC	HIVGLAIYQLALEGLTSPAAVTKRIKELATSGVVDVKGSPNLLAYNGAA-----	282

Рис. 4. Выравнивание аминокислотных последовательностей рекомбинантной протеазы rPAPC, продуцируемой *P. pastoris*, нативного белка nPAPC из *A. ochraceus* BKM-F4104D и зрелой формы фермента mPAPC. Фиолетовым цветом выделен лидерный пептид, отвечающий за секрецию, красным – пропептидный домен, зеленым – зрелая форма, розовым – октагистиновая последовательность, позволяющая проводить аффинную хроматографию, жирным шрифтом – аминокислотные основания, образующие каталитическую триаду. Выравнивание выполнено с использованием онлайн-сервиса Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>), предоставляемого EMBL's European Bioinformatics Institute.

для экспрессии и секреции в КЖ зрелого белка PAPC. CDS гена *papc* была подтверждена секвенированием (рис. 5). Вектор не поддерживается в клетках дрожжей, поэтому для создания штамма-продуцента необходимо внедрение вектора в хромосому *P. pastoris*. Для этого вектор линейаризовали по сайту PmeI и трансформировали им клетки *P. pastoris*. Внедрение вектора осуществляли за счет гомологичной рекомбинации в области АОХ1-промотора (см. карту вектора на рис. 3). Клоны отбирали по способности расти на плотной среде YPD (2% агар-агар), содержащей антибиотик зеоксин.

Селекция трансформантов и получение клонов-продуцентов. Отобранные после трансформации клоны, несущие ген *papc*, проанализировали ПЦР-скринингом на наличие вставки. Высев

полученных клонов на селективную агаризованную среду SA, содержащую YNB, казеин и метанол, позволил выполнить первичный скрининг на их способность к секреции активной формы фермента. Вокруг клонов, секретирующих активный фермент, наблюдали формирование характерных зон гидролиза казеина (рис. 6).

Далее клоны проверяли на способность секретировать целевой фермент в КЖ и сохранять эту способность после 60 генераций. Результаты анализа КЖ при помощи электрофореза представлены на рис. 7. Анализ показывает, что в процессе культивирования отобранных клонов наблюдается наработка и секреция в КЖ белка молекулярной массой ~30 кДа, что соответствует расчетной массе зрелого PAPC. Как видно, целевой белок

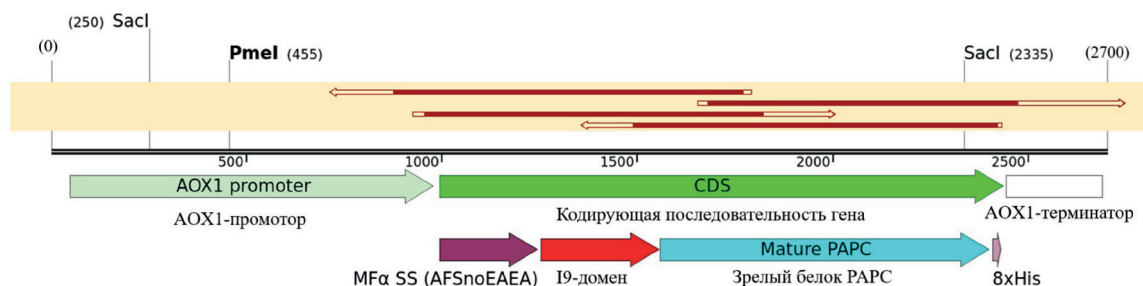


Рис. 5. Графически представлены результаты секвенирования CDS гена *papc* вектора pD912-AFSnoEAEA-PAPC. Коричневыми стрелками показана достоверно прочитанная область. Последовательность CDS была секвенирована в обоих направлениях: 5'→3' и 3'→5'. Анализ результатов секвенирования (хроматограмм) выполняли с помощью программы SnapGene (GSL Biotech, США).

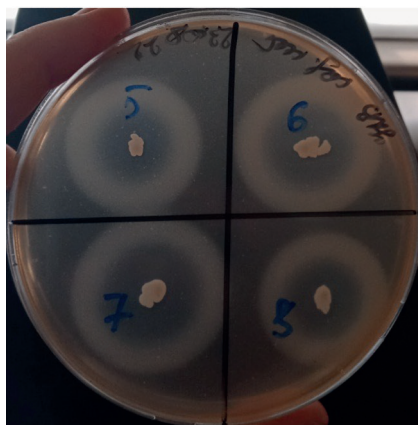


Рис. 6. Формирование зон гидролиза казеина при росте отобранных продуцирующих клонов *P. pastoris*, секретирующих активный фермент PAPC, на селективной среде SA.

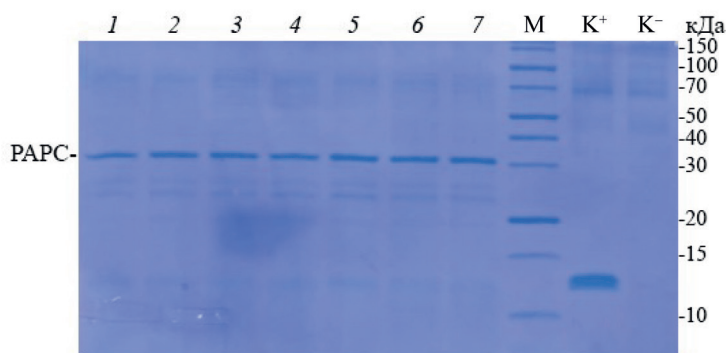


Рис. 7. Проверка стабильности продукции PAPC. Электрофореграмма КЖ различных клонов *P. pastoris* после 72-ч культивирования (72-ч культивирование проводилось после 120-ч культивирования на среде без антибиотика зеоцина) в условиях индукции синтеза белков: 1–7 – образцы КЖ после культивирования различных клонов штамма *P. pastoris*, содержащих встроенный вектор с геном *papc*; M – белковый маркер PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder (Bio-Rad, США); K⁺ – образец КЖ после культивирования штамма-продуцента монеллина; K⁻ – образец КЖ после культивирования нетрансформированного штамма *P. pastoris* BG10.

PAPC превалирует в КЖ отобранных клонов, при этом эндогенные белки клеток *P. pastoris* практически отсутствуют. При продолжительном культивировании штамм не утратил способность к продукции белка, вставка стабильна и без

давления отбора. Более того, штамм показывает высокую гомогенность, что критически важно для дальнейшего увеличения объемов наработки и/или проведения ферментации, а малое количество собственных белков продуцента в КЖ сильно

облегчает последующую очистку. Секретируемая форма белка также снимает вопрос дорогостоящего этапа разрушения биомассы.

Динамика накопления целевого фермента.

Для изучения динамики накопления целевого фермента в КЖ отобранный на этапе первичного скрининга наиболее эффективный продуцирующий клон засеивали в 50 мл среды BMGY, после чего культивировали в колбе объемом 500 мл с ватно-марлевой пробкой для увеличения интенсивности аэрации. На вторые сутки культивирования, после достижения суммарной оптической плотности культуры при 600 нм ~20 о.е., проводили индукцию синтеза целевого белка добавлением 50 мл ВММУ, в дальнейшем добавляя к культуре по 0.5 мл метанола дважды в сутки. Ежедневный анализ КЖ, приведенный на рис. 8, показал, что накопление целевого фермента начинается уже на первые сутки после индукции. На третьи-четвертые сутки культивирования после индукции наблюдали выход на максимальный уровень

накопления РАРС, который составил 640 ед./мл. Наблюдаемый выход целевого фермента в пересчете на объем культуры сопоставим с ранее полученными значениями в системе экспрессии *E. coli*, однако он может быть потенциально увеличен при проведении культивирования в ферментере с повышенным уровнем аэрации. При этом высокая обогащенность КЖ активным ферментом и простота его дальнейшей очистки при получении в *P. pastoris* дает значительное преимущество перед бактериальной системой экспрессии.

Масс-спектрометрия. Масс-спектрометрическое исследование показало (рис. 9), что все детектированные пептиды после трипсинолиза соответствуют фрагментам протеазного домена РАРС. Это свидетельствует о том, что целевой фермент накапливается в КЖ в зрелой форме, поскольку фрагменты пропептидного домена и сигнальной последовательности не были обнаружены.

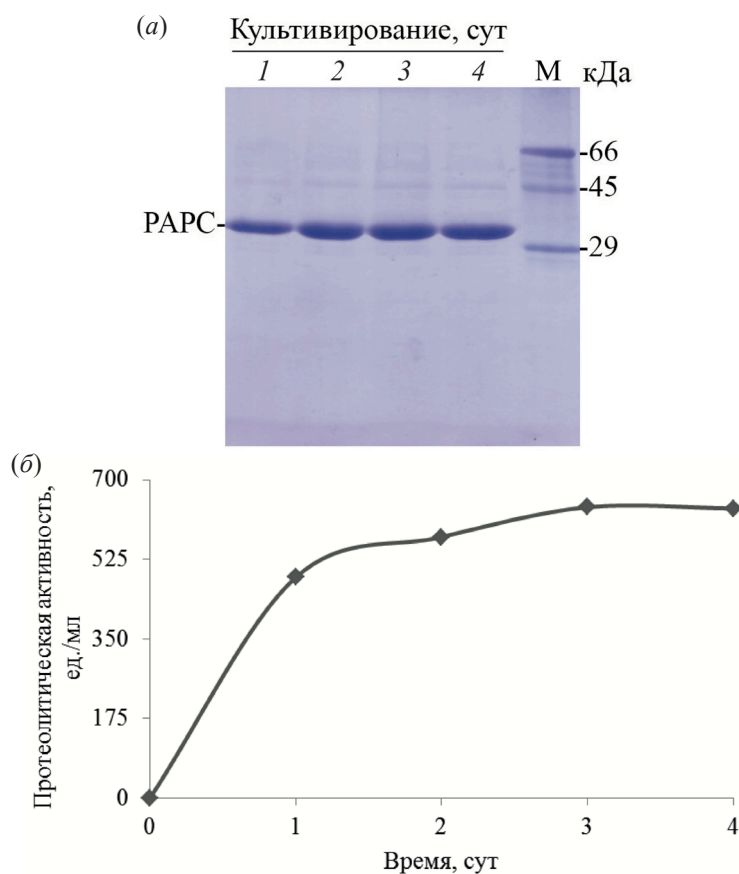


Рис. 8. Динамика накопления целевого фермента РАРС в культуральной жидкости полученного в работе продуцирующего клона *P. pastoris* при глубинном культивировании в колбе: белковый состав (а) и протеолитическая активность (б) в течение 4 сут после индукции белкового синтеза. М – белковый маркер: БСА, овальбумин, карбоангидраза (Merck, Германия).



Рис. 9. Результаты масс-спектрометрического анализа целевого фермента РАРС после экспрессии в *P. pastoris*. Показаны пептидные фрагменты протеазного домена РАРС, обнаруженные в ходе анализа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы, среды и условия культивирования.

Для стандартных генно-инженерных работ по наработке плазмидной ДНК и по сборке вектора использовали штаммы *E. coli* – *E. coli* 10G (F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) *endA1* *recA1* Φ 80*dlacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *araD139* Δ (*ara, leu*)7697*galU* *galK* *rpsL* *nupG* λ - *tonA* (StrR)) и XL-blue (*recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *hsdR17* *supE44* *relA1* *lac* [F'*proAB* *lacIqZ* Δ M15 *Tn10* (*Tetr*)]). В зависимости от задач, культивирование бактерий *E. coli* осуществляли в жидких средах LB (выращивание клеток после трансформации лигазной смесью) либо 2хYT (выращивание клеток для наработки плазмидной ДНК) и на чашках Петри, содержащих агаризованную среду 2хYT (2% агар-агара). При необходимости в среды для селекции *E. coli* добавляли ампициллин (Sigma-Aldrich, США), тетрациклин (Sigma-Aldrich, США) или зеонин (Thermo Fisher Scientific Inc., США) до конечных концентраций 100, 30 и 40 мкг/мл соответственно. Культивирование *E. coli* осуществляли обычно в 5 мл жидкой среды в 50-мл пробирке при 200–250 об/мин при 37°C.

В работе использовали штамм дрожжей *P. pastoris* BG10 (дикий тип). Дрожжи *P. pastoris* BG10 культивировали при 30°C. Все работы по генетической инженерии дрожжей проводили на средах YPD и YP. После трансформации *P. pastoris* линеаризованной плазмидной ДНК проводили

селекцию клеток на средах, содержащих антибиотик зеонин в необходимых концентрациях (100, 250, 500 мкг/мл). При консервации штаммов для создания клеточного криобанка (Master Cell Bank) использовали среду YPD, содержащую 30% глицерина. Штаммы клеточного банка хранили в криопробирках при –70°C. При скрининге клонов на продукцию целевого белка РАРС использовали чашки с агаризованной средой SA, а для глубинного культивирования отобранных клонов – жидкие питательные среды BMGY/BMMY. Состав питательных сред, использованных в работе, приведен в табл. 1.

Дизайн и сборка вектора. Стандартные генно-инженерные операции (приготовление компетентных клеток, трансформация *E. coli*, выделение плазмидной ДНК, проведение ПЦР, реакции рестрикции и лигирования ДНК, ДНК-электрофорез в агарозном геле) проводили в соответствии с лабораторным руководством по молекулярному клонированию и инструкциями компаний-производителей реактивов, а также с рекомендациями по сборке векторов с помощью систем MoClo [17, 18]. Все ферменты для молекулярных работ были от компании New England Biolabs (США). В работе применяли наборы для выделения плазмидной ДНК и ПЦР-скрининга отдельных колоний клеток от компании Евроген (Россия).

Таблица 1. Состав питательных сред, использованных в работе

№	Питательная среда	Состав, г/л	pH
1	BMGY	Пептон – 20, дрожжевой экстракт – 10, K ₂ HPO ₄ – 17.4, YNB без аминокислот – 13.4, глицерин – 10	7.5
2	BMMY	Пептон – 20, дрожжевой экстракт – 10, K ₂ HPO ₄ – 17.4, YNB без аминокислот – 13.4, метанол – 10	7.5
3	LB (Lysogeny Broth)	Триптон – 10, дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 5	7.5
4	SA	YNB без аминокислот – 13.4, K ₂ HPO ₄ – 17.4, казеин – 10, агар-агар – 20, метанол – 10	7.5
5	YP	Пептон – 20, дрожжевой экстракт – 10	6.5
6	YPD	Пептон – 20, дрожжевой экстракт – 10, декстроза – 20	6.5
7	2xYT	Триптон – 16, дрожжевой экстракт – 10, NaCl – 5	7.0

Дизайн праймеров и виртуальную сборку вектора осуществляли с помощью программного обеспечения SnapGene (GSL Biotech, США). Термодинамические характеристики праймеров рассчитывали с использованием онлайн-сервиса OligoAnalyzer Tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Праймеры для наработки ПЦР-фрагментов ДНК были синтезированы компанией Евроген (Россия), последовательности праймеров приведены в табл. 2.

Плазмида pET23-PAPC, полученная нами ранее, послужила в качестве источника гена *parc* [13]. В качестве материнского вектора использовали плазмиду pD912, содержащую последовательность сигнального пептида AFSnoEAEA. Кодировующую часть гена (CDS) *parc* и вектор амплифицировали с помощью ПЦР (первичная денатурация 98°C – 30 с; далее 25 циклов: денатурация 98°C – 10 с, отжиг праймеров 63°C – 15 с для вектора и для гена, элонгация 72°C – 2 мин для вектора, 72°C – 45 с для гена; финальная элонгация после 25 циклов – 72°C, 2 мин; термочиклер MJ

Mini Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, США). В результате ПЦР в ДНК-последовательности вектора pD912 и CDS гена *parc* были включены сайты узнавания эндонуклеазы рестрикции Пс-типа – BsaI. Применение ферментов подобного типа позволяет в одной пробирке без дополнительных стадий очистки проводить реакцию рестрикции самим ферментом (для образования “липких” концов), обработку эндонуклеазой DpnI (для разрушения исходной матричной метилированной ДНК), а также лигирование [17].

Приготовление компетентных клеток, трансформацию *E. coli* лигазной смесью, ПЦР-скрининг, культивирование *E. coli*, выделение и очистку плазмидной ДНК для передачи образцов на секвенирование проводили в соответствии с лабораторным руководством по молекулярному клонированию и инструкциями к наборам Евроген (Россия) [18]. Полученный вектор секвенировали в компании Евроген (Россия), используя праймеры, указанные в табл. 3.

Таблица 2. Праймеры для сборки плазмиды pD912-AFSnoEAEA-PAPC

№	Название	Последовательность (5'→3')
1	tAOX1-F-BsaI	TTCTTTGGTCTC ATAGT GAATCCTCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTG
2	AFSd-R-BsaI	TTCTTTGGTCTC ACATT TCTTTTCTCGAGAGATACCCCTTCTTCTTAGC
3	2fProtK	TTTCTTGGTCTC GAA TGGCTCCCGTCGAGAACACC
4	3bProtK	TTCTTTGGTCTC AACTA TGATGGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTC

Примечание: подчеркнутые последовательности GGTCTC – сайты узнавания рестриктазой BsaI. Выделенные полужирным шрифтом последовательности – образующиеся “липкие” концы после рестрикции.

Таблица 3. Праймеры для секвенирования CDS гена *parc* полученного вектора pD912-AFSnoEAEA-PAPC

№	Название	Последовательность (5'–3')
1	Primer124_5fAOX1seq	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
2	Primer125_3fAOX1seq	GCAAATGGCATTCTGACATCC
3	1fProtKseq	AGCTACGTCTACGACTCCAGC
4	1bProtKseq	CTTCTTGGAGACACCGTAGGTCTT

Отбор клонов *P. pastoris* со встроенным вектором pD912-AFSnoEAEA-RAPC, секретирующих РАРС. Для эффективной интеграции в геном дрожжей вектор pD912-AFSnoEAEA-RAPC линейаризовали при помощи рестриктазы PmeI согласно инструкции компании-производителя (NEB, США) и очищали с использованием набора Cleanup Mini (Евроген, Россия). Приготовление электрокомпетентных клеток *P. pastoris* и их трансформацию проводили согласно стандартным протоколам [19]. Электропорацию клеток осуществляли на приборе Gene Pulser® II (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием стерильных 0.2-см кювет (Bio-Rad Laboratories, США) при напряжении пультса 1.5 кВ. Для селекции клонов, несущих встроенную кассету, клетки после электропорации высевали на агаризованную среду YPD с добавлением антибиотика зеоцина в конечных концентрациях 100, 250 и 500 мкг/мл. Устойчивые к зеоцину клоны далее проверяли на способность секретировать в КЖ целевой фермент. Для этого единичную колонию засеивали в 2 мл жидкой среды YP и культивировали при 30°C в течение 24 ч. После 24 ч культивирования проводили индукцию синтеза РАРС при помощи индуктора – метанола до 1% от объема культивирования, далее такое же количество метанола вносили ежедневно. После 72 ч индукции КЖ отделяли от клеток при помощи центрифугирования (8000g, 3 мин). К 30 мкл полученного супернатанта добавляли 10 мкл 4× буфера для нанесения образцов, прогревали в течение 10 мин при 95°C и наносили по 10 мкл в лунки 10%-ного ПЛАГ. Электрофорез проводили в трис-трициновой буферной системе согласно стандартной процедуре [20]. В качестве положительного контроля при проведении электрофореза после наработки белка использовали КЖ штамма-продуцента монеллина, в качестве отрицательного контроля – КЖ исходного штамма *P. pastoris* BG10.

Штаммы-продуценты проверяли на способность сохранять встроенную кассету и секрецию РАРС на временном промежутке, соответствующем не менее 60 генераций клеток. Для этого культуры выращивали в течение 5 сут (120 ч) на среде YPD с ежедневным пересевом, без добавления селективного антибиотика зеоцина. После этого проводили 72-ч индукцию, как описано выше, и анализировали при помощи ПЦР с геномной ДНК с парами праймеров (табл. 1), а секрецию РАРС – методом белкового электрофореза в 10%-ном ПЛАГ (см. выше) [20, 21].

Масс-спектрометрия. Гидролиз белков трипсином в ПЛАГ. Гидролиз белков в 10%-ном ПЛАГ проводили, как описано ранее [22], с небольшими модификациями. Вырезанные полосы из геля, окрашенные Кумасси, нарезали на небольшие кусочки (~1 × 1 мм), обескрашивали 50%-ным ацетонитрилом в 200 М бикарбонате аммония в течение 30 мин, дегидрировали чистым ацетонитрилом в течение 15 мин и высушивали на вакуумном центрифужном концентраторе SpeedVac (Savant, Франция) в течение 10 мин. Для восстановления и алкилирования остатков цистеина к высушенным кусочкам геля добавляли раствор, содержащий 50 мМ бикарбоната аммония, 10 мМ ТСЕР (трис(2-карбоксиэтил)фосфин) и 20 мМ 2-хлороацетамида, образец инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Далее избыток раствора отбирали и отбрасывали, а к кусочкам геля добавляли достаточное количество раствора трипсина (15 нг/мкл в 50 мМ растворе бикарбоната аммония), чтобы покрыть кусочки геля, и оставляли инкубироваться при 37°C в течение ночи. Для того чтобы экстрагировать из геля образовавшиеся триптические фрагменты белков, к образцам добавляли три объема, занимаемые кусочками геля, раствора 0.2%-ной ТФУ в воде, образец инкубировали на шейкере при комнатной температуре в течение 1 ч. Раствор пептидов переносили в новую пробирку, высушивали досуха на вакуумном центрифужном концентраторе SpeedVac и хранили при –80°C. Перед анализом пептиды растворяли в 20 мкл раствора, содержащего 2% ацетонитрила, 97.9% воды и 0.1% ТФУ.

Гидролиз белков трипсином в растворе. Аликвоту раствора, содержащего 20 мкг белка, высушивали досуха на центрифужном вакуумном концентраторе SpeedVac и растворяли в 20 мкл буферного раствора, содержащего 100 мМ Трис, pH 8.5, 1% дезоксихолата натрия, 10 мМ ТСЕР и 20 мМ 2-САА (2-хлороацетамид), прогревали в течение 10 мин при 85°C, охлаждали до комнатной температуры. К раствору белка добавляли 0.4 мкг трипсина в 10 мкл 100 мМ Трис, pH 8.5, и оставляли инкубироваться при 37°C на ночь. По окончании инкубации к реакционной смеси добавляли равный объем 2%-ной ТФУ, пептиды обессоливали на микроколонке SDB-RPS StageTip, изготовленной из наконечника для автоматической пипетки на 200 мкл и трех кусочков мембраны

SDB-RPS (3M, США), вырезанных иглой калибром 16 [23]. Раствор пептидов наносили на микроколону центрифугированием при 300g, промывали смесью растворителей 50 мкл 1%-ной ТФУ: 50 мкл этилацетата (2 раза), 50 мкл 0.2%-ной ТФУ и элюировали 60 мкл раствора, содержащего 5% гидроксида аммония и 60% ацетонитрила в воде. Элюат высушивали досуха и хранили при -80°C . Перед анализом пептиды растворяли в 40 мкл раствора, содержащего 0.1% ТФУ и 2% ацетонитрила в воде.

Хромато-масс-спектрометрический анализ. Образцы загружали на изготовленную в лаборатории предколону 50×0.1 мм, упакованную сорбентом Reprosil-Pur 200 C18-AQ 5 мкм (Dr. Maisch, Германия), в растворе, содержащем 2% ацетонитрила, 97.9% H_2O , 0.1% ТФУ, при скорости потока 4.2 мкл/мин и разделяли при комнатной температуре на колонке из плавленного кварца 300×0.1 мм с эмиттером, изготовленной на приборе P2000 Laser Puller (Sutter, США) и упакованной в лаборатории сорбентом Reprosil PUR C18AQ 1.9 (Dr. Maisch). Обращенно-фазовую хроматографию проводили на хроматографе Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific, США), соединенном с масс-спектрометром Orbitrap Lumos Tribrid (Thermo Fisher Scientific) посредством наноэлектроспрейного источника (Thermo Fisher Scientific). Для хроматографического разделения пептидов использовали систему растворителей А (99.9% воды, 0.1% муравьиной кислоты) и Б (19.9% воды, 0.1% муравьиной кислоты, 80% ацетонитрила). Пептиды элюировали с колонки линейным градиентом: 3–4% Б за 5 мин, 4–40% Б за 53 мин, 40–60% Б за 7 мин, 60–99% Б за 0.1 мин, 99% Б за 6 мин, 99–3% Б за 0.1 мин при скорости потока 500 нл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили со следующими настройками прибора: MS1-сканирование: разрешение 60 000, диапазон сканирования: 350–1600 m/z , максимальное время инъекции ионов – auto, уровень AGC – standard, MS2-сканирование: разрешение 15 000, HCD-фрагментация с энергией 30%, максимальное время инъекции ионов – 80 мс, уровень AGC – standard.

Анализ масс-спектрометрических данных. Масс-спектрометрические данные анализировали при помощи компьютерной программы Peaks studio 10.0 (Bioinformatics Solutions Inc., США) [24]. Идентификацию белков проводили посредством корреляции тандемных масс-спек-

тров с базой данных белковых последовательностей *E. coli*, к которой была добавлена аминокислотная последовательность целевого белка, со следующими параметрами: постоянная модификация Cys – карбамидометилирование, переменные модификации – деамидирование Asn/Gln, окисление Met и ацетилирование *N*-концевой аминокислотной группы, допустимый уровень ложноположительных identifications пептидов – 0.01, специфичность протеазы – C-конец Arg и Lys (при поиске в базе данных допускалось до трех пропущенных сайтов гидролиза). При идентификации пептидов допускалось отклонение экспериментально полученной массы пептида от его теоретической массы до 10 м.д., а отклонение массы фрагментов – до 0.05 Да.

Протеолитическая активность. Общую протеолитическую активность в КЖ измеряли модифицированным методом Ансона–Хагихары, заключающимся в определении количества тирозина в неосаждаемых трихлоруксусной кислотой (ТХУ) продуктах протеолиза после 30-мин гидролиза 1%-го раствора казеина в 100 мМ Трис-НCl, 1 мМ CaCl_2 , pH 8.0, при 37°C . К 10 мкл анализируемой КЖ добавляли 190 мкл буфера, после чего смешивали с 400 мкл раствора казеина и инкубировали для проведения гидролиза. Останавливали реакцию добавлением 600 мкл 10%-ной ТХУ. Для формирования осадка пробирки после проведения реакции выдерживали 30 мин при комнатной температуре, после чего центрифугировали в течение 10 мин при 10 000g и определяли оптическое поглощение супернатанта при 275 нм. За единицу активности (ед.) принимали количество фермента, которое за 1 мин в условиях определения высвобождает 1 нмоль тирозина, для расчетов строили калибровочную кривую [25, 26].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспрессируемая микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D протеаза РАРС может выполнять схожую функцию с протеазами-активаторами протеина С из змеиных ядов, поэтому выступает перспективным кандидатом для использования в медицине и ветеринарии в качестве основного компонента набора по анализу свертываемости крови. Ранее было показано, что получение протеазы РАРС, экспрессируемой непосредственно микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D, представляет собой более дорогостоящий способ

получения по сравнению с рекомбинантной продукцией в *E. coli*. В данной работе была рассмотрена альтернативная система экспрессии на основе дрожжей *P. pastoris*. Был сконструирован вектор, несущий ген *rapc*. Этим вектором были трансформированы дрожжи *P. pastoris*, проведена селекция трансформантов на среде, содержащей антибиотик зеоцин. При помощи селекции на агаризованной среде с казеином, а также анализа культуральной жидкости методом белкового электрофореза были отобраны наиболее эффективные клоны-продуценты целевого фермента. Исследована динамика накопления активной формы РАРС в культуральной жидкости после индукции белкового синтеза при глубинном культивировании продуцирующего клона в колбе. Таким образом, были получены штаммы-продуценты РАРС на основе дрожжей *P. pastoris*.

Секреция дрожжами активной растворимой формы РАРС в культуральную жидкость потенциально должна упростить и удешевить очистку по сравнению с выделением из *E. coli*, т.к. не будет содержать стадий разрушения клеток, отмывки телец включения и ренатурации фермента. Полученный в результате работы штамм-продуцент может быть использован для дальнейшего получения экспериментальных промышленных партий фермента на биотехнологических производствах, поддерживающих проведение дрожжевой ферментации.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 25-24-00020, Е.В. Локтюшов, <https://rscf.ru/project/25-24-00020/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования. Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

СКК – написание оригинального черновика статьи, экспериментальная часть, обработка данных; ЮСЛ – редактирование текста статьи; РХЗ – экспериментальная часть; ВВФ – экспериментальная часть; ВНС – разработка концепта; ААО – разработка концепта; КАМ – редактирование текста статьи; ЕВЛ – управление проектом,

редактирование текста статьи, экспериментальная часть, получение финансирования.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Banerjee G., Ray A.K. // Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 2017. V. 33. P. 119–143. <https://doi.org/10.1080/02648725.2017.1408256>
2. Frolova A.S., Chepikova O.E., Deviatkina A.S., Solonkina A.D., Zamyatnin A.A. // Biology (Basel). 2023. V. 12. P. 797. <https://doi.org/10.3390/biology12060797>
3. Jabalia N., Chaudhary N. // GSTF J. BioSci. 2015. V. 3. P. 15–19. <https://doi.org/10.7603/s40835-014-0005-8>
4. Zhang Y., Huang H., Yao X., Du G., Chen J., Kang Z. // Bioresour. Technol. 2017. V. 247. P. 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.006>
5. Ramirez-Larrosa J.S., Eckhard U. // Biomolecules. 2022. V. 12. P. 1–19. <https://doi.org/10.3390/biom12020306>
6. Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Kurakov A.V., Egorov N.S. // Appl. Biochem. Microbiol. 2013. V. 49. P. 581–586. <https://doi.org/10.1134/S0003683813060148>
7. Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Kurakov A.V., Baranova N.A., Egorov N.S. // Appl. Biochem. Microbiol. 2012. V. 48. P. 488–492. <https://doi.org/10.1134/S0003683812050109>
8. Bouwens E.A., Stavenhagen F., Mosnier L.O. // J. Thromb. Haemost. 2013. V. 11. P. 242–253. <https://doi.org/10.1111/jth.12247>
9. Mohammed S., Favaloro E.J. // Methods Mol. Biol. 2017. V. 1646. P. 137–143. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7196-1_10
10. Gempeler-Messina P.M., Volz K., Buhler B., Muller C. // Haemostasis. 2001. V. 31. P. 266–272. <https://doi.org/10.1159/000048072>
11. Osmolovskiy A.A., Orekhova A.V., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. // Biomed. Khim. 2018. V. 64. P. 115–118. <https://doi.org/10.18097/PBMC20186401115>
12. Nasr A.R., Komarevtsev S.K., Baidamshina D.R., Ryskulova A.B., Makarov D.A., Stepanenko V.N., Trizna E.Y., Gorshkova A.S., Osmolovskiy A.A., Miroshnikov K.A., Kayumov A.R. // Biochimie. 2025. V. 230. P. 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2024.11.002>
13. Komarevtsev S.K., Evseev P.V., Shneider M.M., Popova E.A., Tupikin A.E., Stepanenko V.N., Kabilov M.R., Shabunin S.V., Osmolovskiy A.A., Miroshnikov K.A. // Microorganisms. 2021. V. 9. P. 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091936>

14. Komarevtsev S.K., Popova E.A., Kreyer V.G., Miroshnikov K.A., Osmolovskiy A.A. // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. P. 32–36.
<https://doi.org/10.1134/S0003683820010093>
15. Pan Y., Yang J., Wu J., Yang L., Fang H. // Front. Microbiol. 2022. V. 13. P. 1059777.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1059777>
16. Zhang Q., Wang X., Luo H., Wang Y., Tu T., Qin X., Su X., Huang H., Yao B., Bai Y., Zhang J. // Microb. Cell Fact. 2022. V. 21. P. 112.
<https://doi.org/10.1186/s12934-022-01837-x>
17. Marillonnet S., Grutzner R. // Curr. Protoc. Mol. Biol. 2020. V. 130. P. 115.
<https://doi.org/10.1002/cpm.b.115>
18. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd Ed. / Ed. Nolan C. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
19. Lin-Cereghino J., Wong W.W., Xiong S., Giang W., Luong L.T., Vu J., Johnson S.D., Lin-Cereghino G.P. // Biotechniques. 2005. V. 38. P. 44–48.
<https://doi.org/10.2144/05381BM04>
20. Schagger H. // Nat. Protoc. 2006. V. 1. P. 16–22.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
21. Looke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. // Biotechniques. 2011. V. 50. P. 325–328.
<https://doi.org/10.2144/000113672>
22. Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J.V., Mann M. // Nat. Protoc. 2006. V. 1. P. 2856–2860.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>
23. Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y. // Nat. Protoc. 2007. V. 2. P. 1896–1906.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.261>
24. Ma B., Zhang K., Hendrie C., Liang C., Li M., Doherty-Kirby A., Lajoie G. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2003. V. 17. P. 2337–2342.
<https://doi.org/10.1002/rcm.1196>
25. Anson M.L. // Science. 1935. V. 81. P. 467–468.
<https://doi.org/10.1126/science.81.2106.467>
26. Hagihara B., Matsubara H., Nakai M., Okunuki K. // J. Biochem. 1958. V. 45. P. 185–194.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a126856>

Construction of a Producer Strain of the Fibrinolytic Enzyme PAPC Based on *Pichia pastoris* Yeast

S. K. Komarevtsev*, Yu. S. Lapteva**, R. H. Ziganshin*, V. V. Farofonova**,
V. N. Stepanenko***, A. A. Osmolovsky****,
K. A. Miroshnikov*, ****, and E. V. Loktyushov**, #

Phone: +7 (920) 758-89-36; e-mail: zhenyaloktyushov@gmail.com

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

** Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences,
Institute for Biological Instrumentation,
prosp. Nauki 3, Pushchino, 142290 Russia

*** Sechenov First Moscow State Medical University, ul. Trubetskaya 8/2, Moscow, 119991 Russia

**** Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Leninskiye gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

Yeast *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) is widely used in food and pharmaceutical industries as microbial cell factories of recombinant proteins due to its ability to heterologously overexpress many target proteins, including proteolytic enzymes. Protease-activator of protein C (PAPC) of blood plasma from micromycete *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D can potentially be introduced into therapeutic practice as a fibrinolytic drug and into diagnostic systems for blood coagulation analysis as the main component that activates protein C. To solve problems of using protease-activator of protein C in medicine and veterinary science, it is important to have a reliable system to produce the recombinant enzyme. Such a production system can be created on the basis of yeast. The aim of this work was to construct a PAPC-producing strain based on *P. pastoris* and to demonstrate effective production and secretion of the recombinant enzyme into the culture fluid. We assembled a vector carrying the *papc* gene. This vector was used to transform *P. pastoris* yeast, and transformants were selected on a zeocin-containing medium. The clones most effectively producing the target enzyme were selected using agar medium with casein and analysis of the culture fluid by SDS-PAGE. The dynamics of accumulation of the active form of PAPC in the culture fluid after induction of protein synthesis during submerged cultivation of the producing clone in a flask was studied. LC-MS analysis confirmed the presence of the enzyme in the culture medium and demonstrated that accumulation occurs in the mature active form. The obtained strain can be used for further production of experimental industrial batches of the enzyme in biotechnological production facilities that support yeast fermentation.

Keywords: PAPC, yeast expression, *Pichia pastoris*