

на правах рукописи

Беленькая Светлана Валерьевна

СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА АЛТАЙСКОГО
МАРАЛА (*CERVUS CANADENSIS SIBIRICUS*)

1.5.3 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

р.п. Кольцово – 2021

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный
руководитель: Щербаков Д.Н., кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник отдела биоинженерии
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Официальные
оппоненты: Гончар Д.А., кандидат биологических наук, зам.
директора по производству ООО «СибЭнзим».

Меркулова Т.И., доктор биологических наук,
главный научный сотрудник лаборатории регуляции
экспрессии генов ФГБНУ ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

Ведущая
организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт молекулярной и
клеточной биологии Сибирского отделения
Российской академии наук

Защита состоится «__» ____ 2021 г. в ____ на заседании диссертационного
совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки
«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская
область, тел.: +7(383)363-47-00.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ
ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Непомнящих Т.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Аспарагиновые протеазы представляют собой широко распространенный класс ферментов, обнаруженных у вирусов, бактерий, архей и эукариотов. Широкий спектр функций, выполняемых АП в живой природе, является причиной их интенсивного использования в различных отраслях хозяйственной деятельности. Такие АП как химозин, пепсин, некоторые растительные и грибные ферменты используют в качестве добавок при ферментации и производстве различных продуктов (Barbano and Rasmussen 1992; Kitts and Weiler 2003; Laloi et al. 2002). Понимание механизмов работы АП привело к разработке и внедрению фармпрепаратов. Одна из больших групп которых, являются ингибиторами активности протеаз, участвующих в развитии патологических состояний. К ним относятся пепсин при язвенной болезни, ренин при гипертонии (Scott, McGeehan, and Harrison 2006), плазмепсины при малярии (Coombs et al. 2001), катепсин D при метастазах рака (Benes, Vetricka, and Fusek 2008), катепсин E при аутоиммунных заболеваниях (Zaidi and Kalbacher 2008), пептидазы ВИЧ (Wlodawer and Erickson 1993) и ВАСЕ при болезни Альцгеймера (Dominguez, Hartmann, and De Strooper 2004).

Химозины – это представители семейства аспарагиновых пепсиноподобных протеаз, которые участвуют в высокоспецифичном гидролизе каппа-казеина в желудке млекопитающих на ранних этапах постнатального развития. Для некоторых представителей этой группы ферментов описан феномен перекрестной субстратной специфичности, то есть отсутствие снижения или даже повышения ферментативной активности в отношении близкого по структуре, но не тождественного основному природному субстрату. Это означает, что химозины некоторых млекопитающих способны эффективно гидролизовать к-казеины других, даже эволюционно отдаленных, видов. Например, рекомбинантный химозин одногорбого верблюда демонстрирует феномен перекрестной субстратной специфичности в отношении к-казеина коровьего молока. Кроме того, имеются данные о том, что такая же способность присуща химозином некоторых представителей семейства Оленевые (*Cervidae*), однако природа этого явления до сих пор не ясна.

Увеличение объема данных о нуклеотидных и аминокислотных последовательностях, вторичной и третичной структуре, а также биохимических свойствах ферментов группы химозинов расширит имеющиеся знания, касающиеся связи структуры этого фермента и его свойств. Понимание того, как изменение структуры белка может повлиять на его биохимические свойства, открывает широкие перспективы для инженерной энзимологии.

Цель и задачи исследования

Цель работы: Получить рекомбинантный химозин алтайского марала (*Cervus canadensis sibiricus*) и изучить его биохимических свойства.

Задачи:

1. Определить нуклеотидную последовательность участка ДНК алтайского марала, соответствующую гену химозина. Установить структурную организацию секвенированного гена.
2. Провести дизайн генов, оптимизированных для экспрессии в системах *Escherichia coli* и *Kluyveromyces lactis*, и конструирование рекомбинантных векторов, обеспечивающих экспрессию искусственных генов в выбранных системах.
3. Получить штаммы-продуценты рекомбинантного прохимозина алтайского марала на основе *E.coli* и *K.lactis*. Провести выделение и очистку целевых белков.
4. Провести анализ некоторых биохимических свойств полученных рекомбинантных ферментов.

Научная новизна и теоретическая значимость работы

1. Впервые определена полная нуклеотидная последовательность гена химозина алтайского марала, депонированная в GenBank под номером MT225406.
2. Впервые установлена экзон/интронная организация и реконструирована последовательность мРНК гена, кодирующего препрохимозин алтайского марала.
3. Сконструированы экспрессионные вектора, обеспечивающие наработку рекомбинантного фермента в системе *Escherichia coli* и *Kluyveromyces lactis*.
4. Получены рекомбинантные штаммы продуценты прохимозина алтайского марала в про- и эукариотической системе экспрессии.
5. Для представителя химозинов семейства Оленевых впервые проведен анализ основных биохимических и технологических свойств.

Практическая значимость работы

Разработан рекомбинантный вектор pSVB способный обеспечить интеграцию в геном *Kluyveromyces lactis* экспрессионных кассет, содержащих автоиндуцибельный промотор. Полученный вектор открывает перспективы для создания высокоэффективных дрожжевых продуцентов белков, востребованных в хозяйственной деятельности, в том числе рекомбинантных ферментов для пищевой отрасли и сельского хозяйства. Получен рекомбинантный аналог химозина алтайского марала, обладающий комплексом технологических свойств привлекательных для сыроделия. Фермент может быть востребован предприятиями производителями сыров.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Ген препрохимозина алтайского марала состоит из 9 экзонов и 10 интронов общей длиной 11161 п.н. Реконструированная последовательность мРНК гена препрохимозина составляет 1146 нуклеотидов.

2. Спроектированная экспрессионная кассета, содержащая кодирующую часть гена прохимозина алтайского марала размером 1095 п.н., встроенная в плазмидный вектор pET21a, обеспечивает синтез рекомбинантного химозина алтайского марала в клетках *Escherichia coli*.

3. Разработанный экспрессионный вектор pSVB-Cer, содержащий такие структурные элементы как гибридный промотор, включающий коровую последовательность промотора глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы и регуляторную последовательность промотора изоцитрат лиазы, лидерную сигнальную последовательность белка α -MF и терминаторную область гена CYS1, обеспечивает синтез и секрецию рекомбинантного химозина алтайского марала в дрожжах *Kluyveromyces lactis*.

4. Рекомбинантный химозин алтайского марала, полученный в прокариотической системе экспрессии, обладает следующими характеристиками:

- параметры кинетики Михаэлиса-Ментен: $V_{max} = 177 \pm 20$ нМ/сек, $K_m = 1,27 \pm 0,03$ мкМ; $k_{cat} = 3,54$ сек⁻¹; $k_{cat}/K_m = 2,79$ мкМ⁻¹·сек⁻¹.
- молокосвертывающая активность: 52955 ± 2184 УЕ/мг
- общая протеолитическая активность: 114%
- специфичность: 0.56
- термостабильность: 57,5°C.

5. Рекомбинантный химозин алтайского марала, полученный в дрожжевой системе экспрессии, обладает следующими характеристиками:

- параметры кинетики Михаэлиса-Ментен: $V_{max} = 1281 \pm 189$ нМ/сек; $K_m = 9,20 \pm 0,03$ мкМ; $k_{cat} = 25,63$ сек⁻¹; $k_{cat}/K_m = 2,79$ мкМ⁻¹·сек⁻¹.
- молокосвертывающая активность: 71719 УЕ/мг
- общая протеолитическая активность: 119%
- специфичность: 0.72
- термостабильность: 43°C

Апробация работы и публикации

Результаты диссертационной работы отражены в 9 публикациях в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 5 статей опубликованы в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты диссертаций, 4 тезиса докладов на всероссийских и международных конференциях. Получены 3 патента РФ.

Результаты работы были представлены на различных научных конференциях, в том числе: Международный форум. Биотехнология:

состояние и перспективы развития (Москва, 2018 г.); VI Международной конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Кольцово, 2019 г.).

Вклад автора

Выделение геномной ДНК алтайского марала проводилась лично автором. Секвенирование, установление экзон/интронной организации и реконструирование последовательности мРНК гена препрохимозина алтайского марала проводилось Бондарем А.А. совместно с автором. Оптимизация нуклеотидной последовательности для экспрессии в системе *Escherichia coli* и *Kluyveromyces lactis* проводилась автором совместно с Щербаковым Д.Н. Дизайн рекомбинантных векторов, обеспечивающих экспрессию искусственных генов в системе *Escherichia coli* и *Kluyveromyces lactis*, проводилась автором совместно с Щербаковым Д.Н. Конструирование рекомбинантных плазмид, получение штаммов продуцентов на основе *Escherichia coli* и *Kluyveromyces lactis*, выделение и очистка рекомбинантного прохимозина алтайского марала проводилась лично автором. Определение молокосвертывающей активности, термостабильности, зависимости молокосвертывающей активности от pH и концентрации катионов кальция, определение константы Михаэлиса для полученных ферментов проводилась автором совместно с Кургиной Т.А. и Ельчаниновым В.В.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 115 страницах, содержит 11 таблиц и 22 рисунка. Библиографический список включает 130 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Определение нуклеотидной и аминокислотной последовательности прохимозина алтайского марала

Первым этапом работы было установление нуклеотидной последовательности и определение экзон/интронной организации гена, кодирующего препрохимозин алтайского марала. Для этого из лимфоцитов животных выделяли геномную ДНК.

Для подтверждения видовой принадлежности выделенной ДНК заявленному таксону *Cervus canadensis sibiricus* были амплифицированы и секвенированы фрагменты митохондриального генома с использованием праймеров МТСВ_F (5'-CCGCCATAAATAGGNGAAGG-3') и МТСВ_R (5'-WAGAAYTTCAGCTTTGGG-3'). Необходимо отметить, что в базе данных GenBank присутствуют несколько структур МТ-СУВ подвидов

Cervis canadensis, в названии которых латинское «maral» упоминается как общее название благородного оленя, обитающего на территории Ирана и Турции, что перекликается с алтайским маралом, но не означает генетической с ним идентичности. Полученную нами нуклеотидную последовательность гена МТ-СУВ *C.c. sibiricus* (рег. номер GenBank MT331597) мы сравнили со структурами соответствующего участка митохондриальной ДНК для 12 подвидов благородного оленя *Cervis elaphus*, доступных в базе данных GenBank. Как и предполагалось, секвенированная структура гена МТ-СУВ *C.c.sibiricus* соответствует алтайскому маралу и почти идентична структуре, известной для подвида *C.e.canadensis*, который является синонимом *C.c.sibiricus* согласно систематике Павлинова, и образует с ним отдельную кладу на филогенетическом древе цитохрома В *Cervis elaphus* (Павлинов И. Я., 2006).

Далее была проведена работа по установлению структуры гена препрохимозина алтайского марала. На основании анализа нуклеотидных последовательностей генов химозинов, представленных в базе данных GenBank, было сделано предположение о том, что длина целевого гена составляет около 11 000 п.н. В связи с этим были рассчитаны две пары праймеров для получения двух перекрывающихся фрагментов гена химозина алтайского марала. С использованием подобранных праймеров были получены левые и правые перекрывающиеся фрагменты (примерно по 6000 п.н.) целевого гена. ДНК всех фрагментов клонировали в составе вектора pJet с последующим секвенированием по Сенгеру.

Для подтверждения принадлежности к гену химозина и расчета праймеров для следующего шага секвенирования полученные последовательности гена химозина алтайского марала длиной 850–950 п.н. выравнивали с известными для других китопарнокопытных структурами из базы данных GenBank. Таким образом, шаг за шагом в итоге был получен набор перекрывающихся секвенограмм и собран контиг перекрывающихся фрагментов гена. Полученная последовательность была депонирована в GenBank под номером MT225406 (марал, *Cervus canadensis sibiricus*).

После установления интрон/экзонной структуры гена была определена кодирующая последовательность гена химозина, включающая пре- и про- последовательности. Проведен сравнительный анализ полученной аминокислотной последовательности химозина алтайского марала с последовательностями химозина коровы (*Bos taurus*) и одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*) (рисунок 1).

В результате в кодирующей последовательности химозина алтайского марала были обнаружены а.к. замены, которые, теоретически, могут влиять на биохимические свойства этого фермента.

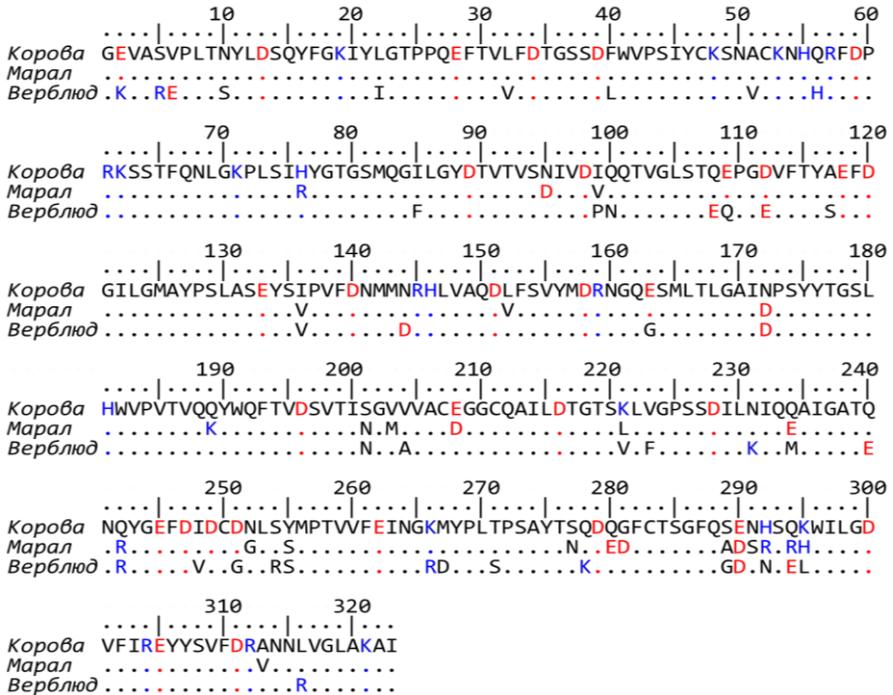


Рисунок 1. Выравнивание химозинов коровы, алтайского марала и верблюда. Положительно заряженные а.о. выделены синим, отрицательно заряженные – красным. Одинаковые а.о. показаны точками.

Получение рекомбинантных препаратов химозина алтайского марала в системе экспрессии *E.coli*

Синтезированная нуклеотидная последовательность, соответствующая прохимозину (проХн) алтайского марала с кодонным составом, оптимизированным для экспрессии в системе *E.coli*, была встроена в экспрессионный вектор pET21a по уникальным сайтам рестрикции BamHI и PspXI, которые были заложены в проектируемую последовательность. Полученным вектором (pET21-Cer) трансформировали компетентные клетки *E.coli* штамм NEB Stable. Плазмидную ДНК отдельных клонов в районе встройки секвенировали по методу Сенгера для проверки наличия делеций или замен в целевой нуклеотидной последовательности. Для получения рекомбинантного штамма-продукта сконструированным вектором трансформировали компетентные клетки *E.coli* штамма B121.

Для наработки целевого белка использовали стандартный протокол, включающий внесение индуктора ИПТГ. С целью оценки эффективности синтеза и локализации рекомбинантного проХн алтайского марала, был проведен электрофоретический анализ белковых препаратов, полученных из различных фракций клеток штаммов-продуцентов (рисунок 2).

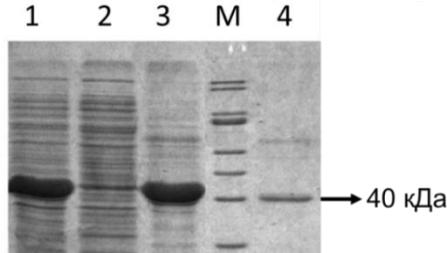


Рисунок 2. Электрофореграмма фракций клеток рекомбинантного штамма, содержащего плазмиду рЕТ21-Сег. 1 – биомасса клеток рекомбинантного штамма *E. coli*, через 24 ч после добавления индуктора, 2 – растворимая фракция биомассы клеток *E. coli* после обработки буфером STET и центрифугирования, 3 – нерастворимая фракция биомассы клеток *E. coli* после обработки лизирующим буфером и центрифугирования (тельца включения), М – маркеры молекулярных масс; 4 – препарат проХн алтайского марала после рефолдинга.

Анализ клеточной биомассы рекомбинантного штамма после добавления индуктора, показал наличие белка, совпадающего по электрофоретической подвижности с расчетными показателями для рекомбинантного проХн алтайского марала. Его содержание составляло $\geq 30\%$ (рисунок 2, дорожка 1) от общего количества белков клетки. Видно, что растворимая фракция биомассы *E. coli* после обработки лизирующим буфером и центрифугирования (рисунок 2, дорожка 2) почти не содержит целевой белок, в то время как фракция телец включения практически полностью представлена рекомбинантным проХн алтайского марала (рисунок 2, дорожка 3). Таким образом, условия экспрессии гена химозина алтайского марала в системе продукции *E. coli* приводят к высокоэффективному синтезу целевого белка, при этом почти весь он накапливается в нерастворимой форме в тельцах включения.

Для анализа биохимических свойств полученного фермента проводили многостадийную процедуру выделения, солюбилизации, денатурации и рефолдинга белка. Процедура солюбилизации телец включения состояла из центрифугирования клеточной культуры, содержащей целевой белок, с последующим растворением биомассы в буфере STET и разрушением клеточной стенки с использованием

ультразвукового гомогенизатора. Денатурация проводилась путем растворения очищенных телец включения буфером А с 8М мочевиной (рН 10,7). Процедура рефолдинга включала в себя разведение раствора белка до конечной концентрации мочевины 0,8 М, доведение рН раствора до слабощелочных значений (рН 8,0) и ступенчатый диализ против раствора, содержащего 50 мМ TrisHCl, 150 мМ NaCl, (рН 8,0).

В результате был получен препарат рХн марала (рХн-Cer-E.coli), обладавший молокосвертывающей активностью (МА), на основании чего был сделан вывод, что использование системы *E.coli* позволяет получить ферментативно-активный препарат рХн. Однако, локализация рХн в тельцах включения и последующая многостадийная процедура выделения, солюбилизации, растворения, ренатурации и диализа в значительной степени снижают выход целевого белка (рисунок 2, дорожка 4). Это послужило еще одной причиной разработки альтернативной системы продукции на основе *K. lactis*, которая не только позволяет получить проХн в растворимой форме, но и обеспечивает посттрансляционные модификации целевых белков

Конструирование рекомбинантного вектора, обеспечивающего экспрессию генов в *Kluyveromyces lactis*

Для экспрессии гена химозина алтайского марала в системе *K. lactis* был спроектирован вектор, призванный обеспечить синтез и секрецию целевого белка. Центральным элементом любого экспрессионного вектора является промотор - последовательность способная влиять на уровень синтеза мРНК. При разработке вектора было решено использовать гибридный промотор, включающий коровую последовательность промотора глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAP1) и регуляторную последовательность промотора изоцитрат лиазы (ICL1). В состав экспрессионной кассеты также были включены: сигнальная последовательность белка α -MF *S.cerevisiae* обеспечивающая секрецию белка во внеклеточное пространство; регион встройки целевого гена (для анализа встроены репортерный ген люциферазы *Gaussia princeps* (GausLuc); терминаторная область гена CYC1 *S.cerevisiae* в качестве терминатора синтеза РНК; промотор гена алкогольдегидрогеназы (ADH1 promoter); ген ацетамидазы (amdS), как селективный маркер для отбора клонов-трансформантов (рисунок 3).

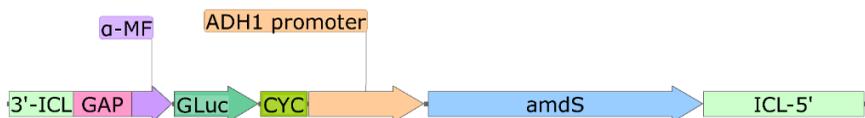


Рисунок 3. Схема дрожжевой экспрессионной кассеты.

Для амплификации фрагментов экспрессионной кассеты были спроектированы олигонуклеотидные праймеры (Таблица 1).

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для сборки вектора pSVB.

№ реакции	Название праймера	Нуклеотидная последовательность (5'-3')	Продукт ПЦР
1	Icl-A-F	aaaaaagcggccgcaattcatctagataatcgggtatgattaacag	3'-часть <i>ICL1</i> промотора –
	Icl-B-R	cgaggctgaggaaccaaatagagtc	
2	Gap-C-F	gactctatttggttctcagcctcgactgcttggcttcac	Часть <i>GAP</i> промотора
	Icl-D-R	gagaatttcattgtgtaatatcttttttttacttgaactg	
3	AlfaF-E-F	aatattacacaatgaattctctactatattagccg	Сигнала секреции α -MF
	AlfaF-F-R	aaaaaaggatccatcatccttctcagcgaagc	
4	Gluc-G-F	aaaaaaggatccaaaagaagcccaccgagacacacgaag	Ген <i>GausLuc</i>
	Gluc-G-R	atcgacaagaaaagggcctgtctaggttagtcaccaccggcccccttg	
5	Сус-I-F	acaggcccccttttctttgtcg	Терминаторная область гена <i>СУС1</i>
	Сус-J-R	aaaaaactcgagccgccgggctgcttgcataaagaagccttcgagc	
6	Amds-K-F	aaaaaacccgggtgtttccgggtgtacaatatggac	Промотор гена алкогольдегидрогеназы, ген <i>amdS</i>
	Amds-L-R	aaaggtaaaagctatggagtcaccacatttc	
7	Icl-M-F	tgactccatagcttttacctttgtgtcttatgtg	5' часть <i>ICL1</i> промотора
	Icl-N-R	aaaaaaactcgagcaattcgagattaggtgagcttacgg	

С использованием спроектированных праймеров с матрицы геномной ДНК *K.lactis* были получены ампликоны: 3'-часть *ICL1* промотора, 5'-часть *GAP* промотора и 5'-часть *ICL1* промотора. С матрицы геномной ДНК *S. cerevisiae* были получены ампликоны терминаторной области гена *СУС1* и сигнала секреции α -MF. С матрицы вектора pKLAC2 получен промотор гена алкогольдегидрогеназы и ген ацетамидазы *amdS*. С матрицы вектора pCDH-EF1-GausLuc-IRES-copGFP получен ген *GausLuc*.

Полученные продукты ПЦР отжигали между собой, в следующем порядке № 1, 2, 3; № 4, 5 и № 6, 7. Продукты отжига амплифицировали с использованием фланкирующих праймеров: Icl-A-F и AlfaF-F-R для фрагментов № 1, 2, 3; Gluc-G-F и Сус-J-R для №4,5 и Amds-K-F и Icl-N-R для № 6, 7 (рисунок 4 (А)).

Ампликоны были встроены в челночный вектор pJet1.2. В результате получено три рекомбинантные плазмиды: pJet-1-2-3, pJet-4-5 и pJet-6-7, которые были секвенированы с целью проверки целостности нуклеотидных последовательностей (рисунок 4 (Б)). После проверки плазмиду pJet-1-2-3 обрабатывали ферментами CciNI и BamHI, pJet-4-5 BamHI и XmaI, pJet-6-7 XmaI и PspXI. Вектор pJet1.2 гидролизывали по сайтам PspXI и CciNI. Продукты реакции гидролиза смешивали и лигировали по липким концам (рисунок 4 (В)). Лигазной смесью проводили трансформацию компетентных клеток *E.coli* штамм Neb Stable. Плазмидную ДНК отдельных клонов в районе встройки секвенировали по методу Сенгера. В результате был получен вектор pSVB-Gluc. Общая схема конструирования вектора приведена на рисунке 4.

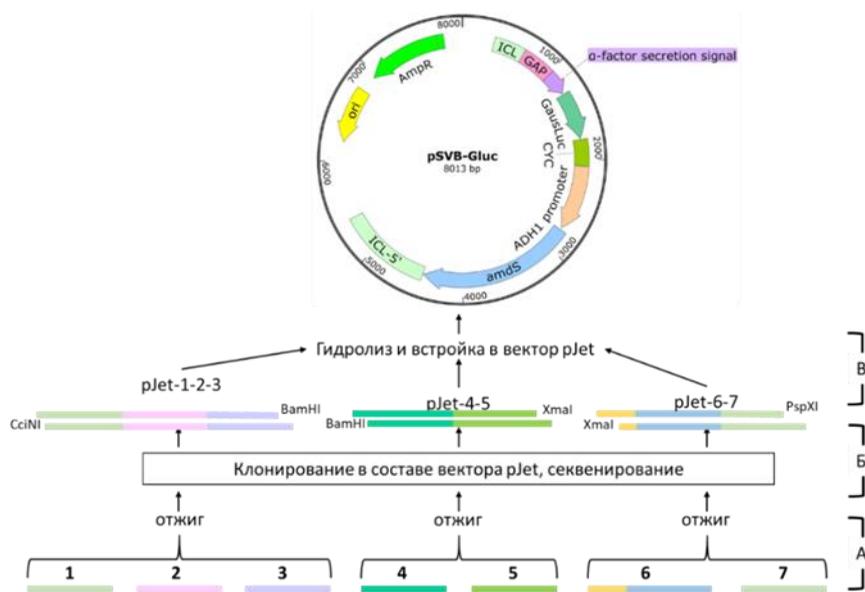


Рисунок 4. Схема конструирования вектора pSVB-Gluc. А – амплификация составных последовательностей вектора и их отжиг; Б – встройка продуктов отжига в вектор pJet1.2 и их проверка; В – гидролиз полученных векторов по уникальным сайтам рестрикции и их лигирование

Сконструированным вектором pSVB-Gluc трансформировали электрокомпетентные клетки *K.lactis* штамма GG799. Полученные индивидуальные колонии культивировали в течение трех дней в среде YEP, содержащей 2% глюкозы. Затем культуральную жидкость анализировали на

наличие люциферазной активности с использованием в качестве субстрата нативного целентеразина (NanoLight Technologies, США). В качестве положительного контроля выступала культуральная среда клеток НЕК293FT, трансфицированных плазмидой pCDH-EF1-GausLuc-IRES-copGFP. В качестве отрицательного контроля выступала культуральная жидкость *K.lactis* штамма GG799 (Таблица 2).

Таблица 2. Значение уровня люминесценции.

Название образца	Значение сигнала люминесценции, RLU
<i>K. lactis_pSVB</i> клон 1	13'695'700±5900
<i>K. lactis_pSVB</i> клон 2	10'451'300±7100
<i>K. lactis_pSVB</i> клон 3	64'400'400±4400
Положительный контроль	10'246'400±1100
Отрицательный контроль	0

Значения, приведенные в таблице 2, демонстрируют, что сконструированный вектор pSVB способен обеспечивать синтез и секрецию белков в системе *K. lactis*.

Получение рекомбинантного препарата химозина алтайского марала в системе экспрессии *K. lactis*

После подтверждения способности вектора pSVB обеспечивать синтез и секрецию ферментативно активного белка в культуральную жидкость в составе этого вектора клонировали последовательность проХн алтайского марала. Для получения рекомбинантного штамма-продуцента, вектором pSVB-Cер трансформировали электрокомпетентные клетки *K. lactis* штамма GG799.

После трансформации проводили отбор клонов с целью поиска наиболее эффективного продуцента целевого белка. Для этого 14 индивидуальных клонов культивировали в среде YEP, содержащей 1% глюкозы, в течение трех дней. По завершении культивирования проводили активацию рекомбинантного прохимозина алтайского марала непосредственно в культуральной жидкости и определяли её молокосвертывающую активность (рисунок 5). В результате был выбран клон для наработки рХн алтайского марала (рХн-Cер-K.1) с целью изучения его биохимических свойств. Им стал клон № 3.

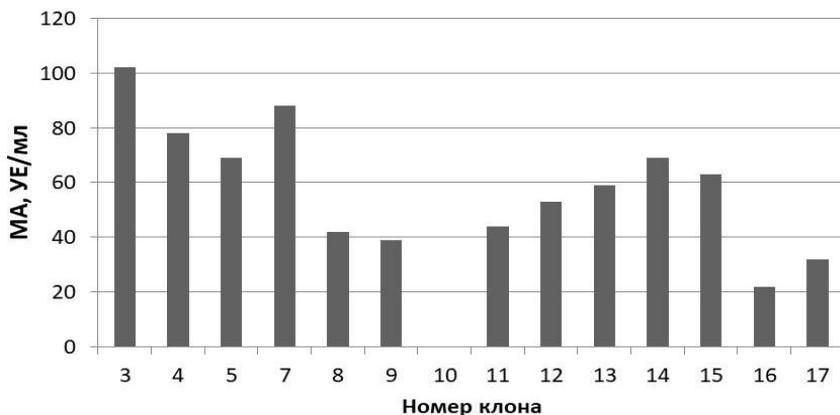


Рисунок 5. Общая МА культуральной жидкости отдельных клонов-продуцентов рХн алтайского марала.

Определение параметров кинетики Михаэлиса-Ментен рекомбинантного химозина алтайского марала

Кинетические исследования ферментов являются одними из наиболее важных инструментов для понимания биологических взаимодействий на молекулярном уровне. В последние годы были предприняты значительные усилия по разработке чувствительных и точных методов характеристики кинетики ферментативных реакций с использованием эффективных протоколов анализа для расчета константы Михаэлиса (K_m), каталитической константы скорости или числа оборотов фермента (k_{cat}), константы специфичности или каталитической эффективности (k_{cat}/K_m).

Одним из таких методов является ферментный анализ на основе флуоресценции с резонансным переносом энергии (FRET) с использованием пептидного субстрата. Результаты измерения приведены в таблице 3.

Таблица 3. Параметры кинетики Михалиса-Ментен рХн

Препарат	V_{max} (нМ/сек)	K_m (мкМ)	k_{cat} (сек ⁻¹)	k_{cat}/K_m (мкМ ⁻¹ ·сек ⁻¹)
рХн-Bos	238 ± 2	3,68 ± 0,02	4,76	1,29
рХн-Sam	242 ± 42	1,36 ± 0,04	4,84	3,56
рХн-Cer-E.c	177 ± 20	1,27 ± 0,03	3,54	2,79
рХн-Cer-K.l	1281 ± 189	9,20 ± 0,03	25,63	2,79

Для эффективной работы ферменты группы химозинов должны соблюдать баланс между аффинностью (K_m), максимальной скоростью (V_{max}) и каталитической эффективностью (k_{cat}/K_m), т.к. высокие значения кинетических параметров не гарантируют эффективность в технологической практике. Например, высокая K_m снижает каталитическую эффективность (k_{cat}/K_m).

Анализ основных биохимических и технологических свойств рекомбинантного химозина алтайского марала

Рассматривая те или иные молокосвертывающие ферменты (МФ), мы всегда имеем в виду потенциальную возможность их практического использования. Поэтому для характеристики химозинов различного генеза используют биохимические параметры, важные, в том числе, для его дальнейшего применения в производственной практике. К таким параметрам относятся:

1. Молокосвертывающая активность (МА),
2. Общая протеолитическая активность (ПА),
3. Специфичность (определяемая как МА/ПА),
4. Термостабильность (ТС),
5. Зависимость МА от pH субстрата,
6. Зависимость МА от концентрации ионов кальция в субстрате.

При исследовании биохимических и технологических свойств рХн марала в качестве препаратов сравнения применяли коммерческие препараты генно-инженерного химозина коровы (рХн-Vos) и одnogорбого верблюда (рХн-Sam), которые считаются эталонными коагулянтами молока для сыроделия.

1. Молокосвертывающая активность – это высокоспецифичный протеолиз связи Phe105-Met106 в молекуле κ -казеина. Гидролиз этой связи приводит к дестабилизации казеиновых мицелл, в результате чего происходит образование молочного сгустка – основы для производства сыра. Несмотря на существование пептидных субстратов, имитирующих химозин чувствительную область κ -казеина, исследования активности фермента на молоке имеет как практическое, так и фундаментальное значение. Это объясняется тем фактом, что в физиологических и производственных условиях реакция специфического протеолиза проходит не в водном растворе, а в молоке, где процесс катализа зависит от структуры казеиновых мицелл и их микроокружения (сывороточные белки, жировые глобулы молока, ионы и т.д.).

Как правило при исследовании МА химозинов в качестве субстрата используют коровье молоко. Метод определения активности фермента на молоке коровы – прост, дешев и, самое главное, функционален, поскольку

регистрирует продолжительность образования сгустка и, тем самым, имитирует события, происходящие как в желудке новорожденного, так и в сыродельной ванне.

Для препаратов рХн аплтайского марала, полученных в про- и эукариотической системах экспрессии, была рассчитана удельная МА (УЕ/мг белка). Сравнительный анализ удельной МА показал, что значения этого параметра у исследуемых образцов ниже, чем у препаратов сравнения (таблица 4).

Таблица 4. Общая и удельная МА рекомбинантных химозинов

Препарат	Общая МА, УЕ/мл	Концентрация белка мг/мл	Удельная МА УЕ/мг	Удельная МА, %
рХн-Вос	2752 ± 88	0.033 ± 0.005	83394	100
рХн-Сам	94454 ± 31	0,928 ± 0.015	87654	103
рХн-Сег-Е.с	2330 ± 10	0.044 ± 0.002	52955	64
рХн-Сег-К.1	3154 ± 11	0,022 ± 0,003	71719	86

2. Общая ПА. При описании свойств любого нового химозина важной характеристикой является его общая ПА. В отличие от МА, общая ПА фермента направлена на любые пептидные связи белков молока, за исключением связи Phe105-Met106 к-казеина. Как говорилось ранее, специфичность химозина не связана только с последовательностью Phe105-Met106 как таковой, но и определяется суммой взаимодействий аминокислотных остатков субстрата и субсайтов узнавания ферментов. Высокая общая ПА приводит к снижению выхода сыра (за счет потерь продуктов протеолиза, которые удаляются вместе с подсырной сывороткой) и ухудшению его органолептических (за счет образования горьких пептидов) и физико-химических свойств (нарушается текстура, формируется мажущая консистенция). Кроме того, неспецифический гидролиз казеинов молока ведет к ухудшению технологических характеристик подсырной сыворотки, которая используется в качестве сырья для изготовления некоторых продуктов питания (отдельные виды молочных напитков, детские питательные смеси, альбуминные пасты) или добавок в хлебопекарной промышленности. В этой связи, идеальный коагулянт молока для сыроделия – это фермент, сочетающий в себе высокий показатель МА и минимальную общую ПА (Ельчанинов, 2021).

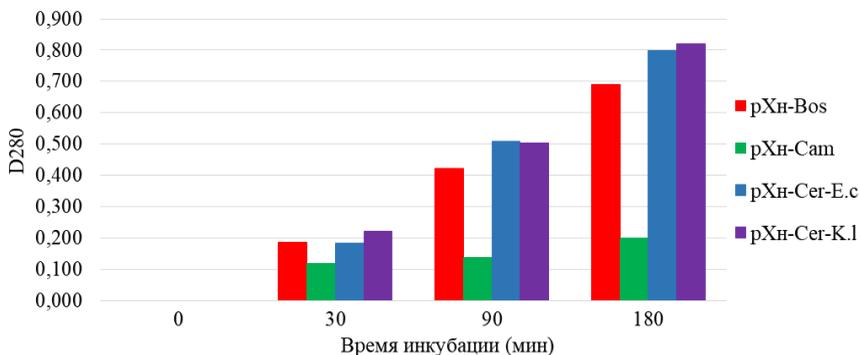


Рисунок 6. Общая протеолитическая активность.

Результат анализа общей ПА исследуемых препаратов рекомбинантных химозинов приведен на рисунке 6. Вне зависимости от системы экспрессии общая ПА химозина марала, оказалась выше, чем общая ПА эталонных коагулянтов (таблица 5).

3. Специфичность молокосвертывающего фермента определяется как соотношение молокосвертывающей и общей протеолитической активности (МА/ПА) (Таблица 5). Используя критерий специфичности коммерческие коагулянты молока можно расположить в следующей последовательности: рХн верблюда > рХн коровы > говяжий пепсин > мукопепсины > эндотиापепсин. Представленный ряд отражает универсальность ферментов (чем выше специфичность, тем универсальнее препарат) и указывает на возрастающую вероятность развития пороков вкуса и консистенции при использовании коагулянта с высокой общей ПА для выработки сыров с длительными сроками созревания и хранения (Ельчанинов, 2021).

Таблица 5. МА, общая ПА и специфичность препаратов химозина

Препарат	Удельная МА%	Общая ПА %	Специфичность, МА/ПА
рХн-Bos	100	100	1.00
рХн-Cam	103	15	6.88
рХн-Cer-E.c	64	114	0.56
рХн-Cer-K.l	86	119	0.72

В отличие от рХн верблюда, чья специфичность по отношению к коровьему молочному субстрату почти в 7 раз выше, чем у рХн коровы, специфичность рХн марала, вне зависимости от системы продукции,

оказалась ниже. По сравнению с рХн коровы соотношение МА/ПА для химозина марала, полученного в системах экспрессии *E.coli* и *K.lactis*, составило соответственно 0,56 и 0,72 (таблица 5).

4. Термостабильность. Под этим термином понимают температуру, при которой сохраняется специфическая активность фермента. Для коагулянтов молока этот показатель определяют путем измерения остаточной МА после прогревания при температурах в диапазоне 30-65 °С (рисунок 11). Порогом термоинактивации считали температуру, при которой фермент сохраняет менее 80% от исходной молокосвертывающей активности (измеренной при температуре 30-35°С) (Ельчанинов, 2021). Порог термоинактивации (IT_{80}) МФ влияет на стратегию его применения при выработке сыра. Так, для сыров с короткими сроками созревания и хранения допускается использование термостабильных коагулянтов молока с высокими IT_{80} . Напротив, для сыров с длительными сроками созревания и хранения необходимо использовать ферменты с низким порогом температурной инактивации.

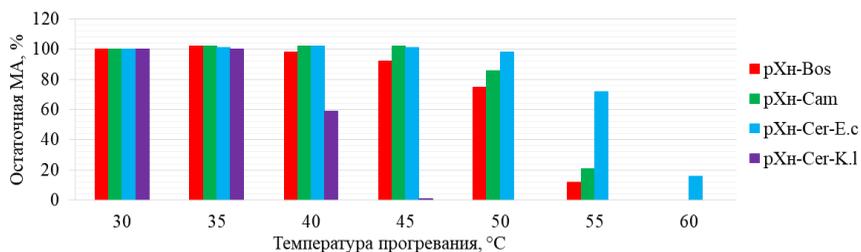


Рисунок 7. Термостабильность препаратов рекомбинантного химозина.

Результаты исследования ТС рХн, представленные на рисунке 7, свидетельствуют, что система экспрессии кардинальным образом влияет на ТС рХн марала. Фермент, полученный в прокариотической системе экспрессии, не только имел максимальную ТС с показателем $IT_{80}=55^{\circ}C$, но и сохранял около 20% от исходной МА даже после прогревания при 60°С. Напротив, рХн марала, синтезированный в системе продукции *K.lactis*, демонстрировал исключительную термолабильность с $IT_{80}=40^{\circ}C$. Низкий порог термоинактивации является ценным технологическим параметром коагулянта молока в сыроделии.

5. Зависимость МА от рН субстрата. Как правило ферменты проявляют наибольшую активность в узком диапазоне рН. Для химозинов разных видов животных этот показатель находится в интервале от 4,5 до 5,5. Процесс производства большинства видов сыров включает в себя стадию предварительной обработки молока перед добавлением МФ в молоко.

Концентрат молочнокислых бактерий добавляется в сырое молоко с рН около 6,7. Затем смесь инкубируют при 32–35 °С в течение 30–40 мин. Развивающаяся микрофлора закваски начинает метаболизировать лактозу до молочной кислоты, и в результате рН смеси начинает снижаться. Чаще всего МФ вводят в смесь при рН 6,5–6,6. В связи с этим способность эффективно коагулировать молоко в слабокислом диапазоне рН является одним из основных технологических требований к МФ.

В диапазоне рН от 6,0 до 7,0 чувствительность рекомбинантных химозинов марала, полученных в системах экспрессии *E.coli* и *K.lactis*, была ниже, чем у эталонных ферментов (рисунок 8). Это означает, что рХн марала, полученный в про- или эукариотической системе продукции, в наименьшей степени изменяет свою МА при изменении рН субстрата, что, по данному параметру, делает его более предсказуемым и экономичным по сравнению с коммерческими рХн.

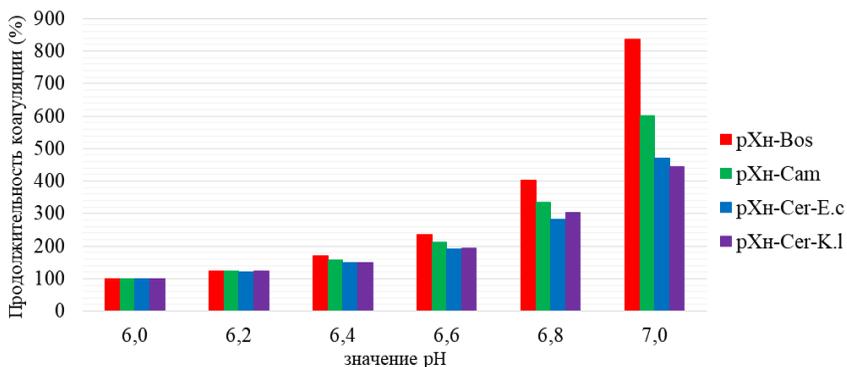


Рисунок 8. Зависимость продолжительности коагуляции молока от рН субстрата.

6. Продолжительности коагуляции (%) от концентрации CaCl_2 .

При промышленном производстве большинства видов сыров молоко проходит стадию пастеризации. Растворимость кальциевых солей фосфорной кислоты падает с повышением температуры. Поэтому в процессе пастеризации ионы кальция, присутствующие в молоке, необратимо осаждаются в виде нерастворимого фосфата кальция ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Это приводит к снижению содержания Ca^{2+} и увеличению продолжительности коагуляции сычужного фермента. Для компенсации данного эффекта, в молоко после пастеризации добавляют 0,1–0,5 г/л ($\approx 1\text{--}5$ мМ) CaCl_2 . Увеличение содержания хлорида кальция на 1–5 мМ приводит не только к более высоким значениям МА, но и к более высокой общей ПА

фермента, особенно на стадии коагуляции. Ввиду вышеизложенного в производстве стремятся минимизировать необходимые дозы CaCl_2 после пастеризованного молока. Для новых МФ чувствительность к содержанию Ca^{2+} , которая эквивалентна или меньше чувствительности эталонных ферментов (рекомбинантных Хн коровы и верблюда), является положительным фактором, поскольку дает возможность варьировать количество вносимого хлорида кальция, не беспокоясь о значительных изменениях МА и ПА. График зависимости продолжительности коагуляции (%) от концентрации CaCl_2 полученных рекомбинантных препаратов в сравнении с Хн коровы представлен на рисунке 9.

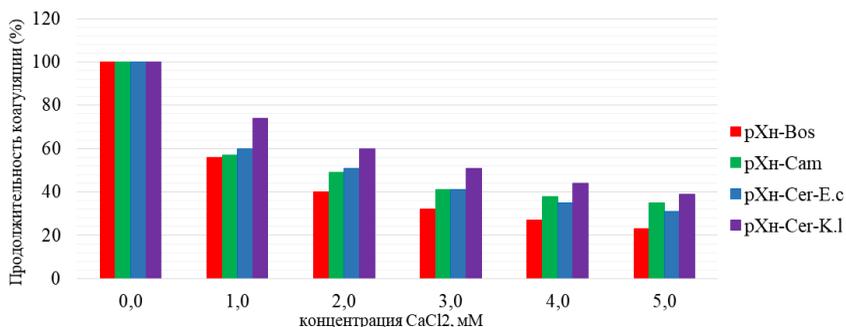


Рисунок 9. Зависимость продолжительности коагуляции от концентрации ионов кальция.

По сравнению с рХн коровы и верблюда специфическая активность рХн марала, полученного как в про- так и в эукариотической системах экспрессии сопоставима или менее чувствительна к повышению концентрации Ca^{2+} в молочном субстрате. В сыроделии низкая чувствительность коагулянта молока к нарастанию концентрации хлорида кальция в субстрате является предпочтительной, поскольку снижает риск развития избыточной ПА.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что ген химозина алтайского марала имеет длину 11161 п.н. и состоит из 9 экзонов и 10 интронов. Выведена последовательность мРНК проХн алтайского марала, длина которой составила 1146 нуклеотидов. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей Хн марала и Хн коровы позволил выявить 24 аминокислотные замены. Нуклеотидная последовательность гена депонирована в GenBank под номером MT225406.
2. Получен штамм-продуцент *Escherichia coli*, обеспечивающий синтез и накопление проХн алтайского марала в виде телец включения. Разработанный протокол очистки и ренатурации целевого белка позволил получить ферментативно-активный препарат с удельной молокосвертывающей (МА) активностью 52955 ± 120 УЕ/мг.
3. Разработан новый интеграционный вектор pSVB, обеспечивающий синтез и секрецию целевых белков в дрожжах *Kluuyveromyces lactis*. С его помощью был получен штамм-продуцент проХн алтайского марала на основе *Kluuyveromyces lactis* обеспечивал синтез, секрецию и накопление в культуральной среде целевого белка с удельной МА 71719 ± 90 УЕ/мг.
4. Значения кинетических параметров рХн марала, отличаются в зависимости от системы продукции и занимают промежуточное положение между аналогичными значениями рХн коровы и верблюда.
5. Сравнительный анализ основных биохимических параметров, важных с точки зрения практического использования химозина, выявил что:
 - а) специфичность рекомбинантных химозинов марала, полученных в системах экспрессии *E.coli* и *K.lactis* ниже, чем у эталонных ферментов и достигает 0,56 и 0,72 соответственно.
 - б) выбор системы экспрессии кардинальным образом влияет на термостабильность рХн марала. Фермент, полученный в прокариотической системе экспрессии, имеет максимальную термостабильность с показателем $IT_{80}=57,5^{\circ}C$, тогда как рХн марала, синтезированный в системе продукции *K.lactis*, демонстрировал исключительную термолабильность с $IT_{80}=43^{\circ}C$.
 - в) вне зависимости от системы продукции рХн марала превосходит рХн коровы и верблюда по таким параметрам, как чувствительность к концентрации Ca^{2+} и изменению рН в диапазоне 6,0-7,0.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК

1. **Belenkaya S.V.**, Bakulina A.Y., Pyichev A.A., Shcherbakov D.N., Kurgina T.A., Rukhlova E.A., Bondar A.A., Lavrik O.I., Elchaninov V.V. Characterization of the altai maral chymosin gene, production of a chymosin recombinant analog in the prokaryotic expression system, and analysis of its several biochemical properties. *Biochemistry (Moscow)*. 2020. Vol. 85. № 7. P. 781-791.
2. **Belenkaya S.V.**, Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Belov A.N., Koval A.D., Elchaninov V.V. Basic biochemical properties of recombinant chymosins (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020. Vol. 56. № 4. P. 363-372.
3. **Belenkaya S.V.**, Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Belov A.N., Koval A.D., Elchaninov V.V. Production of maral (*Cervus elaphus sibiricus severtzov*) recombinant chymosin in the prokaryotic expression system and the study of the aggregate of its biochemical properties relevant for the cheese-making industry. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020. Vol. 56. № 6. P. 647-656.
4. **Беленькая С.В.**, Ельчанинов В.В., Щербаков Д.Н. Разработка продуцента рекомбинантного химозина марала на основе дрожжей *Kluveromyces lactis*. *Биотехнология*. 2021. Т. 37. № 5. С. 20-27
5. **Belenkaya S.V.**, Rudometov A.P., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Kriger A.V., Belov A.N., Koval A.D., Elchaninov V.V. Biochemical properties of recombinant chymosin in alpaca (*Vicugna pacos l.*). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018. Vol. 54. № 6. P. 569-576.

Тезисы на всероссийских и международных конференциях

1. **Беленькая С. В.**, Бондарь, А. А., Ельчанинов, В. В., Щербаков, Д. Н. (2019). Получение рекомбинантного химозина марала (*Cervus elaphus sibiricus*) и определение его молокосвертывающей активности. In VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (с. 38-41).
2. Щербаков, Д. Н., Бондарь, А. А., Рудометов, А. П., **Беленькая, С. В.**, Ельчанинов, В. В., Ильичев, А. А., Коваль, А. Д. (2019). Дизайн гена прохимозина лося (*Alces alces*) для получения его рекомбинантного аналога в прокариотической системе экспрессии. VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (с. 232-235).

3. Ельчанинов В.В., Щербаков Д.Н., **Беленькая С.В.**, Рудометов А.П., Балабова Д.В., Кригер А.В., Белов А.Н., Коваль А.Д (2019). Некоторые результаты и перспективы исследования новых рекомбинантных химозинов для сыроделия. В сборнике: ПИЩА. ЭКОЛОГИЯ. КАЧЕСТВО. Сборник материалов XVI Международной научно-практической конференции. Ответственные за выпуск: О.К. Мотовилов, О.А. Высоцкая, К.Н. Ницневская, Л.П. Хлебова (с. 267-271).
4. **Беленькая, С. В.**, Ельчанинов, В. В., Рудометов, А. П., Щербаков, Д. Н. (2018). Разработка продуцента молокосвертывающего фермента для сыродельной промышленности на основе прохимозина *Vicugna racos*. Биотехнология: состояние и перспективы развития (с. 662-664).

Патенты РФ

1. Щербаков Д.Н., Рудометов А.П., Ельчанинов В.В., **Беленькая С.В.**, Кригер А.В., Ильичев А.А. // Патент на изобретение RU 2670071 С1, 17.10.2018. Заявка № 2017123395 от 03.07.2017. Рекомбинантная плаزمида рЕТ21а-ргоСһут, обеспечивающая синтез химерного белка прохимозина в *Bos taurus*, и штамм *Escherichia coli* В121(де3)plyse рЕТ21а-ргоСһут - продуцент химерного белка прохимозина в *Bos taurus*.
2. **Беленькая С.В.**, Ельчанинов В.В., Щербаков Д.Н. // Патент на изобретение RU 2729403 С1, 06.08.2020. Заявка № 2019117249 от 31.05.2019. Рекомбинантная плазмида рЕТ32-Тгех Vic, обеспечивающая синтез химерного белка прохимозина *Vicugna racos*, и штамм *Escherichia coli* В121(де3)plyse рЕТ32-ТгехVic-продуцент химерного белка прохимозина *Vicugna racos*.
3. **Беленькая С.В.**, Щербаков Д.Н., Ельчанинов В.В., Бондарь А. А. // Патент на изобретение RU 2754229 С1, 30.08.2021. Заявка № 2020135070 от 20.10.2020. Универсальный рекомбинантный вектор рSVO и плазмидные генетические конструкции рSVO-Glu и рSVO-Vic, обеспечивающие синтез и секрецию целевых белков в клетках дрожжей вида *Kluyveromyces lactis* и полученные с использованием указанного универсального вектора.