

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen112509>

Научная статья



Сравнение эффективности якорных белков ScAGα1p, KpCW51p, KpCW61p для поверхностного дисплея у дрожжей *Komagataella phaffii*

М.А. Цыганков, А.М. Румянцев, А.С. Макеева, М.В. Падкина

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Актуальность. Дрожжевой дисплей — эффективная технология выведения на поверхность клетки целевых белков посредством их слияния с белками клеточной стенки. Данная методика, в том числе, позволяет получать на основе дрожжей вакцинные препараты путем экспонирования на их клеточной поверхности белков-антигенов. Поиск и характеристика белков, позволяющих эффективно экспонировать целевые белки на поверхности клеток *Komagataella phaffii*, — актуальная задача.

Цель работы — сравнить эффективность белков клеточной стенки ScAGα1p, включая исследование нескольких вариантов кодирующей последовательности гена *ScAGα1*, а также KpCW51p, KpCW61p для экспонирования репортерного белка на поверхности клеток.

Материалы и методы. Изучаемые последовательности генов были проклонированы под контролем промотора гена *AOX1* в одной рамке считывания с геном репортерного белка eGFP и интегрированы в геном штамма X-33 дрожжей *K. phaffii*.

Результаты. Иммуноцитохимический анализ и конфокальная микроскопия штаммов, экспонирующих на своей поверхности белок eGFP в условиях индукции промотора гена *AOX1*, позволили выявить наиболее эффективный якорный белок. Наилучшие результаты были продемонстрированы при использовании белка ScAGα1 — альфа-агглютинина дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, структурный ген которого не содержал нативной 3'-некодирующей области.

Выводы. Полученные в работе плазмиды позволят получить штаммы дрожжей *K. phaffii*, эффективно экспонирующие на своей поверхности белки, в том числе антигены, которые можно будет использовать в качестве вакцинного препарата.

Ключевые слова: дрожжевой дисплей; *Pichia pastoris*; *Komagataella phaffii*; гетерологичный синтез белков.

Как цитировать:

Цыганков М.А., Румянцев А.М., Макеева А.С., Падкина М.В. Сравнение эффективности якорных белков ScAGα1p, KpCW51p, KpCW61p для поверхностного дисплея у дрожжей *Komagataella phaffii* // Экологическая генетика. 2022. Т. 20. № 4. С. 359–371. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen112509>

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen112509>
Research Article

Comparasion of the effectiveness of anchor proteins ScAGa1p, KpCW51p, KpCW61p for surface display in yeast *Komagataella phaffii*

Mikhail A. Tsygankov, Andrey M. Rumyantsev, Anastasiya S. Makeeva, Marina V. Padkina

Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

BACKGROUND: Yeast display is an effective technology for exposure target proteins to the cell surface by fusing them with cell wall proteins. This technique, among other things, makes it possible to obtain vaccine preparations based on yeast by exposing antigen proteins on their cell surface. Finding and selecting proteins that allow effective exposure of target proteins on the surface of yeast cells is an urgent task.

AIM: The aim of this work was to evaluate the efficiency of cell wall proteins ScAGa1p, KpCW51p, KpCW61p for displaying the reporter protein on the *Komagataella phaffii* cell surface, including the study of several variants of the *ScAGa1* gene coding sequence.

MATERIALS AND METHODS: The studied gene sequences were cloned under the control of the *AOX1* gene promoter in the same reading frame as the eGFP reporter protein gene and integrated into the genome of the *K. Phaffii* yeast strain X-33.

RESULTS: Cytoimmunochemical analysis and confocal microscopy of strains displaying the eGFP protein on their surface under conditions of induction of the *AOX1* gene promoter made it possible to identify the most effective anchor protein. The best efficiency was demonstrated for the sequence of the *ScAGa1* gene without the native 3' non-coding region.

CONCLUSIONS: The plasmids obtained in the work will make it possible to obtain a yeast strain *K. phaffii* that effectively exposure proteins, including antigens, on its surface, which can be used as a vaccine preparation.

Keywords: yeast display; *Pichia pastoris*; *Komagataella phaffii*; heterologous protein synthesis.

To cite this article:

Tsygankov MA, Rumyantsev AM, Makeeva AS, Padkina MV. Comparasion of the effectiveness of anchor proteins ScAGa1p, KpCW51p, KpCW61p for surface display in yeast *Komagataella phaffii*. *Ecological genetics*. 2022;20(4):359–371. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen112509>

АКТУАЛЬНОСТЬ

Дрожжевой дисплей (ДД) — эффективная технология выведения и закрепления на поверхности клетки целевых белков посредством их слияния с белками клеточной стенки. Принцип метода практически был опробован в 1985 г. на вирусных частицах, когда было показано, что за счет слияния последовательностей генов, кодирующих белок оболочки вируса и целевого пептида, можно получить вирусные частицы, несущие этот пептид на своей поверхности [1]. В случае экспонирования антител на поверхности фагов методика позволяла эффективно отбирать специфичные к определенному антигену антитела.

Однако, в виду небольших размеров вирусов и их геномов, помещать на их поверхность крупные белки оказалось невозможно. Тогда для экспонирования более крупных белков стали использовать клетки бактерий. Недостатком бактериальных систем является их неспособность производить многие белки эукариот, поэтому для экспонирования эукариотических белков стали использовать дрожжи [2].

Исследовательская группа Шредера в 1993 г. впервые получила штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, экспонирующий на своей поверхности гетерологичный белок [3]. Несколькими годами позже в 1997 г. ДД использовали для отбора фрагментов антител с нужными свойствами из библиотеки случайных мутантов [4], открыв дорогу для применения ДД в белковой инженерии. Помимо *S. cerevisiae* в качестве платформ для экспонирования различных белков используются и другие виды дрожжей, такие как *Komagataella phaffii* (ранее известные как *Pichia pastoris* [5]), *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica* и дрожжи рода *Kluyveromyces* [6–8].

Сфера применения ДД необычайно широка. Он может быть использован для переработки отходов производств, например целлюлозы и крахмала, в производстве химических соединений и биотоплива, в процессах биоадсорбции тяжелых и редких металлов, для целей биоремедиации, в белковой инженерии, а также в медицине и чисто научных исследованиях, например в изучении белок-белковых взаимодействий [2].

Особенно следует отметить потенциал ДД для получения вакцинных препаратов для животноводства. На его основе уже ведутся работы по созданию оральных вакцин для птиц. Так, был разработан штамм *K. phaffii*, на поверхности клеток которого иммобилизован гемагглютинин высокопатогенного штамма вируса птичьего гриппа (подтип H5N1). Добавление этого штамма в куриный корм привело к появлению у кур антител, нейтрализующих вирус [9]. Однако наиболее перспективной выглядит возможность применения клеток *K. phaffii*, экспонирующих антигены вирусов, в сочетании с инъекционным методом введения. В работе [10] клетки дрожжей *S. cerevisiae*, экспонирующие гемагглютинин вируса H5N1 в качестве антигена, использовали для вакцинации мышей. При этом

проводилась инъекция непосредственно суспензии клеток, убитых температурной обработкой. Была показана 100 % защита вакцинированных таким образом мышей от вирулентного вируса птичьего гриппа H5N1 и не было обнаружено каких-либо побочных эффектов. При подобном подходе нет необходимости в очистке рекомбинантных белков, как в случае с субъединичными вакцинами. Таким образом, вакцины, полученные на основе метода ДД, могут быть необычайно дешевыми, оставаясь при этом эффективными.

ДД обладает рядом преимуществ перед другими клеточными системами и охарактеризован как один из наиболее перспективных подходов, в частности, для белковой инженерии [11, 12]. Дрожжи, будучи эукариотами, могут осуществлять различные посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование и образование дисульфидных связей, фолдинг и секрецию эукариотических белков. ДД дает возможность катализировать реакции с использованием крупных субстратов, которые не могут попасть в клетку, а также в условиях, неоптимальных для работы фермента. Помимо этого, он позволяет повысить устойчивость целевого белка к изменениям pH, температуры, наличию органических растворителей, протеаз и даже улучшить его активность [13]. Дрожжи, как и бактерии, не требуют для культивирования особых технических затрат и способны расти в средах относительно простого состава. При этом, в связи с большим размером клеток дрожжей, на их поверхности размещается больше молекул целевого белка (порядка 10^4 – 10^5) [14], и их проще отделить от среды.

Как было отмечено ранее, для ДД используют разные виды дрожжей. Но особый интерес среди них представляют метилотрофные дрожжи *K. phaffii*, получившие широкое распространение в биотехнологии.

Метилотрофные дрожжи *K. phaffii* применяются в современной биотехнологии для производства самых разнообразных белков. Для них разработаны хорошо зарекомендовавшие себя методы генетической инженерии, а их секвенированный геном находится в открытом доступе [15]. Преимущество дрожжей *K. phaffii* как объекта биотехнологии состоит также в наличии необычайно сильных и при этом строго регулируемых промоторов [16]. Перечисленные факторы сделали *K. phaffii* одной из самых эффективных среди известных систем экспрессии гетерологичных генов. Опыт применения этих дрожжей в биотехнологии показал, что вероятность успешного синтеза любого чужеродного белка с помощью *K. phaffii* составляет около 75 %, что считается очень высоким показателем. Причем основной этап — получение штаммов, синтезирующих целевой белок на любом, даже самом минимальном уровне, поскольку использование *K. phaffii* предоставляет широкие возможности для дальнейшей оптимизации условий культивирования [16]. Во множестве работ с помощью *K. phaffii* были достигнуты высокие уровни синтеза целевых белков ≥ 1 г/л.

При этом существуют примеры успешного синтеза внутриклеточных белков в количествах до 22 г/л, а секреторных белков — до 15 г/л. Дрожжи *K. phaffii* способны секретировать большее количество белка, чем *S. cerevisiae* [17]. Существует также ряд примеров успешного синтеза белков с помощью *K. phaffii*, которые ранее не удавалось синтезировать с помощью других систем на основе *Baculovirus* или *S. cerevisiae* [18].

Дрожжи *K. phaffii* имеют аэробный тип метаболизма и могут расти до высоких плотностей клеточной суспензии (>130 г/л сухой клеточной массы [19]; >400 г/л сырой клеточной массы; >500 OD₆₀₀ Ед/мл суспензии [20]). Учитывая, что при производстве вакцинных препаратов на основе ДД важное значение имеет количество клеточной массы, а также, что количество гетерологичных белков в случае ДД напрямую зависит от количества клеток, выбор *K. phaffii* в качестве платформы для ДД выглядит особенно привлекательно.

В случае использования дрожжей для получения вакцинных препаратов для птиц и их перорального применения *K. phaffii* имеет еще одно преимущество. Как было установлено Габоарди *K. phaffii* оказался многообещающим пробиотиком для домашней птицы [21]. Клетки штамма X-33 дрожжей *K. phaffii* добавляли в рацион перепелок, вакцинированных против болезни Ньюкасла, инфекционного птичьего бронхита и инфекционной бурсальной болезни птиц. Добавление клеток дрожжей в рацион модулировало иммунную систему птиц, повышая уровни антител против этих болезней по сравнению с контролем, и увеличивало массу яиц.

Центральное место в технологии ДД занимают белки клеточной стенки или их фрагменты, благодаря которым и возможно экспонирование на клеточной поверхности других белков. Наиболее известны следующие белки: ScAga1p, ScAga1p/ScAga2p, ScFlo1p, ScSed1p, ScTip1p, и KpPir1/2/3/4p. Все вышеперечисленные белки кроме семейства Pir являются белками дрожжей *S. cerevisiae*. Якорные белки отличаются друг от друга по механизму взаимодействия с клеточной стенкой, свободному N- или C-концу аминокислотной последовательности, к которому может быть присоединен целевой белок, по уровню синтеза в различные фазы клеточного цикла, а также наличию/отсутствию характерного для многих якорных белков гликозилфосфатидилинозитольного домена — GPI-якоря.

Первый дисплей на основе дрожжей *K. phaffii*, в котором якорным белком служил C-концевой фрагмент белка ScAga1p дрожжей *S. cerevisiae*, был получен в 2004 г. [22]. Q. Wang в 2007 г. в своем исследовании также показал работоспособность C-фрагмента белка ScAga1p используя последовательность гена с нативной 3'-некодирующей последовательностью *S. cerevisiae* [23]. В дальнейшем была подтверждена работоспособность в *K. phaffii* и других якорных белков *S. cerevisiae*, например ScAga2p, ScFlo1p, ScSed1p и ScTip1p [7].

L. Zhang и соавт. [24] провели скрининг белков из *K. phaffii*, обладающих доменом GPI и, таким образом, потенциально способных исполнять роль якорных белков для ДД. Авторы использовали репортерную систему на основе гена *CALB*, кодирующего липазу *B. Candida antarctica*. В результате их исследования было отобрано несколько белков, продемонстрировавших наибольшую эффективность, — KpCW51p, KpCW61p. В отдельном исследовании была показана эффективность якорного белка KpCW61p для выведения на поверхность фермента липазы *Thermomyces lanuginosus* [25].

Несмотря на доказанную работоспособность некоторых белков клеточной стенки *S. cerevisiae* в *K. phaffii*, сравнение и выбор якорных белков, позволяющих эффективно экспонировать целевые белки на поверхности клеток *K. phaffii*, остается актуальной задачей.

Цель работы — сравнить эффективность белков клеточной стенки ScAga1p *S. cerevisiae*, включая исследование нескольких вариантов кодирующей последовательности гена *ScAga1*, и KpCW51p/KpCW61p *K. phaffii* для экспонирования репортерного белка на поверхности клеток. Для этого изучаемые последовательности генов были встроены в одну рамку считывания с геном репортерного белка eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein — зеленый флуоресцентный белок улучшенный) под контролем промотора гена *AOX1*, а затем интегрированы в геном штамма X-33 дрожжей *K. phaffii*.

Результаты работы и сконструированные плазмиды позволят получить штаммы дрожжей *K. phaffii*, эффективно экспонирующие на своей поверхности белки, в том числе антигены. Такие штаммы можно будет использовать в качестве вакцинных препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмиды. В работе были использованы следующие плазмиды: pPICZaB (Thermo Fisher Scientific, США), pCMV-GFP (Addgene plasmid repository, США, plasmid #11153, [26]).

Штаммы. Для амплификации плазмидной ДНК использовали бактерии *Escherichia coli*, штамм DH5alpha — генотип F[−] ф80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK[−], mK⁺)phoA supE44 λ[−] hi-1 gyrA96 relA1 (Thermo Fisher Scientific, США). Для получения дрожжевых штаммов-продуцентов использовали штаммы *Komagataella phaffii* X-33 (wt) (Invitrogen, США).

Среды и условия культивирования. Для культивирования бактерий использовали среду LB: 1 % триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, 170 ммоль NaCl, 2,4 % агар (если среда твердая). Для отбора бактериальных трансформантов, устойчивых к антибиотику зеоцину (Invivogen), использовали среду LB low salt с содержанием 25 мг/л антибиотика зеоцина и пониженным содержанием NaCl — 90 ммоль. Для приготовления бактериальных компетентных клеток использовали среду TYM: 2 % триптон, 0,5 % дрожжевой

экстракт, 100 ммоль NaCl, 10 ммоль MgSO₄. Для культивирования дрожжевых штаммов использовали среду YEPD: 1 % дрожжевой экстракт, 2 % пептон, 2 % D-глюкоза. Для индукции экспрессии гетерологичных генов под контролем промотора *AOX1* использовали среду YEPM: 1 % дрожжевой экстракт, 2 % пептон, 1 % метанол. Бактериальные клетки при получении плазмид культивировали при 37 °С. При получении бактериальных компетентных клеток культивирование проводили при 30 °С. Дрожжевые штаммы культивировали при температуре 30 °С.

Выделение ДНК из клеток. Выделение плазмидной ДНК из клеток бактерий осуществляли с помощью набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Выделение хромосомной ДНК из клеток дрожжей осуществляли с помощью универсального набора LumiPure from AnySample для выделения геномной ДНК (Люмипроб, Россия) согласно протоколу производителя.

Выделение ДНК из агарозного геля и реакционных смесей. Очистку ДНК из агарозных гелей и реакционных смесей проводили с помощью набора Cleanup Standard (Евроген, Россия).

ПЦР-скрининг бактериальных трансформантов. Раствор плазмидной ДНК предполагаемых бактериальных трансформантов для анализа получали следующим образом. В 10 мкл воды добавляли колонию бактерий и инкубировали 5 мин при 95 °С. Смесью центрифугировали 2 мин при 7000 об/мин и отбирали 1 мкл надосадочной жидкости в качестве матрицы для ПЦР.

Молекулярные методы. Лигирование фрагментов ДНК проводили с помощью T4 ДНК лигазы (Евроген, Россия) при условиях, рекомендованных фирмой-изготовителем фермента. Гидролиз ДНК проводили в буферных растворах, предложенных фирмами-производителями ферментов (Thermo Fisher Scientific, США или НПО «SibEnzyme», Россия). Рестрикционные смеси инкубировали в течение 30 мин при 37 °С.

Трансформация. Трансформацию дрожжей проводили методом электропорации по описанной ранее методике [27]. Трансформацию бактерий осуществляли по стандартной методике и культивировали в среде Луриа – Бертини [28]. Для отбора бактериальных трансформантов, устойчивых к зеоцину, в среду добавляли антибиотик в концентрации 25 мг/л. Штаммы *E. coli* выращивали при 37 °С. Для отбора дрожжевых трансформантов, устойчивых к антибиотику зеоцину, использовали среду YEPD, в которую добавляли антибиотик в концентрации 150 мг/л. При работе на чашках Петри во все среды добавляли 20 г агара на литр среды.

Амплификация генов, кодирующих белки ScAgα1p, KpCW51p, KpCW61p и eGFP. Амплификацию структурного гена белка eGFP проводили на основе плазмиды pCMV-GFP. В качестве матриц для амплификации генов, кодирующих белки клеточной стенки, использовали хромосомную ДНК дрожжей *S. cerevisiae* (1-GRF18) и *K. phaffii* (X-33). Использовали высокоточную полимеразу Tersus (Евроген, Россия). Режим реакции ПЦР: 1 цикл — 95 °С, 3 мин; 30 циклов — 95 °С, 60 с; 55 °С, 60 с; 72 °С, 120 с. Использованные праймеры приведены в табл. 1.

Определяли интенсивности флуоресценции белка eGFP и меченых флюорофором антител к белку EGFP. Штаммы с геном, кодирующим белок eGFP, проверяли на наличие флуоресценции с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica, Германия).

Для определения на поверхности клеток белка eGFP при помощи иммуноцитохимического анализа использовали кроличьи поликлональные антитела фирмы Евроген, Россия (cat#AB011). Мечение проводили флуоресцентным красителем Sulfo-Цяanine3 при помощи набора Sulfo-Цяanine3 antibody labeling kit (Люмипроб, Россия) по методике, указанной производителем. Клетки собирали центрифугированием и промывали 5 раз 0,1 М натрий-фосфатным буферным раствором (PBS), pH = 7,4

Таблица 1. Последовательности праймеров

Table 1. Primer sequences

Название	Последовательность
F-Xbal-ScAgα1long	5-ATTACATCTAGACGCCAAAAGCTCTTTATC-3
R-ScAgα1long-Agel	5-ATTACAACCGGTTTGTATTGTTCTTTCTATTTGA-3
F-Xbal-ScAgα1	5-ATTACATCTAGACGCCAAAAGCTCTTTATC-3
R-ScAgα1-Agel	5-ATTA CT ACCGGTTTGAATAGCAGGTACGAC-3
F-Xbal-KpCW51	5-ATTACATCTAGACGATGACGATGACTCATTACCTT-3
R-KpCW51-Agel	5-ATAGTTTAACCGGTTCTAGATCAATAGGGCAATGGCA-3
F-Xbal-KpCW61	5-ATTACATCTAGATAACAACCTATCAAACGAGAGTAATG-3
R-KpCW61-Agel	5-ATAGTTTAACCGGTTTAAATCAATAGAGCAAC-3
F-XhoI-GFP	5-GATTACACTCGAGAAAAGAATGGTGAGCAAGGGCG-3
R-GFP-Xbal	5-GATTACATCTAGAACCCTGTACAGCTCGTCCATGC-3
F-AOX1	5-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3

Примечание. Подчеркнуты последовательности, соответствующие сайтам узнавания рестриктазами.

и блокировали 1 % раствором бычьего сывороточного альбумина (*Bovine Serum Albumin*, BSA) в течение 1 ч. Затем клетки инкубировали с антителами (разведение 1 : 20 в PBS, 1 % BSA) в течение 1 ч. После промывки 5 раз 0,1 М PBS анализировали свечение меченых антител к белку eGFP на поверхности клеток полученных штаммов с помощью микроскопа DM4000 (Leica, Германия). Работа на микроскопах проводилась в ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

Биоинформатические методы. Статистическую обработку данных выполняли с использованием программ Excel и GraphPadPrizm 6 [29]. Межгрупповые различия оценивали с помощью *U*-критерия Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Конструирование плазмиды, содержащей репортерный ген *eGFP*

Для получения плазмид, содержащих репортерный ген, с помощью метода ПЦР была получена последовательность гена *eGFP*. Полученный фрагмент ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Xba*I и *Xho*I и встраивали в плазмиду pPICZα, предварительно обработанную теми же рестриктазами. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* и отбирали трансформантов.

Плаزمида pPICZα-eGFP (рис. 1, а) была проверена на наличие вставки с помощью ПЦР, а также с помощью рестрикционного анализа.

Конструирование плазмид, содержащих структурные гены белков клеточной стенки дрожжей — *ScAGα1p*, *KpCW51p*, *KpCW61p* в одной рамке считывания с геном репортерного белка eGFP

В работе Q. Wang [23] была использована последовательность гена, кодирующего белок ScAGα1p вместе с фланкирующим 3'-участком, и показана ее функциональность. В нашей работе мы взяли последовательность гена, кодирующего белок ScAGα1p, как с 3'-фланкирующей областью, так и без нее. Последовательность гена, включающую 3'-некодирующую область, мы обозначаем как *ScAGα1long*.

На первом этапе для получения плазмид, содержащих гены белков клеточной стенки дрожжей — ScAGα1p, KpCW51p и KpCW61p, получали целевые последовательности методом ПЦР. На рис. 2 изображены результаты ПЦР.

Полученные фрагменты ДНК и ранее полученную плазмиду pPICZα-eGFP обрабатывали рестриктазами *Xba*I и *Age*I. Проводили лигирование, а затем трансформацию лигазной смесью бактериальных клеток. Бактериальных трансформантов с целевыми конструкциями отбирали ПЦР-скринингом. Трансформанты с подтвержденным наличием целевого гена выбирали для наработки и последующего выделения плазмидной ДНК и анализа. ПЦР и рестрикционный анализ полученных плазмид подтвердил правильность встроек целевых конструкций. После этого правильность полученных конструкций было

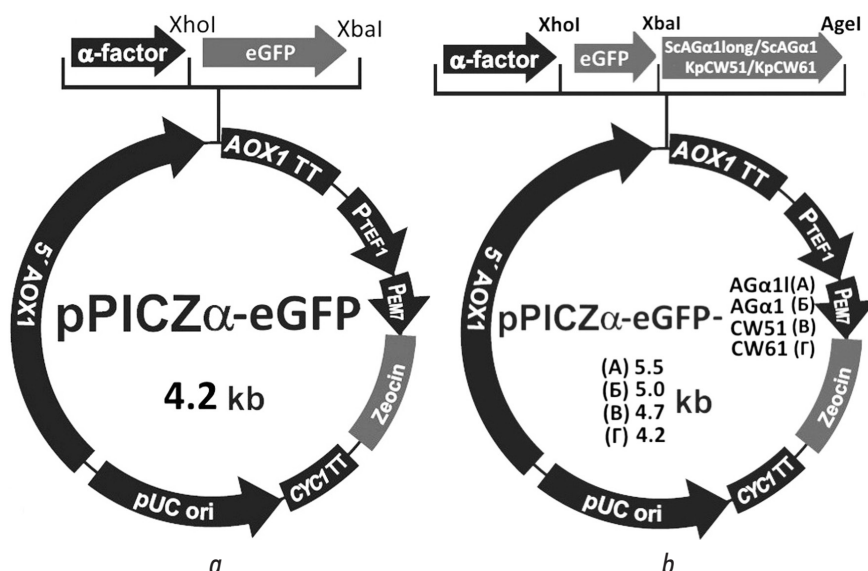


Рис. 1. Схема плазмид, полученных в работе: а — плаزمида с репортерным геном *eGFP*; б — полученные плазмиды с геном *eGFP* и генами белков клеточной стенки. 5'AOX1 — промотор гена *AOX1*, α-factor — альфа-фактор дрожжей; P_{TEF1} — дрожжевой промотор гена *TEF1*; P_{EM7} — бактериальный промотор; CYC1 TT — терминаторная область дрожжевого гена *CYC1*; *Zeocin* — ген устойчивости к зеоцину; pUC ori — ориджин-репликации; AOX1 TT — область терминации транскрипции гена *AOX1*; *eGFP* — ген репортерного белка; ScAGα1l (long), ScAGα1, KpCW51, KpCW61 — белки клеточной стенки; XhoI, XbaI, AgeI — сайты узнавания рестриктаз

Fig. 1. Schematic representation of the plasmids used in the work. а — plasmid with the *eGFP* reporter gene; б — obtained plasmids with the *eGFP* gene and cell wall protein genes. 5'AOX1 — *AOX1* gene promoter; α-factor — yeast alpha factor; P_{TEF1} — yeast promoter of the *TEF1* gene; P_{EM7} — bacterial promoter; CYC1 TT — terminator region of the yeast *CYC1* gene; *Zeocin* — zeocin resistance gene; pUC ori — origin replications; AOX1 TT — transcription termination region of the *AOX1* gene; *eGFP* — reporter protein gene; ScAGα1l (long), ScAGα1, KpCW51, KpCW61 — cell wall proteins; XhoI, XbaI, AgeI — restriction enzyme recognition sites

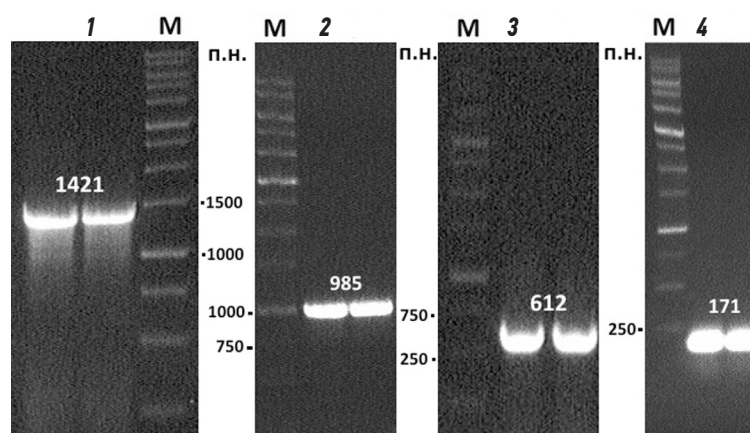


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами к генам *ScAg1long*, *ScAg1*, *KpCW51*, *KpCW61*. М — маркер NL001 (Евроген, Россия); 1 — *ScAg1long* (ожидаемый фрагмент — 1421 п.н.), 2 — *ScAg1* (ожидаемый фрагмент — 985 п.н.), 3 — *KpCW51* (ожидаемый фрагмент — 612 п.н.), 4 — *KpCW61* (ожидаемый фрагмент — 171 п.н.)

Fig. 2. Electrophoregram of PCR products with primers to the genes *ScAg1long*, *ScAg1*, *KpCW51*, *KpCW61*. М — marker NL001 (Eurogene, Russia); 1 — *ScAg1long* (expected fragment — 1421 bp), 2 — *ScAg1* (expected fragment — 985 bp), 3 — *KpCW51* (expected fragment — 612 bp), 4 — *KpCW61* (expected fragment — 171 bp)

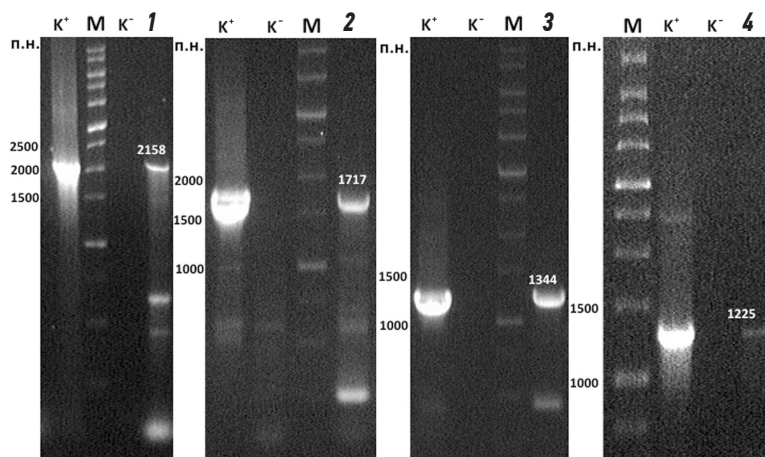


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР на матрице хромосомной ДНК дрожжевых трансформантов с генами *ScAg1long*, *ScAg1*, *KpCW51*, *KpCW61* в одной рамке считывания с геном репортерного белка eGFP с использованием обратных праймеров к соответствующим генам белков клеточной стенки и прямым праймером к гену белка eGFP (1–3) или праймером к фрагменту гена *AOX1* (4). М — маркер NL001 (Евроген, Россия); K⁺ — положительные контроли (плазмиды, которыми трансформировали исходный дрожжевой штам); K⁻ — отрицательные контроли (ПЦР реакционные смеси не содержащие матриц ДНК); 1 — *ScAg1long* (ожидаемый фрагмент — 2158 п.н.); 2 — *ScAg1* (ожидаемый фрагмент — 1717 п.н.); 3 — *KpCW51* (ожидаемый фрагмент — 1344 п.н.), 4 — *KpCW61* (ожидаемый фрагмент — 1225 п.н.)

Fig. 3. Electrophoregram of PCR products on a matrix of chromosomal DNA of yeast transformants with the *ScAg1long*, *ScAg1*, *KpCW51*, *KpCW61* genes in the same reading frame with the eGFP reporter protein gene using reverse primers to the corresponding cell wall protein genes and a forward primer to the eGFP protein gene (1–3) or primer to the fragment of the *AOX1* gene (4). М — NL001 marker (Evrogen, Russia); K⁺ — positive controls (plasmids used to transform the original yeast strain); K⁻ — negative controls (PCR reaction mixtures not containing DNA templates); 1 — *ScAg1long* (expected fragment — 2158 bp); 2 — *ScAg1* (expected fragment — 1717 bp); 3 — *KpCW51* (expected fragment — 1344 bp), 4 — *KpCW61* (expected fragment — 1225 bp)

подтверждено секвенированием. Таким образом, на первом этапе мы получили плазмиды, несущие в своем составе последовательности генов, кодирующие белки клеточной стенки дрожжей, — *ScAg1long*, *ScAg1*, *KpCW51*, *KpCW61* в одной рамке считывания с геном репортерного белка eGFP. Причем последовательность *ScAg1long* содержит собственную 3'-некодирующую область гена *ScAg1* дрожжей *S. cerevisiae*. В случае второго варианта *ScAg1*, в качестве 3'-терминирующей области представлена соответствующая последовательность гена *AOX1*

K. phaffii, которая содержится в векторе pPICZaB. Структура полученных плазмид представлена на рис. 1, б.

Получение штаммов дрожжей с последовательностями генов *ScAg1long*, *ScAg1*, *KpCW51*, *KpCW61* в одной рамке считывания с геном репортерного белка eGFP

Полученными плазмидами (рис. 1, б) трансформировали штамм дрожжей *K. phaffii* (X-33). Выделяли из полученных трансформантов хромосомную ДНК и проверяли методом ПЦР наличие вставок целевых конструкций. Результаты ПЦР представлены на рис. 3.

Анализ экспонирования репортерного белка eGFP на поверхности клеток методом конфокальной микроскопии

Полученные дрожжевые трансформанты выращивали в условиях индукции промотора гена *AOX1* и анализировали клетки с помощью конфокальной микроскопии. Результаты представлены на рис. 4.

Как видно из результатов микроскопии, все полученные штаммы кроме контрольного синтезируют и экспонируют репортерный белок eGFP. Можно сделать предварительный вывод, что наиболее эффективно репортерный белок eGFP выводит на клеточную поверхность вариант белка ScAgα1p, структурный ген которого был клонирован без 3'-нетранслируемой области, и собственный белок клеточной стенки дрожжей *K. phaffii* — KpCW51p. Наихудшие результаты показывает белок KpCW61p дрожжей *K. phaffii* и белок ScAgα1p, структурный ген которого был клонирован с собственной 3'-нетранслируемой областью.

Анализ содержания репортерного белка eGFP на поверхности клеток методом флуоресцентной спектрометрии

На следующем этапе проводили количественный анализ флуоресценции репортерного белка eGFP

у полученных штаммов. Полученные дрожжевые трансформанты выращивали в условиях индукции промотора гена *AOX1* и анализировали клетки и культуральную жидкость (КЖ) с помощью спектрофлуориметра (поглощение 485 нм, эмиссия 520 нм). Помимо этого, при помощи меченых красителем Cy3 антител к белку eGFP на поверхности клеток определяли относительную флуоресценцию на спектрофлуориметре (поглощение 540 нм, эмиссия 570 нм). Данные представлены на рис. 5.

Данные свидетельствуют, что вариант белка ScAgα1p, структурный ген которого не содержит нативной 3'-некодирующей области, во всех опытах показывает наилучшие результаты в качестве якорного белка. Во всех вариантах штаммов кроме контрольного в КЖ детектируется наличие репортерного белка eGFP. Доля секретируемого белка eGFP по отношению к закрепленному на поверхности составляет от 56 % с якорем KpCW51 до 68 % с якорем ScAgα1p.

ОБСУЖДЕНИЕ

Дрожжевой дисплей — эффективная технология выведения на поверхность клетки целевых белков посредством их слияния с белками клеточной стенки.

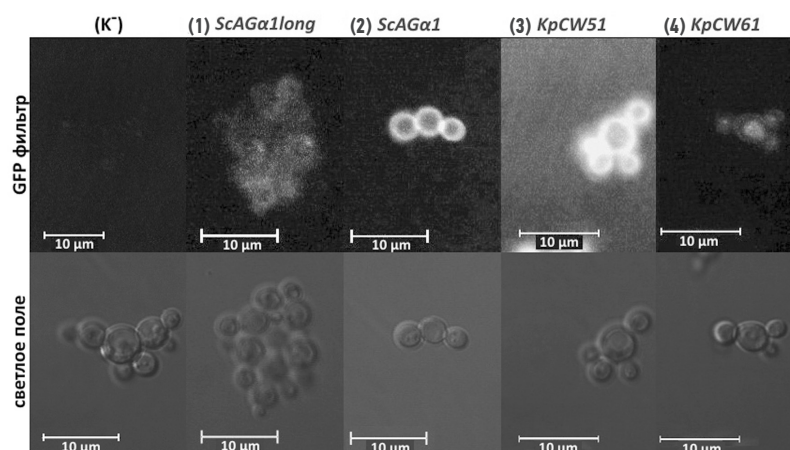


Рис. 4. Конфокальная микроскопия полученных штаммов с репортерным белком eGFP. В качестве контрольного варианта (K⁻) использовали клетки исходного штамма *K. phaffii* X-33

Fig. 4. Confocal microscopy of obtained strains with eGFP reporter protein. Cells of the original strain *K. phaffii* X-33 were used as a control variant (K⁻)

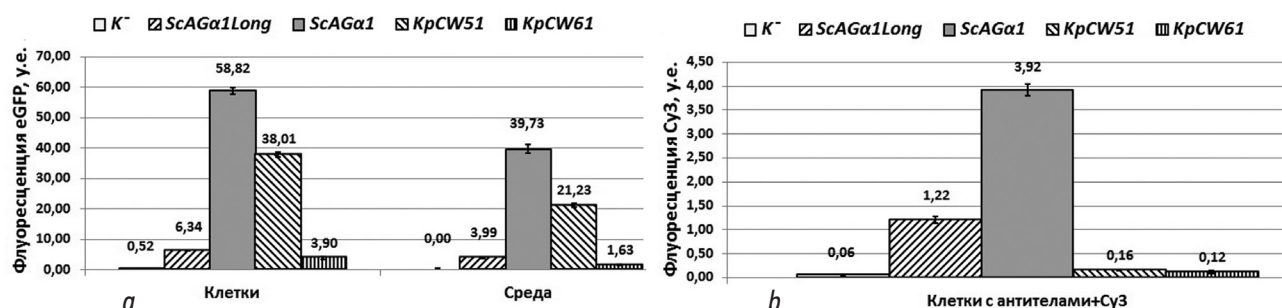


Рис. 5. Флуоресценция клеток с белком eGFP (a) и меченых красителем Cy3-антител к белку eGFP (b). Данные представлены со стандартной ошибкой среднего. K⁻ — исходный штамм X-33

Fig. 5. Cells fluorescence with the eGFP protein (a) and dye-labeled Cy3 antibodies to the eGFP protein (b). Data are presented with standard error of the mean. K⁻ — original strain X-33

Поиск и характеристика белков, позволяющих эффективно экспонировать целевые белки на поверхности клеток *K. phaffii*, является актуальной задачей. В нашей работе мы оценили эффективность двух вариантов белка клеточной стенки ScAGa1p дрожжей *S. cerevisiae*, кодирующая последовательность которых отличалась наличием/отсутствием 3'-фланкирующей области, и собственных белков *K. phaffii* — KpCW51p, KpCW61p для экспонирования белков на поверхности клеток *K. phaffii*.

ScAGa1p (α-агглютинин) — гликопротеин клеточной стенки, опосредующий адгезию клеток *S. cerevisiae* в процессе полового размножения, находится на поверхности α-клеток *S. cerevisiae*. Он взаимодействует с α-агглютинином из клеток α-типа через домен на своем N-конце. ScAGa1p был первым белком, использованным для экспонирования гетерологичных белков на поверхности клеток дрожжей [3]. Ранее в отдельных исследованиях была показана функциональность для *K. phaffii* вариантов белка ScAGa1p, кодирующие последовательности которых содержали 3'-фланкирующую последовательность или были лишены ее. Но в этих работах не проводили сравнение эффективности экспрессии вариантов гена. Мы предположили, что фланкирующая 3'-последовательность может оказывать влияние на экспрессию, так как известно, что она играет роль в реакции полиаденилирования и регуляции, может быть мишенью для регуляторных белков. Поэтому мы взяли две последовательности гена белка ScAGa1p: 1) с нативной 3'-некодирующей областью из *S. cerevisiae* (*ScAGa1long*), 2) с 3'-некодирующей областью от гена *K. phaffii* AOX1, которая присутствует в исходном векторе для клонирования pPICZαB (*ScAGa1*).

Другие белки в нашем исследовании являются собственными белками *K. phaffii* — это KpCW51p и KpCW61p. KpCW51p — белок размером 211 аминокислот, KpCW61p — 65 аминокислот — самый маленький белок с GPI-якорем, который демонстрировал способность выводить на поверхность клеток *K. phaffii* репортерные белки в исследовании L. Zhang и соавт. [24]. В обоих случаях поиск авторами доменов по базам данным Interproscan не дал результатов, а база NCBI определяет их как «неизвестные гипотетические белки». Известно, что белки клеточной стенки дрожжей часто являются гликопротеинами. Анализ авторов показывает, что KpCW51p предположительно имеет 27 сайтов O-linked гликозилирования, а KpCW61p всего 6, из которых 3 O-linked и 3 N-linked. Эти два белка продемонстрировали самую высокую эффективность выведения на поверхность репортерного белка — CALB [24].

Сравнение флуоресценции репортерного белка eGFP у полученных штаммов

Результаты конфокальной микроскопии (рис. 4) показывают, что якорные белки KpCW51p и ScAGa1p наиболее эффективно выводят и задерживают на поверхности клетки репортерный белок eGFP. Причем за синтез

белка ScAGa1p отвечает последовательность *ScAGa1* — без собственной 3'-некодирующей области. Наихудшие результаты показал белок ScAGa1p, кодируемый последовательностью *ScAGa1long*, и белок KpCW61p. Можно заметить, что флуоресценция в случае с белком KpCW61p детектируется в основном в сферической области внутри клетки и лишь небольшое свечение наблюдается на поверхности. Вероятно, происходит накопление репортерного белка, слитого с белком KpCW61p, в эндоплазматическом ретикулуме, это свидетельствует о неэффективном прохождении секреторного пути по сравнению с другими представленными белками. Свечение репортерного белка ScAGa1p с кодирующей последовательностью *ScAGa1long* слабое и равномерно распределено по клетке.

Данные выводы подтверждает и количественная оценка флуоресценции белка eGFP, как в клетках, так и в культуральной жидкости. На рис. 5, а мы видим, что флуоресценция репортерного белка с вариантом гена *ScAGa1* — максимальная, и в 9 раз более интенсивная, чем с вариантом гена *ScAGa1long*. Вероятно, что нативная последовательность 3'-некодирующей области *S. cerevisiae* в последовательности *ScAGa1long* оказывает негативное влияние на экспрессию гена в *K. phaffii*, что приводит к снижению уровня белка ScAGa1p.

Наихудший результат в выведении репортерного белка на поверхность клетки показывает белок KpCW61p, хотя ранее в публикациях он показывал хорошую эффективность для дисплея *K. phaffii* — для выведения репортерного белка CALB [24] и фермента липазы *T. lanuginosus* [25]. Вероятно, в случае небольших якорных белков — гликопротеинов — на эффективность может оказывать ряд факторов. Это гетерогенность углеводного компонента, линкер, связывающий целевой белок с якорным и сам целевой белок. В нашем исследовании совокупность негативных факторов резко понизила его эффективность в качестве якорного белка для дрожжевого дисплея белка eGFP у *K. phaffii*. Возможно, при использовании специального линкера и с другими целевыми белками KpCW61p будет более эффективным.

При всех вариантах исследуемых якорных белков мы видим, что в КЖ выращиваемых штаммов детектируется флуоресценция, а значит, репортерный белок eGFP не весь удерживается на поверхности клеток полученных штаммов, а «сваливается» в КЖ. Данные флуоресценции КЖ коррелируют с данными свечения клеток — наиболее сильная флуоресценция детектируется в штаммах с последовательностями *ScAGa1* и *KpCW51*, кодирующими белки ScAGa1p и KpCW51p. Вероятно, это происходит из-за сильного промотора гена *AOX1*, который обеспечивает сверхэкспрессию генов под его контролем. Уровень синтеза белка eGFP, слитого с исследуемыми якорными белками, сильно превышает доступную емкость поверхности клетки. Известно, например, что ген *ScAGa1* под контролем нативного промотора имеет низкий конститутивный

уровень экспрессии, повышение которого вызывается лишь феромонами клеток противоположного типа спаривания [30].

Сравнение флуоресценции СуЗ-антител к белку eGFP на поверхности клеток

Данные флуоресценции меченых антител к eGFP подтверждают, что самый эффективный якорный белок из сравниваемых — белок ScAGa1p из дрожжей *S. cerevisiae*, кодируемый последовательностью без собственной 3'-нетранслируемой области. Следует отметить, что флуоресценция СуЗ-антител к белку eGFP, слитого с нативным белком KpCW51p, резко упала и перестала отличаться от данных флуоресценции контрольного штамма и штамма с белком KpCW61p. Вероятно, репортерный белок eGFP экспонируется и закрепляется при помощи белка KpCW51p таким образом, что становится недоступным для антител. Можно предположить, что определенную роль в этом могут играть углеводные остатки белка KpCW51p, которые экранируют участки белка eGFP, узнаваемые антителами. То, что синтез и секреция белка eGFP, слитого с KpCW51p, происходит эффективно, свидетельствуют данные флуоресценции клеток и культуральной жидкости. Данное обстоятельство надо учитывать при выборе якорных белков для дрожжевого дисплея — применение белка KpCW51p для вывода на поверхность клетки антител может оказаться неэффективным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы были получены плазмиды, содержащие последовательности генов якорных белков — ScAGa1p из дрожжей *S. cerevisiae* и KpCW51p, KpCW61p из *K. phaffii* в одной рамке считывания с геном репортерного белка eGFP. Получены штаммы дрожжей, экспонирующие на своей поверхности репортерный белок eGFP посредством исследуемых белков клеточной стенки.

В результате сравнения исследованных белков был выбран наиболее эффективный якорный белок для выведения на поверхность клетки целевого белка. Это белок ScAGa1p, причем последовательность его гена не должна содержать нативной 3'-нетранслируемой области

из *S. cerevisiae*. Эффективность белка KpCW61p оказалась наихудшей, что отличается от известных данных. Вероятно, его эффективность в качестве якорного белка может зависеть от ряда факторов, в том числе — выводимого на поверхность клетки белка и линкера между ними.

Полученные в работе данные и плазмиды позволяют получать штаммы дрожжей *K. phaffii*, эффективно экспонирующие на своей поверхности белки, в том числе антигены. Такие штаммы можно будет использовать в качестве вакцинных препаратов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Вклад каждого автора: М.А. Цыганков — проведение экспериментов, написание текста рукописи; А.М. Румянцев — планирование и проведение экспериментов; А.С. Макеева — проведение экспериментов; М.В. Падкина — разработка концепции исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Санкт-Петербургского государственного университета (грант № 75428571).

ADDITIONAL INFORMATION

Author contribution. Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study. Contribution of each authors: M.A. Tsygankov — conducting experiments, writing the text of the manuscript, A.M. Romyantsev — planning and conducting experiments, A.S. Makeeva — conducting experiments, M.V. Padkina — research concept.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Funding source. The study was carried out with the financial support of Saint Petersburg State University (grant No. 75428571).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smith G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface // *Science*. 1985. Vol. 228, No. 4705. P. 1315–1317. DOI: 10.1126/science.4001944
2. Ueda M. Establishment of cell surface engineering and its development // *Biosci Biotechnol Biochem*. 2016. Vol. 80, No. 7. P. 1243–1253. DOI: 10.1080/09168451.2016.1153953
3. Schreuder M.P., Brekelmans S., van den Ende H., Klis F.M. Targeting of a heterologous protein to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast*. 1993. Vol. 9, No. 4. P. 399–409. DOI: 10.1002/yea.320090410
4. Boder E.T., Wittrup K.D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries // *Nat Biotechnol*. 1997. Vol. 15, No. 6. P. 553–557. DOI: 10.1038/nbt0697-553
5. Kurtzman C.P. Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis // *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009. Vol. 36, No. 11. P. 1435–1438. DOI: 10.1007/s10295-009-0638-4

6. Kim S.-Y., Sohn J.-H., Pyun Y.-R., Choi E.-S. A cell surface display system using novel GPI-anchored proteins in *Hansenula polymorpha* // *Yeast*. 2002. Vol. 19, No. 13. P. 1153–1163. DOI: 10.1002/yea.911
7. Tanaka T., Yamada R., Ogino C., Kondo A. Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012. Vol. 95, No. 3. P. 577–591. DOI: 10.1007/s00253-012-4175-0
8. Bielen A., Teparic R., Vujaklija D., Mrsa V. Microbial anchoring systems for cell-surface display of lipolytic enzymes // *Food Technol Biotechnol*. 2014. Vol. 52, No. 1. P. 16–34.
9. Wasilenko J.L., Sarmento L., Spatz S., Pantin-Jackwood M. Cell surface display of highly pathogenic avian influenza virus hemagglutinin on the surface of *Pichia pastoris* cells using alpha-agglutinin for production of oral vaccines // *Biotechnol Prog*. 2010. Vol. 26, No. 2. P. 542–547. DOI: 10.1002/btpr.343
10. Lei H., Jin S., Karlsson E., et al. Yeast surface-displayed H5N1 avian influenza vaccines // *J Immunol Res*. 2016. Vol. 2016. ID4131324. DOI: 10.1155/2016/4131324
11. Angelini A., Chen T.F., de Picciotto S., et al. Protein Engineering and selection using yeast surface display // *Methods Mol Biol*. 2015. Vol. 1319. P. 3–36. DOI: 10.1007/978-1-4939-2748-7_1
12. Cherf G.M., Cochran J.R. Applications of yeast surface display for protein engineering // *Methods Mol Biol*. 2015. Vol. 1319. P. 155–175. DOI: 10.1007/978-1-4939-2748-7_8
13. Pack S.P., Park K., Yoo Y.J. Enhancement of β -glucosidase stability and cellobiose-usage using surface-engineered recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in ethanol production // *Biotechnology Letters*. 2002. Vol. 24. P. 1919–1925. DOI: 10.1023/A:1020908426815
14. Andreu C., Del Olmo M.L. Yeast arming systems: pros and cons of different protein anchors and other elements required for display // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018. Vol. 102, No. 6. P. 2543–2561. DOI: 10.1007/s00253-018-8827-6
15. Mattanovich D., Callewaert N., Rouzé P., et al. Open access to sequence: browsing the *Pichia pastoris* genome // *Microb Cell Fact*. 2009. Vol. 8. ID53. DOI: 10.1186/1475-2859-8-53
16. Cereghino J.L., Cregg J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* // *FEMS Microbiol Rev*. 2000. Vol. 24, No. 1. P. 45–66. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x
17. Падкина М.В., Самбук Е.В. Перспективы использования дрожжевого дисплея в биотехнологии и клеточной биологии (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2018. Т. 54, № 4. С. 337–351. DOI: 10.7868/S0555109918040013
18. Ahmad M., Hirz M., Pichler H., Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014. Vol. 98, No. 12. P. 5301–5317. DOI: 10.1007/s00253-014-5732-5
19. Prabhu A.A., Boro B., Bharali B., et al. Gene and process level modulation to overcome the bottlenecks of recombinant proteins expression in *Pichia pastoris* // *Curr Pharm Biotechnol*. 2017. Vol. 18, No. 15. P. 1200–1223. DOI: 10.2174/1389201019666180329112827
20. Cereghino G.P.L., Cereghino J.L., Ilgen C., Cregg J.M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris* // *Curr Opin Biotechnol*. 2002. Vol. 13, No. 4. P. 329–332. DOI: 10.1016/S0958-1669(02)00330-0
21. Gaboardi G.C., Alves D., de los Santos D.G., et al. Influence of *Pichia pastoris* X-33 produced in industrial residues on productive performance, egg quality, immunity, and intestinal morphometry in quails // *Sci Rep*. 2019. Vol. 9, No. 1. ID 15372. DOI: 10.1038/s41598-019-51908-0
22. Mergler M., Wolf K., Zimmermann M. Development of a bisphe-nol A-adsorbing yeast by surface display of the *Kluyveromyces* yellow enzyme on *Pichia pastoris* // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004. Vol. 63, No. 4. P. 418–421. DOI: 10.1007/s00253-003-1361-0
23. Wang Q., Li L., Chen M., et al. Construction of a novel system for cell surface display of heterologous proteins on *Pichia pastoris* // *Biotechnol Lett*. 2007. Vol. 29, No. 10. P. 1561–1566. DOI: 10.1007/s10529-007-9430-6
24. Zhang L., Liang S., Zhou X., et al. Screening for glycosylphosphatidylinositol-modified cell wall proteins in *Pichia pastoris* and their recombinant expression on the cell surface // *Appl Environ Microbiol*. 2013. Vol. 79, No. 18. P. 5519–5526. DOI: 10.1128/AEM.00824-13
25. Yang J., Huang K., Xu X., et al. Cell Surface Display of *Thermomyces lanuginosus* Lipase in *Pichia pastoris* // *Front Bioeng Biotechnol*. 2020. Vol. 8. ID544058. DOI: 10.3389/fbioe.2020.544058
26. Matsuda T., Cepko C.L. Electroporation and RNA interference in the rodent retina *in vivo* and *in vitro* // *PNAS USA*. 2004. Vol. 101, No. 1. P. 16–22. DOI: 10.1073/pnas.2235688100
27. Wu S., Letchworth G.J. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol // *Biotechniques*. 2004. Vol. 36, No. 1. P. 152–154. DOI: 10.2144/04361DD02
28. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Москва: Мир, 1984.
29. graphpad.com [Электронный ресурс]. GraphPad Prism software [дата обращения: 2022 Oct 10]. Доступ по ссылке: <https://www.graphpad.com/>
30. Lipke P.N., Kurjan J. Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins // *Microbiol Rev*. 1992. Vol. 56, No. 1. P. 180–194. DOI: 10.1128/mr.56.1.180-194.1992

REFERENCES

1. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985;228(4705):1315–1317. DOI: 10.1126/science.4001944
2. Ueda M. Establishment of cell surface engineering and its development. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2016;80(7):1243–1253. DOI: 10.1080/09168451.2016.1153953
3. Schreuder MP, Brekelmans S, van den Ende H, Klis FM. Targeting of a heterologous protein to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1993;9(4):399–409. DOI: 10.1002/yea.320090410
4. Boder ET, Wittrup KD. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol*. 1997;15(6):553–557. DOI: 10.1038/nbt0697-553
5. Kurtzman CP. Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009;36(11):1435–1438. DOI: 10.1007/s10295-009-0638-4
6. Kim S.-Y., Sohn J.-H., Pyun Y.-R., Choi E.-S. A cell surface display system using novel GPI-anchored proteins in *Hansenula polymorpha*. *Yeast*. 2002;19(13):1153–1163. DOI: 10.1002/yea.911

7. Tanaka T, Yamada R, Ogino C, Kondo A. Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;95(3):577–591. DOI: 10.1007/s00253-012-4175-0
8. Bielen A, Teparic R, Vujaklija D, Mrsa V. Microbial anchoring systems for cell-surface display of lipolytic enzymes. *Food Technol Biotechnol.* 2014;52(1):16–34.
9. Wasilenko JL, Sarmento L, Spatz S, Pantin-Jackwood M. Cell surface display of highly pathogenic avian influenza virus hemagglutinin on the surface of *Pichia pastoris* cells using alpha-agglutinin for production of oral vaccines. *Biotechnol Prog.* 2010;26(2):542–547. DOI: 10.1002/btpr.343
10. Lei H, Jin S, Karlsson E, et al. Yeast surface-displayed H5N1 avian influenza vaccines. *J Immunol Res.* 2016;2016:4131324. DOI: 10.1155/2016/4131324
11. Angelini A, Chen TF, de Picciotto S, et al. Protein engineering and selection using yeast surface display. *Methods Mol Biol.* 2015;1319:3–36. DOI: 10.1007/978-1-4939-2748-7_1
12. Cherf GM, Cochran JR. Applications of yeast surface display for protein engineering. *Methods Mol Biol.* 2015;1319:155–175. DOI: 10.1007/978-1-4939-2748-7_8
13. Pack SP, Park K, Yoo YJ. Enhancement of β -glucosidase stability and cellobiose-usage using surface-engineered recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in ethanol production. *Biotechnology Letters.* 2002;24:1919–1925. DOI: 10.1023/A:1020908426815
14. Andreu C, Del Olmo ML. Yeast arming systems: pros and cons of different protein anchors and other elements required for display. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(6):2543–2561. DOI: 10.1007/s00253-018-8827-6
15. Mattanovich D, Callewaert N, Rouzé P, et al. Open access to sequence: browsing the *Pichia pastoris* genome. *Microb Cell Fact.* 2009;8:53. DOI: 10.1186/1475-2859-8-53
16. Cereghino JL, Cregg JM. 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
17. Padkina MV, Sambuk EV. Prospects for the application of yeast display in biotechnology and cell biology (review). *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2018;54(4):337–351. (In Russ.) DOI: 10.7868/S0555109918040013
18. Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(12):5301–5317. DOI: 10.1007/s00253-014-5732-5
19. Prabhu AA, Boro B, Bharali B, et al. Gene and process level modulation to overcome the bottlenecks of recombinant proteins expression in *Pichia pastoris*. *Curr Pharm Biotechnol.* 2017;18(15):1200–1223. DOI: 10.2174/1389201019666180329112827
20. Cereghino GPL, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;13(4):329–332. DOI: 10.1016/S0958-1669(02)00330-0
21. Gaboardi GC, Alves D, de los Santos DG, et al. Influence of *Pichia pastoris* X-33 produced in industrial residues on productive performance, egg quality, immunity, and intestinal morphometry in quails. *Sci Rep.* 2019;9(1):15372. DOI: 10.1038/s41598-019-51908-0
22. Mergler M, Wolf K, Zimmermann M. Development of a bisphenol A-adsorbing yeast by surface display of the *Kluyveromyces* yellow enzyme on *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;63(4):418–421. DOI: 10.1007/s00253-003-1361-0
23. Wang Q, Li L, Chen M, et al. Construction of a novel system for cell surface display of heterologous proteins on *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett.* 2007;29(10):1561–1566. DOI: 10.1007/s10529-007-9430-6
24. Zhang L, Liang S, Zhou X, et al. Screening for glycosylphosphatidylinositol-modified cell wall proteins in *Pichia pastoris* and their recombinant expression on the cell surface. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(18):5519–5526. DOI: 10.1128/AEM.00824-13
25. Yang J, Huang K, Xu X, et al. Cell surface display of *Thermomyces lanuginosus* lipase in *Pichia pastoris*. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:544058. DOI: 10.3389/fbioe.2020.544058
26. Matsuda T, Cepko CL. Electroporation and RNA interference in the rodent retina *in vivo* and *in vitro*. *PNAS USA.* 2004;101(1):16–22. DOI: 10.1073/pnas.2235688100
27. Wu S, Letchworth GJ. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques.* 2004;36(1):152–154. DOI: 10.2144/04361DD02
28. Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.* Moscow: Mir, 1984. (In Russ.)
29. graphpad.com [Internet]. *GraphPad Prism software* [cited 2022 Oct 10]. Available at: <https://www.graphpad.com/>
30. Lipke PN, Kurjan J. Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol Rev.* 1992;56(1):180–194. DOI: 10.1128/mr.56.1.180-194.1992

ОБ АВТОРАХ

***Михаил Александрович Цыганков**, инженер-исследователь, биологический факультет, кафедра генетики и биотехнологии, лаборатория биохимической генетики; адрес: Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2513-6655>; Scopus: 56252740000; eLibrary SPIN: 1098-0995; e-mail: mial.tsygankov@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

AUTHORS' INFO

***Mikhail A. Tsygankov**, Engineer-Researcher, Faculty of Biology, Department of Genetics and Biotechnology, Laboratory of biochemical genetics; address: 7/9, Universitetskaya emb., Saint Petersburg, 199034, Russia; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2513-6655>; Scopus: 56252740000; eLibrary SPIN: 1098-0995; e-mail: mial.tsygankov@yandex.ru

ОБ АВТОРАХ

Андрей Михайлович Румянцев, канд. биол. наук, ст. научн. сотр., биологический факультет, кафедра генетики и биотехнологии, лаборатория биохимической генетики;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1744-3890>;
Scopus: 55370658800; eLibrary SPIN: 9335-1184;
e-mail: rumyantsev-am@mail.ru

Анастасия Станиславовна Макеева, инженер-исследователь, аспирантка, биологический факультет, кафедра генетики и биотехнологии, лаборатория биохимической генетики;
eLibrary SPIN: 1412-8449; e-mail: anastasimakeeva@mail.ru

Марина Владимировна Падкина, д-р биол. наук, профессор, биологический факультет, кафедра генетики и биотехнологии, лаборатория биохимической генетики;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4051-4837>;
Scopus: 6602596755; eLibrary SPIN: 7709-0449;
e-mail: mpadkina@mail.ru

AUTHORS' INFO

Andrey M. Rumyantsev, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Associate, Faculty of Biology, Department of Genetics and Biotechnology, Laboratory of biochemical genetics;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1744-3890>;
Scopus: 55370658800; eLibrary SPIN: 9335-1184;
e-mail: rumyantsev-am@mail.ru

Anastasiya S. Makeeva, Engineer-Researcher, Postgraduate Student, Faculty of Biology, Department of Genetics and Biotechnology, Laboratory of biochemical genetics;
eLibrary SPIN: 1412-8449; e-mail: anastasimakeeva@mail.ru

Marina V. Padkina, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Faculty of Biology, Department of Genetics and Biotechnology, Laboratory of biochemical genetics;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4051-4837>;
Scopus: 6602596755; eLibrary SPIN: 7709-0449;
e-mail: mpadkina@mail.ru